



**Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Química**

**“RESOLUCIÓN BIOCATALÍTICA DE
ENANTIÓMEROS DEL IBUPROFENO”**

Tesis Doctoral

Bioquímica Carla José

DIRECTORA: Prof. Dra. Laura E. Briand

AÑO: 2013

Trabajo presentado para optar al Grado Académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, área Química (UNLP).

El mismo fue desarrollado en su totalidad en los laboratorios del **Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas “Dr. Jorge J. Ronco” (CINDECA)**, dependiente de **CONICET** y de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (**UNLP**).

La Plata, Febrero 2013

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al iniciar el doctorado nunca imaginé encontrar tan buenos amigos y compañeros de trabajo, personas que en los momentos difíciles han conseguido hacerme reír. Gracias y muchas gracias a todas las personas del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas – Dr. Jorge J. Ronco(CINDECA), que de una forma u otra participaron en el desarrollo de esta Tesis ya sea discutiendo sobre ciencia como dándome su solidaridad y apoyo personal.

Mi primer agradecimiento especial es para mí directora de Tesis, la Dra. Laura E. Briand, por su confianza, apoyo y compromiso constante. Gracias por su cariño y comprensión. Gracias por ser mucho más de lo que esperaba de una directora de Tesis.

Un agradecimiento especial a mi familia, que siempre me apoyó sin saber muy bien de que se trataba todo esto de “la ciencia”. Gracias por preferir darme un futuro mejor sacrificando algo tan valioso como es el estar juntos. Gracias por cada llamada, cada rezo, cada vela encendida..... siempre los extrañé y los sigo extrañando!!!

A mis dos hombres platenses, Nico y Santi, que han tenido que soportar con amor y paciencia mis nervios, desilusiones, inseguridades y obsesiones por esta Tesis. Gracias por ser el cable a tierra, son la más importante de mi vida.

A mis compañeras de grupo, Silvana Matkovic y M. Victoria Toledo, quiero agradecerles la armonía del grupo de trabajo que es algo valiosísimo. Vic gracias por tu colaboración cuando el tiempo me corría. Sil, gracias por las extensas charlas de café, que podían terminar quien sabe en qué lugar del país o el mundo..... ¡qué bien la pasamos!. Gracias por escucharme, aconsejarme, gracias por tu optimismo.

Quiero agradecer especialmente a mis compañeros del tercer piso, Oriana, Graciela, Jorge, Luis, Vicky Curia, Negrito Julio y Andrés, con quienes compartí gran cantidad de horas, casi siempre dándoles las espaldas preocupada en largar más y más reacciones, por lo que les pido perdón. También debo pedir perdón por el torturante shacker. Gracias por el ambiente ameno que siempre me brindaron, gracias por estar dispuestos a una pregunta o a arreglar un equipo, gracias a todos simplemente por estar ahí.

Oriana, tengo que agradecerte por presentarme a mi directora de Tesis, hecho fundamental de toda esta historia. Además, quiero agradecerte tu amistad y compañía.

A Graciela Valle, gracias por su calidez y amabilidad, gracias por su colaboración continua con las medidas de IR.

Agradezco a Luis Gambaro por las medidas de TPSR-TPD.

Agradezco a Rita Bonetto por las medidas de microscopía electrónica y su excelente predisposición para explicarme y acercarme material para comprender este tema.

Quiero agradecer al Dr. Carlos Llerena-Suster y La Dra. Susana Morcelle, por sus aportes a este trabajo y buena predisposición a todas mis preguntas. Realmente está muy bueno trabajar juntos.

Gracias al Dr. Jaiver Osorio por su colaboración con medidas en HPLC.

Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas y financiamiento otorgado.

Agradezco a la Universidad Nacional de La Plata por los proyectos acreditados otorgados.

Agradezco al Instituto Nacional de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC)- UNL-CONICET, Santa Fe, Argentina. Especialmente al Dr. Sebastián Collins quien me recibió en esa ciudad y me enseñó a realizar y analizar las medidas de infrarrojo asociadas a intercambio isotópico con excelente predisposición y compromiso.

Quiero agradecer a mis compañeros de Cátedra, Química Analítica, con quienes compartí muy buenos momentos y me aliviaron el trabajo en este último tramo. También a Gabriel Saticq, ex compañero de introducción a la Química y compañero del CINDECA, por escuchar mis miedos de docente y becario principiante, que aguante!!

Nuevamente quiero mencionar el agradecimiento a todo el personal del CINDECA. Necesito agradecer enormemente a la gente de recepción, contaduría y ordenanza, por su buena onda diaria, tal vez la más importante, ya que siempre fueron el primer encontronazo laboral de día.

Muchísimas gracias a todos!!!!!!!

INDICE

RESUMEN	1
CAPITULO 1: INTRODUCCION Y OBJETIVOS	
1.Introducción	6
1.1.Antiinflamatorios no esteroides (AINEs)	7
1.1.1 Definición y estructura química	7
1.1.2. Mecanismo de acción y nueva clasificación	10
1.1.3. Efectos adversos y otros	13
1.2. (R/S)-ibuprofeno	15
1.2.1. Relación acción - enantioselectividad. Importancia de la resolución racémica	15
1.2.2. Métodos aplicados a la resolución racémica de ibuprofeno	19
1.2.3. Resolución racémica enzimática de ibuprofeno. Antecedentes	23
1.3. Objetivo de la Tesis	24
1.4. Referencias bibliográficas. Capítulo 1	24
CAPITULO 2: ENZIMAS EN BIOCATÁLISIS	
2.1. Enzimas: definición y estructura	28
2.2. Nomenclatura y clasificación de enzimas	34
2.3. Catálisis enzimática	35
2.3.1. Generalidades como catalizadores	35
2.3.2. Catálisis en medios no convencionales	38
2.3.3. Sistemas con co-solventes orgánicos: metodologías y ventajas	41
2.4. Lipasas	42
2.4.1. Función biológica	42
2.4.2. Estructura y mecanismo de acción	43
2.4.3. Homologías estructurales entre lipasas. Especificidad de sustrato	47
2.4.4. Reacciones catalizadas por lipasas	53

2.4.5. Aplicaciones biotecnológicas de lipasas	54
2.4.6. Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	57
2.5. Referencias bibliográficas. Capítulo 2	62

CAPITULO 3: INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

3.1. Aspectos generales sobre la inmovilización de enzimas	67
3.2. Métodos de inmovilización de enzimas	70
3.2.1. Métodos de inmovilización de enzimas por retención física	71
3.2.1.1. Atrapamiento	71
3.2.1.2. Inclusión en membranas	72
3.2.2. Métodos de inmovilización por unión química	72
3.2.2.1. Unión a soportes	72
3.2.2.2. Reticulado	76
3.2.3. Elección del método de inmovilización	77
3.3. Biocatalizador comercial Novozym® 435	78
3.3.1. Composición y estructura	78
3.3.2. Aplicaciones de Novozym® 435	81
3.4. Referencias bibliográficas. Capítulo 3	81

CAPITULO 4: ESTERIFICACIÓN DE (R/S)-IBUPROFENO UTILIZANDO ETANOL COMO REACTIVO Y SOLVENTE: UN PROCESO ECO-COMPATIBLE.

4.1. Estudio paramétrico de la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con etanol, catalizada por Novozym® 435. Estrategia general del estudio	85
4.2. Metodología experimental	86
4.2.1. Sistema de reacción	86
4.2.2. Metodología de análisis cuali y cuantitativo	87
4.3. Calculo de parámetros de enantioselectividad: ee, EF, E.	90
4.4. Resultados y discusión	93
4.4.1. Efecto del contenido inicial de agua	93
4.4.2. Efecto del volumen de etanol. Relación molar entre sustratos	96

4.4.3. Efecto de la temperatura de reacción	99
4.4.4. Efecto de la masa de catalizador	100
4.4.5. Estudio cinético bajo condiciones óptimas de reacción	102
4.5. Reusos de Novozym® 435 en condiciones óptimas de reacción	103
4.6. Conclusiones	105
4.7. Referencias bibliográficas. Capítulo 4	105

CAPITULO 5: ESTRATEGIAS PARA LA INVESTIGACIÓN DE LAS CAUSAS DE DESACTIVACIÓN. FUNDAMENTOS.

5.1. Generalidades del estudio	109
5.2. Isotermas de adsorción	111
5.3. Reacción superficial a temperatura programada	112
5.4. Desorción a temperatura programada	114
5.5. Tratamientos con etanol	114
5.6. Análisis por espectroscopia infrarroja y determinación de la estructura secundaria de proteínas	116
5.6.1. Espectroscopia de infrarrojo: fundamentos teóricos. Espectro IR de proteínas. Determinación de la estructura secundaria de las proteínas	116
5.6.2. Descripción del equipo utilizado y metodología	117
5.7. Remoción de proteínas desde Novozym® 435	118
5.8. Análisis textural por microscopía electrónica medioambiental	119
5.8.1. Microscopio electrónico de barrido. Fundamento	119
5.8.2. Descripción del equipo y metodología utilizada	120
5.9. Cuantificación de proteínas	121
5.9.1. Procedimiento para la precipitación cuantitativa de proteínas	121
5.9.2. Cuantificación de proteínas mediante espectroscopia UV-Visible	122
5.9.2.1. Espectroscopia UV-Visible: fundamentos – Absorción UV-Vis de proteínas	122
5.9.2.2. Equipo y metodología utilizada	125
5.9.3. Ensayo del ácido bicinónico	126
5.9.3.1. Fundamento	126

5.9.3.2. Metodología empleada	127
5.10. Referencias bibliográficas. Capítulo 5.	130

CAPITULO 6: EFECTO DEL ETANOL Y ETANOL-AGUA EN EL BIOCATALIZADOR COMERCIAL NOVOZYM® 435. RESULTADOS Y DISCUSION.

6.1. Adsorción de ibuprofeno sobre Novozym® 435	134
6.2. Disolución del soporte de Novozym® 435 por contacto con etanol	135
6.3. Cuantificación del efecto del etanol sobre Novozym® 435	140
6.4. Evolución de la estructura secundaria de Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	143
6.5. Interacción superficial de etanol con Novozym® 435	146
6.6. Efecto del etanol sobre la textura interna y externa de Novozym® 435	152
6.7. Discusión de resultados	156
6.8. Conclusiones	160
6.9. Referencias bibliográficas. Capítulo 6	161

CAPITULO 7: EFECTO DE CO-SOLVENTES Y ALCOHOLES EN LA ESTERIFICACION DE (R/S)-IBUPROFENO CATALIZADA POR NOVOZYM® 435

7.1. Antecedentes y fundamentos del estudio	164
7.2. Metodología de estudio	167
7.2.1. Sistema de reacción	167
7.2.2. Análisis de las muestras	169
7.3. Resultados obtenidos	169
7.3.1. Efecto de la relación molar de sustratos en solventes orgánicos de polaridad opuesta: isooctano y acetonitrilo	169
7.3.2. Efecto de la naturaleza química del solvente	172
7.3.3. Efecto de la naturaleza del alcohol	173
7.4. Discusión de resultados	176
7.5. Conclusiones	186

7.6. Referencias bibliográficas. Capítulo 7.	187
--	-----

CAPITULO 8: INVESTIGACION DE LA ESTABILIDAD DE NOVOZYM® 435 EN LA PRODUCCION DE BIODIESEL

8.1. Introducción	190
8.2. Materiales y métodos	192
8.2.1. Esterificación de ácidos grasos libres	192
8.2.2. Procedimiento para el tratamiento de las esferas de Novozym® 435	193
8.2.3. Análisis del medio de reacción	194
8.2.4. Cuantificación de proteínas por método de ácido bicinconínico	196
8.3. Resultados y discusiones	197
8.3.1. Ensayos de estabilidad de Novozym® 435 en producción de biodiesel	197
8.3.2. Evidencias de la degradación de Novozym® 435 en el medio de reacción	200
8.3.3. Evidencias de la pérdida de matriz polimérica de Novozym® 435	203
8.3.4. Efectos de las condiciones de reacción sobre la estructura secundaria de la enzima	208
8.3.5. Modificación de la textura externa e interna del biocatalizador	211
8.4. Conclusiones	214
8.5. Referencias bibliográficas. Capítulo 8	215

CAPITULO 9. SCREENING DE NUEVOS SISTEMAS BIOCATALITICOS - PERSPECTIVAS FUTURAS

9.1. Nuevos materiales biocatalíticos	218
9.1.1. Componente enzimático activo compuesto por la lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	219
9.1.2. Selección de los soportes del material enzimático	219
9.1.3. Síntesis de nuevos biocatalizadores	225
9.2. Screening de su aplicación en esterificación enantioselectiva de (R/S)-ibuprofeno con alcoholes de cadena corta	
9.2.1. Sistemas de reacción	227

9.2.2. Determinación de conversión y enantioselectividad	228
9.3. Resultados y discusión	229
9.3.1. Evaluación de la inmovilización	229
9.3.2. Esterificación de (R/S)-ibuprofeno con alcoholes de cadena corta, sin co-solvente	230
9.3.3. Esterificación de (R/S)-ibuprofeno con etanol en presencia de co-solvente	236
9.4. Perspectivas futuras	239
9.5. Referencias bibliográficas. Capítulo 9.	240
CAPITULO 10: CONCLUSIONES FINALES	243

Anexo 1. Antecedentes del uso de lipasas en la resolución enantiomérica de R/S-ibuprofeno.

Anexo 2. Aplicaciones de Novozym® 435 reportadas en la literatura de los últimos 15 años.

Anexo 3. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

Anexo 4. Fundamentos de técnicas experimentales

RESUMEN

En esta Memoria se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la aplicación de lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en la resolución racémica de (R/S)-ibuprofeno por medio de esterificación con alcoholes de cadena corta.

Esta investigación se abordó con la finalidad de obtener un método limpio, de bajo impacto ambiental y sustentable para la resolución de dicho profeno. En este sentido se eligió la resolución racémica enzimática por medio de esterificación con lipasas inmovilizadas, técnica de resolución de profenos ampliamente estudiada por la comunidad científica en las últimas décadas. Lo innovador del trabajo abordado consiste en proponer el empleo de un medio de reacción compuesto únicamente por los sustratos ((R/S)-ibuprofeno y alcohol), sin empleo de co-solvente orgánico, de forma alternativa al medio orgánico convencionalmente empleado, lo que resulta en un proceso eco-compatible y más económico.

La presente Tesis Doctoral se ha dividido en 10 capítulos.

Los primeros tres capítulos corresponden al marco teórico y los antecedentes de la temática de investigación desarrollada.

Así en el Capítulo 1 se fundamenta claramente la importancia de la resolución racémica del (R/S)-ibuprofeno. En este sentido se detalla el mecanismo de acción, inversión, efectos adversos de los antiinflamatorios no esteroides (AINEs) en general y específicamente del (R/S)-ibuprofeno, de modo de comprender la importancia asociada al incremento de la fracción de enantiómero activo del ibuprofeno en la droga.

El Capítulo 2 se inicia con una descripción básica de las enzimas para profundizar posteriormente en el mundo de las lipasas y sus aplicaciones. Finalmente se da información detallada acerca de la lipasa B de *Candida antarctica* empleada como catalizador en esta investigación.

El Capítulo 3 aborda la inmovilización de enzimas (ventajas, desventajas, métodos) dando lugar así a la descripción detallada del catalizador comercial Novozym® 435 utilizado en primer instancia en este trabajo. Posteriormente se brinda información detallada de sus numerosas aplicaciones.

Los Capítulos 4 al 9 están completamente basados en las distintas experiencias realizadas a lo largo de este trabajo de investigación. Cada uno de estos capítulos tiene un fin particular por lo que se han organizado de manera que cada uno de ellos posea sus fundamentos, tanto teóricos como experimentales, resultados, discusión, conclusiones de los mismos y referencias bibliográficas.

En el Capítulo 4 se planteó la resolución de (R/S)-ibuprofeno con etanol como reactivo y solvente, actuando Novozym® 435 como catalizador. Se realizó la optimización de las distintas variables experimentales que influyen en este tipo de sistemas de reacción (volumen de alcohol, volumen de agua, masa de catalizador, temperatura, tiempo de reacción). Posteriormente se estudió la estabilidad de Novozym® 435 al someterse a sucesivos usos bajo las condiciones previamente halladas como óptimas.

El estudio del reuso de Novozym® 435 reveló cierta desactivación. En este contexto se decidió estudiar las causas de tal comportamiento. Así, los Capítulos 5 y 6 abordan este aspecto.

En el Capítulo 5 se describe detalladamente la estrategia de estudio y se dan los fundamentos de las técnicas empleadas, mientras que el Capítulo 6 muestra los resultados experimentales obtenidos y la discusión-conclusión de los mismos. Ambos capítulos involucran estudios de adsorción de ibuprofeno sobre Novozym® 435, el efecto del etanol sobre el catalizador comercial por medio de reacción superficial a temperatura programada-desorción a temperatura programada (TPSR-TPD), microscopía electrónica, evolución de la estructura secundaria de la enzima inmovilizada por espectroscopia

infrarroja (FTIR e intercambio isotópico-DRIFT), pasaje de componentes del catalizador al medio de reacción por espectroscopia infrarroja FTIR y cuantificación de proteína.

En base a los resultados hallados respecto del efecto de etanol sobre Novozym® 435 se estudiaron las siguientes estrategias:

- 1) Disminución del volumen de etanol y empleo de un co-solvente orgánico (Capítulo 7). En este sentido se evaluó la esterificación de ibuprofeno con etanol catalizada por Novozym® 435 empleando solventes orgánicos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, y diferentes relaciones molares de sustratos.
- 2) Reemplazo del etanol por otros alcoholes de cadena corta (Capítulo 7). Se llevaron a cabo reacciones con alcoholes alternativos al etanol (1-propanol y 2-propanol) bajo las condiciones de reacción previamente halladas como óptimas, establecidas en el capítulo 4.
- 3) Screening de nuevos sistemas catalíticos (Capítulo 9). En este sentido, se evaluaron nuevos biocatalizadores, basados en la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en soportes de diversa naturaleza, en la esterificación enantioselectiva de (R/S)-ibuprofeno con alcoholes de cadena corta. Los soportes empleados consisten en quitosano con y sin funcionalización con glutaraldehído, polipropileno isotáctico y óxidos inorgánicos (TiO_2 , SiO_2 , ZrO_2 y Nb_2O_5). Al momento, el estudio de estos nuevos biocatalizadores es un screening llevado a cabo bajo condiciones de reacción previamente halladas como óptimas para Novozym® 435. En los resultados experimentales expuestos en este capítulo se fundamentan las perspectivas futuras.

En el Capítulo 8 se estudió la estabilidad de Novozym® 435 al ser aplicado en la producción de biodiesel. Esta sección del trabajo de investigación surgió en el marco de un

convenio establecido con la empresa norteamericana Piedmont Biodiesel (Pittsboro, North Carolina) quien aportó las muestras de biocatalizador empleado en el proceso industrial de producción de biodiesel para su estudio. El análisis llevado a cabo consistió en aplicar las estrategias detalladas en el capítulo 5, estableciéndose el efecto de los alcoholes de cadena corta sobre el catalizador en dicha aplicación industrial.

Finalmente, en el Capítulo 10 se exponen las conclusiones finales del trabajo realizado y presentado en esta Memoria.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN

El alto grado de estereoselectividad de muchos procesos biológicos conduce a que la actividad biológica, la toxicidad, la distribución y el metabolismo de un fármaco dependan en gran medida de su estereoquímica, por lo cual estos parámetros farmacológicos y farmacocinéticos puedan ser muy diferentes para cada enantiómero de una mezcla racémica [1]. Hay muchos ejemplos que muestran cómo un enantiómero presenta actividad, mientras que el otro no tiene efecto farmacológico; uno es tóxico frente al otro que demuestra ser seguro y activo; e incluso hay casos en los que uno es agonista frente al otro que se comporta como antagonista [1, 2]. A pesar de todo, la mayoría de estos fármacos se han comercializado como mezclas racémicas al no existir una normativa clara al respecto, ni métodos económicos para realizar la separación de los enantiómeros.

Un ejemplo del uso de medicamentos como mezclas racémicas con consecuencias muy graves es el caso de la talidomida, que se empleó brevemente como sedante y contra náuseas en embarazadas en Europa y Gran Bretaña durante el período de 1959 a 1962. Las propiedades deseadas residían en la acción de la R-talidomida. Sin embargo, la S-talidomida tiene un espectro de actividad biológica muy diferente y se vio que era responsable de los aproximadamente 2000 casos de graves malformaciones irreversibles en niños nacidos de mujeres que la tomaron durante el embarazo [3].

En 1992 la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos estableció indicaciones que regularon la fabricación de fármacos quirales como racémicos o como isómeros puros [4]. Entre estas directrices se destaca el estudio exhaustivo al que deberán ser sometidos los posibles nuevos fármacos racémicos antes de ser aprobados y puestos a la venta. Este hecho ha forzado a muchas empresas farmacéuticas a sintetizar isómeros puros, o por el contrario dedicarse a la fabricación de moléculas aquirales.

Este trabajo de Tesis está centrado en un compuesto racémico cuya actividad farmacológica está directamente asociada a la quiralidad del compuesto: el **R/S-ibuprofeno**, el cual es ampliamente utilizado a nivel mundial debido a su alta

efectividad, baja incidencia de efectos adversos y toxicidad en las dosis recomendadas [5]. Este fármaco pertenece a la familia de los antiinflamatorios no esteroides (AINEs), los cuales son la piedra angular en el tratamiento de múltiples condiciones convirtiéndose en el grupo terapéutico más utilizado en el mundo. Solamente en los Estados Unidos se generan cerca de 100 millones de prescripciones anualmente, hecho atribuible a su importante papel como agentes analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios [6]. Las próximas secciones describen las características de los fármacos antiinflamatorios de la categoría de los AINEs con especial énfasis en el R/S-ibuprofeno.

1.1. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES (AINEs)

1.1.1. Definición y estructura química

Los antiinflamatorios no esteroides son un grupo variado y químicamente heterogéneo de fármacos principalmente antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos, por lo que reducen los síntomas de la inflamación, el dolor y la fiebre respectivamente. Todos ejercen sus efectos por acción de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa [6]. Los antiinflamatorios naturales, segregados por el propio organismo, son derivados de los corticoides, sustancias de origen esteroideo de potente acción antiinflamatoria e inmunosupresora. En oposición a los corticoides, el término "no esteroideo" se aplica a los AINEs para recalcar su diferencia en estructura química respecto a los antiinflamatorios naturales. Como analgésicos se caracterizan por no pertenecer a la clase de los narcóticos y actuar bloqueando la síntesis de prostaglandinas [7].

Como se mencionó en el primer párrafo los agentes terapéuticos incluidos en esta categoría incluyen muchos compuestos que en general no tienen relación química entre ellos (aunque la mayoría son ácidos orgánicos) pero comparten actividades terapéuticas y efectos secundarios [8]. Dicha diversidad química queda expuesta en las

Tablas 1 y 2 donde se muestra la clasificación de los antiinflamatorios no esteroides según su estructura molecular básica [7, 9].

Tabla 1. Clasificación química de los AINES (1999) [7].

Antiinflamatorios no esteroides (AINES)	
I-	<p>Ácidos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Salicílico: fármaco prototipo ácido acetil salicílico • Enólicos: <ul style="list-style-type: none"> -Pirazolonas: fármaco prototipo metamizol - Pirazolidindionas: fármaco prototipo fenilbutazona - Oxicams: fármaco prototipo piroxicam • Acético: <ul style="list-style-type: none"> - Indolacético: fármaco prototipo ácido indometacina - Pirrolacético: fármaco prototipo ácido ketorolac - Fenilacético: fármaco prototipo ácido diclofenaco - Piranoindolacético: fármaco prototipo ácido etodolaco • Propiónico: fármaco prototipo ácido naproxeno • Antranílico: fármaco prototipo ácido ácido mefenámico • Nicotínico: fármaco prototipo ácido clonixina
II-	<p>No ácidos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sulfoanilidas: fármaco prototipo ácido nimesulida • Alcanonas: fármaco prototipo ácido nabumetona • Paraaminofenoles: fármaco prototipo ácido paracetamol

Tabla 2: Clasificación química de los AINE's 2000-2001 [9].

Antiinflamatorios no esteroides (AINES)
<ul style="list-style-type: none">• Ácidos propiónicos:<ul style="list-style-type: none">- Fenoprofeno- Flurbiprofeno- Ibuprofeno- Ketoprofeno- Naproxeno- Oxaprozim- Acido tiaprofénico• Ácidos acéticos:<ul style="list-style-type: none">- Derivado fenilacético:<ul style="list-style-type: none">Diclofenaco sódicoDiclofeco potásico- Derivado piranoindolaético:<ul style="list-style-type: none">Etodolac- Derivado pirrolacético<ul style="list-style-type: none">- Indometacina- Sulindaco- Tolmentín- Ketorolac• Ácidos antranílicos (fenamatos):<ul style="list-style-type: none">- Meclofenamato- Ácido mefenámico• Derivado del ácido salicílico<ul style="list-style-type: none">Diflunisal• Agentes no ácidos- Derivados naftilalcanonas<ul style="list-style-type: none">Nabumetona

- Oxicanes:
 - Piroxicam
 - Meloxicam
 - Tenoxicam
- Inhibidores selectivos de la COX-2:
 - Celecoxib
 - Rofecoxib

Hasta el año 1998 se consideraba racional clasificar a los AINEs según su estructura química. Aunque el paracetamol no tiene propiedades antiinflamatorias, clásicamente se ha agrupado como un AINE. En la actualidad se considera que esto sólo tiene importancia en situaciones relacionadas a fenómenos de hipersensibilidad a un compuesto o grupo químico particular.

Actualmente resulta más útil clasificar a los AINEs en base a su blanco de acción lo cual surge en base a la mayor información disponible sobre el mecanismo de acción de estos fármacos y sobre la existencia de diferentes isoenzimas de la ciclooxigenasa, como se detalla en el próximo apartado de este texto.

1.1.2. Mecanismo de acción y nueva clasificación

Los antiinflamatorios no esteroideos inhiben la actividad de la enzima ciclo-oxigenasa o ácido graso dioxigenasa (COX) resultando esto en una disminución de la producción de prostaglandinas (PG) y tromboxanos a partir del ácido araquidónico, los cuales son conocidos mediadores celulares en los procesos inflamatorios [7, 10, 11]. La Figura 1 muestra un esquema de la síntesis celular de éstos mediadores lipídicos de manera de poder apreciar con mayor claridad el fenómeno celular al cual hacemos referencia.

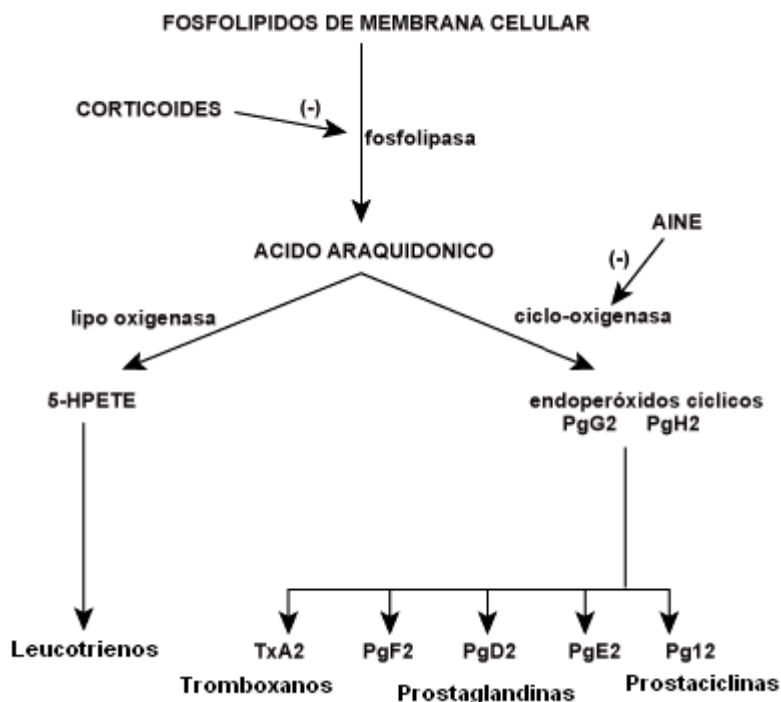


Figura 1. Biosíntesis de mediadores lipídicos

Si bien cada clase de mediador lipídico y, dentro de una determinada clase, cada especie química, posee acciones propias y algunas diferentes entre sí, se destacan a continuación aquellas funciones que son afectadas por los AINEs porque actúan principalmente el nivel de PGD2 y TxA2. Mientras que la PGD2 provoca vasodilatación y bronco constricción del músculo liso, quimiotaxis y acumulación de neutrófilos en los focos de inflamación, la principal función del TxA2 es favorecer la coagulación y actuar como vasoconstrictor [10].

Si bien la función de las prostaglandinas es crucial en la producción de dolor, inflamación y fiebre, la acción de los AINEs sobre estos mediadores lipídicos también se asocia a posibles efectos adversos ya que estos mediadores lipídicos llevan a cabo funciones fisiológicas [6, 7].

En 1991 se descubrió que la enzima COX posee dos isoformas, COX-1 y COX-2, estableciéndose que la primera es una enzima constitutiva y se expresa en múltiples

tejidos como endotelio del tracto gastrointestinal, las plaquetas y mucosa renal relacionándose con la participación de las prostaglandinas y tromboxanos en el control de funciones fisiológicas (ejemplo: citoprotección de la mucosa gástrica, regulación de agregación plaquetaria), mientras que la COX-2 es una enzima inducible en determinadas células bajo circunstancias patológicas por el concurso de ciertas citoquinas y mediadores de la inflamación y por lo tanto altamente responsable de la inflamación y el dolor [6, 7, 11].

Los AINEs tradicionales inhiben de forma no selectiva a ambas isoformas de la COX e incluso en algunos casos existe una mayor inhibición de la COX-1 lo cual trae como consecuencias los efectos adversos sobre el sistema gastrointestinal, renal y la coagulación [7].

Con el advenimiento de los inhibidores selectivos de la COX-2 (Tabla 2), se ha clasificado a los AINEs de acuerdo con su mecanismo de acción, resultando una mejor forma de agruparlos en base a este criterio según se muestra a continuación [7]:

- AINEs tradicionales
- AINEs inhibidores preferenciales de la COX-2 (Nimesulida, Meloxicam, Etodolaco, Nabumetona)
- AINEs inhibidores selectivos de la COX-2 (Rofecoxib, Celecoxib, valdecoxib)

La asignación de una de estas categorías a un determinado AINE se realiza en base a la comparación de sus valores de concentraciones requeridas para inhibir en un 50% la actividad de la COX-2 (CI_{50}^{COX-2}) y de la COX-1 (CI_{50}^{COX-1}), es decir si la relación $CI_{50}^{COX-2}/CI_{50}^{COX-1}$ es menor a la unidad dicho AINE inhibe preferentemente a COX-2 [7].

Si bien los efectos terapéuticos de estos antiinflamatorios residen principalmente en la acción que ejercen sobre la síntesis de prostaglandinas, se sabe que llevan a cabo mecanismos adicionales por los cuales afectan la síntesis y/o la acción de otros mediadores celulares, neurotransmisores y que desestructuran respuestas celulares

[7]. Por citar un ejemplo, en cuanto a la acción antipirética de los AINEs se sabe que principalmente es debida a la disminución de la síntesis de prostaglandina E₂ (PGE₂) a nivel hipotalámico donde se lleva a cabo la regulación de la temperatura corporal. La prostaglandina E₂, cuya liberación es estimulada por la acción de diferentes pirógenos, actúa como mediador de la respuesta febril al alterar el punto fijo de la temperatura. Los AINEs reducen la temperatura corporal si ésta se halla previamente aumentada por el pirógeno. Sin embargo, no afectan la temperatura corporal en condiciones normales. Además los salicilatos y el ibuprofeno son capaces de inhibir la prostaglandina E₂ mediante la reducción de la translocación nuclear del NF-κB con la consecuente reducción en la expresión de la COX-2 [8].

1.1.3. Efectos adversos y otros

- Efectos adversos: A continuación se da una breve reseña sobre los efectos adversos más importantes de los AINEs
 - *Tracto gastrointestinal*: el efecto adverso más frecuente asociado con el uso de los AINEs se relaciona con la irritación directa o indirecta del tracto gastrointestinal [7, 12]. La mayoría de las veces es leve y reversibles e incluso no da síntomas, pero pueden ser muy graves. Los efectos indirectos se asocian con la inhibición de la COX-1 dado que las prostaglandinas poseen un efecto protector de la mucosa gastrointestinal debido a que mantienen el flujo sanguíneo, estimulan la secreción de mucus y bicarbonato y regulan el cambio y reparación celular. El efecto irritante o erosivo directo se asocia a algunos AINEs ácidos (ácidos débiles) que se convierten en liposolubles a un pH bajo. Al ser tomados oralmente cruzan la membrana lipídica y dentro de las células de la mucosa gástrica se ionizan perdiendo liposolubilidad y así quedan “atrapados” en el interior celular donde interrumpen la función celular por afectar múltiples rutas celulares como la fosforilación

oxidativa mitocondrial, síntesis de ATP, intercambio de iones (Na^+ , K^+ y H^+) entre otras.

- *Efecto renal*: este efecto se dan en personas que presentan una enfermedad renal de base y se deben a la expresión constitutiva en este órgano de ambas isoenzimas de la COX [7, 13]. La disminución de las prostaglandinas genera una disminución del filtrado glomerular que conduce a aumento de presión arterial e hiperpotasemia.

- Efecto antiagregante-trombótico

La mayoría de los AINEs inhiben a la COX-1 en las plaquetas previniendo la formación de tromboxano A_2 el cual induce la agregación plaquetaria [7]. Por lo tanto, AINEs a dosis bajas reducen el riesgo de síndromes coronarios. Por su parte, los inhibidores selectivos de la COX-2 no inhiben la síntesis de tromboxano A_2 , y dicha consecuencia podría más bien incrementar el riesgo de trombosis.

- Beneficios adicionales de los AINEs: estudios epidemiológicos y experimentales han documentado los efectos benéficos de los AINEs en desordenes cardiovasculares, cáncer colon-rectal y enfermedad de Alzheimer [12, 14]. Si bien los mecanismos de estos efectos no están esclarecidos y siguen en estudio.

- *Enfermedad cardiovascular*: asociado al efecto antiagregante plaquetario mencionado anteriormente. La aspirina ha demostrado reducción del infarto de miocardio en un 44% con dosis de 325 mg cada dos días esto se atribuye a la acción sobre la agregación plaquetaria [12].
- *Cáncer colon-rectal*: los AINEs parecen prevenir o inhibir el desarrollo de tumores de colon incluyendo adenomas colon rectales y causar la

regresión de lesiones neoplásicas establecidas [6, 11, 12, 14]. En 1999 La FDA aprobó el uso del celecoxib como tratamiento coadyuvante en los pacientes que padecen poliposis adenomatosa familiar.

- *Enfermedad de Alzheimer*: se ha observado que la ingestión crónica de AINEs disminuye el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer y retrasan el desarrollo de la misma una vez establecida [6, 12, 14, 15].

En base a la información presentada en cuanto a los AINEs en general queda clara su importancia como analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos en el mundo entero, de modo que pese a los efectos adversos que pueden provocar, principalmente en el uso crónico, no han podido ser suplantado por otros fármacos. En un principio se pensó que la solución vendría de la mano de los inhibidores selectivos de la COX-2, lo cual no resultó. Si bien ha quedado demostrado que éstos últimos reducen notablemente los efectos adversos sobre el tracto gastrointestinal, la ventaja de su uso se ve disminuida por los efectos de la inhibición de esta enzima en tejidos donde es constitutiva, interfiriendo así en el funcionamiento renal. Estos AINEs no actúan a nivel plaquetario por lo cual no brindan ningún tipo de cardioprotección si no que se sugiere un efecto trombótico, de esta manera independientemente del tipo de AINE empleado en un tratamiento crónico se aconseja un seguimiento del paciente si éste posee factores de riesgo [6].

1.2. (R/S) – IBUPROFENO

1.2.1. Relación acción - enantioselectividad. Importancia de la resolución racémica

El ibuprofeno, ácido (\pm)-2-(p-isobutilfenil) propanoico, es el nombre genérico de la droga que compone medicamentos como el Ibupirac®, Sindol®, Ibuevanol®, Matrix® entre otros. Como ya se mencionó anteriormente esta droga pertenece a la familia de

los antiinflamatorios no-esteroides o AINES que se caracterizan por su actividad anti-inflamatoria, antipirética y analgésica. El ibuprofeno se introdujo a finales de 1960, siendo el primer miembro de los derivados del ácido propiónico o profenos que ingresa en el mercado. El relativo éxito del ibuprofeno, debido a la baja incidencia de efectos adversos, promueve el desarrollo de numerosas moléculas como naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno y otros.

Una rápida visión a la estructura química de estos ácidos (Figura 2) pone de manifiesto la presencia de un centro quiral en la molécula.

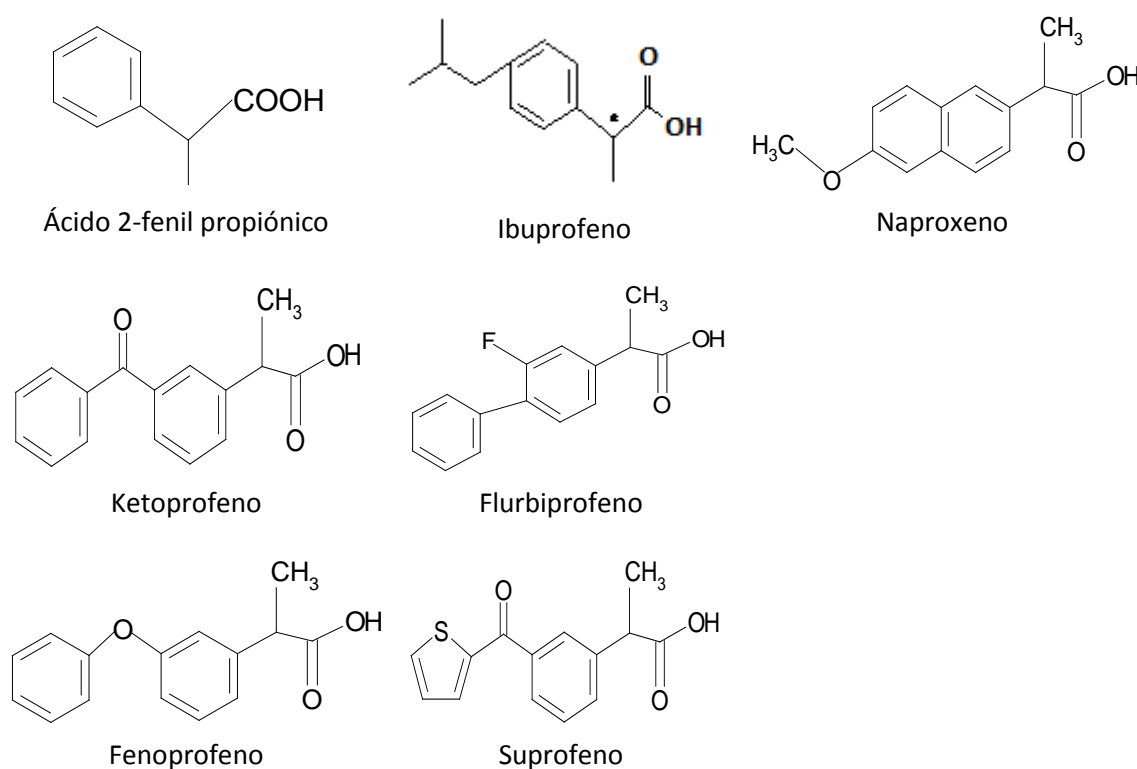


Figura 2. Estructuras de los ácidos 2-aril-propiónicos

En su mayoría las formas farmacéuticas consisten en las mezclas racémicas de los enantiómeros R(-) y S(+), sin embargo está bien documentado que la forma S(+) es la farmacológicamente activa para todos ellos [7, 16]. En el caso específico del

ibuprofeno se ha determinado que el S(+)-ibuprofeno es 160 veces más activo que su enantiómero [16].

Todos los profenos sufren in vivo una inversión quiral catalizada por enzimas, por medio de la cual parte del enantiómero R(-) es transformado en la forma activa S(+) [17]. La extensión de la inversión es variable de un producto a otro ocurriendo extensamente para el caso del ibuprofeno y fenoprofeno y en poca extensión para el flurbiprofeno [7]. El mecanismo por el cual esto ocurre es conocido y dos enzimas involucradas han sido aisladas y caracterizadas [17].

Si bien la existencia de dicha inversión quiral lleva a pensar directamente en un efecto positivo ya que aumentaría la eficiencia de estos fármacos haciendo que más del 50 % de la droga administrada sea activa terapéuticamente, ha quedado demostrado que la inversión quiral posee ciertos efectos negativos o dudosos que deben tenerse en cuenta, los cuales surgen de observar el mecanismo por el cual ocurre tal inversión.

Siendo el ibuprofeno el fármaco de mi interés particular y el más extensamente estudiado en torno a este punto, se muestra en la figura 3 el mecanismo de inversión quiral in vivo de este AINE [17, 18].

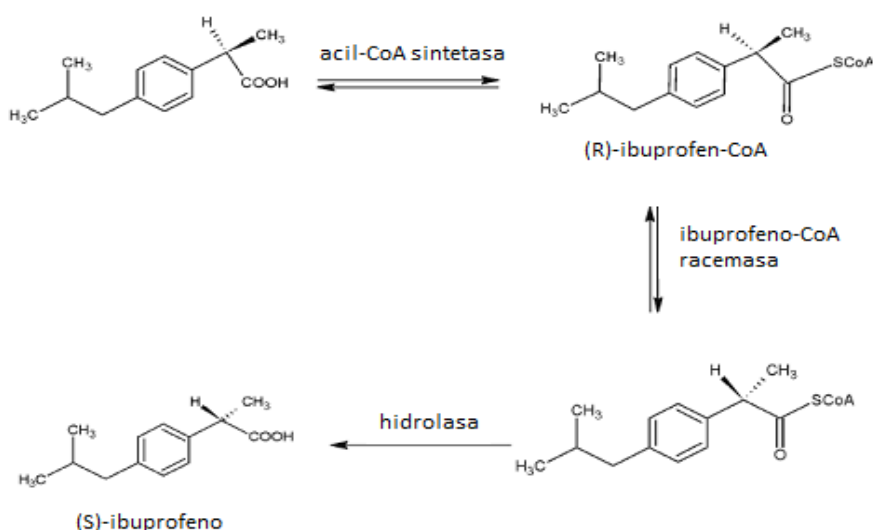


Figura 3. Mecanismo del metabolismo de inversión del ibuprofeno

Como puede apreciarse fácilmente se trata de un mecanismo enzimático, por lo tanto la extensión de la inversión variará entre distintos individuos dependiendo esto de las actividades enzimáticas de cada individuo en particular, este punto da cierta aleatoriedad a la eficiencia terapéutica de cada profeno en la población **[18]**.

Se encuentra bien documentado que la inversión quiral del ibuprofeno ocurre mediante un mecanismo de tres pasos. El primero paso consiste en la conjugación del R(-)-ibuprofeno para formar un tioéster acyl-CoA, reacción catalizada por la acyl-CoA sintetasa estereoselectiva. En el segundo paso la ibuprofen CoA racemasa (Metilmalonil CoA racemasa **[18]**) lleva a cabo la epimerización del R(-)-tioéster al S(+)-tioéster. Finalmente el S(+)-tioéster es hidrolizado liberándose el S(+)-ibuprofeno reacción catalizada por una hidrolasa de la cual no se conoce exactamente la identidad.

En competencia con la hidrólisis, el tio-éster intermedio también puede participar de un intercambio de acilos con triglicéridos endógenos, lo cual resulta en una acumulación de ibuprofeno en tejido graso. Los efectos a largo plazo de dicha acumulación aún no se conocen pero no pueden descartarse efectos tóxicos **[1]**.

Lee y colaboradores **[18]** demuestran y cuantifican la inversión de R(-) a S(+) ibuprofeno en el hombre y examinan la disposición de ambos enantiómeros en el cuerpo. De estos estudios surge que en individuos sanos, en promedio, un 63 ± 6 % del R(-)-ibuprofeno administrado es invertido a su enantiómero. También queda demostrado que la inversión ocurre en única dirección (no es detectable la inversión al administrar S(+)-ibuprofeno). Este grupo de investigadores encuentran que la cinética de cada enantiómero individual es alterada si se administra concomitantemente el enantiómero opuesto, hecho que estaría de acuerdo con observaciones de la compañía Merck, quien establece que el enantiómero S(+) actúa dentro de los 12 minutos de ingestión versus 30 minutos de la mezcla racémica.

Por otro lado, efectos colaterales gastrointestinales como hemorragias y úlceras asociados a tratamientos crónicos han sido mayoritariamente atribuidos a la acidez generada por el R(-)-ibuprofeno **[19]**.

En base a lo expuesto, un tratamiento farmacológico con el isómero S(+)-ibuprofeno puro tendría las siguientes ventajas:

- Reducción de la dosis administrada
- Disminución de efectos secundarios gastrointestinales directos
- Disminución de potenciales efectos adversos asociados a la acumulación de ibuprofeno en tejido adiposo
- Se evitaría la variabilidad de respuesta al no producirse la inversión in vivo
- Disminución del tiempo requerido para el desarrollo de la acción terapéutica deseada.

Todas estas ventajas muestran con claridad la importancia de la obtención de enantiómeros simples y justifican el interés desarrollado en las últimas décadas por la obtención de ácidos S(+)-2-aril propiónicos puros.

1.2.2. Métodos aplicados a la resolución racémica de ibuprofeno. Antecedentes

Existen dos rutas posibles para la obtención de compuestos ópticamente activos a partir de un material ópticamente inactivo: resolución racémica y síntesis asimétrica.

La resolución racémica se basa en que los enantiómeros que componen un racemato reaccionan a distinta velocidad con un reactivo quiral o un catalizador como una enzima, mientras que la síntesis asimétrica implica la creación de un centro asimétrico en un material de partida no quiral (proquiral) [1].

La viabilidad de un proceso dependerá en parte del costo del mismo, que estará determinado por costos de reactivos y costo-posibilidad de reciclado del agente de resolución o del catalizador, y también de la cantidad de desechos generados y productividad (Kg. de producto por unidad de volumen del reactor y por unidad de tiempo). Teniendo en cuenta estos parámetros, si bien la síntesis asimétrica de los ácidos S(+) es técnicamente viable, la metodología no resulta rentable ya que requiere reactivos de elevado costo, consume mucho tiempo y no proporciona un rendimiento aceptable del enantiómero puro para su comercialización posterior [1, 20]. Por otro lado, la resolución racémica es la ruta más prometedora para la obtención de

enantiómeros puros a escala industrial y ha sido objeto de extenso estudio en los últimos años para múltiples casos, entre ellos el (R/S)-ibuprofeno.

En la figura 4 se muestran las principales técnicas empleadas para llevar a cabo una resolución racémica.

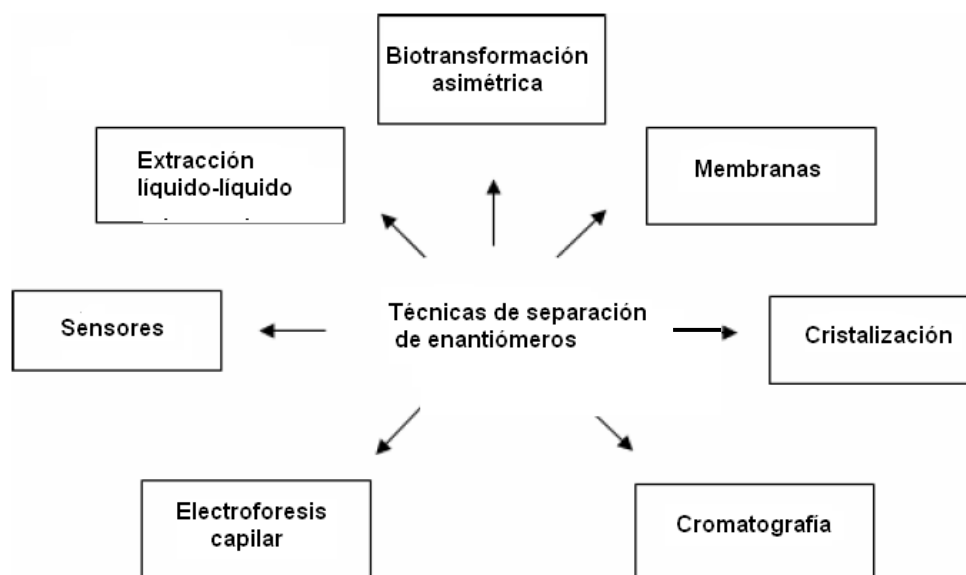


Figura 4. Técnicas usadas para la separación de enantiómeros (extraída de [1])

En el texto a continuación se describen brevemente las principales técnicas aplicadas a la resolución racémica del (R/S)-ibuprofeno.

- *Métodos cromatográficos:* el método más común hasta la fecha para la resolución enantiomérica del ibuprofeno y demás materiales quirales en general es la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) [1]. Para ello dos estrategias son aplicables. La primera estrategia consiste en seleccionar una fase estacionaria quiral adecuada para la resolución del analito de interés, y la segunda estrategia se basa en modificar (derivatizar) el analito para que pueda ser resuelto por una determinada fase estacionaria aquiral.

Según publicaciones de los últimos 10 años, las mejores fases estacionarias para la resolución de ibuprofeno son aquellas compuestas por derivados de celulosa, amilasa, ciclodextrinas, proteínas y aminoácidos.

La desventaja de estos métodos radica principalmente en el tiempo requerido y sobre todo en la cantidad de solvente orgánico involucrado que luego de la separación debe ser evaporado a fin de extraer el ácido libre.

- *Métodos de separación física:* la cristalización ha sido la técnica más empleada a escala industrial para obtener enantiómeros puros, siendo la cristalización diastereoisomérica la técnica dominante en la industria farmacéutica para la obtención de ibuprofeno, recibiendo a menudo el nombre de resolución clásica [1]. Un agente de resolución empleado comúnmente para tal fin por esta técnica es L-lisina. Se ha encontrado que la sal D-ibuprofeno-L-lisinato posee cerca de dos tercios de la solubilidad del L-ibuprofeno-L-lisinato permitiendo una buena separación enantiomérica. Esta es una técnica eficaz y de bajo costo.
- *Resolución cinética enzimática:* En particular la resolución racémica de ibuprofeno catalizada por lipasas ha sido extensamente estudiada por varios autores en las últimas dos décadas [21], dichos reportes se detallan en el apartado 1.2.3.

Las estrategias posibles para llevar a cabo dicha resolución son:

1. Hidrólisis enantioselectiva, a partir de un éster racémico en un medio acuoso
2. Síntesis enantioselectiva del éster, a partir de un ácido racémico, mediante una esterificación o una transesterificación en medio orgánico.

Dependiendo de la lipasa elegida como biocatalizador se obtendrá S o R estereopreferencia. Las lipasas principalmente empleadas en la resolución de profenos son las lipasas de *Candida rugosa* y de *Rizhomucor miehei*, las cuales esterifican al S(+)-ibuprofeno, y la lipasa B de *Candida antarctica* que cataliza la esterificación del R(-)-ibuprofeno, este último caso es ventajoso porque

directamente queda sin reaccionar el isómero de interés [21]. Es importante destacar que la esterificación de ibuprofeno y otras drogas no esteroideas, independientemente de la enantioselectividad del proceso, ha sido reportada como una manera eficiente de obtener una prodroga (mezcla de ésteres) que no genere los problemas gastrointestinales frecuentemente asociados a los AINEs como consecuencia del grupo carboxílico libre presente en estos compuestos [22].

El proceso estándar de resolución cinética tiene la desventaja de obtener un rendimiento máximo de 50% del enantiómero deseado. Para superar esta limitación se ha acoplado, in situ, a la resolución cinética una racemización del sustrato inicial [1].

Entre las ventajas del método enzimático para la resolución enantioselectiva de drogas racémicas se incluyen la enantioselectividad inherente a las enzimas, en particular las lipasas son altamente selectivas, las condiciones suaves en las cuales estos biocatalizadores operan, si la enzima se emplea inmovilizada se tiene la posibilidad de recuperarla fácilmente el medio de reacción y así por un lado facilitar la separación de productos como también reciclar el catalizador. La inmovilización también permite una operación continua y mayor variabilidad de diseño de reactores como también mayor estabilidad enzimática en medios no convencionales. Por otro lado deben mencionarse las desventajas, que en este caso están relacionadas con el gran número de parámetros que deben ser optimizados (contenido de agua, solvente, temperatura, relación molar de sustratos, presencia de inhibidores, cantidad de catalizador, concentración de alcohol, etc.) para cada sistema de reacción en particular [1, 21].

- Cromatografía en fluido supercrítico (SFC): consiste en un desarrollo reciente en la separación de enantiómero del ibuprofeno, en la cual se emplea dióxido de carbono como fluido supercrítico. Esta técnica posee un comportamiento similar a la HPLC, pero puede ser ejecutada en menor

tiempo, no ha mostrado problemas de desactivación de la columna, ni lixiviación del componente quiral de la fase estacionaria y no requiere tiempos largos para alcanzar el equilibrio. Además tiene como atractivo el emplear una fase móvil benigna para el ambiente.

La bibliografía referida a los métodos y técnicas ensayados en búsqueda de enantiómeros puros es extensa, y si bien algunos métodos son más prometedores que otros a la fecha aún deben ajustarse variables que permitan mejorar resultados a los fines de adaptarlos para su uso a escala industrial.

Por lo tanto, frente a un problema de interés como es la obtención de S(+)-ibuprofeno se ha investigado la resolución racémica enzimática del fármaco. En este contexto, se presenta la recopilación de antecedentes sobre este tipo de reacciones.

1.2.3. Resolución racémica enzimática de ibuprofeno. Antecedentes

El **Anexo 1** detalla los resultados reportados en los últimos 20 años respecto a la resolución racémica de ibuprofeno empleando enzimas. Se indican valores de conversión y enantioselectividad obtenidos como también condiciones bajo las cuales se desarrolló la reacción. Puede apreciarse que la esterificación de (R/S)-ibuprofeno por vía enzimática ha sido llevada a cabo casi exclusivamente en un medio compuesto por un solvente orgánico siendo los solventes más utilizados ciclohexano e isooctano. Si bien operando en medio orgánico se han reportado altas conversiones de ácido y elevadas enantioselectividades, el uso de un co-solvente orgánico implica asumir el costo del mismo, de las operaciones de transporte, separación y reciclado; y el riesgo de que se produzcan fugas nocivas tanto para individuos como para el medio ambiente.

Los reportes acerca de estudios llevados a cabo en un medio sin solvente son escasos [23-25]. En estas investigaciones se utilizó una alimentación estequiométrica de sustratos, la cual no permite la solubilización del ácido a temperatura ambiente. En

este contexto, la esterificación del ibuprofeno se realizó a temperaturas de 70/80 °C que, si bien aseguran la fusión del ácido, pueden resultar nocivas para la actividad enzimática que en general se reduce por encima de los 60 °C.

1.3. OBJETIVO DE LA TESIS

El presente trabajo de Tesis tiene como objetivo general la investigación de la esterificación enantioselectiva de (R/S)-ibuprofeno catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) inmovilizada (Novozym®435) en búsqueda de un método de obtención del enantiómero farmacológicamente activo que sea sustentable y benigno para el ambiente y las personas. Más específicamente, se desea desarrollar un método libre de co-solvente agregados en el cual se utilice el alcohol de esterificación como reactivo y solvente. En este contexto, se investigó la interacción de los sustratos con el biocatalizador a los fines de obtener información fundamental entre actividad y estructura enzimática como así también actividad biocatalítica-propiedades fisicoquímicas y estabilidad del material.

Finalmente, se ha realizado un screening de nuevos biocatalizadores compuestos por la lipasa CALB dispersa sobre soportes oxidicos (TiO₂, SiO₂, ZrO₂, Nb₂O₅) y orgánicos (quitosano y polipropileno).

1.4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. CAPITULO 1

[1] Carvalho P.O., Cass Q.B., Calafatti S.A., Contesini F.J., Bizaco R., *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 2006, 23, 291-300.

[2] Waigner I.W., *Drug Stereochemistry: Analytical Methods and Pharmacology*, 2^o ed., 1993, Marcel Dekker, New York.

[3] Tseng S., Pak G., Washenik K., Keltz Pomeranz M., Shupack J. L., *J. Am. Acad. Dermatol.* 1996, 35, 969-979.

-
- [4] Food & Drug Administration: FDAs statement for the development of new stereoisomeric drugs. *Chirality* 1992, 4, 338-340
- [5] Matkovic S.R., Valle G. M., Briand L.E., *Lat. Am. Appl. Res.* 2005, 35, 189-195.
- [6] Pascucci R.A., *JAOA* 2002, 102 (9) 487-489.
- [7] a) Flórez J., *Farmacología Humana*, 3º ed. 1998. ISBN-10: 8445806130, ISBN-13: 978-8445806135, Barcelona, España, Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. b) Flórez J., *Farmacología Humana*, 4ºed. 2003, ISBN: 9788445812907, editorial Masson, Barcelona, España.
- [8] Hardman J.G., Limbird L.E., Molinoff P.B., Ruddon R.W., Goodman A. Goodman & Gilman *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Vol I. 9ª edición. McGraw- Hill Interamericana: México 1996.
- [9] Lacy C., Armstrong L., Goldman M., Lance L., *Drug information Handbook 2000-2001*, 8º ed., Editorial Internacional. American Pharmaceutical Association. Lexi Comp. USA.
- [10] Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S., “*Inmunología Celular y Molecular*”, 4º edición, 2002, McGraw-Hill- Interamericana de España S.A.U., ISBN 84-486-0405-9.
- [11] Steinbach G., Lynch P., Phillips R., *New England Journal of Medicine* 2000, 342 (26), 1946-1952.
- [12] Boyce E., Takiya L., *Formulary* 2000, 35, 142-168 idis 443087
- [13] Schinitzer T., *American J. Med.* 2001, 110(1A): 46S-49S Idis Nº 458900
- [14] Siu A., *Hong Kong Physiotherapy Journal* 2000, 9 (3), 85-88
- [15] In't Veld B.A., Ruitenberg A., Hofman A., Launer L.J., van Duijn C.M., Stijnen T., *N. Engl. J. Med.* 2001, 345, 1515-1521.
- [16] Adams S.S., Bresloff P., Manson G.C., *J Pharm. Pharmacol* 1976, 28, 256–257.
- [17] Reddy A., Hashim M., Wang Z., Penn L., Stankovic C.J., Burdette D., Surendram N., Cai H., *International Journal of Pharmaceutics* 2007, 335, 63-69.
- [18] Lee E.J.D., Williams K., Day R., Graham G., Champion D., *Br. J. Clin. Pharmac.* 1985, 19, 669-674.

- [19] Stinson S.C. Chiral Drugs. Product Report in C&EN Northeast News Report, October 9, 1995, 44-74.
- [20] Arroyo Sanchez M., Tesis Doctoral "Síntesis de ácidos 2-aril-propiónicos homóquiraes mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas", 1995, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
- [21] Foresti M.L., Galle M., Ferreira M.L., Briand L.E., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2009, 84, 1461-1473.
- [22] Zhao X-G., Wei D-Z., Song Q-X., *J Mol Catal B: Enzym.* 2005, 36 (1-6), 47-53.
- [23] Pepin P., Lortie R., *Biotechnol Bioeng.* 1999, 63, 502-505.
- [24] Trani M., Ducret A., Pepin P., Lortie R., *Biotechnol. Lett.* 1995, 17, 1095-1098.
- [25] Ergan F., Trani M., Lortie R., *Ann. NY Acad. Sci.* 1995, 750, 228-231.

CAPITULO 2

ENZIMAS EN BIOCATÁLISIS

2.1. ENZIMAS: DEFINICION Y ESTRUCTURA

Las enzimas son proteínas desarrolladas por las células de 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]. Como todas las proteínas, las enzimas poseen cuatro niveles estructurales los cuales se describen brevemente a continuación [3, 4].

- **Estructura primaria:** queda definida por la secuencia (orden) de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos (Figura 1). Estos consisten en enlaces amida entre el α -carboxilo de un aminoácido con el α -amino del aminoácido siguiente. Por convención el orden de escritura es siempre desde el grupo amino-terminal hasta el carboxilo final.

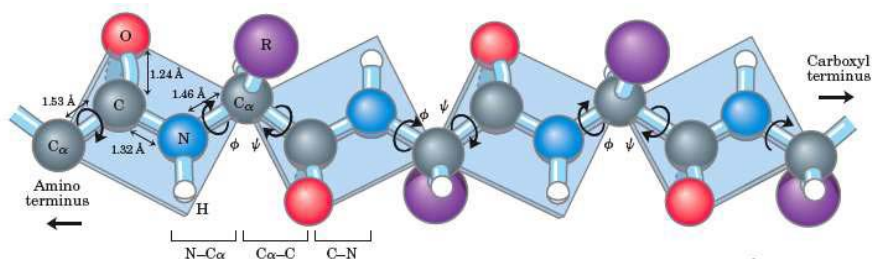


Figura 1. Representación del enlace peptídico (extraída de [5])

- **Estructura secundaria:** es la disposición de la secuencia de aminoácidos en el espacio. Se refiere a la disposición de aminoácidos que están muy cerca entre sí en la secuencia peptídica. Las estructuras secundarias están mantenidas por enlaces de hidrógeno entre el grupo N-H de un enlace peptídico y el grupo carbonilo (C=O) de otro enlace peptídico. Existen dos tipos de estructura secundaria regular: hélices α y láminas u hojas β . Reciben el nombre de regular porque son fácilmente reconocibles por sus características geométricas. La α -hélice, se forma al enrollarse helicoidalmente sobre sí misma la estructura primaria, lo cual se debe a la formación de enlaces de hidrógeno entre el C=O de un aminoácido (n) y el -NH- del cuarto

aminoácido que le sigue en la secuencia ($n+4$), este tipo de estructura tienen en promedio 3.6 aminoácidos por vuelta quedando las cadenas laterales de los mismos hacia afuera de la hélice. Dicha hélice es dextrógira. En la figura 2 se muestra esquemáticamente este tipo de estructura proteica.

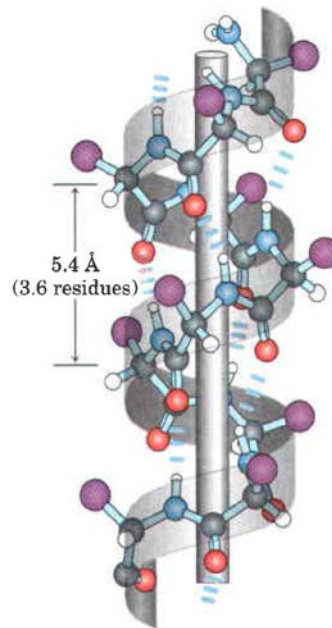


Figura 2. Estructura típica de α hélice (extraída de [5]). El extremo amino se encuentra en la parte superior de la imagen y el extremo carboxilo en el lado inferior. Los puentes de hidrógeno se indican con líneas punteadas celestes. Los colores tienen la misma asignación que en la figura 1.

En la **hoja β** los puentes de hidrógeno se producen entre cadenas polipeptídicas vecinas a diferencia del caso de las α -hélices. Esta estructura se forma por el posicionamiento paralelo/antiparalelo de dos cadenas de aminoácidos dentro de la misma proteína, en el que los grupos N-H de una de las cadenas forman enlaces de hidrógeno con los grupos C=O de la opuesta. Los grupos R de esta estructura están posicionados por sobre y por debajo del plano de las láminas en forma alternada. Estos R no deben ser muy grandes, ni crear un impedimento estérico, ya que se vería

afectada la estructura de la lámina. Los aminoácidos forman una cadena en forma de zigzag, y a ello se debe la denominación de lámina u hoja plegada. Si los extremos amino están del mismo lado en las cadenas vecinas la hoja β se denomina paralela y si las cadenas vecinas corren en dirección opuesta, la hoja β es llamada antiparalela (Figura 3).

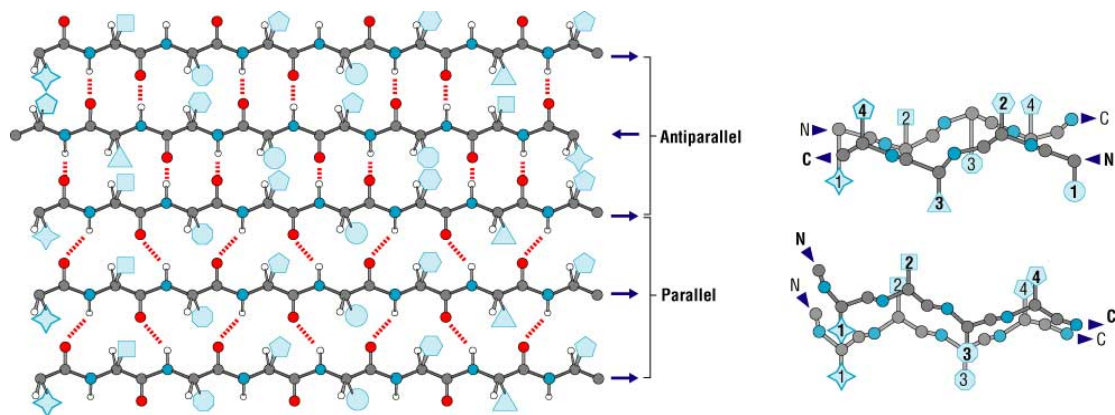


Figura 3. Representación de la hoja plegada β . Los puentes de hidrógeno se indican con líneas punteadas. En color rojo se indican los átomos de oxígeno y en color azul los de nitrógeno. Los símbolos celestes corresponden a los grupos R laterales de los aminoácidos

Las hojas β pueden formarse desde una única cadena peptídica si ésta contiene **giros β (beta turn)** que forman una estructura en forma de horquilla (Figura 4). Frecuentemente se encuentra el aminoácido prolina en estos giros.

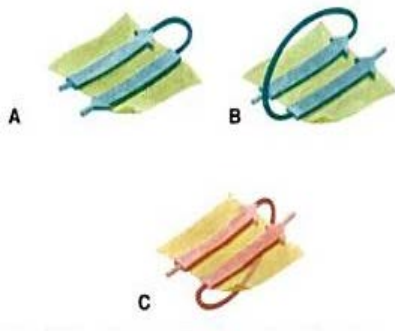


Figura 4. Conexiones entre cadenas polipeptídicas adyacentes de las hojas β plegadas. A) la conexión en horquilla entre cadenas antiparalelas se encuentra topológicamente en el plano de la hoja plegada. B) Conexión de entrecruzamiento dextrógira entre cadenas en una hoja plegada paralela. C) Conexión de entrecruzamiento levógira en una hoja plegada paralela (raras). (figura extraída de [3])

Estos giros β unen segmentos de estructuras regulares, tanto de α -hélices como de hebras de hojas β plegadas, su nombre se debe a que mayoritariamente se los encuentra conectando hebras en las hojas β . Casi siempre se encuentran en la superficie de la proteína e involucran cuatro residuos de aminoácidos sucesivos y se los considera como estructuras irregulares.

Las estructuras irregulares, también llamadas **espirales**, son los segmentos de las cadenas polipeptídicas cuyos residuos sucesivos no tienen valores similares de ángulos característicos. Cabe remarcar que estas estructuras no repetitivas, irregulares, no son menos ordenadas que las α -hélices o las hojas β , son solamente irregulares y por ende más difíciles de describir. (No confundir este término con espiral al azar que se refiere a conformaciones fluctuantes y desordenadas asumidas por las proteínas desnaturalizadas en solución). También se consideran estructuras irregulares a aquellas **variaciones de la estructura estándar** (ejemplo protuberancia β , retorcimientos de hojas β o α -hélices causadas por el aminoácido prolina, etc.) y los **giros β** descritos anteriormente en esta sección.

Casi todas las proteínas de más de 60 residuos contienen uno o más bucles de 6 a 16 residuos que no son componentes de hélices u hojas plegadas. Estos **bucles Ω** (llamados así por su forma), son entidades globulares compactas porque sus cadenas laterales tienden a ocupar sus cavidades internas. Dado que bucles Ω casi siempre se

localizan en la superficie de la proteína pueden tener un rol importante en el proceso de reconocimiento biológico.

Muchas proteínas tienen regiones en verdad desordenadas tales como los grupos extendidos cargados de la superficie o los extremos N-terminal o C-terminal. Con frecuencia se mueven en solución porque hay pocas fuerzas que los mantengan en su lugar. En ocasiones segmentos completos de la cadena polipeptídica se encuentran desordenados. Estos pueden tener roles funcionales como la unión de una molécula específica, de modo que pueden estar desordenados en un estado de la proteína (molécula ausente) y ordenados en otro (molécula unida).

• **Estructura terciaria:** consiste en la forma en la que se organizan en el espacio los diferentes tramos de la cadena polipeptídica que se encuentran muy alejados en la secuencia de aminoácidos. La estructura terciaria está mantenida por enlaces iónicos y de puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales de los aminoácidos, enlaces hidrofóbicos y eventualmente puentes disulfuro. La secuencia de una proteína codificada genéticamente determina su estructura tridimensional. El interior de una molécula de proteína contiene preponderancia de aminoácidos hidrofóbicos que tienden a agruparse y excluir al agua. Este núcleo (core) es estabilizado por fuerzas de Van der Waals y uniones hidrofóbicas. Por el contrario, el exterior de una molécula de proteína se compone principalmente de aminoácidos hidrofílicos, los cuales poseen carga o son capaces de formar puentes de hidrógeno con el agua. Esto hace que una proteína tenga mayor solubilidad en agua.

• **Estructura cuaternaria:** este nivel estructural sólo aparece en aquellas proteínas constituidas por varias subunidades, las cuales establecen entre sí asociaciones de tipo no covalente.

En la figura 5 se muestran en forma conjunta los distintos niveles estructurales de las proteínas.

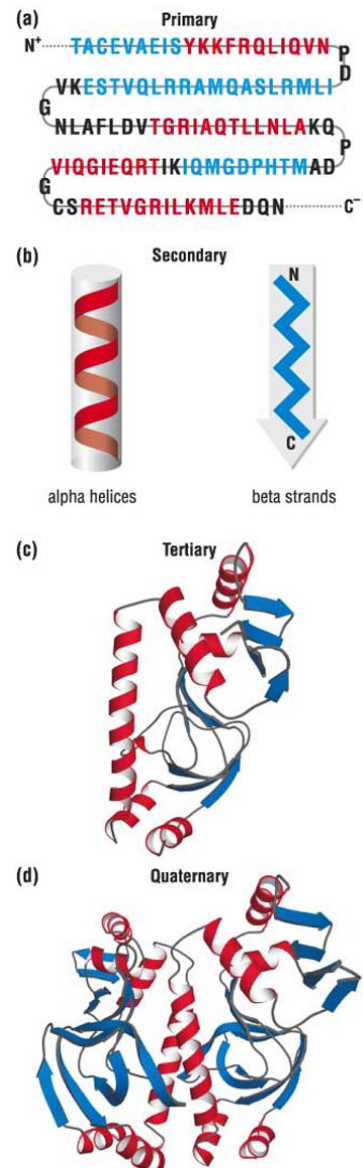


Figura 5. Niveles estructurales de proteínas. a) Primaria, b) secundaria, c) terciaria y d) cuaternaria.

2.2. NOMENCLATURA Y CLASIFICACION DE ENZIMAS

La *Comisión Internacional de Enzimas* ha recomendado una nomenclatura sistemática (Tabla 1) en la cual se designa a cada enzima por un nombre recomendado, generalmente corto y apropiado para su uso habitual, un nombre sistemático que identifica la reacción que cataliza y por un número de clasificación que identifica a la enzima de forma inequívoca [6]. Para ilustrar con un ejemplo, las lipasas empleadas en la presente Tesis se clasifican con el número E.C. 3.1.1.3, 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 «1» representa a la subclase (esterasa, por hidrolizar un enlace éster), la tercera cifra «1» indica la sub-subclase (esterasa que reconoce ésteres del glicerol) y la cuarta cifra «3» designa a la glicerol-éster-hidrolasa de ácidos de cadena larga.

Tabla 1. Clasificación internacional de las enzimas de acuerdo a su actividad biocatalítica y grupos sobre los que actúan.

<p>1.- OXIDO REDUCTASAS <i>Catalizan reacciones de oxido-reducción</i></p>	<p>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 -NH₂ 1.5 - Actúan sobre grupos imino =NH</p>
<p>2.- TRANSFERASAS <i>Catalizan la transferencia de grupos funcionales</i></p>	<p>2.1 - Grupos de un átomo de C 2.2 - Grupos aldehídicos o cetónicos 2.3 - Grupos acilo 2.4 - Grupos glucosilo 2.7 - Grupos fosfato 2.8 - Grupos que contienen azufre</p>
<p>3.- HIDROLASAS <i>Catalizan reacciones de hidrólisis</i></p>	<p>3.1 - Esteres 3.2 - Enlaces glucosídicos</p>

	3.4 - Enlaces peptídicos 3.5 - Otros enlaces C-N 3.6 - Anhídridos de ácido
4. LIASAS <i>Catalizan la adición a dobles enlaces</i>	4.1 - >C=C< 4.2 - >C=O 4.3 - >C=N-
5.- ISOMERASAS	5.1 – Racemasas y epimerasas
6.- LIGASAS <i>Catalizan la formación de enlaces con escisión de ATP</i>	6.1 - Entre átomos de C-O 6.2 - Entre átomos de C-S 6.3 - Entre átomos de C-N 6.4 - Entre átomos de C-C

2.3. CATALISIS ENZIMATICA

2.3.1. Generalidades como catalizadores

Las enzimas, como catalizadores, tienen las siguientes características principales [3, 7]:

- Altas velocidades de reacción: las reacciones catalizadas enzimáticamente son típicamente de 10^6 a 10^{12} veces más rápidas que la misma reacción sin catálisis, y varios ordenes de magnitud más rápidas que la reacción catalizada químicamente. Como todo catalizador, aceleran el curso de las reacciones al disminuir la energía de activación necesaria para que se lleven a cabo. Las enzimas normalmente catalizan las reacciones con mayor eficacia que los catalizadores inorgánicos. Como ejemplo tenemos 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. En cambio, esta energía es de 50 kJ/mol en presencia de platino, y disminuye a 8 kJ si está presente la peroxidasa (antiguamente denominada catalasa). Este efecto tan

drástico se debe a que las enzimas forman un complejo intermedio enzima-sustrato, que posteriormente se transforma en la enzima inicial y el producto.

- Las enzimas son selectivas: 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. 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 (5-10) 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 debido al plegamiento característico de la enzima. De todas formas, 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.
- 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. Así cuando la concentración del producto de la reacción biocatalizada aumenta hasta cierto valor, puede existir una inhibición de la enzima.
- 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.
- La mayoría de las enzimas son solubles en agua y presentan mayor actividad "in vivo" a pH= 7-8 y a temperatura ambiente. Esto lleva a que estos biocatalizadores requieran condiciones más suaves de reacción respecto a los

catalizadores químicos, los cuales normalmente requieren altas temperaturas y presiones como también valores extremos de pH.

- Se pueden utilizar varias enzimas en combinación para realizar transformaciones que sucedan en varios pasos sucesivos.
- Las enzimas se degradan en condiciones relativamente suaves. Por tanto la manipulación de las enzimas, tanto durante su utilización como durante su conservación, exige un manejo más delicado que otro tipo de catalizadores.

La inestabilidad, el precio elevado y la especificidad respecto a sustrato son los principales inconvenientes que presentan los procesos catalizados por enzimas. Sin embargo, muchos de estos problemas se han superado por las siguientes razones:

- 1) Un gran número de reacciones enzimáticas transforman sustratos estereoselectivamente y originan intermedios o productos de mucho interés en síntesis.
- 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.
- 3) Los avances de la biología molecular han permitido la manipulación del material genético, el aislamiento de genes y su expresión con el fin de obtener determinadas proteínas en grandes cantidades. Como consecuencia, el precio de las enzimas ha bajado. Además la ingeniería genética (“ingeniería de proteínas”) permite modificar la estabilidad, especificidad y otras características de las enzimas de manera de optimizar su performance en la reacción de interés.
- 4) La limitación que supone la insolubilidad de ciertos sustratos en agua, sobre los que las enzimas no son realmente activas, se ha visto en parte superada por la posibilidad de realizar reacciones en fases heterogéneas en las que el sustrato está presente en una disolución donde se suspende la enzima (medios no convencionales).

2.3.2. Catálisis enzimática en medios no convencionales

Las enzimas son proteínas diseñadas por sistemas biológicos para realizar una función catalítica sobre reacciones que tienen lugar en el interior de las células de seres vivos en los que se encuentran presentes. El disolvente predominante en el interior de las células es el agua, pero el ambiente nativo de las enzimas no es agua pura sino entornos compuestos por lípidos, proteínas y otras especies iónicas en agua. De acuerdo con lo anterior el medio acuoso podría definirse como el “*medio convencional*” en el que las enzimas desarrollan su acción. Cuando se emplea el término “*medio no convencional*” se hace referencia a un medio no acuoso.

En los últimos años el empleo de biocatalizadores en síntesis orgánica se ha convertido en una alternativa muy atractiva respecto a los métodos químicos convencionales debido a que las enzimas presentan una alta quimio-, regio- y enantioselectividad que las convierte en valiosos catalizadores en el campo de la química fina. Como se mencionó en la sección anterior, las reacciones catalizadas por enzimas normalmente se llevan a cabo en condiciones suaves y las enzimas son biocatalizadores muy eficaces, capaces de aumentar las velocidades de reacción 10^{12} veces. Además, los procesos biocatalíticos son menos peligrosos, contaminantes y consumen menos energía que las metodologías químicas convencionales.

Todas estas razones han hecho de los biocatalizadores un tema de investigación muy popular tanto en el ámbito académico como industrial. El alto potencial de las enzimas como catalizadores es ampliamente conocido, sin embargo cuando su uso se restringe al medio natural acuoso su utilidad y alcance están limitados debido a que la mayoría de los compuestos orgánicos son insolubles en agua, y en ella pueden tener lugar reacciones secundarias indeseables (hidrólisis, racemización, etc.). El equilibrio termodinámico de muchos procesos es desfavorable en agua, y la recuperación de los productos no es algo trivial ya que el agua es un disolvente difícil de eliminar por su alto punto de ebullición y calor de vaporización.

En principio, muchos de estos problemas se resuelven usando disolventes orgánicos en lugar de agua como medio de reacción. A primera vista tal sustitución parecería imposible debido a la idea convencional de que las proteínas se desnaturalizan (pierden su estructura nativa) en disolventes orgánicos. Sin embargo, esta idea viene de examinar enzimas en mezclas de agua con solventes orgánicos y no en disolventes orgánicos puros. En realidad, en ausencia de agua, que actúa como lubricante molecular, las enzimas son muy rígidas. Por lo tanto, aunque en mezclas de agua con solventes orgánicos las proteínas tienen tendencia a desnaturalizar y suficiente flexibilidad conformacional para hacerlo, en disolventes orgánicos “secos” su tendencia a desnaturalizar es mayor pero la flexibilidad necesaria para hacerlo está ausente, es decir, el control es cinético más que termodinámico en estos sistemas. Como consecuencia, la conformación nativa de las enzimas se retiene en gran medida en disolventes orgánicos y muchas enzimas son capaces de catalizar reacciones en medios no acuosos [8]. Durante los últimos 25 años ha quedado bien demostrado que la utilidad tecnológica de las enzimas se puede aumentar marcadamente empleándolas en disolventes orgánicos en lugar de en su entorno acuoso natural [9]. El hecho de que generalmente la actividad enzimática en solventes anhidros, o con poco contenido de agua, es menor a la actividad enzimática en agua a veces confunde sobre el potencial de la enzimología no acuosa. Hay que tener en cuenta que desde el punto de vista industrial la verdadera pregunta es si la actividad enzimática es lo suficientemente alta como para la aplicación prevista, no la comparación con la actividad enzimática en agua [8].

El grupo de Klibanov ha estudiado la actividad de la proteasa subtilisina en la reacción de transesterificación o hidrólisis de un éster en acetonitrilo y en agua [8]. Esta proteasa tiene una actividad que resulta 7 órdenes de magnitud más baja cuando se encuentra suspendida en acetonitrilo respecto a la enzima disuelta en agua. Mediante estudios de cristalografía de rayos X y espectroscopia de infrarrojo (FTIR) determinaron que no hay diferencias en las estructuras terciaria ni secundaria de esta enzima en agua y en acetonitrilo. Sin embargo, determinaron por FTIR que ocurre un cambio muy

importante en la estructura secundaria al liofilizar la enzima, y que tal desnaturalización es reversible. Así, no es el contacto con el solvente orgánico (acetonitrilo, octano, dioxano) sino la deshidratación durante la liofilización lo que altera de forma marcada la estructura. Esto puede superarse empleando lioprotectores.

Por otro lado plantean que la primera etapa de cualquier reacción enzimática consiste en la unión del sustrato al centro activo, lo cual implica un paso de desolvatación previo. La subtilisina y muchas otras enzimas poseen centros activos hidrofóbicos y trabajan mejor con sustratos hidrofóbicos. Cuanto más fuertemente esté asociado el sustrato al solvente, menos favorable será la desolvatación y por lo tanto la reacción. La posición del equilibrio entre sustrato unido a enzima y sustrato libre depende de la energía de solvatación.

Otro término que afecta a la energía de activación es la energía del estado de transición. Para la subtilisina y muchas otras hidrolasas este estado de transición de la reacción es muy polar. Si el estado de transición queda totalmente cubierto del medio externo un cambio de solvente no afecta la estabilidad del mismo, sin embargo esto no siempre ocurre y existe en muchos casos una exposición aunque sea parcial del estado de transición al solvente, y en estos casos el agua lo estabilizará mejor que un solvente orgánico de menor polaridad.

En cuanto a la flexibilidad o movilidad conformacional, como se mencionó anteriormente, ésta será menor en solventes orgánico ya que es el agua la molécula que determina este parámetro en proteínas. Por un lado la disminución de flexibilidad genera mayor estabilidad conformacional y térmica, aspecto muy importante que da lugar a la posibilidad de empleo de enzimas en medio no acuoso. Pero si la pérdida de flexibilidad es extrema será afectada la actividad enzimática la cual requiere cierta movilidad estructural dada por las moléculas de aguas conocidas como esenciales para la enzima. A esto se asocia el hecho experimental de que las enzimas presenten menor actividad en medios orgánicos polares respecto a medios orgánicos hidrofóbicos.

El pH es otro aspecto que tienen en cuenta Klibanov y colaboradores en sus análisis. El estado de protonación de los distintos grupos ionizables de una enzima es importante para la actividad enzimática, tanto en medio acuoso como orgánico. En agua, la ionización puede controlarse mediante ajustes de pH pero en medio orgánico la situación es más complicada, de hecho el concepto de pH deja de tener sentido. Lo que se ha demostrado es que en solventes orgánicos las enzimas tienen “memoria de pH”, es decir, su actividad catalítica refleja el pH de la solución acuosa de la cual fueron recuperadas (liofilización o precipitación). Este fenómeno es debido a que los grupos ionizables de la proteína retienen su último estado de ionización en el proceso de deshidratación (o precipitación).

2.3.3. Sistemas con co-solventes orgánicos: metodologías y ventajas

Los solventes orgánicos en biotransformaciones suelen utilizarse en sistemas bifásicos (solvente-agua inmiscibles), como un sistema micelar inverso o bien suele utilizarse el solvente puro.

En los sistemas bifásicos las enzimas y los compuestos hidrofílicos se encuentran en la fase acuosa, donde la reacción tiene lugar, mientras que los compuestos hidrofóbicos se encuentran en la fase orgánica. En los sistemas micelares inversos, las moléculas de enzima están solubilizadas en micelas inversas, hidratadas y discretas, compuestas por surfactantes e inmersas en una fase continua de disolvente orgánico hidrofóbico. Bajo condiciones adecuadas estos sistemas son termodinámicamente estables y ópticamente transparentes. Por último, en los sistemas formados únicamente por el disolvente orgánico, las preparaciones enzimáticas sólidas (enzimas liofilizadas o inmovilizadas sobre un soporte inerte) están suspendidas en el medio en presencia de suficiente cantidad de agua (como norma general menor al 5% v/v) para asegurar la actividad enzimática. Aunque cada uno de estos sistemas tenga sus ventajas y desventajas el más utilizado es el sistema de disolvente orgánico neto y es el utilizado en éste trabajo de investigación en particular.

Finalmente se presentan, en base a lo expuesto, las ventajas de la biocatálisis en medio orgánico [10]:

- Es posible la catálisis de reacciones que son desfavorables en agua.
- Reacciones colaterales inducidas por el agua, como la hidrólisis, son suprimidas.
- Los sustratos hidrofóbicos se pueden solubilizar.
- Los biocatalizadores al ser insolubles en disolventes orgánicos (tanto en forma libre como inmovilizada) se pueden recuperar fácilmente mediante una simple filtración, permitiendo en muchos casos su reutilización y reciclado.
- La termoestabilidad del catalizador se incrementa, al menos mientras el contenido de agua se mantenga lo suficientemente bajo.
- La selectividad enzimática puede afectarse intensamente e incluso cambiarse según el disolvente empleado, lo que se conoce como “ingeniería del solvente” y es una alternativa a la “ingeniería de proteínas”.

2.4. LIPASAS

2.4.1. Función biológica

Las lipasas (glicerol ester hidrolasas E.C. 3.1.1.3.) son un grupo de enzimas cuya función biológica consiste en catalizar la hidrólisis reversible de triglicéridos de grasas animales y aceites vegetales para obtener como productos finales glicerol y ácidos grasos libres o sus productos intermedios como mono y diglicéridos según se presenta en la figura 6.

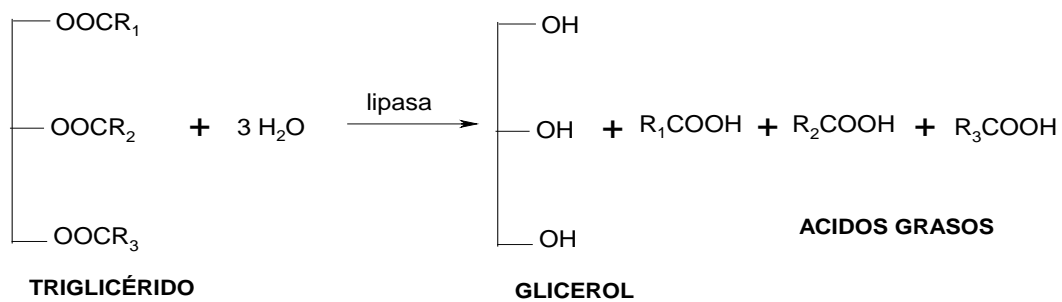


Figura 6. Función biológica de lipasas: hidrólisis de triglicéridos

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, y han sido aisladas de microorganismos, plantas y animales [11]. En el campo de la biocatálisis todos los esfuerzos se han enfocado sobre las de origen microbiano debido a su gran accesibilidad y a que su producción pudo manipularse gracias a la ingeniería genética actual [12]. Se pueden encontrar en bacterias, levaduras y hongos, y la mayoría son lipasas exocelulares, es decir, atraviesan la membrana celular una vez sintetizadas y pasan al medio externo. Muchas de estas lipasas microbianas han sido purificadas y secuenciadas [13, 14]. En general son glicoproteínas que contienen entre un 3 % y un 15 % de glúcidos en su estructura, preferentemente manosa. También es frecuente que un mismo microorganismo produzca varias isoenzimas, es decir, diferentes variantes de una misma enzima que poseen idéntica función y se encuentran simultáneamente en un organismo, éstas catalizan la misma reacción pero difieren en sus secuencias de aminoácidos debido a que son productos de distintos genes o de diferentes alelos de un mismo gen [15]. Estas isoenzimas actúan en algunas ocasiones sobre sustratos diferentes y en la mayoría de los casos presentan diferencias en sus parámetros cinéticos y condiciones óptimas de reacción [7].

2.4.2. Estructura y mecanismo de acción

En la naturaleza (función hidrolítica natural) las lipasas actúan en la interfase orgánica-acuosa, y su modelo cinético normalmente no se ajusta a cinéticas de tipo Michaelis-

Menten sino que son generalmente mucho más complejas [16]. Los sustratos propios de las lipasas son ésteres insolubles, así las lipasas deben ser capaces de interactuar con la interfase de sus sustratos agregados. La mayoría se caracteriza por ser activadas por interfase, es decir, al adsorberse sobre una interfase acuosa/lipídica desarrollan una actividad muy superior a la que muestran en la fase acuosa, fenómeno que se conoce como *activación interfacial*.

Esta activación normalmente se produce mediante un fenómeno de adsorción inicial sobre la interfase, al que sigue la reacción propiamente dicha, con la formación del complejo enzima-sustrato y posterior liberación de los productos a la fase acuosa y regeneración de la enzima [17].

En el caso de las esterasas, éstas catalizan la hidrólisis de ésteres solubles, trabajando sin interfase y pudiendo describirse su cinética mediante modelos de Michaelis-Menten. En este punto es necesario aclarar que la mayoría de las lipasas son también esterasas.

Las interpretaciones teóricas sobre la activación en la interfase y la posterior hidrólisis de los sustratos se han basado en los datos estructurales de las lipasas. En estos estudios estructurales se ha recurrido a la mutagénesis dirigida y al análisis por difracción de Rayos X de los cristales obtenidos a partir de lipasas purificadas.

En el caso de la lipasa pancreática humana, la eliminación de la serina en posición 152 supone la inactivación de la enzima [18]. Este aminoácido está incluido en una secuencia Gly-His-Ser-Leu-Gly similar a la encontrada en la lipasa hepática porcina, que es Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly [19, 20]. En todas las secuencias de lipasas analizadas hasta la fecha, tanto en eucariotas como en procariotas, a pesar de las diferencias existentes, siempre se encuentra la secuencia consenso Gly-X-Ser-X-Gly [21, 22]. Por esta razón se pensó en la existencia de un centro de reconocimiento de la interfase, topográficamente diferente al centro activo. La secuencia altamente conservada Gly-X-Ser-X-Gly forma un característico motivo tipo β -giro- α llamado "codo nucleofílico" [23].

Desde 1990 se han descrito estructuras tridimensionales de lipasas que están disponibles en el Protein Data Bank ([http:// www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)). Estas estructuras, a pesar de que poseen diferentes secuencias de aminoácidos y difieren en tamaño (22-60 kDa), se pliegan de una forma similar y poseen centros activos parecidos. El plegamiento de todas las lipasas se corresponde con el modelo de α/β hidrolasa en el que es característico un núcleo de láminas β (en su mayoría dispuestas paralelamente) rodeadas por α -hélices [24, 25]. Este plegamiento incluye la tríada catalítica típica de las lipasas (serina, histidina y glutámico o aspártico), así como un hueco donde encaja un oxianión [22].

Generalmente el centro activo de las lipasas no es accesible al sustrato, ya que está recubierto por un bucle que lo hace totalmente inaccesible al disolvente. Esto se da en todas las lipasas excepto en la cutinasa. El fenómeno de activación interfacial se ha asociado a que al contacto con la interfase lípido/agua el bucle sigue un reordenamiento conformacional descubriendo al sitio activo [26]. Aunque surgieron controversias al encontrarse que la presencia de dicho bucle no siempre está relacionada con la activación interfacial, ya que las lipasas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antarctica* y una lipasa pancreática no presentan este fenómeno a pesar de estar provistas de dicho bucle [26, 22]. Esto hace que una lipasa de *Candida antarctica* esté mejor adaptada a los medios orgánicos que una lipasa de *Thermomyces lanuginosa* (considerada una lipasa típica), ya que la primera no posee un bucle convencional, sino más bien una hélice de gran movilidad que actúa como tal, y la estructura parece estar en conformación abierta con el centro activo accesible [27].

En cuanto a la reacción propiamente dicha, la hidrólisis sucede mediante un mecanismo similar al de las serin-proteasas con los siguientes pasos [28] (Figura 7):

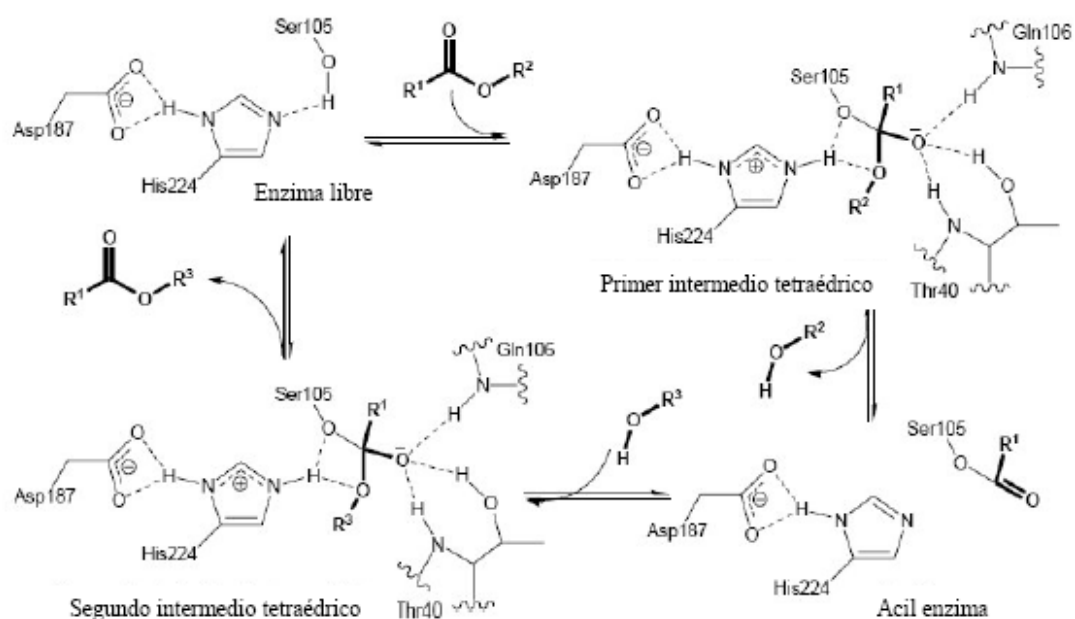


Figura 7. Mecanismo de reacción de lipasas. La numeración de los aminoácidos del sitio activo corresponden a la lipasa B de *Candida antarctica*. (Extraído de [23]).

1. El sustrato se sitúa en el centro activo de la lipasa de tal manera que el carbono carbonílico toma contacto con el grupo -OH de la serina. El protón del grupo hidroxilo de la serina se transfiere al N ϵ de la histidina de la triada catalítica y el O γ con carga negativa ataca nucleofílicamente al grupo carbonilo del sustrato con lo que se produce un intermediario tetraédrico (Td 1).
2. La carga negativa, en un principio situada en el O γ de la serina, sufre una translocación hacia el oxígeno del grupo carbonilo, originando un oxianión. Este oxianión encaja en un hueco que se forma tras la apertura del bucle (tapadera). En la cutinasa de *Fusarium solana* que carece de dicho bucle y en las lipasas en las que no sucede la activación interfacial, también se ha observado este hueco en el centro activo [29].

3. El intermedio tetraédrico se rompe cuando el protón cedido a la histidina se transfiere al oxígeno del alcohol. El alcohol se libera y seguidamente se forma el complejo acil-enzima.
4. Se produce un segundo ataque nucleofílico, esta vez de una molécula de agua sobre el carbono carbonílico del complejo acil-enzima. Se forma un nuevo intermedio tetraédrico (Td2) que, a continuación se rompe, liberando un ácido graso y regenerando el -OH de la serina.

La función del ácido glutámico/aspártico, presente en la triada catalítica, es la estabilización de la carga positiva generada sobre la histidina en los intermedios tetraédricos.

Este tipo de mecanismo de reacción se conoce con el nombre de Mecanismo ping-pong bi bi dado que el primer sustrato ingresa al sitio activo de la enzima y forma el primer intermedio tetraédrico, luego el primer producto sale del centro activo y se forma el complejo acil-enzima. Después ingresa el segundo sustrato de la reacción al centro activo y se forma el segundo intermedio tetraédrico. Finalmente, el segundo producto sale del centro activo y la enzima queda libre para comenzar otro ciclo catalítico [23].

Como observa en la figura 7, las lipasas pueden catalizar reacciones de transferencia de acilo entre varios compuestos. Así, dependiendo de los grupos R que aparecen en el esquema de la figura 7 la reacción puede ser la hidrólisis de un éster, una esterificación o una transesterificación. El segundo sustrato también puede ser una amina, lo que resultaría en una aminólisis. En las reacciones de hidrólisis o transesterificación el primer sustrato (dador de acilo) puede ser también un tioéster [23].

2.4.3. Homologías estructurales entre Lipasas. Especificidad de sustrato

Como se mencionó en la sección 2.4.2., todas las lipasas tienen en común en sus estructuras un núcleo de láminas β paralelas rodeadas por α hélices. Además poseen

una triada catalítica cuyo orden en la secuencia aminoacídica es similar. Todas las lipasas investigadas hasta la fecha muestran un grado sorprendente de similitud estructural y funcional, independientemente del organismo del que se aislaron e incluso aunque las homologías en la secuencia de aminoácidos sean bajas [30].

En los trabajos de Uppenberg y Cygler-Schrag se ha demostrado que el sitio activo de las lipasas se encuentra dividido en un sitio de unión al acilo y un sitio de unión al alcohol, siendo éste último el que posee mayor especificidad por sustrato [14, 31]. De hecho existe una cantidad considerable de publicaciones acerca de la estereoselectividad del sitio de unión a alcoholes de las lipasas [32]. CALB es un ejemplo de alta estereoselectividad por alcoholes secundarios debido a la geometría del hueco oxoanión, el cual estabiliza al intermedio tetraédrico [33]. También se encuentran trabajos acerca de la preferencia de diferentes lipasas por sustratos de acilo de diferente largo de cadena debido a la geometría el sitio activo [34].

En la tabla 2 se pueden observar las homologías en las secuencias existentes entre varias lipasas [7]. Se cree que todas estas enzimas proceden de un mismo gen y que posteriormente han sufrido una evolución diferente con el tiempo.

Tabla 2. Homologías en las secuencias aminoacídicas de lipasas

Lipasa	Secuencia consenso Gly-X-Ser-X-Gly	His catalítica	Asp/Glu Catalítico	Hueco oxianiónico
CVL, PCL	-Gly85-His86- Ser87 -Gln88- Gly89-	-His285-Leu286	-Asp263-	-Gly16-Leu17-
RML	-Gly142-His143- Ser144 -Leu145- Gly146-	-His257-Leu258-	-Asp203-	-Gly81-Ser82-
HLL	-Gly144-His145- Ser146 - Leu147-Gly148-	-His258-Leu259-	-Asp201-	-Gly82-Ser83-
PcamL	-Gly143-His144- Ser145 - Leu146-Gly147-	-His259-Ile260-	-Asp199-	-Gly83-Ser84-
ROL	-Gly143-His144- Ser145 - Leu146-Gly147-	-His257-Leu258-	-Asp204-	-Gly82-Thr83-
PPL	-Gly150-His151- Ser152 - Leu153-Gly154-	-His263-Leu264-	-Asp176-	-Gly76-Phe77-
CAL-B	-Thr103-Trp104- Ser105 - Gln106-Gly107-	-His224-Ala225-	-Asp187-	-Gly39-Thr40-
CRL (lip1)	-Gly207-Glu208- Ser209 - Ala210-Gly211-	-His449-Ser450-	-Glu341-	-Gly123-Gly124-
GCL (lipII)	-Gly215-Glu216- Ser217 - Ala218-Gly219-	-His463-Gly464-	-Glu354-	-Gly131-Ala132-

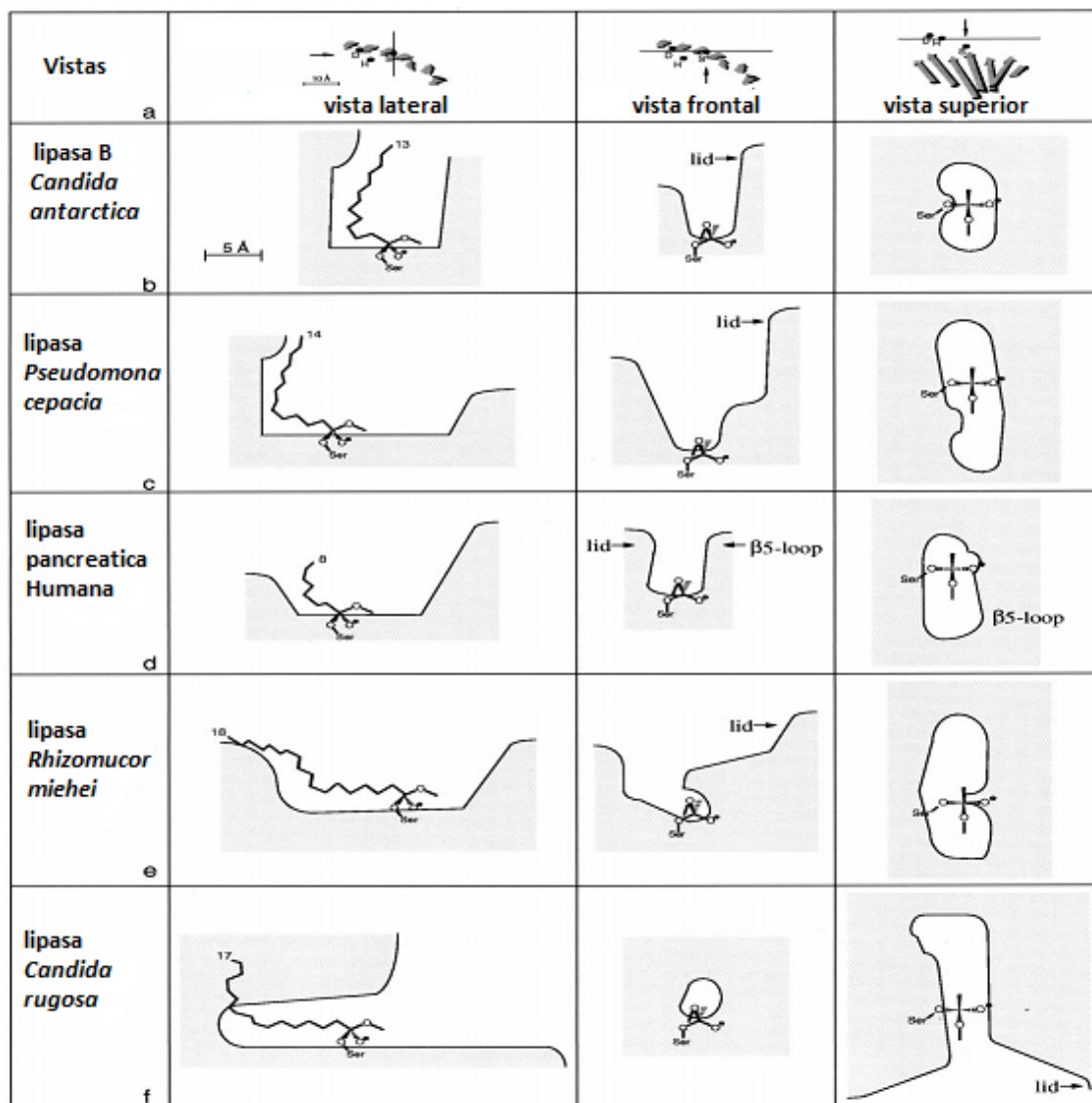
PCL: lipasa *P. glumae*, RML: lipasa *R. miehei*, HLL: lipasa *H. lanuginosa*, PcamL: lipasa *P. cambebertii*, ROL: lipasa *R. delemar*, PPL: lipasa pancreática humana, CAL-B: lipasa B de *C. antarctica*, CRL: lipasa *C. rugosa*, GCL: lipasa *G. candidum*.

No obstante, como se mencionó anteriormente, a pesar de estas similitudes, variaciones sutiles en la estructura del centro activo pueden tener grandes efectos en las propiedades catalíticas y la estabilidad de la lipasa en un disolvente determinado.

Todas las lipasas aceptan ésteres de cadena mediana (de 4 átomos de carbono, C4) a larga (C16), algunas son incluso capaces de hidrolizar ésteres de ácidos grasos muy largos (C22). La especificidad de sustrato (referida a la especie dadora del grupo acilo)

está determinada por la forma del centro activo que impone las preferencias en el tamaño de cadena que acepta cada lipasa como se muestra en la figura 8 [34].

Los triglicéridos suelen ser moléculas grandes que deben encajar en la cavidad del centro activo para que puedan ser hidrolizados correctamente. En el caso de la lipasa B de *Candida antarctica*, el centro activo se encuentra al final de un profundo y estrecho túnel que sólo es capaz de admitir triglicéridos de pequeño tamaño. En cambio, en la lipasa de *Candida rugosa*, el túnel que está en las inmediaciones del centro activo, es capaz de albergar una cadena de, al menos, doce átomos de carbono.



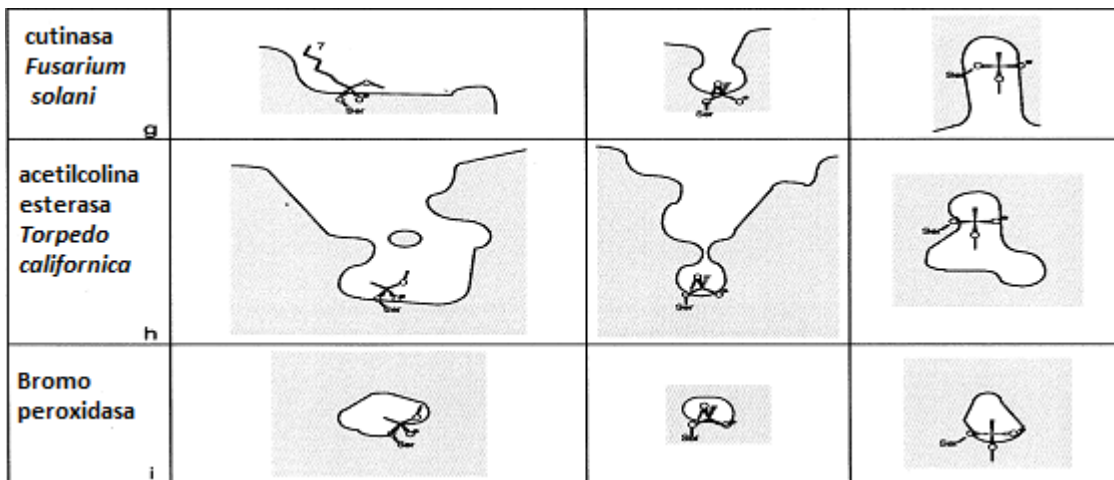


Figura 8. Geometría del centro activo de varias lipasas y esterases. El alcohol no se muestra por claridad. El número indica la longitud del ácido graso más grande que es capaz de unirse completamente al centro activo (extraído de Pleiss et al. [34]).

Las lipasas muestran diferentes tipos de especificidad [7]:

- 1) especificidad para un determinado lípido
- 2) especificidad para una determinada posición en un triglicérido
- 3) especificidad para un determinado ácido graso del triglicérido

1) Lipasas específicas para determinados lípidos: es el caso de la lipasa producida por una cepa de *Penicillium cyclopium* que presenta mayor actividad sobre monoglicéridos que sobre di y triglicéridos. Este tipo de selectividad es dependiente de la temperatura en el caso de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

2) En función de su especificidad posicional, las lipasas se dividen en dos grupos:

2-a) Lipasas no específicas, es decir, aquellas que catalizan la hidrólisis del grupo éster cualquiera sea su posición sobre el esqueleto del glicerol o la naturaleza del ácido graso liberado. Catalizan la hidrólisis completa del triglicérido pero también conducen a la formación de productos intermedios (1,2), (2,3), (1,3) diglicéridos y monoglicéridos. Dentro de este grupo se encuentra la lipasa B de *Candida antarctica*

usada en este trabajo y lipasas de *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescens* y *Geotrichum candidum* [35].

2-b) Lipasas específicas: que pueden presentar dos tipos de especificidad posicional:

2-b.1. lipasas 1,3-específicas: liberan los ácidos grasos unidos a las posiciones 1 y 3 del glicerol. Este tipo de especificidad se ha observado en las lipasas de *Rhizopus arrhizus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* y *Mucor miehei*.

2-b.2. lipasas 2-específicas: este tipo de especificidad es extremadamente raro y sólo encontramos como ejemplo la lipasa de *Geotrichum candidum*, capaz de hidrolizar los ésteres del ácido oleico y linoleico en la posición 2 del glicerol.

3) Especificidad de ácido graso: algunas lipasas catalizan la hidrólisis de un determinado tipo de ácido graso particular en un triglicérido. Dicha especificidad se refiere al número de átomos de carbono del ácido graso y también al grado de insaturación del mismo. En general se observa que para una misma longitud de cadena carbonada la velocidad de hidrólisis aumenta con el grado de insaturaciones. Para el caso específico de CALB, según lo visto previamente esta enzima es más activa con ácidos grasos de cadena corta-mediana [34, 35].

En este contexto, se ha intentado racionalizar la preferencia enantiomérica de las lipasas basándose en los requerimientos estéricos de los sustituyentes. Las denominadas “reglas de Kazlauskas” se resumen en la figura 9 [36]. La experiencia ha demostrado que la regla es bastante predictiva para la acción de las lipasas sobre alcoholes secundarios, pero menos para las transformaciones de alcoholes primarios y ácidos carboxílicos.

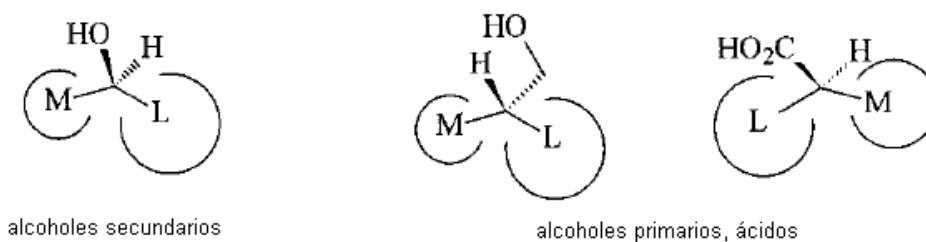


Figura 9. Reglas de Kazlauskas. M: sustituyente de tamaño medio, L: sustituyente de tamaño grande. En reacciones de acilación el enantiómero mostrado reacciona más rápido, en reacciones de hidrólisis el ester del enantiómero mostrado reacciona más rápido (extraído de Kazlauskas et al. [36]).

2.4.4. Reacciones catalizadas por lipasas

Como se mencionó en el punto 2.4.1. la reacción que por naturaleza catalizan estas enzimas es la hidrólisis de triglicéridos, es decir la hidrólisis del enlace éster. Sin embargo, aunque son muy específicas en cuanto al enlace químico sobre el cual actúan también catalizan otras reacciones no necesariamente lipolíticas, lo que hace que esta clase de enzimas tenga una amplia utilización en reacciones diversas. La figura 10 presenta las reacciones catalizadas por las lipasas.

Aplicaciones muy interesantes surgen de la capacidad de estas enzimas de catalizar la reacción inversa lo que les permite la síntesis de ésteres, la transesterificación y la interesterificación [17]. La concentración de agua en el medio de reacción determinará el desplazamiento del equilibrio hacia la síntesis o hidrólisis del enlace éster en estos sistemas.

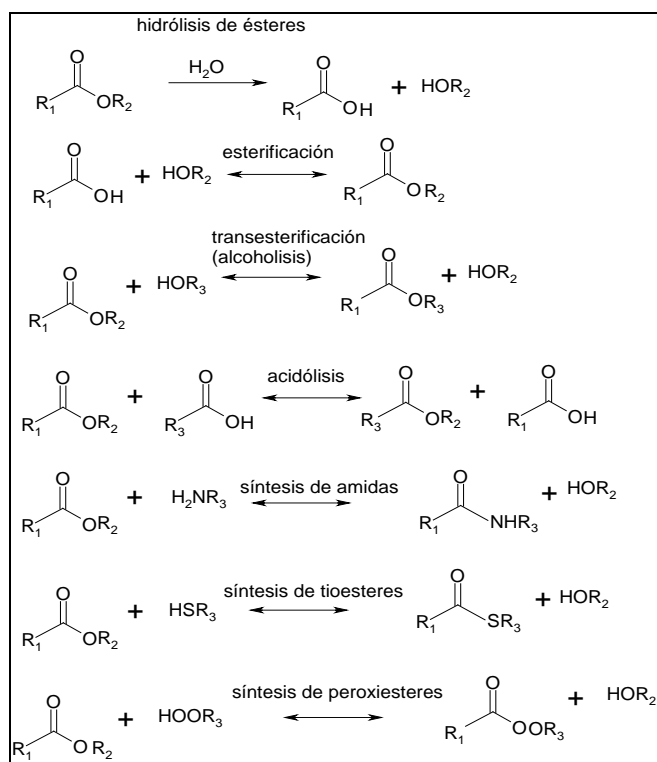


Figura 10. Reacciones catalizadas por lipasas

La transesterificación se define como una reacción de síntesis en la cual el sustrato donante del grupo acilo es un éster y se distinguen dos tipos de transesterificación según la especie aceptora del grupo acilo sea el glicerol (glicerólisis) o un alcohol (alcoholólisis).

La interesterificación es un proceso útil para cambiar la composición de ácidos grasos en un enlace éster, en el cual el grupo acilo se intercambia entre un éster y un ácido graso (acidólisis) o entre dos ésteres.

2.4.5. Aplicaciones biotecnológicas de lipasas

Las razones del enorme potencial biotecnológico de las lipasas son su gran estabilidad en disolventes orgánicos, no requieren cofactores, tienen una amplia especificidad de sustrato y presentan una elevada enantioselectividad [28].

A continuación se indican los distintos tipos de reacciones con interés industrial catalizadas por lipasas, mostrando así la importancia biotecnológica de dichas enzimas [37].

a) Reacciones de hidrólisis:

- Hidrólisis de aceites vegetales en la industria oleoquímica.
- Producción de aromas y sabores para la industria alimentaria.
- Inclusión en detergentes para la eliminación de manchas de grasa.
- Finalidades analíticas para la determinación de la estructura de triglicéridos.
- Resolución de mezclas quirales.

b) Reacciones de síntesis

- Síntesis de triglicéridos.
- Síntesis de precursores de péptidos.
- Producción de esteroides para la industria farmacéutica.
- Resolución de mezclas racémicas de alcoholes en la industria farmacéutica.
- Síntesis de alcoholes terpénicos como saborizantes.
- Síntesis de ésteres glucídicos para la industria cosmética.

c) Reacciones de interesterificación

- Variación de la composición de ácidos grasos en mezclas de triglicéridos.
- Eliminación de ácidos grasos responsables de causar inestabilidad en el sabor de ciertos aceites y mantequillas.

d) Reacciones de transesterificación.

- Preparación de compuestos enantioméricamente puros.
- Transesterificaciones enantioselectivas dobles.

Actualmente el estudio de las lipasas se orienta, por un lado, a una serie de aplicaciones de química fina de interés fundamentalmente farmacéutico y

básicamente en la resolución de compuestos quirales ya que en las normativas de legislación se tiende a exigir productos ópticamente puros en lugar de mezclas racémicas. Algunos de los trabajos, dentro de esta área, en los que se centra la atención se mencionan a continuación [37]:

- Preparación de cicloalcanoles enantioméricamente puros como intermediarios de reacciones de interés farmacológico.
- Síntesis enantioselectiva de α -amino- β -hidroxi ácidos como productos para elucidar estructuras tridimensionales de proteínas y péptidos.
- Preparación de análogos de hormonas enantioméricamente puros.
- Preparación de enantiómeros puros del ácido 2-aril-propiónico, como ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno entre otros, de utilidad farmacológica como antiinflamatorios.
- Síntesis altamente diastereoselectiva de β -Lactonas como intermediarios para la producción de compuestos quirales.
- Producción de agentes antipsicóticos como derivados de butirofenonas enantioméricamente puros.
- Síntesis de piranonas ópticamente puras, útiles en ciertas reacciones quirales como adiciones cíclicas.
- Resolución cinética de alcoholes secundarios.
- Preparación de quinonas diterpenoides útiles en el tratamiento de artritis.
- Producción de biosurfactantes como ácido araquidónico de aplicación en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.
- Preparación de etanolaminas ópticamente activas de interés fisiológico en medicina.
- Bioconversión de triglicéridos con ácidos grasos poliinsaturados a hidroperóxidos de alta reactividad en industria alimentaria.
- Síntesis de productos antitumorales como acetomicina.

- Síntesis de antioxidantes derivados de la vitamina E (benzofuraniles) para el tratamiento de ciertas enfermedades.
- Transesterificaciones de 1,3-propanodiolos para la construcción de 3-acetoxipropanoles usados en la síntesis de alcaloides.
- Síntesis de compuestos fluoroorgánicos para síntesis de biomoléculas.
- Preparación de cianocicloalcanoles para posterior producción de 1,3-heterociclos.
- Construcción de biosensores, por ejemplo, para la determinación de ácidos grasos en alimentos.
- Producción de peroxiácidos importantes en síntesis orgánica y en la industria química.
- Resolución de antibióticos como nitroimidazoles.

Por otro lado, una aplicación interesante, actualmente en estudio, es el tratamiento de residuos incluyendo la destrucción, prevención o limpieza de sólidos, películas y efluentes con un alto contenido en grasas [23].

2.4.6. Lipasa B de *Candida antarctica*

La *Candida antarctica* es una levadura basidiomiceto que, como indica su nombre fue aislada en la Antártida con el propósito de encontrar enzimas capaces de operar en condiciones extremas para poder usarlas en formulaciones de detergentes [38]. Su lipasa (CAL) es probablemente la más versátil de todas las lipasas empleadas en biotransformaciones preparativas. Como otros microorganismos, produce dos isoenzimas A y B, que difieren en cierta medida: mientras la isoenzima A (CAL A) es dependiente de Ca^{+2} y más termoestable, la B (CAL B) es menos termoestable (aunque lo es mucho más que la mayoría de las lipasas) y no dependiente de cationes metálicos [39]. La especificidad de sustrato varía bastante, ya que CAL A es altamente activa de manera no específica sobre triglicéridos, mostrando cierta preferencia por el grupo

éster en posición *sn*-2. Así mismo presenta baja actividad frente a ésteres simples y preferencia de ácidos carboxílicos de cadena lineal larga [38, 39]. Mientras que CAL B presenta una preferencia *sn*-3 respecto a triglicéridos aunque su especificidad es más bien amplia hacia el sustrato donador de acilo y presenta un alto grado de selectividad hacia el sustrato alcohol [30, 39]. CALB es menos activa frente a triglicéridos grandes pero resulta muy activa sobre un rango muy amplio de ésteres no naturales (ésteres simples, amidas y tioles) [39]. Esta isoenzima ha demostrado ser altamente esteroespecífica tanto en hidrólisis como en síntesis orgánica [31]. La tabla 3 resume en forma comparativa las características de estas isoenzimas.

Tabla 3. Características de CAL A y CAL B (extraída de [38]).

	CALA	CALB
Peso molecular (kD)	45	33
Punto isoeléctrico (PI)	7.5	6.0
pH óptimo	7	7
Actividad específica (LU/mg)	420	435
Termoestabilidad a 70 °C ^a20 min	100	15
.....120 min	100	0
pH estabilidad	6-9	7-10
Activación interfacial	Si	No
Especificidad posicional hacia triglicéridos	<i>Sn</i> -2	<i>Sn</i> -3

^a actividad residual luego de incubación a 70 °C en buffer 0,1M Tris (pH = 7) durante 20 minutos y 120 minutos.

^b pH al cual más del 75% de la actividad es retenida durante incubación por 20 horas a temperatura ambiente



Figura 11. Estructura tridimensional de CALB (1TCB del PDB, basado en información de [31])

Al igual que otras lipasas sigue un mecanismo de acción típico de serin-proteasas. La secuencia de aminoácidos, la cual se muestra en la figura 12 no posee homología significativa con las secuencias de otras lipasas. Desde los estudios estructurales realizados se concluye que la tríada catalítica es del tipo Ser-His-Asp/Glu, en concordancia con otras lipasas, específicamente la tríada catalítica de CALB está constituida por Ser105-His224-Asp187. Sin embargo, en esta enzima la secuencia consenso alrededor de la serina del sitio activo es T-W-S-Q-G. Comparando ésta con la secuencia típica dada anteriormente vemos que en CALB hay un reemplazo del primer aminoácido de dicha secuencia consenso (glicina) por treonina. [31].

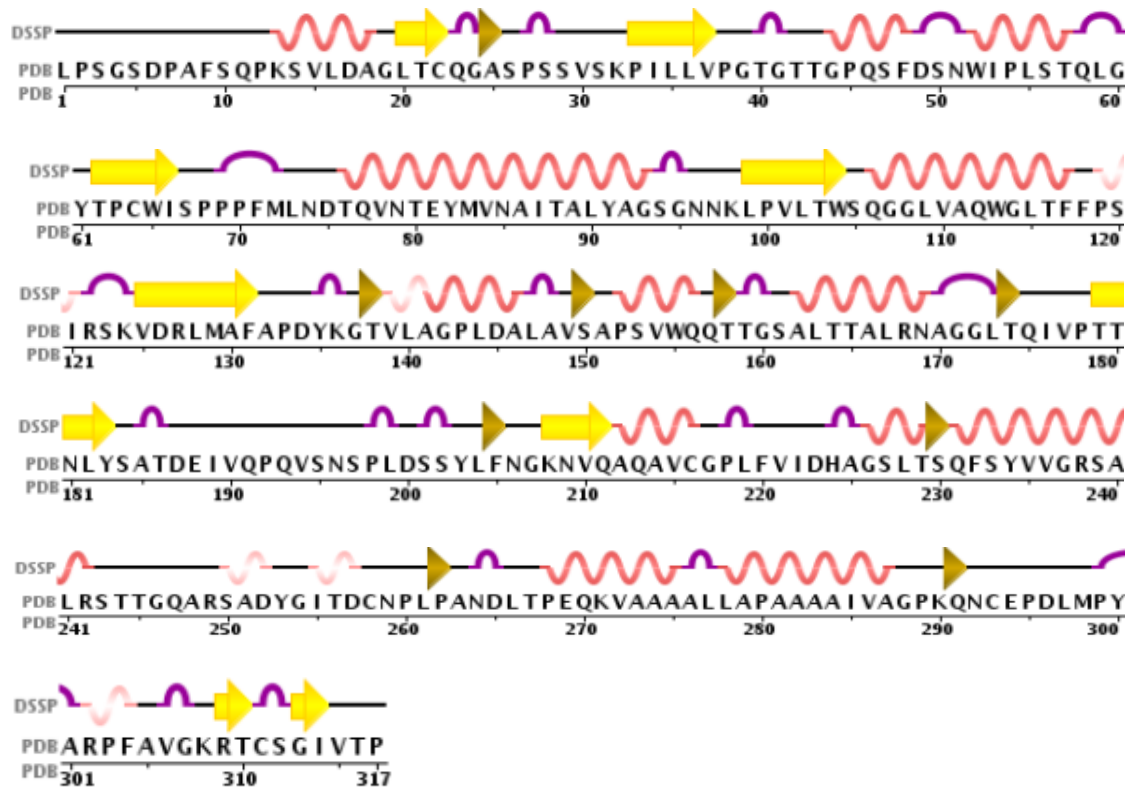


Figura 12. Estructura primaria de CALB (extraída de PDB, información basada en [31]).

En la estructura de esta enzima, el sitio activo es accesible al solvente externo mediante un estrecho canal. Las dimensiones del sitio activo son de 10Å X 4Å de ancho y 12Å de profundidad medidos desde el O de la Ser 105 a la superficie. Dicho canal está formado principalmente por tres elementos estructurales: hélice $\alpha 5$ y $\alpha 10$ y una región de bucle que proyecta el residuo de Ile 189 dentro del canal. Las paredes de dicho canal son muy hidrofóbicas sin embargo en la vecindad de la serina catalítica, en el fondo del canal, se encuentran tres aminoácidos hidrofílicos (Thr 40, Asp 134 y Gln 157) los cuales generan una red de puentes de hidrogeno accesibles al solvente. Según Uppenberg y colaboradores esto impone restricciones sobre la orientación de sustratos lipídicos anfifílicos en el sitio activo [31]. Los factores más importantes determinantes de la selectividad por el sustrato son la restricción física, la naturaleza hidrofóbica del bolsillo del sitio activo y el mecanismo de estabilización del intermedio tetraédrico. CALB, comparada con otras lipasas, tiene poco espacio en el bolsillo del

sitio activo y se asocia a este hecho su selectividad [39]. Estudios por difracción de Rayos X han demostrado que el bolsillo del sitio activo está compuesto por dos canales, uno de ellos aloja al grupo acilo y el otro al grupo alcohol de la molécula de sustrato (éster) como puede verse en la figura 13 [40].

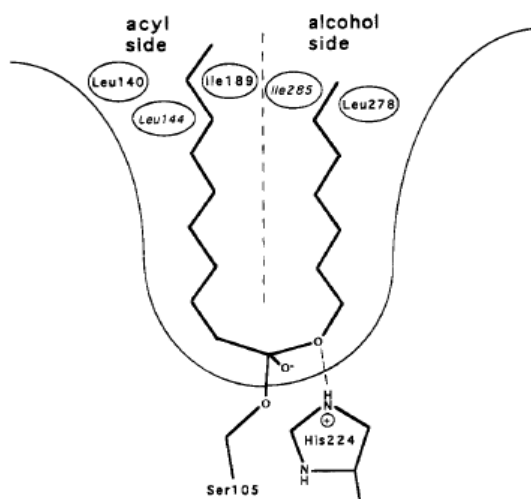


Figura 13. Esquema del sitio activo de CALB formado por dos canales paralelos (extraído de [40]).

Estudios de rayos X reportados por Uppenberg y colaboradores [31] muestran que la única zona compatible con N-glicosilación es la comprendida por los siguientes residuos de aminoácidos: Asn 74, Asp 75 y Thr 76. Más específicamente indican que el residuo de asparagina (Asp) 74 se encuentra glicosilado por 2 moléculas de N-acetilglucosamina.

En agua es una proteína excepcionalmente robusta que se desactiva a 50-60 °C (en forma inmovilizada el límite operacional aumenta a 60-80 °C) y también muestra una resistencia elevada a la desnaturalización por adición de disolventes orgánicos [27]. En literatura se reporta que CALB ha sido empleada a temperaturas de 150 °C [41] y en disolventes orgánicos de

alta polaridad como acetonitrilo y dimetilsulfóxido y en fluidos supercríticos [42, 43].

En contraste con muchas otras lipasas esta enzima parece ser bastante rígida y no muestra un efecto de activación interfacial lo que la convierte en una especie intermedia entre una esterasa y una lipasa típica. [39]. La falta de activación interfacial en CALB es consistente con la ausencia de cambios estructurales observados en las estructuras cristalinas de rayos X con y sin inhibidor (análogo del estado de transición). Por lo tanto es posible que CAL B no posea región de tapadera (lid) que regule el acceso al sitio activo. La estructura es como si estuviese siempre en conformación “abierta” con una entrada bastante restringida al sitio activo. Una corta hélice, $\alpha 5$, se identificó como potencial “lid” debido a su posición y a cierta transición orden/desorden observada en esta zona al analizar mediante rayos X cristales de CALB en diferentes entornos cristalinos [31, 40].

La ausencia de lid facilita que se pueda predecir su selectividad mediante cálculos computacionales [31] y la mayoría de las reglas de Kazlauskas [36] se pueden aplicar [40]. Uppenberg y colabores predicen, en base a estudios de modelado del intermedio tetraédrico de CALB, que solo el enantiómero R (del sustrato éster) es capaz de formar intermedios que permitan la catálisis. Tal predicción está de acuerdo con muchos resultados experimentales [39, 40].

2.5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. CAPITULO 2:

[1] (a) Walsh, C., *Enzymatic Reaction Mechanisms*, ISBN-10: 0716700700, ISBN-13: 978-0716700708, 1978, editorial WH Freeman, San Francisco, Estados Unidos.

(b) Fersht, A., *Enzyme Structure and Mechanism*, 2ª edición, 1985, editorial WH Freeman, New York, Estados Unidos.

(c) Dixon M., Webb E.C., *Enzymes*, 3ª edición, 1978, Academic Press, New York, Estados Unidos.

[2] (a) Yamada U., Shimizu S., *Angew. Chem., Int. Ed.* 1988, 27, 622-642

(b) Wong C.-H., *Science* 1989, 244, 1145-1152

- (c) Hutchinson C.W., *Trends Biotech.* 1990, 8, 348-353
- (d) Ward O.P., Young, C.S., *Enz. Microb. Technol.* 1990, 12, 482- 493.
- [3]**(a) Voet D.-Voet J.G., Bioquímica. Capítulo 8: Estructura tridimensional de proteínas, 3º ed., 2006, ISBN-10: 950-06-2301-3. ISBN-13: 978-950-06-2301-8, Editorial Médica Panamericana, Bs. As. Argentina, pp. 227-286.
- (b) Voet D.-Voet J.G., Bioquímica, 4º edición, 2010, ISBN 13 978-0470-57095-1, ISBN 13 978-0470-91745-9, John Wiley & Sons Inc., EEUU.
- [4]** Voet-Voet- Pratt, Fundamentos de Bioquímica. Capítulo 6: Proteínas: estructura tridimensional, 2º edición, 2007, ISBN: 978- 950-06-2314-8. Editorial Médica Panamericana, Bs. As., Argentina, pp. 129-180.
- [5]** Nelson D.L., Cox M.M, Lehninger Principles of Biochemistry. Capítulo 4: Estructura tridimensional de proteínas, 5º edición, 2008, ISBN-13: 978-0-7167-7108-1, ISBN-10: 0-7167-7108-X, W.H. Freeman and Company, New York, EEUU, pp. 113-153.
- [6]** International Union of Biochemistry and Molecular Biology <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>
- [7]** Arroyo-Sánchez M., Tesis doctoral: “Síntesis de ácidos 2-aril-propiónicos homoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas”, 1995, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- [8]** a) Klivanov A.M. *Trends Biochem. Sci.*, 1989, 14, 141-144. b) Klivanov A.M., *Trends in biotechnology (TIBTECH)*, 1997, 15, 97-101. c) Griebenow K., Klivanov A.M., *J. Am. Chem. Society* 118, 1996, 11695-11700.
- [9]** Klivanov A.M., *Natur*, 2001, 409: 241- 246.
- [10]** Carrea G., Riva S., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000, 39, 2226-2254.
- [11]** Bórgstrom B. y Brockman, H.L., Lipases, Elsevier, Amsterdam, 1984.
- [12]** Pandey A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N., Soccol V.T., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1999, 29, 119-131.
- [13]** Cygler M., Schrag J.D., Ergon F., *Biotech. Genet. Eng. Rev.* 1992, 10, 143-184.
- [14]** Cygler M., Schrag J.D, *Methods Enzymol.* 1997, 284, 3-27.

- [15] Hunter R.L., Markert C.L., *Science* 1957, 125, 1294-1295.
- [16] Alarcón Vivero Manuel Rubén, Tesis doctoral "Producción de Lipasa Lip2 de *Candida rugosa* en el sistema *Pichia pastoris*: Caracterización y aplicación en reacciones de síntesis", 2008, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- [17] Jaeger K.E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson C., Van Heuvel M., Misset O., *FEMS Microbiol Rev.*, 1994, 15:29-63.
- [18] Winkler F.K., D'Arcy A., Hunziker W., *Nature* 1990, 343, 771-774.
- [19] Chapus C., Sémériva M., Bovier-Lapierre C., Desnuelle P., *Biochemistry* 1976,15, 4988-4991.
- [20] Guidoni A., Benkouka F., De Caro J., Rovey M., *Biochim. Biophys. Acta* 1981, 660, 148-150.
- [21] Kordel M., Menge U., Morelle G., Hedmann H., Schmid R.D. en "*Lipases: structure, mechanism and genetic engineering*", Alberghina, L., Schmid, RD. y Verger, R. eds., 1991, VCH Weinheim, Alemania, pp.421-424.
- [22] Uppenberg J., Patkar S., Bergfords T., Jones T.A., *J. Mol Biol.* 1994, 235, 790-792.
- [23] Hernández-Fernández, F.J., Tesis doctoral: "Desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos basados en el uso de líquidos iónicos, fluidos supercríticos y tecnología de membranas", 2008, Universidad de Murcia, Murcia, España.
- [24] Ollis D.L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra, B., Frolova F., Franken S.M. Harel M., Remington S.J., Silman I., Schrag J.D., Sussman J.L., Verscheuren K.H.G., Goldman A., *Protein Eng.* 1992, 5, 197-211.
- [25] Lawson D.M., Brzozowski A.M., Rety S., Verma C., Dodson G.G., *Protein. Eng.* 1994, 7, 543-550.
- [26] Verger R., *Trends in biotechnology (TIBTECH)*, 1997, 15, 32-38.
- [27] Salis A., Svensson I., Monduzzi M., Solinas V., Adlercreutz P., *Biochim. Biophys. Acta* 2003, 1646, 145-151.
- [28] Arroyo M., *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 2000, pp. 19-24

- [29] (a) Martínez C., De Geus P., Lauwereys M., Mathysens G., Cambillau C., *Nature* 1992, 356, 615-618. (b) Martínez C., Nicolas A., Van Tilbeurgh, H., Egloff M.P., Cudrey C., Verger R., Cambillau C., *Biochemistry* 1994, 33, 83-89.
- [30] Schmid R.D., Verger R., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37, 1608-1633.
- [31] Uppenberg J., Hansen M.T., Patear S., Jones T.A., *Structure* 1994, 2, 293-308.
- [32] Cygler M., Grochulski P., Kazlauskas R.J., Bouthillier J.D., Rubin B., Gupta A.K., *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 3180-6.
- [33] Uppenberg J., Oehrner N., Norin M., Hult K., Kleywegt G. J., Patkar S., Waggen V., Anthonsen T., Jones T. A., *Biochemistry* 1995, 34, 16838-16851.
- [34] Pleiss J., Fischer M., Schmid R.D., *Chem. Phys. Lipids*, 1998, 93, 67-80.
- [35] Rogalska K., Cudrey C., Ferrato F., Verger R., *Chirality* 1993, 5, 24-30.
- [36] Kazlauskas R.J., Weissfloch A.N.E., Rappaport A.T., Cuccia L.A., *J. Org. Chem.* 1991, 56, 2656-2665.
- [37] Alarcón Vivero M.R., Tesis doctoral: "Producción de la lipasa Lip2 de *Candida rugosa* en el sistema *Pichia pastoris*: caracterización y aplicación en reacciones de síntesis", 2008, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- [38] Kirk O., Christensen M.W., *Organic Process Research & Development*, 2002, 6, 446-451.
- [39] Anderson E.M., Larsson K.M., Kirk O., *Biocatal. Biotransform.* 1998, 16, 181-204.
- [40] Uppenberg J., Oehrner N., Norin M., Hult K., Kleywegt G.J., Patkar S., Waagen V., Anthonsen T., Jones A., *Biochemistry* 1995, 34 (51), 16838-16851.
- [41] Lozano P., De Diego T., Carrié D., Vaultier M., Iborra J.L., *Biotechnol. Prog.* 2003, 19, 380-382.
- [42] Ottoson J., Francsson L., King J.W., Hult K., *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1594, 325-334.
- [43] Lozano P., De Diego T., Carrié D., Vaultier M., Iborra J.L., *Chemical Communications*, 2002, 7, 692-693.

CAPITULO 3

INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

3.1. ASPECTOS GENERALES SOBRE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte [1].

La inmovilización de enzimas permite una mejora significativa de su estabilidad, lo que hace posible su empleo en la producción industrial de productos químicos, farmacéuticos, alimentos; en el tratamiento de residuos; en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, y muchas otras aplicaciones.

Como ventajas de la inmovilización podemos destacar [1, 2]:

- Aumento de la actividad en solventes orgánicos.
- Aumento de la enantioselectividad.
- El aumento de la estabilidad de la enzima.
- La posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costos del proceso.
- La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Esto permite mejoras en la separación del producto además de la posibilidad de aumentar la concentración de catalizador de forma significativa respecto a un proceso en el que se encuentra en suspensión. Todo lleva a un aumento en productividad que hace al proceso económicamente más rentable.
- El estudio bioquímico de sistemas proteicos *in vivo* que difícilmente podrían ser simulados en soluciones homogéneas.

A pesar de las ventajas señaladas, encontramos desventajas tales como [1]:

- El derivado inmovilizado es más caro que la enzima nativa ya que se añade una etapa en la preparación del catalizador.
- La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con diferente número de uniones al soporte.
- Suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización.

A menudo la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas. En primer lugar en cuanto a su estabilidad y en segundo lugar en cuanto a su actividad. Una enzima inmovilizada es un sistema heterogéneo en el cual los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, activadores, etc.) se encuentran en interfase, como consecuencia la actividad enzimática es afectada por efectos de tipo difusional, estérico y de microentorno.

Generalmente se observa un aumento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización debido a las siguientes razones:

- Estabilización conformacional de la enzima debido a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte. Así la estructura terciaria de la enzima adquiere mayor rigidez y mayor estabilidad. Este tipo de estabilización se adquiere únicamente en aquellos métodos en los que intervienen enlaces de tipo covalente como el reticulado o la unión a soportes (más adelante se detallan los métodos de inmovilización).
- Protección frente a proteasas. Se ha visto que la unión de proteasas a soportes elimina su capacidad proteolítica.
- Se evita agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio.

- Alteración del microentorno de la enzima. El microentorno de la enzima, (pH, contenido de agua, concentración de sustrato, oxígeno, etc. que “ve” la molécula de enzima) estará determinado por las propiedades químicas del soporte, pudiendo ser muy diferentes a las características del seno del medio de reacción.

Así mismo, la inmovilización afecta la actividad enzimática. En este contexto podría producirse la pérdida total de actividad debida a las siguientes causas:

- La unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido.
- Los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima.
- La inmovilización puede generar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva.
- Las condiciones experimentales del proceso causan desnaturalización o desactivación de la enzima.

Una disminución o un aumento de actividad después de la inmovilización se deberán principalmente a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y /o de microentorno.

- En cuanto a los efectos difusionales, como consecuencia de la inmovilización la difusión de los sustratos al centro activo de la enzima puede estar impedida por resistencias difusionales externas (el sustrato deberá atravesar la película líquida estacionaria que rodea al soporte insoluble, capa de Nernst o de difusión) como también resistencias

difusionales internas (debido a que el sustrato debe atravesar el interior del soporte para llegar a la enzima inmovilizada).

Existen diversas maneras de minimizar estos efectos difusionales como por ejemplo disminuir el tamaño de catalizador, aumentar la concentración de sustrato, incrementar la agitación o el flujo en el reactor.

- Efectos electrostáticos entre sustrato y soporte, estos pueden atraerse o repelerse.
- Impedimentos estéricos o de tamaño del sustrato. Se ha visto que muchas veces la actividad posterior a la inmovilización se ve disminuida para sustratos de elevado peso molecular mientras que se mantiene para sustratos de bajo peso molecular, esto es debido exclusivamente a efectos estéricos.
- Efectos de microentorno. De acuerdo a lo ya mencionado sobre el microentorno, el efecto observado suele ser un desplazamiento en el valor de pH óptimo de la catálisis enzimática y, muchas veces, un ensanchamiento del intervalo de pH en el cual la enzima puede actuar.

3.2. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

Los métodos de inmovilización se clasifican en dos grandes categorías: 1) retención física y 2) unión química. Cada una de estas categorías incluye varios métodos de inmovilización tal como se muestra de forma esquemática en la figura 1.

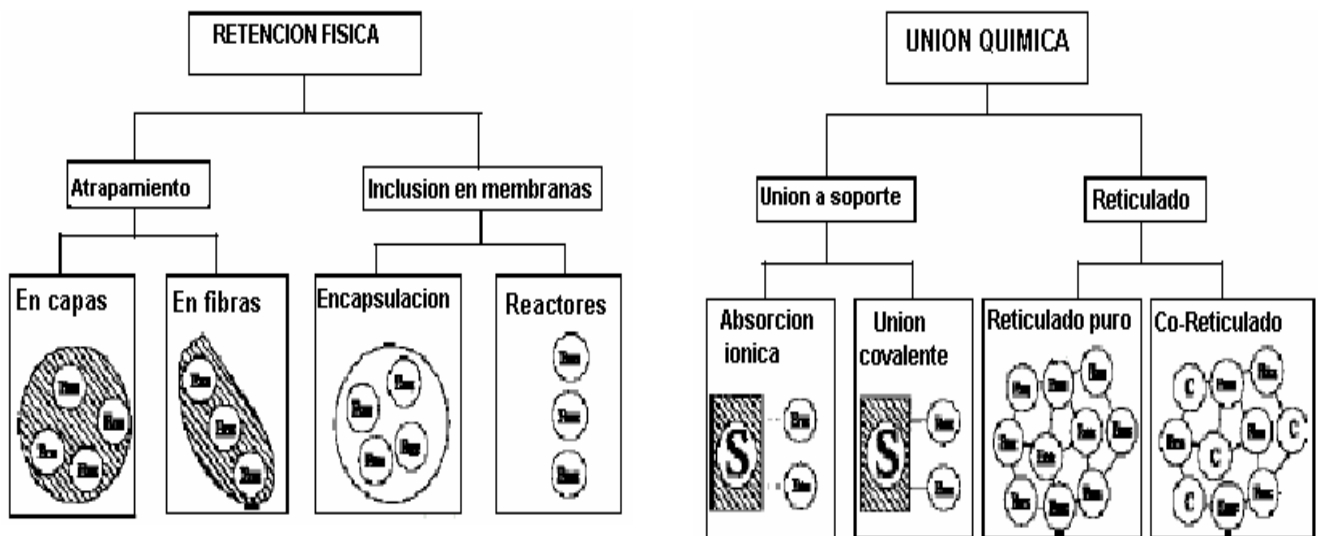


Figura 1. Métodos generales de inmovilización de enzimas (extraído de [1])

En las próximas secciones se describen cada uno de los métodos presentados.

3.2.1. Métodos de inmovilización de enzimas por retención física

3.2.1.1. Atrapamiento

Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros de tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano [1]. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante suspensión de la enzima en una solución del monómero, seguidamente se inicia la polimerización. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, las cuales suelen ser más resistentes que los geles.

El atrapamiento es de gran sencillez experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. De todas formas el atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la

naturaleza química del proceso (monómeros y radicales libres generados) no altera los grupos reactivos de la proteína. Además su aplicación se restringe a procesos en los cuales las moléculas de sustrato y producto sean lo suficientemente pequeñas como para moverse con libertad entre la matriz polimérica y la solución.

3.2.1.2. Inclusión en membranas

1) Microencapsulación: En esta técnica las enzimas son encerradas en una membrana semipermeable, que permiten el paso de sustrato y producto pero no de enzima. Estas membranas pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes, también llamadas micelas inversas). Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos.

2) Reactores de membrana: El desarrollo de reactores o sistemas que contengan enzimas atrapadas ha despertado gran interés en la industria. Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial e impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor. En general en esta metodología se procede primero a la adsorción de la enzima sobre la membrana que formará el reactor.

3.2.2. Métodos de inmovilización por unión química

3.2.2.1. Unión a soportes

Son los métodos más utilizados y más antiguos. La elección del soporte y el tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del catalizador. Se

debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de reacción y ser fácilmente separable del medio líquido para ser reutilizado. Otros puntos a evaluar son su precio, disponibilidad, permeabilidad y capacidad de adsorción de agua.

Existe una amplia variedad de soportes empleados para este fin. Los materiales difieren en tamaño, porosidad, densidad, forma aunque generalmente se encuentran como cilindros, hojas, fibras y más corrientemente con forma de esferas. Los soportes pueden ser clasificados en dos grandes grupos:

1) *Soportes inorgánicos:*

- *Naturales:* arcillas como bentonita, piedra pómez, sílice, etc.
- *Manufacturados:* óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.

2) *Soportes orgánicos:*

- *Polímeros naturales:*
 - Polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina,
 - Proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc.)
- *Polímeros sintéticos:*
 - Poliolefinas (poliestireno)
 - Polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.)
 - Otros (alcohol polivinílico, poliamidas, etc.)

Siguiendo con la clasificación propuesta en la figura 1, la unión de la enzima a soportes puede ocurrir por 1) adsorción o 2) unión covalente; técnicas que se detallan a continuación.

- 1) Adsorción:** en la adsorción la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno y/o interacciones hidrofóbicas [3]. Los principales factores que influyen en la adsorción son:
- pH del medio: controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y el sólido.
 - Fuerza iónica: al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína.
 - Diámetro de poro: debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima.
 - Presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima: éstos pueden incrementar la carga enzimática del derivado.

Como las principales ventajas de este método se destacan: sencillez, bajo costo, cambios conformacionales despreciables de la enzima, no hay cambios de especificidad enzimática, los derivados son estables en medios con bajo contenido de agua.

Los inconvenientes de la adsorción son: la optimización de las variables que controlan la adsorción, los derivados son poco estables desde el punto de vista mecánico y que la unión al soporte es débil. El problema principal de este método es la reversibilidad del proceso y que los cambios en las condiciones de operación como el pH y la temperatura pueden provocar el desplazamiento de la enzima hacia la fase soluble (desorción). En procesos donde se trabaje con solventes no polares es el método aconsejable puesto que no existe dicha reversibilidad [3].

Una variante dentro de esta técnica es el empleo de resinas de intercambio iónico las cuales tienen grupos funcionales y contraiones móviles.

2) **Unión covalente:** Este método es quizás el más importante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en activar grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. De los 20 aminoácidos presentes en la estructura de las proteínas los más involucrados en la formación de enlaces con el soporte son lisina, cisteína, tirosina e histidina, y en menor medida metionina, triptofano, arginina y los ácidos aspártico y glutámico. El resto de los aminoácidos debido a su carácter hidrofóbico no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica y no pueden intervenir en la unión covalente.

Este método presenta las siguientes ventajas:

- manipulación sencilla de derivados.
- la carga enzimática permanece constante después de la inmovilización. De hecho la inmovilización por enlace covalente es el único método que descarta la posibilidad de desorción de la enzima.
- Mayor resistencia a la desactivación por efecto de la temperatura, solventes orgánicos y pH al tener estabilizada su estructura terciaria.

Y las desventajas son:

- Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
- El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo. Para evitar esto se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo.
- Las condiciones relativamente drásticas de la inmovilización por esta técnica hace que no sea aconsejable para aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

3.2.2.2. Reticulado

También denominado “*Entrecruzamiento o cross-linking*”. Este método utiliza reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre moléculas de enzima. Como reactivos bifuncionales pueden emplearse dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e incluso diaminas si están activadas con carbodiimina. El reactivo más empleado en el entrecruzamiento de lipasas es el glutaraldehído aunque también se ha empleado heximetilendiamina. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

El co-reticulado, permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática rica en residuos de lisina (por ejemplo albúmina bovina).

Un procedimiento mixto de inmovilización muy común consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre una resina de intercambio iónico o un soporte polimérico (con lo que se consigue una gran carga enzimática) y posteriormente añadir el reactivo bifuncional.

Actualmente el método más novedoso consiste en la cristalización de la enzima y posterior reticulado con glutaraldehído (*Cross-linked Enzyme Crystal o CLECs*). Los CLECs presentan un aumento de estabilidad debido a la formación de un entramado cristalino, donde las moléculas de enzima están rodeadas exclusivamente por otras moléculas de proteína. De esta manera la propia enzima actúa como soporte y su estructura terciaria está estabilizada por uniones covalentes intermoleculares. Estos cristales pueden soportar temperaturas elevadas y pH extremos así como la acción de proteasas, las cuales no pueden penetrar en la matriz del cristal [3].

3.2.3. Elección del método de inmovilización

No existe un método de inmovilización universalmente válido para todas las enzimas. No obstante gracias a toda la información disponible en la actualidad se pueden realizar generalizaciones sobre cada método de inmovilización (Tabla 1) y así, podremos seleccionar el más adecuado para cada aplicación específica.

Tabla 1. Comparación entre métodos de inmovilización de enzimas.

Característica	Atrapamiento	Inclusión membrana	Adsorción	Unión covalente	Reticulado
Preparación	Difícil	Media	Sencilla	Difícil	Media
Fuerza de unión	Media	Débil	Media-Débil	Fuerte	Media-Fuerte
Actividad enzim.	Baja	Media-Alta	Media-Alta	Alta	Moderada
Especificidad de sustrato	No modificable	No modificable	No modificable	Modificable	Modificable
Regeneración del soporte	Imposible	Posible	Posible	Difícil	Imposible
Estabilidad	Alta	Media	Baja	Alta	Alta
Resistencia microbiana	Sí	Sí	No	No	Sí
Validez/aplicación	General	General	General	Limitada	Limitada
Costo	Medio	Medio-Alto	Bajo	Alto	Medio

3.3. BIOCATALIZADOR COMERCIAL NOVOZYM® 435

3.3.1. Composición y estructura

Novozym® 435 consiste en la enzima lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) adsorbida físicamente sobre esferas de poliacrilato conocidas como LEWATIT VP OC 1600 (www.lewatite.com/ion/en/), el cual consiste en poli(metilmetacrilato) entrecruzado con divinilbenceno [4, 5]. Teniendo en cuenta la naturaleza del soporte puede decirse que la interacción proteína-soporte ocurre principalmente a través de interacciones hidrofóbicas [6].

En la figura 2 se muestran imágenes obtenidas con microscopio electrónico de barrido (SEM) de la lipasa B de *Candida antarctica* (99 % Sigma Aldrich) y de una partícula del biocatalizador comercial Novozym® 435.

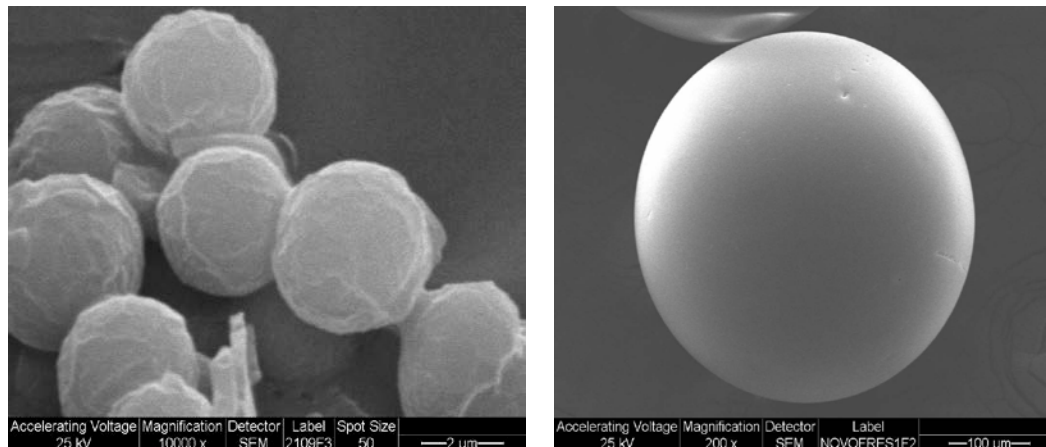


Figura 2. Imágenes obtenidas en SEM de CALB (izquierda) y Novozym® 435 (derecha)

Las partículas esféricas de Novozym® 435 poseen un tamaño de 0,315-1,00 mm (> 80%), densidad aparente de 0,65-0,80 g/ml, superficie de $\sim 130 \text{ m}^2/\text{g}$ (BET) y alta estabilidad térmica (-20-100 °C) [7]. Este catalizador posee una actividad catalítica de

10000 PLU/g y un contenido máximo de agua de 3% w/w según lo reportado en la ficha de este producto. La actividad está expresada en “propil laurate units (PLU)” por gramo. Novozym® 435 es muy tolerante al calor con una actividad máxima entre los 70-80 °C, aunque se recomienda su uso entre los 40- 60 °C para una productividad óptima [3].

Mediante microespectroscopia infrarroja (SIRMS) se ha determinado que la enzima se encuentra localizada en un “casquete” externo de de 80-100 μm de espesor y que la misma se distribuye de manera no homogénea en la partícula esférica de catalizador, como se muestra en la figura 3 [8]. Esta imagen se obtiene graficando para cada píxel la intensidad de la banda infrarroja Amida I ($1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) la cual, como se detalla en el capítulo 5 de esta Tesis, es una banda característica de proteínas y sensible a la estructura secundaria de las mismas. Así, empleando SIRMS se estableció de forma simultánea la distribución espacial y cuantitativa de la lipasa así como la estructura secundaria la enzima inmovilizada. Estos estudios evidenciaron que la estructura secundaria de CALB no es alterada por la inmovilización en Novozym® 435. En este contexto, la CALB posee la contribución de un 31% de la estructura α -hélice y 19% de la lámina- β de acuerdo con resultados de difracción de Rayos X [9].

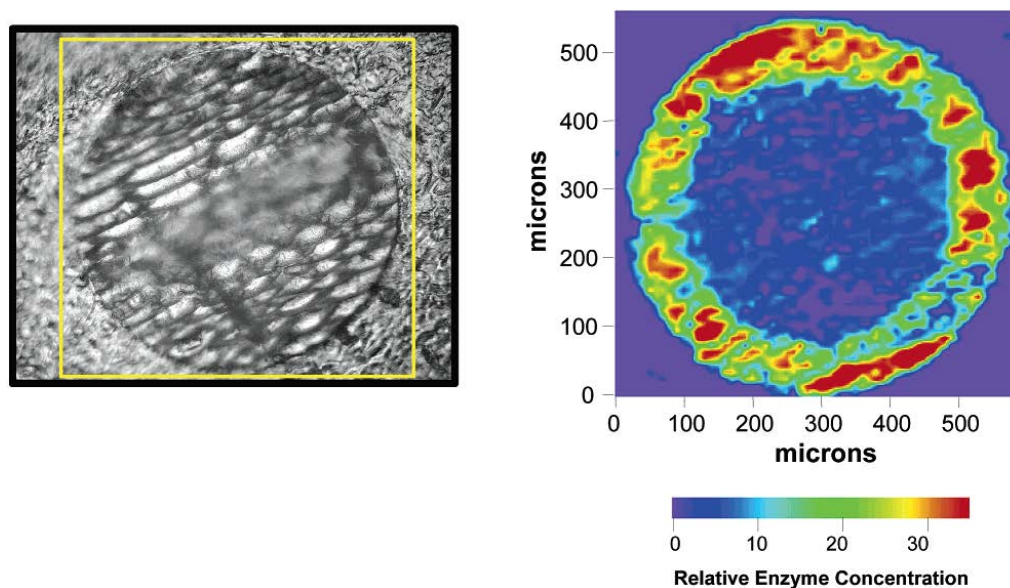


Figura 3. Izquierda: imagen en luz visible de una partícula de Novozym® 435 embebida en parafina y seccionada transversalmente con un espesor de 12 μm . El cuadrado amarillo marca la zona que luego se muestra como una imagen de microscopía-IR. Derecha: Imagen de la distribución de enzima en un corte transversal correspondiente a la zona central de una partícula de Novozym® 435 (extraída de [8]).

Por medio de microscopia electrónica de barrido se ha establecido que el tamaño de poro de Novozym® 435 es de aproximadamente 100 nm, más de 10 veces mayor al tamaño de la molécula de CALB, por lo que no hay barrera física para la difusión de enzima ni de sustrato a través de este catalizador. En vista de éstos resultados Ying Mei et al. concluyeron que la distribución no homogénea de CALB en la matriz del soporte se encuentra gobernada por las interacciones proteína-soporte y proteína-proteína [8].

La identidad y la cuantificación de CALB en Novozym® 435 ha sido determinada y reportada por Petra et al. [6]. Estos autores determinaron que dicho catalizador posee un único componente proteico compatible con la lipasa B de *Candida antarctica*. Así mismo, establecieron que la enzima se encuentra glicosilada e indicaron alguna otra modificación que no pudieron identificar.

En cuanto a la cuantificación, Novozym® 435 posee 52 mg proteína/g catalizador según el trabajo de Petry et al, quienes emplearon una hidrólisis ácida total de la proteína inmovilizada en Novozym® 435 seguido de la cuantificación de los aminoácidos fenilalanina (Phe) y Tirosina (Tyr) mediante cromatografía líquida (HPLC).

3.3.2. Aplicaciones de Novozym® 435

Novozym® 435 es probablemente la lipasa más empleada en biocatálisis. Se utiliza como catalizador en procesos industriales para la síntesis de ésteres sencillos, amidas, alcoholes, aminas y ácidos carboxílicos ópticamente activos.

Las gran cantidad y variedad aplicaciones de este catalizador reportada en literatura de los últimos 15 años se muestra en el **Anexo 2**, en este apartado se detalla el tipo de reacción involucrada en la aplicación, características del medio de reacción (sustratos, solventes, cantidad de catalizador, temperatura, adición o no de agua, tiempo, agitación, etc.), conversiones obtenidas, excesos enantioméricos de sustratos y/o productos [10-40].

3.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. CAPÍTULO 3

- [1] Arroyo M., *Ars Pharmaceutica* 1998, 39(2), 23-39.
- [2] Miletić N., Vuković Z., Nastasović A., Loos K., *J. Mol. Catal. B: Enz.* 2009, 56, 196-201.
- [3] Pérez-Victoria Moreno de Barreda I., Tesis doctoral: "Acilaciones regioselectivas de oligosacáridos catalizada por enzimas: caracterización y propiedades de los productos", 2006, Universidad de Granada, Granada, España.
- [4] Chen B., Hu J., Miller E.M., Xie W., Cai M., Gross R.E., *Biomacromolecules* 2008, 9, 463-471.
- [5] Cabrera Z., Fernández-Lorente G., Fernandez-Lafuente R., Palomo J.M., Guisan J.M., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2009, 57, 171-176.

- [6] Petry I., Ganesan A., Pitt A, Moore B.D., Halling P.J., *Biotechnol. Bioeng.* 2006, 95(5), 984-991.
- [7] Zhao H., Song Z., *Biochem. Eng. J.* 2010, 49, 113-118.
- [8] Mei Y., Miller L., Gao W., Gross R.A., *Biomacromolecules* 2003, 4, 70-74.
- [9] Uppenberg J., Hansen M.T., Patkar S., Jones T.A., *Structure* 1994, 2, 293-308.
- [10] Tan T., Lu J., Nie K., Deng L., Wang F, *Biotechnology Advances*, 2010, 28, 628-634.
- [11] Fjerbaek L., Christensen K.V., Norddahl B., *Biotechnol. Bioeng.* 2009, 102, 1298-1315.
- [12] Chao-Chin Lai, Siti Zullaikah, Sahi Ramjan Vali, Yi-Hsu Ju, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2005, 80, 331-337.
- [13] Chang H-M., Liao H-F., Lee C-C.; Shieh C-J., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2005, 80, 307-312.
- [14] Torres P., Reyes-Duarte D., López-Cortés N., Ferrer M., Ballesteros A., Plou F.J., *Process Biochem.* 2008, 43, 145-153.
- [15] Solares L.F., Lavandera I., Gotor-Fernández V., Brieva R., Gotor V., *Tetrahedron* 2006, 62, 3284-3291.
- [16] Yadav G.D., Borkar I.V., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2009, 84, 420-426.
- [17] Van As B.A.C., Van Buijtenen J., Mes T., Palmans A.R.A., Meijer E.W., *Chemistry* 2007, 13, 8325-8332.
- [18] Yadav G.D., Sajgure A.D., Dhoot S.B., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2008, 88, 1145-1153.
- [19] Santos J.C., Bueno T., Molgero P.C., Rós D., de Castro H.F., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2007, 82, 956-961.
- [20] Maugard T., Tudella J., Legoy M.D., *Biotechnol. Progress* 2000, 16, 358-362.
- [21] Tufvesson P., Annerling A., Hatti-Kaul R., Adlercreutz D., *Biotechnol. Bioeng.* 2007, 97, 447-453.
- [22] Abe Y., Kude K., Hayase S., Kawatsura M., Tsunashima K., Itoh T., *J. Mol. Catal. B: Enz.* 2008, 51, 81-85.

- [23] Mahapatro A., Johnson D.M., Patel D.N., Feldman M.D., Ayon A.A., Agrawal C.M., *Langmuir* 2006, 22, 901-905.
- [24] Wu J., Zong M-H., Wu H., Lou W-Y., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2008, 83, 814-820.
- [25] Patel R.N., *Coordination Chemistry Reviews*, 2008, 252, 659-701.
- [26] Pámies O., Bäckvall J.E., *Chem. Rev.* 2003, 103, 3247-3261.
- [27] Paetzold J., Bäckvall J.E., *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 17620-17621.
- [28] Trani M., Ducret A., Pepin P., Lortie R., *Biotechnol. Lett.* 1995, 17, 1095-1098.
- [29] Arroyo M., Siniesterra J.V., *J. Org. Chem.* 1994, 59, 4410-4417.
- [30] José C., Briand L.E., *Reac. Kinet. Mech. Cat.*, 2010, 99, 17-22.
- [31] Foresti M.L., Galle M., Ferreira M.L, Briand L.E., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2009, 84, 1461-1473.
- [32] Liu B., Qian X., Wu Q., Lin X., *Enzym. Microb. Technol.* 2008, 43, 375-380.
- [33] Zhao X-G., Wei D-Z., Song Q-X., *J. Mol. Catal. B: Enz.* 2005, 36, 47-53.
- [34] Ducret A., Trani M., Lortie R., *Enzym. Microb. Technol.* 1998, 22, 212-216.
- [35] Goujard L., Figueroa M.C., Villeneuve P., *Biotechnol. Lett.* 2004, 26, 1211-1216.
- [36] Gryglewicz S., Jadownicka E., Czerniak A., *Biotechnol. Lett.* 2000, 22 1379-1382.
- [37] Takwa M. , Xiao Y., Simpson N., Malmström E., Hult K., Koning C.E., Heise A., Martinelle M., *Biomacromolecules*, 2008, 9, 704-710.
- [38] Hua Yun Zhang, Xin wang, Chi Bun Ching, *Chirality*, 2007, 19, 245-249
- [39] D'Antona N., Lombardi P., Nicolosi G., Salvo G., *Process Biochemistry*, 2002, 38, 373-377.
- [40] Oliveira Carvalho P., Contesini F.J., Ikegaki M., *Brazilian Journal of Microbiology*, 2006, 37, 329-337.

CAPITULO 4

ESTERIFICACIÓN DE (R/S)-IBUPROFENO UTILIZANDO ETANOL COMO REACTIVO Y SOLVENTE: UN PROCESO ECO-COMPATIBLE.

4.1. ESTUDIO PARAMETRICO DE LA ESTERIFICACION DE (R/S)-IBUPROFENO CON ETANOL CATALIZADA POR NOVOZYM® 435. ESTRATEGIA GENERAL DEL ESTUDIO

Los principales factores que afectan las reacciones de síntesis enzimática en las que intervienen un ácido orgánico de naturaleza quiral y un alcohol, son:

- Naturaleza y fuente de la enzima
- Tipo de alcohol y ácido usados
- Concentración de la enzima
- Concentración de sustratos
- Factores físicos externos (temperatura, agitación, etc.)
- Tipo de disolvente
- Influencia del agua
- Tiempo de reacción

Los factores mencionados pueden afectar tanto la velocidad como la enantioselectividad de la reacción. Sin embargo, no siempre la mayor velocidad de esterificación proporciona la mayor enantioselectividad.

Como se mencionó en el capítulo 1, el objetivo es maximizar la enantioselectividad de la esterificación de ibuprofeno racémico sin utilizar un co-solvente orgánico. En este sentido, es necesario optimizar los parámetros de reacción a los fines de desarrollar un proceso biotecnológico económico y de bajo impacto ambiental. Para ello, en primer lugar se propone un sistema de reacción, consistente en (R/S)-ibuprofeno, etanol (como sustrato aceptor de acilo y solvente) y Novozym® 435 como catalizador. La elección de tal sistema está basada en la demostración previa de la factibilidad de esterificación de ibuprofeno racémico en tales condiciones generales demostrada por Foresti et al. [1]. La reacción bajo estudio está representada en la figura 1.

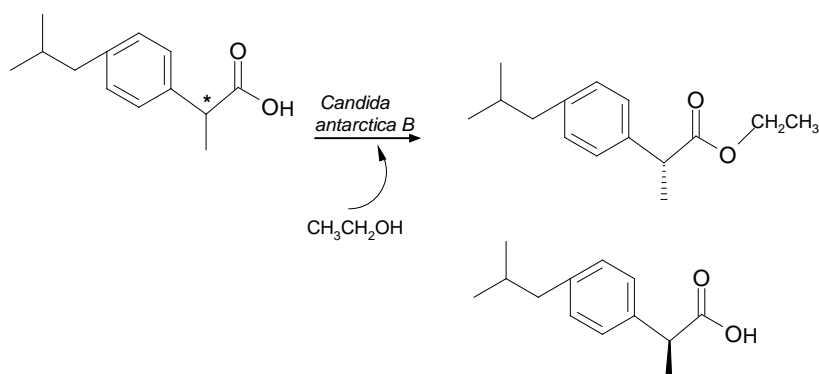


Figura 1. Esterificación enantioselectiva de R/S-ibuprofeno con etanol como reactivo y solvente, catalizada por lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym® 435).

En este contexto se evaluaron la conversión (X %) y enantioselectividad (eeS %, E, EF) al variar el volumen de alcohol, contenido de agua inicial de la mezcla, masa de catalizador, temperatura y tiempo de reacción.

A continuación se detallan las condiciones experimentales de las reacciones llevadas a cabo, los resultados y discusión, y finalmente las conclusiones de dichos estudios.

4.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.2.1. Sistema de reacción

Las reacciones de esterificación fueron realizadas en frascos de vidrio de 100 ml de capacidad cerrados herméticamente, los cuales fueron mantenidos a temperatura y agitación constante (200 rpm) en un baño de agua (Julabo SW22, Alemania). En todos los casos se disolvieron 0,5000 g (2,42 mmoles) de (R/S)-ibuprofeno (Parafarm, 99.23%, Argentina) en una cantidad definida de etanol absoluto (Carlo Erba 99.8%, Italia) a temperatura ambiente y la reacción se inició por el agregado de una cantidad definida de catalizador (Novozym® 435, proporcionado por Novo Nordisk AS, Dinamarca). Para el caso de la reacción estándar (condiciones de partida del estudio

paramétrico) se emplearon 20,00 ml de etanol absoluto (relación molar etanol/ibuprofeno: 141), la temperatura de trabajo se fijó en 45 °C, la masa de catalizador fue de 100 mg y la reacción se llevó a cabo durante 72 hs. Con base en este sistema estándar de reacción se evaluaron una a una de forma sucesiva las variables mencionadas previamente, de modo de ir optimizando de a una por vez, llegando finalmente a la optimización de todas las variables del sistema. Así, en el estudio del efecto del contenido inicial de agua sobre la reacción, la variable fue ajustada a los siguientes valores: 0; 1; 4,8; 9,1 y 20 % v/v. Cuando se evaluó el efecto del volumen de alcohol éste se redujo a 10, 5, 3, 2 y 1 ml de etanol, que corresponden a relaciones molares alcohol:ibuprofeno iguales a 71, 35, 21, 14 y 7, respectivamente. Una vez establecidos los valores óptimos de contenido de agua y volumen de etanol se estudió el efecto de la temperatura de reacción, la cual fue ensayada entre 37 y 55 °C, posteriormente se evaluó el efecto de la masa de Novozym® 435 variando la misma entre 25 y 200 mg. Como parámetro final se fijó el tiempo óptimo de reacción, el cual se obtuvo a través del estudio cinético de la esterificación bajo condiciones optimizadas.

Se realizaron ensayos blancos tendientes a determinar el grado de avance y la enantioselectividad de la reacción no catalizada, estos ensayos consisten en la reproducción del sistema de reacción correspondiente en ausencia de catalizador. La ausencia de éster (producto de reacción) fue comprobada en los ensayos blancos por ausencia del pico característico de ésteres de ibuprofeno en el cromatograma obtenido por HPLC quiral y además la titulación del ibuprofeno remanente indicó que no hubo consumo de dicho sustrato en ausencia de catalizador en 72 hs de reacción)

4.2.2. Metodología de análisis cuali y cuantitativo

Una vez transcurrido el tiempo programado de reacción se procedió a la extracción de una alícuota de 50 µl del medio líquido y se diluyó en 20,00 ml de MeOH: TEAA 60:40 (metanol Carlo Erba 99,8% y buffer acetato de tetraetilamonio (TEAA) Fluka 0,1% v/v

de pH = 4). Dicha alícuota fue destinada al estudio de enantiómeros del ibuprofeno mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) empleando una columna quiral de modo de obtener parámetros de enantioselectividad como se detalla más adelante en este apartado. Cabe destacar que fueron realizadas las diluciones posteriores necesarias, de acuerdo al valor hallado de conversión (X %), de modo de inyectar en la columna de HPLC concentraciones de (R/S)-ibuprofeno del orden de 30 ppm. Las diluciones siempre se realizan con MeOH: TEAA 60:40. Una vez logrado dicho nivel de concentración las muestras fueron filtradas a través de filtros de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro (Sartolon polyamid, Sartorius® AG, Alemania) y se inyectaron en la columna quiral. En todo momento las muestras se conservaron en frascos de vidrio color caramelo cerrados herméticamente y en heladera hasta el momento del análisis. Los fundamentos de la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) y de la columna quiral se presentan en el Anexo 3 [2-8].

Así mismo, se determinó la cantidad de ibuprofeno remanente, sin esterificar, por medio de su titulación con una solución de hidróxido de potasio en etanol (KOH en etanol, Carlo Erba 85,0 %; etanol absoluto, Carlo Erba 99,8%) de concentración conocida (la cual fue establecida contra patrón primario de biftalato de potasio [9] empleando fenolftaleína como indicador de punto final. Esta determinación se basa en la presencia de ibuprofeno remanente como único compuesto ácido en el sistema y por ello es factible emplear una titulación ácido-base para su cuantificación [1] siendo la metodología reconocida por ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) para el dosaje de este principio activo [10].

El cálculo de la masa de ibuprofeno se realizó a través de la ecuación (1) que se presenta a continuación,

$$[\text{masa (R/S)-Ibuprofeno}]_t = (V \cdot N)_{\text{KOH}} \cdot (P \text{ mequiv ibuprofeno}/1000) \cdot F \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde **V** y **N** corresponden al volumen y normalidad del hidróxido de potasio involucrados en la titulación respectivamente, y **Pmequiv** es el peso miliequivalente del ibuprofeno (206,29 mg/mequiv). El término **F** corresponde al factor de corrección que debe emplearse debido a la sustracción de una alícuota del sistema de reacción (50 µl) para el análisis por HPLC. Para el cálculo del factor de corrección (F) se utiliza la siguiente expresión:

$$F = \frac{V_{\text{final}}}{V_{\text{inicial}}} = \frac{V_i - 0,05 \text{ ml}}{V_i}$$

La conversión de R/S-ibuprofeno (X %) se determinó a través de la ecuación (2),

$$X\% = 100 * \frac{[\text{masa (R/S)-Ibuprofeno}]_i - [\text{masa (R/S)Ibuprofeno}]_t}{[\text{masa (R/S)-Ibuprofeno}]_i} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde el subíndice **i** indica inicial y el subíndice **t** corresponde al tiempo total de reacción

En este contexto, es importante aclarar que no fue posible determinar la conversión de ibuprofeno por HPLC debido a que los alcoholes en general difunden en el interior de las esferas de Novozym® 435 como se discutirá en los próximos capítulos. Tal como reportaron Heinsman y colaboradores este fenómeno ocasiona que cierta fracción del sustrato ácido (ibuprofeno) sea retenido en las esferas de catalizador. Por lo tanto, deberá removerse el sustrato retenido en el biocatalizador con el fin de obtener una verdadera cuantificación del avance de reacción, de lo contrario se tendrá una sobreestimación de la conversión que es lo que sucede al determinar este parámetro de reacción por medio de HPLC. Por consiguiente la única metodología confiable para la determinación del ibuprofeno que no reaccionó es la titulación ácido-base de dicho sustrato por sacrificio es decir, que la titulación se realizó directamente en el recipiente donde se llevó a cabo la reacción [11].

4.3. CÁLCULOS DE PARÁMETROS DE ENANTIOSELECTIVIDAD: ee %, E, EF

Chen y colaboradores son la referencia clásica en cuanto a la cuantificación del progreso de una resolución racémica, quienes definen los parámetros ee% (exceso enantiomérico) y E (relación enantiomérica) que son discutidos a continuación [12].

- Exceso enantiomérico (ee%):

$$\text{ee S \%} = \frac{[S]_t - [R]_t}{[S]_t + [R]_t} * 100 \quad \text{ee R \%} = \frac{[R]_t - [S]_t}{[S]_t + [R]_t} * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

El exceso enantiomérico siempre se refiere a uno de los dos enantiómeros, S(+) o R(-), y puede referirse al producto o al reactivo, quedando condicionado el uso de uno u otro por la facilidad de análisis de los mismos. Este parámetro tomará valores entre 0 y 100 %.

Demostrada una relación lineal que vincule la concentración de cada enantiómero en una muestra con el área correspondiente en el cromatograma podemos expresar el eeS% y eeR% en función de dichas áreas. La verificación de tal linealidad se detalla en el **Anexo 3**. Así, la expresión que se empleó en el cálculo del exceso enantiomérico de sustrato (eeS%), S (+) ibuprofeno en nuestro caso particular, fue la siguiente:

$$\text{ee S \%} = \frac{A_t^S - 1,075 * A_t^R}{A_t^S + 1,075 * A_t^R} * 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde A_t^S y A_t^R corresponden a las áreas de los picos correspondientes a los isómeros S(+) y R(-) respectivamente, al finalizar la reacción. Dicha expresión involucra un factor de corrección ($F_R = 1,075$) debido a que el detector empleado posee diferente respuesta hacia cada enantiómero. El cálculo de dicho factor se detalla en el **Anexo 3**.

- Relación enantiomérica (E):

$$E = \frac{\ln [(1-X)(1-ee_s)]}{\ln [(1-X)(1+ee_s)]}$$

$$E = \frac{\ln [1-X(1+ee_p)]}{\ln [1-X(1-ee_p)]}$$

Ecuación 5

Este parámetro relaciona la conversión total (X) con el exceso enantiomérico de sustrato (ee_s) o de producto (ee_p). En términos generales se considera que una reacción es enantioselectiva a valores de $E > 20$ [13], aunque este valor depende fuertemente de la fuente consultada. La ventaja de usar el parámetro E reside en su independencia del avance de la reacción ya que se trata de una propiedad intrínseca de la enzima, teniendo su origen en consideraciones cinéticas. En este sentido el parámetro E fue definido por Chen y colaboradores (1982) para reacciones irreversibles en las cuales un único sustrato se convierte en un único producto siguiendo una cinética de primer orden o pseudoprimer orden, en un sistema homogéneo y en ausencia de reacciones secundarias (ecuación 5). Posteriormente, en 1987, los mismos autores extendieron la definición a reacciones reversibles, implicando el cálculo del parámetro E el conocimiento previo de la constante de equilibrio de la reacción [12]. En el trabajo de Straathof y Jongejan se hace una recopilación de las distintas formas de evaluar la enantioselectividad a partir del valor propuesto por Chen et al. En dicho trabajo se estudian métodos de cálculo de este parámetro y se discuten la influencia de factores como: existencia de reacciones paralelas, cinética y termodinámica de la reacción principal, inhibición enzimática, homogeneidad de fases, equilibrio químico, limitación por difusión, mezcla incompleta, tipo de reactor [14]. Este reporte deja en claro la necesidad de tomar con precaución los valores de relación enantiomérica dados en la literatura, debido a que mayoritariamente provienen de medidas únicas y del empleo de la ecuación 5 para su cálculo, expresión que no es de aplicación general. Resulta interesante tener en cuenta que una determinada transformación enzimática de sustrato en producto es catalizada por diferentes isoenzimas, siendo común la presencia de distintas isoenzimas en los productos comerciales actualmente

disponibles (tanto enzimas libres como inmovilizadas). Las isoenzimas pueden tener diferentes valores de E y solamente pueden usarse enzimas puras para determinar parámetros cinéticos tales como la relación enantiomérica. Además, al emplear enzimas inmovilizadas las características difusionales de los sustratos a través del biocatalizador influyen en la validez del valor obtenido del parámetro E [14]. Este último aspecto es evidenciado por Heinsman y colaboradores [11].

Aunque los parámetros descritos por Chen et al. han sido ampliamente utilizados en todo tipo de resoluciones (Kazlauskas et al 1991 [15], Chiou et al 1992 [16], Santaniello et al 1993 [17], Secundo et al 1997 [18]) algunos autores proponen otra forma de cuantificar la enantioselectividad. Lopez-Belmonte et al. proponen un nuevo parámetro denominado Factor Enantiomérico (EF), independiente de la cinética de reacción, el cual se calcula como el cociente del exceso enantiomérico experimental (calculado mediante la ecuación 3) y el denominado exceso enantiomérico teórico, dado por la ecuación (6), que corresponde al valor que tendría el exceso enantiomérico, al mismo tiempo de reacción y mismo valor de conversión, si reaccionara solo un enantiómero (el de velocidad de reacción rápida). Así un valor de EF de 1 indica enantioselectividad perfecta, y un valor de 0 ausencia de resolución [19].

$$EF = ee/ee \text{ teórico} \quad ee \text{ teórico} = \frac{X \cdot 100}{(100 - X)} \quad \text{Ecuación 6}$$

En la resolución cinética de racematos, cuando una conversión (X%) superior al 50 % indica que la enzima convierte a los dos enantiómeros, por lo tanto en situaciones donde $X \% \geq 50 \%$ el valor de EF debe calcularse teniendo en cuenta un valor de ee % teórico de 100 %. En este caso, valores de EF de 0,99 para conversiones superiores al 50 % representan sistemas enzimáticos muy atractivos con moderada selectividad.

Teniendo en cuenta los conceptos discutidos respecto a distintos parámetros de enantioselectividad enzimática y el alcance de los mismos y, considerando que la

comercialización de un compuesto como enantiopuro requiere de alta pureza enantiomérica, típicamente con excesos enantioméricos $\geq 98\%$, se decide centrar el estudio del rendimiento enantioselectivo de la reacción de interés mediante el cálculo del exceso enantiomérico de sustrato, S(+) ibuprofeno.

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1. Efecto del contenido inicial de agua

El contenido de agua es un factor importante que afecta tanto a la actividad como a la enantioselectividad de las lipasas. En la literatura se reportan esterificaciones catalizadas por lipasas realizadas en medios no acuosos, respecto a ellos los hallazgos presentados en esta Tesis son coincidentes en la importancia del agua en el medio de reacción. Además actualmente es conocido que el nivel de flexibilidad de una enzima aumenta al aumentar su nivel de hidratación y se ha confirmado experimentalmente que la mejora en cuanto a la actividad enzimática observada al agregar pequeñas cantidades de agua al medio de reacción orgánico está asociada a un aumento de flexibilidad [20]. En cuanto al efecto del agua sobre la enantioselectividad, el trabajo de Broos y colaboradores -un estudio de anisotropía de fluorescencia resuelto en el tiempo sobre la flexibilidad molecular del sitio activo de enzimas suspendidas en solventes orgánicos- constituye la primera evidencia experimental de que la flexibilidad y la enantioselectividad de una enzima están relacionadas entre sí [20]. Sin embargo, la literatura publicada todavía muestra opiniones diferentes sobre si la flexibilidad aumentada de enzimas hidratadas puede aumentar o disminuir la enantioselectividad de las mismas. El trabajo experimental de Broos demostró que la flexibilidad de enzima en la orden de sub-nanosegundos permiten el muestreo rápido de un repertorio grande de conformaciones de la enzima, así mejora la probabilidad de alcanzar un estado conformacional capaz de unirse y convertir a un sustrato enantiomérico [20]. La flexibilidad de la enzima inducida por la hidratación de la

proteína parece esencial para maximizar interacciones favorables con el sustrato. Por otro lado, algunos informes convienen sobre el hecho que una enzima con más flexibilidad conformacional causada por un nivel de hidratación más alto tiene menos posibilidad de discriminar entre los dos enantiómeros [21].

En el caso de la resolución de (R/S)-ibuprofeno, el efecto del contenido de agua en la reacción realizada en medio orgánico ha sido estudiada por numerosos autores [19, 22, 23, 24]. Xie y colaboradores estudiaron el efecto del agua agregada sobre la actividad y la enantioselectividad enzimática en la esterificación de ibuprofeno racémico con n-butanol catalizada por lipasa de *Candida rugosa* en varios solventes hidrofóbicos. Los autores encontraron que la lipasa podía ser dramáticamente activada añadiendo una muy pequeña cantidad de agua, y que la activación era sumamente enantioselectiva para la esterificación de (S)-ibuprofeno [23]. En aquella contribución, para todos los solventes probados los perfiles de conversión y de enantioselectividad con el contenido de agua era notablemente similar, siendo en ese caso 0.1 % v/v el contenido de agua óptimo para la reacción ensayada [23].

La figura 2 muestra el efecto del contenido de agua sobre la conversión y exceso enantiomérico obtenido en la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con etanol, en ausencia de co-solvente orgánico, luego de 72 horas de reacción.

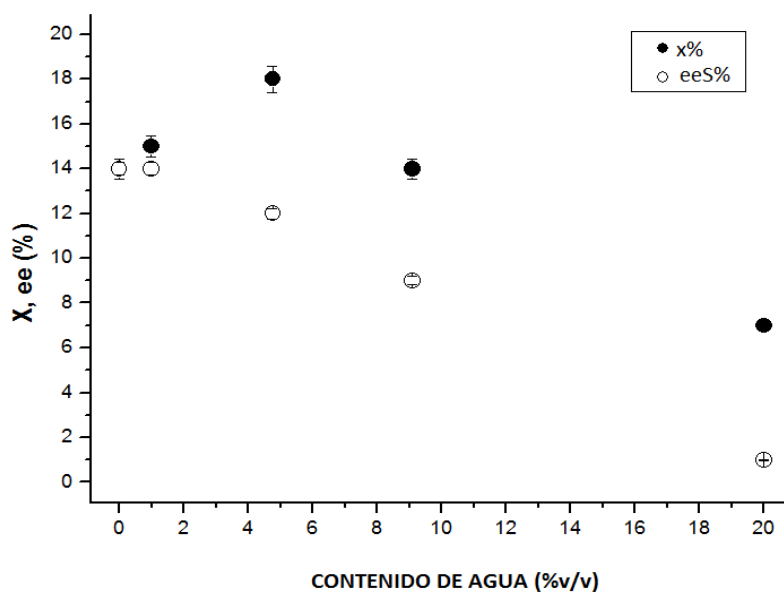


Figura 2. Efecto del contenido inicial de agua sobre la conversión de R/S-ibuprofeno total (X%) y el exceso enantiomérico hacia S(+)-ibuprofeno (eeS%). Condiciones de reacción: reactor batch, 0.500 g de R/S-ibuprofeno; 20,00 ml de etanol absoluto, 100 mg de Novozym® 435, 45 °C, 200 rpm y 72 h.

En términos de conversión total del ácido a éster (X%), se observa un máximo valor para un contenido de agua de 4,8 % v/v. Este comportamiento es típico de esterificaciones catalizadas por lipasas en las cuales un cierto grado de hidratación de la enzima tiene un efecto positivo sobre la flexibilidad y por lo tanto sobre su actividad. Por otro lado, ya que el agua es un subproducto de la reacción, su adición promueve la reacción inversa: la hidrólisis del éster que se formó. Entonces, el contenido acuoso óptimo en las reacciones de esterificación catalizadas por lipasas es el resultado de un compromiso entre la influencia positiva del agua sobre la actividad de la enzima, y la reducción de la conversión neta de la síntesis por la hidrólisis de éster. Además, se ha propuesto que el agua pueda formar complejos dead-end con la lipasa, generando esto una desactivación irreversible [25].

En términos de exceso enantiomérico los resultados mostrados en la figura 6 revelan que para un contenido inicial de agua en el rango de 0 a 4,8 % v/v, el agua no tiene

efecto significativo sobre la enantioselectividad de la reacción, sin embargo para contenidos de agua mayores a 4,8 % v/v el exceso enantiomérico disminuye notablemente. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Pepin y Lortie [22] y también con el trabajo de Trani y colaboradores [26] quienes encontraron que en la resolución de (R/S)-ibuprofeno en un medio sin solventes catalizada por Novozym® 435, bajas actividades de agua condujeron a mayores enantioselectividades.

En un compromiso entre lograr elevados valores de exceso enantiomérico y que el catalizador sea activo, se fijó el contenido de agua inicial en 4,8 % v/v para posteriores ensayos.

4.4.2. Efecto del volumen de etanol. Relación molar entre sustratos

En las reacciones de esterificación enzimática los alcoholes actúan como nucleófilos y se sabe que su concentración afecta la velocidad y la enantioselectividad de la reacción [27]. Así, la concentración del alcohol es un parámetro clave a considerar en la resolución catalizada por lipasas, y ha sido un parámetro por lo general considerado en el análisis paramétrico de la resolución enzimática de (R/S)-ibuprofeno [28,29, 30].

La figura 3 muestra la conversión de ibuprofeno y el exceso enantiomérico hacia el isómero S(+)-ibuprofeno en función del volumen de etanol.

Los datos incluidos en la figura 3 revelan que la conversión total al éster (X%) aumenta gradualmente cuando se reduce el volumen de etanol desde 20 ml a 1 ml. Se reduce el efecto inhibitorio conocido de los alcoholes sobre la actividad de las lipasas cuando se emplean volúmenes inferiores de etanol, conduciendo a conversiones de reacción más altas. Foresti y colaboradores proponen la formación de complejos dead-end entre la lipasa y el etanol a altas concentraciones del alcohol y demuestran la viabilidad termodinámica de dicha inhibición competitiva por medio de modelado molecular [31]. Los resultados del modelado revelan que una reacción irreversible entre la histidina de la tríada catalítica y el etanol (y también el agua) es entálpicamente favorecida y puede ocurrir antes que el ibuprofeno interaccione con el sitio activo.

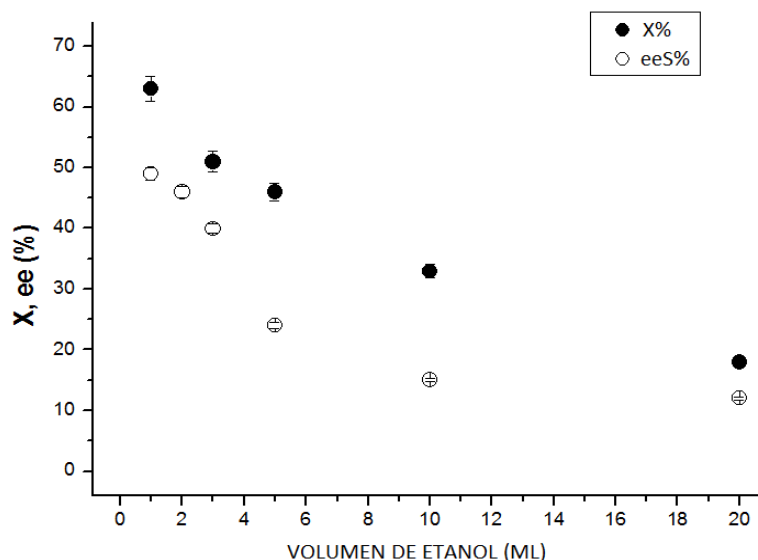


Figura 3. Efecto del volumen de etanol sobre la conversión de R/S-ibuprofeno total (X%) y el exceso enantiomérico hacia el isómero S(+) (eeS%). Condiciones de reacción: reactor batch, 0.5000 g de R/S-ibuprofeno; 4,8 % v/v H₂O, 100 mg de Novozym® 435, 45 °C, 200 rpm y 72 h.

El aumento del volumen de etanol va asociado también a una dilución del sistema, involucrando esto dilución del ibuprofeno y del catalizador. Por lo tanto, si bien es conocido y reportado el efecto inhibitorio de alcoholes sobre lipasas, y posiblemente ésta sea la causa principal del comportamiento observado en la figura 3, el efecto de dilución de un sustrato y del catalizador también estarían actuando como efectos negativos para el avance de la reacción de esterificación, y así los tres efectos contribuyen al comportamiento observado: disminución de la conversión y del exceso enantiomérico al aumentar el volumen de etanol.

Por otro lado, también hay efectos positivos asociados al aumento de volumen de etanol, los cuales actúan promoviendo la reacción de esterificación. Estos efectos son, la dilución del efecto inhibitorio de restos ácidos de ibuprofeno sobre la actividad del catalizador, y favorecer el desplazamiento del equilibrio hacia la esterificación por el gran exceso de uno de los reactivos.

En el caso de la cantidad de agua añadida, el porcentaje de agua se mantuvo constante respecto al volumen total de la mezcla de reacción por lo que, en este caso, el agua añadida no se diluye por el aumento del volumen de etanol utilizado. Sin embargo, la relación entre el volumen de agua y la cantidad (masa) de biocatalizador se incrementa realmente (la cantidad de agua es aumentada para mantener su porcentaje constante en relación con el volumen total de reacción, y la cantidad de catalizador es siempre la misma), y por lo tanto un efecto adicional e indirecto del incremento del volumen de etanol, relacionado con el incremento en la relación agua/biocatalizador debe considerarse.

En cuanto a la enantioselectividad del proceso, en la figura 3 el exceso enantiomérico del sustrato muestra un perfil similar al obtenido para la conversión total de ibuprofeno, incrementándose significativamente al disminuir el volumen de etanol en la mezcla de reacción. Estos resultados están de acuerdo con resultados reportados en una serie de artículos publicados sobre esterificación de ibuprofeno racémico, donde se presentan perfiles de exceso enantiomérico con la concentración del alcohol semejantes a los perfiles de conversión o de velocidad de reacción [27, 29, 30].

Considerando el análisis presentado anteriormente, en forma directa o indirecta, el incremento del volumen de etanol en el sistema de reacción incrementa el efecto inhibitorio o perjudicial ejercido por el alcohol. Efectos adicionales reportados por otros autores, como la extracción de agua desde el sitio activo por el etanol [32] y el efecto de dilución del ibuprofeno al usar mayores volúmenes de etanol [33] quizás contribuyen en paralelo a la disminución de enantioselectividad y actividad experimentalmente observada al aumentar el volumen de etanol del sistema de reacción.

En base a los resultados mostrados, el volumen de etanol absoluto se fijó en 1,00 ml para los posteriores ensayos.

4.4.3. Efecto de la temperatura de reacción

En las condiciones óptimas de contenido de etanol y de agua discutidas en las secciones previas, la reacción fue realizada a 37 °C y a 55 °C. Las temperaturas superiores a 55 °C causaron una marcada evaporación del etanol lo que generó dificultad para mantener el volumen de reacción constante. Los resultados en términos de conversión total y exceso enantiomérico hacia el enantiómero S(+)-ibuprofeno se presentan en la figura 4.

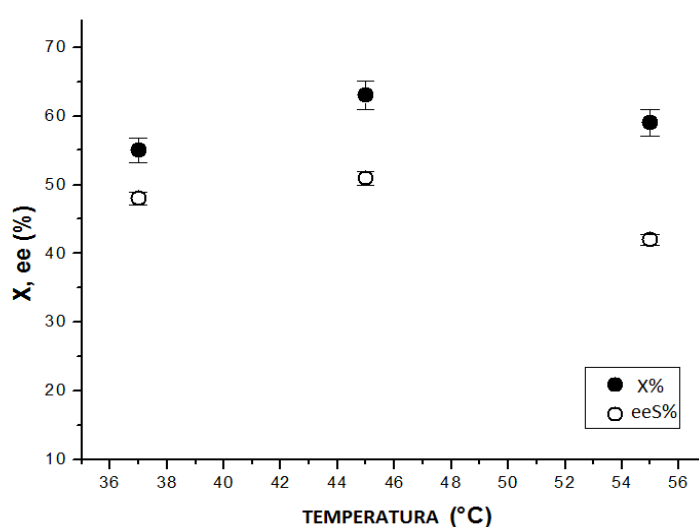


Figura 4. Efecto de la temperatura sobre la conversión de R/S-ibuprofeno total (X%) y el exceso enantiomérico hacia el enantiómero S(+) (ee%). Las condiciones de reacción: reactor batch, 0.500 g de R/S-ibuprofeno; 4,8 % v/v H₂O, 1,0 ml de etanol absoluto, 100 mg de Novozym® 435, 200 rpm y 72 h.

En la figura 4 se observa que la mayor actividad catalizadora se obtuvo a 45 °C con un valor de conversión total de 63 %. A 55 °C la conversión hacia el éster muestra una leve reducción respecto al resultado obtenido a 45 °C, que estaría de acuerdo con el aumento en la velocidad de desactivación que muestran las enzimas al aumentar la temperatura. Por otro lado, a 55 °C se obtuvo un descenso más abrupto del exceso enantiomérico. Es conocido que la enantioselectividad de las lipasas disminuye a altas temperaturas que promueven la deformación del sitio activo. El aumento de

flexibilidad del sitio activo reduce la habilidad del biocatalizador de discriminar entre los dos enantiómeros conduciendo esto a una disminución de la enantioselectividad. Una mirada rápida en la literatura en cuanto a la resolución de AINEs catalizada por lipasas ilustra el efecto de temperatura sobre la enantioselectividad mostrado por lipasas de diferente origen [19, 30, 34]. En el trabajo de Ong y colaboradores la enantioselectividad en la esterificación de (R/S)-ketoprofeno catalizada por CALB libre aumenta al aumentar la temperatura de reacción hasta los 40 °C [34]. Cuando la temperatura superó los 45 °C la enantioselectividad mostró una caída abrupta. En el trabajo de Won y colaboradores la enantioselectividad de la lipasa de *Candida rugosa* en la esterificación de (R/S)-ibuprofeno en isooctano también disminuyó significativamente por incrementos de temperatura, encontrando un valor óptimo a 30 °C (la menor temperatura ensayada) [30]. Finalmente para la reacción catalizada por Lipozyme IM (conteniendo lipasa de *Rhizomucor miehei*) Lopez-Belmonte y colaboradores reportan una relación inversa entre factor de enantioselectividad y temperatura [19].

4.4.4. Efecto de la masa de catalizador

La influencia de la cantidad de Novozym® 435 sobre la conversión y el exceso enantiomérico se presenta en la figura 5. Allí puede observarse que tanto la conversión total a ésteres como el exceso enantiomérico de sustrato aumentan linealmente con la masa de catalizador hasta los 100 mg.

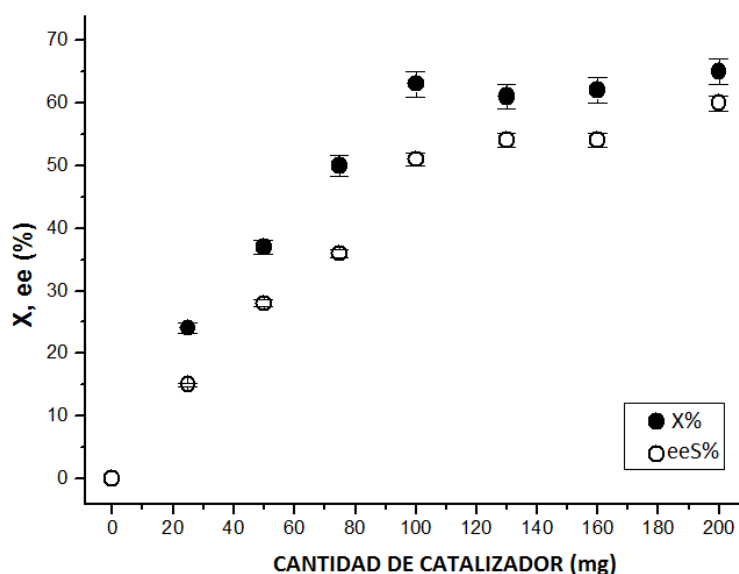


Figura 5. Efecto de la masa de catalizador sobre la conversión de R/S-ibuprofeno total (X%) y el exceso enantiomérico hacia el enantiómero S(+) (eeS%). Condiciones de reacción: reactor batch, 0.500 g de R/S-ibuprofeno; 4,8 % v/v H₂O; 1,0 ml de etanol absoluto, 45 °C 200 rpm y 72 h.

Para mayores cantidades de biocatalizador no se observaron cambios significativos en la conversión y esto produce un descenso de la productividad del catalizador la cual se mide como actividad específica del mismo, es decir, moles de ibuprofeno esterificado/mg catalizador hora.

Respecto al exceso enantiomérico, el eeS % continúa incrementándose para masas de biocatalizador superiores a los 100 mg, alcanzando un valor máximo de 60 % para la reacción catalizada con 200 mg de Novozym® 435.

Debido la elevada cantidad de catalizador comercial empleada en nuestro sistema de reacción, se estudió el reuso de Novozym® 435 con el objetivo de reducir los costos del proceso.

4.4.5 Estudio cinético bajo condiciones óptimas de reacción.

En las mejores condiciones de reacción determinadas en los estudios presentados anteriormente (0,5000 g. de R/S-ibuprofeno; 1,00 ml de etanol absoluto; 4,8 % v/v agua, 160 mg de Novozym® 435, 45 °C y 200 rpm) la conversión y la enantioselectividad fueron evaluadas en función del tiempo de reacción. Los resultados en términos de conversión de R/S-ibuprofeno y exceso enantiomérico hacia S(+)-ibuprofeno se muestran en la figura 6.

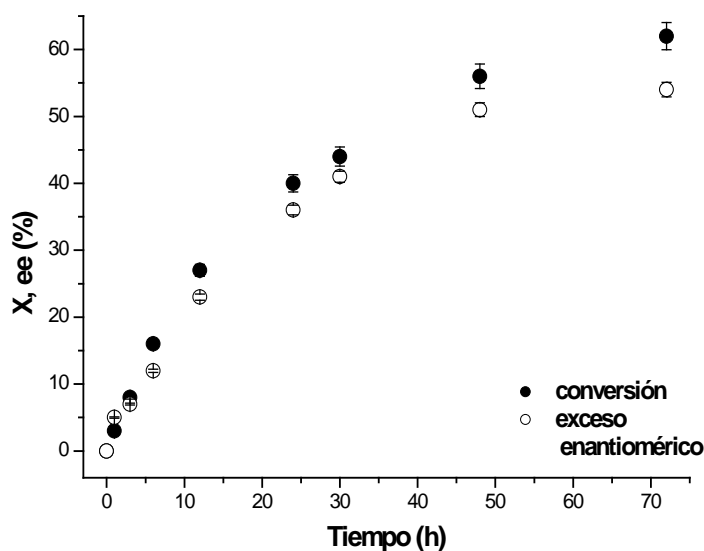


Figura 6. Evolución de la conversión de R/S-ibuprofeno total (X%) y el exceso enantiomérico hacia el isómero S(+) (eeS%) en función del tiempo bajo condiciones de reacción optimizadas: 0,5000 g de R/S-ibuprofeno; 1,00 ml de etanol absoluto; 4,8 % v/v agua, 160 mg de Novozym® 435, 45 °C y 200 rpm.

La esterificación enantioselectiva de ibuprofeno en exceso de etanol sin solventes orgánicos adicionales procede a una alta velocidad a pesar del exceso de alcohol empleado. De hecho, los valores de conversión total están muy cerca de aquellos encontrados para un proceso similar realizado en medios orgánicos [35]. En términos

de enantioselectividad de reacción, el exceso enantiomérico evidencia un continuo incremento en el tiempo de reacción, alcanzando un valor de 54 % a las 72 horas. Los reportes hallados acerca de la resolución de ibuprofeno racémico catalizada por Novozym® 435 realizadas en solvente orgánico (no sustrato), muestran valores mayores [35] y menores [36] de exceso enantiomérico/enantioselectividad respecto a los obtenidos en este trabajo. Novozym® 435 también ha sido usado para la resolución de ibuprofeno racémico en un medio sin solvente, que requirió temperaturas superiores a los 70 °C [22, 26, 37, 38]. En aquellas condiciones, aplicando el vacío para quitar el agua formada durante la reacción, los autores reportan haber logrado un exceso enantiomérico de 95 % y un 85 % cuando el proceso fue escalado a 100 g de ibuprofeno [26].

4.5. REUSOS DE NOVOZYM® 435 EN CONDICIONES ÓPTIMAS DE REACCIÓN

Una vez optimizadas las condiciones de reacción del sistema en estudio se evaluó la estabilidad biocatalítica de Novozym® 435. En este sentido el catalizador fue sometido a sucesivos ciclos de reacción bajo las condiciones halladas como óptimas: reactor en batch, 0,5000 g de R/S-ibuprofeno; 1,00 ml de etanol absoluto; 4,8 % v/v de agua, 160 mg de Novozym® 435, 45 °C, 200 rpm y 48 hs de reacción. Al finalizar cada ciclo de 48 hs de reacción el catalizador fue separado del medio de reacción por filtración, y posteriormente se lavó con etanol a modo de asegurar que no arrastre en él moléculas de sustrato ni producto. Los líquidos de dicho ciclo (medio de reacción y líquidos de lavado del catalizador) se analizaron como se detalló en el apartado 4.2.2. con el fin de obtener los valores de X % y eeS % de dicho ciclo. Los resultados se muestran en la figura 7.

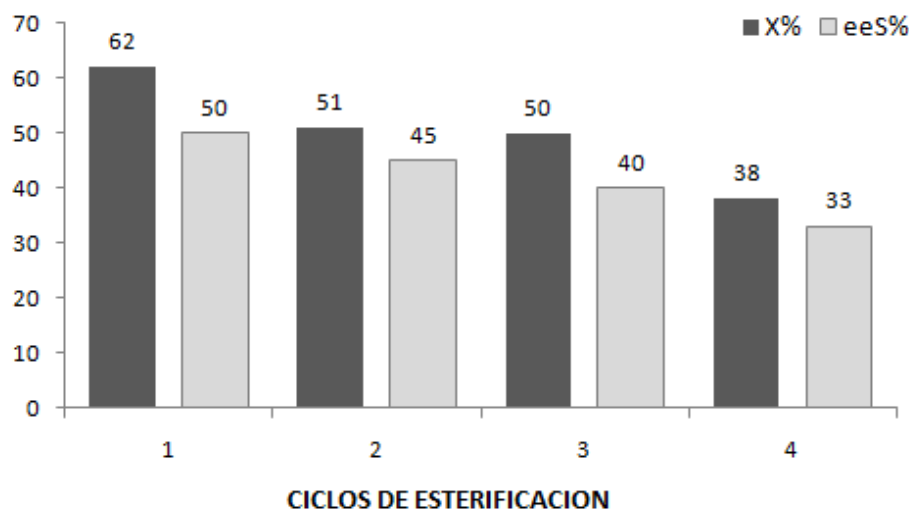


Figura 7. Estabilidad de Novozym® 435 al reutilizarse en etanol bajo condiciones óptimas de reacción. Condiciones de operación: reactor en batch; 0,5000 g de R/S-ibuprofeno; 1,00 ml de etanol absoluto; 4,8 % v/v de agua, 160 mg de Novozym® 435, 45 °C, 200 rpm y 48 hs de reacción.

El reúso de Novozym® 435 fue ensayado con el objetivo de establecer si el alcohol provoca una drástica inhibición sobre el biocatalizador que pueda deteriorar su actividad o enantioselectividad. La figura 7 muestra los valores de conversión y exceso enantiomérico obtenidos para cada uso (ciclo de 48hs de reacción) consecutivo de Novozym® 435. Los resultados obtenidos sugieren que al emplear 1,00 ml de etanol (relación molar etanol /ibuprofeno = 7) el alcohol no impone una inhibición drástica en Novozym® 435, que luego de cuatro usos aún conserva un 60 % de su actividad inicial. En cuanto a la enantioselectividad del catalizador reutilizado, se observó una disminución gradual del exceso enantiomérico de sustrato llegando en el cuarto uso de Novozym® 435 a un valor de un 58 % respecto al valor inicial (primer uso). En términos de exceso enantiomérico, la disminución observada podría ser debida al aumento de flexibilidad del sitio activo de la lipasa inducido por el agua, la temperatura y el contacto con etanol durante sus usos previos.

4.6. CONCLUSIONES

La esterificación enantioselectiva de (R/S)-ibuprofeno catalizada por Novozym® 435 fue llevada a cabo satisfactoriamente en ausencia de co-solventes orgánicos adicionales. En este contexto, el etanol no produjo una drástica disminución en la actividad del biocatalizador, obteniéndose conversiones comparables a las reportadas en un medio orgánico convencional. El estudio paramétrico reveló que la esterificación de 0,500 g de ibuprofeno racémico con 1,0 ml de etanol absoluto en presencia de 4,8 % v/v de agua agregada y 160 mg de Novozym® 435, operando a 45 °C y 200 rpm, resultaron las mejores condiciones ensayadas en términos de conversión total y exceso enantiomérico hacia el enantiómero S(+). A pesar de que para un fin práctico el exceso enantiomérico debe ser mejorado, se ha demostrado que la esterificación enantioselectiva de (R/S)-ibuprofeno catalizada por lipasas a moderadas temperaturas (45 °C) y en un medio libre de co-solvente orgánico es un proceso factible.

El reúso del catalizador en un sistema de reacción con relación molar alcohol/ácido igual a 7 no conduce a una drástica desactivación de la lipasa, la que se podría re-utilizar hasta cuatro veces con una actividad y selectividad del 60 % respecto al primer uso.

4.7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. CAPÍTULO 4.

[1] Foresti M.L., Martino R., Ferreira M.L., Briand L.E., XV Congreso Argentino de Catálisis y 4º Congreso de Catálisis del MERCOSUR, 2007, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

[2] www.IUPAC.org

[3] Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R., Principio de análisis instrumental, 6º edición, 2008, ISBN-13: 978-970-686-829-9, ISBN-10: 970-686-829-1, Cengage Learning, México DF.

-
- [4] Morante Zarcero S., Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación a la síntesis asimétrica, 2007, ISBN: 978-84-9772-998-7. Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, España. Editorial Dykinson S.L. Madrid.
- [5] Meyer V., Practical High Performance Liquid Chromatography, 5° edición, 2010, John Wiley & Sons.
- [6] Sandie Lindsay, High Performance Liquid Chromatography , 2° edición, 1992, ISBN 10: 0471931152, ISBN 13: 978-0471931157, John Wiley & Sons.
- [7] www.mn-net.com
- [8] Matkovic S.R., Valle G.M., Briand L.E., *Lat. Am. Appl. Res.* 2005, 35, 189-195.
- [9] Harris D.C., Análisis Químico Cuantitativo, 2° edición (5° edición norteamericana) 2001, editorial Reverté, Barcelona, España.
- [10] www.anmat.gov.ar/principal.asp
- [11] Heinsman N.W.J.T., Schröen C.G.P., van der Padt A., Franseen M.C.R., Boom R.M., vanit Riet K., *Tetrahedrom asymm.*, 2003, 14, 2699-2704.
- [12] a) Chen C.S., Fujimoto Y., Girdaukas G., Sih C.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, 104, 7294-7299 b) Chen C.S., Wu S.H., Girdaukas G., Sih C.J., *J Am. Chem Soc.*, 1987, 109, 2812-2817.
- [13] A. Ghanem, H.Y. Aboul-Enein, *Tetrahedrom: Asymmetry*, 2004, 15, 3331-3351
- [14] Straathof A.J.J., Jongejan J.A., *Enzym and Microbial Technology*, 1997, 21, 559-571.
- [15] Kazlauskas R.J., Weissfloch A.N.E., Rappaport A.T., Cuccia L.A., *J. Org. Chem.*, 1991, 2656-2665.
- [16] Chiou A.J., Wu S.H., Wang K.T., *Biotechnol. Lett.*, 1992, 14, 461-464.
- [17] Santaniello E., Ferraboschi P., Grisenti P., *Enzime Microb. Technol.*, 1993, 15, 367-382.
- [18] Secundo F., Ottolina G., Riva S., Carrea G., 1997, *Tetrahedron:Asymmetry*, 8, 2167-2173.
- [19] López-Belmonte M.T., Alcántara A.R., Sinisterra J.V., *J. Org. Chem.*, 1997, 62,1831-1840.

- [20] Broos J., Visser A.J., Engbersen J.F., Verboom W., van Hoek A., Reinhoudt D.N., *J. Chem. Soc.*, 1995, 117, 12657-12663.
- [21] Wehtje E., Costes D., Adlercreutz P., *J. Mol Catal B: Enzym*, 1997, 3, 221–230.
- [22] Pepin P., Lortie R., *Biotechnol Bioeng*, 1999, 63, 502-505.
- [23] Xie Y., Liu H., *J. Chem. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1998, 864, 570-575.
- [24] Arroyo M., Moreno J.M., Sinisterra J.V., *J. Mol. Catal. A:Chem*, 1995, 97, 195-201.
- [25] Graber M., Bousquet-Dubouch M.P., Lamare S., Legoy M.D., *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, 1648, 24–32.
- [26] Trani M., Ducret A., Pepin P., Lortie R., *Biotechnol. Lett.*, 1995 17, 1095–1098.
- [27] Wu J.Y. and Liu S.W., *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, 26, 124–130.
- [28] Sanchez A., Valero F., Lafuente J., Sola C, *Enzyme Microb Technol*, 2000, 27, 157–166.
- [29] Ikeda Y., Kurokawa Y., *J Biosci Bioeng.*, 2002, 93, 98–100.
- [30] Won K., Hong J., Kim K., Moon S., *Process Biochem*, 2006, 41, 264–269.
- [31] Foresti M.L., Galle M., Ferreira M.L., Briand L.E., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2009, 84, 1461-1473.
- [32] Trodler P., Pleiss J., *BMC Struct. Biol.*, 2008, 8, 9–18.
- [33] Köhler J., Wünsch B., *Theor Biol Med Mode*, 2007, 4, 34–49.
- [34] Ong A.L., Kamaruddin A.H., Bhatia S., Long W.S., Lim S.T., Kumari E., *Enzyme Microb. Technol.*, 2006, 39, 924–929.
- [35] Carvalho P., Contesini F.J., Ikegaki M., *Braz. J.Microbio.*, 2006, 37, 329–337.
- [36] Arroyo M. and Sinisterra J.V., *J. Org. Chem.*, 1994, 59, 4410–4417
- [37] Ducret A., Trani M., Pepin P., Lortie R., *Biotechnol Tech*, 1995, 9, 591–596. [38] Ergan F., Trani M., Lortie R., *Ann NY Acad Sci*, 1995, 750, 228–231.

CAPITULO 5

ESTRATEGIAS PARA LA INVESTIGACIÓN DE LAS CAUSAS DE DESACTIVACIÓN. FUNDAMENTOS

Los resultados mostrados en el capítulo anterior evidencian que tanto la conversión a ésteres etílicos como el exceso enantiomérico hacia el S(+)-ibuprofeno son afectados por el volumen de etanol y el contenido inicial de agua de la mezcla de reacción. En este contexto, cuando una mezcla de etanol: (R/S)-ibuprofeno con relación molar igual a 141 (0,20 ml de etanol por miligramo de biocatalizador) fue ensayada, se logró baja conversión (18 %) y exceso enantiomérico (12 %). Sin embargo, al emplear una relación molar igual a 7 (0,01 ml/mg) se obtiene 62 % de conversión de ibuprofeno con 50 % de exceso enantiomérico hacia S(+)-ibuprofeno en condiciones de operación óptimas. Además, también se observó una pérdida de actividad en los sucesivos usos. En este contexto, hay varias investigaciones que dan cuenta de la desactivación de Novozym® 435 [ver Anexos 1 y 2]. En particular, investigaciones dedicadas a la producción de bio-diesel manifiestan que el exceso de metanol o etanol inhibe la reacción de transesterificación [1-4]. De manera similar, se ha reportado que el biocatalizador se desactiva cuando es utilizado en reacciones de esterificación con 1-propanol, octanol, metanol, butanol, t-butanol y 1,2-propanodiol como nucleófilos [5-10]. A pesar de los reportes acerca de la desactivación/inhibición de Novozym® 435, ninguna de las investigaciones involucradas se ha enfocado en dar una explicación fiable acerca de las causas de tal comportamiento.

Así, a partir de los resultados obtenidos y los reportes hallados acerca de este tema se abordó una exhaustiva investigación que permitió dilucidar las causas de la desactivación de Novozym® 435. En este contexto, la información obtenida no solo permitió comprender el sistema de reacción sino que brindó las bases para el diseño de posteriores ensayos y el desarrollo de materiales catalíticos avanzados.

5.1. GENERALIDADES DEL ESTUDIO

Como ha sido mencionado, el etanol tiene una acción directa sobre CALB a través de la formación de complejos dead-end estos complejos son causa de una inhibición irreversible de la enzima, y por lo tanto sería, al menos una, de las causas de la

desactivación observada [11]. Así mismo, es conocido que los catalizadores basados en enzimas inmovilizadas por adsorción como es el caso de Novozym® 435, sufren la lixiviación o desprendimiento de enzimas [12 a, b]. Por otro lado, Heinsman y colaboradores reportan el hinchamiento de este catalizador comercial al ser sometido a una reacción similar a la planteada en este trabajo, lo que lleva a pensar en que la desactivación también puede tener origen en el efecto del etanol sobre la integridad de Novozym® 435 [13].

En este contexto, se investigó la interacción de Novozym® 435 con etanol y con una solución de ibuprofeno-etanol a través de isothermas de adsorción y reacción superficial a temperatura programada/desorción a temperatura programada (TPSR/TPD). Estos análisis tienen como finalidad establecer la “fuerza” de interacción etanol-Novozym® 435 y mostrar si existen o no interferencias entre los sustratos.

Por otro lado, se abordó el estudio de la integridad del catalizador al estar en contacto con etanol absoluto y con mezclas etanol-agua en condiciones determinadas. Dichos ensayos se realizaron a distintas temperaturas (temperatura ambiente y 45 °C), por distintos períodos de tiempo (desde 40 minutos hasta 8 días) y a diferentes relaciones de masa de catalizador/ml etanol como se detalla más adelante. Luego del contacto Novozym® 435-etanol bajo condiciones determinadas, se obtuvo la estructura secundaria de la enzima inmovilizada por medio de estudios de espectroscopia de infrarrojo (FTIR) realizados sobre el catalizador “lavado”, refiriéndose el término “lavado” al material resultante del contacto con el alcohol. Adicionalmente se estudió la textura/rugosidad del catalizador, antes y después de someterse a la acción del alcohol, por microscopía electrónica medioambiental (E SEM). El líquido resultante de dicho contacto, o lavado, se sometió a estudios de espectroscopia de infrarrojo (FTIR), espectroscopia UV-Visible y cuantificación de proteínas por medio de la técnica del ácido bicinonínico (BCA). El objetivo de estos estudios es determinar si el alcohol afecta la integridad del catalizador, es decir si produce cambios de textura y/o desprendimiento de matriz polimérica y/o proteína desde el catalizador.

Presentada la estrategia de estudio, en los siguientes apartados de este capítulo se detallan las técnicas empleadas, condiciones de desarrollo de cada etapa así como el equipamiento utilizado. Aquellas técnicas que merezcan extenso desarrollo teórico, como la espectroscopia de infrarrojo, se describen brevemente en este capítulo siendo desarrolladas completamente en el Anexo 4.

En el próximo capítulo (Capítulo 6) se muestran los resultados obtenidos y las conclusiones que surgen a partir de estos estudios.

5.2. ISOTERMAS DE ADSORCIÓN

La adsorción de ibuprofeno (Parafarm 99,23%) sobre Novozym® 435 (Novozymes Brasil, batch LC200217, 72 m²/g) fue ensayada a 25, 28 y 32 °C por contacto del biocatalizador (80-100 mg) con 20,60 ml de una solución conteniendo 60 ppm de ibuprofeno racémico en etanol (Carlo Erba 99,8%) durante 40 min. Los experimentos fueron realizados en frascos sellados colocados en un baño agitado a 120 rpm y a temperatura controlada. Alícuotas de 200 µl de la solución de ibuprofeno fueron retiradas a los 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 minutos durante la experiencia. Se trabajó con un volumen inicial del sistema que garantice la ausencia de perturbaciones debido a la extracción de las sucesivas alícuotas de 200 µl, para ello el volumen total retirado debe ser ≤ 10 % del volumen inicial del sistema.

El análisis de ambos enantiómeros del ibuprofeno y los ésteres de etilo fue realizado por análisis con HPLC quiral utilizando una columna Nucleodex Beta – PM (Marcherey-Nagel) con detector UV operando a 230 nm. La fase móvil (Metanol/0,1%TEAA pH 4,0 (60/40 v/v)) se corrió con un caudal de flujo de 0,700 ml/min. Detalles acerca del equipo de HPLC como de las variables de operación se detallan en el Anexo 3. Las alícuotas analizadas de esta manera en primer lugar fueron diluidas a 30 ppm con fase móvil, filtradas a través de filtros de nylon de 0,45 µm, y luego analizadas por HPLC quiral en las condiciones indicadas. Cada muestra se corrió al menos cuatro veces.

La adsorción de ibuprofeno sobre el catalizador es la etapa que precede a la reacción propiamente dicha por lo cual, se monitoreó la ausencia de productos durante los ensayos. En este sentido, la ausencia de la señal cromatográfica debida a ésteres etílicos garantizó la ausencia de reacción a las temperaturas ensayadas.

La cantidad de ibuprofeno adsorbido sobre Novozym® 435 se determinó por diferencia entre la cantidad inicial del fármaco y la cantidad remanente en solución. En este contexto, se obtuvieron las áreas correspondientes a S(+)-ibuprofeno y R(-)-ibuprofeno de los cromatogramas. Luego, teniendo en cuenta la linealidad de la respuesta concentración-área (ver Anexo 3) previamente determinada, se utilizó la relación área-concentración de una solución patrón de R/S-ibuprofeno en etanol preparada y analizada simultáneamente con las muestras. Luego se calculó la concentración de cada enantiómero en solución para cada tiempo y a cada temperatura estudiada.

Adicionalmente se realizó un experimento control siguiendo la metodología de adsorción descrita sin el agregado del biocatalizador con el fin de evaluar los errores que intervienen en todo el procedimiento. Este experimento demostró que la cuantificación de ibuprofeno en etanol a través de HPLC quiral posee una desviación estándar de 0,74 ppm (Anexo 3).

5.3. REACCIÓN SUPERFICIAL A TEMPERATURA PROGRAMADA

La interacción de etanol con la superficie de Novozym® 435 fue investigada mediante la adsorción del alcohol a 32 °C seguida de reacción superficial a temperatura programada (TPSR). En la figura 1 se muestra el equipo utilizado.

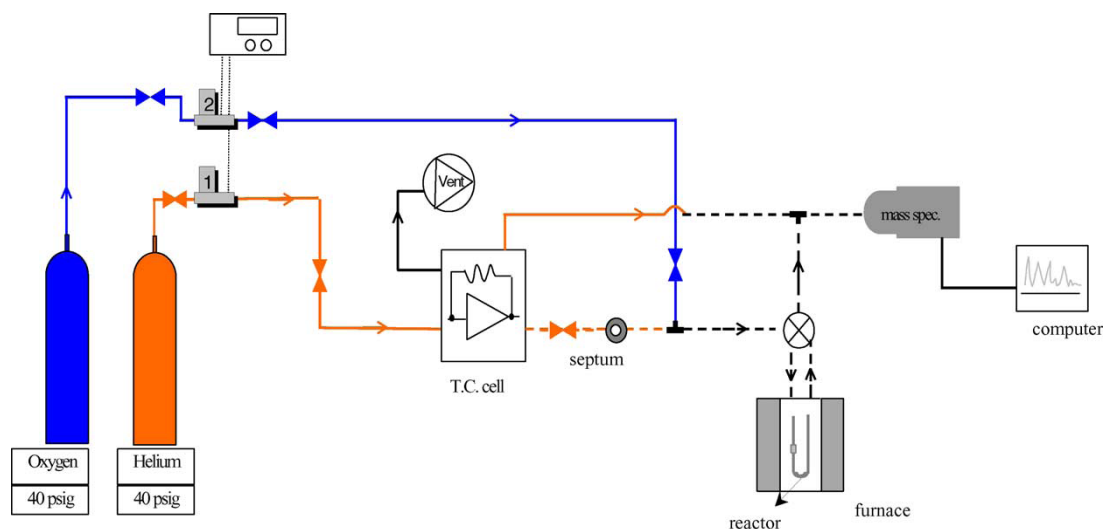


Figura 1. Diagrama de flujo del equipo de adsorción y reacción superficial a temperatura programada. (----) líneas calefaccionadas (extraído de [14]).

El equipo posee un flujo controlado de oxígeno de alta pureza para pre-tratamientos y helio de alta pureza para estudios de adsorción-desorción. La muestra se coloca dentro de un reactor de cuarzo con forma de U que es calentado por un horno eléctrico. La velocidad de calentamiento se controla electrónicamente y es registrada por una computadora.

La muestra de catalizador (46,6 mg, Novozymes Brasil, batch LC200217, $72 \text{ m}^2/\text{g}$) fue pretratada a $32 \text{ }^\circ\text{C}$ por 40 minutos bajo un flujo de Helio puro ($35 \text{ cm}^3 \text{ (NTP) min}^{-1}$) antes de la adsorción y análisis de TPSR. Luego sucesivos pulsos de $0,5 \text{ } \mu\text{l}$ de etanol (Merck P.A., 100%) fueron dosificados a través de un septum caliente hasta alcanzar la saturación. El proceso de adsorción fue seguido in situ mediante espectrometría de masa que detecta el alcohol no adsorbido y/o especies desorbidas desde la muestra. Luego de la saturación, la muestra fue calentada hasta $200 \text{ }^\circ\text{C}$ a razón de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ en la experiencia de reacción a temperatura programada. Las especies resultantes de desorción y/o reacción superficial son detectadas en el espectrómetro de masas y registradas en una computadora. Los siguientes fragmentos masa/carga (típicamente, m/e) fueron empleados en la identificación de las especies desorbidas: etanol, $m/e =$

31; acetaldehído, m/e = 29; ácido acético m/e = 31, m/e = 41 y m/e = 42; acetato de etilo, m/e = 43; etil éter, m/e = 31, m/e = 29 y m/e = 59; agua, m/e = 18; CO₂, m/e = 44; etileno y CO, m/e = 28.

5.4. DESORCIÓN A TEMPERATURA PROGRAMADA

Los análisis de desorción a temperatura programada fueron realizados sobre Novozym®435 y Lewatit VP OC1600 luego del tratamiento (lavado) con etanol. Este tratamiento con alcohol es detallado más adelante en este capítulo. Las muestras (de aproximadamente 20 mg) fueron calentadas hasta 400 °C a razón de 10°C/minuto bajo un flujo de helio puro (35 cm³ NTP min⁻¹). Las especies resultantes de la desorción y/o reacción en superficie son detectadas en un espectrómetro de masas. El equipamiento usado así como las relaciones m/e investigadas se describen en la sección precedente.

5.5. TRATAMIENTOS CON ALCOHOL

El efecto del etanol sobre el biocatalizador se estudió mediante cuatro series de experimentos. En la **primera serie**, Novozym® 435 (Novozymes Brasil, batch LC200217, 72 m²/g) se puso en contacto tres veces consecutivas con etanol (Carlo Erba 99,8%) a 28 °C y 200 rpm en un baño de agua agitado a temperatura controlada (Julabo SW22) durante 40 minutos. Estos experimentos se realizaron variando la relación entre la masa de Novozym® 435 y el volumen de etanol; las relaciones ensayadas fueron 12:1 (1,1800 g de biocatalizador con 100,00 ml de etanol) y 100:1 (100 mg de catalizador con 1,00 ml de etanol). Este último experimento también contiene una cantidad inicial de agua de 4,76 % v/v.

Una **segunda serie** de experimentos imita las condiciones de reacción de la esterificación de R/S-ibuprofeno discutidas en el capítulo 4. En este contexto Novozym® 435 se puso en contacto 4 veces consecutivas con una mezcla etanol-agua (4,76 % v/v) a 45 °C y 200 rpm en un baño de agua agitado (Julabo SW22) durante 48

horas. La relación entre la cantidad de Novozym® 435 y el volumen de etanol fue de 100 mg/ml.

Los experimentos descritos anteriormente se realizaron en frascos cerrados herméticamente. Una pequeña cantidad de muestra del catalizador se retiró luego de cada contacto con el alcohol para ser analizada por TPSR/TPD, FTIR y ESEM. La cantidad de proteína desorbida desde el catalizador se intentó cuantificar en los líquidos resultantes de cada contacto, en la sección 5.9 se detalla el fundamento y el desarrollo experimental de las técnicas de cuantificación de proteínas empleadas en este trabajo. El procedimiento de precipitación de proteínas desde estos líquidos con sulfato de amonio no tuvo éxito. Otras técnicas empleadas en la cuantificación de proteínas desorbidas fueron la técnica del ácido bicinónico, que resultó no reproducible en medio etanólico, y espectroscopia UV-Visible, en la cual se encontró interferencia de sorbatos y benzoatos desprendidos desde el catalizador al contactarse con el medio de reacción.

Adicionalmente, los líquidos resultantes del contacto catalizador-alcohol se llevaron a sequedad y los residuos sólidos resultantes se analizaron por FTIR para determinar la presencia de componentes provenientes desde el catalizador. Por lo tanto, con las experiencias descritas previamente se tiene un análisis cualitativo del efecto de etanol sobre Novozym® 435.

La **tercer serie** de tratamientos consistió en la determinación cuantitativa del efecto del etanol sobre Novozym® 435. En esta experiencia 1,000 g de catalizador se puso en contacto con 10,00 ml de una mezcla etanol-agua (4,76 % v/v) a 45 °C y 200 rpm por un período de 8 días (período que corresponde a 4 ciclos de 48 horas). Luego, las esferas de catalizador se secaron en desecador durante 8 días (deshidratación) y posteriormente se sometieron a temperaturas de 150 °C durante 10 minutos (temperaturas requeridas para la desorción del etanol como se muestra en el capítulo 6), se enfriaron en desecador y se pesaron. El procedimiento se repitió un total de 8 veces hasta alcanzar un peso constante. Este ensayo permitió determinar la cantidad de masa total perdida por Novozym® 435 y la cantidad de etanol adsorbida.

El líquido resultante de este contacto de 8 días se evaporó y los sólidos resultantes se re-disolvieron en 2,00 ml de agua. Por medio de filtración (filtros de nylon 0,45 μm) se separaron los componentes no solubles en agua de la fase acuosa. Los filtros se secaron y pesaron de modo de tener en cuenta estos sólidos en la masa total perdida de catalizador. Posteriormente se realizó la cuantificación de proteínas desorbidas empleando la técnica del ácido bicinónico sobre las soluciones acuosas filtradas.

En colaboración con este trabajo de Tesis en Dr. Carlos Llerena-Suster realizó electroforesis SDS-Page de las soluciones acuosas, antes y después de la filtración, de modo de evidenciar el desprendimiento de proteína como también la identidad de la misma (El fundamento de la electroforesis SDS-Page se describe en el Anexo 4).

Finalmente, la **cuarta serie** de experimentos consistió en repetir los tratamientos en ausencia de agitación, a modo de eliminar cualquier efecto mecánico interferente. En este sentido se llevaron a cabo tratamientos a 28 °C y 45 °C. Para cada temperatura ensayada se realizaron tratamientos durante 40 min (tres tratamientos sucesivos) y 48 horas. Respecto a la relación biocatalizador/volumen de alcohol se reproducen las usadas en series anteriores, es decir, se emplea una relación de 12 mg/ml etanol absoluto en los tratamientos a 28 °C y una relación de 100 mg/ml etanol absoluto en los tratamientos a 45 °C.

5.6. ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA Y DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE PROTEÍNAS

5.6.1. Espectroscopia de infrarrojo: fundamentos teóricos. Espectro IR de proteínas. Determinación de la estructura secundaria de las proteínas

La espectroscopia de IR es una herramienta valiosa para la investigación de estructura de proteínas, del mecanismo molecular de reacciones de proteínas y del plegamiento, despliegue y mal plegamiento de las mismas. Probablemente la aplicación más común de la espectroscopia de infrarrojo en los estudios de proteínas es el análisis de la

estructura secundaria. Este estudio se realiza casi exclusivamente utilizando la banda *amida I* ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) [15 a]. En el Anexo 4 se detalla el fundamento de la espectroscopia infrarroja, las características generales de los espectros infrarrojos de proteínas así como el empleo de la banda *amida I* en la determinación de la estructura secundaria de las mismas. También se detalla en dicho anexo el fundamento del empleo de intercambio isotópico (deuteración). El intercambio isotópico de moléculas de agua por moléculas de D_2O permite investigar la banda *amida I* ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) sin la interferencia de la vibración de flexión de especies O-H que aparece típicamente a 1640 cm^{-1} [15-19].

5.6.2. Descripción del equipo utilizado y metodología

La evolución de la estructura secundaria de la enzima inmovilizada en Novozym® 435 en contacto con etanol fue seguida mediante análisis por FTIR. Para ello las muestras (esferas de catalizador sometidas a tratamiento con alcohol) fueron mantenidas en desecador durante 4 días a los fines de equilibrar el contenido de humedad. Posteriormente, se diluyeron con KBr y se comprimieron en pastillas para el análisis por espectroscopia infrarroja. Los espectros se recogieron en el rango de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} empleando un equipo Bruker Vertex 70 en el modo transmisión ($\pm 2\text{ cm}^{-1}$) y en condiciones ambientes. Los espectros fueron adquiridos con 60 scans en modo de absorción. La contribución al espectro infrarrojo del soporte, Lewatite VP OC1600 (obtenido mediante el método descrito en la sección 5.7), se restó digitalmente desde el espectro de Novozym® 435. En todos los casos se verificó que la máxima intensidad de absorción fuera similar con lo cual, se garantizó que todas las muestras presentaran la misma longitud de camino óptico.

Así mismo, la evolución de la estructura secundaria de la enzima inmovilizada en Novozym® 435 en contacto con etanol fue seguida mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier por reflectancia difusa (DRIFTS) acoplada a intercambio isotópico con óxido de deuterio. El intercambio isotópico de moléculas de agua de

todas las muestras se realizó por contacto de 100 μl de óxido de deuterio ($\text{D} > 99\%$) bajo agitación vigorosa por 10 minutos y posterior incubación toda la noche a temperatura ambiente. La evolución del intercambio isotópico en el tiempo se evaluó a través de la señal amida II a los fines de determinar el máximo intercambio posible. La banda amida II involucra la combinación fuera de fase de vibraciones de flexión de especies $\delta(\text{N-H})$ con vibraciones de estiramiento de especies $\nu(\text{C-N})$ de las proteínas. Además involucra una pequeña contribución de vibración de flexión en el plano de especies $\delta(\text{C=O})$ y vibraciones de estiramiento $\nu(\text{C-C})$ y $\nu(\text{N-C})$. El átomo de H de especies N-H es relativamente fácil de intercambiar por un átomo de deuterio en comparación con el hidrógeno del enlace amida que en cierta medida se encuentra protegido por uniones de hidrógeno y es menos accesible al solvente, estas observaciones se utilizan como evidencia de la evolución del intercambio H-D [19].

La adquisición de los espectros se realizó con un equipo FTIR Nicolet 8700 con un detector criogénico MCT-A (4 cm^{-1} de resolución, 100 scans). El espectrómetro y los espejos que dirigen la radiación hacia la muestra fueron continuamente purgados con aire seco (generador Parker Balston) de modo de eliminar la contribución del CO_2 y del vapor de agua de los espectros.

La estructura secundaria de la lipasa B de *Candida antarctica* se determinó a través de la deconvolución de la señal de amida I (1700 a 1600 cm^{-1}). El ajuste de esa señal infrarroja en los distintos componentes lorentzianos se realizó con un módulo de software de Origin 5.0. La posición y número de componentes se determinó a través de la derivada segunda de la banda amida I y la contribución de cada componente se evaluó por la integración del área bajo la curva y la posterior normalización por el área total de la banda de la amida I.

5.7. REMOCIÓN DE PROTEÍNAS DESDE NOVOZYM® 435

El biocatalizador se sometió al procedimiento descrito por Gross y colaboradores con el fin de desorber la proteína (lipasa B de *Candida antarctica*) inmovilizada sobre la

resina macroporosa Lewatit VP OC1600 [20]. Novozym® 435 (0,1000 g) se incubó a 37 °C durante 30 minutos con 3,00 ml de dimetilsulfóxido (DMS) (J.T.Baker 100%) en un baño agitado a 220 rpm. Luego las esferas de catalizador se separaron por filtración y se lavaron 3 veces con fracciones de 5,00 ml de DMS por vez. A continuación el biocatalizador recuperado se incubó a 37 °C durante 30 minutos con 3,00 ml de Tritón X-100 5 % v/v. Se separó el biocatalizador por filtración, se lavó 3 veces con 5,00 ml de la misma solución de Tritón X-100 y finalmente se lavó con agua destilada. Este procedimiento permitió obtener el soporte Lewatit VP OC1600 y cuantificar la cantidad total de enzima contenida en Novozym® 435 por medio de la técnica del ácido bicinconínico como se detalla en la sección 5.9.3. Así, la cantidad total de proteína inmovilizada en Novozym® 435 (Novozymes Brasil, batch LC200217, 72 m²/g) es de 53,3 mg/g catalizador.

Diferentes intentos de cuantificar la enzima desorbida desde Novozym® 435 empleando sulfato de amonio como precipitante de proteínas no tuvieron éxito. Esto probablemente se relaciona con el hecho de que la cantidad reportada de CALB presente en este biocatalizador comercial es de 30 a 55 mg CALB / gramo.

5.8. ANÁLISIS TEXTURAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA MEDIOAMBIENTAL

5.8.1. Microscopio electrónico de barrido: Fundamento

El microscopio electrónico de barrido o SEM, es aquel que utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen. Así, respecto a un microscopio óptico la luz se sustituye por un haz de electrones, las lentes por electroimanes y las muestras se hacen conductoras metalizando su superficie. En base a las características mencionadas, el SEM consiste en uno de los instrumentos más versátiles para el examen y análisis de características microestructurales de objetos sólidos. Una de las razones para ello es su alta resolución (de 20 a 50 Å) y otra característica importante es la apariencia tridimensional de la imagen de la muestra, resultado de su gran

profundidad de foco (aproximadamente 100 veces mayor que la de un microscopio óptico a la misma magnificación) [21].

En el Anexo 4 se detalla el fundamento y funcionamiento de este tipo de microscopios.

5.8.2. Descripción del equipo y metodología utilizada

Se investigó la textura del biocatalizador por medio de un microscopio electrónico de barrido medio ambiental ESEM FEI Quanta 200 en condiciones de bajo vacío (0.98 Torr) y alto vacío. Las muestras fueron preparadas como especímenes ultradelgados mediante la incorporación de las esferas del biocatalizador en resina LR White que luego se polimerizó en estufa a 58 °C por 12 hs. Posteriormente, la resina se seccionó con un micrótopo y las muestras se dispersaron sobre portaobjetos. Las mismas se cubrieron con una película de oro con el objetivo de evitar cargas eléctricas en la superficie.

Imágenes a 400X y 600X de magnificación, de muestras con y sin contacto previo con etanol, fueron tomadas y analizadas con el programa FERImage de modo de obtener la dimensión fractal, D , y el parámetro d_{min} usando el método del variograma [22, 23, 24]. El variograma, empleado para determinar parámetros que caracterizan la rugosidad superficial, consiste en un gráfico de la discrepancia (varianza) de la variación de altura en una superficie para diferentes pasos, como una función de tales pasos y en escala logarítmica. La pendiente del gráfico se relaciona con la dimensión fractal mediante la ecuación: $D=3\text{-pendiente}/2$.

Otra manera de obtener información acerca de rugosidad superficial por medio del variograma es el estudio de textura de las imágenes SEM. En el caso de la dimensión fractal, por ejemplo, los niveles de gris de la imagen digitalizada de una superficie fractal muestra el mismo comportamiento fractal que la superficie original [24].

El variograma presenta un comportamiento fractal a baja escala y un comportamiento que parece tener una tendencia asintótica a alta escala. Sin embargo, si se amplía el eje vertical aparecen máximos y mínimos en las varianzas. Esta región periódica fue

descrita por dos parámetros d_{min} y d_{per} [25]. El parámetro d_{min} también se utilizó en este trabajo para caracterizar la rugosidad de las muestras y se corresponde con el extremo inferior de la región periódica descrita anteriormente. En definitiva, representa la celda de menor tamaño con un peso estadístico suficiente para producir períodos.

5.9. CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS

5.9.1. Procedimiento para la precipitación cuantitativa de proteínas

En general, la precipitación salina de las proteínas se fundamenta en el aumento de la fuerza iónica del medio. En este sentido, el agregado de una gran cantidad de sal a una solución de proteínas disminuye la interacción proteína- H_2O (desaparece la capa de solvatación) lo que conlleva al predominio de la interacción proteína-proteína y a la consecuente precipitación de las mismas. La concentración salina a la que se produce la precipitación no es igual para todas las proteínas, lo que permite usar esta propiedad para la separación y purificación de proteínas particulares a partir de mezclas complejas. Comúnmente se utiliza sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$ para tal fin, a causa de su gran solubilidad (3,9 M a 0 °C en agua, 760 g de sulfato de amonio/1000 ml de agua a una temperatura de 20 °C) y porque el ión sulfato divalente permite alcanzar altas fuerzas iónicas. La adición gradual de ésta sal permite el fraccionamiento de una mezcla de proteínas, las cuales son precipitadas pero no desnaturalizadas [26].

La cuantificación de proteínas por precipitación salina se aplicó a las muestras provenientes de los tratamientos sucesivos de Novozym® 435 con etanol y etanol-agua con el fin de cuantificar la proteína desprendida en tales condiciones. Esta cuantificación no tuvo éxito dado que no se observó precipitación.

Por otro lado, la concentración de lipasa B de *Candida Antarctica* (Lipozyme batch LCN02102) de la muestra proporcionada por Novozymes Brasil se determinó mediante

la precipitación y pesada de la cantidad total de proteína. A un volumen conocido de muestra (1,00 ml) se agregaron gota a gota 2,00 ml de solución saturada de sulfato de amonio a 4 °C y se mantuvo durante toda la noche a esa temperatura. El precipitado se centrifugó durante 30 minutos a 9600g, se secó bajo vacío a temperatura ambiente y se pesó. El sulfato de amonio que co-precipitó con las proteínas se determinó a través de la precipitación de los iones sulfato con BaCl₂ 5%. El precipitado se filtró, lavó, secó y calcinó en mufla a 800 °C hasta peso constante.

Estas operaciones permitieron establecer que el extracto crudo de CALB posee 201,8 mg/ml de “proteína precipitable”.

La cuantificación por precipitación resultó no confiable debida a la presencia de especies interferentes como ácidos nucleicos, que también precipitarían con sulfato de amonio. Tal interferencia fue evidenciada a través de espectroscopia Uv-Visible, donde el máximo de absorción se localizó en 257 nm y, por electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio (colaboración del Dr. Carlos Llerena-Suster). En este contexto, la cuantificación de proteínas en el producto comercial (grado técnico) fue dejada de lado, y con ello el empleo de este producto como fuente de lipasa para la obtención de curvas de calibración.

5.9.2. Cuantificación de proteínas mediante espectroscopia UV-Visible

5.9.2.1. Espectroscopia UV-Visible: fundamentos – Absorción UV-Vis de proteínas

La absorción de energía en las regiones visibles y ultravioleta del espectro da como resultado una excitación electrónica. La región del visible se extiende desde 350 a 800 nm. La región ultravioleta abarca desde 100 a 200 nm y se divide en dos regiones diferentes: la región de ultravioleta lejano, que se extiende desde 100 a 200 nm y la llamada región del ultravioleta cercano que va desde 200 nm a 350 nm. Los datos espectrales de absorción en el ultravioleta-visible se suelen presentar como gráficas de absorbancia o logaritmo del coeficiente de extinción frente a longitud de onda.

En general las bandas de absorción en las regiones UV-Visible son anchas, dado que cada nivel electrónico de energía está asociado con niveles vibracionales y rotacionales. Así las transiciones de electrones pueden producirse entre cualquiera de los diversos estados vibracionales o rotacionales de un nivel electrónico más alto [27]. En el caso particular de las proteínas, los cromóforos son el enlace peptídico y los residuos aromáticos de triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe). Las características espectrales de dichos cromóforos se muestran en las figuras 4 y 5 [28].

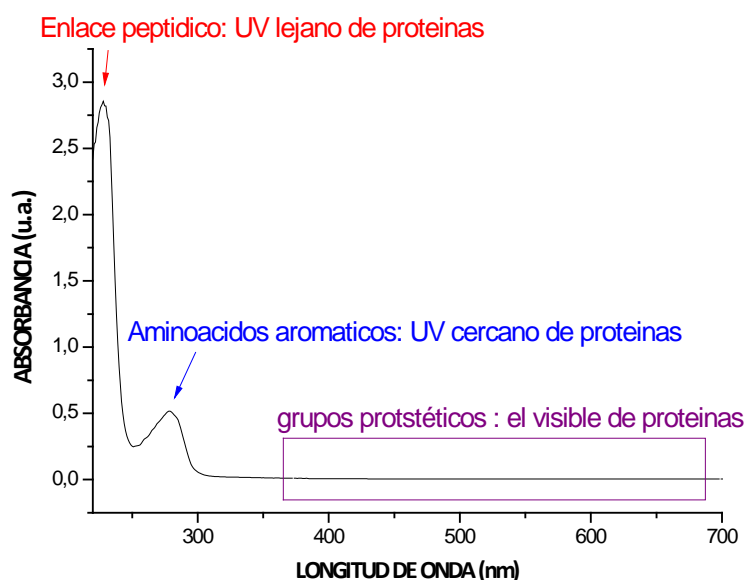
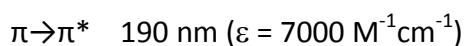


Figura 4. Espectro típico de absorción UV-Vis de proteínas. El espectro mostrado corresponde a Seroalbúmina bovina (Sigma 99% A3059 lot 12640255) en agua destilada.

La absorción de radiación UV asociado al enlace peptídico se debe a las siguientes transiciones electrónicas:



Si bien las cadenas laterales de los aminoácidos aspártico, glutámico, asparagina, glutamina, arginina e histidina absorben radiación de 200 nm, esta queda solapada con la fuerte absorción del enlace peptídico.

Cabe destacar que si bien la zona del espectro descrita previamente corresponde a la máxima absorción de luz UV para proteínas, no es la zona del espectro utilizada para el estudio de las mismas, debido esto a la presencia de múltiples interferencias en torno a los 200 nm. La zona del espectro UV más útil para el estudio de proteínas corresponde a la zona centrada en 280 nm, donde se minimizan interferencias asociadas a la presencia de otras sustancias y se tiene una importante absorción de luz por parte de los aminoácidos aromáticos como se muestra en la figura 5.

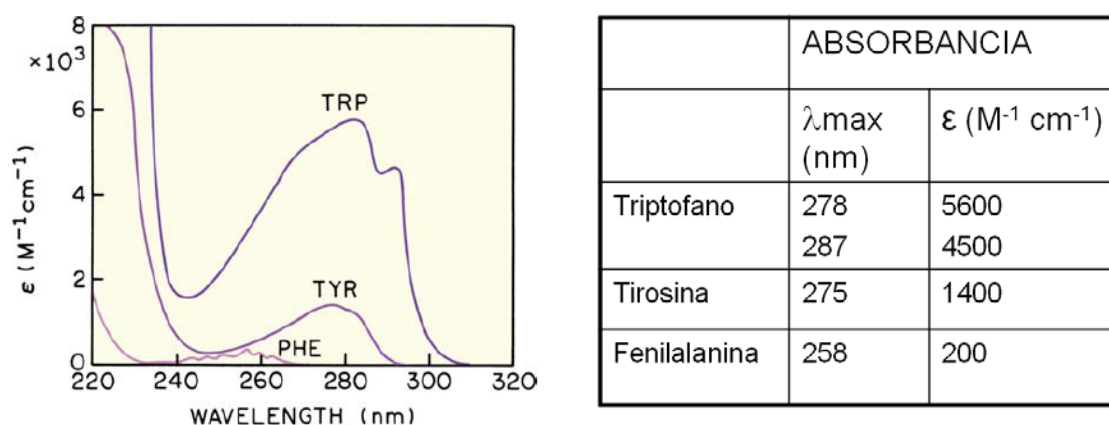


Figura 5. Absorción UV-Vis de aminoácidos aromáticos. Los aminoácidos se encuentran en cantidades equimolares y condiciones idénticas [28]

Dado que las concentraciones de estos aminoácidos es francamente constante en proteínas la absorción en 280 nm se emplea en la estimación de la concentración de proteínas según la Ley de Lambert-Beer. En esta aproximación se fundamenta el empleo de seroalbúmina bovina como proteína de referencia en la cuantificación de proteínas por espectroscopia UV-Visible. Si no se aplica tal aproximación, dado que

cada proteína posee una determinada composición aminoacídica debe determinarse su coeficiente de absorptividad molar según la siguiente expresión [29]:

$$\epsilon \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)} = 5500 \times n^{\circ} \text{ Trp} + 1490 \times n^{\circ} \text{ Tyr} + 125 \times n^{\circ} \text{ SS}$$

$n^{\circ} \text{ Trp}$ = número residuos de triptofano en la secuencia

$n^{\circ} \text{ Tyr}$ = número residuos de tirosina en la secuencia

$n^{\circ} \text{ SS}$ = número de enlaces disulfuro en la proteína

La consideración de los puentes disulfuros en el cálculo del coeficiente de absorptividad molar se debe a la absorción de radiación de los mismos en 250 y 270 nm ($\epsilon = 700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

5.9.2.2. Equipo y metodología utilizada

La espectroscopia UV-Visible se empleó con el fin de hallar la cantidad de proteína desprendida desde Novozym® 435. En este contexto, las absorbancias de los líquidos filtrados (etanol-agua 4,8 % v/v) resultantes de los contactos catalizador-alcohol se estudiaron en el rango de 200-400 nm con un equipo Perkin Elmer Lambda35 empleando cubetas UVette® 220-1600 nm con 1 cm de camino óptico. Los espectros obtenidos mostraron absorbancias muy elevadas a longitudes de onda inferiores a 290 nm con máximos de absorción en 256 nm, 225 nm y 220 nm. Una re-evaluación del reporte de Zhao y Song acerca de las sustancias desprendidas desde Novozym® 435, reveló que existen interferencias en las muestras problema (líquidos producto del contacto etanol-catalizador) debidas a la presencia de sorbato y benzoato que se desprenden desde el catalizador comercial (A máx sorbato: 258 nm, A máx benzoato: 230 nm) [30]. Estas sustancias poseen elevados coeficientes de extinción por lo tanto aunque se encuentren en baja cantidad en las muestras la interferencia es muy importante. En este sentido se prepararon soluciones acuosas de sorbato de potasio

(0,1 % v/v) y benzoato de sodio (0,2 % v/v) y se tomaron los espectros en el rango 200 a 400 nm, evidenciándose tal interferencia.

En base a lo expuesto es que las medidas realizadas de espectroscopia UV-Vis no fueron utilizadas finalmente para la cuantificación de proteína desorbida por efecto del alcohol sobre Novozym® 435, empleándose la cuantificación por técnica del ácido bicinconínico para tal fin.

5.9.3. Ensayo del ácido bicinconínico

5.9.3.1. Fundamento

El método de cuantificación de proteínas con ácido bicinconinico se basa en el poder reductor de las proteínas que provoca la reducción de iones cúpricos a cuprosos en medio alcalino (reacción de biuret) [27, 31]. Los iones cuprosos resultantes reaccionan con el ácido bicinconinico (originalmente de color verdoso) formando un complejo de color morado. El color es proporcional al contenido proteico de la muestra.

Este método de cuantificación de proteínas es sencillo, rápido, muy sensible y presenta gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos, como altas concentraciones de sales y detergentes iónicos y no iónicos (SDS, tritón X-100). Así mismo, posee menor variabilidad entre proteínas respecto a otros métodos de cuantificación de las mismas.

Como desventajas de este método pueden mencionarse:

- La lectura de absorbancia debe realizarse rápidamente es un parámetro a controlar.
- La interferencia de compuestos reductores (DTT, B-mercaptoetanol, glucosa, ácido ascórbico) y de sulfato de amonio en alta concentración.

En nuestro caso particular podemos mencionar que altas concentraciones de etanol en el medio dan lugar a respuestas no reproducibles de este método.

5.9.3.2. Metodología empleada

- Cuantificación de proteína total inmovilizada en Novozym® 435 por técnica de ácido bicinconinico. Calibración BSA en Tritón X-100/dimetilsulfóxido

El método de BCA implica la preparación de tres soluciones acuosas denominadas A, B y C. La solución A contiene 0,4000 g de BCA (Fluka \geq 90%), 0,8000 g de Na_2CO_3 (Mallinckrodt), 0,1630 g de NaHCO_3 (Anedra), 0,1581 g de NaOH (Carlo Erba \geq 97%) y 0,0641 g de tartrato dibásico de sodio dihidratado (Fluka \geq 99%) en 40 ml de agua destilada. La solución B consiste en una solución 4 % p/v de CuSO_4 y la solución C es una mezcla de las soluciones A y B en una relación de 100/2 (v/v) (en este caso particular, la solución C se corresponde con 30,00 ml de solución A y 0,60 ml de solución B, y se prepara justo antes de la cuantificación).

Las soluciones estándar para las curvas de calibración se prepararon con seroalbúmina bovina (Sigma 99% A3059 lot 12640255). La solución acuosa de partida conteniendo 1 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA) se diluyó a 0,1 mg/ml en una mezcla 35 % v/v DMS: 1,75 % v/v Tritón X-100: 30 % v/v agua (composición igual a la mezcla de solventes resultante de la extracción de la proteína total desde Novozym® 435). Las soluciones de calibración se prepararon tomando un volumen apropiado de la solución 0,1 mg/ml de BSA y diluyendo con la mezcla DMS-TX 100. Posteriormente, a 100 μl de cada solución se añadió 1,00 ml de la solución C y se incubó a 60 °C durante 10 minutos (cada solución se preparó por duplicado). Las mezclas se dejaron enfriar y luego se midió la absorbancia a 562 nm en un equipo Perkin Elmer Lambda35 empleando cubetas UVette® 220-1600 nm con 1 cm de camino óptico. La curva de calibración se realizó en un intervalo de concentración desde 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 83 $\mu\text{g}/\text{ml}$, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$A_{562 \text{ nm}} = 0,0367 * \text{Proteína } (\mu\text{g}/\text{ml}) + 0,0173 \quad r^2 = 0,965$$

- Técnica de ácido bicinconínico en medio etanólico

Con el objetivo de cuantificar la proteína desprendida desde Novozym® 435, el método descrito en la sección precedente se realizó de forma equivalente en medio etanólico, la única diferencia consistió en emplear etanol-agua 4,8 % v/v como medio, es decir como solvente, para realizar las diluciones de las soluciones de calibración, en reemplazo de la matriz de Tritón X-100/DMS empleada en el ítem anterior. Fue imposible obtener resultados reproducibles en las cuatro experiencias sucesivas realizadas.

A partir de estos hallazgos se decide realizar un cambio de medio previo a la cuantificación por esta misma técnica de modo de llevar a cabo la cuantificación en medio acuoso donde convencionalmente se realizan las cuantificaciones de proteínas por diversas técnicas.

- Cuantificación de proteína desprendida desde Novozym® 435. Calibración con lipasa B de *Candida antarctica* en agua destilada

En este contexto se decide llevar a cabo la cuantificación de proteínas por medio de la técnica de ácido bicinconínico empleando una curva de calibración (figura 6) realizada a partir de la lipasa B de *Candida antarctica* de alta pureza (35,500 g/mol) comprada a Sigma Aldrich Argentina (10.9 U/mg). La calibración se realizó en agua destilada. Inicialmente se obtuvo una solución de CALB Sigma (0,0044 g) en agua destilada (4,00 ml). La verdadera concentración de esta solución se obtuvo a partir de su valor de absorbancia a 280 nm (A^{280}) y del coeficiente de extinción de esta enzima ($\epsilon^{280}_{CALB} = 41285 \text{ M}^{-1}$) según la ecuación de Lambert-Beer: $A^{280} = \epsilon^{280} \cdot b \cdot C$. Así, la concentración de esta solución de partida resultó ser 0,1956 mg/ml. Posteriormente fueron obtenidas distintas soluciones de calibración por su dilución con agua destilada. De todas las soluciones de calibración fueron obtenidos los espectros UV-Visible y posteriormente se aplicó la reacción con bicinconínico. En este sentido, 170 μl de la

solución de calibración se hizo reaccionar con 1,70 ml de reactivo de trabajo (solución C) durante 10 minutos a 60 °C. Las mezclas se dejaron enfriar y luego se midió la absorbancia a 562 nm en un equipo Perkin Elmer Lambda35 empleando cubetas UVette® 220-1600 nm con 1 cm de camino óptico. La figura 6 muestra la recta de calibración obtenida. Cabe destacar que las distintas soluciones (A, B y C) que involucra la técnica de BCA fueron preparadas en el momento de realizar la cuantificación, empleando los reactivos y las proporciones previamente detalladas al inicio de esta sección.

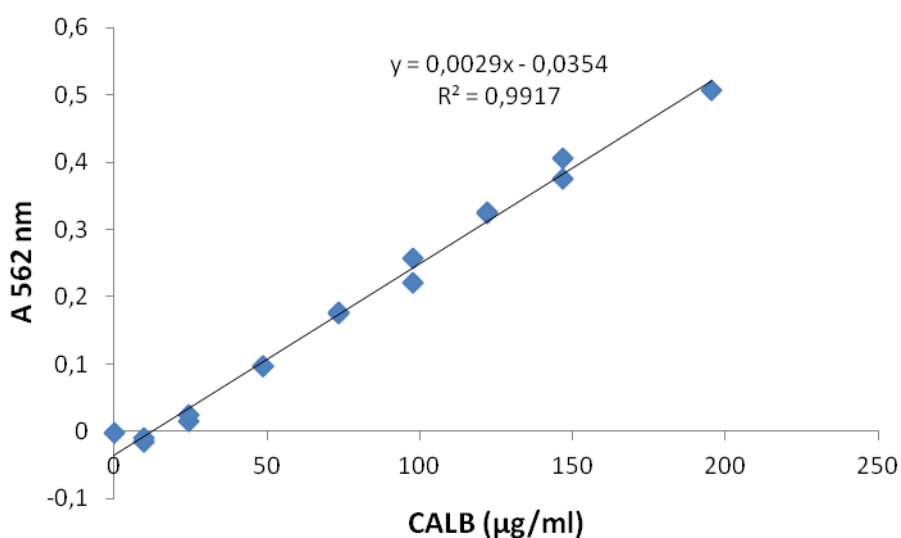


Figura 6. Curva de calibración técnica de ácido bicinonínico CALB (alta pureza)-agua destilada

La matriz de las muestras original es alcohólica, razón por la cual el líquido proveniente del tratamiento de Novozym® 435 (1,0000 g) con etanol (10,00 ml), 4,76 % v/v de agua, durante 8 días a 45 °C y 200 rpm se llevaron a sequedad y los residuos sólidos resultantes se resuspendieron en 3,00 ml de agua. Una alícuota de 0,50 ml se separó para su análisis por SDS-page y el volumen restante se filtró a través de filtros de nylon de 0,45 µm. Posteriormente se realizó la cuantificación de proteínas por técnica de BCA y una nueva electroforesis desnaturizante (SDS-page).

Respecto a la reacción con BCA, una alícuota de 170 µl de muestra filtrada se hace reaccionar con 1,70 ml de reactivo de trabajo durante 10 minutos en un baño a temperatura controlada de 60 °C (la reacción se realiza por duplicado). Posteriormente se midió la absorbancia a 562 nm en un equipo Perkin Elmer Lambda 35 empleando cubetas UVette® 220-1600 nm con 1 cm de camino óptico.

En base a los hallazgos de interferencias espectroscópicas mencionados previamente se decide evaluar si las especies benzoato y sorbato interfieren en ésta técnica para tal fin se prepararon soluciones de sorbato (0,1 % p/v) y benzoato (0,2 % p/v) en agua y se analizaron paralelamente a la muestra problema y soluciones de calibración. Las concentración de las soluciones corresponden a la concentración de dichos componentes en la lipasa comercial Lipozyme batch LCN02102. Así se evidenció que estas sustancias no interfieren dando validez a la cuantificación de proteínas llevada a cabo.

5.10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. CAPÍTULO 5.

- [1] Tan T., Lu J., Nie K., Deng L., Wang F., *Biotech. Adv.* 2010, 28, 628–634.
- [2] Fjerbae L., Christensen K.V., Norddahl B., *Biotech. Bioeng.* 2009, 102, 1298–1315.
- [3] Lai C-C., Zullaikah S., Vali S.R., Ju Y-H., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2005, 80, 331–337.
- [4] Chang H-M., Liao H-F., Lee C-C., Shieh C-J., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2005, 80, 307–312.
- [5] Arroyo M., Siniesterra J.V., *J. Org. Chem.* 1994, 59, 4410–4417.
- [6] Won K., Hong J., Jim K., Moon S., *Process Biochem.* 2006, 41, 264–269.
- [7] Zhang H-Y., Wang X., Ching C-B., *Chirality* 2007, 19, 245–249.
- [8] Maugard T., Tudella J., Legoy M.D., *Biotech. Prog.* 2000, 16, 358–362.
- [9] Santos J.C., Bueno T., Molgero P.C., Ros D., de Castro H.F., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2007, 82, 956–961.
- [10] Patel R.N., *Coord. Chem. Rev.* 2008, 252, 659–701.

- [11] Foresti M.L., Galle M., Ferreira M.L., Briand L.E., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2009, 84, 1461–1473.
- [12] a) Arroyo M., *Ars Pharmaceutica* 1998, 39:2, 23-39.
b) Perez-Victoria Moreno de Barreda I., Tesis doctoral “Acilaciones regioselectivas de oligosacáridos catalizada por enzimas: caracterización y propiedades de los productos”, 2006, Universidad de Granada, Granada, España.
- [13] Heinsman N.W.J.T., Schroën C.G.P., van der Padt A., Franssen M.C.R., Boom R.M., van’t Riet K, *Tetrahedron Asymm.* 2003, 14, 2699–2704.
- [14] Briand L.E., Gambaro L.A., *Appl. Catal A: Gen.* 2004, 256, 151-159.
- [15] a) Barth A., *Biochimica et Biophysica Acta- Bioenergetics* 2007, 1767, 1073-1101.
b) Skoog D.A., Holler F.J., Cruch S.R., Principios de Análisis instrumental, 6° edición, 2008, ISBN-13: 978-970-686-829-9, ISBN-10:970-686-829-1, Cengage learning editores, México.
- [16] Ryczkowski J., *Catal. Today* 2001, 68, 263-381.
- [17] Conley R.T., Espectroscopia infrarroja, 1979, 2° ed., Editorial Alhambra S.A., Madrid, España.
- [18] Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruyschaert J.M., *Subcell. Biochem.* 1994, 23, 405–450.
- [19] Llerena-Suster C.R., José C., Collins S.E., Briand L.E., Morcelle S.R., *Process Biochem.* 2012, 47, 47-56.
- [20] Chen B., Hu J., Miller E.M., Xie W., Cai M., Gross R.A., *Biomacromolecules* 2008, 9, 463–471.
- [21] Bonetto R. D., Tesis doctoral “Determinación de parámetros físicos de señales provenientes del microscopio electrónico de barrido”, 2000, Universidad de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Física, La Plata, Argentina.
- [22] Bianchi F.D., Bonetto R.D., *Scanning* 2001, 23, 193–197.[23] Ladaga J.L., Bonetto R.B., *Advances in Imaging and Electron Physics* 2003, 120, 135–191.[24] Pentland A.P., *IEEE Trans. Pattern. Anal. Mach. Intell* 1984, 6, 661–674.[25] Bonetto R.D., Ladaga J.L.,

Scanning 1998, 20, 457–463. [26] Voet D., Voet J.G., *Biochemistry*, 2011, 4° ed., ISBN 13 978-0470-57095-1, 13 978-0470-91745-9, John Wiley & Sons, EEUU.

[27] Noble J.E., Bailey M.J.A., capítulo 8: “Quantitation of proteins” de *Methods in Enzymology*, 2009, vol. 463, 73-95. *Guide to Protein Purification*, 2° ed., R.R. Burgess and M.P. Deutscher, ISBN: 978-12-374536-1.

[28] Nelson D.L., Cox M.M., *Lehninger-Principios de Bioquímica*, 2008, 5° ed., ISBN-13: 978-0-7167-7108-1, ISBN-10: 0-7167-7108-X. W.H. Freeman and Company, New York, EEUU.

[29] Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T., *Prot. Sci.* 1995, 4, 2411-2423.

[30] Zhao H., Song Z., *Biochem. Eng. J.* 2010, 49, 113–118.

[31] www-thermoscientific.com/pierce

CAPITULO 6

EFFECTO DEL ETANOL Y ETANOL-AGUA EN EL BIOCATALIZADOR COMERCIAL NOVOZYM® 435. RESULTADOS Y DISCUSION

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos al llevar a cabo la estrategia descrita en el capítulo anterior, seguidos de la discusión de los mismos y las conclusiones extraídas.

6.1. ADSORCIÓN DE (R/S)-IBUPROFENO SOBRE NOVOZYM® 435

En la figura 1 se presenta la adsorción de S(+)-ibuprofeno y R(-)-ibuprofeno sobre Novozym® 435 como función del tiempo. El biocatalizador fue puesto en contacto con una solución de ibuprofeno racémico en etanol a diferentes temperaturas por un período de tiempo prolongado. En general, las cantidades adsorbidas en estos experimentos se encuentran por encima de la desviación estándar del procedimiento lo cual asegura que las cantidades adsorbidas no corresponden a errores del método (ver Anexo 3).

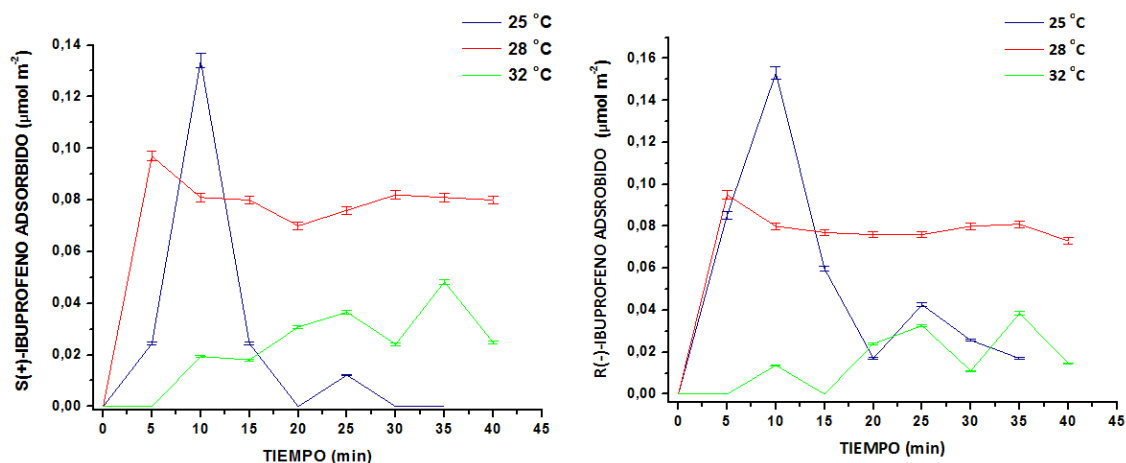


Figura 1. Cinética de la adsorción de S(+)-ibuprofeno (izquierda) y R(-)-ibuprofeno (derecha) sobre Novozym® 435 a 25 °C, 28 °C y 32 °C. Condiciones de operación: 80-100 mg de biocatalizador; 20,6 ml de 60 ppm de R/S-ibuprofeno en etanol.

La adsorción de ibuprofeno sobre Novozym® 435 se incrementa a 25 °C en los primeros 10 minutos de contacto y lentamente desorbe indicando una fisisorción débil

(el experimento se realizó tres veces con los mismos resultados). Una adsorción irreversible de S(+) y R(-) ibuprofeno es detectada a 28 °C, mientras que a 32 °C la cantidad de ibuprofeno adsorbida disminuye abruptamente a unos 0,01 $\mu\text{mol m}^{-2}$. Este comportamiento no puede atribuirse a reacción superficial de ibuprofeno con etanol dado que el análisis por HPLC evidencia la ausencia de productos de reacción a las temperaturas estudiadas. En las secciones siguientes se presentan otros experimentos que otorgan las claves para entender las observaciones realizadas en la cinética de adsorción.

6.2. DISOLUCIÓN DEL SOPORTE DE NOVOZYM® 435 POR CONTACTO CON ETANOL

El efecto de la cantidad de alcohol (con y sin agua agregada) sobre Novozym® 435 fue investigada variando la relación entre la cantidad de biocatalizador y volumen de etanol, la temperatura y el tiempo de contacto como se describió en la sección 5.5. En este contexto las figuras 2 A y 2B comparan el espectro infrarrojo de la enzima comercial CALB de Sigma Aldrich, Novozym® 435 (antes del contacto con el alcohol), la resina Lewatit VP OC 1600 y los sólidos recuperados luego de llevar a sequedad el medio líquido que tuvo contacto con el biocatalizador.

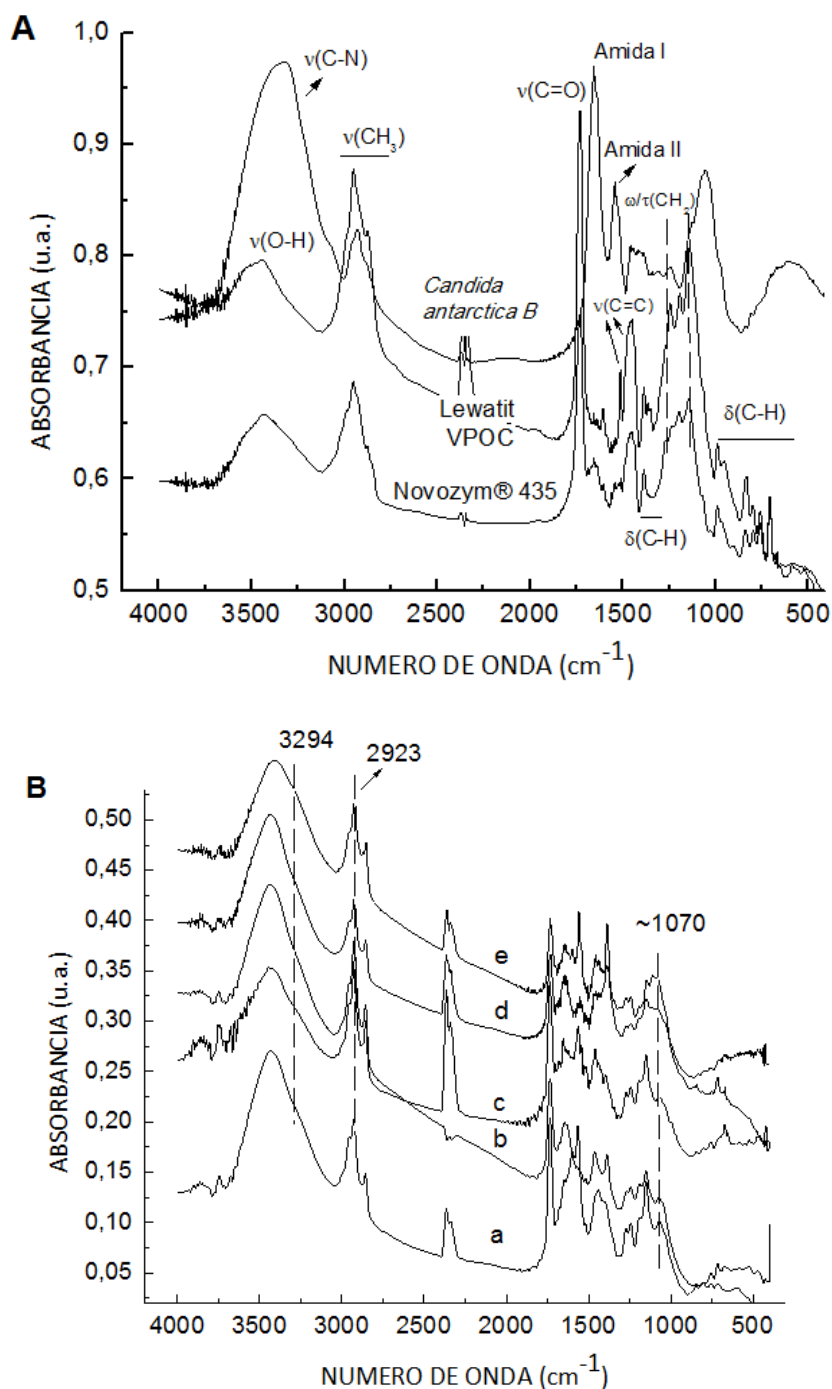


Figura 2. (A) Espectro IR de Novozym® 435, resina macroporosa Lewatit VP OC1600 y lipasa B de *Candida antarctica* (CALB). **(B)** Espectro IR de sólidos recuperados desde el medio líquido luego del contacto etanol-Novozym® 435. (a), (b) y (c) corresponde al primer, segundo y tercer tratamiento de Novozym® 435 con de etanol en una relación 12mg/ml por 40 min a 28 °C. Los espectros (d) y (e) corresponden a sólidos

recuperados luego del tratamiento de 100 mg de Novozym® 435 con 1,00 ml de etanol-agua (4,76 % v/v) por 40 min 28 °C y 48 hs a 45 °C, respectivamente.

Particularmente la figura 2B muestra los sólidos recuperados luego de tres experimentos consecutivos donde se pusieron en contacto 1,1800 g de Novozym® 435 con 100,00 ml de etanol absoluto (relación 12:1 mg/ml), junto con los sólidos recuperados luego del contacto de 100,0 mg del biocatalizador con 1,00 ml de etanol (relación 100:1 mg/ml) conteniendo 4,76 % v/v de agua destilada a temperatura ambiente por 40 minutos y a 45 °C por 48 horas.

Adicionalmente, la Tabla 1 resume las posiciones de las bandas y las asignaciones de las señales de infrarrojo.

Tabla 1: Resumen de la naturaleza de grupos orgánicos y las correspondientes señales de infrarrojo detectadas en Novozym® 435, Lewatit VP OC, lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) y sólidos recuperados luego del contacto de Novozym® 435 con etanol

	$\nu(\text{O-H})$	$\nu(\text{C-N})$	$\nu(\text{CH}_3)$	$\nu(\text{C=O})$	Amida I	Amida II	Anillo aromático $\nu(\text{C=C})$
CALB		3331 cm^{-1}	2928 cm^{-1}		1653 cm^{-1}	1540 cm^{-1}	
Lewatit VP OC	3436 cm^{-1}		2950 cm^{-1} ; 2875 cm^{-1}	1731 cm^{-1}			1510 cm^{-1} 1454 cm^{-1}
Novozym 435	3436 cm^{-1}		2950 cm^{-1} ; 2875 cm^{-1}	1729 cm^{-1}	1656 cm^{-1}		1459 cm^{-1}
Sólidos recuperados	3425 cm^{-1}		2964 cm^{-1} ; 2864 cm^{-1}	1733 cm^{-1}	1644 cm^{-1}	1558 cm^{-1}	1456 cm^{-1}

	$\delta_{\text{as}}(\text{C-H})$	$\delta_{\text{s}}(\text{C-H})$	$\omega(\text{CH}_2)$ $\tau(\text{CH}_2)^{\text{a}}$	$\delta(\text{C-H})^{\text{b}}$ fuera del plano
CALB				
Lewatit VP OC	1387 cm^{-1}	1361 cm^{-1}	1269–1145 cm^{-1}	991, 969 (s), 834, 800, 757, 709 cm^{-1}
Novozym 435	1387 cm^{-1}	1361 cm^{-1}	1269–1145 cm^{-1}	996, 966 (s), 840, 798, 763, 704 cm^{-1}
Sólidos recuperados	1387 cm^{-1}		1271–1147 cm^{-1}	716, 672 cm^{-1}

^a $\omega(\text{CH}_2)$ y $\tau(\text{CH}_2)$

^b flexión fuera del plano de grupos C-H aromáticos

El espectro IR de CALB posee una intensa señal centrada en 3331 cm^{-1} debido a las vibraciones de estiramiento de enlaces $\nu(\text{N-H})$ que se superponen a las vibraciones de estiramiento de los enlaces $\nu(\text{O-H})$ [1]. Adicionalmente las lipasas poseen intensas bandas amida I y amida II centradas en 1653 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} , respectivamente [1, 2]. La señal de infrarrojo conocida como amida I surge de la vibración de tensión del carbonilo, $\nu(\text{C=O})$, del backbone de las proteínas. Esta vibración no es afectada por la naturaleza de las cadenas laterales de aminoácidos pero sí es influenciada por la estructura secundaria de las proteínas. La señal de infrarrojo llamada amida II se atribuye a la combinación de vibraciones de flexión en el plano y fuera del plano del enlace N-H con la vibración de tensión del enlace C-N de las proteínas.

El soporte Lewatit VP OC1600 posee una intensa señal a 1731 cm^{-1} debida a la vibración de tensión de los grupos carbonilos del polimetilmetacrilato (PMMA) $(\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_n\text{-CO-O-CH}_3$ [3, 4]. Además, se observan las intensas señales debidas a la tensión simétrica y asimétrica de grupos metilos (2950 cm^{-1} y 2875 cm^{-1} , respectivamente) junto con vibraciones de flexión simétrica y asimétrica (de intensidad débil) de los mismos grupos (1387 cm^{-1} y 1361 cm^{-1} respectivamente) [5]. Estas últimas dos señales son características de las vibraciones de enlaces C-H de grupos metilos y metilenos unidos a un átomo de carbono terciario tal como se encuentran en el PMMA (ver figura 9 para detalle de la estructura molecular). El conjunto de señales intensas observadas en el rango de números de onda desde 1269 cm^{-1} a 1145 cm^{-1} son características de vibraciones de los grupos metileno. La resina PMMA también posee divinilbenceno como agente de reticulación. La presencia de esta sustancia se evidencia a través del doblete de mediana intensidad en 1510 cm^{-1} y 1454 cm^{-1} debido a vibraciones de tensión de enlaces $\nu(\text{C-C})$ en el anillo aromático. Además el grupo de señales débiles que se observan desde 834 cm^{-1} a 709 cm^{-1} es característico de vibraciones de flexión fuera del plano del enlace $\delta(\text{C-H})$ en bencenos alquil sustituidos [4, 5].

La resina PMMA no posee especies O-H, por lo tanto la señal ancha de intensidad media a 3436 cm^{-1} puede ser atribuida a moléculas de agua adsorbidas.

El biocatalizador comercial Novozym® 435 posee tanto señales que corresponden a CALB (una señal débil que corresponde a la amida I se observa en 1656 cm^{-1}) como señales que corresponden a la resina macroporosa como se esperaba (ver tabla 1).

La figura 2B muestra el espectro infrarrojo de los sólidos recuperados desde el medio orgánico luego del contacto con Novozym® 435 bajo varias condiciones (diferentes temperaturas, cantidad de etanol, con y sin agua agregada y tiempo de contacto como se describió previamente). Los sólidos recuperados muestran señales de infrarrojo compatibles tanto con la enzima CALB como con especies de la matriz macroporosa según la similitud de las señales de IR de estos tres sistemas (ver tabla 1), por lo tanto se puede concluir la presencia de estas especies en los sólidos recuperados. Adicionalmente, el análisis de infrarrojo indica la presencia de moléculas de etanol adsorbidas incluso cuando el alcohol se dejó evaporar antes del análisis de las muestras (señales indicadas en la figura 2B). La señal observada como un hombro en 3294 cm^{-1} pertenece a la vibración de tensión del enlace $\nu(\text{O-H})$ del alcohol. Esta señal corresponde a grupos (clusters) de uniones de hidrógeno que se forman entre las moléculas de etanol adsorbidas [6]. La flexión en el plano de especies $\delta(\text{O-H})$ también podría contribuir a la intensa señal observada a 1387 cm^{-1} atribuida anteriormente a la flexión de especies $\delta(\text{C-H})$. Además, las señales en 2923 cm^{-1} y 1070 cm^{-1} corresponden a vibraciones de tensión de los grupos metilo y tensión asimétrica de especies $\nu_{\text{as}}(\text{C-C-O})$ del etanol adsorbido.

La naturaleza de la fase sólida recuperada desde el etanol que tuvo contacto con Novozym® 435 evidencia la disgregación/disolución del biocatalizador expuesto al medio orgánico. Este efecto es independiente de la cantidad de etanol, la adición o no de agua, la temperatura y se produce incluso cuando el biocatalizador está en contacto con etanol un período de tiempo tan corto como 40 minutos. A su vez se comprobó la existencia de disgregación/disolución en ausencia de agitación, evidenciándose que el efecto mencionado se debe a la acción del medio orgánico sobre Novozym® 435, sin interferencias mecánicas del sistema.

La disolución de la resina PMMA ha sido reportada previamente por González-Benito y Koenig y por Schubert y colaboradores [7-9]. Los autores demostraron que el PMMA se disuelve en una mezcla de acetonitrilo/alcohol, CCl₄/alcohol (metanol, etanol y 1-propanol) y mezclas de alcohol-agua, incluso a temperatura ambiente con un velocidad de disolución que aumenta en una forma parabólica con el tiempo de la exposición a los disolventes. El proceso de disolución comienza con el hinchamiento del polímero por el CCl₄ que permite a los alcoholes penetrar en el PMMA. El alcohol interactúa con el PMMA a través de enlaces de hidrógeno hidroxilo-carbonilo y separa las cadenas del polímero. En este contexto, estas observaciones también explican los hallazgos sobre las modificaciones de la textura interior de las esferas de Novozym® 435 como se presenta en las siguientes secciones.

6.3. CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO DEL ETANOL SOBRE NOVOZYM® 435

Los resultados presentados anteriormente proporcionan evidencia de la disgregación/disolución de Novozym® 435 en contacto con etanol, lo que a su vez induce la desorción de proteína del biocatalizador. En este contexto el biocatalizador se trató durante largos períodos de tiempo (cuatro ciclos de 48 hs cada uno) a 45 °C imitando las condiciones de esterificación de ibuprofeno con etanol como reactivo y solvente. La cuantificación de proteínas en dichos tratamientos fracasó tal como se describió en el capítulo 5 (secciones 5.5 y 5.9).

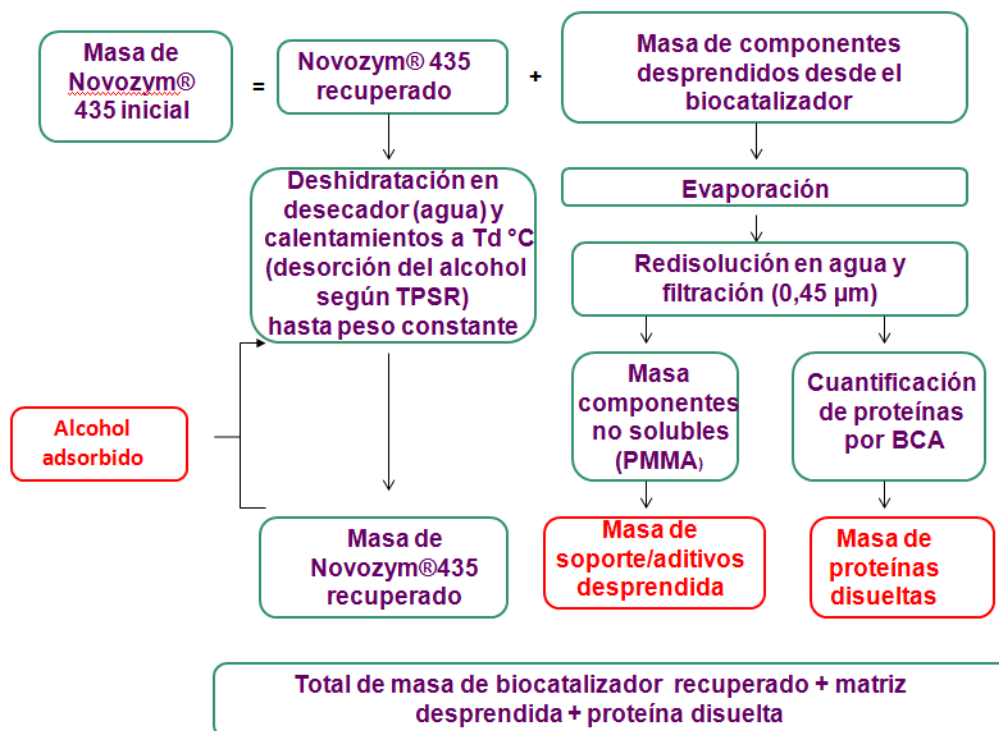
Con el fin de evitar interferencias, el biocatalizador (1,0000 g) fue puesto en contacto con 10,00 ml de etanol- agua (4,76 % v/v) durante ocho días como se describió en la sección 5.5. Pasado ese período de tiempo, el líquido se separó por filtración empleando un filtro de membrana de nylon 0,45 µm con el fin de retener sustancias no solubles como PMMA. Las esferas de catalizador se lavaron cuatro veces con 5,00 ml de etanol por vez y los líquidos de los lavados fueron añadidos al líquido inicialmente separado después del tratamiento de ocho días. Luego se dejó evaporar la fase líquida. Los sólidos retenidos en el filtro de nylon como los sólidos recuperados

por evaporación de la fase líquida fueron suspendidos en una mínima cantidad de agua destilada (3,00 ml). Una alícuota de 0,50 ml se analizó por electroforesis desnaturizante SDS-Page. Luego se realizó una nueva filtración con filtros de nylon de 0,45 μm con el objetivo de separar sustancias no solubles en agua. La cuantificación de proteína desprendida por medio de la técnica de ácido bicinonínico (BCA) y una nueva electroforesis SDS-Page se realizó sobre la fase acuosa filtrada.

Este análisis evidencia que un 2,34 % a 5,30 % de la cantidad total de proteína contenida en Novozym® 435 se desprende al someter el biocatalizador al efecto del etanol durante 8 días de acuerdo a la metodología descrita anteriormente.

El porcentaje de proteína desprendida fue calculado teniendo en cuenta que el valor de proteína total contenida en Novozym® 435 de 53,3 mg/g, valor obtenido mediante el procedimiento detallado en la sección 5.7. Cabe destacar que la cantidad de proteína total en Novozym® 435 determinada a través del método reportado por Gross y colaboradores es similar al contenido de proteína basado en el análisis de HPLC reportado por Halling y colaboradores para Novozym® 435 [10, 11].

Adicionalmente, se determinó la cantidad de alcohol adsorbido a través del calentamiento secuencial de las esferas de catalizador a 150 °C durante 10 minutos, enfriamiento a temperatura ambiente en desecador y pesada. Estos ciclos se repitieron hasta alcanzar un peso constante que aseguró que el etanol fue removido (desorbió) desde las partículas del catalizador. La temperatura elegida para el tratamiento (150 °C) corresponde a la temperatura de desorción del etanol hallada mediante el análisis de TPSR/TPD como se describe en la sección 6.5. Este experimento demostró que Novozym® 435 pierde 16,6 % de su masa inicial y que adsorbe irreversiblemente 0,3881 gr de alcohol por gramo de catalizador al ser expuesto a contacto con etanol a 45 °C durante 8 días. El esquema 1 muestra el balance de masa de los experimentos descritos anteriormente.



Esquema 1. Balance de masa para Novozym® 435 antes y después de estar en contacto con una mezcla etanol-agua 4,76 % v/v.

El análisis por electroforesis SDS-Page se realizó con el fin de obtener una evidencia más del desprendimiento de proteína desde Novozym® 435 y evidenciar la identidad de la proteína desprendida.

Es importante la diferencia hallada al analizar por SDS-Page muestras filtradas y sin filtrar. En ese sentido la muestra sin filtrar muestra una banda correspondiente a un PM de 33 kDa correspondiente a la lipasa B de *Candida antarctica* según los patrones moleculares empleados, mientras que no se aprecia ninguna banda al analizar la muestra filtrada. Sin embargo la técnica de bicinonínico realizada sobre estas mismas muestras evidencia presencia de proteína.

Estos resultados sugieren que, si bien la técnica de BCA permite cuantificar la proteína desprendida desde el catalizador sin interferencias, se está logrando con dicha técnica una semi-cuantificación de la proteína perdida ya que una fracción aún mayor de CALB

se desprende desde Novozym® 435 ligada a restos de soporte, siendo evidenciado esto por SDS-Page de las muestras sin previa filtración. En la electroforesis la liberación de la enzima desde los restos de soporte ocurre durante el pre-tratamiento de la muestra con SDS y β -mercaptoetanol y su liberación permite la migración a través del gel de poliacrilamida.

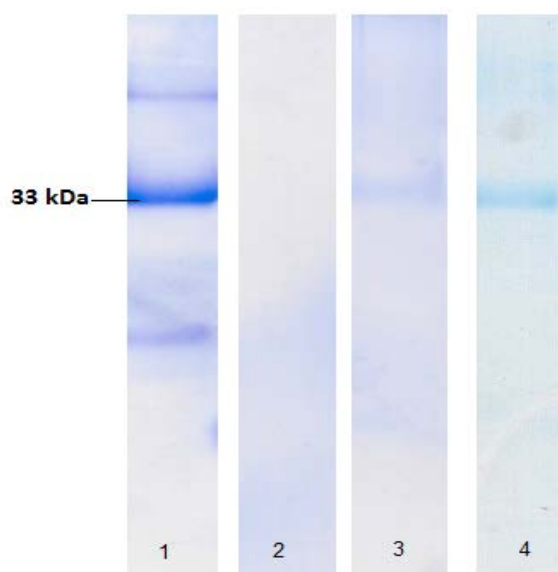


Figura 3. Análisis SDS-Page de: **1**-lipasa B de *Candida antarctica* Sigma Aldrich, **2**- muestra filtrada correspondiente al tratamiento de Novozym® 435 con etanol por 192 hs, **3**- ídem sin filtrar y **4**- muestra sin filtrar proveniente del tratamiento con etanol por 48 hs.

6.4. EVOLUCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA LIPASA B DE *Candida antarctica*

Novozym® 435 también se analizó mediante espectroscopia de infrarrojo con el fin de investigar el efecto del etanol sobre la estructura secundaria de las moléculas de CALB que permanecieron adsorbidas sobre las esferas de catalizador. Las partículas de biocatalizador recuperadas después de cada tratamiento con etanol se dejaron desecar durante cuatro días a temperatura ambiente con el fin de equilibrar su

humedad. Un análisis cuidadoso demuestra que la intensidad y el perfil de la banda amida I del espectro infrarrojo mejoran cuando dicho procedimiento se aplicó debido a la eliminación de las moléculas de agua físicamente adsorbidas.

El análisis del espectro IR de enzimas en la región 1700-1600 cm^{-1} (amida I) proporciona información cualitativa y cuantitativa sobre la estructura secundaria de la proteína [1, 12].

La señal amida I del catalizador Novozym® 435 de partida y luego de varios ciclos de tratamiento con etanol (durante 40 min a 28 °C y durante 48 hs - 192 hs a 45 °C), junto con la señal correspondiente a la lipasa B de *Candida antarctica* pura (como material de referencia) se deconvolucionaron con el fin de obtener evidencias de cambios de estructura secundaria. La tabla 2 muestra los números de onda y las asignaciones de señales que fueron identificadas a través del cálculo de la segunda derivada en la región amida I [1, 2].

Tabla 2. Asignaciones características de las señales de infrarrojo que componen la banda amida I para lipasa B de *Candida antarctica*.

Número de onda (cm^{-1})	Asignación
1618-1622	Agregados intermoleculares
1629-1631	Lámina β
1639-1642	Lámina β ; lámina β antiparalela
1648	Hélice α
1650-1655	Hélice α
1662-1666	Hélice α
1671-1674	giros
1676-1679	giros
1684-1691	Lámina β

La figura 4 compara el porcentaje de contribución de los distintos elementos de la estructura secundaria normalizados respecto de Novozym® 435 para una mejor

visualización de las modificaciones que se producen en la estructura por acción del alcohol. El porcentaje de contribución de la estructura de α -hélice fue obtenido mediante adición de las áreas de las señales que aparecen en el rango 1650 cm^{-1} y 1655 cm^{-1} . De forma similar, la contribución de la lámina β corresponde a la adición de las áreas de señales localizadas en 1629 cm^{-1} - 1639 cm^{-1} y 1684 cm^{-1} - 1691 cm^{-1} . En el cálculo de la contribución de los giros se consideraron las áreas de señales localizadas en 1668 cm^{-1} - 1679 cm^{-1} . De igual manera, las señales localizadas en 1619 cm^{-1} - 1620 cm^{-1} se emplearon en la estimación de la contribución de agregados moleculares.

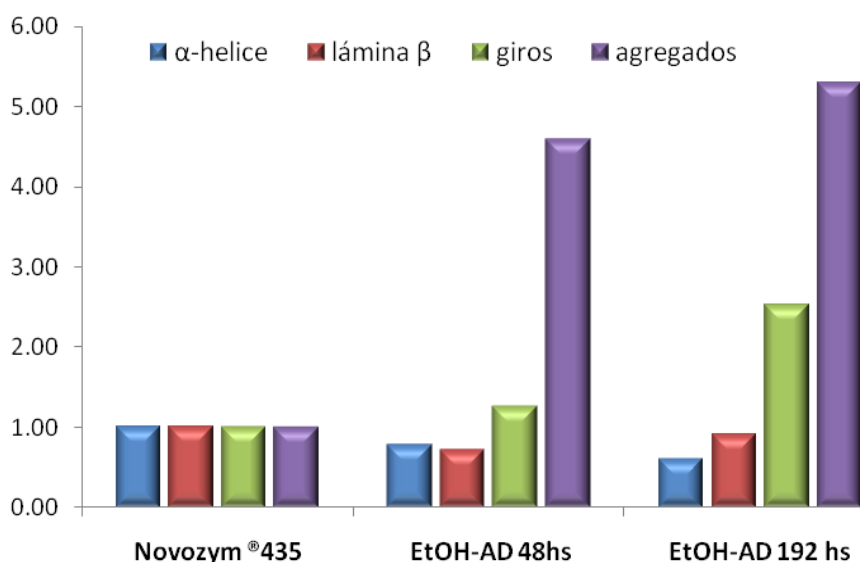


Figura 4. Evolución de la estructura secundaria de Novozym® 435 a las 48 hs y 192 hs de contacto con etanol a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se muestra el contenido de α hélice, lámina β , agregados y giros relativo a Novozym® 435 fresco (inicial).

Así mismo, el contacto con etanol a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ en tres ciclos de 40 minutos produce una gradual disminución de α -hélice e incremento de la lámina β , sin modificaciones importantes en la contribución de agregados y giros a la estructura secundaria.

6.5. INTERACCIÓN SUPERFICIAL DE ETANOL CON NOVOZYM® 435

La interacción de etanol con Novozym® 435 se investigó a través de la adsorción de etanol gaseoso y líquido seguido de reacción superficial a temperatura programada *in situ*. Inicialmente, esta investigación se realizó sobre una muestra de Novozym® 435 sin ningún tratamiento previo. Sin embargo, sorprendentemente no había adsorción de etanol. Por lo tanto, en una segunda etapa se analizó una muestra ya utilizada en la esterificación de R/S-ibuprofeno. La adsorción se realizó con dosis sucesivas de etanol gaseoso a través de las esferas de Novozym® 435 y posterior análisis de la corriente gaseosa en un espectrómetro de masas como se describe en la sección 5.3.

La figura 5 muestra siete pulsos de alcohol luego del contacto con el biocatalizador en función del tiempo. El área (indicada por encima de cada señal) de los pulsos que salen del lecho de biocatalizador aumenta constantemente. Esta observación indica que la superficie del catalizador adsorbe etanol desde el inicio y se satura en la sexta dosis. Además no se detectaron especies como agua, CO, CO₂, lo cual indica que el etanol se adsorbe sin reaccionar en la superficie de Novozym® 435 a 32 °C lo que asegura que los sitios de adsorción superficial no se modifican durante el análisis.

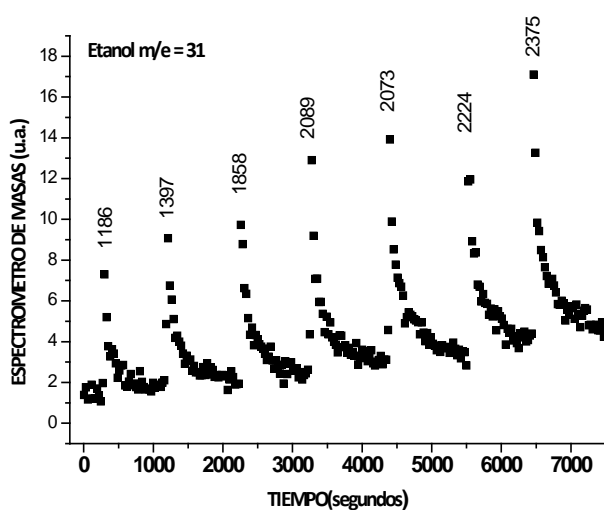


Figura 5. Señales del espectrómetro de masas de varios pulsos de etanol gaseoso (m/e: 31) luego de interactuar con Novozym® 435 previamente usado en la esterificación de ibuprofeno con etanol.

La desorción térmica programada del alcohol adsorbido muestra una amplia señal de desorción de etanol molecular y agua que comienza a los 52 °C (ver $m/e = 31$ en la figura 6). La observación de que ni etileno, ni CO o CO₂ son producidos durante la experiencia es evidencia de que el etanol no reacciona sobre la superficie del biocatalizador.

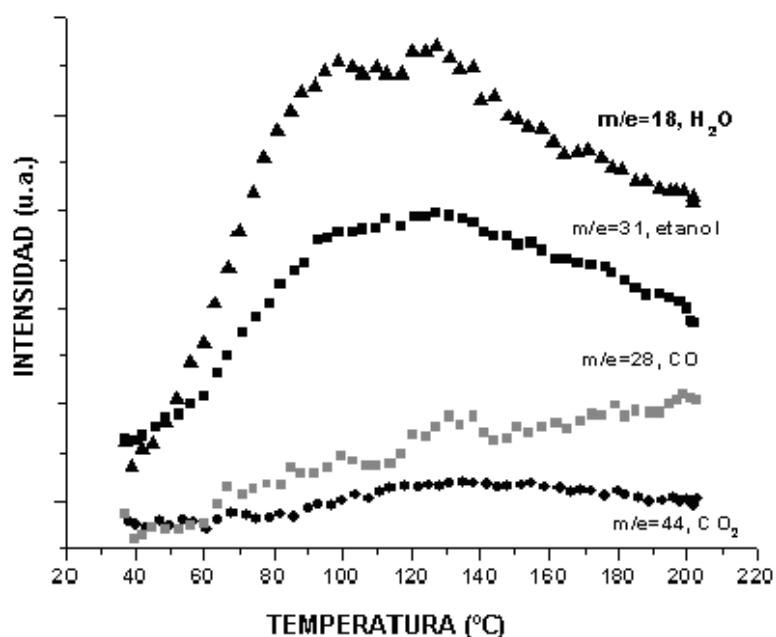


Figura 6. Espectro de desorción térmica programada *in situ* realizada luego de la adsorción de etanol sobre Novozym® 435.

Evidencias adicionales de la fuerte adsorción del etanol se obtuvieron mediante estudios de TPD realizados sobre Novozym® 435 luego de ser tratado repetidamente con etanol en medio líquido como se describió en la sección 5.4. Una vez más el etanol desorbe sin reacción superficial. No obstante el proceso de desorción comienza a 150 °C y muestra un máximo a 184 °C (ver figura 7).

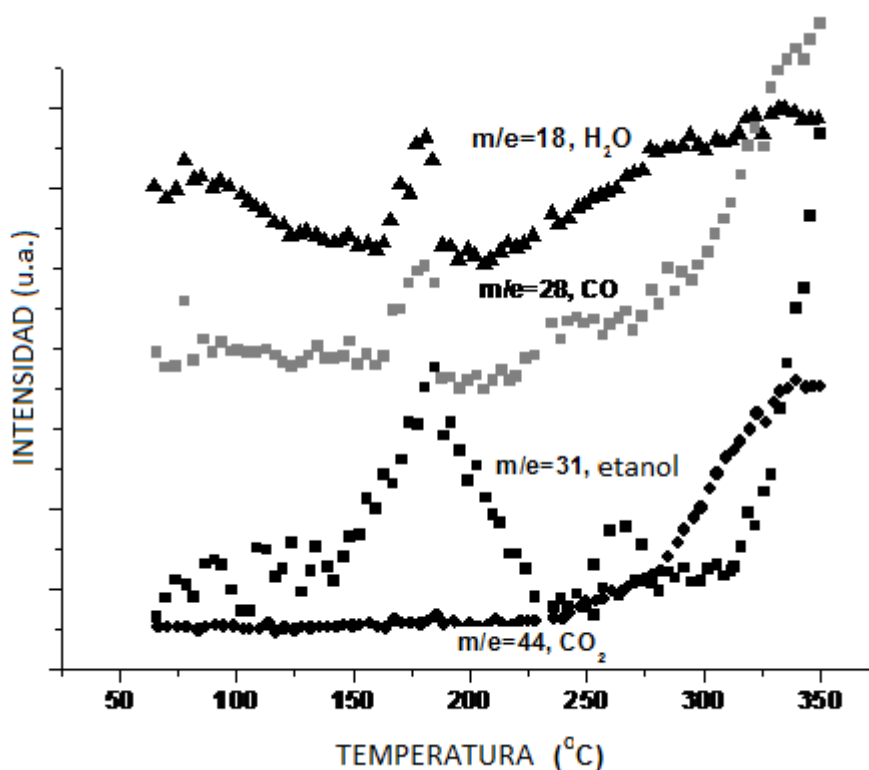


Figura 7. Espectro de desorción térmica programada realizada luego del contacto de Novozym® 435 con etanol líquido a R.T.

Adicionalmente, se realizaron experimentos de desorción térmica (sin adsorción previa del alcohol) sobre Novozym® 435 sin uso previo, y sobre el soporte, Lewatit VP OC1600, con el fin de demostrar de forma inequívoca la detección de etanol molecular en los ensayos descritos anteriormente. Estos experimentos demuestran que las moléculas de agua desorben en diferentes rangos de temperatura: 37-150 °C, 157-207 °C y una tercer desorción comienza a 222 °C y continuó incluso a 400 °C como se observa en la figura 8. Esta desorción de moléculas de agua a altas temperaturas está acompañada de CO y CO₂ y se asignan a la descomposición de aminoácidos y PMMA del soporte (matriz). Esta observación permite confirmar que la señal a m/e =31 observada en el análisis de TPSR a 184 °C corresponde a etanol y no pertenece a la descomposición térmica de CALB ni de PMMA.

Al principio de esta sección se señaló que Novozym® 435 “fresco” (sin uso previo) no adsorbió etanol gaseoso. Sin embargo, la observación de que el catalizador expuesto a etanol líquido y a una mezcla ibuprofeno-etanol desarrolla la capacidad para absorber el alcohol merece un mayor debate basado en la investigación recientemente reportada por Zhao y Song [13]. Los autores identificaron diecisiete sustancias (principalmente glicerol, ácido benzoico, 2-hidroxietil-benzoato, 2-hidroxietil-sorbato y ácido sórbico) que migran desde Novozym® 435 hacia soluciones acuosas, solventes orgánicos (metanol, acetona, acetonitrilo, t-butanol y hexano) y líquidos iónicos. Aunque el origen de estas sustancias no está claro, ellos sugieren que pueden ser introducidos durante la formulación de la enzima y la inmovilización sobre PMMA como preservante o contaminante. Particularmente los ácidos sórbico y benzoico son usados como aditivos durante la polimerización de acrilato. En general, la migración de estos compuestos hacia solventes polares ocurre en 30 minutos a temperatura ambiente. Por lo tanto, teniendo en cuenta estas observaciones, se espera que las muestras expuestas a etanol durante al menos 40 minutos (de acuerdo con el procedimiento realizado en esta investigación) hayan desorbido la mayoría de tales sustancias. Adicionalmente, la presente investigación demuestra que también la resina PMMA se disuelve debido al contacto con etanol. Por lo tanto, la exposición de Novozym® 435 a etanol eliminó todas las sustancias interferentes permitiendo una mayor difusión y posterior adsorción del alcohol en la región interna del catalizador como mostró el análisis de TPSR.

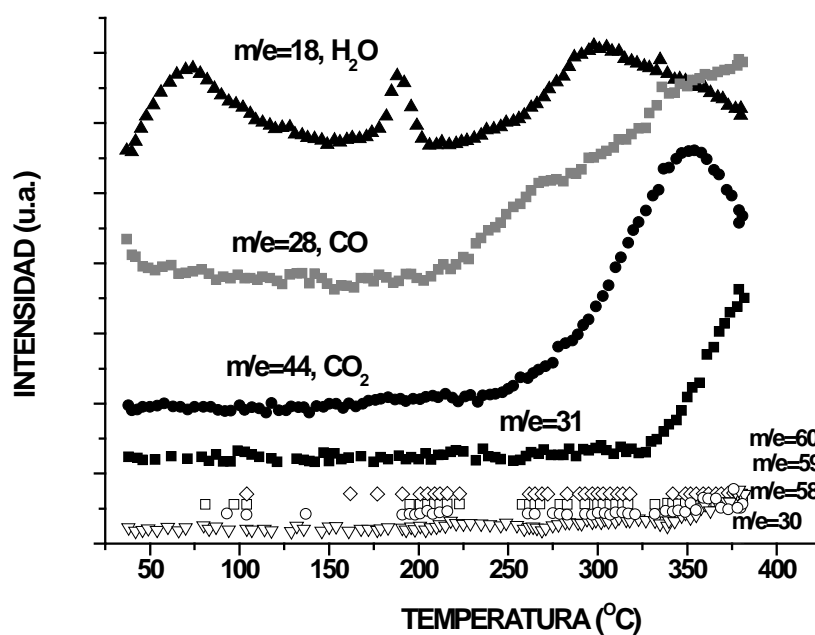


Figura 8. Espectro de desorción térmica programada de Novozym® 435 sin previo uso.

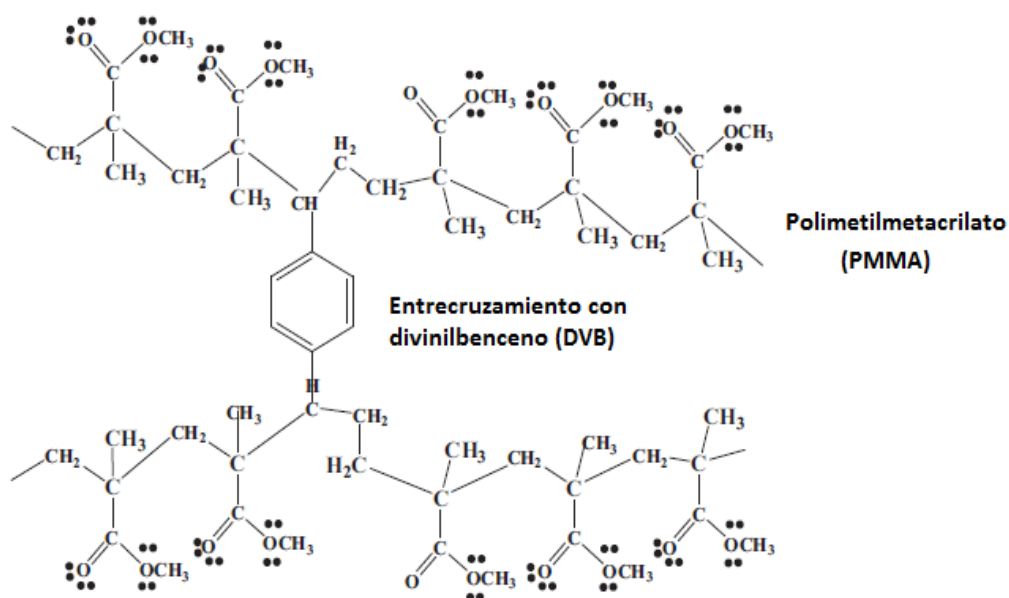


Figura 9A. Estructura molecular del polimetilmetacrilato PMMA entrecruzado con divinilbenceno.

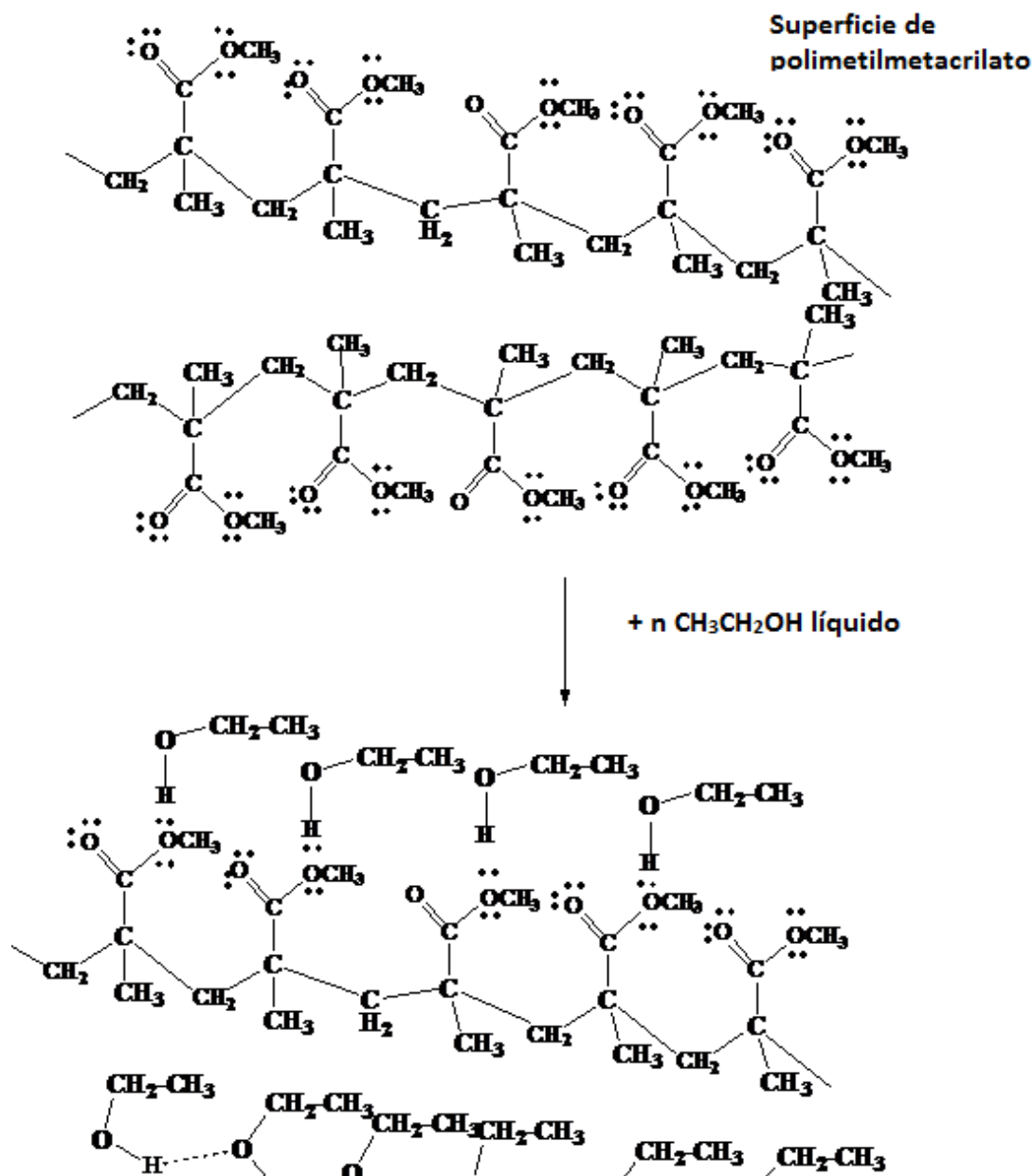


Figura 9B. Representación de la interacción de PMMA con agua y etanol luego de la pérdida de los aditivos.

La figura 9A muestra la estructura molecular del polimetilmetacrilato con el aditivo divinilbenceno utilizado para entrecruzar las cadenas del polímero. La figura 9B representa la interacción de agua y de agua-etanol con la superficie de PMMA luego de la pérdida del aditivo. La ausencia de adsorción inicial de etanol en fase gaseosa indica

la ocupación de sitios de adsorción sobre la resina e incluso la falta de disponibilidad de agua para generar la adsorción de etanol por medio de uniones de hidrógeno. Sin embargo, observando la interacción en fase líquida, la solubilidad relativa de estas especies en etanol líquido hace disponibles muchos sitios de adsorción para el etanol (por unión de hidrógeno al agua y unión hidrógeno a oxígenos del PMMA). Las interacciones hidrofóbicas entre el grupo etilo del etanol y la cadena $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)-$ del PMMA es importante para comprender la alta temperatura a la cual el etanol desorbe desde la superficie. Puede apreciarse en la figura 7 que las señales de desorción del etanol y el agua se encuentran cercanas a los 180 °C. Esta observación podría estar relacionada a una fuerza de unión similar de ambas moléculas cuando están involucradas uniones de hidrógeno como principales interacciones con la superficie o con otras moléculas.

6.6. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA TEXTURA INTERNA Y EXTERNA DE NOVOZYM® 435

Las figuras 10 y 11 muestran micrografías obtenidas con un microscopio electrónico de barrido de esferas de catalizador, enteras y seccionadas transversalmente, antes y después de someterse a contacto con etanol líquido respectivamente.

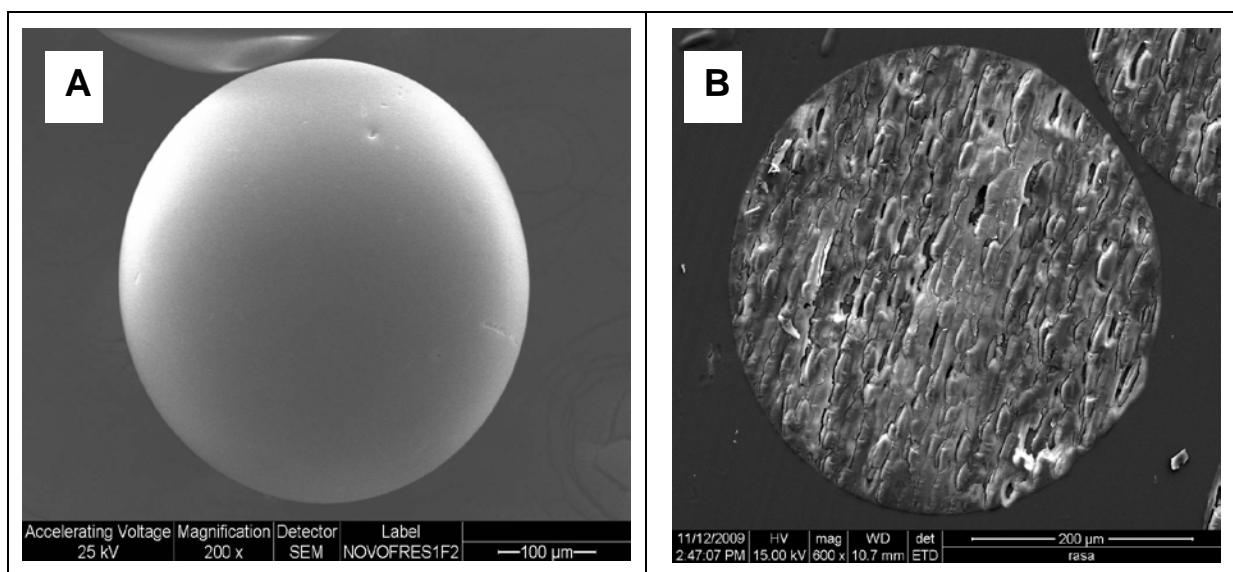


Figura 10. Micrografía SEM de (A) una esfera (magnificación de 200X) y (B) de la sección transversal (600X) de Novozym® 435 antes del contacto con etanol.

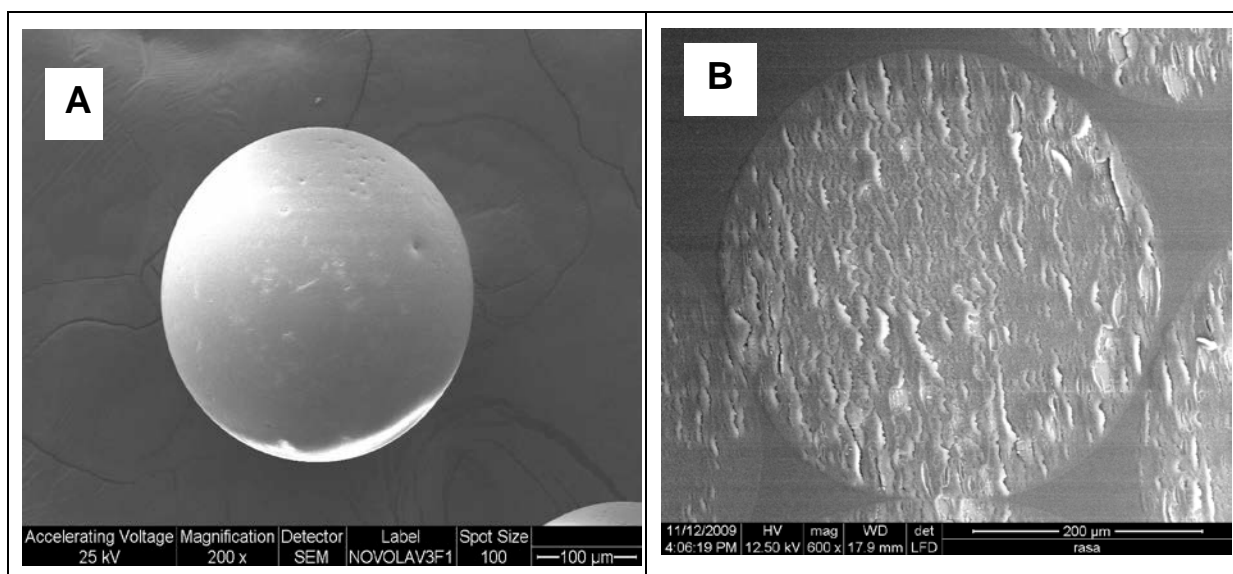


Figura 11. Micrografía SEM de (A) esfera (magnificación 200X) y (B) de la sección transversal (magnificación 600X) de Novozym® 435 luego de someterse a contacto con etanol-agua 4,76 % v/v, a temperatura ambiente.

Observando las figuras 10 A y 11 A se aprecia que la textura externa de las esferas de catalizador expuestas a etanol muestra un evidente rayado superficial comparado con

las esferas que no tuvieron contacto con el alcohol. En este contexto, el etanol afectó también la textura interna de las esferas aunque este efecto no es perceptible a simple vista de las imágenes (ver figuras 10 B y 11 B). Por esta razón, la morfología interna de Novozym® 435 antes y después de la interacción con etanol fue estudiada con el estimador de la dimensión fractal (D) y el parámetro d_{min} , mediante el método del variograma, implementando el programa FERImage [14]. Este programa trabaja con imágenes cuadradas, por lo tanto la porción central de las imágenes correspondientes es típicamente un cuadrado de $132\ \mu\text{m} \times 132\ \mu\text{m}$ o de $84\ \mu\text{m} \times 84\ \mu\text{m}$ dependiendo del tamaño de partícula. Si la imagen es anisotrópica, ambos parámetros, D y d_{min} , no necesariamente serán constantes en diferentes direcciones, por lo tanto, se utilizó un valor promedio de los obtenidos en seis direcciones diferentes, entre 0° y 90° .

Las figuras 12 y 13 muestran ejemplos de gráficos de varianza en función de los pasos en imágenes de cortes transversales de Novozym® 435 antes y después de interactuar con etanol. En este contexto se consideraron cinco imágenes de cinco partículas diferentes en cada caso y sus valores medios e incertidumbres se dan a continuación.

El biocatalizador Novozym® 435 fresco, es decir sin contacto previo con alcohol, posee un $d_{min} = 1,8 \pm 0,2\ \mu\text{m}$ y $D = 2,54 \pm 0,01\ \mu\text{m}$. El contacto con etanol provocó un incremento de ambos estimadores a los siguientes valores, $d_{min} = 2,7 \pm 0,5\ \mu\text{m}$ y $D = 2,72 \pm 0,04\ \mu\text{m}$, El incremento de d_{min} indica que el etanol provocó un incremento de la estructura (o patrón textural) interna.

Valores de $2 < D < 2,5$ indican superficies lisas persistentes mientras que valores $2,5 < D < 3$ indican antipersistencia, tratándose de una superficie completamente rugosa cuando D tiende a 3. El caso particular de $D = 2,5$ corresponde a una superficie de tipo browniana.

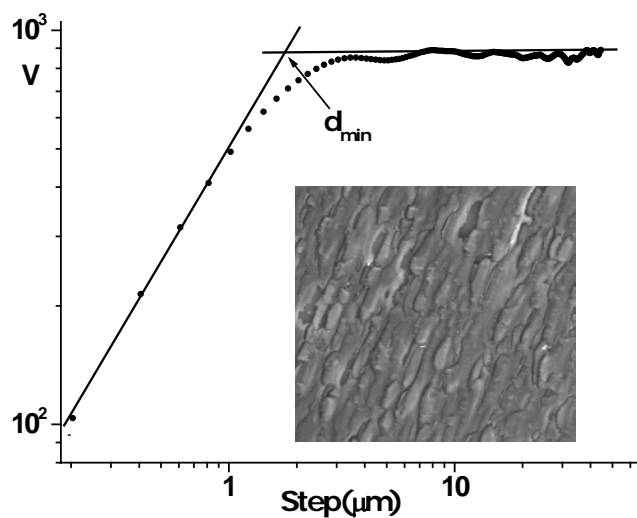


Figura 12. Variograma correspondiente a la porción central de la imagen a 600X, de $84 \mu\text{m} \times 84 \mu\text{m}$, de la sección transversal de Novozym® 435 antes del contacto con etanol.

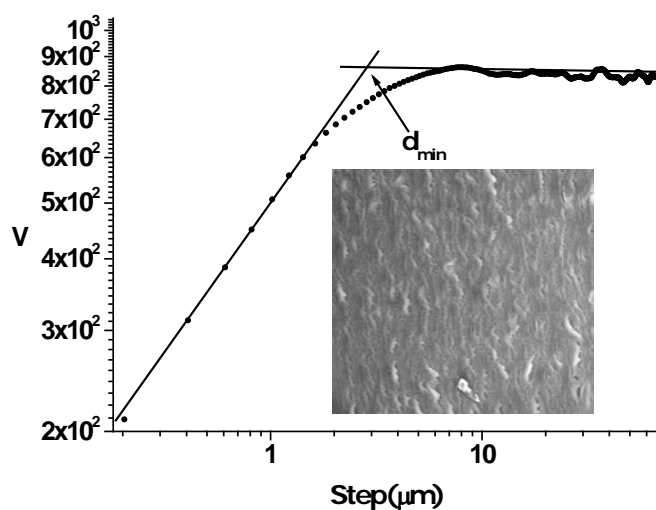


Figura 13. Variograma correspondiente a porción central de la imagen a 600 X, de $84 \mu\text{m} \times 84 \mu\text{m}$, de la sección transversal de Novozym® 435 luego del contacto con etanol.

Las muestras analizadas (con y sin contacto con etanol) indican un comportamiento fractal antipersistente ($D > 2,5$). El aumento de la dimensión fractal por el contacto con alcohol indica un aumento de rugosidad en la superficie interna del catalizador asociado a dicho tratamiento.

6.7. DISCUSION DE RESULTADOS

La motivación de la presente investigación fue hallar las causas de la desactivación de Novozym® 435 luego de varios reúsos en la esterificación de ibuprofeno racémico con etanol como reactivo y solvente (sin adición de co-solvente). El examen exhaustivo de literatura de los últimos 10 años dedicada a la aplicación del biocatalizador muestra varios reportes de su desactivación/inhibición bajo diferentes condiciones de reacción, sin embargo no hay una explicación clara del fenómeno. En este contexto la presente investigación demuestra que no hay una sino varias causas que dan lugar a la pérdida de actividad observada al emplear etanol como medio de reacción (con y sin agua agregada). El efecto más relevante de este solvente es la disolución/disgregación del polimetilmetacrilato PMMA que constituye el núcleo de las esferas de catalizador. Este efecto no se limita al etanol dado que en la literatura se reporta que el PMMA se disuelve en mezclas de tetracloruro de carbono y acetonitrilo con alcoholes de bajo peso molecular (metanol, etanol y 1-propanol) independientemente de la composición de la mezcla [7-9]. El proceso de disolución ejercido por los solventes conduce a la migración de polímero y otras sustancias hacia la fase líquida. En este contexto, Zhao y Song reportaron la migración de 17 sustancias desde Novozym® 435 hacia solventes orgánicos y líquidos iónicos como se nombró anteriormente. Adicionalmente, algunas de estas sustancias resultan activas como dadores de acilo en reacciones de esterificación y transesterificación en presencia de la lipasa B de *Cándida antarctica* [13].

Por otra parte, la interacción de etanol con Novozym® 435 no ocurre solo en la superficie del catalizador, sino que el alcohol difunde al interior de las esferas.

Previamente Heinsman y colaboradores hallaron resultados anómalos en la relación enantiomérica durante la esterificación enantioselectiva de ácido 4-metiloctanoico con etanol catalizada por Novozym® 435 [15]. Los autores demostraron que el etanol produce hinchamiento del soporte y que el ácido 4-metiloctanoico se adsorbe fuertemente dentro de las perlas de catalizador. Estos efectos combinados producen un aumento de 175-200 % en el volumen de las esferas (desde un volumen inicial de 58 ml a un volumen final de 125 ml). La presente investigación confirma la difusión del etanol al interior de las esferas de Novozym® 435 a través de la parametrización de las imágenes de SEM de secciones transversales de esferas de catalizador. Estos cálculos, nunca realizados antes en sistemas biocatalíticos, evidencian la modificación de la textura interna de las esferas. El incremento de la longitud (el parámetro d_{min}) del patrón estadístico que describe la textura de Novozym® 435 al interactuar con etanol indica que el alcohol incrementa la porosidad interna del soporte. Por otro lado, el incremento de la dimensión fractal D se correlaciona con el incremento de la rugosidad de la superficie.

La adsorción de etanol gaseoso y posterior análisis por TPSR indicó que el etanol interacciona con la capa más externa de catalizador donde se localiza la enzima (CALB se localiza en una capa externa de 100 μm de espesor [6]). La desorción del etanol molecular (solo se detectó $m/e=31$) permitió concluir que el etanol se adsorbe sobre la enzima sin reaccionar al aumentar la temperatura. Además el perfil de desorción del etanol (desde 60 °C hasta 200 °C) indica pluralidad de sitios de adsorción de la enzima y probablemente la presencia de PMMA expuesto en la superficie. De hecho, el análisis TPSR del biocatalizador luego de su interacción con etanol líquido, que difunde dentro de las esferas como se discutió antes, demuestra que la interacción molecular del alcohol con el PMMA es mucho más fuerte (también sin reacción al aumentar la temperatura) comenzando la desorción a 150 °C. El proceso de disolución de Lewatit VP OC1600 podría tener lugar en porciones no entrecruzadas de bajo peso molecular. La resina de bajo peso molecular probablemente se disuelve por interacción con etanol a través del hinchamiento y la disrupción de fuerzas de Van der Waals entre las

cadena de resina del soporte. En este contexto, se produce la competencia entre las fuerzas de Van der Waals de la resina sólida y puentes de hidrógeno entre el etanol y residuos polares de la resina. Este proceso físico simple no involucra la ruptura de enlaces covalentes de la resina. Las figuras 9A y 9B muestran las diferencias entre DVB entrecruzado con PMMA y cadenas de PMMA interactuando mediante fuerzas de Van der Waals-principalmente hidrofóbicas pero también por puentes de hidrógeno con etanol. El intercambio (migración) de aditivos presentes en Novozym® 435 es rápido en medio líquido, probablemente afectado por la solubilidad relativa de los distintos aditivos presentes, exponiendo más la superficie hidrofóbica al etanol. En fase gas esta interacción se encuentra menos favorecida por impedimentos estéricos y la fuerte interacción de la superficie con los aditivos. El análisis de FTIR evidencia agua adsorbida pero, como se esperaba, la cantidad adsorbida no es elevada por lo que no resulta particularmente importante en la coordinación del etanol.

Estas observaciones dan fuerte evidencia del efecto inhibitorio ejercido por el etanol reportado previamente en base a observaciones tanto experimentales como teóricas [2]. En este contexto, los cálculos por modelado molecular en un modelo simple permitió postular que la formación irreversible de especies dead-end entre el etanol adsorbido y residuos de serina (Ser 105) e histidina (His 224) de la tríada catalítica de CALB es termodinámicamente factible. Adicionalmente, estos complejos pueden formarse antes de la coordinación del ibuprofeno generando así inhibición de los sitios activos de la enzima en el proceso de esterificación.

La inhibición ejercida por el alcohol junto con la desorción de proteína desde Novozym® 435 causó una disminución de los sitios de adsorción activos en el biocatalizador que a su vez disminuye la cantidad de ibuprofeno adsorbido como se observó en los experimentos discutidos en la sección 6.1. En este contexto, se postula como hipótesis que los diferentes comportamientos observados en la figura 1 a 25 °C versus 28°C y 32 °C pueden atribuirse a la existencia de dos rutas diferentes que pueden tener lugar según la temperatura del ensayo. A 25 °C los aditivos co-adsorbidos no han tenido tiempo suficiente para migrar a la fase líquida abandonando

el soporte [13]. A continuación el ibuprofeno se adsorbe sobre los aditivos en lugar de hacerlo sobre la enzima o el soporte. Conforme pasa el tiempo los aditivos migran a la fase líquida y el ibuprofeno se elimina junto con ellos. A mayor temperatura (28 y 32 °C) los aditivos migran más rápidamente hacia el líquido permitiendo que el ibuprofeno se adsorba directamente sobre el catalizador de manera irreversible.

La fuerte interacción de ibuprofeno con residuos de aminoácidos puede perturbar uniones de hidrógeno entre átomos de la proteína lo que afecta a la estructura terciaria de la misma (no investigado aquí) y a su vez también provocar cambios en la estructura secundaria de CALB. En este contexto, se cree que las proteínas en solventes hidrofóbicos conservan su estructura nativa debido a las interacciones de hidrógeno entre átomos de la proteína y a una estructura más rígida en ausencia de agua. A la inversa, proteínas en solventes polares que pueden quitar moléculas de agua desde la superficie de la proteína y competir por uniones de hidrógeno entre átomos de la proteína provocan su desnaturalización [16]. Sin embargo las investigaciones de Griebenow y Klibanov muestran un comportamiento completamente diferente de la estructura secundaria de proteínas (subtilisina y lizosima cristalinas y liofilizadas) en mezclas acuoso-orgánicas que van desde agua pura a solventes puros como acetonitrilo, tetrahidrofurano y 1-propanol [17]. Los autores demostraron que el contenido de α hélice disminuyó marcadamente en la mayoría de las mezclas agua-solvente. Este comportamiento resultó cinéticamente controlado, es decir, se debe a restricciones inherentes en la movilidad conformacional de la proteína en medio anhidro respecto a mezclas agua-solvente. Sin embargo la influencia de alcoholes sobre la conformación y actividad catalítica de lipasas inmovilizadas ha sido mucho menos investigada. En este sentido, Gao y colaboradores estudiaron el efecto del etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol y t-butanol sobre la hidrofobicidad de lipasa de *Candida rugosa*, lipasa B de *Candida antarctica* y lipasa *pancreática porcina* en soluciones acuosas conteniendo alcoholes y la actividad específica de lipasa inmovilizada en aerogeles de sílice [18]. En el caso particular de CALB, la adición de etanol cambia en cierta medida el plegamiento de la enzima a la vez que se

incrementa la exposición de grupos hidrofóbicos de la enzima (incremento del índice hidrofóbico).

Tal como se presentó previamente un 16,6% de la masa de Novozym® 435 se pierde por contacto con etanol en condiciones óptimas de reacción. Esta pérdida involucra un 3-5 % de CALB desprendida como proteína soluble, libre, si bien una fracción de la enzima se pierde ligada a restos de soporte y no ha sido aún cuantificada.

6.8. CONCLUSIONES

La presente investigación demuestra que el biocatalizador comercial Novozym® 435 se disuelve en etanol y etanol-agua ocasionando la pérdida de proteína. En este contexto los resultados de cuantificación de proteína por diferentes técnicas y los problemas encontrados en su aplicación evidencian la necesidad de diseñar e implementar cuidadosamente dichas técnicas de cuantificación.

La observación de que el etanol no es adsorbido sobre el catalizador fresco, sin contacto previo con etanol líquido, sugiere que el alcohol expone superficie hidrofóbica/hidrofílica del PMMA previamente limitada por la presencia de los aditivos y del reticulante divinilbenceno. Además los estudios por TPSR demuestran que el etanol se adsorbe fuertemente sobre el catalizador.

La acción del etanol sobre la integridad del soporte también fue evidenciada mediante el análisis de la textura interna de las esferas del catalizador. En este sentido los estudios microscópicos de cortes transversales del catalizador demuestran que se produce el aumento de la rugosidad y de la porosidad del material por acción del etanol.

Finalmente el etanol impacta sobre la estructura secundaria de CALB provocando un aumento en el contenido de láminas β , giros y agregados, y la disminución del contenido de α hélice.

Las conclusiones discutidas anteriormente demuestran que la desactivación observada en la actividad de Novozym® 435 en contacto con alcoholes no es simple de explicar

dado que tiene origen en múltiples efectos. En este contexto y teniendo en cuanto la variedad de aplicaciones de Novozym® 435, la presente investigación es un punto de partida para realizar más estudios sobre la estabilidad de biocatalizadores comerciales con el fin de diseñar procesos biotecnológicos fiables. De estas observaciones se deduce que la estabilidad del biocatalizador como un todo debe ser investigada en el solvente antes del desarrollo de una aplicación específica. Cabe destacar que entre las múltiples aplicaciones del biocatalizador Novozym® 435 se destacan aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica, donde la pureza de los productos es importantísima y se encuentra legislada. Así, conocer las sustancias presentes en el medio de reacción permitirá planear una adecuada separación y purificación del producto buscado, como también plantear un adecuado sistema de control de calidad en estos sistemas.

Más importante aún, los investigadores debemos ser conscientes de que la disolución del soporte de Novozym® 435 en un medio etanólico podría dañar/alterar el comportamiento de equipos utilizados como por ejemplo columnas cromatográficas, y más importante, los productos resultan contaminados con sustancias desprendidas desde el catalizador, hecho inaceptable en aplicaciones medicas, farmacológicas y alimentarias ya que puede tener efecto negativo sobre la salud humana.

6.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. CAPÍTULO 6

- [1] Barth A., *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1756, 1073–1101.
- [2] Foresti M.L., Valle G.M., Bonetto R., Ferreira M.L., Briand L.E., *Appl. Surf. Sci.* 2010, 256, 1624–1635.
- [3] Mei Y., Miller L., Gao W., Gross R.A., *Biomacromolecules* 2003, 4, 70–74.
- [4] Silverstein R.M., Bassler G.C., Morrill T.S., *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5° edición, 1991, ISBN 0471 63404 2, pp. 102–131, J. Wiley & Sons, New York, EEUU.

- [5] Base de datos de espectros infrarrojos del National Institute of Standards and Technology (<http://webbook.nist.gov>) de metilacrilato $C_4H_6O_2$ (CAS: 96-33-3) y divinilbenceno $C_{10}H_{10}$ (CAS: 108-57-6).
- [6] Mizukami M., Moteki M., Kurihara K., *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 12889–12897.
- [7] González-Benito J., Koenig J.L., *Polymer* 2006, 47, 3065–3072.
- [8] González-Benito J., Koenig J.L., *Macromolecules* 2002, 35, 7361–7367.
- [9] Hoogenboom R., Becer C.R., Guerrero-Sanchez C., Hoepfener S., Schubert U.S., *Aust. J. Chem.* 2010, 63, 1173–1178.
- [10] Chen B., Hu J., Miller E.M., Xie W., Cai M., Gross R.A., *Biomacromolecules* 2008, 9, 463–471.
- [11] Petry I., Ganesan A., Pitt A., Moore B.D., Halling P.J., *Biotech. Bioeng.* 2006, 95, 984–991.
- [12] Gryglewicz S., Jadownicka E., Czerniak A., *Biotechnol. Lett.* 2000, 22, 1379–1382.
- [13] Zhao H., Song Z., *Biochem. Eng. J.* 2010, 49, 113–118.
- [14] Bianchi F.D., Bonetto R.D., *Scanning* 2001, 23, 193–197.
- [15] Heinsman N.W.J.T., Schroën C.G.P., van der Padt A., Franssen M.C.R., Boom R.M., van't Riet K., *Tetrahedron Asymm.* 2003, 14, 2699-2704.
- [16] Mattos C., Ringe D., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2001, 11, 761-764.
- [17] Griebenow K., Klivanov A.M., *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 11695-11700.
- [18] Gao S., Wang W., Wang Y., Luo G., Dai Y., *Bioresource Tech.* 2010, 101, 7231-7238.

CAPITULO 7

EFFECTO DE CO-SOLVENTES Y ALCOHOLES EN LA ESTERIFICACIÓN DE (R/S)-IBUPROFENO CATALIZADA POR NOVOZYM® 435

7.1. ANTECEDENTES Y FUNDAMENTOS DEL ESTUDIO

En base a los resultados presentados en el capítulo 6 respecto al efecto del etanol sobre Novozym® 435, se decidió evaluar el sistema de reacción al disminuir la concentración de etanol en contacto con el catalizador comercial. Para ello, por cuestiones de solubilidad del ibuprofeno y del volumen total necesario para que el catalizador se encuentre en íntimo contacto con el medio de reacción, se requiere del empleo de un co-solvente orgánico. En este contexto se decide abordar el estudio de la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con etanol catalizada por Novozym® 435 en presencia de co-solventes.

Para tal estudio se emplearon isooctano, n-hexano, tetracloruro de carbono, acetato de etilo, acetonitrilo y tetrahidrofurano como co-solventes orgánicos.

La elección de estos seis solventes se fundamenta en primer lugar, en reportes previos encontrados en la literatura que demuestran la factibilidad de su uso en biocatálisis, es decir que demuestran la actividad de lipasas al emplear dichos solventes en el medio de reacción. Además, es ampliamente conocido y reportado que la naturaleza del solvente es uno de los parámetros claves en la performance de reacciones enzimáticas, dependiendo de esta variable no solo la actividad de la enzima sino también la selectividad de la misma [1-9]. Sin embargo, aún siendo muy numerosa la literatura acerca del efecto del solvente en distintos sistemas de reacción enzimática, hasta la fecha no se han reportado tendencias claras ni generales al respecto. Las observaciones de alcance más generalizado en cuanto a esterificaciones catalizadas por lipasas en medios orgánicos, indican que las mayores actividades y selectividades enzimáticas han sido obtenidas en solventes orgánicos hidrofóbicos. La hidrofobicidad de un solvente queda representada con el valor de log P del mismo, definiéndose dicho parámetro como el logaritmo de la constante de reparto del solvente en un sistema bifásico octanol-agua [10]. En base a lo reportado, parecería que el valor $\log P = 2$ es un valor “bisagra” (de quiebre de comportamiento) en esterificaciones enzimáticas, encontrándose buenos valores de conversión y enantioselectividad con solventes cuyos

log P son mayores o iguales a 2, y bajísima actividad o ausencia de reacción para valores de log P < 2 [1-3, 7-9]. Sin embargo son heterogéneos los comportamientos reportados para ambas regiones de log P. En este sentido, López-Belmonte y colaboradores, quienes estudiaron la resolución racémica de ácidos 2-arilpropiónicos catalizada por lipasas de *Rizhomucor miehei* inmovilizada, y el grupo de Ceynowa en el estudio de la esterificación de R/S-ibuprofeno con etanol en diversos solventes orgánicos catalizada por lipasa de *Pseudomona* sp en reactores de membrana, observaron una dependencia lineal de la conversión en función de log P para valores de log P ≥ 2 [3, 7]. Sin embargo, no encontraron una tendencia entre la enantioselectividad y el log P. Por otro lado, Min Gon Kim, Ying Liu y Dantona no observaron una línea de tendencia para ninguno de los parámetros de reacción al estudiar el efecto del solvente en la esterificación de R/S-ibuprofeno con diversos alcoholes empleando como catalizadores lipasas de *Candida rugosa*, *Candida* sp y Novozym® 435, respectivamente [1, 2, 6]. En la literatura también se encuentran reportadas excepciones en cuanto a la presencia de actividad en ciertos solventes de bajo valor de log P, es decir solventes más hidrofílicos [5, 8, 9, 11]. En este sentido, Zhao Dan Tong y colaboradores quienes estudiaron la esterificación de ibuprofeno con 1-octanol catalizada por la estearasa APE1547, obtuvieron los mejores avances de reacción a valores intermedios de log P ($\sim 2,5$) resultando la conversión obtenida al emplear acetonitrilo (log P = -0,33) equivalente a la hallada en isooctano (log P 4,5). Así mismo reportan un comportamiento continuamente creciente para la enantioselectividad en función de log P [5].

Persson y colaboradores estudiaron la esterificación del ácido 2-fenil propiónico con 1-heptanol empleando diferentes catalizadores basados en lipasas de diverso origen, encontrando comportamientos muy distintos según el catalizador en cuestión [12]. En este sentido reportan que la enantioselectividad de Novozym® 435 fue independiente del parámetro log P del solvente, observando en iguales condiciones de reacción un aumento de enantioselectividad en función de log P para catalizadores basados en lipasa de *Cándida rugosa* inmovilizada.

Si bien son amplios los reportes sobre este tema, la mayoría de ellos consisten en una exposición de resultados experimentales, sin dar una explicación acerca del por qué del comportamiento observado. En un primer momento se postuló que los solventes más hidrofílicos tienen mayor capacidad de quitar moléculas de agua esenciales a las moléculas de enzima afectando así su actividad [13, 14]. Sin embargo, Yin Liu y colaboradores estudiaron la esterificación de ibuprofeno racémico con 1-propanol en diversos solventes y observan que aún bajo control de la actividad acuosa (a_w) se evidencia la influencia de la naturaleza química del solvente en la performance de la reacción, demostrando así que si bien hay un efecto del solvente sobre la actividad enzimática debida a la interacción con moléculas de agua esenciales, hay otros efectos propios del solvente sobre la enzima [2].

Así, la influencia del medio es muy compleja involucrando interacciones entre el solvente de reacción, la enzima y los sustratos. Esto hace que sea imposible predecir el comportamiento. Es por esta razón que se decidió evaluar la reacción central de este trabajo de Tesis, es decir la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con etanol, en diversos solventes orgánicos, tanto hidrofóbicos como hidrofílicos.

Adicionalmente al empleo de un co-solvente se propone como estrategia la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con otros alcoholes sin empleo de co-solventes. Las publicaciones halladas respecto al empleo de diversos alcoholes en esterificaciones enzimáticas de profenos, indican claramente que las mayores actividades enzimáticas se obtienen al emplear alcoholes primarios, entre los cuales las mejores performance las dan los alcoholes primarios de cadena lineal, sin encontrarse actividad al emplear alcoholes terciarios ni polioles. Sin embargo hay contradicciones respecto a la actividad enzimática frente a alcoholes secundarios [2, 3, 7, 8, 9]. Varios grupos de investigación reportan un aumento de actividad enzimática al disminuir el número de átomos de carbono del alcohol empleado [2, 5, 7, 16]. En este sentido el 1-propanol es el alcohol más extensamente empleado y elegido como óptimo. Son muy pocos los antecedentes respecto del empleo de alcoholes con menos de tres átomos carbono debido a que se les atribuye un efecto de deshidratación de enzimas por lo cual son dejados de lado [2].

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados se decidió estudiar la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con 1-propanol y 2-propanol en reemplazo del etanol.

7.2. METODOLOGÍA DE ESTUDIO

7.2.1. Sistema de reacción

- Esterificación en presencia de co-solvente

Las reacciones de esterificación fueron realizadas en frascos de vidrio de 100 ml de capacidad cerrados herméticamente, los cuales fueron mantenidos a temperatura (45 °C) y agitación constante (200 rpm) en un baño de agua (Julabo SW22, Alemania). En todos los casos 0,5000 g (2,42 mmoles) de (R/S)-ibuprofeno se hicieron reaccionar con un volumen definido de etanol absoluto (Carlo Erba 99,8 %) en presencia de solvente orgánico (acetonitrilo, isooctano, n-hexano, tetracloruro de carbono, acetato de etilo, tetrahidrofurano). En todos los casos se emplearon los volúmenes mínimos de solventes necesarios para disolver la masa indicada de ibuprofeno que corresponden a: 20,00 ml de isooctano (Carlo Erba 99,5 %); 17,00 ml de n-hexano (Sintorgan 98,5 %); 5,00 ml de tetracloruro de carbono (U.V.E. 99,9 %); 2,50 ml de acetato de etilo (Analyticals Carlo Erba 99,5 %); 2,00 ml de acetonitrilo (Carlo Erba 99,9 %) y 2,00 ml tetrahidrofurano (Merck >99 %).

Se adiciona agua destilada solo en aquellos sistemas de reacción donde el solvente es miscible en agua, es decir para reacciones llevadas a cabo en acetonitrilo y tetrahidrofurano. En tales casos se emplea un contenido de agua inicial de 4,76 % v/v. Las reacciones se inician con el agregado del catalizador Novozym® 435, el cual se emplea en relación 160 mg de catalizador por cada ml de alcohol.

Los volúmenes de etanol absoluto empleados (0,14; 0,20; 0,35; 0,60; 0,80 y 1,00 ml) corresponden a las siguientes relaciones molares alcohol/ácido: 1:1; 1,42:1; 2,47:1; 4,25:1; 5,70:1 y 7,08:1 respectivamente.

Adicionalmente, se realizaron ensayos tendientes a determinar el grado de avance y la enantioselectividad de la reacción no catalizada que consistieron en la reproducción de los sistemas de reacción con relación molar alcohol: ácido 7,08:1 en ausencia de catalizador.

- Esterificación sin co-solvente

Se investigó la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con alcoholes de cadena corta: 1-propanol (Sigma Aldrich $\geq 99,5$) y 2-propanol (J.T. Baker $\geq 99,93\%$). Las esterificaciones fueron realizadas bajo condiciones halladas previamente como óptimas al emplear etanol como agente nucleofílico y solvente (experiencias detalladas en el Capítulo 4). Se emplearon frascos de vidrio de 100 ml de capacidad cerrados herméticamente, los cuales fueron mantenidos a temperatura (45 °C) y agitación constante (200 rpm) en un baño de agua (Julabo SW22, Alemania). En todos los casos 0,5000 g (2,42 mmoles) de (R/S)-ibuprofeno se hicieron reaccionar con 1,00 ml de alcohol. El contenido de agua inicial fue 4,76 % v/v. Las reacciones se iniciaron con el agregado del catalizador Novozym® 435, el cual se empleó en relación 160 mg de catalizador por cada ml de alcohol.

Adicionalmente se realizaron ensayos con 1,30 ml y 3,20 ml de 1-propanol y 2-propanol a los efectos de evaluar el efecto del volumen del alcohol.

Así mismo se investigó la conversión y enantioselectividad luego de exponer el biocatalizador durante 8 días a la acción del 1-propanol a los fines de evaluar la estabilidad de Novozym® 435 frente a este alcohol. Tanto las condiciones como el tiempo de exposición simulan cuatro ciclos consecutivos de reacción de 48 horas cada uno en las mejores condiciones halladas.

Se realizaron ensayos tendientes a determinar el grado de avance y la enantioselectividad de la reacción no catalizada que consistieron en la reproducción de los sistemas de reacción con 1,00 ml de alcohol en ausencia de catalizador.

7.2.2. Análisis de las muestras

Transcurridas 48 horas de reacción se procedió a determinar la conversión (X %) y de exceso enantiomérico de sustrato (eeS %), empleando la valoración de ibuprofeno remante con hidróxido de potasio en etanol y el análisis por HPLC quiral, respectivamente. El procedimiento de análisis, los cálculos, fundamentos de técnicas y equipos utilizados fueron descritos detalladamente en el Capítulo 4 y el Anexo 3.

7.3. RESULTADOS OBTENIDOS

7.3.1. Efecto de la relación molar de sustratos en solventes orgánicos de polaridad opuesta: isooctano y acetonitrilo

En la figura 1 se presentan los valores de conversión (X %) y exceso enantiomérico hacia la especie S(+)-ibuprofeno (eeS %) obtenidos al realizar la esterificación de ibuprofeno racémico con etanol catalizada con Novozym® 435 al emplear tanto un co-solvente orgánico hidrofóbico (isooctano) como un co-solvente orgánico hidrofílico (acetonitrilo). En estos experimentos se utilizaron distintas relaciones molares etanol:ibuprofeno, variando el volumen de etanol agregado al sistema tal como se describió en la sección 7.2.1.

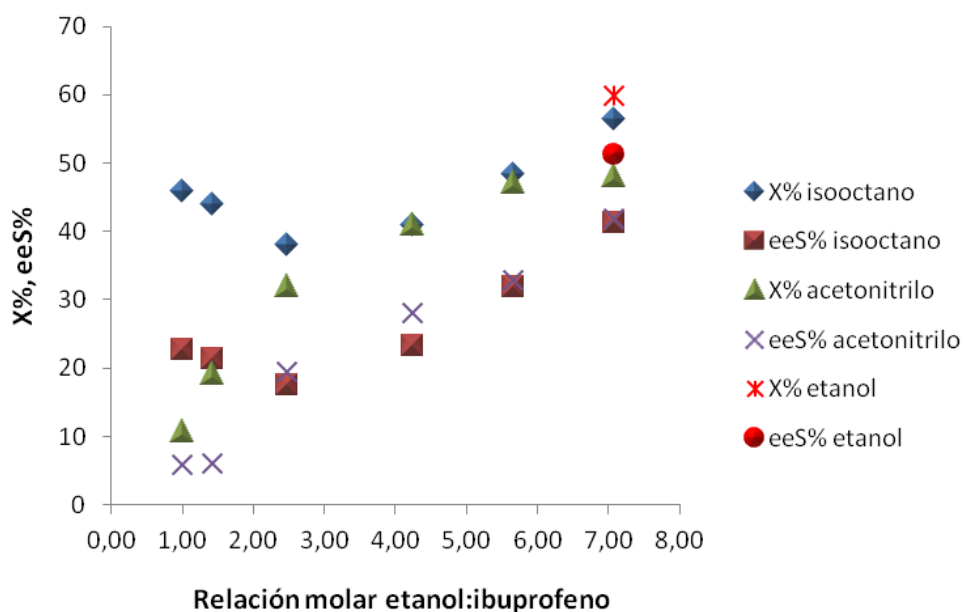


Figura 1. Resultados comparativos del efecto de la relación molar alcohol/ácido sobre la conversión y enantioselectividad en la esterificación de R/S-ibuprofeno con etanol al emplear isooctano y acetonitrilo como co-solventes. Se muestran adicionalmente los valores de X % y eeS % obtenidos con etanol como reactivo y solvente en las mismas condiciones de reacción.

Los resultados mostrados en la figura 1 demuestran que el agregado de alcohol favorece la conversión y el exceso enantiomérico a relaciones molares etanol:ibuprofeno mayores o iguales a 2,47 independientemente del co-solvente empleado.

Cuando los sustratos se utilizaron en cantidades estequiométricas (o bien con un leve exceso de alcohol) el comportamiento del sistema de reacción resultó diferente según la naturaleza química del solvente empleado. En este contexto, resulta interesante evaluar la esterificación utilizando una relación molar de sustratos de 1,42:1 variando los volúmenes de co-solvente empleado. Los resultados de éstas experiencias se muestran en las figuras 2 y 3.

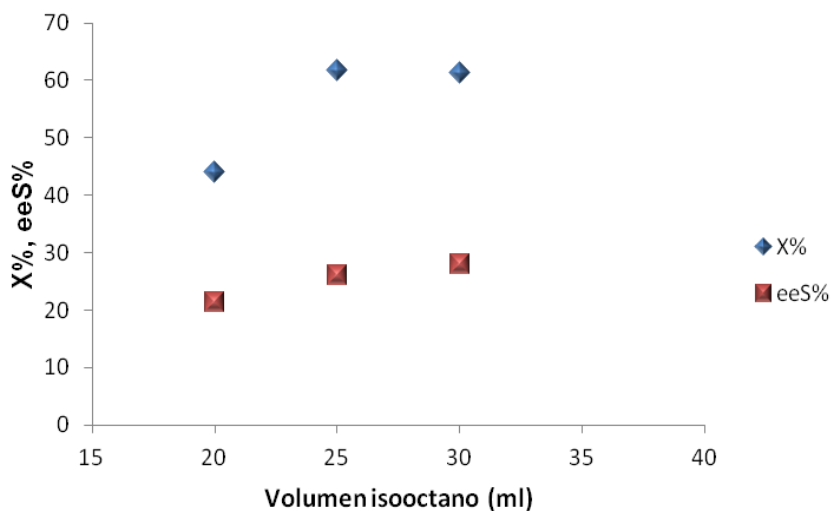


Figura 2.
Efecto del volumen de isooctano al emplear un valor de relación molar etanol:ibuprofeno igual a 1,42:1.

Los resultados presentados en las figuras 2 y 3 indican que el aumento de la cantidad de co-solvente por encima del mínimo necesario para disolver el ibuprofeno no altera la enantioselectividad independientemente de la naturaleza del mismo. Sin embargo, la conversión de R/S-ibuprofeno es favorecida al aumentar la cantidad de isooctano y disminuye drásticamente en el caso del aumento del volumen de acetonitrilo.

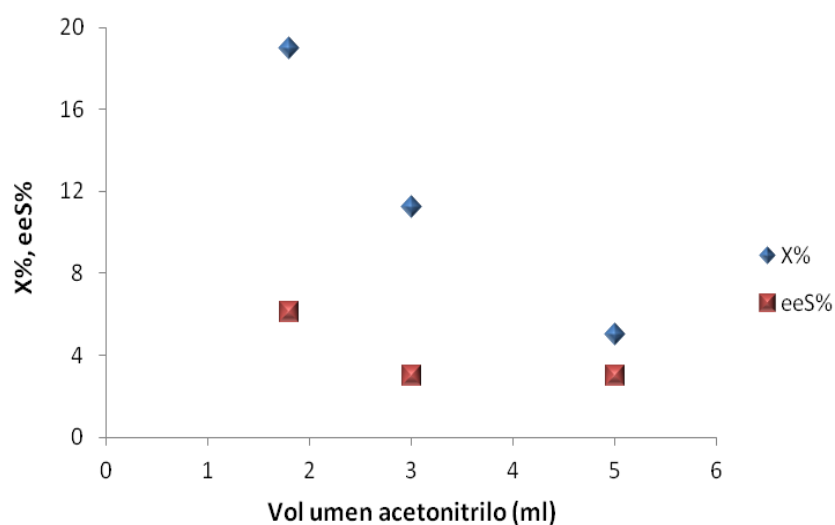


Figura 3.
Efecto del volumen de acetonitrilo al emplear un valor de relación molar etanol:ibuprofeno igual a 1,42:1.

7.3.2. Efecto de la naturaleza química del solvente

En base a los resultados mostrados en el apartado anterior, se decidió evaluar el efecto de la presencia de distintos solventes orgánicos sobre la conversión y enantioselectividad de la reacción de esterificación de (R/S)-ibuprofeno con etanol. Para ello se seleccionó un grupo de solventes con diferente hidrofobicidad, evaluándose un rango de valores del parámetro log P desde -0,33 hasta 4,5. Cada uno de los solventes fue empleado en una cantidad mínima, tal como se indicó en la sección 7.2.1. En estos estudios se emplearon relaciones molares etanol:ibuprofeno de 1,42:1 y 7,08:1. Las demás condiciones de reacción fueron las mismas que las empleadas en presencia de isooctano y acetonitrilo. En las figuras 4 y 5 se representan los resultados obtenidos en las relaciones molares de sustratos correspondientes a 1,42 y 7,08, respectivamente.

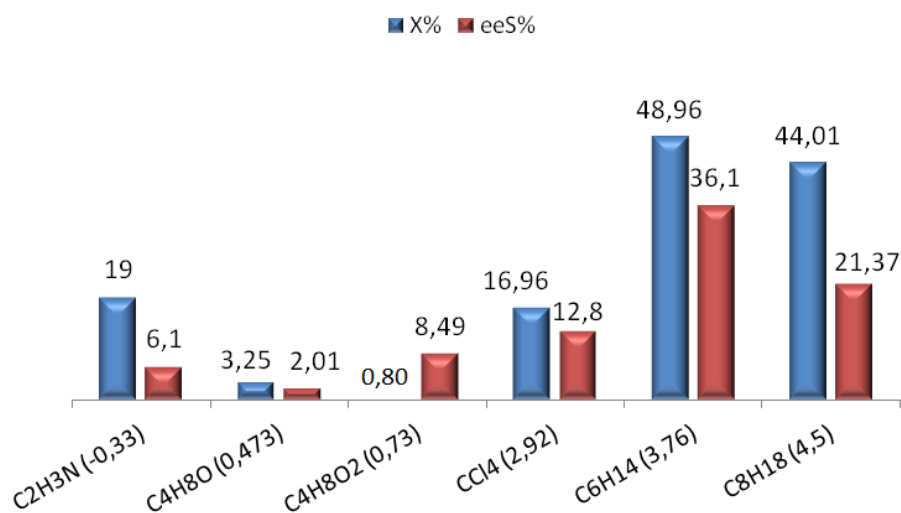


Figura 4. Efecto de la naturaleza del solvente en la esterificación de (R/S)-ibuprofeno. Relación molar etanol:ibuprofeno 1,42:1. Se muestran los valores de X % y eeS % en orden creciente de log P del solvente involucrado. En el eje X del gráfico se indican las fórmulas químicas de los solventes y los valores de log P correspondientes (log P extraídos de [17]).

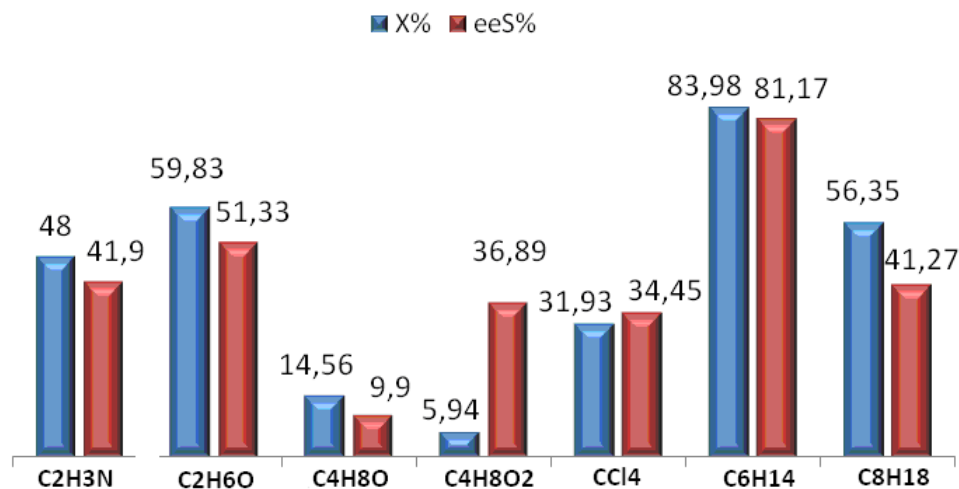


Figura 5. Efecto de la naturaleza del solvente en la esterificación de (R/S)-ibuprofeno. Relación molar etanol:ibuprofeno 7,08:1. Se muestran comparativamente los valores de X % y eeS % obtenidos en un sistema con y sin co-solvente agregado. En el eje X del gráfico se indican las fórmulas químicas de los co-solventes empleados.

Cabe destacar que todos los blancos de reacción mostraron valores de conversión de 0,5 %-0,7 %; excepto el blanco de reacción en presencia de acetato de etilo, en el cual la conversión fue de 1,6 %. En ningún caso se observó enantioselectividad de la reacción en ausencia de catalizador. Debe señalarse que, los valores de X% asignados a los distintos sistemas de reacción corresponden a conversión neta.

7.3.3. Efecto de la naturaleza del alcohol

En la figura 6 se presentan los valores de conversión y exceso enantiomérico hacia el enantiómero S(+) obtenidos al realizar la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con distintos alcoholes de cadena corta, sin co-solvente agregado y bajo catálisis de Novozym® 435. Tal como se describió en la sección 7.2.1 las condiciones de reacción empleadas corresponden a las halladas como óptimas al estudiar la esterificación empleando etanol (ver detalles en el Capítulo 4).

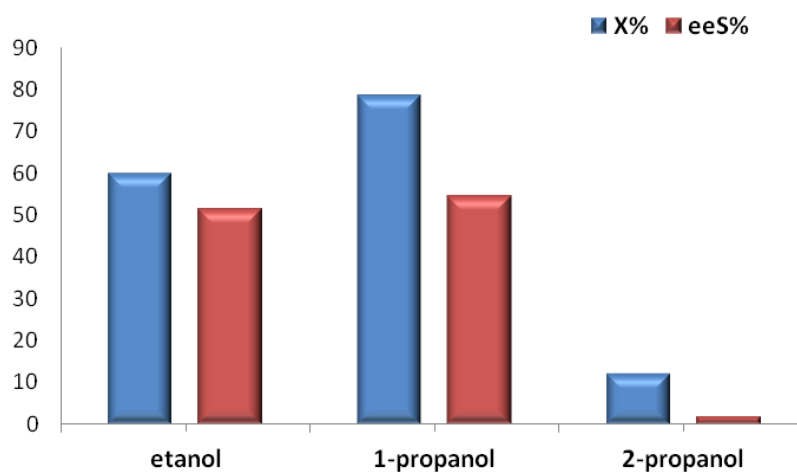


Figura 6. Efecto de la naturaleza del alcohol sobre la conversión (X %) y enantioselectividad (eeS %) de la esterificación de R/S-ibuprofeno. Condiciones de reacción: 0,5 g (R/S)-ibuprofeno, 1,00 ml alcohol, 160 mg Novozym[®] 435, 45°C, 200 rpm, 4,76 % v/v agua destilada, 48 horas de reacción.

A continuación se evaluó el efecto del aumento de volumen de alcohol (1-propanol y 2-propanol) respecto al mínimo volumen requerido para la disolución del sustrato e íntimo contacto del catalizador con el sistema de reacción. La figura 7 muestra los valores de conversión y exceso enantiomérico obtenidos al emplear volúmenes de 1-propanol y 2-propanol entre 1,00 ml y 3,20 ml conjuntamente con los resultados obtenidos al evaluar el efecto del volumen de etanol sobre la misma reacción (resultados detallados y discutidos en el Capítulo 4)

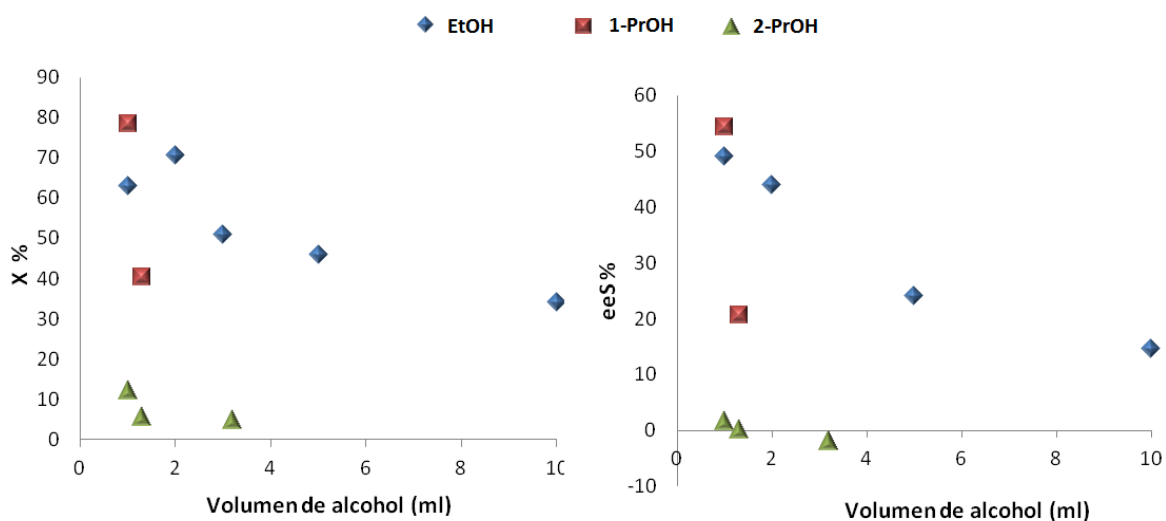


Figura 7. Efecto del volumen de 1-propanol (1-PrOH) y 2-propanol (2-PrOH) sobre la conversión (X %, izquierda) y exceso enantiomérico (eeS %, derecha) en la esterificación de (R/S)-ibuprofeno catalizada por Novozym® 435. Se muestra comparativamente el efecto del volumen de etanol (EtOH). Condiciones de reacción: 0,5 g (R/S)-ibuprofeno, volumen variable de alcohol, 160 mg Novozym® 435 por cada ml de alcohol, 45°C, 200 rpm, 4,76 % v/v agua destilada, 48 horas de reacción.

Se evidencia que el empleo de un volumen de alcohol superior a 1,00 ml tiene un efecto negativo en el avance de reacción y en la selectividad de la misma, verificándose este comportamiento para los tres alcoholes estudiados. La figura 7 muestra claramente tal comportamiento, así como también un efecto negativo más marcado al emplear alcoholes de tres átomos de carbono.

Los resultados presentados en la figura 6 evidencian que la esterificación de ibuprofeno con 1-propanol alcanza la mayor conversión (78 %) mientras que no se observan diferencias en cuanto a enantioselectividad respecto al etanol. Por su parte el 2-propanol arroja valores muy bajos de ambos parámetros de reacción. En base a estos resultados se seleccionó al 1-propanol para evaluar el reuso de Novozym® 435 en la esterificación de ibuprofeno racémico frente a dicho alcohol como reactivo y

solvente. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al estudiar el efecto del volumen de alcohol sobre la performance enzimática se decidió emplear 1,00 ml de n-propanol para el estudio de estabilidad del catalizador; los resultados obtenidos se muestran en la figura 8 de manera comparativa al comportamiento obtenido al estudiar la estabilidad de Novozym® 435 en etanol (resultados detallados y discutidos en el Capítulo 4).

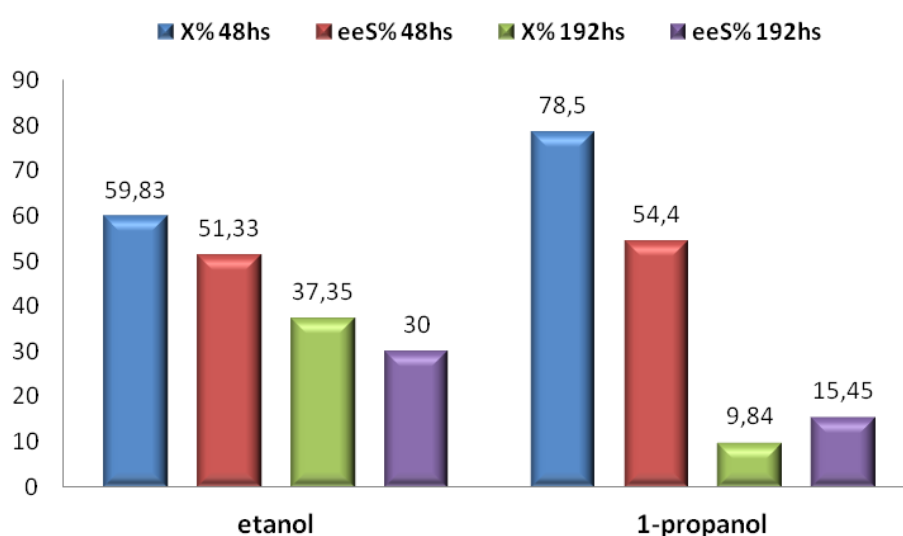


Figura 8. Reusos de Novozym®435 en etanol y 1-propanol . Condiciones de reacción: 0,5 g (R/S)-ibuprofeno, 1,00 ml alcohol, 160 mg Novozym® 435 por cada ml de alcohol, 45°C, 200 rpm, 4,76%v/v agua destilada, 48 horas de reacción.

7.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La naturaleza del disolvente es un factor clave en la performance enzimática. Numerosas investigaciones se han centrado en relacionar alguna propiedad físico-química del disolvente con la selectividad enzimática, para así, poder racionalizar los procesos biocatalíticos. A continuación se definen parámetros que caracterizan la

naturaleza de un solvente de manera de poder analizar los resultados obtenidos en la esterificación de R/S-ibuprofeno con etanol respecto del solvente empleado.

El *coeficiente de partición* $\log P$, se define como el logaritmo de la constante de reparto de una sustancia neutra entre dos fases inmiscibles en equilibrio: octanol y agua, es decir, consiste en el logaritmo del cociente entre las concentraciones de dicha sustancia en fase orgánica respecto de fase acuosa estando las fases en equilibrio **[10]**.

La *constante dieléctrica* (ϵ) y el *momento dipolar* (μ) son propiedades complementarias de una sustancia. Con frecuencia se utilizan ambas constantes físicas para caracterizar su polaridad, aunque el momento dipolar no representa la polaridad de un disolvente. En este sentido, una molécula polar es aquella que tiene un elevado momento dipolar. Sin embargo, cuando se dice que un disolvente es polar, significa que tiene una elevada constante dieléctrica. En otras palabras, la polaridad de un disolvente o constante dieléctrica, es una propiedad macroscópica, mientras que la polaridad molecular o momento dipolar es una propiedad de moléculas aisladas.

La polaridad de un disolvente o constante dieléctrica puede definirse como su capacidad para solvatar y estabilizar cargas. Mientras que el momento dipolar hace referencia a la capacidad de una sustancia de mantener cargas opuestas separadas en sus moléculas. Así, el valor de $\log P$ se relaciona con la lipofilia del disolvente y, por tanto puede asociarse con la eliminación o mantenimiento de la monocapa de agua esencial de la enzima mientras que la constante dieléctrica del disolvente da una idea acerca de la flexibilidad de la enzima en el disolvente **[9, 13, 14]**.

El estudio de la esterificación de R/S-ibuprofeno con etanol catalizada por Novozym® 435 en solventes de propiedades opuestas como son isooctano ($\log P = 4,5$ y $\epsilon = 1,94$) y acetonitrilo ($\log P = -0,33$ y $\epsilon = 36,6$) evidenció influencia de la naturaleza del solvente en la reacción cuando la misma se llevó a cabo empleando relaciones molares etanol:ibuprofeno menores a 2,47:1. Estas observaciones podrían atribuirse a que las características del medio de reacción son similares al emplear volúmenes de etanol absoluto superiores a 0,35 ml tanto en isooctano (20 ml) como acetonitrilo (2 ml), es decir, la hidrofobicidad y polaridad del medio de reacción quedarían definidas

principalmente por el exceso de etanol. Al emplear menores volúmenes de alcohol, y por lo tanto trabajar en relación estequiométrica de reacción o en bajos excesos de alcohol, las características del medio quedarían definidas por la naturaleza química del co-solvente. Idea que está de acuerdo con los comportamientos obtenidos al evaluar el efecto del volumen del co-solvente al emplear un valor de relación molar etanol:ibuprofeno 1,42:1. En las figuras 2 y 3 se observa la evolución de X % y eeS %, (positiva o negativa según el solvente) al aumentar el volumen de los solventes en estudio hasta alcanzarse una meseta, hecho que concuerda con una modificación gradual de la naturaleza físico-química del medio de reacción al aumentar el volumen de co-solvente en el mismo, alcanzándose un punto donde el ambiente posee las características físico-químicas del solvente, es decir, el volumen de etanol presente ya no determina las características del medio, sino que su rol principal en estas condiciones es como sustrato de reacción. La zona de meseta correspondería al comportamiento en un ambiente netamente definido por el solvente agregado.

En condiciones de leve exceso del alcohol, los resultados obtenidos evidenciaron que un aumento del volumen de isooctano en el medio de reacción favorece el avance de la misma, aumentando la conversión alcanzada desde 44 % a 61 % al modificar el volumen de dicho solvente desde 20,00 ml a 30,00 ml, mientras el efecto sobre la enantioselectividad es menos marcado, aumentando el eeS % desde 21 % a 28 %. Por otro lado, el aumento del volumen de acetonitrilo tiene un efecto negativo en ambos parámetros de reacción, disminuyendo la conversión de 19 % a 5 % y el exceso enantiomérico desde 6 % a 3 % al modificar el volumen desde 2,00 a 5,00 ml.

En este contexto, surgen tres puntos importantes de destacar:

- Los resultados obtenidos están de acuerdo con reportes previos respecto a que la esterificación enzimática (X %) es favorecida al emplear un solvente hidrofóbico como isooctano respecto al empleo de un solvente orgánico hidrofílico como

acetonitrilo, verificándose tal comportamiento únicamente en condiciones de bajos exceso de etanol, es decir relaciones molares etanol:ibuprofeno $< 2,47$.

- El sistema de reacción sin co-solvente agregado ha generado los mejores resultados en cuanto a los valores obtenidos de conversión y exceso enantiomérico hacia S(+)-ibuprofeno.

- El biocatalizador comercial Novozym® 435 mostró ser activo al emplear acetonitrilo como co-solvente en la reacción en estudio. Este hallazgo está de acuerdo con lo reportado por Sinisterra y colaboradores quienes al estudiar la esterificación de ácido 2-fenil-propiónico con 1-propanol en diversos solventes orgánicos, empleando como biocatalizadores Novozym® 435 y la enzima CALB nativa, observan que si bien el valor $\log P = 2$ se comporta como un “valor de corte” como se describió anteriormente, el acetonitrilo y las carvonas eran excepciones a tal comportamiento, encontrando una actividad enzimática menor a la esperada al emplear carvonas y una actividad mayor a la esperada al emplear acetonitrilo según sus valores de $\log P$ [8, 9]. En base a estas observaciones proponen que deben tenerse en cuenta otros parámetros, como la constante dieléctrica (ϵ) y el carácter ácido/base del solvente, al analizar el efecto de un solvente en biocatálisis. En cuanto a la constante dieléctrica, éste parámetro es de gran importancia, ya que la mayoría de las interacciones no covalentes presentes en la proteína son de tipo electrostático, y de acuerdo con la ley de Coulomb, están inversamente relacionadas con ese parámetro. En base a esto Sinisterra y colaboradores proponen que las enzimas son más flexibles en aquellos disolventes con un valor de ϵ elevado. De esta forma, la lipasa B de *Candida antarctica* puede presentar una mayor flexibilidad en acetonitrilo ($\epsilon = 35,94$), lo que facilita las interacciones enzima-sustrato, y aumentaría su actividad. Por otra parte, atribuyen al carácter ácido del acetonitrilo una posible interacción con el residuo Asp 145 situado en la región $\alpha 5$, posible tapadera del centro activo, provocando su apertura y facilitando la entrada de los sustratos en él.

Tal como se describió en el apartado 7.3.2. se evaluó el efecto la naturaleza química de co-solventes orgánicos en dos condiciones de reacción. Por un lado, se trabajó con una relación molar etanol:ibuprofeno 7,08:1 que resultó la óptima independientemente de la ausencia, presencia y naturaleza del co-solvente según resultados disponibles al momento, es decir, según lo hallado al evaluar la reacción sin solventes (capítulo 4) o con agregado de isooctano o acetonitrilo (apartado 7.3.1.). Por otro lado, se evaluó el comportamiento de la reacción frente a diversos solventes pero empleando una relación molar etanol:ibuprofeno de 1,42:1. En esta condición, se minimizó el volumen de etanol, y por ende, su efecto deletéreo sobre el catalizador, manteniendo un exceso del reactivo de modo de favorecer la reacción en sentido de la esterificación, punto importante en reacciones reversibles como el caso en estudio.

Tabla1. Valores de log P y constante dieléctrica de los distintos solventes orgánicos evaluados como co-solventes.

Solvente	log P	ϵ (Constante dieléctrica)
Acetonitrilo (C ₂ H ₃ N)	-0,33	36,6
Etanol (C ₂ H ₆ O)	-0,31	24,6
Tetrahidrofurano (C ₄ H ₈ O)	0,473	7,52
Acetato de etilo (C ₄ H ₈ O ₂)	0,73	6,03
Tetracloruro de carbono (CCl ₄)	2,92	2,24
n-Hexano (C ₆ H ₁₄)	3,76	1,86
Isooctano (C ₈ H ₁₈)	4,50	1,94

La figura 4 muestra un importante efecto de la naturaleza del solvente al trabajar con relaciones molares de 1,42:1. En estas condiciones se observó un comportamiento similar de la conversión y exceso enantiomérico hacia el S(+)-ibuprofeno en función del log P del solvente. De acuerdo con varios grupos de investigación que estudian esterificaciones catalizadas por lipasas un aumento del parámetro log P, es decir un

aumento de la hidrofobicidad del solvente, mostró efecto positivo en el avance de la reacción (X %) y en la selectividad de la misma (eeS %), obteniéndose las mejores performance en n-hexano e isooctano [1-3, 7-9]. Por otro lado, no hay acuerdo en cuanto a los resultados hallados al emplear solventes con valores de log P menores a 2. Como se indicó previamente el acetonitrilo es una excepción al comportamiento general observado ya que se obtienen mejores resultados a los esperados según su valor de log P, estando de acuerdo con lo reportado por el grupo de Sinisterra para la esterificación de ácidos 2-aril-propiónicos con 1-propanol catalizada por Novozym® 435 [8, 9].

Al emplear una relación molar de sustratos 7,08:1, tanto la conversión como el exceso enantiomérico hacia S(+)-ibuprofeno aumentan respecto a los obtenidos al emplear una relación molar etanol:ibuprofeno de 1,42:1. Si bien el aumento en X % puede ser atribuido al desplazamiento de la reacción por la mayor concentración de uno de los reactivos, esto no justifica el aumento de selectividad observado, efecto que estaría asociado a las mezclas etanol-cosolvente que tendrían influencia en la estructura y flexibilidad de CALB. En este contexto, se observó que aún en condiciones de exceso marcado de etanol la naturaleza del solvente influye en la performance obtenida. Sin embargo, sería necesario establecer las características físico-químicas de estas mezclas alcohol-solvente para una adecuada correlación con la actividad biocatalítica.

Si se tienen en cuenta los valores de constantes dieléctricas de los solventes en estudio (Ver tabla 1), se observa que el avance de la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con etanol catalizada por Novozym® 435 es favorecida tanto por solventes hidrofóbicos no polares, que posean valores de log P > 3, como también por solventes hidrofílicos polares cuyas constantes dieléctricas sean $\epsilon > 20$.

Es interesante el comportamiento observado al emplear acetato de etilo como solvente en condiciones de relación molar de sustrato 7,08:1. En este caso el exceso enantiomérico hacia el S(+)-ibuprofeno resultó muy superior al valor de conversión

logrado ($X \% = 5,94 \%$ y $eeS \% = 36,89 \%$). Nótese que en las demás reacciones ensayadas los valores de conversión y exceso enantiomérico hacia el S(+)-ibuprofeno tienen un mismo comportamiento y sus valores son similares. Así, al avanzar la reacción el sustrato remanente se enriquece en el enantiómero S(+) debido a la mayor velocidad de esterificación hacia el enantiómero R(-), esto determina la enantioselectividad del catalizador. Dado que la selectividad no es absoluta el avance de la reacción aumenta el exceso enantiomérico de sustrato asociando esto a una pérdida cuantitativa de S(+)-ibuprofeno que reacciona formando el éster correspondiente. En acetato de etilo, se observa un comportamiento más selectivo de la enzima, mejor discriminación de enantiómeros, si bien el avance de la esterificación es pobre. Esto generó buenas expectativas respecto este co-solvente. Hallar condiciones que lleven a mejorar la conversión, como el aumento de masa de catalizador, daría una muy buena producción de S(+)-ibuprofeno. La optimización de la reacción con acetato de etilo como co-solvente se encuentra en estudio.

Respecto al efecto de la naturaleza del alcohol en resoluciones enzimáticas de profenos, si bien muchos reportes indican que las mayores conversiones en esterificaciones catalizadas por lipasas son logradas con alcoholes primarios, respecto a secundarios y, que la actividad es muy baja o nula al emplear alcoholes terciarios y polioles, se encuentran excepciones. Se cree que si bien la formación del complejo acil-enzima es un paso crucial en este tipo de reacciones, la conversión final depende de la accesibilidad del nucleófilo (el alcohol en este caso) a dicho complejo. Así, el efecto de la naturaleza de la molécula del alcohol dependerá de cada sistema estudiado ya que cada sistema puede generar un complejo acil-enzima con cierta geometría en la zona del sitio activo propia que determinará a qué tipo de molécula le será más accesible el complejo para completar la reacción.

El comportamiento observado al evaluar la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con alcoholes primarios y secundarios empleando el catalizador comercial Novozym® 435 está de acuerdo con lo reportado por Arroyo y colaboradores [8, 9]. En este sentido se

evidenció una mayor actividad enzimática al emplear alcoholes primarios (etanol y 1-propanol) respecto al empleo de 2-propanol, atribuible a impedimento estérico según reportes de modelado molecular. La actividad hallada al emplear 2-propanol fue baja pero no nula, en discrepancia con lo reportado por los grupos de investigación de López-Belmonte y Ying Liu quienes estudiaron la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con diversos alcoholes empleando catalizadores basados en lipasa de *Rhizomucor miehei* y *Candida sp*, encontrando actividad únicamente al emplear alcoholes primarios [2, 3].

Al estudiar la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con 1,00 ml de alcohol se obtuvo una diferencia importante en cuanto a la conversión alcanzada en 48 horas de reacción al emplear etanol (59,83 %) y 1-propanol (78,5 %), sin diferencias en cuanto a la enantioselectividad (eeS % = 51,33 % y 54,4 %, respectivamente).

Los reportes hallados respecto del efecto de la naturaleza de los alcoholes primarios lineales en la esterificación enzimática de profenos es bastante homogénea en cuanto a la tendencia de disminución de actividad enzimática y selectividad al aumentar la longitud de la cadena carbonada del alcohol, observándose este comportamiento en los escasos reportes que emplean etanol [2, 5-7,16]. El efecto sobre el avance de reacción se justifica en base a diferencias en velocidad de difusión hacia la lipasa inmovilizada y diferencias de nucleofilicidad de los alcoholes: al aumentar la longitud de la cadena carbonada disminuye la nucleofilicidad del alcohol y se hacen más importantes los impedimentos estéricos [16].

Cabe destacar que dichos reportes comparan performances obtenidas al emplear iguales concentraciones (mM) de los distintos alcoholes, es decir, se conserva constante la relación molar alcohol:ácido. En este trabajo de Tesis, al presentar los resultados se compararon performances obtenidas al emplear un mismo volumen de alcohol (1,00 ml) que no se corresponde con una misma relación molar (etanol:ibuprofeno = 7,08:1 y propanol:ibuprofeno = 5,50:1). Sin embargo, al estudiar el efecto del volumen de alcohol se encontró un efecto negativo mucho más importante al emplear 1-propanol respecto de etanol. Así, si se comparan los valores de conversión y exceso enantiomérico obtenidos al emplear una relación molar

alcohol:ácido 7,08:1 en etanol (X % = 59,83 %, eeS % = 51,33 %) y 1-propanol (X % = 40,37 %, eeS % = 20,60 %) los resultados concuerdan con el comportamiento reportado por los autores referenciados.

En este sentido, Ong y colaboradores reportan que la longitud de cadena del alcohol afecta significativamente la reacción de esterificación, observando que al aumentar el número de átomos de carbono del alcohol disminuye la relación molar alcohol:ácido requerida para lograr un determinado nivel de conversión [18]. En este sentido las relaciones molares requeridas para alcanzar conversiones del 70 % en esterificaciones de (R/S)-ketoprofeno con la lipasa B de *Candida antártica* fueron 4:1 para etanol, 3:1 para n-propanol y 1:1 para n-butanol.

En base a los valores de conversión y eeS % hallados al emplear alcoholes de tres átomos de carbono, se seleccionó al 1-propanol para evaluar la estabilidad de Novozym® 435. La figura 8 muestra de forma comparativa la estabilidad catalítica de Novozym® 435 al emplear etanol y 1-propanol sin empleo de co-solventes en la esterificación de (R/S)-ibuprofeno. Los resultados hallados indican que la estabilidad es mayor en etanol presentándose un 62 % de actividad remante respecto al primer ciclo de reacción en comparación con un 12,5 % de actividad remanente al emplear 1-propanol.

Finalmente, dado que el objetivo central de esta Tesis consiste en hallar una ruta limpia y rentable de resolución de (R/S)-ibuprofeno, se consultaron bases de datos sobre toxicidad y límites de exposición permitidos a los alcoholes y solventes estudiados, información mostrada en la figura 9, como también bases de datos sobre producción Argentina y exportación de los distintos químicos evaluados en la esterificación de (R/S)-ibuprofeno la información obtenida se muestra en las figuras 10 y 11 [19, 20].

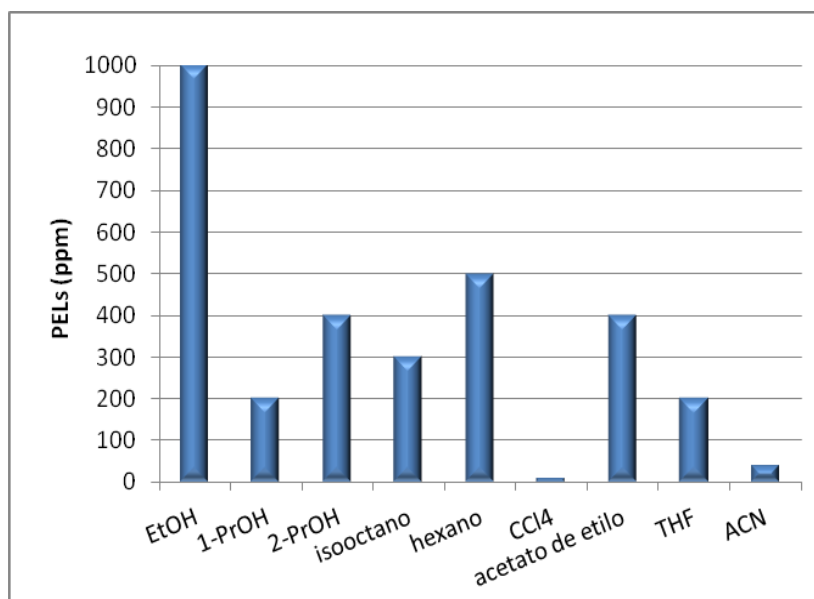


Figura 9. Límites de Exposición Permitidos (PELs) a los diversos solventes orgánicos empleados [19]. Se muestran los límites máximos de exposición permitidos expresados en ppm, los cuales corresponden a jornadas de trabajo de 8 a 12 horas por día.

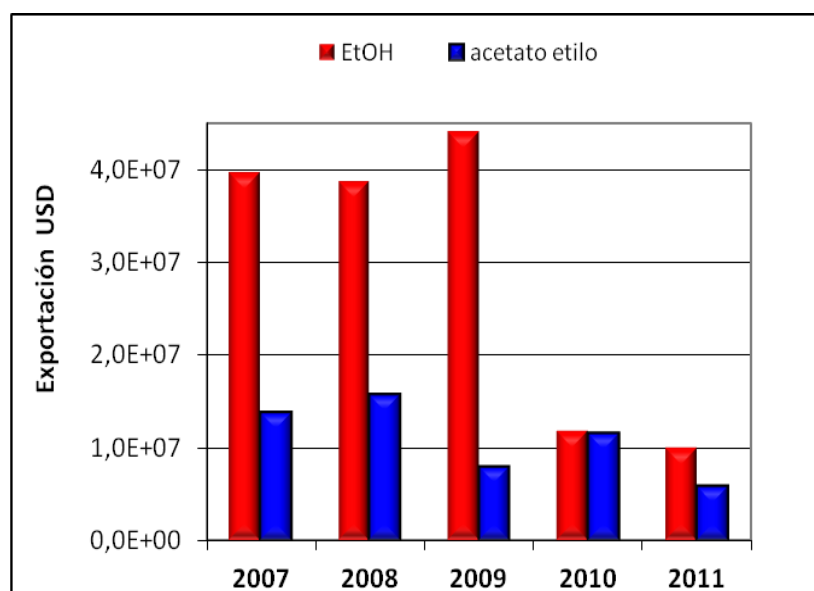


Figura 10. Evolución temporal de la exportación Argentina de etanol y acetato de etilo.

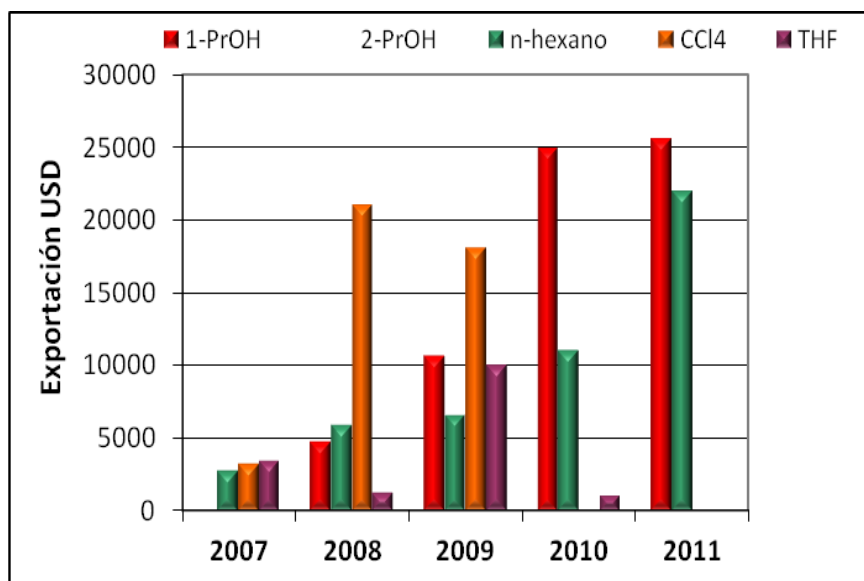


Figura 11. Evolución temporal de la exportación Argentina de distintos compuestos evaluados en la esterificación de ibuprofeno racémico

Esta información claramente evidencia que la resolución de profenos empleando etanol como sustrato y solvente resulta en una ruta sustentable y ecocompatible.

7.5. CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas a partir de los resultados expuestos en este capítulo son las siguientes:

- La conversión de ibuprofeno y la enantioselectividad hacia el isómero S(+) en la esterificación catalizada por Novozym® 435 se incrementan con el contenido de etanol en presencia de co-solventes.
- Las propiedades hidrofóbicas /hidrofílicas y de solvatación de solventes (que no actúan como sustratos) tienen influencia en la actividad del catalizador Novozym® 435.

- Debe destacarse al acetato de etilo y como posible co-solvente a emplear en la resolución de R/S-ibuprofeno por esterificación con etanol catalizada por Novozym® 435. En este sentido, deben completarse estudios de modo de optimizar las condiciones de reacción con el fin de aumentar la conversión de la reacción, ya que este sistema evidenció un comportamiento enantioselectivo. Además, son buenos los niveles de producción nacional como también los límites de exposición permitidos a este solvente.
- Etanol y n-propanol pueden utilizarse como sustratos y solventes con rendimientos comparables a los obtenidos en presencia de co-solventes.
- En términos de estabilidad catalítica, el empleo de etanol es la mejor opción (62 % de actividad remanente vs 12,5 % al emplear 1-propanol).
- Los alcoholes de cadena corta afectan la integridad de Novozym® 435 provocando pérdida de enzima (pérdida de actividad catalítica) y contaminación del sistema.
- La producción nacional de etanol y su moderado impacto ambiental garantizaría la sustentabilidad de una tecnología de resolución racémica de profenos.

7.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. CAPÍTULO 7

[1] Kim M.G., Lee S.B., *J. Ferment. Bioeng.* 1996, 83, 269-271.

[2] Liu Y., Wang F., Tan T.W., *J. Mol. Catal. B: Enz.* 2009, 56, 126-130.

[3] López-Belmonte M.T., Alcántara A.R., Sinisterra J.V., *J. Org. Chem.* 1997, 62, 1831-1840.

[4] Carvalho P.O., Contesini F.J., Bizaco R., Calafatti S.A., Macedo G.A., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 33, 713-718.

[5] Zhao D-t., Er-na X., Jia-xin W., Ren W., Xiao-fei W., Lei W., Zhi W., *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2011, 16, 638-644.

-
- [6] D'Antona N., Lombardi P., Nicolosi G., Salvo G., *Process Biochem.* 2002, 38, 373-377.
- [7] Ceynowa J., Rauchfleisz M., *J. Mol. Catal. B: Enz.* 2003, 23, 43-51.
- [8] Arroyo M., Sinisterra J.V., *J. Org. Chem.* 1994, 59, 4410-4417.
- [9] Arroyo Sánchez M., Tesis doctoral "Síntesis de ácidos 2-aril-propiónicos homoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas", 1995, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid, España.
- [10] Sangster J., *J. Phys. Chem. Ref. Data* 1989, 18, 1111-1227.
- [11] Lee W.H., Kim K.J., Kim M.G., Lee S.B., *J. Ferment. Bioeng.* 1995, 80, 613-615.
- [12] Persson M., Costes D., Wehtje E., Adlercreutz P., *Enz Microb. Technol.* 2002, 30, 916-923.
- [13] Klibanov A.M., *TIBTECH* 1997, 15, 97-101.
- [14] Laane C., Boeren S., Voos K., Veeger C., *Biotechnol. Bioeng.* 1987, 30, 81-87.
- [15] José C., Bonetto R.D., Gambaro L.A., Guauque Torres M.P., Foresti M.L., Ferreira M.L., Briand L.E., *J. Mol. Catal. B: Enz.* 2011, 71, 95-107.
- [16] Ong A.L., Chuan Fu K., Kamaruddin A.H., Bhatia S., Proceedings of the 1st International Conference on Natural Resources Engineering & Technology, 2006, Putrajaya, Malaysia, 186-194.
- [17] <http://toxnet.nlm.nih.gov/>
- [18] Ong A.L., Kamaruddin A.H., Bhatia S., Long W.S., Lim S.T., Kumari R., *Enz. Microb. Technol.* 2006, 39, 924-929.
- [19] <http://www.osha.gov>
- [20] Base de datos de importaciones y exportaciones SCAVAGE 2012 (<http://www.scavage.com/trade>).

CAPITULO 8

INVESTIGACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE NOVOZYM®435 EN LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL

8.1. INTRODUCCION

A través de los estudios que fueron desarrollados en los capítulos 5 y 6 de esta Tesis se evidenció que tanto el etanol como mezclas etanol-agua disuelven-disgregan el polimetilmetacrilato (PMMA), soporte de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) en el biocatalizador comercial Novozym® 435, independientemente de las condiciones investigadas. Además el alcohol difunde al interior de las esferas de catalizador quedando fuertemente adsorbido (la desorción del alcohol ocurre únicamente por calentamiento a temperaturas ≥ 150 °C) [1]. Las investigaciones demostraron que un 16,6 % de la masa inicial de biocatalizador se pierde por contacto con etanol (o mezclas etanol-agua) durante cuatro ciclos de 48 horas a 45 °C. La acción del etanol sobre la integridad de la resina PMMA también fue determinada en base a estudios de textura interna del catalizador. En este sentido, el análisis microscópico de secciones transversales de las esferas de biocatalizador evidenció un incremento de la rugosidad y de la estructura porosa del material por contacto con el alcohol.

Adicionalmente, el etanol (con o sin agua agregada) modificó la estructura secundaria de la enzima, provocando una disminución de α hélice, aumento de las láminas β y de los giros β .

Las conclusiones obtenidas desde las investigaciones presentadas previamente en este trabajo evidencian que la desactivación observada de Novozym® 435 en contacto con alcoholes no puede ser explicada fácilmente debido a la existencia de una multiplicidad de efectos que dan cuenta de tal fenómeno. En este contexto, se aplicó una metodología similar para investigar la estabilidad de Novozym® 435 en la producción de biodiesel bajo condiciones industriales de operación. Esta investigación se realizó en colaboración con la empresa Piedmont Biofuels (Carolina del Norte, EEUU) que realizó las reacciones de esterificación para la obtención de biodiesel y proveyó las muestras de biocatalizador luego de usadas en los ensayos que se describen en las próximas secciones.

El **biodiesel** se define como una mezcla de monoacilésteres de ácidos grasos de cadena larga de origen vegetal o animal para su uso en combustión. Este biocombustible constituye una alternativa viable para la obtención de energía limpia y renovable [2].

El biodiesel puede ser utilizado como un sustituto directo, o mezclado con diesel de petróleo, y ofrece varias ventajas ambientales incluyendo una disminución de hasta un 80 % de emisiones de CO₂, menor liberación de CO, compuestos orgánicos volátiles (COV) y partículas en la combustión. Un obstáculo importante para la producción competitiva de biodiesel a gran escala es el costo de la materias prima (aceite virgen), lo que puede contribuir a casi el 90 % de los costos totales de producción [3].

Convencionalmente el biodiesel se produce utilizando catalizadores básicos los cuales presentan problemas de recuperación del catalizador y corrosión. Además, tales catalizadores requieren aceites con bajo contenido de ácidos grasos libres (FFA) que poseen costo elevado. En este contexto, la catálisis enzimática se ha explorado recientemente con buenos resultados demostrando ser un sistema que proporciona grandes ventajas en el proceso como: mayor seguridad, pueden usarse materias primas de menor calidad, el producto y subproducto se obtienen con mayor grado de pureza y los procesos enzimáticos son generalmente más limpios y ecológicos [2, 3].

Como ya es bien conocido el biodiesel es producido por esterificación de ácidos grasos o transesterificación de grasas y aceites con alcoholes de cadena corta y bajo costo [4]. En este sentido, el metanol y el etanol son los alcoholes empleados mayoritariamente en producción de biodiesel debido a su bajo costo respecto a alcoholes de cadena más larga, si bien se ha reportado la inhibición de lipasas por estos alcoholes. La relación molar a la cual ocurre la inhibición depende del alcohol y lipasa utilizada, también de la temperatura de reacción, así como de la presencia y tipo de disolvente [3].

La revisión de investigaciones dedicadas a la producción enzimática de biodiesel establece claramente que la relación molar entre el aceite o grasa y el alcohol influencia la vida útil enzimática y es un parámetro clave a tener en cuenta en el screening de enzimas para aplicación en producción de biodiesel.

Si bien muchas publicaciones científicas evidencian que la performance catalítica de las lipasas, tanto libres como inmovilizadas (Novozym® 435), es severamente afectada por metanol y etanol, ninguna de ellas se ocupó de investigar las causas de la inhibición [4-7]. Tales investigaciones se centraron en cómo minimizar o eliminar la inhibición en vez de explicar por qué ocurre y cuál es la consecuencia en la calidad del producto. Las investigaciones de la presente Tesis proporcionan importante información respecto al efecto de la relación molar de sustratos, la presencia de humedad y el contacto del biodiesel sobre Novozym® 435 durante la producción de biodiesel. En este contexto se estudió la integridad física (pérdida de soporte polimérico y/o enzima en el medio de reacción) del biocatalizador, las modificaciones de textura interna y externa, y el efecto sobre la estructura secundaria de la enzima.

8.2. MATERIALES Y METODOS

8.2.1. Esterificación de ácidos grasos libres

Dos muestras de 0,2 gramos de Novozym® 435 (batch LC200229) fueron reusadas 92 (muestra denominada 218 en el siguiente texto) y 117 veces (muestra denominada 219) respectivamente en la producción de biodiesel por esterificación con metanol a 65 °C durante 2 horas. En cada ciclo de reacción se emplearon 44 ml de una mezcla conteniendo 4,2 % de ácido oleico (libre) y 0,46 % de metanol agregado al comienzo de la reacción. En el caso de la esterificación realizada con la muestra 218 se realizó la eliminación continua de humedad a través del proceso FAeSTER (patente pendiente de la empresa Piedmont Biofuels). Por el contrario, en la esterificación con la muestra 219 no se eliminó la humedad [8].

Luego de cada reacción y un minuto de decantación, se tomaron 15 ml de medio de reacción y se filtraron con papel de 2,5 µm. Tal procedimiento fue repetido luego de 30 minutos de decantación adicional a los fines de determinar la cantidad de material particulado que permanece en suspensión sin ser eliminado por gravedad.

Una tercer muestra llamada 220 fue usada en una esterificación de materia prima conteniendo 15 % de ácidos grasos libres (mezcla de aceite de soja y ácido oleico) con 1,58 % en peso de metanol adicionada al comienzo de la reacción.

Adicionalmente una muestra de Novozym® 435 se probó en un reactor a escala piloto, por lo que esta muestra es llamada “piloto” a lo largo del texto. En este caso la reacción se llevó a cabo durante 2 horas (un único ciclo de reacción) a 65 °C, por agitación por burbujeo, con 4 % de ácidos grasos libres y 0,23 ml de metanol. El reactor escala piloto empleado posee un tanque de reacción de acero inoxidable (132,5 litros), con eliminación continua de glicerol, aceite y purificación de biodiesel.

Novozym® 435 saturada en biodiesel por 4 horas se empleó como referencia (muestra denominada “control” en adelante). El biodiesel es el producto comercial de Piedmont Biofuels que contiene < 0,08 % de ácidos grasos libres y < 0,05 % metanol, de acuerdo con las especificaciones la ASTM [9].

8.2.2. Procedimiento para el tratamiento de las esferas de Novozym® 435

Las muestras de Novozym® 435 denominadas control, 218, 219, y piloto se lavaron con tert-butanol (Sigma Aldrich 99,0 %) con el fin de remover residuos de aceites, glicerol y biodiesel adsorbidos sobre las esferas de catalizador. Las muestras se lavaron tres veces empleando aproximadamente 1 ml de alcohol en el recipiente y luego se filtraron a través de un filtro de papel convencional. Posteriormente las esferas de biocatalizador fueron lavadas con agua destilada para eliminar el alcohol que cristaliza a temperatura ambiente. Luego se dejaron secar en desecador a temperatura ambiente.

Se determinó la estructura secundaria de la enzima inmovilizada en el biocatalizador comercial inicial, Novozym® 435, muestra control (esferas embebidas en biodiesel) y muestras de biocatalizador empleado en la producción de biodiesel bajo distintas condiciones de operación industrial (muestra 218, 219, piloto). Dichos estudios se realizaron mediante análisis de infrarrojo (FTIR). Las condiciones de operación, equipo

empleado, metodología de deconvolución de espectros y asignación de señales fueron debidamente detalladas en el Capítulo 5, sección 5.6.2.

Adicionalmente, el diámetro de las esferas de biocatalizador y la morfología interna y externa de las mismas fueron determinadas mediante estudios de microscopía electrónica. Tales determinaciones se realizaron sobre esferas de Novozym® 435 sin uso (inicial), muestra control y muestras de biocatalizador empleado en la producción de biodiesel bajo diferentes condiciones de reacción.

En el Anexo 4 se detallan los fundamentos teóricos de la microscopía electrónica y el capítulo 5 (sección 5.8.2.) posee toda la información acerca del equipo empleado, preparación de las muestras, análisis y obtención de parámetros texturales.

8.2.3. Análisis del medio de reacción

La figura 1 presenta esquemáticamente el procedimiento seguido en el estudio del material proveniente del medio de reacción y retenido en los papeles de filtro.

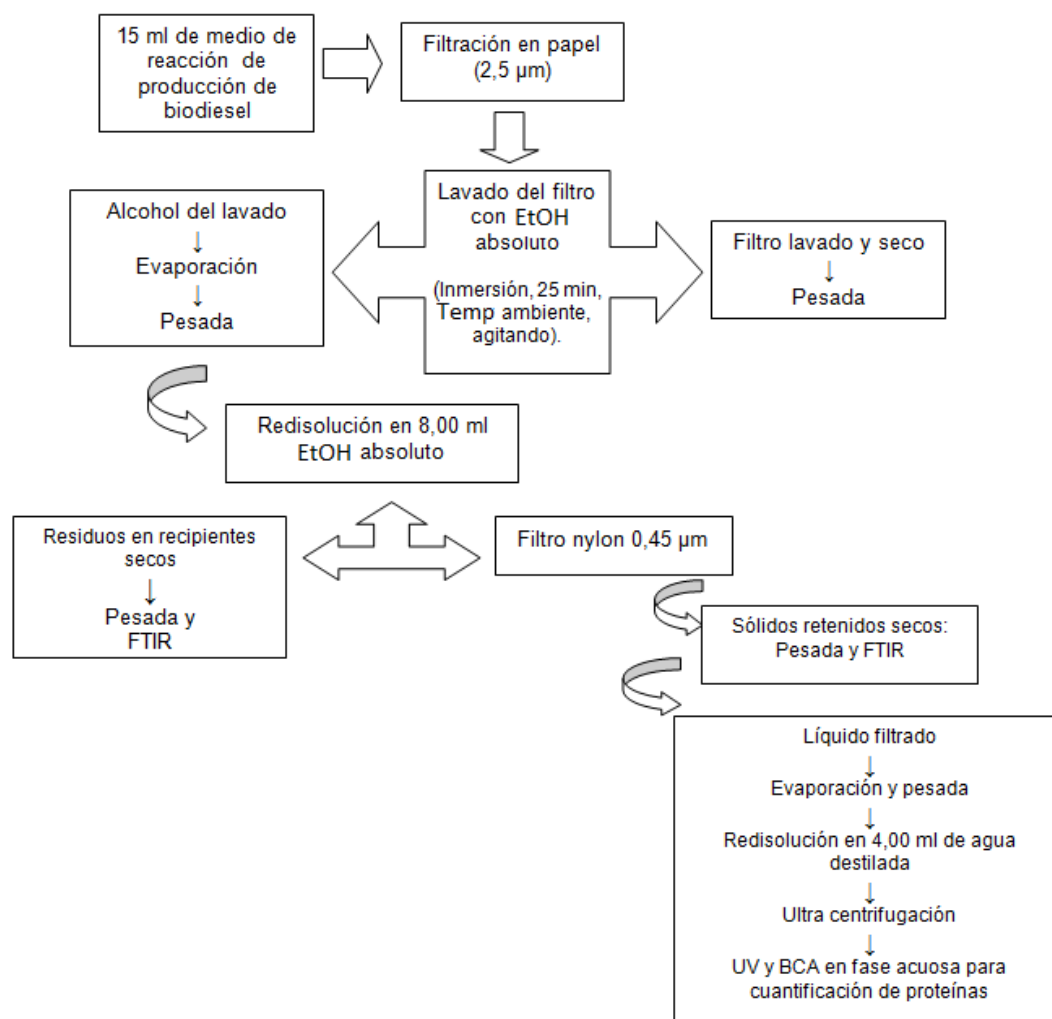


Figura 1. Estrategia de investigación para el análisis cuali y cuantitativo del material remanente en medio de reacción de la esterificación de ácidos grasos libres con metanol catalizada con Novozym® 435.

Cada filtro se pesó y se lavó con etanol anhidro (Carlo Erba grado HPLC) por 25 minutos a temperatura ambiente con el fin de remover el material retenido. Los filtros “lavados” se secaron (80 horas) y se pesaron nuevamente. El alcohol remanente del lavado se evaporó dejando un residuo oleoso con pequeñas partículas inmersas en él. Este material se pesó y se disolvió en 8,00 ml de etanol, posteriormente se realizó una filtración a través de filtros de nylon de 0,45 µm (Osmonic). Estos filtros se secaron,

pesaron y el material retenido en ellos se analizó por espectroscopia infrarroja FTIR. Por otro lado, la fase líquida resultante de esta filtración (0,45 µm) se llevó a sequedad, los residuos sólidos se pesaron y posteriormente se redisolieron en 4,00 ml de agua destilada. La fase acuosa se ultracentrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm en una centrifuga Spectrafuge 16M Labnet con la finalidad de separar la fase acuosa de una capa oleosa restante. A continuación se realizaron estudios por espectroscopia UV-Visible en el rango 200 nm a 400 nm y la determinación de proteínas en la fase acuosa por medio del ensayo de ácido bicinconínico. En ambos estudios se empleó un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda35.

8.2.4. Cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico

Tal como se mencionó previamente la cantidad de proteína recuperada desde el medio de reacción se cuantificó por medio del ensayo de ácido bicinconínico. Los fundamentos de esta técnica se detallaron anteriormente en el capítulo 5 de esta Tesis (sección 5.9.3).

La curva de calibración empleada corresponde a la previamente reportada en el capítulo 5 de esta tesis, es decir, la calibración obtenida aplicando la técnica de ácido bicinconínico a soluciones de CALB de alta pureza en agua destilada. La curva de calibración fue realizada en un intervalo de concentraciones de CALB comprendido entre 0 y 195,6 µg/ml empleando 9 soluciones de referencia. La ecuación obtenida para la curva de calibración es la siguiente:

$$A_{562} = 0,0029 * \text{Prot } (\mu\text{g/ml}) + 0,0354$$

$$r^2 = 0,9917$$

8.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.3.1. Ensayos de estabilidad de Novozym® 435 en producción de biodiesel

La figura 2 muestra el rendimiento catalítico de dos muestras de Novozym® 435 testeadas en la esterificación de materia prima de alimentación conteniendo 4 % de ácidos grasos libres con 0,46 % de metanol con y sin eliminación continua de humedad (muestras 218 y 219 respectivamente). Adicionalmente, la figura 2 muestra la esterificación de 15 % de ácidos grasos libres con 1,58 % de metanol sin eliminación de humedad (muestra 220). En ambos casos se mantiene aproximadamente constante la relación entre los ácidos grasos libres y el metanol.

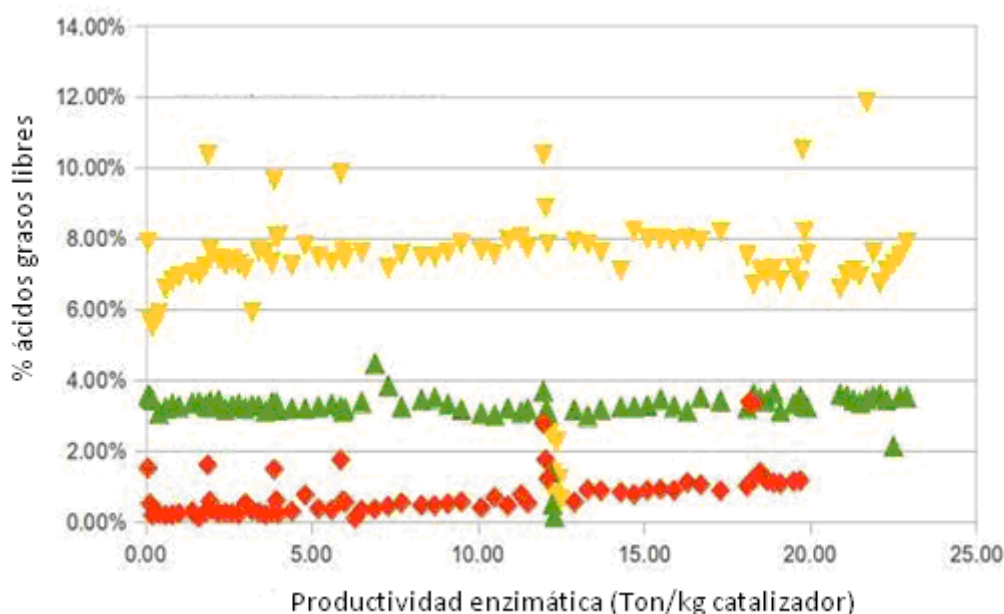


Figura 2. Rendimiento catalítico de Novozym® 435 en diferentes condiciones de reacción. ◆ 4 % ácidos grasos libres; 0,46 % MeOH con FAeSTER (Muestra 218), ▲ 4 % ács. grasos libres, 0.46 % MeOH sin FAeSTER (Muestra 219), ▼ 15 % ács. grasos libres, 1,58 % MeOH sin FAeSTER (Muestra 220). En todos los casos se emplearon 0,5 % p/p de biocatalizador, 120 minutos de reacción, 65 °C.

Los datos corresponden al porcentaje de ácidos grasos no convertidos luego de las 2 horas de reacción en función de la productividad enzimática calculada como la cantidad de biodiesel producido (en toneladas) por kg de biocatalizador en cada ciclo de 2 horas. Los puntos con resultados atípicos corresponden a 40 y 80 minutos de prueba.

El conjunto de puntos pertenece a 92 ciclos de reacción consecutivos de la muestra 218 y a 117 ciclos de reacción en el caso de las muestras 219 y 220. La muestra 218 sufre la pérdida de actividad más notable ya que la cantidad de ácidos grasos libres que queda en el medio de reacción aumenta continuamente a partir del ciclo 83. Los niveles de humedad fueron inferiores a los 100 ppm a lo largo de los experimentos, por lo tanto la pérdida de actividad no se relaciona con el nivel de humedad en este sistema de reacción. Además, el medio de reacción muestra partículas más finas que lo observado en las otras muestras. Estas partículas, cuya naturaleza se describe en secciones siguientes, permanecen en suspensión durante largos periodos de tiempo y solo pueden eliminarse con la corriente de líquido que abandona el reactor.

Con el fin de disponer de medidas comparables de desactivación de todas las muestras, cada una de ellas se hizo reaccionar empleando el método FAeSTER con las mismas condiciones luego del ciclo 60 de reacción. En este contexto, las muestras 219 y 220 se enjuagaron con el material de alimentación conteniendo 4 % de ácidos grasos libres con el fin de eliminar cualquier resto de aceite o agua. La muestra 220 se hizo reaccionar dos veces con la mezcla conteniendo 4 % de ácidos grasos libres usando el método FAeSTER (120 minutos cada ciclo de reacción). La figura 3 muestra el porcentaje de ácidos grasos no convertidos que permanecen en el medio de reacción en función de la productividad enzimática bajo condiciones de remoción de humedad mediante el método FAeSTER.

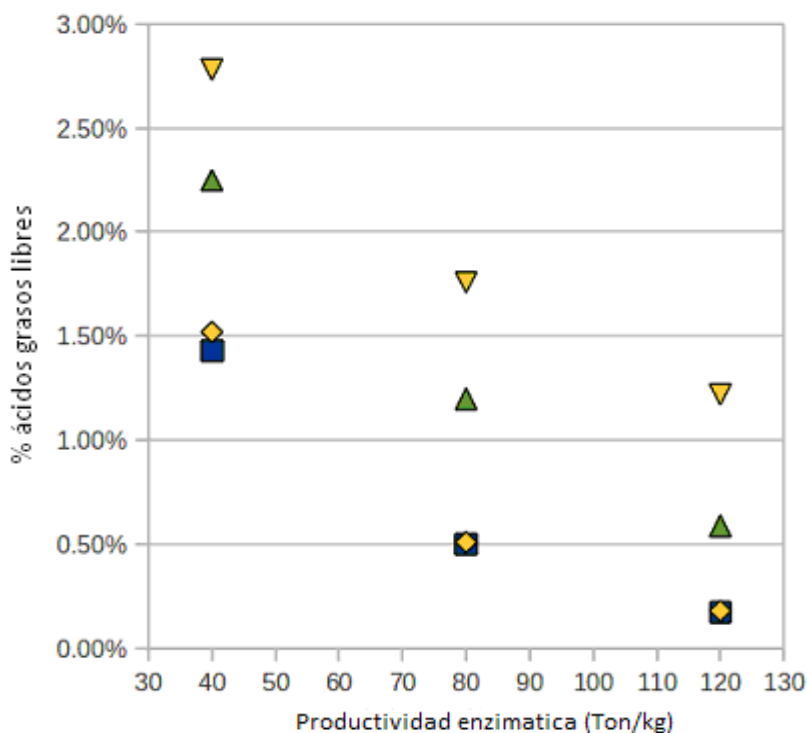


Figura 3. Comparación del rendimiento catalítico de distintas muestras de Novozym®435. ◆ 4 % ácidos grasos libres con FAeSTER, 1^{er} ciclo; ▼ 4 % ács. grasos libres con FAeSTER, 60^{mo} ciclo; ■ 4 % ács. grasos libres sin FAeSTER, 60^{mo} ciclo; ▲ 15 % ács. grasos libres sin FAeSTER, 60^{mo} ciclo.

Los resultados correspondientes al primer ciclo de 120 minutos de reacción llevado a cabo con materia prima conteniendo un 4 % ácidos grasos empleando el método FAeSTER muestran una alta conversión hacia biodiesel. Sin embargo, se observa desactivación del catalizador al ser reutilizado en sucesivos ciclos bajo aplicación del método FAeSTER respecto a la operación sin remoción de humedad. La figura 3 muestra claramente que la conversión obtenida en el ciclo 61 de la muestra 219 (60 ciclos previos sin aplicación de FAeSTER) es mayor a la conversión obtenida si durante los 61 batchs se aplica la remoción de humedad (muestra 218). También se aprecia la disminución de la conversión obtenida en el ciclo 61 respecto al primer ciclo de reacción para la muestra 218.

Vale la pena notar que la actividad catalítica de Novozym® 435 se mantiene estable cuando la humedad no se elimina de la mezcla de reacción. Estas observaciones están

de acuerdo con el reporte de Kaieda y colaboradores, quienes al evaluar el efecto del contenido de metanol y de agua en la producción de biodiesel empleando lipasas de diverso origen observaron inhibición enzimática a altos contenidos de metanol y un efecto protector del agua respecto a la inhibición por alcohol [10].

La reacción llevada a cabo con un material de alimentación conteniendo 15 % ácidos grasos libres y sin remoción de humedad mostró un comportamiento similar al obtenido utilizando un 4 % de ácidos grasos libres sin FAeSTER. Una vez más, los resultados evidencian que la presencia de humedad juega un rol importante en la estabilidad catalítica de Novozym® 435.

8.3.2. Evidencias de la degradación de Novozym® 435 en el medio de reacción

Los resultados descritos en la sección anterior evidencian claramente la desactivación de Novozym® 435 al reutilizarse cuando se elimina humedad del medio de reacción. En este contexto, la estabilidad física y enzimática del biocatalizador se evaluó con el fin de obtener conocimientos fundamentales que permiten correlacionar el rendimiento catalítico y las propiedades intrínsecas del catalizador.

En primer lugar, todos los medios de reacción se investigaron con el fin de determinar si alguno de los materiales constitutivos del biocatalizador (proteína y/o PMMA) se encontraban presentes en el mismo indicando la degradación del biocatalizador. Como un segundo enfoque, las esferas de biocatalizador se sometieron a estudios con el fin de determinar la estructura secundaria de la enzima inmovilizada y parámetros de textura (secciones 8.3.4 y 8.3.5 respectivamente).

El medio de reacción se filtró luego de la reacción y la presencia de partículas y/o material enzimático se investigó luego de remover el biodiesel tal como se describió previamente en la sección 8.2.3. En la tabla 1 se presenta la cantidad de residuo recuperado por unidad de volumen de medio de reacción luego de 1 minuto y 30 minutos de finalizada la reacción junto con el contenido de proteína

Tabla 1. Cantidad de residuos sólidos y proteína hallados en el medio de reacción debido a la degradación de Novozym® 435 durante la producción de biodiesel con y sin remoción de humedad mediante el método FAeSTER.

Novozym® 435	Tiempo de recolección ¹	Concentración de residuos en % p/v ²					proteína perdida [mg/100ml]
		Biodiesel + PMMA + enzima + otros	Residuo no soluble en etanol (PMMA) ³	Residuo soluble en etanol	No soluble en agua ni en etanol (aceite, biodiesel)		
218 con FAeSTER	1 min	1,36	1.28	----	0.08	11,88	
	30 min	1,19	0.15	0.90	0.14	11,01	
218 sin FAeSTER	1 min	1,39	0.10	1.11	0.18	8,68	
	30 min	1,36	0.35	0.86	0.15	8,82	
219 con FAeSTER	1 min	1,31	0.11	1.08	0.12	10,76	
	30 min	1,49	0.16	1.14	0.19	9,04	
219 sin FAeSTER	1 min	1,35	0.13	1.08	0.14	15,08	
	30 min	1,47	0.22	1.05	0.20	9,27	

¹ Se tomó muestra de reacción a 1 minuto y 30 minutos de finalizada la reacción.

² El porcentaje p/v de residuo sólido fue determinado en 15,00 ml de medio líquido y extrapolado a 100 ml.

³ Los valores corresponden a la diferencia entre residuos insolubles totales y residuos solubles.

Como se esperaba, el medio de reacción evidencia la presencia de un componente oleoso (no soluble en agua, no retenido en filtros de 0,45 μm). Sin embargo, además de este componente se encontraron otros dos: un residuo sólido no soluble en etanol retenido por filtros de 0,45 μm y un residuo soluble en agua. La mayor cantidad de residuo sólido no soluble (1,28 % p/v) pertenece a la muestra 218 que se utiliza con remoción continua de agua y sufre desactivación al ser reutilizada. Este residuo no soluble contiene matriz polimérica de las esferas de biocatalizador tal como se evidencia mediante estudios de FTIR que se describen en la próxima sección.

El análisis UV-Visible de los residuos solubles en agua se presenta en la figura 4.

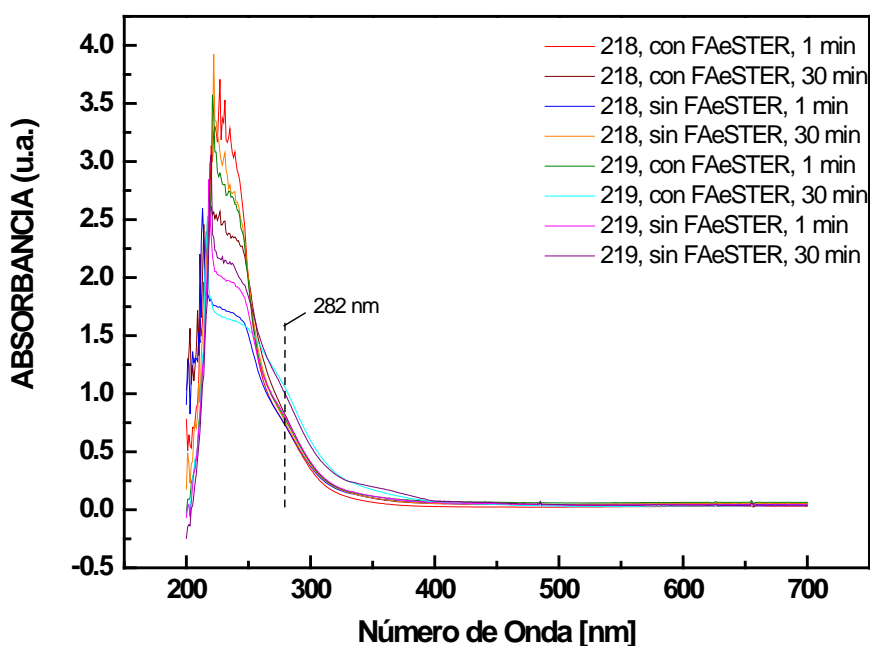


Figura 4. Espectros UV-Vis de residuos solubles en agua obtenidos del medio de reacción de la esterificación ácidos grasos libres con metanol catalizada con Novozym® 435, a 65 °C, con y sin remoción de humedad (FAeSTER), luego de 1 min y 30 min de finalizada la reacción.

El mismo muestra la presencia de señales características de ciertos componentes de Novozym® 435, como una señal amplia e intensa atribuida a ácido sórbico (258 nm) y ácido benzoico (230 nm) usados como conservantes en la fabricación del biocatalizador en estudio. Además, un hombro observado a 282 nm correspondería a la absorbancia de aminoácidos aromáticos de la proteína.

Más evidencias de la presencia de proteínas fueron obtenidas a través de su cuantificación mediante el ensayo de ácido bicinconínico que indica una concentración de 0,09 mg/ml a 0,15 mg/ml de proteína en el medio de reacción, independientemente de las condiciones operativas (ver Tabla 1).

8.3.3. Evidencias de la pérdida de matriz polimérica de Novozym® 435

La naturaleza de los residuos recuperados desde el medio de reacción se determinó mediante espectroscopia infrarroja. Las figuras 5A y 5B muestran los espectros infrarrojos de los sólidos recuperados desde los filtros, junto a los espectros de infrarrojo del aceite recuperado desde las esferas de catalizador luego del lavado con tert-butanol, el soporte polimérico PMMA y la lipasa B de *Candida antarctica*.

La tabla 2 resume las posiciones de las bandas y las asignaciones de las señales de infrarrojo.

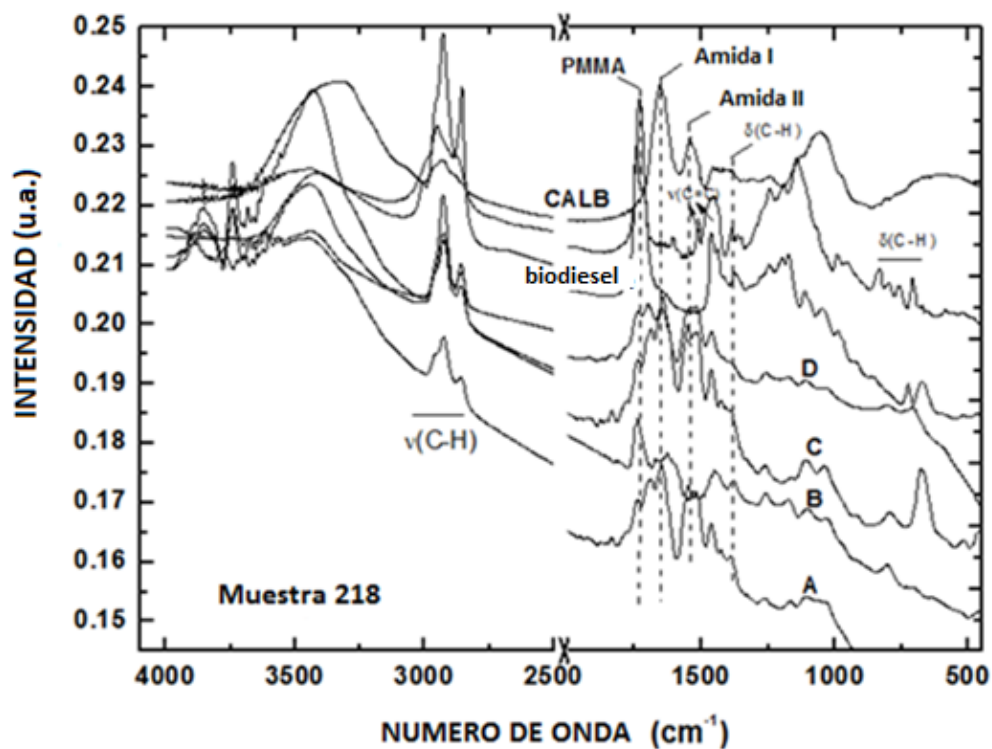


Figura 5A. Espectros infrarrojos de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB), soporte Lewatit VP OC1600 de polimetilmetacrilato (PMMA), biodiesel y residuos del medio de reacción al emplear la muestra de biocatalizador 218. Estos espectros corresponden a las siguientes condiciones de operación: A y B reacción sin FAeSTER, muestras filtradas luego de 1 min y 30 minutos de decantación respectivamente. C y D reacción con FAeSTER, muestras filtradas luego de 1 min y 30 minutos de decantación respectivamente.

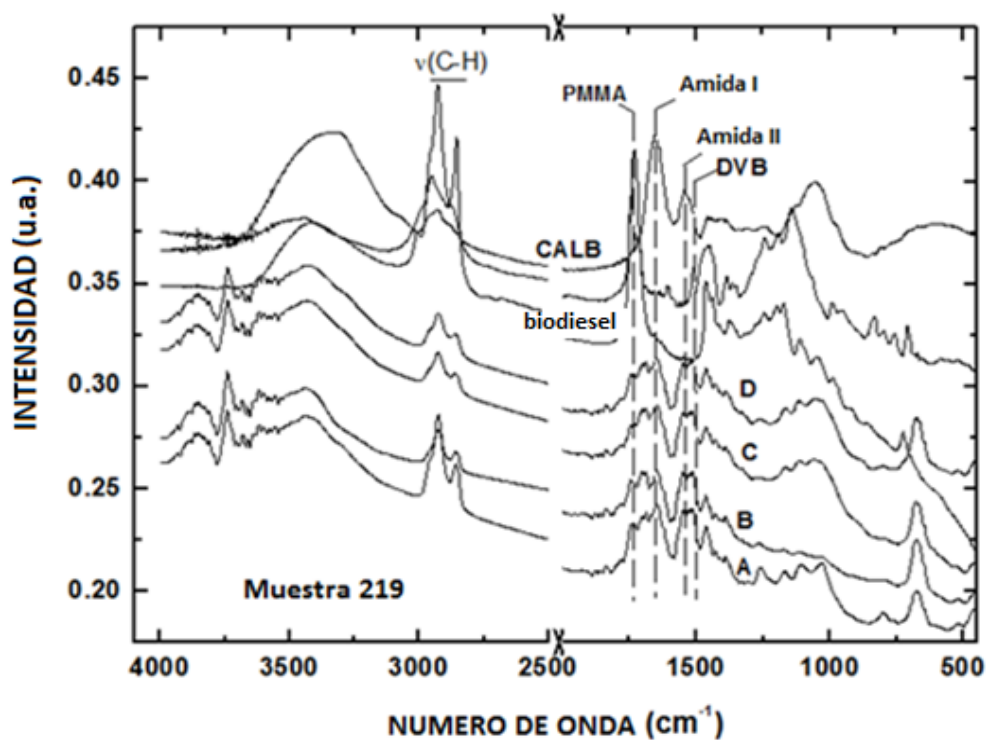


Figura 5B. Espectros infrarrojos de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB), soporte Lewatit VP OC1600 de polimetilmetacrilato (PMMA), biodiesel y residuos del medio de reacción al emplear la muestra de biocatalizador 219. Estos espectros corresponden a las siguientes condiciones de operación: A y B reacción sin FAeSTER, muestras filtradas luego de 1 min y 30 minutos de decantación respectivamente. C y D reacción con FAeSTER, muestras filtradas luego de 1 min y 30 minutos de decantación respectivamente.

Tabla 2. Resumen de la naturaleza de grupos orgánicos, y sus correspondientes señales de infrarrojo, que se detectaron en Novozym®435, Lewatit VP OC, lipasa B de *Candida antarctica*, residuo de biodiesel (residuo oleoso) y sólidos recuperados del medio de la reacción de esterificación de ácidos grasos libres con metanol.

	v(O-H)	v(C-N)	v(CH ₃)	v(C=O)	Amida I	Amida II	Anillo aromático v(C=C)	δ _{as} (C-H)	δ _s (C-H)	v _{as} (C-O)	ω(CH ₂) τ(CH ₂) ¹	Fuera del plano δ(C-H) ²	δ(CH ₂) _n
Lipasa CALB		3331 cm ⁻¹	2928 cm ⁻¹		1653 cm ⁻¹	1540 cm ⁻¹							
Lewatit VPOC	3436 cm ⁻¹		2950 cm ⁻¹ ; 2875 cm ⁻¹	1731 cm ⁻¹			1510 cm ⁻¹ 1454 cm ⁻¹	1387 cm ⁻¹	1361 cm ⁻¹		1269-1145 cm ⁻¹	991, 969(s), 834, 800, 757, 709 cm ⁻¹	
Residuo oleoso	3417 cm ⁻¹		3002 cm ⁻¹ 2928 cm ⁻¹ ; 2858 cm ⁻¹	1742 cm ⁻¹ ; 1713 cm ⁻¹				1463-1350 cm ⁻¹	1350-1150 cm ⁻¹	1300-1000 cm ⁻¹			724 cm ⁻¹
Sólidos recuperados	3437 cm ⁻¹		2958 cm ⁻¹ ; 2857 cm ⁻¹	1741 cm ⁻¹ ; 1692 cm ⁻¹	1646 cm ⁻¹	1552 cm ⁻¹	1510 cm ⁻¹ ; 1463 cm ⁻¹	1384 cm ⁻¹		1259-1039 cm ⁻¹		674 cm ⁻¹	

¹ ω(CH₂) y τ(CH₂) vibración flexión asimétrica fuera del plano y torción de grupos metilenos

² Flexión fuera del plano de grupos C-H aromáticos.

El soporte Lewatit VP OC1600 posee una intensa señal en 1731 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento de los grupos carbonilos del polimetilmetacrilato (PMMA). Además, se observaron señales intensas debidas al estiramiento asimétrico y simétrico de grupos metilo (2950 cm^{-1} y 2875 cm^{-1} respectivamente) y señales de intensidad débil asociadas a vibraciones de flexión asimétrica y simétrica de los grupos metilo (1387 cm^{-1} y 1361 cm^{-1} , respectivamente) [11]. Estas dos últimas señales son características de vibraciones de enlace C-H de grupos metilos y metilenos asociados a un carbono terciario tal como el de la resina PMMA. El conjunto de señales intensas observadas en el intervalo 1269 cm^{-1} a 1145 cm^{-1} son características de vibraciones de torsión $\omega(\text{CH}_2)$ y flexión $\tau(\text{CH}_2)$ de grupos metileno. La presencia de divinilbenceno como agente de entrecruzamiento se pone de manifiesto a través del doblete de intensidad media a 1510 cm^{-1} y 1454 cm^{-1} debido a las vibraciones de enlaces $\nu(\text{C}=\text{C})$ pertenecientes al anillo aromático. Adicionalmente, se observa un conjunto de señales débiles en el intervalo 834 cm^{-1} a 709 cm^{-1} que son características de vibraciones de flexión fuera del plano de enlaces $\delta(\text{C}-\text{H})$ de bencenos sustituidos con alquilos [11, 12]. El residuo oleoso (restos de biodiesel) posee dos bandas intensas en 1742 cm^{-1} y 1713 cm^{-1} atribuidas a vibraciones de estiramiento de los grupos carbonilo $\nu(\text{C}=\text{O})$ de las uniones éster (COOR) perteneciente a cualquiera de los ácidos grasos libres y al biodiesel [13, 14]. Además, las vibraciones asociadas a estiramiento de grupos $\nu(\text{CH}_3)$, $\nu(\text{CH}_2)$ y $\nu(\text{CH})$ aparecen en 3002 cm^{-1} , 2928 cm^{-1} y 2858 cm^{-1} , junto con las vibraciones de flexión de los grupos metileno $\delta(\text{CH}_2)_n$ de largas cadenas carbonadas a $1463-1350\text{ cm}^{-1}$, $1350-1150\text{ cm}^{-1}$ y 724 cm^{-1} .

El espectro infrarrojo de la lipasa B de *Candida antarctica* posee dos bandas intensas correspondientes a las bandas amida I y amida II centradas en 1653 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} respectivamente [15, 16]. Estas señales se observan en los residuos recuperados desde el medio de reacción constituyendo una fuerte evidencia de la pérdida de proteína desde Novozym® 435 durante la producción de biodiesel.

La superposición de las señales infrarrojas del grupo carbonilo (1730 cm^{-1}) de los ácidos grasos, biodiesel y PMMA hace difícil analizar la presencia de matriz polimérica

en esta región. Sin embargo, los residuos poseen la señal de divinilbenceno (DVB) en aproximadamente 1510 cm^{-1} que es el agente de entrecruzamiento de la matriz polimérica como se discutió anteriormente (la señal en 1463 cm^{-1} podría pertenecer tanto al DVB como al residuo oleoso). Evidencia adicional es proporcionada por la señal a 674 cm^{-1} que se atribuye a la flexión fuera del plano de enlaces carbono-hidrógeno $\delta(\text{C}=\text{C}-\text{H})$ de sustancias aromáticas [1, 12].

8.3.4. Efectos de las condiciones de reacción sobre la estructura secundaria de la enzima.

La figura 6 muestra el espectro infrarrojo de Novozym® 435 inicial y de las muestras control, 218 (92 usos), 219 (117 usos) y piloto. El biocatalizador Novozym® 435 posee señales que pertenecen a la lipasa CALB (señal débil que pertenece a la banda amida I centrada en 1651 cm^{-1}) y al polímero macroporoso, tal como se esperaba.

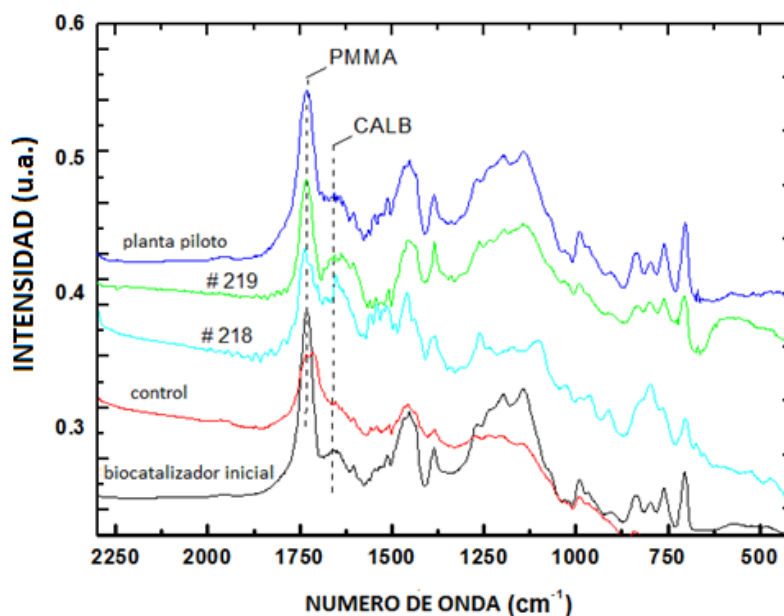


Figura 6. Espectro infrarrojo de esferas de Novozym® 435 inicial, luego de contacto con biodiesel (muestra control), usada en planta piloto y reutilizada 92 veces (muestra 218) y 117 veces (muestra 219) en la producción de biodiesel.

En este contexto es interesante comparar la relación de áreas de las señales de infrarrojo que pertenecen al PMMA respecto a la banda amida I como una evidencia semi-cuantitativa de la alteración del contenido de soporte y enzima. La muestra denominada “control” (que solo estuvo en contacto con biodiesel) y las muestras empleadas en la producción de biodiesel en diferentes condiciones operativas (muestras 218, 219 y piloto) poseen relaciones menores respecto al biocatalizador inicial, indicando esto cierto grado de alteración en el contenido de matriz polimérica y de proteína (ver tabla 3).

Tabla 3. Relación entre áreas de señales infrarrojas del soporte polimérico PMMA en 1735 cm^{-1} y proteína en 1651 cm^{-1} y contribución de los componentes individuales a la estructura secundaria de la enzima.

Novozym® 435	A_{1735}/A_{1651} ¹	% contribución estructura secundaria				
		Agregados β	α -hélice	Estructuras al azar	lámina β ²	giros β ³
Muestra inicial	5.9	----	26.4	20.5	21.8	31.3
control	2.8	0.7	13.6	16.8	56.2	12.7
# 218	1.8	4.8	25.4	15.9	39.7	14.2
# 219	2.2	2.6	12.7	15.8	45.6	23.3
piloto	4.0	4.0	23.0	17.1	36.3	19.2

¹ A_{1735} y A_{1651} corresponden a las áreas de las señales infrarrojas centradas en 1735 cm^{-1} y 1651 cm^{-1} correspondientes a la resina PMMA y amida I, respectivamente.

² el porcentaje de lámina β corresponde a la adición de la contribución de las señales más intensas en 1631 cm^{-1} , 1641 cm^{-1} y 1695 cm^{-1} .

³ el porcentaje de giros β corresponde a la adición de la contribución de las señales en 1667 cm^{-1} , 1678 cm^{-1} y 1680 cm^{-1} .

El biocatalizador empleado una única vez en planta piloto posee el valor de relación de áreas más cercano al correspondiente a Novozym® 435 inicial ($A_{\text{PMMA}}/A_{\text{amida}} = 4,0$ vs 5,9) mientras que las muestras de biocatalizador reutilizado (218 y 219) poseen valores menores. Estas observaciones sugieren que a mayor tiempo de reacción mayor degradación sufre el biocatalizador. Además, se puede concluir que el contenido de polimetilmetacrilato disminuye en mayor proporción respecto al contenido de proteína en el reuso del catalizador.

La muestra “control” embebida en biodiesel (no sometida a reacción) también muestra cierto grado de degradación respecto al catalizador inicial ($A_{\text{PMMA}}/A_{\text{amida}} = 2,8$ vs 5,9). Adicionalmente la estructura secundaria de la proteína también se vio afectada por el contacto con biodiesel. En este contexto, el análisis del espectro infrarrojo en la región $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ (amida I) proporciona información cuali y cuantitativa de los elementos de estructura secundaria de la proteína [1, 15, 16]. La tabla 3 muestra los porcentajes de contribución de cada elemento a la estructura secundaria de la proteína en cada una de las muestras en estudio.

Como se mencionó anteriormente, incluso la exposición a biodiesel a temperatura ambiente altera la estructura secundaria de la lipasa, incrementando el porcentaje de lámina β y disminuyendo la contribución de α -hélice y/o los giros β , respecto a Novozym® 435 inicial. Es importante destacar que tanto la muestra control como las utilizadas en la reacción poseen β -agregados en sus estructuras, que son una indicación de mal plegamiento seguido de agregación de la proteína. Este fenómeno se produce cuando la proteína es sometida a situaciones de stress como variaciones de pH, alta concentración de sales, etc. [17, 18]. Resulta interesante que la contribución de agregados moleculares a la estructura secundaria de la proteína se incrementa mucho más en aquellas muestras donde se aplicó la remoción continua de agua (muestras 218 y piloto).

8.3.5. Modificación de la textura externa e interna del biocatalizador

La figuras 7a a 7e muestran imágenes microscópicas de las esferas de Novozym® 435 inicial, control, 218, 219, y piloto respectivamente.

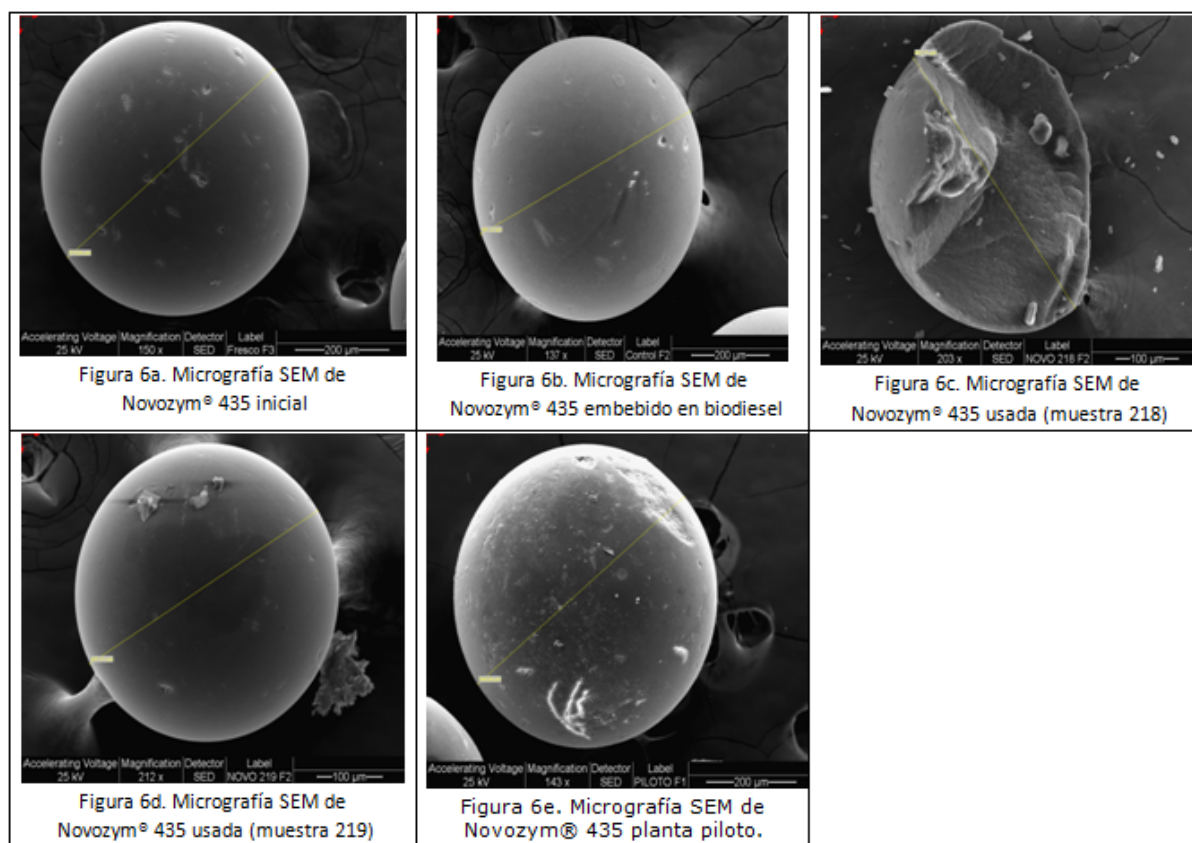


Figura 7. Micrografías de esferas de Novozym® 435: (7a) biocatalizador inicial, (7b) luego de contacto con biodiesel, (7c) usada 92 veces (muestra 218), (7d) usada 117 veces (muestra 219) y (7e) usada en planta piloto en la producción de biodiesel.

El análisis de diámetros de varias esferas de cada una de las muestras indica una importante variación que va desde un promedio de 539 μm para el catalizador de partida, 626 μm para la muestra control, 478 μm para la muestra 218 (92 ciclos de reacción), 427 μm para la muestra 219 (117 ciclos de reacción) y 612 μm para la muestra empleada en un ciclo de reacción a escala piloto (ver tabla 4).

Las esferas de catalizador que fueron embebidas en biodiesel a temperatura ambiente (sin reacción) poseen un diámetro mayor al correspondiente al biocatalizador inicial, evidenciando hinchamiento de las esferas. Esta observación está de acuerdo tanto con resultados previos presentados en esta Tesis como con investigaciones previas reportadas por Heinsman y colaboradores [1, 19, 20]. Las investigaciones previas demuestran que un ácido graso como el ácido 4-metil octanoico y su etil-éster difunden y adsorben (7,2 +/- 2,6 mmol de ácido graso por gramo) en Novozym® 435 causando un incremento en el volumen de las esferas de 175-250 %. Sorprendentemente este fenómeno ocurre tan solo luego de 2 minutos de contacto entre Novozym® 435 y los sustratos a temperatura ambiente.

Adicionalmente, se tomaron imágenes de secciones transversales de las distintas muestras con una amplificación de 8400X empleando un equipo SEM Philips 505. Estas imágenes se analizaron con el programa FERImage de modo de calcular los parámetros d_{min} , d_{per} y D (dimensión fractal) haciendo uso del método del variograma.

Como se indicó en el capítulo 5 (sección 5.8.2.), el variograma, usado para determinar parámetros que caracterizan la rugosidad superficial, consiste en un gráfico de la varianza de la variación de altura en la superficie para diferentes pasos, como función de tales pasos en escala logarítmica [21-24]. La pendiente del gráfico se relaciona con la dimensión fractal según: $D = 3 - \text{pendiente}/2$. El parámetro d_{min} caracteriza la rugosidad de la muestra y representa el tamaño de la mínima celda unidad con peso estadístico suficiente para producir períodos. El parámetro d_{per} es una medida del diámetro medio de los “huecos” entre estas celdas elementales cercanas (círculos virtuales que representan regiones de separación entre celdas elementales) [24].

En este contexto, cinco imágenes correspondientes a cinco partículas diferentes para cada caso fueron estudiadas y sus valores promedio de D , d_{per} , d_{min} e incertidumbres se presentan en la tabla 4.

El contacto con biodiesel y las condiciones de reacción modifican la textura con tendencia opuesta. En este sentido, la muestra control presenta un valor de dimensión fractal, D , inferior respecto al biocatalizador inicial. Sin embargo, las muestras, 219 y

piloto poseen valores mayores de D respecto a Novozym® 435. Se observa que La muestra 219, que se reutilizó más veces en la producción de biodiesel, presenta mayor modificación de la textura interna (mayor D).

La modificación de la textura se correlaciona con la disminución del parámetro d_{min} . En este sentido, la muestra 219 nuevamente presenta el valor más bajo de los muestras estudiadas. El parámetro d_{per} disminuye alcanzando valores similares para la muestras 218, 219 y control.

Tabla 4. Valores promedio del diámetro de las esferas de biocatalizador, dimensión fractal (D), tamaño de la mínima celda unidad (d_{min}) con peso estadístico, y distancia entre tales celdas elementales (d_{per}).

Novozym® 435	diámetro ¹ (μm)	d_{min} ¹ (μm)	d_{per} ¹ (μm)	D ¹
Muestra inicial	539	0.129 ± 0.014	1.766 ± 0.015	2.593 ± 0.010
Control	626	0.1066 ± 0.0026	1.111 ± 0.070	2.417 ± 0.010
# 218	478	0.114 ± 0.040	1.12 ± 0.30	2.525 ± 0.068
# 219	427	0.1009 ± 0.0045	1.05 ± 0.12	2.642 ± 0.034
Piloto	612	0.1113 ± 0.0058	1.59 ± 0.10	2.638 ± 0.011

¹ Los valores dados en la tabla corresponden al análisis de un mínimo de cinco partículas diferentes de biocatalizador en cada caso.

La disminución del diámetro observada en las muestras de catalizador sometidas a reacción refleja que, además del hinchamiento de las esferas se produce la degradación del biocatalizador. Este efecto no solo compensa el aumento de tamaño asociado a la adsorción de biodiesel sino que provoca una disminución neta de tamaño.

8.4. CONCLUSIONES

La eliminación continua de la humedad conduce a la desactivación del catalizador y favorece la degradación del polimetilmetacrilato (PMMA) que constituye el soporte de la lipasa CALB. Sin embargo la presencia de PMMA y de proteína activa se detectó en el medio de reacción independientemente de las condiciones de operación.

Sorprendentemente, el biodiesel (sin presencia de metanol) es capaz de difundir al interior de las esferas de catalizador produciendo hinchamiento, modificando la textura interna y también disolviendo-disgregando la matriz polimérica

La presente investigación demuestra que la estabilidad catalítica de Novozym® 435 en la producción de biodiesel no es afectada por la composición del material de alimentación (% ácidos grasos libres en la materia prima), sin embargo, sí se observó influencia de la presencia de humedad. En este contexto, la desactivación del catalizador no puede explicarse de manera sencilla ya que una multiplicidad de efectos da lugar a tal fenómeno. Por un lado, el biodiesel difunde al interior de las esferas de biocatalizador provocando su hinchamiento, de igual manera a lo previamente evidenciado al poner en contacto Novozym® 435 con etanol, etanol-agua y 2-propanol-agua a temperatura ambiente durante al menos 40 minutos [1, 25]. Investigaciones anteriores reportadas por Lee demostraron que el metanol difunde en esferas de PMMA [26]. Los autores observaron que la difusión del metanol en las esferas de PMMA posee un período de inducción seguido por un frente de difusión lineal que se acelera hacia el centro de las esferas. El aumento de la temperatura desde 25 °C hacia 50 °C provoca la disminución del período de inducción y el aumento de la velocidad del frente de difusión. En este caso, la esterificación de ácidos grasos libres se realiza a 65 °C por lo cual es esperable que el metanol difunda rápidamente en las esferas y afecte la integridad del polímero.

Adicionalmente varias investigaciones evidencian que el PMMA se disuelve en mezclas de pares de solventes como acetonitrilo/alcohol y agua/alcohol (metanol, 2-propanol,

etanol y 1-propanol), CCl₄/alcoholes, fenilmetanol/2-clorobutano entre otros [26-29]. Particularmente, Hoogenboom y colaboradores investigaron la solubilidad de PMMA en varias mezclas agua-alcohol y correlacionaron la solubilidad del polímero con la hidratación de las cadenas debido a las uniones de hidrógeno entre moléculas de agua y grupos éster del PMMA [29]. Los autores demuestran que la solubilidad del PMMA aumenta al adicionar agua al metanol, hecho atribuido a una mejor hidratación de grupos éster. En efecto, el PMMA se disuelve en mezclas metanol-agua conteniendo desde 70% a 100% de metanol en un rango de temperaturas desde 50 °C a 70 °C. Estas observaciones explican porque la cantidad de PMMA (residuo no soluble) encontrado en el medio de reacción fue similar con o sin remoción continua de humedad. La alteración de estructura secundaria de la lipasa en condiciones de operación con remoción de humedad puede ser una causa adicional de desactivación. De hecho, la muestra 218 utilizada con remoción continua de humedad presenta la mayor contribución de β-agregados en su estructura secundaria.

8.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. CAPÍTULO 8.

- [1] José, C., Bonetto R.D., Gambaro L.A., Guauque Torres M. del Pilar, Foresti M.L., Ferreira M.L., Briand L.E., *J. Molec. Catal. B: Enz.* 2011, 71, 95-107.
- [2] Rivera I., Villanueva G., Sandoval G, *Grasas y aceites* 2009, 60, 468-479.
- [3] Chesterfield D.M., Rogers P.L., Al-Zaini E.O., Adesina A.A., *Chem. Eng. J.* 2012, Vol. 207-208, 701-710.
- [4] Tan T., Lu J., Nie K., Deng L., Wang F., *Biotechnol. Adv.* 2010, 28, 628-634.
- [5] Fjerbaek L., Christensen K.V., Norddahl B., *Biotechnol. Bioeng.* 2009, 102, 1298-1315.
- [6] Lai C-C., Zullaikah S., Vali S.R., Ju Y-H., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2005, 80, 331-337.
- [7] Chang H-M., Liao H-F., Lee C-C., Shieh C-J., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2005, 80, 307-312.

- [8] FAesTER es el método de esterificación de ácidos grasos con enzimas bajo continua eliminación de agua, proceso desarrollado por Piedmont Biofuels con patente pendiente.
- [9] Conjunto de regulaciones ASTM D6751-11b respecto de las propiedades del biodiesel cuando se utiliza puro (B100) y mezclado con otros combustibles derivados de la destilación de petróleo como gasoil.
- [10] Kaieda M., Samukawa T., Kondo A., Fukuda H., *J. Biosci. Bioeng.* 2001, 91, 12-15.
- [11] Base de datos de espectros infrarrojos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (<http://webbook.nist.gov>. Metilacrilato C₄H₆O₂ (CAS: 96-33-3) y divinilbenceno C₁₀H₁₀ (CAS: 108-57-6).
- [12] Silverstein R.M., Bassler G.C., Morrill T.S., *in* Spectrometric Identification of Organic Compounds, 1991, J. Wiley & Sons eds., pp. 102-131.
- [13] Bezerra de Lira L.F., de Albuquerque M.S., Andrade Pacheco J.G., Fonseca T.M., de Siqueira Cavalcanti E.H., Stragevitch L., Pimentel M.F., *Microchem. J.* 2010, 92, 126-131.
- [14] Martínez Avila O.M., Sánchez Castellanos F.J., Suárez Palacios O.Y., *Rev. Ing. Inv.* 2007, 27, 34-43.
- [15] Barth A., *Biochim. Biophys. Acta* 2007; 1767, 1073-1101.
- [16] Foresti M.L., Valle G.M., Bonetto R.D., Ferreira M.L., Briand L E, *Appl. Surf. Sci.* 2010, 256, 1624-1635.
- [17] Natalello A., Santarella R., Doglia S.M., de Marco A., *Protein Expression & Purification* 2008, 58, 356-361.
- [18] Kardos J., Okuno K., Kawai T., Hagihara Y., Yumoto N., Kitagawa T., Závodszy P., Naiki H., Goto Y., *Biochim. Biophys. Acta* 2005, 1753, 108-120.
- [19] Heinsman N.W.J.T., Schroën C.G.P.H., van der Padt A., Franssen M.C.R., Boom R.M., van't Riet K., *Tetrahedron: Asymm.* 2003, 14, 2699-2704.
- [20] José C., Briand L.E., *Reac. Kinetics, Mechanism Catal.* 2010, 99, 17-22.
- [21] Bianchi F.D., Bonetto R.D., *Scanning* 2001, 23, 193-197.

- [22] Ladaga J.L., Bonetto R.D, Characterization of Texture in Scanning Electron Microscope Images. *Advances in Imaging and Electron Physics*, 2002, vol. 120, ISSN: 1076-5670/02, pp. 135-189, Peter W. Hawkes ed., Academic Press, EEUU.
- [23] Pentland A.P., *IEEE Trans. Pattern. Anal. Mach. Intell. PAMI-6* (6) (1984) 661-674.
- [24] Bonetto R. ., Ladaga J.L, *Scanning* 1998, 20, 457-463.
- [25] Toledo M.V., José C., Collins S.E, Bonetto R.D., Ferreira M.L., Briand L.E., *J. Mol. Catal. B: Enz.* 2012, 83, 108-119.
- [26] Lee P.I. , *Polymer* 1993, 34(11), 2397-2400.
- [27] Cowie J.M.G., Mohsin M.A., McEwen I.J., *Polymer* 1987, 28, 1569-1572.
- [28] González-Benito J., Koenig J.L., *Polymer* 2006, 47, 3065-3072.
- [29] Hoogenboom R., Becer C.R., Guerrero-Sanchez C., Hoeppener S., Schubert U.S., *Aust. J. Chem.* 2010. 63, 1173-1178.

CAPITULO 9

SCREENING DE NUEVOS SISTEMAS BIOCATALÍTICOS - PERSPECTIVAS FUTURAS

9.1. NUEVOS MATERIALES BIOCATALÍTICOS

Los resultados reportados en los capítulos precedentes, muestran un sistema de resolución cinética de (R/S)-ibuprofeno sustentable y prometedor, en el cual el etanol actúa como reactivo y solvente. Sin embargo, hay evidencias de que no solo el etanol, sino otros alcoholes de cadena corta (1-propanol y 2-propanol), afectan la integridad de Novozym® 435, catalizador comercial empleado en este trabajo [1, 2]. El mencionado efecto es muy importante no solo desde el punto de vista de la catálisis en sí, ya que genera pérdida de actividad enzimática en el tiempo, sino que ocasiona contaminación del sistema, relevante en la separación del producto deseado, más aún si tenemos en cuenta que se trata de un medicamento.

Frente al hallazgo de los efectos del etanol sobre Novozym® 435 detallados en los capítulos 5 y 6 de esta Tesis, se decidió abordar distintas estrategias. La primera de ellas consistió en reemplazar el etanol por 1-propanol o 2-propanol. La segunda estrategia consistió en disminuir el volumen de etanol y emplear un co-solvente (Capítulo 7). Ambas mostraron ser deficientes en cuanto al avance de reacción y resolución enantiomérica respecto al empleo de etanol como sustrato y solvente. Si bien el empleo de 1-propanol generó una buena performance, la estabilidad catalítica lo deja en desventaja respecto al etanol. En este contexto, se plantea una tercera estrategia, la síntesis de nuevos materiales biocatalíticos que se desarrolla en este capítulo.

Debe señalarse que la síntesis de los nuevos biocatalizadores se realizó en el marco de un proyecto de colaboración científica entre el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas - Dr. Jorge J. Ronco (CINDECA) – UNLP – CONICET de la ciudad de la Plata, y la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI) – UNS – CONICET de la ciudad de Bahía Blanca. Este proyecto involucra el trabajo conjunto de los grupos de investigación dirigidos por la Dra. María Luján Ferreira (PLAPIQUI) y la Dra. Laura E. Briand (CINDECA). En este sentido, los nuevos materiales biocatalíticos fueron

sintetizados en el centro PLAPIQUI y posteriormente se llevó a cabo su aplicación en la esterificación enantioselectiva de profenos en el centro CINDECA.

9.1.1. Componente enzimático activo compuesto por la lipasa B de *Candida antarctica*

Se seleccionó la lipasa B de *Candida antarctica* como componente enzimático de los catalizadores propios. La elección se basó en las características de estabilidad y robustez de dicha enzima (ver capítulo 2, sección 2.4.6.) y fundamentalmente se seleccionó por su enantiopreferencia en la esterificación de profenos, llevando ésta a enriquecer el sistema de reacción en el S(+)-ibuprofeno deseado. Además, la evidencia experimental hallada durante el desarrollo de este trabajo de Tesis, respecto de la utilidad de esta enzima en la esterificación de ibuprofeno racémico con etanol y otros alcoholes es considerada satisfactoria.

9.1.2. Selección de los soportes del material enzimático

Cualquier material que se considere para su uso como soporte de enzimas debe contar con ciertas características tales como: alta afinidad por proteínas, disponibilidad de grupos funcionales reactivos para reacciones directas con las enzimas o para su modificación química, estabilidad mecánica y rigidez, factibilidad de ser regenerado, y, al menos en principio, tener alta área superficial. En función de su aplicación podría requerirse que el material no resulte tóxico (biocompatible) y, para responder al creciente interés público por la salud y el cuidado del medioambiente, debería ser biodegradable. Finalmente, para ser económicamente atractivo, el material debería ser de bajo costo **[3a y b]**.

En este caso en particular se desea que sea insoluble en alcoholes de cadena corta ya que la estrategia de síntesis de catalizadores propios busca justamente hacer frente a

la disgregación de Novozym® 435 por el etanol, si bien esta estrategia también nos permitiría independizarnos de la importación de Novozym® 435.

Las dos técnicas de inmovilización más comúnmente usadas son la adsorción y la inmovilización por unión covalente. El primer sistema asegura buena recuperación de actividad pero impide el uso de la enzima en medios acuosos donde se produciría el fenómeno de desorción, mientras que la inmovilización por enlace covalente puede ocasionar importantes modificaciones en la enzima, lo que generalmente repercute en una disminución importante de la actividad. La aplicación de la inmovilización por unión covalente se centra en aplicaciones hidrolíticas para evitar el desprendimiento enzimático [4]. En la literatura se reportan una multitud de soportes con diferentes grupos funcionales utilizados para llevar a cabo la inmovilización, y multitud de protocolos para favorecer la interacción soporte – enzima.

La adsorción interfacial de lipasas en soportes hidrofóbicos ha sido propuesta como un método simple para preparar lipasas inmovilizadas. La hipótesis detrás de esta estrategia de inmovilización consiste en contactar las lipasas con materiales hidrofóbicos que de alguna manera se asemejan a sus sustratos naturales, y así lograr la inmovilización de estas enzimas en una conformación abierta que permite lograr un incremento en su actividad catalítica (activación interfacial de las lipasas) [3a y b].

Existen en la literatura reportes de la adsorción de diversas lipasas en materiales hidrofóbicos y sus aplicaciones. Palomo y colaboradores reportaron la hiperactivación de las lipasas de *Mucor miehei*, *Candida rugosa* y *Candida antarctica B* por su adsorción interfacial en materiales fuertemente hidrofóbicos como Sepabeds modificadas con grupos octadecilo [5]. Así mismo, diversos polímeros hidrofóbicos como los materiales basados en polipropileno han sido ensayados como soportes de enzimas [6]. Bosley y colaboradores estudiaron la actividad de las lipasas de *Humicola special*, *Rhizopus niveus* y *Candida antarctica B* adsorbidas en EP100 [6]. Cao et al. reportaron la inmovilización por adsorción de CALB en diversos soportes por técnicas de adsorción interfacial y por enlace covalente.

El alto costo de los materiales frecuentemente utilizados como soportes de lipasas (resinas acrílicas, polímeros sintéticos, etc.), ha propiciado un interés creciente por la búsqueda de materiales más económicos como CaCO_3 , cáscara de arroz, y quitosano [7-13]. Entre estas alternativas, el derivado de la quitina conocido como quitosano, resulta ser la más interesante debido a que la quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. En la literatura también se encuentran numerosas aplicaciones de materiales inorgánicos como soportes de enzimas [14-21]. El gran atractivo de estos materiales radica en su alta resistencia y bajo costo.

En este contexto, se decidió evaluar soportes hidrofílicos e hidrofóbicos, de naturaleza orgánica e inorgánica. Los materiales empleados son de bajo costo y alta accesibilidad. A continuación se indican las características destacables de los soportes seleccionados.

- **Quitosano** (poli[β -(1-4)-linked-2 amino-2 deoxy D-glucosa, material hidrofílico)

El quitosano cumple con el requisito de ser un material de bajo costo, ya que se lo obtiene a partir de los desechos de la industria marisquera (cáscaras de langostinos, camarones y crustáceos). Otras características que propician el uso del quitosano como material de inmovilización de lipasas son: su disponibilidad en varias formas físicas (escamas, pellets, gel, fibras y membranas), baja degradabilidad, fácil manipulación, alta afinidad por las proteínas y no-toxicidad (biocompatible). Además, es resistente mecánicamente y térmicamente [10-12].

El quitosano es un aminopolisacárido (figura 1), por lo tanto tiene características superficiales hidrofílicas y puede ser modificado químicamente en una variedad de formas.

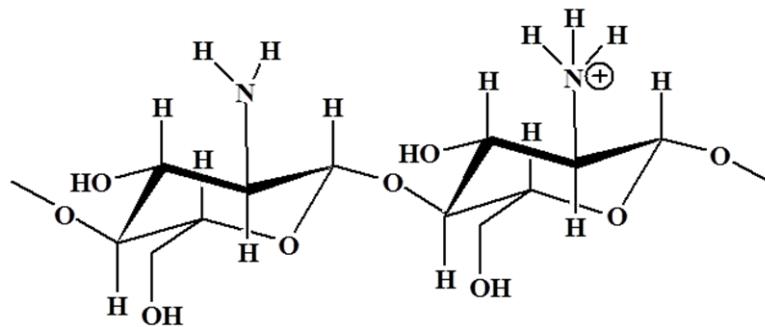


Figura 1. Estructura molecular de quitosano

Respecto a la solubilidad no consta que sea soluble en alcoholes, sin embargo debe tenerse en cuenta que si bien es insoluble en agua sufre hinchamiento en medio acuoso y retiene agua por puentes de hidrógeno generándose un entorno acuoso sobre el soporte [10-12].

En este trabajo de Tesis se empleó quitosano en la inmovilización por adsorción de lipasa B de *Candida antarctica* obteniéndose el derivado CALB/Quitosano (o C/Q). En este material biocatalítico la interacción soporte-enzima ocurre principalmente a través de interacciones iónicas y de puente de hidrógeno. Además, este soporte fue funcionalizado con glutaraldehído y posteriormente empleado en la inmovilización de CALB obteniéndose el derivado CALB/GQ. Este material involucra uniones covalentes, de tipo imina, entre los grupos aldehído del glutaraldehído y los grupos $-NH_2$ del quitosano y de residuos de lisinas de la enzima, es decir, el di-aldehído actúa como “puente” entre el quitosano y la enzima, vinculándolos a través de uniones covalentes. Como ya fue mencionado, los derivados de este tipo son más resistentes a la desorción de proteína, sin embargo debe evaluarse la actividad remanente post-inmovilización dado que este tipo de uniones generan mayores cambios en la estructura enzimática afectando así su actividad [3b]. Por otro lado, debe considerarse que el glutaraldehído tiene efecto a largo alcance, pudiendo afectar estéricamente posiciones alejadas hasta 50 aminoácidos desde su sitio de unión [3b].

- **Polipropileno isotáctico**

Este soporte consiste en un polímero sintético, el cual fue obtenido en la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI) vía metallocenos. En la figura 2 se muestra su estructura molecular.

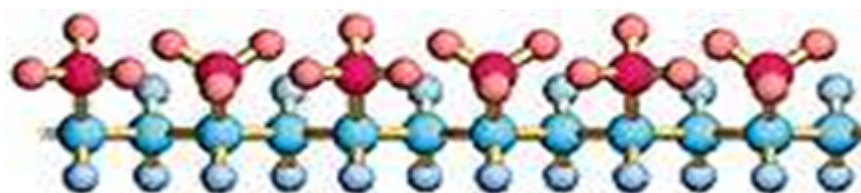
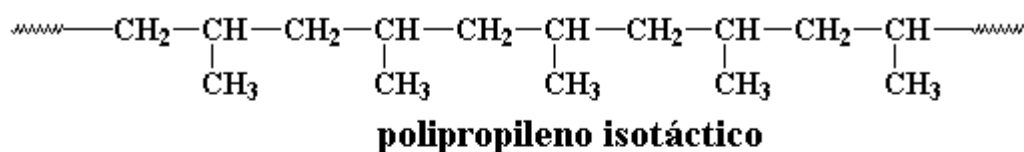


Figura 2. Estructura molecular de polipropileno isotáctico

El polipropileno consiste en un plástico de tipo 1, libre de bisfenol A. Se trata de un material hidrofóbico, inerte químicamente, muy resistente mecánica y térmicamente si bien posee comportamiento termoplástico (se ablanda a temperaturas mayores a 150 °C). Es económico, biocompatible, de fácil manejo y adecuada morfología, no poroso, no soluble en alcoholes ni en agua y no adsorbe agua [22].

Los derivados inmovilizados se representan con la sigla CALB/PPL (o C/PPL) en el texto. En estos materiales la inmovilización ocurre por adsorción a través de interacciones hidrofóbicas.

En la tabla 1 se resumen las diferencias más importantes entre los dos tipos de soportes orgánicos tratados en el texto precedente de modo de facilitar futuras discusiones de resultados.

Tabla 1. Principales diferencias entre quitosano y polipropileno isotáctico.

Quitosano	Polipropileno isotáctico
Hidrofílico	Hidrofóbico
Susceptible a modificación química (funcionalización)	Inerte químicamente
Adsorbe agua	No adsorbe agua

- **Soportes inorgánicos**

Los óxidos inorgánicos son materiales económicos y muy resistentes, atractivos como soportes de enzimas. Respecto a los polímeros, los óxidos inorgánicos son más resistentes mecánicamente, más estables en medio orgánico y también desde el punto de vista térmico. Además, son más económicos. En este sentido, se decidió emplear los siguientes óxidos en la síntesis de biocatalizadores: TiO_2 , SiO_2 , ZrO_2 y Nb_2O_5 . Todos poseen características superficiales hidrófilas. Los soportes oxídicos en presencia de agua generan un pH específico en su superficie, éste es medido como el pH en el punto de carga eléctrica nula (PZC o PI) [23]. En la tabla 2 se indican las características relevantes de los óxidos empleados como soportes en esta Tesis.

Tabla 2. Características de los diferentes óxidos empleados como soportes de CALB.

óxido	pH ¹	S _{BET} (m ² /g)	Pérdida de peso (%/m ²)
ZrO ₂	5.9-6.1	39	0.038
TiO ₂	6.0-6.4	45.7	0.028
SiO ₂	3.0	300	0.004
Nb ₂ O ₅	4.3	55	0.036

¹ pH en el punto de carga eléctrica nula (PZC o PI) de los óxidos. Este dato corresponde al pH específico de la capa de humedad superficial de cada uno de los materiales.

² Pérdida de agua por calentamiento a 400 °C.

9.1.3. Síntesis de nuevos biocatalizadores

- Protocolo de inmovilización

Se sintetizaron biocatalizadores a través de **inmovilización por adsorción simple** empleando la lipasa B de *Candida antarctica* (pureza técnica, Lipozyme batch LCN02102) sobre distintos soportes: quitosano, polipropileno isotáctico, ZrO₂ (fumed Evonik Ind.), SiO₂ (fumed Cab-O-Sil) y Nb₂O₅ (preparado por calcinación de ácido níobico por Lehigh University, Pensilvania, EEUU). Además, el biocatalizador CALB/TiO₂ fue obtenido por adsorción de CALB de alta pureza (Sigma Aldrich 10,9 U/mg) sobre TiO₂ (anatasa P-25, Degussa).

Además, se llevó a cabo la **inmovilización por unión covalente** empleando la lipasa de grado técnico y quitosano funcionalizado con glutaraldehído.

La inmovilización en soportes orgánicos se realizó por contacto de 4,00 ml de CALB L (Lipozyme batch LCN02102) con 2,50 g de soporte a temperatura ambiente en 50,00 ml de buffer de pH 7,0. El contacto se mantuvo durante 7 hs con agitación suave. Pasadas las 7 hs se filtró y se realizaron tres lavados con 50 ml de agua destilada.

En el caso del polipropileno, se realizó un pre-tratamiento del soporte con etanol absoluto durante 3 minutos a 500 rpm, antes del uso en la inmovilización de CALB. Este pre-tratamiento disminuye la hidrofobicidad del microambiente favoreciendo tanto la carga como la distribución enzimática en soportes muy hidrofóbicos [24].

En la obtención de biocatalizadores basados en CALB/óxidos (ZrO₂, SiO₂ y Nb₂O₅) fue seguido un protocolo similar, la única diferencia consistió en emplear agua destilada (pH 5) en reemplazo del buffer con la finalidad de evitar la adsorción de iones sobre los soportes como ha sido reportado [25].

En la síntesis de CALB/TiO₂, inicialmente se preparó una solución a partir de 20 mg CALB pura (Sigma Aldrich, 10,9 U/mg) y 25,00 ml de agua destilada (pH 5). La masa de

soporte adicionada a la solución fue de 100 mg. La inmovilización se llevó a cabo a 25 °C y 180 rpm en un baño de agua (Julabo SW22) durante 7 hs. Posteriormente se realizó la separación del biocatalizador, el lavado con agua destilada y secado a 50 °C [25].

- Proteína total inmovilizada: precipitación con sulfato de amonio

Se determinó la cantidad de proteína precipitable con sulfato de amonio siguiendo la técnica detallada en la sección 5.9.1. Esta determinación se aplicó inicialmente a una alícuota de la solución inicial de lipasa comercial, de manera de conocer la cantidad inicial de proteína que se somete a contacto con el soporte. Luego, pasadas las 7 horas de contacto soporte-enzima, se realizó la cuantificación de proteína precipitable en los líquidos obtenidos post-filtración. La diferencia da por resultado la cantidad de proteína precipitable inmovilizada. Cabe destacar que se asegura una precipitación cuantitativa realizando el test de trioleína en el sobrenadante resultante de la precipitación [26].

- Lipasa activa inmovilizada: test de síntesis de etiloleato

Se determinó la cantidad de lipasa activa inmovilizada empleando la reacción test de síntesis de etiloleato basada en la esterificación de ácido oleico con etanol como reactivo y solvente [27]. Es importante destacar que se empleó una reacción test muy similar a la reacción a la cual se quieren aplicar los nuevos catalizadores, por lo tanto, esta cuantificación de enzima inmovilizada resulta más representativa respecto a la cuantificación discutida en el párrafo anterior.

En la reacción test, la esterificación de ácido oleico con etanol absoluto se llevó a cabo a 45 °C, 1000 rpm y se determinó el ácido no consumido en la reacción por titulación con KOH. Debe destacarse que esta cuantificación se realizó empleando la zona lineal actividad enzimática vs concentración enzimática [26, 27].

9.2. SCREENING DE LOS BIOCATALIZADORES EN LA ESTERIFICACIÓN ENANTIOSELECTIVA DE (R/S)-IBUPROFENO CON ALCOHOLES DE CADENA CORTA.

9.2.1. Sistemas de reacción

- Esterificación de (R/S)-ibuprofeno con alcoholes de cadena corta, sin co-solvente.

Se investigó la esterificación de (R/S)-ibuprofeno (Parafarm 99,23 %) con alcoholes de cadena corta: etanol (Carlo Erba 99,8 %), 1-propanol (Sigma Aldrich \geq 99,5 %) y 2-propanol (J.T. Baker \geq 99,93 %). Las esterificaciones fueron realizadas bajo condiciones halladas previamente como óptimas al emplear etanol como agente nucleofílico y solvente (experiencias detalladas en el Capítulo 4). En todos los casos 0,5000 g (2,42 mmoles) de (R/S)-ibuprofeno se hicieron reaccionar con 1,00 ml de alcohol. El contenido de agua inicial fue 4,76 % v/v. La esterificación se llevó a cabo a 45 °C y agitación constante (200 rpm) en un baño de agua (Julabo SW22, Alemania). Las reacciones se iniciaron con el agregado del biocatalizador correspondiente (C/Q, C/GQ C/PPL y C/óxidos), el cual se empleó en relación 160 mg de catalizador por cada ml de alcohol.

- Esterificación de (R/S)-ibuprofeno con etanol en presencia de co-solvente

Como se muestra en la sección 9.3.2. los derivados basados en quitosano como soporte no resultaron buenas alternativas en cuanto a la enantioselectividad en la esterificación con alcoholes de cadena corta. Por esta razón, se decidió ensayar la reacción en presencia de un co-solvente orgánico y observar si la presencia del mismo mejora la performance. En este sentido se emplearon acetonitrilo e isooctano.

Las reacciones de esterificación fueron realizadas en frascos de vidrio de 100 ml de capacidad cerrados herméticamente, los cuales fueron mantenidos a temperatura (45

°C) y agitación constante (200 rpm) en un baño de agua (Julabo SW22, Alemania). En todos los casos, 0,5000 g (2,42 mmoles) de (R/S)-ibuprofeno se hicieron reaccionar con un volumen definido de etanol absoluto (Carlo Erba 99,8 %) en presencia de solvente orgánico (acetonitrilo, isooctano), empleándose volúmenes mínimos de solventes necesarios para disolver la masa indicada de ibuprofeno. En este sentido se emplearon 20,00 ml de isooctano (Carlo Erba 99,5 %) o 2,00 ml de acetonitrilo (Carlo Erba 99,9 %) según corresponda. Se adicionó agua destilada solo en aquellos sistemas de reacción donde el solvente es miscible en agua, es decir para reacciones llevadas a cabo en acetonitrilo, empleándose un contenido de agua inicial de 4,76 % v/v.

Las reacciones se iniciaron con el agregado del catalizador CALB/Quitosano, el cual se emplea en relación 160 mg de catalizador por cada ml de alcohol.

Los volúmenes de etanol absoluto empleados (0,20; 0,35; 0,60; 0,80 y 1,00 ml) corresponden a las siguientes relaciones molares alcohol/ácido: 1,42:1; 2,47:1; 4,25:1; 5,70:1 y 7,08:1, respectivamente.

9.2.2. Determinación de la conversión y enantioselectividad

Transcurridas 48 horas de reacción se procedió tal como se describió previamente en el Capítulo 4 a fin de obtener los valores de conversión (X %) y de exceso enantiomérico de sustrato (eeS %), empleando la valoración de ibuprofeno remante con hidróxido de potasio en etanol y el análisis por HPLC quiral, respectivamente. El procedimiento de análisis, cálculos, fundamentos de técnicas y equipos utilizados se describen detalladamente en el Capítulo 4 y Anexo 3.

9.3. RESULTADOS y DISCUSIÓN

9.3.1. Evaluación de la inmovilización

La tabla 3 muestra los resultados de la cuantificación de proteína total inmovilizada y lipasa activa inmovilizada al emplear soportes de naturaleza orgánica, quitosano y polipropileno. Tal como se estableció en la sección 9.1.3 la cantidad de proteína total inmovilizada se obtuvo por precipitación con sulfato de amonio. Así la expresión del resultado corresponde a gramos de proteína precipitable inmovilizada en 100 gramos de soporte. Adicionalmente se determinó la cantidad de lipasa activa inmovilizada empleando la reacción test de síntesis de etiloleato. La actividad se correlaciona mediante una curva de calibración con la cantidad de proteína presente en el catalizador y se obtiene el resultado final como gramos de lipasa activa en 100 gramos de soporte [28].

Tabla 3. Proteína total inmovilizada (% p/p) y lipasa activa inmovilizada (% p/p) en derivados propios y en Novozym® 435.

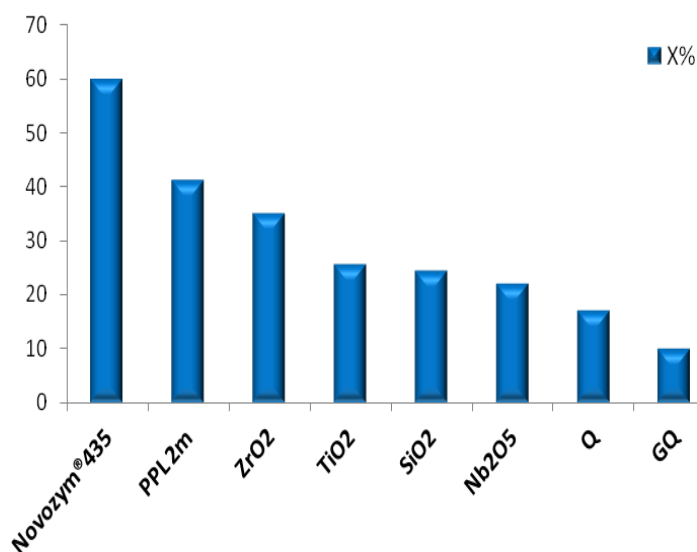
	Novozym® 435	CALB/PPL	CALB/Q y CALB/QG
Proteína total (% p/p)	5,5	10	7
Lipasa activa (% p/p)	5,5	2,5	1,2

Respecto a los catalizadores CALB-óxidos solo se realizó la cuantificación de proteína total inmovilizada, la cual fue determinada por medidas de absorbancia a 280 nm. Debido a las interferencias halladas, asociadas a la presencia de ácidos nucleicos en la fórmula comercial Lipozyme batch LCN02102 empleada como fuente de CALB, las determinaciones realizadas no presentan valor. Solo resulta válida la cuantificación de proteína total inmovilizada sobre TiO₂ debido a que en la síntesis de dicho catalizador se empleó CALB de alta pureza. Así, la cantidad total de proteína inmovilizada sobre TiO₂ resultó ser de 17 % p/p, concordando esta cantidad con la monocapa teórica [25].

Los resultados mostrados en la tabla 3 indican que si bien se logra inmovilizar una cantidad de proteína total superior a la hallada en Novozym® 435, los catalizadores propios presentan menor actividad o menor porcentaje de lipasa activa. En este sentido, al emplear polipropileno isotáctico se obtuvo un biocatalizador con un 50 % de actividad respecto al biocatalizador comercial, mientras que al emplear como soporte quitosano hidrofílico (funcionalizado o no) se obtuvo un catalizador con 1/3 de actividad respecto de la referencia comercial. Esta observación sugiere por un lado, la existencia de agregación superficial de enzima en los catalizadores sintetizados y además, de acuerdo con la literatura, se observa que soportes hidrofóbicos (PMMA y PPL) favorecen la inmovilización de la lipasa en forma activa respecto a la reacción test (síntesis de etil-oleato).

9.3.2. Esterificación de (R/S)-ibuprofeno con alcoholes de cadena corta, sin co-solvente.

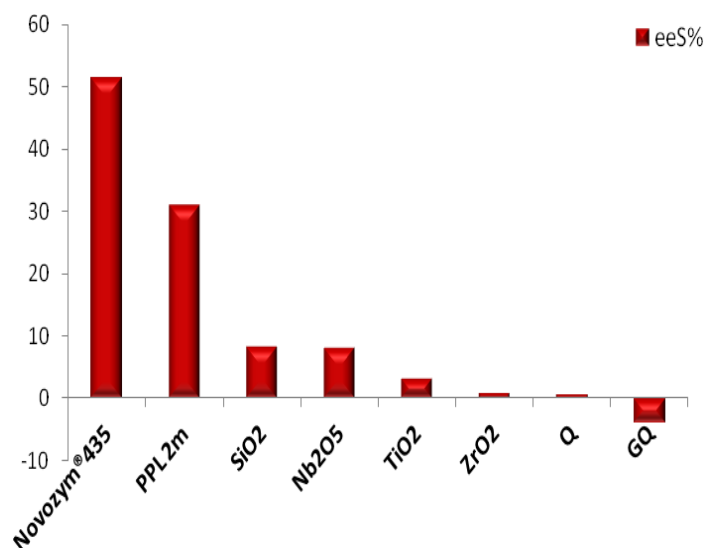
En las figuras 3A y 3B se presentan los resultados obtenidos respecto a la actividad y enantioselectividad de los biocatalizadores sintetizados al aplicarse en la resolución cinética de ibuprofeno racémico por esterificación con etanol en condiciones establecidas.

**Figuras 3A y B.**

Screening de biocatalizadores propios en la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con etanol. PPL, CALB/polipropileno; PPL 2m (se usó el doble de masa de catalizador); Q, CALB/quitosano; GQ, CALB/glutaraldehído-quitosano

(3A) Valores de conversión total (X %).

(3B) Valores de exceso enantiomérico hacia S(+)-ibuprofeno
 Condiciones de reacción: 0,5 g (R/S)-ibuprofeno; 1,00 ml etanol, 160 mg catalizador, 45°C, 200 rpm, 4,76 % v/v agua, 48 hs.



Los resultados mostrados en la figura 3A evidencian conversiones entre 22 % y 40 % con los sistemas CALB/óxidos inorgánicos. Sin embargo, como muestra la figura 3B, la enantioselectividad de estos sistemas es baja. Debe destacarse que los resultados corresponden a un screening, quedando pendiente aún la optimización de las distintas

variables operacionales para cada sistema en particular. Teniendo en cuenta esto se consideran buenas las conversiones logradas y por lo tanto se tienen en cuenta estos sistemas catalíticos para futuras optimizaciones.

Respecto a la interpretación de los resultados observados, debe tenerse en cuenta el tipo de interacción enzima-óxido según el pH usado en la inmovilización, el área superficial de soporte y su capacidad de adsorción de agua. En la tabla 4 se indican las especies químicas predominantes en las superficies de cada óxido al pH de la inmovilización. En este sentido, todos los catalizadores CALB/óxidos se prepararon en agua destilada a pH = 5 sin control del pH con buffer. La enzima CALB tiene un punto isoeléctrico $pI = 6$, entonces a $pH = 5 < pI$, la enzima posee predominantemente carga positiva.

En el caso de los óxidos estudiados, se trabajó a un $pH > pI$ en los casos del SiO_2 y Nb_2O_5 , con lo cual es esperable que posean carga superficial negativa y por lo tanto la atracción electrostática enzima-soporte sería intensa. Debido a que en el caso del dióxido de silicio el $pH \gg pI$, estos óxidos tendrían una carga negativa más extendida con lo cual las fuerzas electrostáticas son aún más intensas.

Tabla 4. Especies químicas predominantes en las superficies de los soportes inorgánicos bajo condiciones de inmovilización empleadas.

óxido	Especies superficiales a pH = 5	
	mayoritaria	minoritaria
ZrO_2	Zr-OH	
TiO_2	TiOH	Ti_2O^-
SiO_2	SiO^-	SiOH, Si-OHO-Si
Nb_2O_5	NbO_4-O^-	

Por otro lado, el SiO_2 no posee una gran densidad de OH superficiales (está en relación con la pérdida de agua) y por lo tanto, favorece la adsorción de moléculas aisladas. Todos los óxidos con excepción del dióxido de silicio pierden agua cuando se calcinan a $400\text{ }^\circ\text{C}$ (ver pérdida de peso en la tabla 2). Sin embargo, el SiO_2 presenta un carácter hidrofóbico ya que es el que posee la menor (casi nula) cantidad de agua adsorbida.

En este contexto, el trabajo de Gross et al. sugieren que la adsorción de moléculas de CALB en una configuración compacta es decir cercanas unas a otras, preservarían su estructura nativa y la actividad catalítica, en comparación con las moléculas adsorbidas en forma aislada [28]. Esto explicaría, por qué a pesar de la elevada superficie específica del óxido de silicio, la conversión del sistema CALB/ SiO_2 es similar a la de los sistemas CALB/ TiO_2 y CALB/ Nb_2O_5 . El hecho que las conversiones de todos los sistemas sea similar indicaría que la cantidad de enzima adsorbida activa es también muy similar.

La superficie del dióxido de titanio del tipo anatasa (similar al ZrO_2) posee fundamentalmente especies TiOH y con una menor contribución de especies Ti_2O^- a $\text{pH} = 5$ ($\text{pH} \sim \text{pI}$). En este contexto, la interacción entre la enzima cargada positivamente y el soporte se produce preferentemente a través de puentes de hidrógeno en los que hay moléculas de agua a modo de ligandos [25].

Al aplicar los catalizadores basados en CALB inmovilizada sobre soportes orgánicos a la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con etanol, las conversiones (X %) y actividades por gramo de catalizador resultaron bajas en comparación con Novozym® 435, independientemente de la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica del soporte. Sin embargo, es importante destacar que los nuevos biocatalizadores mostraron actividades específicas, en términos de actividad por molécula de lipasa inmovilizada, comparables con Novozym® 435 tal como se muestra en las figuras 4A y 4B. Adicionalmente se muestran los resultados obtenidos al emplear el doble de masa del catalizador CALB/polipropileno (C/PPL 2m).

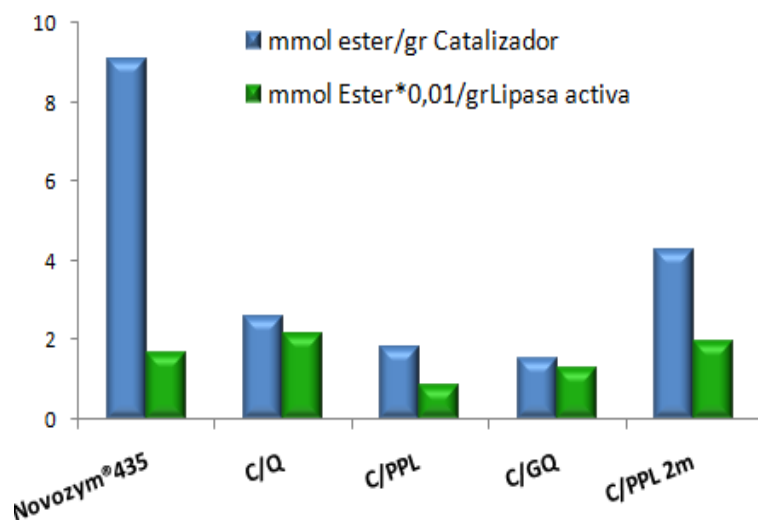


Figura 4A Actividad específica de distintos biocatalizadores en la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con etanol. Adicionalmente se muestran resultados obtenidos con Novozym® 435.

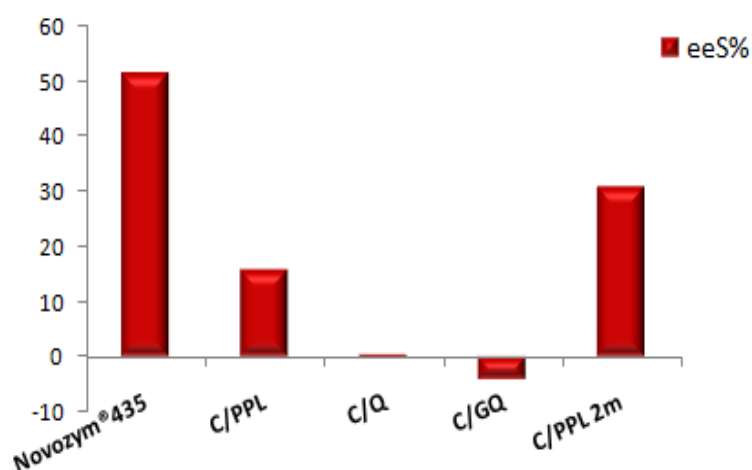


Figura 4B. Enantioselectividad (eeS %) de biocatalizadores propios y Novozym® 435 en la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con etanol

Estos resultados indican que las moléculas de enzima que son inmovilizadas en los soportes orgánicos empleados (hidrofóbicos e hidrofílicos) permanecen tan activas como las moléculas de lipasa que forman parte de Novozym® 435. Sin embargo, si se tiene en cuenta la cantidad de enzima soportada versus la activa (ver tabla 3) se evidencia que una porción de la enzima adsorbida estaría agregada por lo cual, la conversión de R/S-ibuprofeno de los catalizadores propios es inferior a la de

Novozym® 435. Estos resultados también evidencian la ausencia de alteraciones en la actividad molecular asociada a la naturaleza hidrofóbica-hidrofílica del soporte.

Los valores de eeS % obtenidos (figura 4B) evidencian que los soportes hidrofóbicos favorecen la enantioselectividad de la reacción. En este sentido resulta muy prometedor el biocatalizador CALB/polipropileno, el cual mostró buena respuesta en el screening. Así mismo, la duplicación de la masa de catalizador en el sistema de reacción generó una mejora muy importante en la conversión y el exceso enantiomérico. En base a estos resultados, el sistema CALB/polipropileno se continuará estudiando a los fines de optimizar la esterificación empleando etanol sin co-solventes, como también se estudiará el empleo de este sistema enzima-soporte en el diseño de reactores de membrana.

Las figuras 5A y 5B muestran los valores de actividad específica y eeS % obtenidos al emplear 1-propanol en reemplazo del etanol. Los resultados son similares a los hallados con etanol.

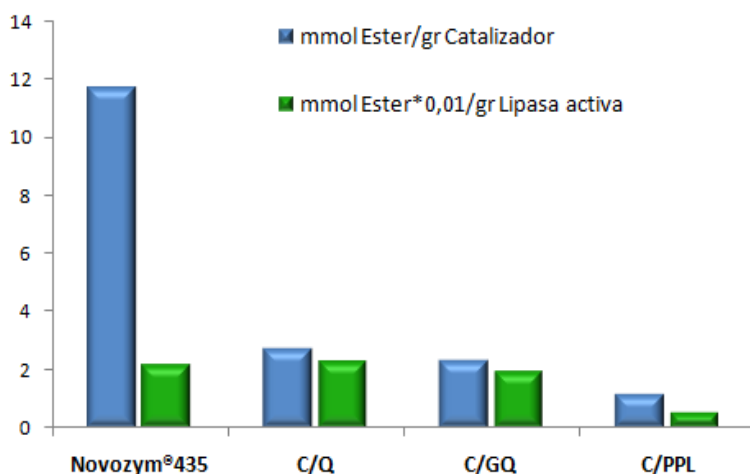


Figura 5A. Actividad específica de distintos catalizadores en la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con 1-propanol.

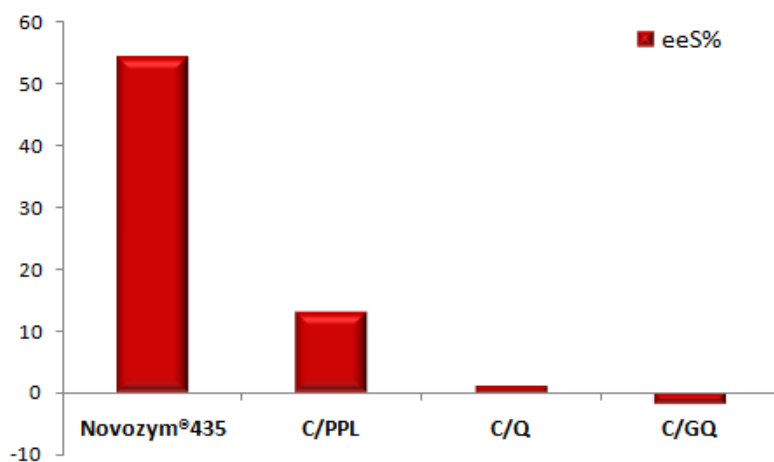


Figura 5B.
Enantioselectividad
(eeS %) de
biocatalizadores
propios y Novozym®
435 en la
esterificación de
(R/S)-ibuprofeno con
1-propanol.

El uso de 1-propanol generó valores de conversión y enantioselectividad similares a los obtenidos con etanol al emplear catalizadores basados en quitosano. Sin embargo, el sistema CALB/PPL mostró un menor rendimiento en estas condiciones. Los catalizadores basados en quitosano como soporte no deben descartarse en su totalidad por la pobre enantioselectividad mostrada, dado que pueden tener otras aplicaciones posibles, por ejemplo obtención de pro-droga (mezcla de esteres). Además queda pendiente completar la optimización de condiciones de reacción para este biocatalizador en particular, tarea a realizar durante mi carrera posdoctoral.

En cuanto al empleo de 2-propanol como sustrato y solvente, las conversiones fueron inferiores al 12 % para todos los catalizadores, incluso para el biocatalizador comercial (no se muestran los resultados). El empleo de 2-propanol conlleva un importante impedimento estérico para que avance de la reacción tal como se demostró para la esterificación de R/S-ketoprofeno con ese alcohol [2].

9.3.3. Esterificación de (R/S)-ibuprofeno con alcoholes de cadena corta en presencia de un co-solvente

La figura 6 muestra los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la relación molar de sustratos (o volumen de etanol) en la performance del catalizador CALB/Quitosano en presencia de co-solventes de naturaleza hidrofílica e hidrofóbica.

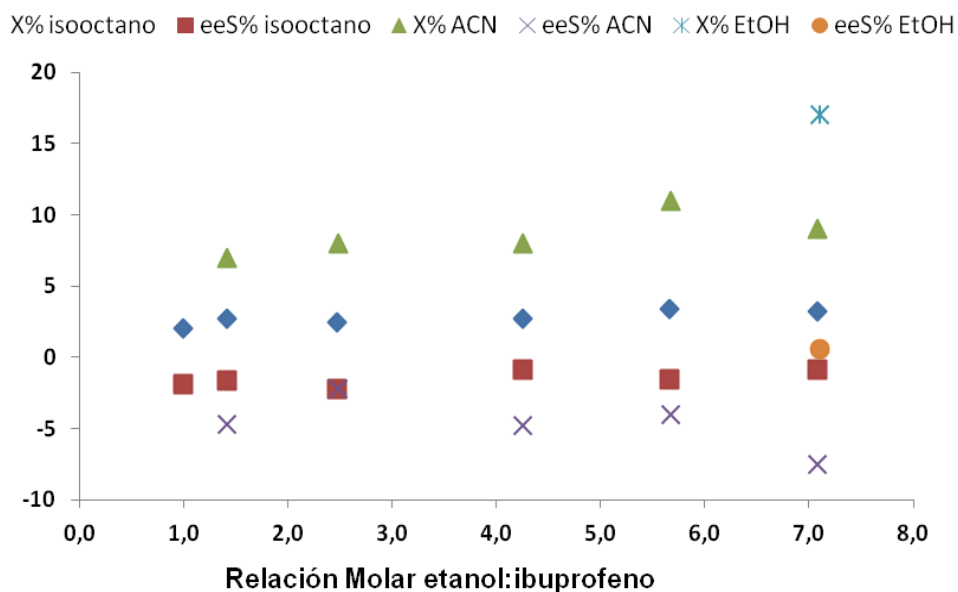


Figura 6. Efecto de la relación molar etanol:ibuprofeno en la esterificación catalizada por CALB/Quitosano en presencia de isooctano y acetonitrilo. Comparativamente se muestran los valores de conversión y eeS % obtenidos en el sistema sin co-solvente agregado.

Con el fin de facilitar la discusión de resultados, en la figura 7A se comparan los valores de X % de los biocatalizadores CALB/Quitosano y Novozym® 435 en un sistema de reacción con 1,00 ml de etanol (relación molar etanol:ibuprofeno de 7,08) en presencia y ausencia de acetonitrilo e isooctano utilizados como co-solventes. La figura 7B muestra los valores de exceso enantiomérico (eeS %) obtenidos en estos mismos sistemas de reacción.

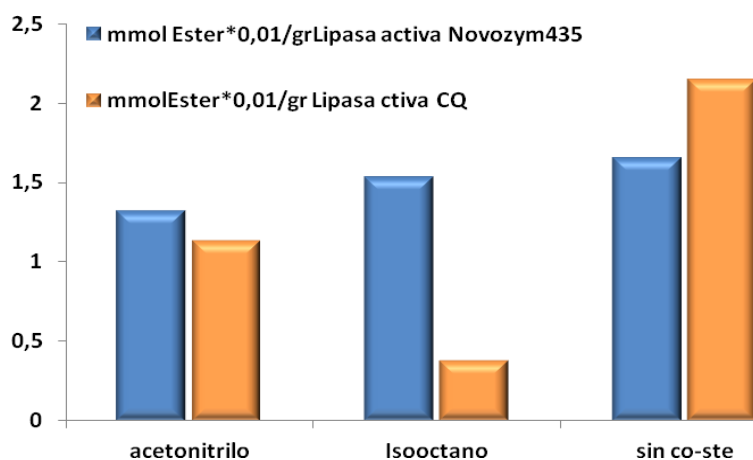


Figura 7A. Efecto del co-solvente en el avance de la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con etanol catalizada por CALB/Qitosano y Novozym® 435. Relación molar 7,08

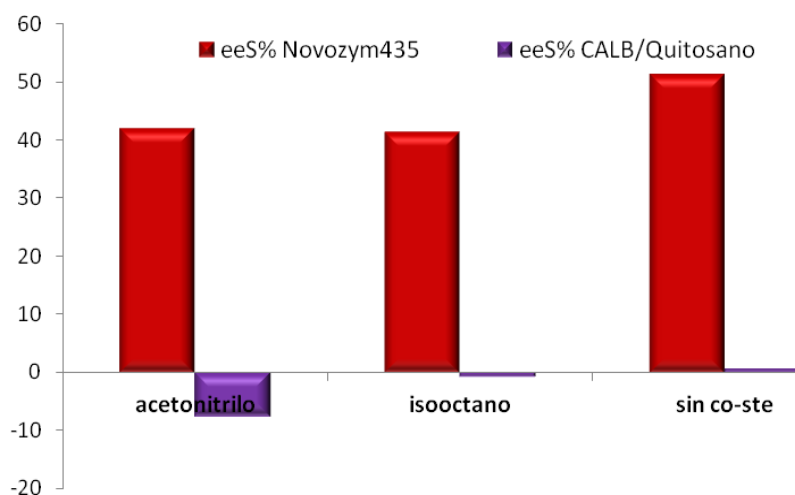


Figura 7B. Efecto del co-solvente sobre el eeS % en la esterificación de ibuprofeno con etanol. Relación molar 7,08. Catalizadores: CALB/Qitosano y Novozym® 435.

La figura 6 evidencia que la actividad del catalizador CALB/Qitosano en la reacción en estudio no está influenciada por el volumen de etanol. Este comportamiento se observó en un rango de relaciones molares etanol:ibuprofeno comprendido entre 1,42 y 7,08, a diferencia de lo observado para Novozym® 435 (ver capítulo 7, sección 7.3.1). Por otro lado, se observó que la presencia de co-solvente (acetonitrilo e Isooctano) posee efecto negativo en la conversión lograda al emplear CALB/Qitosano, observándose un efecto marcadamente negativo del Isooctano sobre la actividad enzimática respecto al sistema sin co-solvente. En cuanto a la enantioselectividad, siempre permaneció muy baja, tanto en ausencia como presencia de co-solventes.

Cabe destacar que el acetonitrilo tiene cierto efecto positivo sobre la enantioselectividad, si bien la enantioselectividad hacia S(+)-ibuprofeno toma valores negativos lo que indica que la enzima modifica su enantio-preferencia hacia el isómero R(-)-ibuprofeno.

Como conclusión global puede decirse que la resolución cinética de (R/S)-ibuprofeno mediante la esterificación con etanol catalizada por CALB inmovilizada sobre soportes orgánicos no evidenció una dependencia con la naturaleza del soporte en cuanto al avance de reacción (X %). Sin embargo, la enantioselectividad (eeS %) es marcadamente favorecida por los soportes hidrofóbicos estudiados (polipropileno isotáctico y Lewatit VP OC). La ausencia de enantioselectividad de los materiales biocatalíticos basados en quitosano puede atribuirse a la importante adsorción de agua de este soporte, hecho que se asociaría con una mayor flexibilidad de la enzima adsorbida que impide la diferenciación entre enantiómeros. En este sentido al agregar un co-solvente hidrofílico como acetonitrilo se observó una mejor discriminación de enantiómeros (si bien hay un cambio de enantiopreferencia) por estos biocatalizadores, pudiendo asociarse a disminución de moléculas de agua sobre el soporte.

9.4. PERSPECTIVAS FUTURAS

En base a los resultados discutidos en la sección precedente queda pendiente la optimización de las distintas variables operacionales como la cantidad de catalizador, el contenido de agua y el volumen de etanol para cada uno de los sistemas biocatalíticos propios. Sin embargo, se tiene principal interés en el sistema CALB/polipropileno, que demostró potencialidad en la resolución de profenos por esterificación con etanol (como sustrato y solvente) sin el empleo de co-solventes. Así mismo, también son dignos de nueva evaluación los sistemas CALB/SiO₂ y CALB/Nb₂O₅.

En cuanto a Novozym® 435, resultaron prometedores los resultados obtenidos en la esterificación con etanol empleando acetato de etilo como co-solvente, ya que el sistema fue muy selectivo si bien deben optimizarse condiciones operacionales a modo de mejorar el avance de reacción, así como evaluar efecto de este solvente sobre integridad del catalizador comercial.

9.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. CAPÍTULO 9

- [1] José C., Bonetto R.D., Gambaro L.A., Guauque Torres M.P., Foresti M.L., Ferreira M.L., Briand L.E., *J. Mol. Catal. B: Enz.* 2011, 71, 95-107.
- [2] Toledo M.V., José C., Collins S.E., Bonetto R.D., Ferreira M.L., Briand L.E., *J. Mol. Catal. B: Enz.* 2012, 83, 108-119.
- [3] a) Linqiu Cao, *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*,. 2005, ISBN: 3-527-31232-3, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania. b) Mateo C., Palomo J.M., Fernández-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R., *Enz. Microb. Technol.* 2007, 40, 1451-1463.
- [4] Sánchez Ferrer A., Tesis Doctoral "Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa*. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático" 1998, Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Ingeniería Química, Barcelona, España.
- [5] Palomo J.M., Muñoz G., Fernández-Lorente G., Mateo C., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2002, 19–20, 279–286.
- [6] Bosley J., Peilow A.D., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997, 74, 107-111.
- [7] Rosu R., Iwasaki Y., Shimizu N., Doisaki N., Yamane T., *J. Biotechnol.* 1998, 66, 51-59.
- [8] Jitawan T., Narumon J., Kanit K., *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 1997, 74, 173-175.
- [9] Krajweska B., *Acta Biotechnologica* 1991, 11, 269-277.
- [10] *Krajewska B., Enz. Microb. Technol.* 2004, 35, 126-139.

- [11] Silva J.A., Macedo G.P., Rodrigues D.S., Giordano R.L.C., Gonçalves L.R.B., *Biochem. Eng. J.* 2012, 60, 16-24.
- [12] Orrego C.E., Salgado N., Valencia J.S., Giraldo G.I., Giraldo O.H., Cardona C.A., *Carbohydrate Polymers* 2010, 79, 9-16.
- [13] Pereira E.B., Zanin G.M., Castro H.F., *Braz. J. Chem. Eng.* 2003, 20, 343, 355.
- [14] Minovska V., Winkelhausen E., Kuzmanova S., *J. Serb. Chem. Soc.* 2005, 70, 609–624.
- [15] da Silva Miranda M., de Castro H.F.M.L., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2006, 81, 566-572.
- [16] Castro H.F., Silva M.L.C.P., Silva G.L.J.P., *Braz. J. Chem. Eng.* 2000, 17, 849–858.
- [17] Ghiaci M., Aghaei H., Soleimanian S., Sedaghat M.E., *Appl. Clay. Sci.* 2009, 43, 289–295.
- [18] Kato K., Gong Y., Saito T., Kimoto H., *J. Biosci. Bioeng.* 2000, 90, 332–334.
- [19] Macario A., Moliner M., Corma A., Giordano G., *Micropor. Mesopor. Mater.* 2009, 118, 334–340.
- [20] Vertegel A.A., Siegel R.W., Dordick J.S., *Langmuir* 2004, 20, 6800-6807.
- [21] Kamori M., Hori T., Yamashita Y., Hirose Y., Naoshima Y., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2000, 9, 269–274.
- [22] <http://www.quiminet.com/>
- [23] Deo G., Wachs I.E., *Crit. Rev. Surf. Chem.* 1994, 4, 141–145.
- [24] Blanco R.M., Terreros P., Muñoz N., Serra E., *J. Mol. Catal. B: Enz.* 2007, 47, 13-20.
- [25] Foresti M.L., Valle G., Bonetto R., Ferreira M.L., Briand L.E., *Appl. Surf. Sci.* 2010, 256, 1624-1635.
- [26] Guauque Torres M.P., Foresti M.L., Ferreira M.L., XXII Congreso Iberoamericano de Catálisis (CICAT-2010), Cón-Cón Chile.; 2010.
- [27] Trubiano G., Borio D., Ferreira M.L., *Biomacromolecules* 2004, 5, 1832-1840.
- [28] Chen B., Miller E.M., Miller L., Maikner J.J., Gross R.A., *Langmuir* 2007, 23, 1381-1387.

CAPITULO 10

CONCLUSIONES FINALES

En el desarrollo de este trabajo de Tesis pudo observarse que la esterificación enantioselectiva de (R/S)-ibuprofeno con alcoholes de cadena corta catalizada por Novozym® 435 fue llevada a cabo satisfactoriamente en ausencia de co-solventes orgánicos adicionales.

En este contexto, se lograron optimizar las condiciones de esterificación de ibuprofeno racémico con etanol para este biocatalizador, obteniéndose conversiones comparables a las reportadas en medio orgánico convencional. A pesar de que para un fin práctico el exceso enantiomérico debe ser mejorado, se ha demostrado que la esterificación enantioselectiva de (R/S)-ibuprofeno catalizada por lipasas a moderadas temperaturas (45 °C) y en un medio libre de co-solvente orgánico es un proceso factible.

Debe destacarse que el catalizador comercial puede ser sometido a cuatro ciclos de 48 hs en condiciones óptimas sin pérdida importante de actividad (actividad remante 62% a las 192 hs de uso).

En este trabajo se presentó un estudio exhaustivo y original respecto a la búsqueda de las causas de la desactivación observada al evaluar el reuso de Novozym® 435. Como fue mencionado oportunamente en el capítulo 5, son varios los reportes que mencionan la desactivación e inhibición por alcoholes, principalmente de cadena corta, pero no se tiene conocimiento acerca del estudio concreto de los comportamientos observados. En este sentido, se aplicaron por primera vez técnicas como Reacción Superficial a Temperatura Programada (TPSR) y análisis de dimensión fractal y otros parámetros texturales a biocatalizadores. Los resultados de estos estudios demuestran que la disminución de actividad observada en Novozym® 435 en contacto con alcoholes no es simple de explicar dado que tiene origen en múltiples efectos (ver figura 1) como la adsorción irreversible de alcoholes, la desintegración del catalizador con pérdida de material enzimático y soporte y cambios en la estructura secundaria de la enzima inmovilizada. Teniendo en cuenta la variedad de aplicaciones de Novozym® 435, la presente investigación es un punto de partida para realizar más

estudios sobre la estabilidad de biocatalizadores comerciales con el fin de diseñar procesos biotecnológicos fiables.

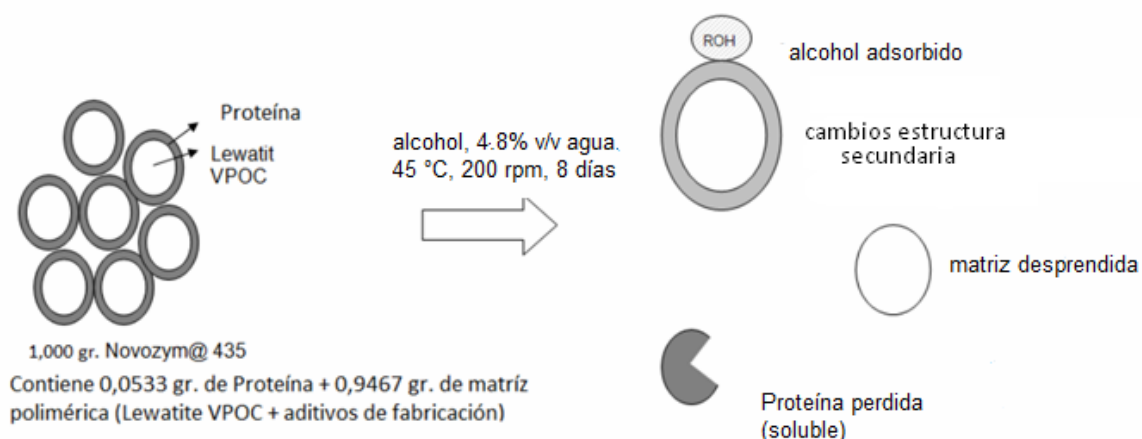


Figura 1. Representación del efecto del etanol sobre Novozym® 435.

Una consecuencia relevante de la desintegración evidenciada consiste en el daño que podría ocasionar en los equipos utilizados, como por ejemplo columnas cromatográficas y más importante, los productos de reacción resultan contaminados con sustancias desprendidas desde el catalizador, hecho inaceptable en aplicaciones médicas, farmacológicas y alimentarias ya que puede tener efecto negativo sobre la salud humana. Esta observación conduce a la necesidad de un mayor control en la purificación del producto.

En este contexto, la presente investigación también evaluó la estabilidad del biocatalizador comercial Novozym® 435 en la síntesis de biodiesel en colaboración con la industria. Los resultados obtenidos demostraron que la estrategia de investigación desarrollada en esta Tesis (a escala de laboratorio) es aplicable, reproducible y confiable para obtener información de reacciones enzimáticas a mayor escala.

Durante el desarrollo de esta Tesis se evaluaron estrategias para superar el inconveniente del efecto del etanol sobre Novozym® 435. Entre ellas se estudió el

empleo de varios solventes orgánicos que permitieron minimizar el volumen de alcohol a emplearse. Estos estudios evidenciaron que el sistema sin co-solvente sigue siendo de elección, si bien el empleo de acetato de etilo como co-solvente mostró importante enantioselectividad, quedando pendiente optimizar el avance de la reacción en ese medio. Otra estrategia estudiada fue el reemplazo de etanol por alcoholes de tres átomos de carbono. Estos estudios evidenciaron que tanto etanol como 1-propanol dan rendimientos comparables al método convencional de resolución de profenos por esterificación con lipasas inmovilizadas. Sin embargo, se demostró que el etanol es la mejor opción en términos de estabilidad catalítica.

La última estrategia presentada consistió en la síntesis de nuevos biocatalizadores basados en CALB inmovilizada en soportes resistentes a la acción del etanol y económicos. En este sentido, el biocatalizador CALB/polipropileno generó muy buenos resultados, destacándose su enantioselectividad. Los demás sistemas catalíticos no mostraron enantioselectividad pero no deben descartarse debido a que las conversiones obtenidas fueron muy buenas aún sin optimización de las condiciones operativas. Por esta razón los nuevos materiales constituyen buenos biocatalizadores aplicables a la obtención de prodrogas (mezcla de ésteres de ibuprofeno), cuyo uso farmacológico permite minimizar los efectos adversos asociados a la acidez del fármaco sobre el tracto gastrointestinal.

En este contexto, se ha propuesto continuar con la optimización de variables operacionales de reacción para los nuevos materiales biocatalíticos, como también estudiar el diseño de reactores basados en polipropileno y otros soportes, estudios a realizar en mi carrera pos-doctoral.

ANEXO 1

**Antecedentes del uso de lipasas en la resolución
enantiomérica de R/S-ibuprofeno.**

Antecedentes del uso de lipasas en la resolución enantiomérica de R/S-ibuprofeno

REACCIÓN	CONDICIONES DE OPERACIÓN	SOLVENTE O CO-SOLVENTE	CONVERSIÓN (X%) Y ee %	DESACTIVACIÓN	REF.
Esterificación	Sustratos (66mM): (+/-) ibuprofeno y 1-propanol. Relación molar: 1:1 Catalizador: SP435A (lipasa A de <i>Candida antarctica</i>): 500 mg. Enantioselectividad: R-ibuprofeno agua (μl): 0 24 °C, 100 rpm, 7 hs.	isooctano (10 ml)	X% = 49,5 % ee S-ibu % = 27 % E = 2,2	Si (por exceso de alcohol)	[1]
Esterificación	(+/-) ibuprofeno 0,405 g (1,963 mmol) y 1-dodecanol 0,2744 g (1,472 mmol) Novozym® 435: 150 mg. Enantioselectividad: R-ibuprofeno Tamiz molecular para control de baja actividad acuosa (no especificado) Tiempo total de reacción: 6 días	Ciclopentano (15 ml)	<u>48 hs de reacción:</u> X%=31 % ee S-ibu %= 20 % <u>132 hs de reacción:</u> X%: 69 % ee S-ibu%= 60 %	No	[2]
Esterificación	<u>1º reacción:</u> (+/-) ibuprofeno (100 g) y 1-dodecanol (67,74 g) Novozym® 435 (11 g). Enantioselectividad: R-ibuprofeno 70 °C, vacío, 24 hs. <u>2º reacción:</u> material de la primer etapa (enriquecido en S-ibuprofeno) (75 g) y 1-dodecanol (22,58 g) Novozym® 435 (8,25 g)	No	<u>1º reacción:</u> X% = 71% ee S-ibu% = 86 % <u>2º reacción:</u> X% = 49 % ee S-ibu % = 97,3 %		[3]

Antecedentes del uso de lipasas en la resolución enantiomérica de R/S-ibuprofeno

	70 °C, vacío, 48 hs.				
Esterificación	(+/-) ibuprofeno (1,96 mmol) y 1-dodecanol (1,47 mmol). Novozym® 435 (150-750 mg). Enantiopreferencia: R-ibuprofeno 22 °C	Si		No reportado	[4]
Acilación	1mmol ibuprofeno y 0,5 mmol Metil α -D-glucopiranosido Novozym ® 435 (0,2 g). Enantiopreferencia: R-ibuprofeno 50 °C, 200 rpm, 144 hs. Se hicieron 4 ciclos sucesivos de reacción	Acetonitrilo (20 ml)	X% 1º ciclo: 87,3%, ee (ester R) %: 40% X% 4º ciclo: 31,7%	No	[5]
Esterificación	(+/-)ibuprofeno (0,5 g) y etanol (1 ml) Novozym® 435 (160mg) Enantiopreferencia: R-ibuprofeno agua: 4,76 % 45 °C, 200 rpm, 48 hs.	No	X% = 62% ee S-ibu% = 50%	Si (reusos del catalizador)	[6] y [7]
Esterificación	Sustratos(66mM): (+/-) ibuprofeno y 1-propanol Lipasa de <i>Candida rugosa</i> (CRL) nativa o inmovilizada (agarosa, silica, alúmina) : cantidades variables Enantiopreferencia: S-ibuprofeno agua: 500 μ l 30 °C, 500 rpm, Buffer Tris /HCl 0,1 M (pH7) (cantidad variable)	Isooctano (10 ml)	<u>Mejores resultados:</u> -CRL nativa(192hs) X%:40, eeR-ibu%: 71,7 -CRL-agarosa(168h) X%:29, eeR-ibu%: 37,2 -CRL-Silica (192hs) X%:40, eeR-ibu%: 75,3 -CRL-alúmina(192hs) X%: 32, eeR-ibu%: 16	Si (por liofilización si el soporte es hidrofóbico)	[8]
Hidrólisis	Metil éster de (R/S)-ibuprofeno (100mM) y agua (0,2 M buffer fosfato pH: 7,2) CRL (libre)(50 mg/ml)	Si (N,N-dimetil formamida(DMF	<u>Mejores resultados:</u> -9 %v/v DMF: X%: 40,8 %; E: 247	No	[9]

Antecedentes del uso de lipasas en la resolución enantiomérica de R/S-ibuprofeno

	Enantioselectividad: S-ibuprofeno Volumen pequeño y variable de co-solvente orgánico polar. 250 rpm, 34 °C, 10 hs,), formaldehído, formamida, entre otros)	-5 %v/v formaldehído: X%: 31%; E:115 -1 %v/v formamida: X%: 40,2% ; E:54		
Esterificación	(+/-)-ibuprofeno (1 mmol) y metanol (2 mmol) CRL (libre) 0,5 g Enantioselectividad: S-ibuprofeno agua : 0,3 ml 30 °C, 150 rpm, 200 hs Aditivos (0,5 g.): soporte sólido o sales	Si (10 ml): tetracloruro de carbono, xileno, ciclohexano, n-hexano, n-heptano, n-octano, entre otros.	<u>Mejores resultados:</u> -tetracloruro de carbono: X%: 44,7; E: 492 -Xileno. X%: 45,3; E: 510 -ciclohexano: X%: 44; E: 473 -n-hexano: X%: 42,2; E: 433 -n-heptano: X%: 46,5; E: 557 n-octano: X%: 45,4; E: 514	No	[10]
Esterificación	1) (+/-) ibuprofeno (0,125 M) y 1-butanol (0,125 M) Relación molar 1:1 Lipozyme® IM (lipasa de Rhizomucor miehei inmovilizada) (10 %w/w agua): 300 mg Enantioselectividad: S-ibuprofeno 37 °C, 72 hs,	Si (10 ml): ciclohexano, isooctano, n-hexano, n-heptano, tolueno, entre otros.	1) Mejores resultados: - Ciclohexano. X%: 66 %; EF:0,92 -isooctano: X%: 75 %; EF: 0,78 - n-hexano X%: 73 %; EF:0,80 -n-heptano X%: 45 %; EF:0,90 - tolueno	Si (por alcoholes polares de cadena corta y solventes orgánicos hidrofílicos (log P<2)	[11]

Antecedentes del uso de lipasas en la resolución enantiomérica de R/S-ibuprofeno

	<p>2) (+/-) ibuprofeno (0,125 M) y alcohol (0,125 M) Relación molar 1:1 Lipozyme ® IM (lipasa de Rhizomucor miehei inmovilizada) (10 %w/w agua): 300 mg 37 °C, 72 hs, Ciclohexano (10ml)</p>		<p>X%: 55 %; EF: 0,70</p> <p>2) Mejores resultados: -1-butanol X%: 66 %; EF:0,99 eeR%: 99 % -1-octanol X%: 34 %; EF: 0,98 eeR%:50 %</p>		
Esterificación	<p>(+/-) ibuprofeno (50 mM) y 1-butanol (M) Relación molar butanol: ibuprofeno = 1,9 Lipozyme ® IM20 (10 mg/ml) Enantiopreferencia: S-ibuprofeno 112 hs, 250 rpm,</p>	<p>Isooctano saturado en agua (10 ml)</p>	<p>X%: 49,9 % ee%: 93,8 % E:113</p>	<p>No</p>	<p>[12]</p>
Esterificación	<p>(+/-)ibuprofeno (103 g: 0,5 mmol) y 1-propanol (60 mg: 1mmol). Relación molar alcohol:ácido : 2:1 Catalizador: CRL nativa (50 mg) o CRL inmovilizada en acetato de celulosa- isopropóxido de titanio (2,4 g, 25 mg CRL/g biocatalizador) Enantiopreferencia: S-ibuprofeno 30 °C /40 °C</p>	<p>Isooctano saturado en agua (10 ml)</p>	<p>CRL nativa: 30 °C; X%:42,6 %; E: 4,7; tpo: 63 hs 40 °C, X%:37,2 %; E: 3,5, tpo: 40 hs</p> <p>Lipasa inmovilizada: 30 °C, X%:35,3 %; E: 12,9; tpo: 110 hs 40 °C, X%: 27,4 %; E: 8,8, tpo: 94 hs</p>	<p>Si importante inhibición por exceso del alcohol y también inhibición a alta concentración del ácido sobre la lipasa sin inmovilizar</p>	<p>[13]</p>
Esterificación	<p>(+/-) ibuprofeno (62,5 mM) y 1-octanol (concentración variable). Relación molar alcohol:</p>	<p>Isooctano (16 ml)</p>	<p><u>Relación molar 1:1</u>, E=400, v₀=100 c/perv</p>	<p>Si Inhibición por [octanol]</p>	<p>[14]</p>

Antecedentes del uso de lipasas en la resolución enantiomérica de R/S-ibuprofeno

	<p>ácido: 1, 2, 4 y 8. Catalizador: CRL (1g) Celite® 545 (1g). Enantiopreferencia: S-ibuprofeno 40 °C con y sin pervaporación, 24 hs</p> <p>(+/-)ibuprofeno (62,5 mM) y alcohol (125 mM) Relación Molar 2:1 Catalizador: CRL (1g) Celite® 545 (1g). Enantiopreferencia: S-ibuprofeno 30 °C, con y sin pervaporación, 24 hs</p>	Isooctano (16 ml)	<p>E=350, v₀=50 s/perv</p> <p><u>Relación Molar 8:1</u> E=90, v₀=20 c/perv E=100, v₀=20 s/perv</p> <p><u>1-hexanol</u> E=280, v₀=25 c/perv E=140, v₀=20 s/perv</p> <p><u>1-octanol</u> E=480, v₀=45 c/perv E=380, v₀=40 s/perv</p> <p><u>1-decanol</u> E=405, v₀=45 c/perv E=390, v₀=40 s/perv</p>	independiente de a _w	
Esterificación	(+/-) ibuprofeno (100mM), n-butanol (100 mM) Catalizador: CRL libre (600 mg) Enantiopreferencia: S-ibuprofeno Agua (0,1 ml), Celite (5 g), 40 °C, 180 rpm	Isooctano (100 ml)	X% = 50 % eeR%: 78,9 % ee%producto (S-ester): 95,3 %	No reportado	[15]
Esterificación	(+/-) ibuprofeno (25 mmol/dm ³), 1-butanol (25 mmol/dm ³) Catalizador(100 mg): CRL inmovilizada sobre polipropileno (EP100®) Enantiopreferencia: S-ibuprofeno	Isooctano (10 ml)	Mejores resultados: X%= 51% en 47 hs ee producto%(S-ester)=93 % E=59, EF=0,89	Efecto de glicosilación de la lipasa en limitación difusional del sustrato	[16]

Antecedentes del uso de lipasas en la resolución enantiomérica de R/S-ibuprofeno

	37 °C, 250 rpm				
Esterificación	(+/-) ibuprofeno (66 mM), 1-propanol (66 mM) 0,2 ml agua Catalizador: enzima liofizada (se ensayaron lipasas de distintos microorganismos). Cantidad de enzima: enzima contenida en 50 ml del cultivo del microorganismo Enantiopreferencia: variable según origen de la lipasa 30°C	Isooctano (2 ml)	Mejores resultados: -Lipasa de <i>O. sulphureo-ochraceum</i> (S preferencia) X%=70,4 % en 336 hs ee sustrato(R-ibu)% = 65 % -Lipasa de <i>F.oxysporum</i> (S preferencia) X%= 84,2 % en 264 hs ee sustrato(R-ibu)% = 100%	No reportado	[17]
Esterificación	(+/-) ibuprofeno, 1-propanol Relación molar alcohol/ácido: 2,41 Catalizador: lipasa nativa de <i>Aspergillus niger</i> AC-54 (7 %w/v) Enantiopreferencia : R-ibuprofeno 168 hs, 35 °C	Varios solventes (Isooctano, ciclohexano, n-hexano, tolueno, diclorometano, acetona) Resultados óptimos en isooctano (10 ml)	Mejores resultados: X%=48,0 % ee sustrato(S-ibu)=79,1% E=32	No reportada. Determinan que el factor más importante en la performance de la reacción es la relación molar alcohol/ibuprofeno. En el rango estudiado (RM 3:1 hasta 1:3) al aumentar la relación molar mejora la performance.	[18]
Esterificación	(+/-) ibuprofeno, N-morpholinoetanol.	Ciclohexano (10	Mejores resultados:	Si	[19]

Antecedentes del uso de lipasas en la resolución enantiomérica de R/S-ibuprofeno

	Relación molar variable Catalizador: CRL-Accurel MP100 (soporte hidrofóbico de polipropileno) o lipasa MY (del mismo microorganismo) Enantiopreferencia: S-ibuprofeno Temperatura: 25 °C a 60 °C	ml)	para 100 mg de CRL-Accurel(3,7 %w/w agua) o 673 mg Lipasa MY/g solido, 37 °C, 15mM de alcohol, 6mM ibuprofeno	(efecto inhibitorio del alcohol)	
Hidrólisis	Alquil-ésteres de (+/-) ibuprofeno (50 g/l), agua Catalizador(enzimas libres): estearasa de <i>Trichosporon beigelli</i> (TBE) y lipasa de <i>Candida cylindracea</i> (CCL=CRL) Enantiopreferencia: S-ibuprofeno (para ambos catalizadores) 29 °C, Relación sustrato: enzima 1:0,7	Buffer pH 8,0 (0,1M fosfato de sodio)	<u>Metilésteres:</u> TBE: 96 hs, X%=34,8 % ee producto=98,5 %, E=117 CCL: 36 hs, X%=43,0 %, ee producto=98,0 %, E=2,4 <u>Etilésteres:</u> TBE: 96 hs, X%=32,2 %, ee producto=99,0 %, E=340 CCL: 48 hs, X%=34,0 %, ee prodcuto=63,0 %, E=6 <u>Butilésteres:</u> TBE: 96 hs, X%=7,2 %, ee producto=17,4 %, E=0,9 CCL: 48hs, X%=27,0 %, ee producto=22,3 %, E=1,4	No	[20]

Antecedentes del uso de lipasas en la resolución enantiomérica de R/S-ibuprofeno

Esterificación	<p>(+/-) ibuprofeno (0,3 mmol), alcohol (0,3 mmol, naturaleza variable) Relación molar alcohol:ácido 1:1 Catalizador: lipasa de <i>Candida sp</i> inmovilizada (200 mg, 1g cataliz/50 mg enzima) Enantiopreferencia : S-ibuprofeno 180 hs, 30 °C, Na₂SO₄/Na₂SO₄.10H₂O (500 mg) esto genera un valor de aw=0,83 constante</p>	<p>Si (varios ensayados) 10 ml</p> <p>Observacion: no observan actividad enzimática en acetoniilo y otros solventes hidrofílicos</p>	<p>Etanol/ hexano: V₀=111,7(μmol/h g), E=6,1, t(eq)= 333 hs</p> <p>1-propanol/hexano: V₀=173,9, E=16,0, t(eq)= 120hs eeproducto=0,59 % para X=60 %</p> <p>1-butanol/hexano: V₀=171,7, E=17,1, t(eq)= 192hs eeproducto=0,55 % para X=60 %</p> <p>isobutanol/hexano: V₀=191,4, E=19,4, t(eq)= 216hs eeproducto=0,56 % para X=60 %</p> <p>Mejor sistema: 1-propanol/isooctano E=17,4 y Keq= 0,016</p>	<p>Si</p> <p>(alcoholes polares cortos: metanol y etanol y por solventes hidrofílicos)</p> <p>Observaciones: no hay actividad enzimática sobre alcoholes 2°, 3° ni polioles</p>	[21]
Esterificación	(+/-) ibuprofeno (0,02 M), alcohol (naturaleza	Si, naturaleza	En condiciones	Si	[22]

Antecedentes del uso de lipasas en la resolución enantiomérica de R/S-ibuprofeno

	variable, óptimo: 1-octanol) Relación molar variable (óptima: 1:1) Catalizador (10 mg): estearasa termofílica APE1547 (<i>Aeropyrum pernyx</i> K1) Enantiopreferencia : R-ibuprofeno Temperatura y aw variables (óptimas: T=60°C, aw= 0,12 y presencia de desecante: Celite 40 mg/ml)	variable (10 ml)	óptimas: Activ:216,5 µmol/h g E= 38,1 Equilibrio: 96 hs X%=57 % ee S-ibu=99 %	(por alcohol y solventes)	
Esterificación	(+/-) ibuprofeno (66 mM), 1-propanol (66 mM) Relación Molar 1:1 Catalizador: Novozym® 435, CRL® y lipasas nativas de distintos microorganismos Enantiopreferencia: S-ibuprofeno (CRL®, otras) y R-ibuprofeno (Novozym® 435, lipasas de <i>Aspergillus niger</i> y <i>terreus</i>) 180 rpm, 35 °C	Isooctano (anhidro)	Mejores resultados: <u>Novozym® 435 (5 mg):</u> X%=64,0 % en 54 hs, ee % sustrato (S-ibu)=82,6 %; E=6,7 <u>CRL® (5 mg):</u> X %=53,0 % en 54 hs ee % sustrato (R-ibu)=77,8 %; E=12,0 <u>Lipasa <i>Aspergillus niger</i> (5 mg):</u> X%=25 % en 162 hs ee % sustrato (R-ibu)=19,9 %; E=4,8 <u>CRL®(15 mg) y silica gel(0,5% w/v):</u> X%=37 % en 24 hs ee % sustrato (R-ibu):	No reportado	[23]

Antecedentes del uso de lipasas en la resolución enantiomérica de R/S-ibuprofeno

			49 %; E=20 <u>Lipasa <i>Aspergillus niger</i></u> (30 mg), silica gel (0,5% w/v): X%=36 % en 24 hs ee % sustrato (R-ibu)=46 % E=15		
Esterificación	(+/-)ibuprofeno (4mM), 1-propanol(12mM) Relación molar alcohol:ácido 3:1 Catalizador (5 %w/v): Novozym® 435, CRL®, <i>Aspergillus niger</i> AC-54 Enantiopreferencia: R-ibuprofeno (Novozym®435 y AC-54), S-ibuprofeno (CRL®) 35 °C, 350 rpm, 48 hs	Isooctano puro [BMIM][PF ₆]/isooctano [BMIM][PF ₄]/isooctano	Mejores resultados: [BMIM][PF ₆]/isooctano (1:1) <u>AC-54:</u> X%=12 %, ee %(S-ibu)=8 %,E=4,6 <u>Novozym®435:</u> X%=35 %, ee%(S-ibu)=24 %, E=3,3 <u>CRL®:</u> X%=48 %, ee%(S-ibu)=60 %, E=8,5		[24]
Esterificación y trans-esterificación	ibuprofeno (2 mmol), alcohol o vinilacetato(20 mmol) 0,05 ml buffer fosfato 0,1 M de pH 7,2 37 °C	50 ml n-hexano	Transesterificación(vinilacetato): X%=25 % ee%producto= 97 %	Si. Inactivación por solventes orgánicos hidrofílicos (log P< 2) y altas concentraciones de	[25]

Antecedentes del uso de lipasas en la resolución enantiomérica de R/S-ibuprofeno

	<p>Catalizador: lipasa de <i>Pseudomona</i> sp nativas e inmovilizadas en membranas de poliamida Enantiopreferencia: R-ibuprofeno</p> <p>Combinación: esterificación de ibuprofeno racémico con etanol seguida de hidrólisis del producto empleando el mismo catalizador</p>		<p>E=90</p> <p>Alcohol: Etanol X%=24 % en 24 hs, ee% producto (R-ester)=95 % E=53</p> <p>Alcohol: 1-propanol X%=19 % en 24 hs, ee% producto(R-ester)=87% E=17</p> <p>Otros alcoholes (metanol, butanol, hexanol, ciclohexanol): menores X% y E</p> <p>Proceso combinado de esterificación seguida de hidrólisis: ee%producto (R-ester)>99 % y E>200</p>	alcohol	
--	--	--	---	---------	--

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.ANEXO 1:

- [1]: Arroyo M., Siniesterra J.V., *J. Org. Chem.* 1994, 59, 4410-4417.
- [2]: Ducret A., Trani M., Pepin P., Lortie R., *Biotechnology techniques* 1995, 9, 591-596.
- [3]: Trani M., Ducret A., Pepin P., Lortie R., *Biotechnology Letters* 1995, 17, 1095-1098.
- [4]: Ducret A., Trani M., Lortie R., *Enzym. Microb. Technol.* 1998, 22, 212-216.
- [5]: Zhao X-G., Wei D-Z., Song Q-X., *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2005, 36, 47-53.
- [6]: Foresti M.L., Galle M., Ferreira M.L., Briand L.E., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2009, 84, 1461-1473.
- [7]: José C., Briand L.E., *Reac. Kinet. Mech. Cat.* 2010, 99, 17-22.
- [8]: Arroyo M., Moreno J.M., Siniesterra J.V., *J. Mol. Cat. A: Chemical* 1995, 97, 195-201.
- [9]: Won Hee Lee, Ki-Joo Kim, Min Gon Kim, Sun Bok Lee, *J. Ferment. Bioeng.* 1995, 80, 613-615.
- [10]: Min Gon Kim, Sun Bok Lee, *J. Ferment. Bioeng.* 1996, 81, 269-271.
- [11]: López-Belmonte M.T., Alcántara A.R., Sinisterra J.V., *J. Org. Chem.* 1997, 62, 1831-1840.
- [12]: Sánchez A., Valero F., Lafuente J., Solá C., *Enz. Microb. Technol.*, 2000, 27, 157-166.
- [13]: Ikeda Y., Kurokawa Y., *J. Biosci. Bioeng.* 2002, 93, 98-100.
- [14]: Won K., Hong J., Jim K., Moon S., *Process Biochemistry* 2006, 41, 264-269.
- [15]: Xie Y-C., Liu H-Z., Chen J-Y., *Biotechnology Letters* 1998, 20, 455-458.
- [16]: N. López N., Pérez R., Vázquez F., Valero F., Sánchez A., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2002, 77, 175-182.

- [17]: Cardenas F., de Castro M.S., Sanchez-Montero J.M., Sinisterra J.V., Valmaseda M., Elson S.W., Alvarez E., *Enz. Microb. Technol.* 2001, 28, 145-154.
- [18]: Carvalho P.O., Contesini F.J., Bizaco R., Calafatti S.A., Macedo G. A., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 33, 713-718.
- [19]: Chen J-C., Tsai S-W., *Biotechnol. Prog.* 2000, 16, 986-992.
- [20]: Koul S., Koul J.L., Singh B., Kapoor M., Parshad R., Manhas K.S., Taneja S.C., Qazi G.N., *Tetrahedron: Asymmetry* 2005, 16, 2575-2591.
- [21]: Liu Y., Wang F., Tan T., *J of Mol Catal B: Enzymatic* 2009, 56, 126-130.
- [22]: Zhao Dan-tong, Xun Er-na, Wang Jia-xin, Wang Ren, Wei Xiao-fei, Wang Lei, Wang Zhi, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2011, 638-644.
- [23]: Carvalho P.O., Contesini F.J., Ikegaki M., *Brazilian Journal of Microbiology* 2006, 37, 329-337.
- [24]: Contesini F.J., Carvalho P.O., *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, 17, 2069-2073.
- [25]: Ceynowa J., Rauchfleisz M., *J of Mol Catal B: Enzymatic* 2003, 23, 43-51.

ANEXO 2

**Aplicaciones de Novozym® 435 reportadas en la
literatura de los últimos 15 años**

APLICACIÓN	REACCIÓN	CONDICIONES OPERATIVAS	CO- SOLVENTE	CONVERSIÓN (X%) Y ee %	DESACTIVACIÓN	REF.
Producción de biodiesel	Metanólisis	Aceite vegetal: metanol (1:1 mol/mol) Novozym® 435 (4% wt) 30 °C, 130 osc/min, tiempo total 48 hs. Agregado del alcohol en 3 etapas para evitar inhibición	No	X Total % = 98,4 %	Si	[1]
	Metanólisis	Ídem anterior, pero el sistema consiste en 3 reactores PBR (Packet Bed Reactor) en serie. Aceites usados: vegetal, de atún y residuos	No	X% = 90 % (se mantiene durante 100 días)	No	[1]
	Transesterificación	Aceite de soja y acetato de metilo (relación 1:12) Novozym® 435	No	X% = 92 %	No	[1]
	Metanólisis	Aceite de semilla de algodón (54 %wt) y metanol (13,5%wt) Novozym® 435 (0,017 g/g aceite) 50 °C, 24 hs.	ter-butanol (32,5 %wt)	X% = 97 %	No	[1]
	Metanólisis	Aceite de soja y metanol Novozym® 435 Tiempo: 6 min. Sistema: reactor PBRS	n-hexano:ter-butanol (9:1 v/v)	X% = 75 %	No	[2]
	Metanólisis	Aceite usado y metanol	No	X% = 90 %	No	[2]

Aplicaciones de Novozym® 435 reportadas en la literatura de los últimos 15 años

		Novozym® 435 Tiempo: 2,74 hs. Sistema: 3 reactores PBRS		(se mantiene por 90 días)		
	Metanólisis	Aceite de girasol y metanol (relación 1:3, el alcohol es agregado en 4 etapas para evitar inhibición) Novozym® 435 (10 %wt respecto al peso del aceite) 40 °C, 24 hs.	1-propanol	X% = 93 %	Si	[2]
	Etanólisis	Grasa de restaurant y etanol 95% Relación 1:4. Enzimas(5 %wt respecto al peso de grasa): lipasa de P. cepacia y Novozym® 435 35 °C, 200 rpm, 24 hs.	No	X% > 96 %	No reporta	[2]
	Metanólisis	Aceite de colza y residual: metanol. Relación = 1:4 Enzimas: 3 %wt TL y 11 % wt Novozym® 435 35 °C, 12 hs. 130 rpm	ter-butanol	X% = 95 %	No	[2]
	Metanólisis	Aceite de arroz y metanol (alcohol agregado en 2 etapas evitando inhibición) Novozym® 435 Tiempo: 4-6 hs. (dependiendo de la proporción relativa de ácidos grasos y acilglicéridos)	Si	X% = 98 5	Si	[3]

Aplicaciones de Novozym® 435 reportadas en la literatura de los últimos 15 años

		Inactivación de lipasa por fosfolípidos y otros componentes minoritarios.				
	Metanólisis	Aceite de Canola y metanol. Relación molar aceite: alcohol = 1:3,5 Novozym® 435 (42,3%) Agua agregada: 7,20% 38 °C, 12,4 hs. Inhibición al emplearse grandes cantidades de alcohol	No	X% = 97,9 %	Si	[4]
Acetilación de Vitamina E	transesterificación	δ/α Tocoferoles (100 mM) y vinil acetato (400 mM) Novozym® 435 (100 mg/ml) 60 °C, aw: 0,15-0,25	2-metil-2-Butanol (2M2B) o mezcla de 2M2B(10%)-hexano(90%)	ee% = 0 2M2B: δ Tocoferoles X% = 65 % (tiempo: 2 semanas) α Tocoferoles X% = 42 % (tiempo: 2 semanas) 2M2B-hexano: δ Tocoferoles X% = 28 % (6 días) α Tocoferoles X% = 20 % (6 días)	No	[5]
Preparación de 3,4-dihidroxi	Hidrólisis de Trans diacetil derivados	(+/-)Trans-4 y agua (el isómero cis no fue buen sustrato)	Acetonitrilo tolueno	Acetonitrilo: X% = 49 %	No	[6]

Aplicaciones de Novozym® 435 reportadas en la literatura de los últimos 15 años

piperidinas	de 3,4-dihidroxi piperidinas N- protegidas	Novozym® 435 30 °C Tiempo: 24hs (Acetonitrilo y Tolueno), 48hs (1,4-Dioxano) agua: 5 equiv	1,4-dioxano	ee sustrato = 97 % ee producto%>99 % E>200 1,4-Dioxano: X% = 47 % ee sustrato% = 89 % ee producto%>99 % E>200 Tolueno: X% =10 % ee sustrato%:9, ee producto%:83, E>12		
Síntesis de n-Butilacetamida	Amidación	benzilacetato y n-butilamina. Relación molar 3:1(amina: ester) Novozym® 435 (3,67 g/L) 55 °C, 8 hs.	Tolueno	X% = 46 %	No	[7]
ITC de dioles secundarios y diésteres de a poliésteres quirales	Polimerización	1,1'(1,3-fenileno)dietanol(1,3diol) y adipato de diisopropilo Catalizador: Shov's (2 mol %) y Novozym® 435 (12 mg/mmol grupo alcohol)	2,4-dimetil-3-pentanol (0,5M)	Poliésteres PM 15 KDa ee % = 99 % 1-3 % grupos cetónicos finales	No	[8]
Producción de ácido R(-)	Hidrólisis- Resolución de (+/-)	0,25 mmol/ml (+/-) metilmandelato y 0,25 mmol/ml agua.	ter-butanol	ee % = 84,2 %	No	[9]

Aplicaciones de Novozym® 435 reportadas en la literatura de los últimos 15 años

Mandélico (precursor de penicilinas y cefalosporinas)	metilmandelato	Novozym® 435 (5mg/ml) 50 °C, 4 hs.				
Síntesis de butilésteres	Esterificación	Butanol y ácido butírico Novozym® 435 (15 %) Disminuyó la actividad al aumentar el tamaño del ácido orgánico.	No	X% = 49 %	Sí	[10]
Síntesis de ésteres de vitaminas	Esterificación	ácido ascórbico/retinol y L-metil lactato Novozym® 435	Sí	X% (retinol) = 90 % X% (ácido ascórbico) = 80 %	No	[11]
Síntesis de alcanolamidas	Condensación	ácido laúrico y monoetanolamina (cantidades equimolares) Novozym® 435 90 °C	No	X% = 75 % (sin remover agua) X% = 95 % (removiendo agua)	No	[12]
	Transesterificación	(E)-4-fenilbut-3-en-2-ol (50 mg, 0,34 mmol) and vinilacetato (1,5 eq) Novozym® 435 (50 % en peso basado en el sustrato) 35 °C, 24 hs.	diisopropileter o [MEBu3P][NT2 (1ml)	X% = 32 % E > 200 ee p % = 99 %, ee s % = 47%	No	[13]
Modificación superficial de monocapas autoensambladas en acero inoxidable 316L (aplicación en	Esterificación	Sustratos: -COOH SAM / -OH SAM y perfenazina/ibuprofeno respectivamente. SAM: monocapas autoenzambladas -COOH SAM: monocapas de ácido 16- mercaptohexadecanoico -OH SAM: monocapas de 11-mercapto-	Tolueno		No	[14]

Aplicaciones de Novozym® 435 reportadas en la literatura de los últimos 15 años

administración de fármacos)		1-undecanol Novozym® 435 60 °C, 5 hs.				
Síntesis de antitumoral 5'-o-benzoil-5-fluorouridina	Benzoilación	benzoato de vinilo y 5-fluorouridina. Relación molar benzoato/5FU = 25/1 Catalizador: Novozym® 435 70 °C, aw: 0,07	Hexano: tetrahidrofura no (50:50 v/v)	X% = 98,9 % ee % >99 %	No	[15]
Síntesis del inhibidor de la dipeptidil-peptidasa IV	Amoniólisis de ésteres	Ácido (5S)-4,5-dihidro-1H-pirrol-1,5-dicarboxílico ,1-(1,1-dimetil)-5-etil éster (0,91M) y carbamato de amonio (71 g/l) Novozym® 435 / CALB libre (25 g/l) 50 °C, 400 rpm. Aditivos: 1) cloruro de calcio (100 g/l): une etanol liberado durante la formación de la amida 2) Sodalime o Ascarite (200 g/l): une el CO ₂ liberado desde el carbamato	Tolueno seco o t-butanol	X% Novozym® 435 = 43 % X% CALB libre = 69 % X% CaCl ₂ = 79 % X% Sodalime = 84 % X% Ascarite = 95 %	No reporta	[16]
Síntesis de antiviral anti-Hepatitis C	Acilación regioselectiva	Ribavirin y oxime éster de (S)-carbобензилоxi-alanina Novozym® 435 60 °C, 24 hs.	tetrahidrofura no	X% = 85 %	No	[16]
Síntesis de antileucémico	Acilación	Vinilacetato y prodroga de 9-β-D-arabinofuranosil guanina (100 g/l) Novozym® 435	1,4 dioxano			[16]

Aplicaciones de Novozym® 435 reportadas en la literatura de los últimos 15 años

Resolución cinética dinámica (DKR)	DKR- Síntesis del precursor de R-dopamina (tratamiento de hipertensión)	(+/-) 207 y p-clorofenil acetato Catalizador: Novozym® 435 y complejo de Rutenio 60 °C	Tolueno	X % = 84 % ee p % >99	No	[16]
	DKR de aminas primarias	Amina primaria y acetato de etilo o metoxiacetato de etilo Catalizador: Novozym® 435 y nanocatalizador de Pd		X% entre 85 %-99 % ee % entre 97 %-99 %		[16]
	DKR de alcoholes secundarios	Alcohol secundario y iso-propil butirato Catalizador: Novozym® 435 y complejo de rutenio dinuclear 24 hs		X% = 100 %	No	[16]
	DKR de alcoholes secundarios	Alcoholes secundarios /aril o alquil dioles y p-clorofenilacetato/isopropenilacetato (3 equiv) Catalizador: Novozym® 435 y complejo de rutenio (2 mol %)	Tolueno	p-clorofenilacetato X% = 78-92 %, ee ≥ 99 % Isopropenilacetato X% 83-95 %, ee ≥ 99 % Dioles X% 76-78 %		[17]
	DKR de Azido alcoholes	Azido alcohol (0,6 mmol) y p-clorofenil acetato (3 equiv) Catalizador: Novozym® 435 (90 mg) y complejo de rutenio (4 mol %) 80 °C	Tolueno (6ml)	X% = 100 % ee % >85 %	No	[17]

Aplicaciones de Novozym® 435 reportadas en la literatura de los últimos 15 años

	DKR de hidroxinitrilos	Hidroxinitrilos (0,2 mmol) y p-clorofenilacetato (3 equiv) Catalizador: Novozym® 435 (20 mg) y complejo de rutenio (4 mol %) 100 °C, 36 hs.	Tolueno (2ml)	X% >70 % ee % >90 %	No	[17]
	DKR de aminas primarias	Amina primaria (0,50 mmol) y iso-propil acetato (400 µl) Catalizador: Novozym® 435 (20 mg) y complejo de rutenio (0,02 mmol) Carbonato de sodio (20 mg), 90 °C, 3 días	Tolueno (8 ml)	X% = 70-95 % ee % >95 %		[18]
Resolución de ibuprofeno racémico Ver también anexo 1	Esterificación	<u>1º reacción:</u> (+/-) ibuprofeno (100 g) y 1-dodecanol (67,74 g) Novozym® 435 (11 g) 70 °C, vacío, 24 hs. <u>2º reacción:</u> material de primer etapa (enriquecido en S-ibuprofeno) (75 g) y 1-dodecanol (22,58 g) Novozym® 435 (8,25 g) 70 °C, vacío, 48 hs.	No	1º reacción: X% = 71% ees-ibu% = 86% 2º reacción: X% = 49% eeS-ibu % = 97,3%	No	[19]
	Esterificación	Sustratos (66 mM): (+/-) ibuprofeno y 1-propanol. Relación Molar:1:1	Isooctano (10 ml)	X% = 49,7 % ee s-ibu% = 27 %,	Si	[20]

Aplicaciones de Novozym® 435 reportadas en la literatura de los últimos 15 años

		Novozym® 435 (500 mg) agua (μl): No 24 °C, 100 rpm, 7 hs.		E = 2,2		
	Esterificación	(+/-) ibuprofeno (0,5 g) y etanol (1 ml) Novozym® 435 (160mg) agua: 4,76 % 45 °C, 200 rpm, 48 hs.	No	X% = 62 % ee% = 50 %	Si	[21] y [22]
Síntesis de derivados de drogas	Acilación	1 mmol Droga (1,2 propandiol/ Rivabirin) y 3 mmol Vinil ésteres Novozym® 435 (10 mg) 50 °C, 200 rpm	Acetona (2 ml)	- 1,2-propandiol X%: 58 % a 95 % (4hs) - Ribavirin X%: 41-93 % (24hs)	disminución de X% con ciertos sustratos	[23]
Preparación de ésteres de ibuprofeno (prodroga)	Acilación	1mmol ibuprofeno y 0,5 mmol metil α-D-glucopiranosido Novozym® 435 (0,2 g) 50 °C, 200 rpm, 144 hs. 4 ciclos sucesivos de reacción	Acetonitrilo (20 ml)	X% 1ºciclo: 87,3 %; ee% (ésterR): 40 % X% 4ºciclo: 31,7 %	Si	[24]
	Esterificación	(+/-) ibuprofeno (1,96 mmol) y dodecanol (1,47 mmol). Novozym® 435 (150-750 mg) 22 °C	Si		No reportado	[25]
N- acilación para obtener N-araquidonil-glicina (tensoactivo en formulaciones farmacéuticas y	N- acilación	2,5 mmol ácido araquidonico o metil araquidonato y 0,5 mmol glicina o tert- butil-glicina Novozym® 435 10 %w/w de sustrato 60 °C	Acetonitrilo o 2-metil-2- butanol	Acilación directa de glicina: X% < 10 % Mejores resultados: metilaraquidonato/t erbutilglicina- acetonitrilo	No	[26]

Aplicaciones de Novozym® 435 reportadas en la literatura de los últimos 15 años

cosméticas)				X% (24 hs) 75 %		
Síntesis de ésteres alifáticos, aromáticos y terpenos (materiales para flavor)	Alcoholisis	Alcohol (0,1 mol) y metil éster del ácido carboxílico correspondiente (0,2 mol) Novozym® 435 (0,3 g) 55 °C	No	Producto/tiempo para obtener 90 % de conversión: Pentilvalerato/10 hs 3metil-butyl-valerate/10 hs 2-metil-butyl-valerato/35 hs Geranil acetato/6 hs Citronelil acetato/6 hs Geranil valerato/10 hs Citronelil valerato/10 hs	No	[27]
Síntesis de poliésteres alifáticos (apertura de anillos)	Transesterificación	2-hidroxi-etil metacrilato (iniciador, 200 µl, 1,6 mmol) ω -pentadecalactona (8,33 mmol, relación molar iniciador/monómero 1:5) o ε-caprolactona (relación molar iniciador:monómero: 1:10) 80 °C, agitación magnética, 24 hs Novozym®435, 40 mg			No	[28]
Resolución	Esterificación	(R/S)-flurbiprofeno (5 a 30 mM) y	Ciclohexano		Si (inhibición)	[29]

Aplicaciones de Novozym® 435 reportadas en la literatura de los últimos 15 años

racemica de AINES		metanol (0-750 mM) Catalizador Novozym® 435 Velocidad de agitación: 0 a 200 rpm, 180 rpm óptima Temperatura: 25 a 50 °C, 45 °C óptima.	(10 ml)		irreversible con pérdida del 67 % de actividad en un ciclo de reacción)	
	Esterificación	(R/S)-ketoprofeno y alcohol (naturaleza variable) 300 rpm, 45 °C 1) 10 mg R/S-ketoprofeno y 3 equiv. n-propanol, 10 mg Novozym® 435, 1 ml solvente (DIPE), 24 hs 2) 10 mg R/S-ketoprofeno y 3 equiv. n-propanol, 10 mg Novozym® 435, 1 ml solvente (1,2-dicloroetano/ 1,2dicloropropano), 48hs 3) 10mg R/S ketoprofeno, 3 equiv. de alcohol, 1ml solvente (1,2dicloropropano),10 mg Novozym® 435, 45 °C, 300 rpm, 100 hs.	Si (naturaleza variable) Mejores resultados:1,2-dicloroetano y 1,2dicloropropano	1)X%= 60 %; eeS%= 68 % ; E: 5 2)dicloroetano: X%= 41,2 %; eeS%=52,8 %; E= 11,9 dicloropropano: X%=18,2 %; eeS%=18,0 %; E=11,4 3)MeOH: X%=70 %; eeS%=88 %;E=5 EtOH: X%=62 %; eeS%= 93 %; E=12 hexanol: X%=55 %; eeS%=80 %; E=12	No reportada	[30]

Aplicaciones de Novozym® 435 reportadas en la literatura de los últimos 15 años

		<p>4) Escala preparativa: 1° Etapa: 500 g (R/S)-ketoprofeno disueltos en 20 L de 1,2-dicloropropano, 340 ml etanol, 500 g Novozym® 435, 45 °C, 17 hs. 2° etapa: 209 g de ácido enantioenriquecido en S ketoprofeno de la etapa 1+ 209 g R/S-ketoprofeno, 10 L 1,2-dicloropropano, 500g Novozym® 435 (recuperada de la etapa previa), 300 ml etanol, 300 rpm, 45°C, 30 hs</p>		<p>4)A escala preparativa: Etanol, 1,2-dicloropropano, proceso en 2 etapas: X%= 60 % y eeS%=96 %</p>		
	Esterificación	<p>(+/-) ibuprofeno (66 mM) /(+/-) ketoprofeno, 1-propanol (66 mM) Relación Molar 1:1 Catalizador(5 mg): Novozym® 435, CRL® y lipasas nativas de distintos microorganismos Enantiopreferencia:S-ibuprofeno/S-ketoprofeno(CRL®, otras) y R-ibuprofeno/R-ketoprofeno (Novozym® 435, lipasas de <i>Aspergillus niger</i> y <i>terreus</i>) 180 rpm, 35 °C, 54 hs</p>	Isooctano anhidro	<p>Ibuprofeno: X%=64 %, ee(S)%=83 % E=6,7</p> <p>Ketoprofeno: X%=62 % ee(S)%=55 % E=3,3</p>	No reportado	[31]

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. ANEXO 2

- [1] Tan T., Lu J., Nie K., Deng L., Wang F, *Biotechnol. Adv.* 2010, 28, 628-634.
- [2] Fjerbaek L., Christensen K.V., Norddahl B., *Biotechnol. Bioeng.* 2009, 102, 1298-1315.
- [3] Lai C-C., Zullaikah S., Ramjan Vali S., Ju Y-H., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2005, 80, 331-337.
- [4] Chang H-M., Liao H-F., Lee C-C.; Shieh C-J., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2005, 80, 307-312.
- [5] Torres P., Reyes-Duarte D., López-Cortés N., Ferrer M., Ballesteros A., Plou F.J., *Process Biochem.* 2008, 43, 145-153.
- [6] Solares L.F., Lavandera I., Gotor-Fernández V., Brieva R., Gotor V., *Tetrahedron* 2006, 62, 3284-3291.
- [7] Yadav G.D., Borkar I.V., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2009, 84, 420-426.
- [8] Van As B.A.C., Van Buijtenen J., Mes T., Palmans A.R.A., Meijer E.W., *Chemistry* 2007, 13, 8325-8332.
- [9] Yadav G.D., Sajgure A.D., Dhoot S.B., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2008, 88, 1145-1153.
- [10] Santos J.C., Bueno T., Molgero P.C., Rós D., de Castro H.F., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2007, 82, 956-961.
- [11] Maugard T., Tudella J., Legoy M.D., *Biotechnol. Progress* 2000, 16, 358-362.
- [12] Tufvesson P., Annerling A., Hatti-Kaul R., Adlercreutz D., *Biotechnol. Bioeng.* 2007, 97, 447-453.
- [13] Abe Y., Kude K., Hayase S., Kawatsura M., Tsunashima K., Itoh T., *J. Mol. Catal. B: Enz.* 2008, 51, 81-85.
- [14] Mahapatro A., Johnson D.M., Patel D.N., Feldman M.D., Ayon A.A., Agrawall C.M., *Langmuir* 2006, 22, 901-905.
- [15] Wu J., Zong M-H., Wu H., Lou W-Y., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2008, 83, 814-820.
- [16] Patel R.N., *Coordination Chemistry Reviews*, 2008, 252, 659-701.

- [17] Pámies O., Bäckvall J.E., *Chem. Rev.* 2003, 103, 3247-3261.
- [18] Paetzold J., Bäckvall J.E., *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 17620-17621.
- [19] Trani M., Ducret A., Pepin P., Lortie R., *Biotechnol. Lett.* 1995, 17, 1095-1098.
- [20] Arroyo M., Siniesterra J.V., *J. Org. Chem.* 1994, 59, 4410-4417.
- [21] José C., Briand L.E., *Reac. Kinet. Mech. Cat.*, 2010, 99, 17-22.
- [22] Foresti M.L., Galle M., Ferreira M.L, Briand L.E., *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2009, 84, 1461-1473.
- [23] Liu B., Qian X., Wu Q., Lin X., *Enzym. Microb. Technol.* 2008, 43, 375-380.
- [24] Zhao X-G., Wei D-Z., Song Q-X., *J. Mol. Catal. B: Enz.* 2005, 36, 47-53.
- [25] Ducret A., Trani M., Lortie R., *Enzym. Microb. Technol.* 1998, 22, 212-216.
- [26] Goujard L., Figueroa M.C., Villeneuve P., *Biotechnol. Lett.* 2004, 26, 1211-1216.
- [27] Gryglewicz S., Jadownicka E., Czerniak A., *Biotechnol. Lett.* 2000, 22 1379-1382.
- [28] Takwa M., Xiao Y., Simpson N., Malmström E., Hult K., Koning C.E., Heise A., Martinelle M., *Biomacromolecules* 2008, 9, 704-710.
- [29] Zhang H.Y., Wang X., Ching C.B., *Chirality* 2007, 19, 245-249
- [30] D'Antona N., Lombardi P., Nicolosi G., Salvo G., *Process Biochem.* 2002, 38, 373-377.
- [31] Oliveira Carvalho P., Contesini F.J., Ikegaki M., *Brazilian Journal of Microbiology* 2006, 37, 329-337.

ANEXO 3

Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

ANEXO 3. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCE

1-Técnicas cromatográficas - HPLC - HPLC quiral

1.1. Introducción a las técnicas cromatográficas

La **cromatografía** es un método físico para la caracterización de mezclas complejas, la cual tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) la cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una que permanece inmóvil (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección determinada [1].

Hoy en día se cuenta con una gran variedad de técnicas cromatográficas, basadas todas ellas en el principio de retención selectiva y cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes.

En una técnica cromatográfica la fase móvil, la cual puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico, se hace pasar en una dirección determinada a través de la fase estacionaria con la que es inmisible y consiste en un sólido o un líquido fijado en un sólido. Dicha fase estacionaria se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen (interaccionan) de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez (retención selectiva). Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente [2].

Después de que los componentes hayan pasado por la fase estacionaria, separándose, pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración

y del tipo de compuesto. El registro de esta señal en función del tiempo (o del volumen de fase móvil añadido) da lugar a un conjunto de picos que representan el cromatograma; registro útil para realizar el análisis cuali y cuantitativo. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para la identificación de los componentes de la muestra mientras que las áreas debajo de los picos proporcionan una medida cuantitativa de cada componente **[2]**.

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de dos modos distintos. El primero de ellos se basa en la forma en que las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto, diferenciándose así la cromatografía en columna de la cromatografía en plano o plana. En la cromatografía en columna, un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual hace se pasar la fase móvil por presión o gravedad. En la cromatografía en plano o plana, la fase estacionaria se fija sobre una placa plana o a los intersticios de un papel; en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por efecto de la gravedad **[2]**.

Otra clasificación de los métodos cromatográficos se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases. Así en base al tipo de fase móvil implicada se tienen tres clases generales de cromatografía: cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos. La tabla 1 presenta la clasificación en base al tipo de fase móvil y equilibrio involucrado **[2,3]**.

Hay que mencionar que solamente la cromatografía de líquidos es la que puede llevarse a cabo en columnas o sobre superficies planas; por otra parte, tanto la cromatografía de gases como la de fluidos supercríticos están restringidas a los procedimientos en columna, de tal modo que las paredes de la columna contienen la fase móvil.

Tabla1. Clasificación de métodos cromatográficos en columna

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de gases (CG)	Gas-Líquido	Líquido unido o adsorbido a superficie sólida	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas- Sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de líquidos (CL)	Líquido-Líquido (reparto) ⁷	Líquido unido o adsorbido a superficie sólida	Distribución entre dos líquidos inmiscibles
	Líquido-Sólido (adsorción)	Sólido	Adsorción
	Intercambio de iones	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en intersticios de sólido polimérico	Distribución-exclusión
Cromatografía de fluido supercrítico (CFS)	Afinidad	Grupo de líquidos específicos unidos a superficie sólida	Distribución entre líquido de la superficie y líquido móvil
		Especies orgánicas enlazadas a superficie sólida	Distribución entre fluido supercrítico y superficie enlazada

A continuación se da una breve explicación del “proceso cromatográfico” el cual es válido para toda técnica cromatográfica aunque aquí se considere a la **cromatografía líquida en columna** como modelo [2, 3]. La figura 1 muestra como dos sustancias A y B se separan en una columna por cromatografía de elución con una fase móvil. La elución implica el transporte de una especie a través de una columna por la adición continuada de nueva fase móvil. El proceso empieza cuando una única porción de la muestra se introduce en la parte superior de la columna (tiempo t_0) después de lo cual los componente de la muestra se distribuyen entre las dos fases, La introducción de fase móvil adicional, el eluyente, hace que la fase móvil que contiene una parte de la muestra avance por la columna, donde tienen lugar un posterior reparto entre la fase móvil y las porciones frescas de fase estacionaria a las que accede (tiempo t_1). Al mismo tiempo, tiene lugar una distribución entre el disolvente nuevo y la fase estacionaria en el lugar en el que inicialmente se ubicaba la muestra. Las sucesivas adiciones de la fase móvil hacen avanzar las moléculas de soluto (analitos) por la

columna en una serie de continuas transferencias entre las fases estacionaria y móvil. Sin embargo, debido a que el movimiento de los solutos solo puede ocurrir en la fase móvil, la velocidad media a la que una zona de soluto migra en la columna depende de la fracción de tiempo que reside en esta fase. Esta fracción de tiempo es pequeña para las sustancias que son retenidas fuertemente por la fase estacionaria (compuesto B) y es grande cuando es más probable la retención en la fase móvil (componente A). Las diferencias de velocidad que resultan hacen que se separen los componentes de la mezcla en bandas o zonas, que se localizan a lo largo de la columna (tiempo t_2). El aislamiento de las especies separadas se realiza haciendo pasar suficiente cantidad de fase móvil a través de la columna hasta que las bandas individuales salen de ella, pudiendo así detectarse o reconocerse (tiempos t_3 y t_4).

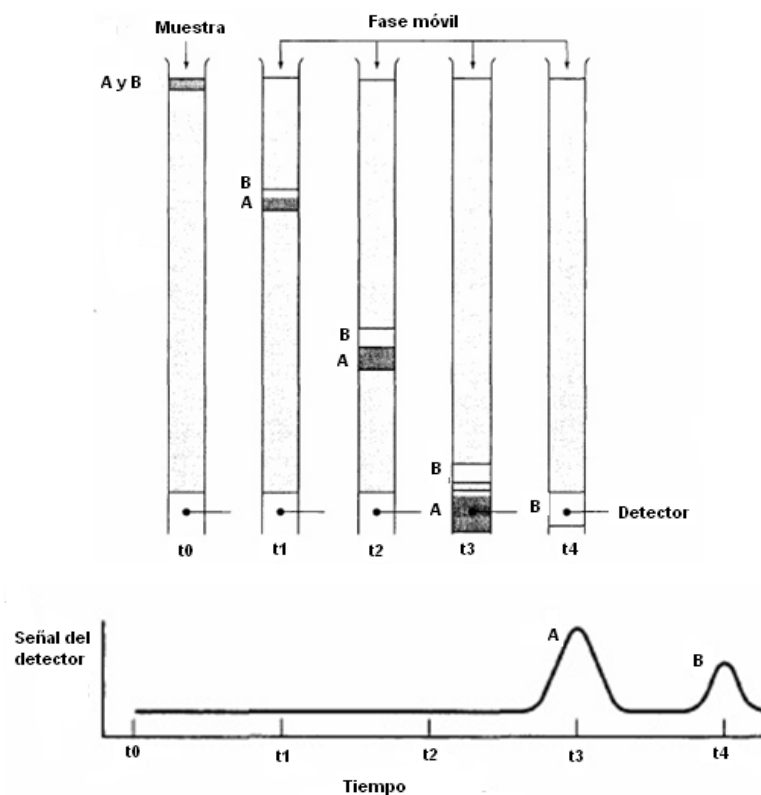


Figura 1. (a) diagrama que muestra la separación de una mezcla de A y B por cromatografía de elución en columna. (b) Señal de salida del detector en las distintas fases de la elución mostradas en (a). (Extraída de [2])

Durante la elución ocurre un proceso asociado y muy importante, la dilución del analito, proceso que acompaña casi siempre a las separaciones. Por otro lado el movimiento de avance por la columna aumenta la distancia entre las bandas. Sin embargo, al mismo tiempo tiene lugar un ensanchamiento de ambas zonas, lo que disminuye la eficacia de la columna como sistema de separación. Existen condiciones en las que se puede lograr que el ensanchamiento de bandas se dé más lentamente que la separación.

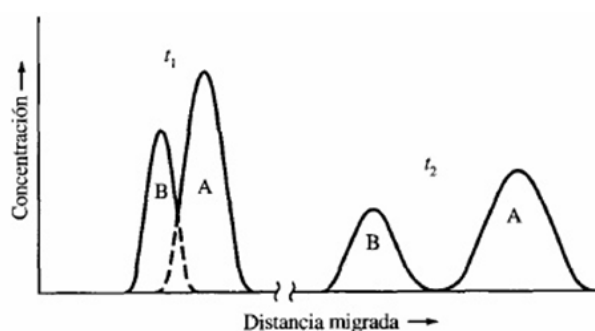


Figura 2. Perfiles de concentración de las bandas de los analitos A y B a dos tiempos distintos en su migración a lo largo de la columna de la figura 1. Los tiempos t_1 y t_2 se indican en la figura 1 (Extraído de [2]).

1.2. HPLC propiamente dicha

Es incuestionable que la Cromatografía Líquida de Alta Presión a menudo conocida como Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) es la técnica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas, terpenoides, plaguicidas, antibióticos esteroides, especies organometálicas y una cierta variedad de sustancias inorgánicas. En cuanto a

las características que debe poseer la muestra a analizar por esta técnica, solo se requiere que sea soluble en la fase móvil empleada lo cual hace extensa la aplicabilidad de esta técnica cromatográfica [4,5].

En esta técnica un pequeño volumen de muestra líquida (del orden de 10 μ l) se inyecta y es arrastrada por la fase móvil, la cual es bombeada a alta presión, hacia la columna cromatográfica donde pasa a través de la fase estacionaria de pequeño tamaño de partícula (3 a 10 μ m). La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía [4].

La separación de enantiómeros por HPLC es una técnica que cada vez es más importante, especialmente en la industria farmacéutica. La síntesis de enantiómeros es a menudo dificultosa, y la industria farmacéutica se ha interesado tanto en cromatografía preparativa como un medio para producir fármacos ópticamente puros y como en la separación analítica para establecer la composición óptica de los productos de reacción.

Diversos enfoques han sido utilizados para la separación de enantiómeros. Se pueden separar diastereoisómeros en columnas convencionales, ya sea después de un proceso de derivatización adecuado o por la adición de compuestos quirales para la fase móvil [5]. Alternativamente, hoy en día existe un gran número de fases estacionarias quirales (CSPs) comerciales, basadas en distintos tipos de selectores quirales como proteínas, polisacáridos, ciclodextrinas, tipo Pirkle, de intercambio de ligando, éteres corona, antibióticos macrólidos y polímeros quirales. Esta gran variedad de CSPs ha hecho que la cromatografía de líquidos quiral tenga hoy día un alto grado de sofisticación y, por tanto, una gran variedad de aplicaciones [3].

1.3. Equipamiento y condiciones empleadas

Equipamiento básico de HPLC: Un cromatógrafo de líquidos de alta resolución consta de seis componentes fundamentales: un reservorio de fase móvil, una bomba para impulsar la fase móvil por todo el sistema a un flujo determinado, un sistema de

inyección de la muestra, una columna que contiene la fase estacionaria, un detector y un sistema de adquisición de datos [3]. En la figura 3 se muestra un esquema del equipo de HPLC.

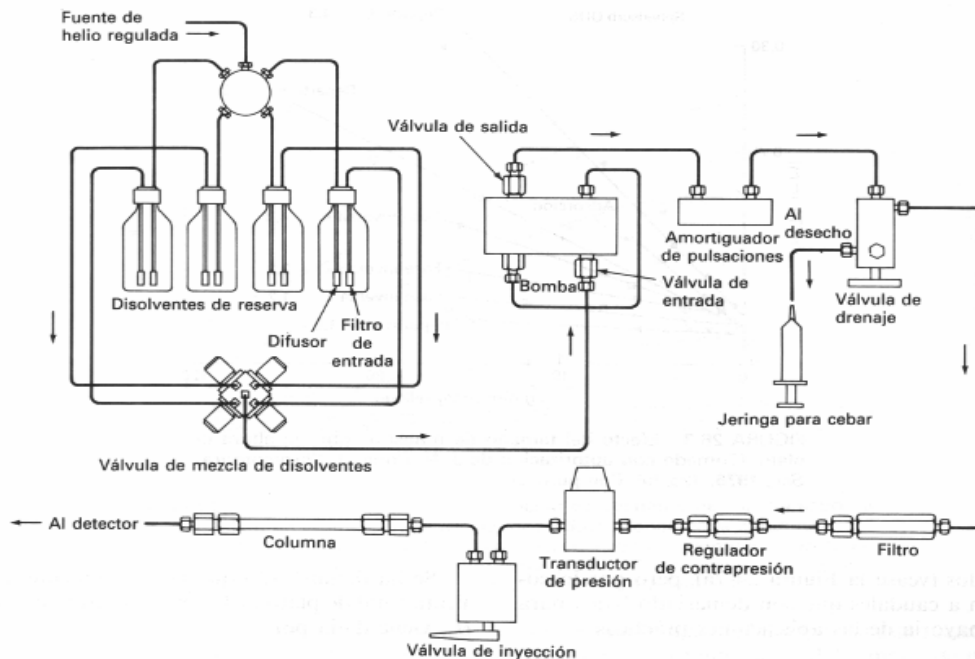


Figura 3. Esquema general de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (extraído de [3])

Descripción de nuestro equipo:

- Columna: En este trabajo se empleó una columna Nucleodex beta-PM (Macherey-Nagel, Alemania) 20 cm, 4 mm, cuya fase estacionaria consiste en β -ciclodextrinas permetiladas unidas a partículas porosas de sílice de 5 a 10 μm de diámetro (Figura 4) [10]

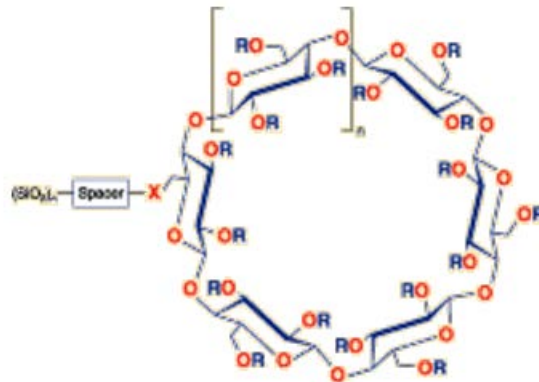


Figura 4. Representación de la fase estacionaria empleada. Columna Nucleodex B-PM Macherey-Nagel. R= CH₃, n= 2. Obtenido de www.mn-net.com [6].

Las ciclodextrinas son oligosacáridos compuestos por unidades de alfa D-glucosa unidas en posiciones 1,4. Las beta y gamma ciclodextrinas contienen 7 y 8 unidades de glucosa, respectivamente. La separación en este tipo de fase estacionaria (conocidas como *fases de cavidad*) se lleva a cabo mediante la formación de compuestos de inclusión. Debido a la uniformidad estereoquímica de las unidades de glucosa, todos los grupos hidroxilo secundarios están orientados hacia un extremo de la estructura toroidal, mientras que todos los grupos hidroxilos primarios se orientan hacia el extremo opuesto, dando lugar a una superficie hidrofílica. Por otro lado, la cavidad interna está formada por los oxígenos de los enlaces glucosídicos y los hidrógenos de las unidades de glucosa por lo que tiene un carácter hidrofóbico apolar. En consecuencia moléculas apolares y de tamaño adecuado tienen tendencia a formar compuestos de inclusión a través de interacciones dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno o fuerzas de dispersión de London. Otra característica importante de las ciclodextrinas es que tienen un número importante de centros quirales ya que cada unidad de glucosa presenta 5 centros quirales. La β -ciclodextrina es una de las más utilizadas porque su cavidad interna posee el tamaño óptimo para la formación de compuestos de inclusión [3].

Las condiciones de trabajo empleadas en este trabajo de tesis fueron:

- HPLC isocrática con fase móvil compuesta por metanol/0,1 %v/v TEAA, pH 4,0 (60:40 v/v)
- Volumen de inyección: 10 μ l
- Flujo de 0,700 ml/min.
- Presión: 2000 psi
- Temperatura: ambiente
- Detector UV operando a 230 nm [7]
- Tiempo de análisis de 40 minutos

Dichas condiciones de operación fueron halladas como óptimas para la resolución de R/S-ibuprofeno por Foresti et al [8] en este mismo equipo de HPLC.

Todas las muestras se corren un mínimo de tres veces con un 2% de error relativo, la estimación de dicho error se presenta más adelante en este Anexo.

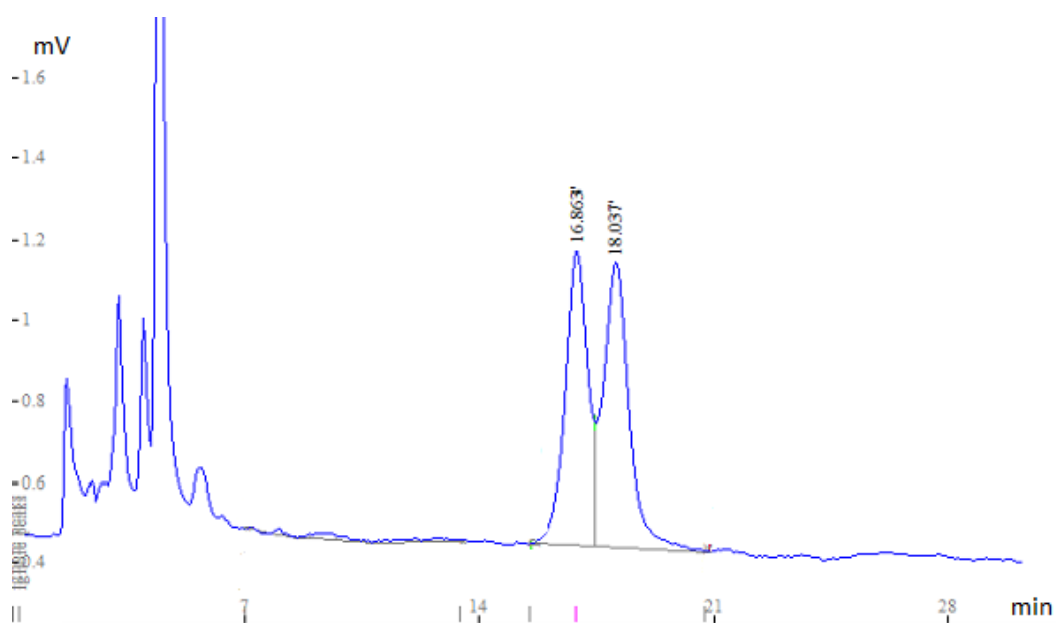


Figura 5. Cromatograma de (R/S)-ibuprofeno obtenido bajo las condiciones mencionadas previamente.

2-Linalidad de respuesta de HPLC quiral y cálculo del factor de detección

2.1. Linealidad de respuesta área-concentración

S-ibu (ppm)	Area S	R-ibu (ppm)	Area R
0	0	0	0
21,39	494	10,43	206,75
34,9	754,75	13,23	227,75
40,76	766,75	16,8	364,25
47,47	899,75	19,86	353,25
48,94	1033,5	23,03	454,75
54,92	1101,75	34,4	643
3,071	411,5	2,771	343,5
59,87	895,25	52,03	720,75

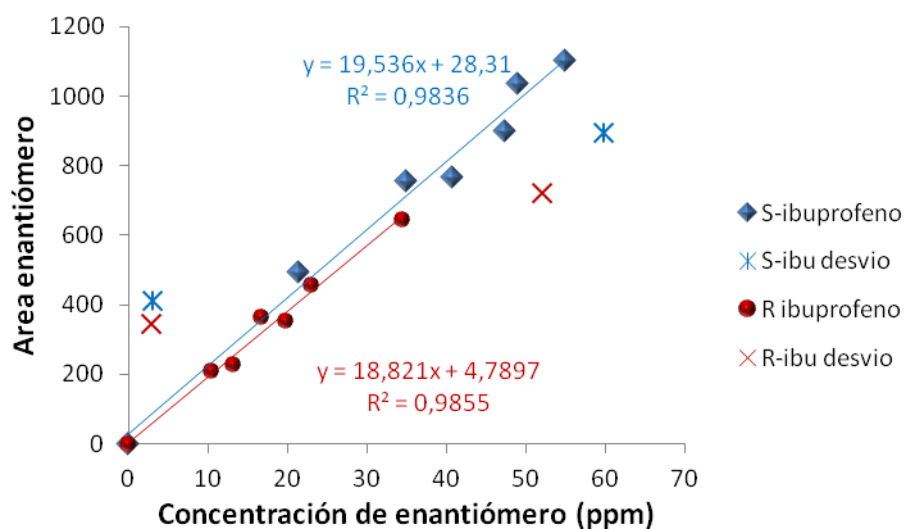


Figura 6. Verificación de linealidad de respuesta Área-Concentración

La figura 6 evidencia la linealidad de respuesta del equipo de HPLC quiral empleado para ambos enantiómeros del ibuprofeno. Se observó linealidad de respuesta para el S-ibuprofeno en un rango de concentración comprendido entre 10 ppm y 60 ppm. Sin

embargo, el intervalo de concentración con respuesta lineal para el enantiómero R resultó ser más estrecho, de 10 a 40 ppm. Este análisis involucró el empleo de soluciones de (R/S)-ibuprofeno conteniendo entre 6 y 112 ppm de ibuprofeno total.

2.2. Factor de detección: Area S-ibuprofeno/Area R-ibuprofeno

R/S-ibuprofeno (ppm)	24,12	25,9	30,11	34,44	40	47,23
Area S/Area R	1,049	1,074	1,076	1,073	1,076	1,08

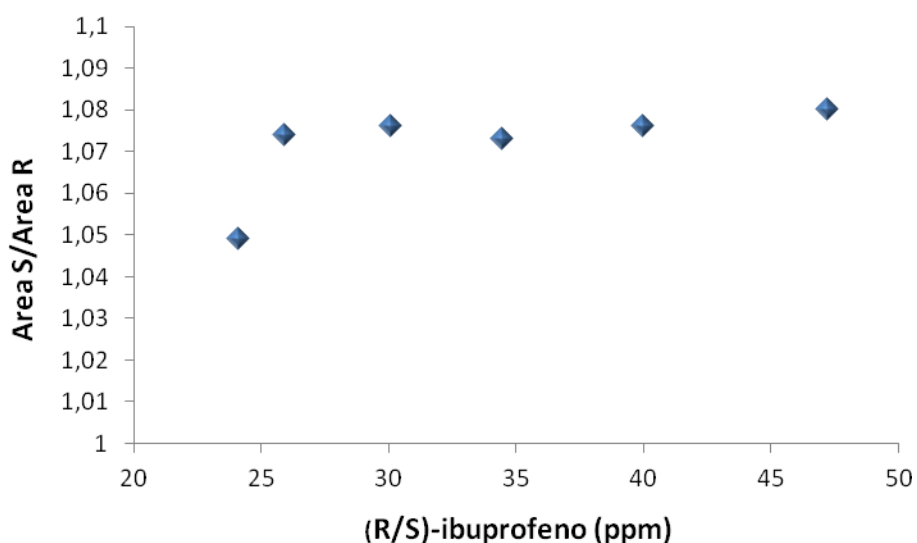


Figura 7. Valor del factor de detección, AreaS/AreaR, en función de la concentración de ibuprofeno racémico

Factor (Area S/Area R) promedio = 1,075, rango de concentración: 26-40 ppm

Si bien queda evidenciada la validez del valor 1,075 para el factor de detección en el rango de concentraciones normalmente empleadas en todo el trabajo de investigación (30 ppm), en cada experiencia se calculó el factor Area S/Area R empleando una muestra control de ibuprofeno racémico, y el valor obtenido fue utilizado en el cálculo del exceso enantiomérico (eeS%) correspondiente a esa experiencia particular. Así, se

evitan errores asociados al cambio del alcohol o presencia de co-solvente en el sistema.

3-.DETERMINACION DE LA DESVIACION PROMEDIO, ERROR PORCENTUAL Y DESVIACION ESTÁNDAR DE MEDIDAS EN HPLC

3.1- Ensayo blanco para determinación de errores

Ensayo Blanco Para Evaluación de Errores

Cálculo de la Desviación Promedio en la Determinación de la Concentración del Isómero S-ibu

Tpo (min)	S ppm	Promedio	Desv. Individ.	Desv.Prom.	Error porcentual
0	31.89	31.7728571	0.11714286	0.64040816	2.01558255
5	33.01	31.7728571	1.23714286		
10	30.94	31.7728571	0.83285714		
15	31.68	31.7728571	0.09285714		
20	31.19	31.7728571	0.58285714		
25	31.04	31.7728571	0.73285714		
30	32.66	31.7728571	0.88714286		

Calculo de la Desviación Estándar de la Concentración del Isómero S-Ibuprofeno

Tpo (min)	S ppm	Promedio	Desv.Standard
0	31.89	31.7728571	0.01372245 0.74740913
5	33.01	31.7728571	1.53052245
10	30.94	31.7728571	0.69365102
15	31.68	31.7728571	0.00862245
20	31.19	31.7728571	0.33972245
25	31.04	31.7728571	0.53707959
30	32.66	31.7728571	0.78702245

Cálculo de la Desviación Promedio en la Determinación de la Concentración del Isómero R-ibu

Tpo (min)	R ppm	Promedio	Desv. Individ.	Desv.Prom.	Error porcentual
0	32.52	32.7742857	0.25428571	0.67346939	2.05487129
5	33.29	32.7742857	0.51571429		
10	32.06	32.7742857	0.71428571		
15	33.26	32.7742857	0.48571429		
20	32.11	32.7742857	0.66428571		
25	32.05	32.7742857	0.72428571		
30	34.13	32.7742857	1.35571429		

Calculo de la Desviación Estándar de la Concentración del Isómero R-Ibuprofeno

Tpo (min)	R ppm	Promedio	Desv.Standard
0	32.52	32.7742857	0.06466122
5	33.29	32.7742857	0.26596122
10	32.06	32.7742857	0.51020408
15	33.26	32.7742857	0.23591837
20	32.11	32.7742857	0.44127551
25	32.05	32.7742857	0.5245898
30	34.13	32.7742857	1.83796122

El ensayo anterior indica un error relativo porcentual de 2.0 %

3.2.- Determinación de la desviación promedio y el Error relativo en los valores de eeS% de la cinética de esterificación

tiempo	valores de eeS	promedio	desv. Indiv	desv prom	error relativo%
3 hs	7	7	0	0,25	3,57
	8	7	1		
	7	7	0		
	7	7	0		
6 hs	12	12	0	0,75	6,25
	13	12	1		
	11	12	1		
	11	12	1		
12 hs	22	23	1	0,25	1,09
	23	23	0		
	23	23	0		
	23	23	0		
24 hs	35	36	1	0,5	1,39
	37	36	1		
	36	36	0		
	36	36	0		
30 hs	40	41	1	0,5	1,22
	41	41	0		
	40	41	1		

	41	41	0		
72 hs	54	54	0	0,5	0,93
	55	54	1		
	55	54	1		
	54	54	0		
				promedio	
				Er% =	2,41

Aquí están calculados los errores porcentuales de cuatro determinaciones de ee que involucran toma de muestra, dilución, análisis en el HPLC y deconvolución de las señales. El promedio de los errores relativos es de 2.4 %.

4- ERRORES EN LA DETERMINACIÓN DE CONVERSIÓN POR TITULACION CON KOH

Las conversiones se determinaron por titulación y no a través del HPLC, así los cálculos anteriores no se aplican aquí. A continuación están evaluados los errores de las titulaciones de ibuprofeno de ensayos de esterificación que se realizaron por duplicado o triplicado. En estos ensayos la titulación de ibuprofeno se realizó solo una vez en cada frasco (una verdadera determinación del error requiere titular varias veces la misma muestra) así , los errores que se presentan a continuación son una estimación del error de titulación, correspondiendo al error del procedimiento global de determinación de X%, involucrando la reacción propiamente dicha y titulación posterior.

Así, la estimación del error en la conversión de la reacción se realizó empleando cinco grupos de datos, correspondientes a las siguientes condiciones de reacción:

Grupo1: etanol; RM 7,08; Novozym435 160 mg/ml; 48 hs; 45 °C

Grupo 2: etanol; RM 7,08; Novozym435 160 mg/ml; 72 hs; 45 °C

Grupo 3: etanol; RM 7,08; Novozym435 160 mg/ml; 72 hs; 37 °C

Grupo 4: etanol; RM 7,08; Novozym435 160 mg/ml; 5 hs; 55 °C

Grupo 5: etanol; RM 14; Novozym435 160 mg/ml; 72 hs; 45 °C

Grupo	X%	X% prom	Desv indiv	Desv prom	Er %	Varianza	Desv standar
1	55,5	59,833	4,333	2,889	4,828	14,083	3,753
	62,0		2,167				
	62,0		2,167				
2	62,1	65,550	3,450	3,450	5,263	23,805	4,879
	69,0		3,450				
3	51,0	50,000	1,000	1,000	2,000	2,000	1,414
	49,0		1,000				
4	31,0	29,350	1,650	1,650	5,622	5,445	2,333
	27,7		1,650				
5	47,23	44,420	2,810	2,000	4,502	8,466	2,906
	44,61		0,190				
	41,42		3,000				

Error relativo % promedio = 4,444

Desviación estándar promedio = 3

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. ANEXO 3

[1] www.IUPAC.org

[2] Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R., Principio de análisis instrumental, 6° edición, 2008, ISBN-13: 978-970-686-829-9, ISBN-10: 970-686-829-1, Cengage Learning, México DF.

[3] Morante Zarcero S., Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación a la síntesis asimétrica, 2007, ISBN: 978-84-9772-998-7. Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, España. Editorial Dykinson S.L. Madrid.

[4] Meyer V., Practical High Performance Liquid Chromatography, 5° edición, 2010, John Wiley & Sons

[5] Sandie Lindsay, High Performance Liquid Chromatography , 2° edición, 1992, ISBN 10: 0471931152, ISBN 13: 978-0471931157, John Wiley & Sons.

[6] www.mn-net.com

[7] Matkovic S.R., Valle G.M., Briand L.E., *Lat. Am. Appl. Res.* 2005, 35, 189-195.

[8] Foresti M.L., Martino R., Ferreira M.L., Briand L.E., XV Congreso Argentino de Catálisis y 4º Congreso de Catálisis del MERCOSUR, 2007, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

ANEXO 4

Fundamentos de técnicas experimentales

ANEXO 4. FUNDAMENTOS DE TECNICAS EXPERIMENTALES

1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

La espectroscopia de infrarrojo es uno de los métodos clásicos para determinación de estructura de moléculas pequeñas debido a su sensibilidad a la composición química y a la arquitectura de las moléculas [1]. Es una de las técnicas más ampliamente usadas como método de identificación y caracterización de sustancias. En el campo de la catálisis permite obtener información a nivel molecular del material catalítico. Así mismo, en el caso de reacciones heterogéneas, permite monitorear directamente la interacción entre las moléculas adsorbidas y el catalizador cuando el análisis se realiza en condiciones de reacción (*in situ*) [2].

Los fotones que transportan la radiación infrarroja no tienen energía suficiente para provocar transiciones electrónicas pero si pueden conseguir vibraciones de los enlaces covalentes de las moléculas. La energía necesaria para provocar una transición vibracional depende del tipo de átomos y del tipo de enlace que los mantiene unidos. Una molécula absorberá energía de un haz infrarrojo cuando dicha energía se corresponda con la necesaria para que se produzca una transición vibracional en la molécula.

Algunas frecuencias de vibración están prohibidas, es decir, no aparecen en el espectro infrarrojo. El requisito general para la actividad infrarroja de una molécula es que la vibración de la misma produzca una variación periódica del momento dipolar. Si no ocurre tal cambio, la vibración será inactiva en el infrarrojo. Por supuesto la molécula puede todavía efectuar la vibración, pero no será activada por la absorción de radiación infrarroja, y por este motivo no será detectada en el espectro infrarrojo [3].

La frecuencia de vibración y la probabilidad de absorción dependen de la fuerza y la polaridad de las uniones vibrantes por lo tanto, estarán influenciadas por efectos inter e intramoleculares. Así, la posición de una banda de absorción en el IR está determinada por las masas vibratorias, y el tipo de enlace (simple, doble, triple), la posición exacta de los electrones por efectos de “donación-retirada” dado por efectos

intra e intermoleculares y por acoplamiento con otras vibraciones. En la ciencia de proteínas el efecto del medio ambiente sobre las frecuencias de vibración es a menudo un indicador de cómo funcionan las proteínas **[1]**.

Un espectro infrarrojo consiste en el gráfico de la absorbancia (o transmitancia) en función de la inversa de la longitud de onda (número de onda) que es proporcional a la energía de transición y posee unidades de cm^{-1} . La coordenada horizontal del espectro corre desde altos hacia bajos valores del número de onda de acuerdo con la recomendación de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) **[1]**.

La región espectral infrarroja es adyacente a la región visible del espectro y se extiende desde $0,78 \mu\text{m}$ (780 nm) hasta $1000 \mu\text{m}$. Esta región se subdivide en: infrarrojo cercano ($780 \text{ nm} - 2,5 \mu\text{m}$), infrarrojo medio ($2,5-50 \mu\text{m}$) e infrarrojo lejano ($50-1000 \mu\text{m}$). La región del infrarrojo medio que se extiende desde $2,5$ a $50 \mu\text{m}$ corresponde a $4000-200 \text{ cm}^{-1}$ expresado en número de onda y es la zona donde se encuentran la mayor parte de las bandas características de los distintos grupos funcionales **[1 y 4]**.

Los equipos de infrarrojo modernos son generalmente *espectrofotómetros de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)* porque la señal del detector de estos equipos se relaciona por una transformada de Fourier con el espectro medido. La técnica de transformada de Fourier supuso una revolución en la espectroscopia en general y particularmente en este tipo de espectroscopia, permitiendo la obtención de espectros de forma rápida, precisa y con relaciones señal/ruido elevadas.

La figura 1 muestra esquemáticamente un espectrofotómetro infrarrojo FTIR, el cual posee tres elementos básicos: una fuente luminosa, un interferómetro de Michelson y un detector.

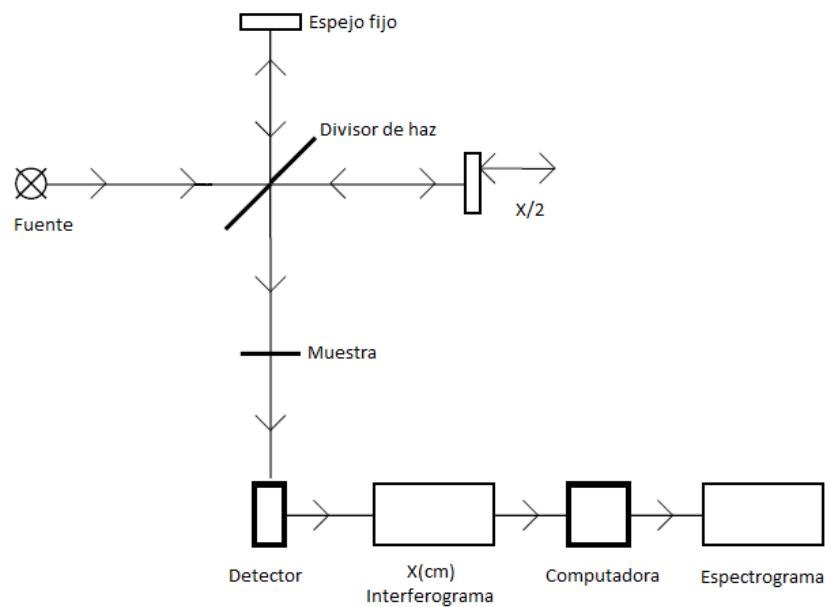


Figura 1. Esquema simplificado de un espectrómetro FTIR [4].

Su funcionamiento es el siguiente: un haz colimado, proveniente de una fuente que emite luz en toda la región infrarroja incide sobre un divisor de haz. El haz incidente se divide en dos haces perpendiculares de igual energía, uno de los cuales incide sobre un espejo fijo y el otro sobre un espejo móvil. Los haces son reflejados por ambos espejos y se recombinan al llegar al divisor de haz. Esto da lugar a una interferencia, la cual puede ser constructiva o destructiva dependiendo de la posición relativa del espejo móvil con respecto al fijo. El haz resultante pasa a través de la muestra, en donde sucede la absorción selectiva de longitudes de onda y, finalmente, llega al detector.

La información recabada por el detector se utiliza para obtener el interferograma, el cual es digitalizado. Una computadora desarrolla el cálculo de la transformada de Fourier del interferograma.

La interacción entre la radiación que incide sobre la materia se explica por tres fenómenos diferentes: absorción, transmisión y reflexión. En general se cumple que la intensidad de la luz transmitida (I_T) es menor que la intensidad incidente (I_0). Una fracción de I_0 es reflejada (I_R) mientras que otra es absorbida (I_A).

La técnica más frecuentemente utilizada en la espectroscopia infrarroja es la basada en la medición de la intensidad transmitida o absorbida (técnica de transmisión). Pero también se han desarrollado técnicas que permiten medir la intensidad reflejada por una muestra como la reflectancia total atenuada (ATR, Attenuated Total Reflectance) y la reflectancia difusa (DRIFTS, Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy).

DRIFTS, Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy. Es una técnica que permite obtener de forma eficaz espectros infrarrojos directamente sobre muestras pulverizadas con mínima preparación de la misma.

La reflexión difusa es un proceso complejo que tiene lugar cuando un haz choca con la superficie de un polvo finamente dividido. En este tipo de muestra tiene lugar una reflexión especular (ángulo de reflexión idéntico al ángulo de incidencia) en cada superficie plana. Sin embargo, como hay muchas de éstas y se encuentran aleatoriamente orientadas, la radiación se refleja en todas las direcciones (reflectancia difusa). En esta técnica el haz colimado, procedente del interferómetro, se direcciona hacia la muestra pulverizada y la radiación que ha sufrido reflexión difusa en la muestra se reúne con un espejo elipsoidal y se enfoca sobre el detector [4].

ATR, Attenuated Total Reflectance. La espectroscopia de reflexión interna es una técnica que permite la obtención de espectros de infrarrojo de muestras que presentan alguna dificultad como sólidos de limitada solubilidad, películas, fibras, pastas, adhesivos y polvos. Cuando un haz de radiación pasa de un medio más denso a uno menos denso, se produce una reflexión. La fracción del haz incidente que se refleja es mayor a medida que aumenta el ángulo de incidencia. Más allá de cierto ángulo crítico la reflexión es completa. Teórica y experimentalmente se ha demostrado que durante el proceso de reflexión el haz se comporta como si penetrase una cierta distancia en el medio menos denso antes de reflejarse. La profundidad de penetración, que puede variar desde una fracción de longitud de onda a varias longitudes de onda, depende de la longitud de onda de la radiación incidente, del índice de refracción de

los dos materiales y del ángulo que forma el haz con la interfase. La radiación que penetra se denomina onda evanescente. Si el medio menos denso absorbe radiación evanescente se produce una atenuación del haz en las longitudes de onda de las bandas de absorción. Este fenómeno se conoce como reflectancia total atenuada [4].

En esta técnica la muestra se coloca como una fina película sobre un cristal transparente de alto índice de refracción. Ajustando adecuadamente el ángulo de incidencia la radiación experimenta múltiples reflexiones internas antes de pasar del cristal al detector. En cada una de estas reflexiones tiene lugar la absorción y atenuación [1 y 4].

Respecto a los espectros obtenidos por las diferentes técnicas descriptas anteriormente, en general se observan los mismos picos pero las intensidades relativas son diferentes [4].

1.1. ESPECTRO INFRARROJO DE PROTEINAS. DETERMINACION DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DE PROTEINAS

La espectroscopia de IR es una herramienta valiosa para la investigación de la estructura de proteínas, del mecanismo molecular de reacciones de proteínas y del plegamiento, despliegue y mal plegamiento de las mismas. Esta técnica espectroscópica posee un amplio rango de aplicación en estudio de proteínas que va desde pequeñas proteínas solubles a grandes proteínas de membrana. Deben destacarse como ventajas un corto tiempo de medición, alta resolución temporal, por debajo de 1 μ s, y a su vez requiere de poca muestra (10-100 μ g) [1].

A continuación se describen los principales elementos que componen el espectro infrarrojo de una proteína.

- amida A y amida B (3300 y 3070 cm^{-1}): la vibración de estiramiento del enlace N-H da lugar a la banda *amida A* localizada entre 3310 y 3270 cm^{-1} . Esta banda se debe exclusivamente a la vibración del enlace N-H y es insensible a la conformación de la cadena principal del polipéptido. Su frecuencia depende de

la fuerza del enlace hidrógeno. La banda amida A es generalmente parte de un doblete de resonancia de Fermi con el segundo componente de absorción débil entre 3100 y 3030 cm^{-1} (*amida B*) [1].

- *amida I* (1650 cm^{-1}): esta banda centrada en 1650 cm^{-1} es debida a vibración de estiramiento del enlace carbonilo (C=O) del backbone de las proteínas y por lo tanto es sensible a la estructura secundaria. Esta banda posee contribuciones menores debidas a vibraciones de estiramiento del enlace C-N fuera de fase, la deformación C-C-N y la flexión en el plano del enlace N-H. Esta última contribución es la responsable de la sensibilidad de la banda *amida I* a la deuteración. La banda *amida I* no es afectada por la naturaleza de las cadenas laterales de aminoácidos sin embargo, como se mencionó anteriormente, es fuertemente dependiente de la estructura secundaria de la proteína [1].

El mecanismo fundamental que hace que la amida I sea sensible a la estructura secundaria es la transición dipolar de acoplamiento (TDC) que es una interacción de resonancia entre los dipolos oscilantes de los grupos amida vecinos y el acoplamiento depende de su orientación relativa y su distancia.

- *amida II* (1550 cm^{-1}): el modo amida II es la combinación fuera de fase de la flexión en el plano del enlace $\delta(\text{N-H})$ y la vibración de tensión $\nu(\text{C-N})$, con pequeñas contribuciones de la flexión en el plano de $\delta(\text{CO})$ y vibraciones de tensión de $\nu(\text{C-C})$ y $\nu(\text{N-C})$. Al igual que la banda *amida I*, la *amida II* apenas se ve afectada por la vibración de cadenas laterales, pero la correlación entre la estructura secundaria de la proteína y su frecuencia es menos evidente que para el caso de la amida I. La N-deuteración convierte el modo *amida II* en un modo denominado *amida II'* debido a la vibración de tensión del enlace $\nu(\text{N-C})$, localizada en 1490-1460 cm^{-1} . La vibración de flexión $\delta(\text{N}^2\text{H})$ tiene una frecuencia considerablemente menor que la vibración de flexión $\delta(\text{N}^1\text{H})$ y por lo tanto ya no se acopla con la vibración de tensión $\nu(\text{C-N})$. En su lugar, se mezcla con otros modos en la región 1070-900 cm^{-1} . Debido a que la flexión

$\delta(\text{N-H})$ contribuye a la *amida II*, pero no a la *amida II'*, ambos modos se verán afectados de manera diferente por la conformación de la proteína y el medio ambiente del grupo amida [1].

- *amida III (1400-1200 cm⁻¹)*: el modo *amida III* es combinación en fase de la flexión $\delta(\text{N-H})$ y la vibración de estiramiento $\nu(\text{N-C})$, con pequeñas contribuciones de la flexión de $\delta(\text{CO})$ en el plano y de la vibración de estiramiento $\nu(\text{C-C})$. Además depende de la estructura de la cadena lateral y desde la flexión $\delta(\text{NH})$ contribuye a diversos modos en la región 1400 - 1200 cm⁻¹ [1].

En la tabla 1 se resumen las posiciones de las principales bandas que componen un espectro infrarrojo de proteínas, indicando las vibraciones responsables de dicha absorción y el tipo de información que posee dicha banda. La figura 2 muestra el espectro infrarrojo obtenido de la lipasa B de *Candida antarctica* (Sigma Aldrich Argentina) destacándose claramente las bandas amida A, amida I y amida II.

Tabla 1. Principales componentes del espectro IR de proteínas

Amida	Nro de onda (cm-1)	composición	información
I	1600-1700	$\nu(\text{C=O})$ 79-85% $\nu(\text{C-N})$ 10-20%	Conformación proteica Enlaces puente H
II	1510-1580	$\delta(\text{N-H})$ 40-60% $\nu(\text{C-N})$ 18-40% $\nu(\text{C-C})$ 10%	Conformación proteica
III	1200-1450	Difícil de localizar	Poco uso
A	3225-3280	$\nu(\text{N-H})$ 95%	Enlaces puente H

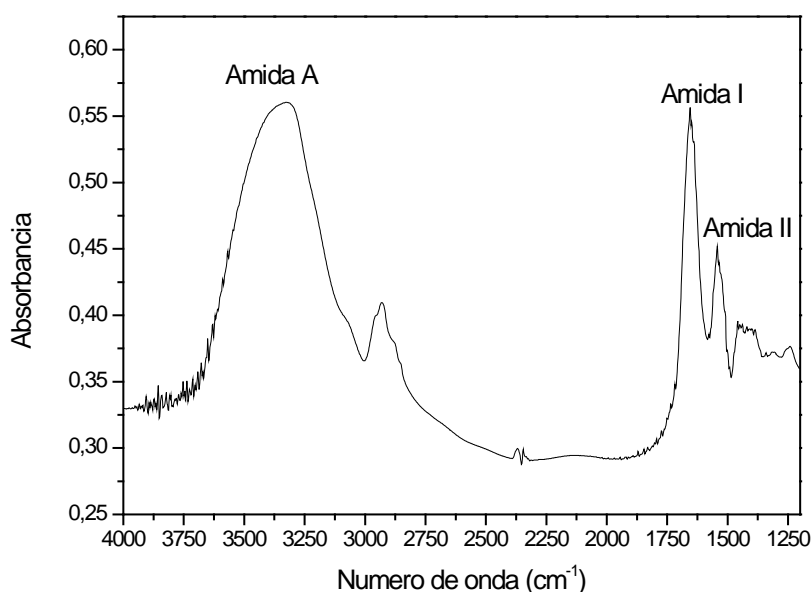


Figura 2. Espectro FTIR de la lipasa B de *Candida antarctica*.

1.1.1. Relación amida I - estructura secundaria de proteínas

Probablemente la aplicación más común de la espectroscopia de infrarrojo en los estudios de proteínas es el análisis de la estructura secundaria. Este estudio se realiza casi exclusivamente utilizando la banda *amida I*, pero las bandas *amida II* y *amida III* así como la región del infrarrojo cercano también han demostrado ser útiles.

Estudios computacionales y experimentales han indicado reglas generales que describen cómo la absorción *amida I* depende de la estructura conformacional de las proteínas [1]. La estructura del tipo α -hélice da lugar a una absorción principal cerca de 1655 cm^{-1} y un hombro a un menor número de onda. La posición de la banda principal se desplaza hacia menores números de onda al aumentar la longitud de la hélice, cuando la hélice es doblada y cuando la hélice es expuesta a solvente (máximo de absorción a $1640\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ en H_2O y en $1629\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ en $^2\text{H}_2\text{O}$). Las α -hélices con menos de 6 residuos no siempre dan lugar a la típica absorción mencionada, pero pueden producir varias bandas a lo largo de la región *amida I* [1].

Las hojas β antiparalelas presentan una banda intensa en 1630 cm^{-1} y una banda más débil cerca de 1685 cm^{-1} . La posición de estas bandas apenas se ve afectada por el número de grupos amida en las cadenas que forman la hoja, sino que depende del número de cadenas. Al aumentar el número de cadenas la posición espectral de la banda principal cambia a una posición inferior, esto también ocurre para el caso de hojas β paralelas. La torsión de una hoja β antiparalela hace que su banda principal se desplace a mayores números de onda y reduce la separación entre las bandas asociadas a hojas β . El efecto de torsión es menor para hojas β paralelas; éstas tienen su absorción principal a mayor número de onda que el correspondiente a hojas β antiparalelas, aunque la diferencia puede ser de solo 4 cm^{-1} y la banda debida a hojas β paralelas puede ser tan baja como 1622 cm^{-1} (en H_2O) para un barril de β proteínas y tan bajo como 1619 cm^{-1} (en $^2\text{H}_2\text{O}$) para péptidos. Las hojas β paralelas exhiben una menor diferencia entre su banda de absorción principal y la banda lateral, y su banda lateral a menudo, aunque no siempre, está ausente [1].

A continuación, en la tabla 2, se muestran los números de onda y las asignaciones de elementos de estructura secundaria correspondientes. La tabla se basa en datos experimentales y asignaciones de varios autores colectados y evaluados por Goormaghtigh et al. [1, 5]. Tales asignaciones fueron empleadas para el cálculo de estructuras secundarias en esta tesis como se describe en la siguiente sección.

Tabla 2. Asignaciones de elementos de estructura secundaria a componentes de la banda amida I.[1]

Estructura secundaria	Posición en $^1\text{H}_2\text{O}$ (cm^{-1})		Posición en $^2\text{H}_2\text{O}$ (cm^{-1})	
	Promedio	Extremos	Promedio	Extremos
α -hélice	1654	1648-1657	1652	1642-1660
Lámina β	1633	1623-1641	1630	1615-1638
	1684	1674-1695	1679	1672-1694
giros	1672	1662-1686	1671	1653-1691
desordenado	1654	1642-1657	1645	1639-1654

La sensibilidad de banda amida I respecto a la estructura secundaria permite estudiar por espectroscopia de infrarrojo el plegamiento, desplegado y agregación de proteínas. En este sentido, en el caso de proteínas desplegadas se observa una banda *amida I* ancha, sin rasgos distintivos y centrada en 1650 cm^{-1} , característico de una estructura desordenada. Por el contrario, los agregados de proteínas presentan una banda cerca o por debajo de 1620 cm^{-1} característica de hojas β intermoleculares.

1.1.2. Interferencia del H₂O. Intercambio isotópico

La hidratación de proteínas involucra la protonación de grupos carboxilato, formación de uniones de hidrógeno entre el agua y grupos C=O/N-H del esqueleto de las proteínas, pudiendo algunos de estos enlaces sustituir puentes de hidrógeno N-H---O=C pre-existentes, e inserción de moléculas de agua sin afectar uniones de hidrogeno de las proteínas. Un considerable número de moléculas de agua permanecen asociadas en proteínas secas [1]. Las señales de infrarrojo características de las moléculas de agua aparecen a 1640 cm^{-1} debido a vibraciones de flexión de especies $\delta(\text{O-H})$ y a 3300 cm^{-1} , señal asociada a vibración de estiramiento de especies $\nu(\text{O-H})$ [6]. Por lo tanto el agua interfiere tanto en la banda amida A como en la banda amida I del espectro FTIR de proteínas. Como se mencionó previamente la banda amida I es empleada para el estudio de estructura secundaria y por lo tanto es importante eliminar la interferencia del agua en esta zona del espectro, para ello en este trabajo de Tesis se recurrió al intercambio isotópico de las muestras (biocatalizador sometido a distintos tratamientos) previo a la obtención de espectro infrarrojo

El reemplazo de átomos de hidrógeno en especies O-H por átomos de deuterio modifica la frecuencia de la vibración de flexión según la ecuación, $\nu = \frac{1}{2} \pi (k/\mu)^{1/2}$, donde ν es sinónimo de frecuencia, k representa la constante de fuerza y μ la masa reducida involucrada en la vibración. Así, la relación de frecuencias para las vibraciones de flexión de especies $\delta(\text{O-H})$ y $\delta(\text{O-D})$ resulta,

$$\frac{\bar{\nu}(OH)}{\bar{\nu}(OD)} = \sqrt{\frac{\mu_{OD}}{\mu_{OH}}}$$

donde $\bar{\nu}$ corresponde al número de onda y μ representa las masas reducidas de las especies correspondientes. Esta relación de números de onda teórica es de 1,374 por lo tanto experimentalmente se espera un cambio para la vibración de flexión desde 1640 cm^{-1} para la especie O-H a 1194 cm^{-1} en las especies O-D [6].

2. FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y MICROSONDA DE ELECTRONES

El microscopio electrónico de barrido o SEM, es aquel que utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen. Así, respecto a un microscopio óptico la luz se sustituye por un haz de electrones, las lentes por electroimanes y las muestras se hacen conductoras metalizando su superficie. En base a las características mencionadas, el SEM consiste en uno de los instrumentos más versátiles para el examen y análisis de características microestructurales de objetos sólidos. Una de las razones para ello es su alta resolución (de 20 a 50 Å) y otra característica importante es la apariencia tridimensional de la imagen de la muestra, resultado de su gran profundidad de foco (aproximadamente 100 veces mayor que la de un microscopio óptico a la misma magnificación) [7].

En el microscopio electrónico de barrido es necesario acelerar los electrones en un campo eléctrico, para aprovechar de esta manera su comportamiento ondulatorio, lo cual se lleva a cabo en la columna del microscopio, donde se aceleran por una diferencia de potencial de 1.000 a 30.000 voltios. Un par de bobinas electromagnéticas concentran el haz hasta una sección mínima de aproximadamente 5 nm. Un segundo par de bobinas, llamadas lentes objetivo, producen además un barrido con el haz de electrones en la muestra en sincronismo con la impresión en las pantallas de los tubos de rayos catódicos de ambos, el de visión normal y el de obtención de fotografías. Esto implica que a cada punto de la pantalla le corresponde un punto de la imagen [7].

Cuando un haz de electrones choca con la superficie de una muestra se producen distintos y complejos fenómenos, siendo los más importantes las dispersiones elásticas (cambios de dirección de los electrones incidentes con pérdida despreciable de energía) y las dispersiones inelásticas (cambios en la energía de los electrones incidentes con cambios despreciables en su dirección).

En el caso de las dispersiones elásticas, la interacción puede ser con el alto campo coulombiano cerca del núcleo de los átomos de la muestra, o bien con los electrones más externos de dichos átomos. En el primer caso y debido a los niveles de energía nuclear ampliamente espaciados ($\approx 1\text{MeV}$) frente a la energía puesta en juego en microanálisis por sonda de electrones (de algunos KeV), hay poca posibilidad de intercambio de energía entre el electrón incidente y el núcleo de la misma. Esta dispersión de Rutherford, sin pérdida de energía, produce en cambio una gran deflexión en la dirección del electrón incidente. Si bien el ángulo de deflexión más probable es de 5° el rango del mismo estará entre 0° y 180° . De esta manera uno o más electrones dispersados elásticamente pueden ser dispersados hacia atrás y hasta salir de la superficie de la muestra (electrones retrodispersados o de "backscatter"), y la fracción de estos aumenta con el número atómico de la muestra [7].

En el caso de que las interacciones elásticas se deban a una interacción del electrón incidente con electrones más periféricos de los átomos de la muestra, muchos de estos electrones de valencia son eyectados fuera de la muestra como electrones secundarios de baja energía ($<50\text{ eV}$).

Aproximadamente el 98 % de las interacciones son de tipo elástico y el 2 % restante son inelásticas.

Las interacciones inelásticas pueden ser de dos tipos [7]:

- a) Interacción del electrón incidente con los electrones de capas más externas del átomo, que dan lugar al espectro de rayos X de líneas características de los elementos presentes en la muestra. Algunas veces ocurre que la vacancia producida en una capa interna, es llenada por un electrón a través de una transición no radiativa, es decir la energía disponible de tal transición es

utilizada por el átomo para eyectar otro electrón. Este efecto, que compite con la emisión de rayos X característicos, se denomina efecto Auger.

- b) El otro caso corresponde a la interacción inelástica con los núcleos, y en el mismo la partícula incidente invariablemente experimenta un cambio en su dirección inicial, y en algunos casos se emite un cuanto de radiación y una cantidad equivalente de energía incidente es perdida por la partícula interactuante. A los potenciales involucrados solamente un 0,5-1% de los electrones incidentes pierden energía bajo este proceso, que da lugar al espectro continuo o Bremsstrahlung.

Una partícula que penetra en un material absorbente tiene distinta posibilidad de sufrir cualquiera de los procesos anteriores en cada interacción y puede tener gran cantidad de interacciones antes de frenarse totalmente. La teoría de las colisiones individuales es de suma importancia para entender el comportamiento de partículas en la materia. Sin embargo, cuando se realiza el experimento lo que se mide es el promedio estadístico de los efectos de todas las colisiones [7].

En base a lo expuesto acerca de las distintas interacciones posibles entre el haz de electrones y la muestra, un microscopio electrónico de barrido puede estar equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar: un detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución (SEI, Secondary Electron Image), un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie (BEI, Backscattered Electron Image), y un detector de energía dispersiva (EDS, Energy Dispersive Spectrometer) permite coleccionar los rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis e imágenes de distribución de elementos en superficies pulidas.

3- FUNDAMENTO DE LA ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas generalmente se lleva a cabo en geles de poliacrilamida (PAGE) o agarosa con un tamaño de poro característico. De manera que la separación de las moléculas se basa en la filtración por el gel (tamaño y forma) así como en la

movilidad electroforética (carga eléctrica). Sin embargo, la electroforesis se diferencia de la filtración en geles en que la movilidad electroforética de moléculas más pequeñas es mayor que la movilidad de las más grandes cuando la densidad de carga es la misma. El pH del gel es lo suficientemente alto (generalmente alrededor de 9) como para que todas las proteínas posean carga negativa y se muevan hacia el ánodo. Las moléculas de tamaño y carga similares se mueven en forma de banda a través del gel. Luego de la electroforesis las bandas separadas pueden visualizarse a través técnicas adecuadas, por ejemplo, si se sumerge el gel en una solución de colorante que se une fuertemente a las proteínas (ejemplo: azul brillante Coomassie) entre otras [8]. Se denomina SDS-PAGE a la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) realizada en presencia del detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) como desnaturalizante de las mismas. Las moléculas anfifílicas como el SDS interfieren en las interacciones hidrofóbicas que estabilizan a las proteínas. Estas toman una forma de cilindro en presencia de SDS. Además, la mayoría de las proteínas se une al SDS en una relación de 1,4 gr de SDS por gramo de proteína (aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos). La carga negativa alta que imparte este detergente enmascara la carga intrínseca de la proteína. El resultado neto es que las proteínas tratadas con SDS tienen formas y relaciones carga-masa similares, por lo tanto, la técnica SDS-PAGE separa a las proteínas exclusivamente por efecto de la filtración del gel, es decir de acuerdo a su masa molecular [8].

En SDS-PAGE las movilidades relativas de las proteínas varían de forma aproximadamente lineal con el logaritmo de sus masas moleculares. En consecuencia, la masa molecular de una proteína puede determinarse con un 5-10 % de exactitud al someterla a una electroforesis junto con varias proteínas marcadoras de masas moleculares conocidas que rodeen la de la proteína de interés [8].

La preparación de la muestra es de máxima importancia para asegurar que todo lo comentado anteriormente se cumple. Al buffer en el que va disuelta la muestra se añade un exceso de SDS (2% p/v); para facilitar la unión del SDS a las proteínas, la muestra se calienta a 100°C durante al menos 3-5 minutos y, opcionalmente, se añade β -mercaptoetanol (5% v/v) o ditioneitol (DTT, 20 mM) si se requieren condiciones

reductoras. El SDS debe incluirse en el tampón de los reservorios, en los de los geles y en el de la muestra para mantener las condiciones desnaturalizantes. La electroforesis SDS-PAGE puede realizarse en condiciones reductoras o no reductoras; la ausencia de reductores se traduce en que si las proteínas poseen puentes disulfuro, el SDS sólo producirá una desorganización parcial de la estructura. Si son dos o más las cadenas unidas por puentes disulfuro intercatenarios, en presencia de SDS, quedarán más o menos desplegados en función de la posición de los puentes disulfuros. [9]. En este trabajo de investigación se emplearon condiciones desnaturalizantes y reductoras en los estudios electroforéticos realizados.

Una vez finalizada la PAGE, se separa el gel de las placas de vidrio haciendo palanca con una espátula y se visualiza con un colorante; el más utilizado es el azul de Coomassie con el que se pueden visualizar 0.1-0.5 µg de proteína por banda. [9]

4-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. ANEXO 4

- [1] Barth A., *Biochimica et Biophysica Acta- Bioenergetics* 2007, 1767, 1073-1101.
- [2] Ryzkowski J., *Catal. Today* 2001, 68, 263-381.
- [3] Conley R.T., *Espectroscopia infrarroja*, 1979, 2° ed., Editorial Alhambra S.A., Madrid, España.
- [4] Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R., *Principios de Análisis instrumental*, 6° edición, 2008, ISBN-13: 978-970-686-829-9, ISBN-10:970-686-829-1, Cengage learning editores, México.
- [5] Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruysschaert J.M., *Subcell. Biochem.* 1994, 23, 405–450.
- [6] Llerena-Suster C.R., José C., Collins S.E., Briand L.E., Morcelle S.R., *Process Biochem.* 2012, 47, 47-56.
- [7] Bonetto R. D., Tesis doctoral “Determinación de parámetros físicos de señales provenientes del microscopio electrónico de barrido”, 2000, Universidad de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Física, La Plata, Argentina.

[8] Voet D.-Voet J.G., Biochemistry, 4° edición, 2011, ISBN 978-0-470-57095-1, Wiley, EEUU.

[9]<http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-Electroforesis-protocolos.pdf>