



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**RESOLUCIÓN CINÉTICA
ENZIMÁTICA ECO-COMPATIBLE
DE R/S-KETOPROFENO**

Trabajo de Tesis Doctoral

Tesista: Lic. María Victoria Toledo

Directora: Dra. Laura E. Briand

Año 2015



El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas “Dr. Jorge J. Ronco” CINDECA, dependiente del CONICET y de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Parte del trabajo experimental se desarrolló en el Instituto Nacional de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química INTEC de la Universidad Nacional del Litoral en la ciudad de Santa Fé, Argentina. Fue dirigido en su totalidad por la Dra. Laura E.

Briand

A Fede y mi familia

A la memoria de mi abuelo Lucho

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de Tesis doctoral no se hubiera podido llevar a cabo sin la guía, colaboración y apoyo constante de muchas personas e instituciones.

En primer lugar quiero agradecer a mi directora, la Dra. Laura E. Briand, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo e iniciarme en la investigación. Gracias por la confianza, compromiso, enseñanzas y tiempo dedicado a mi formación durante estos años.

A mis compañeras de grupo, Silvana y Carla, por su compañerismo, amistad y todos los momentos lindos compartidos. Gracias por ayudarme, escucharme y aconsejarme en todo momento.

A todo el personal del CINDECA: directivos, investigadores, personal de apoyo, becarios, secretarías, personal de limpieza, quienes de una u otra manera, me ayudaron y acompañaron durante todo este tiempo.

A Graciela Valle, por su compañerismo y calidez, gracias por su colaboración constante con las medidas IR.

A Pablo, siempre dispuesto a ayudarme a trasladar los pesados tubos de gases.

A Mariela y Rita, muchas gracias por las medidas de microscopía electrónica

A Martín y al Negrito Julio, por estar siempre dispuestos a arreglar el shaker, la computadora, el equipo de HPLC.

Al Dr. Luis Gambaro, por las medidas de TPSR-TPD realizadas.

A Juan Manuel Padró, por su colaboración con las medidas en HPLC.

Al Dr. Sebastián Collins, del Instituto Nacional de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC)- UNL-CONICET de la ciudad de Santa Fe (Argentina), quien me recibió en su laboratorio y me ayudó y enseñó distintas técnicas de espectroscopia infrarroja.

A la Dra. María Lujan Ferreira, de la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI)-UNS-CONICET de la ciudad de Bahía Blanca (Buenos Aires) por los análisis de modelado molecular.

Al Dr. Carlos Llerena-Suster y la Dra. Susana Morcelle, por sus aportes para este trabajo de Tesis y su compañerismo y buena predisposición.

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

Agradezco a la Universidad Nacional de La Plata por los proyectos y subsidios otorgados para la realización de esta tesis.

Quiero agradecer a mis compañeros de varias cátedras por las que pasé en estos años, Introducción a la Química y Química General, Química de Correlación para Ingeniería y para Ciencias Naturales, por compartir buenos momentos y contribuir en mi formación.

No puedo dejar de expresar mi agradecimiento a la familia. Gracias por el apoyo incondicional y confianza, sobre todo cuando decidí venir a hacer el doctorado a La Plata. Gracias por inculcarme valores y alentarme en todas las etapas de mi vida. Gracias por el esfuerzo y sacrificio que hicieron posible que hoy llegara hasta acá.

A Fede, mi compañero de vida, por su apoyo constante. Por contenerme y darme ánimos cuando algo no andaba bien, surgían los nervios o simplemente no era un buen día. Gracias por acompañarme incondicionalmente, por escucharme siempre aunque poco entendieras de qué te estaba hablando.

¡¡¡Muchas Gracias a Todos!!!

Victoria Toledo

INDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	6
1.1. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES)	7
1.1.1. Definición.....	7
1.1.2. Mecanismo de acción: inhibición de la enzima ciclooxigenasa	8
1.1.3. Clasificación	11
1.1.4. Efectos adversos	14
1.2. DERIVADOS DEL ÁCIDO PROPIÓNICO.....	16
1.3. R/S-KETOPROFENO	19
1.3.1. Características	19
1.3.2. Métodos de obtención de S(+)-ketoprofeno	21
1.4. ENZIMAS EN BIOCATÁLISIS	26
1.4.1. Definición y características	26
1.4.2. Estructura	27
1.4.3. Biocatálisis enzimática: medios de reacción	32
1.4.4. Enzimas lipasas	35
1.4.4.1 Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	42
1.4.5. Inmovilización de enzimas.....	48
1.4.5.1. Novozym® 435: Composición y estructura.....	51
1.4.5.1.2. Aplicaciones.....	54
1.4.6. Mecanismo de la resolución de ácidos 2-arilpropiónicos empleando enzimas.....	55
1.4.7. Antecedentes en la resolución cinética de R/S-ketoprofeno.....	58
1.5. OBJETIVO DE LA TESIS.....	70

1.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
--------------------------------------	----

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA UTILIZADA PARA LA INVESTIGACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LOS ALCOHOLES DE CADENA CORTA CON EL BIOCATALIZADOR COMERCIAL NOVOZYM® 43583

2.1. PROCEDIMIENTO PARA EL TRATAMIENTO CON LOS ALCOHOLES.....	84
2.2. METODOLOGÍA GENERAL.....	85
2.3. DESORCIÓN A TEMPERATURA PROGRAMADA.....	86
2.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA: ENSAYO DE ÁCIDO BICINCONÍNICO.....	89
2.4.1. Fundamento.....	89
2.4.2. Enzima adsorbida en Novozym® 435.....	90
2.4.3. Proteína desorbida por acción de los alcoholes.....	91
2.5 ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.....	92
2.5.1. Fundamento.....	92
2.5.2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier: FTIR.....	96
2.5.3. Reflectancia Total Atenuada (ATR) y Espectroscopia por Transformada de Fourier por Reflectancia Difusa (DRIFTS).....	98
2.5.4. Metodología de análisis.....	101
2.5.5. Determinación de estructura secundaria de proteínas.....	101
2.5.5.1. Fundamento.....	101
2.5.5.2. Información provista por la banda amida I respecto de la estructura secundaria de proteínas.....	105
2.5.5.3. Eliminación de interferencia del H ₂ O: Intercambio isotópico.....	106
2.5.5.4. Metodología de análisis.....	108
2.6. ANÁLISIS DE TEXTURA.....	109
2.6.1. Fundamentos de Microscopía Electrónica de Barrido.....	109
2.6.2. Metodología de análisis.....	112
2.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

CAPÍTULO 3. EFECTO DE LOS ALCOHOLES DE CADENA CORTA EN EL BIOCATALIZADOR COMERCIAL NOVOZYM® 435117

3.1. ESTABILIDAD DE NOVOZYM® 435 LUEGO DEL CONTACTO CON LAS MEZCLAS ALCOHOL- AGUA.....	118
3.1.1. Efecto de la exposición prolongada del biocatalizador a los alcoholes	118
3.1.2. Interacción superficial de los alcoholes con Novozym® 435.....	125
3.1.3. Cuantificación de pérdida de masa y proteína.....	127
3.1.4. Evolución de la estructura secundaria de la lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	131
3.1.4.1. Estructura secundaria de CALB pura	131
3.1.4.2. Estructura secundaria de CALB inmovilizada	136
3.1.4.3. Estructura secundaria luego del tratamiento y reacción	138
3.1.5. Estudio de textura interna.....	147
3.2. CONCLUSIONES.....	151
3.3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	156

CAPÍTULO 4. RESOLUCIÓN CINÉTICA ENZIMÁTICA DE R/S-KETOPROFENO.. 160

4.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	162
4.1.1. Sistema de reacción.....	162
4.1.2. Metodología de análisis.....	163
4.1.2.1. Determinación de la conversión del profeno.....	163
4.1.2.2. Determinación del exceso enantiomérico	165
4.1.3. Cálculos de parámetros de enantioselectividad	170
4.1.4. Exploración del efecto de la actividad acuosa a_w	173
4.2. RESULTADOS.....	175
4.2.1. Esterificación de R/S-ketoprofeno con alcoholes de cadena corta	175
4.2.2. Estudios preliminares de control de la actividad acuosa a_w	188
4.3. CONCLUSIONES.....	192

4.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	194
CAPÍTULO 5. ESTUDIO DEL MECANISMO DE REACCIÓN EN LA ESTERIFICACIÓN DE R/S-KETOPROFENO CATALIZADA POR LA LIPASA B DE <i>Candida antarctica</i>	199
5.1. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA (ATR- FTIR).....	201
5.1.1. Concentración óptima de R/S-ketoprofeno	201
5.1.2. Seguimiento del intercambio isotópico de la enzima	203
5.1.3. Identificación de especies intermediarias en la interacción enzima – R/S- ketoprofeno.....	206
5.2. MODELADO MOLECULAR	212
5.3. CONCLUSIONES.....	219
5.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	221
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	223
ANEXO I. CÁLCULOS DE CONVERSIÓN Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA	227
PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA INVESTIGACIÓN	230

LISTADO DE ABREVIATURAS

AAS: ácido acetilsalicílico

ADME: absorción, distribución, metabolismo y excreción

AE: actividad específica

AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

ATR: reflectancia total atenuada (del inglés, Attenuated Total Reflectance)

a_w : actividad acuosa

BCA: ácido bicinconínico (del inglés, bichoninic acid)

BEI: detector de electrones retrodispersados (del inglés, Backscattered Electron Image)

BET: Brunauer–Emmett–Teller

CALA: lipasa A de *Candida antarctica*, (del inglés, *Candida antarctica* lipase A)

CALB: lipasa B de *Candida antarctica*, (del inglés, *Candida antarctica* lipase B)

CD: dicroísmo circular (del inglés, Circular Dichroism)

COX: enzima ciclooxigenasa

COX-1: ciclooxigenasa 1

COX-2: ciclooxigenasa 2

CSP: fase estacionaria quiral, (del inglés, Quiral Stationary Phase)

D: dimensión fractal

DFT: teoría del funcional de la densidad (del inglés, Density Functional Theory)

DMS: dimetilsulfóxido

DKR: resolución cinética dinámica (del inglés, Dynamic Kinetic Resolution)

DVB: divinilbenceno

DRIFT: espectroscopia infrarroja de reflectancia difusa por transformada de Fourier (del inglés, Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform)

E: relación enantiomérica

ϵ : constante dieléctrica

ϵ : coeficiente de extinción

EF: factor enantiomérico

EDS: detector de energía dispersiva (del inglés, Energy Dispersive Spectrometer)

eeS: exceso enantiomérico de sustrato

eeP: exceso enantiomérico de producto

ESEM: microscopia electrónica de barrido ambiental (del inglés, Environmental Scanning Electron Microscopy)

FTIR: espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (del inglés, Fourier Transform Infrared spectroscopy)

HPETE: ácidos de hidroxiperoxieicosatetraenoicos

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia (del inglés, por high pressure (performance) liquid chromatography)

ILs: líquidos iónicos (del inglés, Ionic Liquids)

IR: infrarrojo:

ν_s : vibración de tensión simétrica

ν_{as} : vibración de tensión asimétrica

δ : vibración de flexión en el plano

γ : vibración de flexión fuera del plano

δ : vibración tijera en el plano (scissoring)

ρ : vibración de balanceo en el plano (rocking)

ω : vibración de cabeceo o aleteo fuera del plano (wagging)

τ : vibración de torsión fuera del plano (twisting)

I_0 : intensidad de luz incidente

I_A : intensidad de luz absorbida

I_R : intensidad de luz reflejada

I_T : intensidad de luz transmitida

MM: mecánica molecular (del inglés, Molecular Mechanics)

MNR: resonancia magnética nuclear (del inglés, Magnetic Nuclear Resonance)

PDB: banco de datos de proteínas (del inglés, Protein Data Bank)

PE: peso equivalente

PI: punto isoeléctrico

PM: peso molecular

PMMA: polimetilmetacrilato

PLU: Propil Laurate Units

QM: mecánica cuántica (del inglés, Quantum Mechanics)

SEI: detector de electrones secundarios (del inglés, Secondary Electron Image)

SEM: microscopia electrónica de barrido (del inglés, Scanning Electron Microscopy)

SIRMS: microespectroscopia IR con radiación sincrotrón (del inglés, Synchrotron Infrared Microspectroscopy)

Td1: intermediario tetraédrico 1

Td2: intermediario tetraédrico 2

TDC: transición dipolar de acoplamiento (del inglés, Transition Dipole Coupling)

TPD: desorción térmica programada (del inglés, Temperature Programmed Desorption)

TEAA: trietilamonio acetato

TPSR: reacción superficial a temperatura programada (del inglés, Temperature Programmed Surface Reaction)

X%: conversión

RESUMEN

En este trabajo de Tesis doctoral se presentan los resultados obtenidos en la aplicación de la lipasa B de *Candida antarctica* en la esterificación enantioselectiva de R/S-ketoprofeno. Este fármaco, perteneciente a la familia de los AINEs (AntiInflamatorios No Esterideos), está formado por dos isómeros ópticos. El enantiómero S(+) es farmacológicamente activo, mientras que el isómero R(-) es biológicamente inactivo y puede presentar efectos perjudiciales. La lipasa B de *Candida antarctica* cataliza la esterificación enantioselectiva del enantiómero R(-) inactivo, dejando el isómero deseado S(+) sin reaccionar. En la presente investigación se emplea la enzima inmovilizada en una matriz macroporosa (Novozym® 435), en un sistema eco-compatible y económico. Las reacciones se llevan a cabo sin el agregado de co-solvente orgánico, siendo el alcohol empleado en la esterificación, el reactivo y solvente de las mismas.

El trabajo llevado a cabo en esta Tesis doctoral se presenta en 6 capítulos.

El **Capítulo 1** corresponde al marco teórico y los antecedentes en este tema de investigación. Contiene información acerca de la actividad farmacológica, modo de acción, efectos adversos de los AINEs en general y específicamente del R/S-ketoprofeno, como así también de las diferentes actividades de los isómeros y las estrategias para obtener isómeros puros de S(+)-ketoprofeno. Seguidamente, describe el empleo de enzimas en biocatálisis, detallando las enzimas lipasas empleadas en este trabajo de investigación y la inmovilización de las mismas. Por último, se presentan los antecedentes en la resolución cinética de R/S-ketoprofeno y el objetivo de esta tesis.

Los siguientes capítulos corresponden a las metodologías y resultados obtenidos en este trabajo de investigación.

En base a estudios previos en los cuales se observa una disminución en la actividad del biocatalizador comercial Novozym® 435 luego de varios ciclos de reuso consecutivos, se llevó a cabo un estudio exhaustivo del efecto que distintos medios alcohol-agua ejercen sobre el biocatalizador. En los **Capítulos 2 y 3**, se presentan las

metodologías y los resultados obtenidos, respectivamente, luego del contacto prolongado de Novozym® 435 con los alcoholes metanol, etanol, 1- y 2-propanol. Se emplearon técnicas de FTIR, Desorción Térmica Programada TPD, ensayo de ácido bicinconínico para la cuantificación de proteína, microscopia electrónica de barrido y FTIR acoplado a intercambio isotópico para evaluar la estructura secundaria de la enzima.

El biocatalizador sin tratar y luego del contacto con los medios alcohol-agua se empleó en la reacción de esterificación enantioselectiva de R/S-ketoprofeno como se describe en el **Capítulo 4**. Se emplearon los alcoholes metanol, etanol, 1- y 2-propanol en un medio libre de co-solvente orgánico.

El **Capítulo 5** provee un estudio del mecanismo de reacción de la lipasa B de *Candida antarctica* empleando técnicas de espectroscopia *in situ* ATR-FTIR resuelta en el tiempo y modelado molecular.

Finalmente, en el **Capítulo 6** se exponen las conclusiones finales del trabajo realizado y presentado en esta Tesis, como así también las perspectivas futuras.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OJETIVOS

1.1. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES)

1.1.1. Definición

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son un grupo de agentes con efecto analgésico, antipirético y antiinflamatorio, por lo que reducen los síntomas del dolor, la fiebre y la inflamación, respectivamente. El fármaco prototipo es el ácido acetilsalicílico (AAS) o aspirina, aunque en la actualidad se dispone de numerosos fármacos que, aunque pertenezcan a diferentes familias químicas, se agrupan bajo el término de AINE. La aspirina es la droga con la cual se comparan los distintos agentes, por lo cual también se conoce a este grupo como drogas “tipo aspirina”. Los AINES tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas mediadoras de la producción de fiebre, dolor e inflamación, a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa. Por esto, otra denominación menos frecuente es la de “drogas anticiclooxigenasa” (Malgor & Valsecia, 2000).

Los AINES son los agentes más vendidos en el mundo. Son muy usados para el tratamiento de la artritis y otras afecciones reumáticas. Por sus acciones farmacológicas características, con frecuencia se autoprescriben sin control médico para aliviar dolores moderados o para bajar la fiebre. Como comparten una capacidad elevada de provocar reacciones adversas de diversa intensidad y gravedad, de las cuales los consumidores generalmente no son conscientes, su toxicidad aguda y crónica reviste interés epidemiológico y constituye un motivo de preocupación.

Esta familia de drogas está compuesta por innumerables agentes, cuya síntesis e incorporación al mercado farmacológico se realiza permanentemente. Aunque la mayoría de los componentes de este grupo comparten las tres acciones que lo definen (analgésica, antipirética y antiinflamatoria), su eficacia relativa para cada una de ellas puede ser diferente, es decir, un fármaco concreto puede mostrar mayor actividad antiinflamatoria o analgésica que otro. Asimismo, su toxicidad puede coincidir con la

del grupo o ser más o menos específica, de ahí que su utilización clínica dependa tanto de su eficacia como de su toxicidad relativas (Florez, 2008).

1.1.2. Mecanismo de acción: inhibición de la enzima ciclooxygenasa

Los principales efectos terapéuticos y muchas de las reacciones adversas de los AINEs pueden explicarse mediante su mecanismo de acción. Los antiinflamatorios no esteroideos inhiben la actividad de la enzima ciclooxygenasa (COX). Estas enzimas catalizan la conversión del ácido araquidónico presente en las membranas celulares a endoperóxidos cíclicos inestables, los cuales se transforman en prostaglandinas y tromboxanos. Las prostaglandinas participan en los mecanismos patógenos de la inflamación, la fiebre y el dolor, por lo que la inhibición de sus síntesis por parte de los AINEs sería responsable de su actividad terapéutica. Sin embargo, dada la participación de estos en determinados procesos fisiológicos, dicha inhibición sería también responsable de diversas reacciones adversas características de estos fármacos (Florez, 2008).

A continuación se presenta una figura del metabolismo del ácido araquidónico.

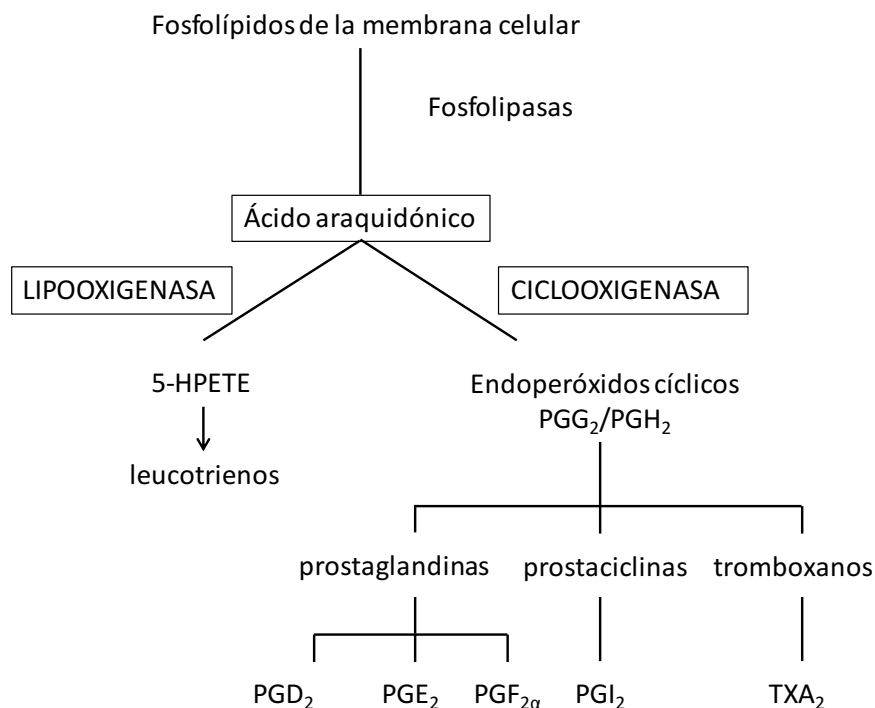


Figura 1. Metabolismo del ácido araquidónico.

Como se mencionó anteriormente, el ácido araquidónico no existe en forma libre en el interior de las células, sino que normalmente está esterificado en los fosfolípidos de membrana. Se libera por la activación de fosfolipasas celulares o el incremento de las concentraciones citosólicas de calcio que activan estas enzimas.

El ácido araquidónico es rápidamente metabolizado a productos oxigenados por diversos sistemas enzimáticos diferentes. La formación de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos mediante la ciclación e incorporación de oxígeno molecular está catalizada por la enzima ciclooxigenasa, mientras que los derivados hidroxilados de ácidos grasos de cadenas rectas (leucotrienos) son producto de la acción de diversas lipooxigenasas (Pérez Ruiz *et al*, 1998).

Los metabolitos del ácido araquidónico, tanto de la vía de la ciclooxigenasa como de la lipooxigenasa, tienen una definida e importante participación en las diversas etapas del proceso inflamatorio.

Los metabolitos provenientes del ácido araquidónico catalizados por lipooxigenasas reciben el nombre de ácidos de hidroxiperoxieicosatetraenoicos (HPETE). Específicamente, la 5-lipooxigenasa cataliza la síntesis de los leucotrienos a partir de 5-HPETE (ácido 5-hidroxiperoxieicosatetraenoico). Estos son mediadores de la inflamación, producen aumento de la permeabilidad vascular e inducen broncoespasmo. Su síntesis tiene lugar en las células inflamatorias como los leucocitos polimorfonucleares, los macrófagos y los mastocitos (Lewis & Austen, 1984; Funk, 2001).

Las enzimas ciclooxigenasas actúan sobre el ácido araquidónico con dos actividades enzimáticas diferentes: ciclooxigenasa y peroxidasa. En primer lugar producen una oxidación y ciclación produciendo un endoperóxido cíclico PGG₂ y luego mediante su actividad peroxidasa transforma PGG₂ en PGH₂.

Los endoperóxidos PGG₂ y PGH₂ son químicamente inestables, pero por acción enzimática se transforman en diversos productos que incluyen prostaglandinas (PGE₂, PGD₂ y PGF_{2α}) o prostaciclina (PGI₂) y tromboxano (TXA₂)(Pérez Ruiz *et al*, 1998).

Las prostaglandinas se producen en la mayoría de las células del organismo humano, actuando como mediadores autócrinos y parácrinos (Simmons *et al*, 2004).

Las funciones principales de las prostaglandinas en general son:

- Inflamación, dolor y fiebre: producen vasodilatación, aumentan la permeabilidad de los tejidos y potencian la acción de sustancias proinflamatorias.
- A nivel inmunológico actúan como inmunosupresoras por inhibición de los linfocitos T y macrófagos; sin embargo estimulan las células inmaduras del sistema inmune.
- En el tracto gastrointestinal reducen la secreción de jugo gástrico. Estimulan la secreción de moco y bicarbonato y de esta manera ejercen una protección sobre la mucosa gástrica.
- En el sistema cardiovascular en su mayoría inducen la vasodilatación, aumento de la permeabilidad y a veces vasoconstricción. Además, debe existir un equilibrio entre PGI_2 y TXA_2 para el control de la agregación plaquetaria e inhibición de la trombosis.
- A nivel renal ejercen un efecto vasodilatador en el riñón, aumento de la velocidad de filtración glomerular, del flujo sanguíneo renal y liberación de renina. Las prostaglandinas son también natiuréticas.
- En la reproducción intervienen en el proceso de maduración folicular y la ovulación, luteólisis y parto.

Como se puede apreciar, las prostaglandinas y tromboxanos son sustancias que intervienen en los procesos de la inflamación pero además están implicados en numerosas funciones fisiológicas, cuya alteración puede tener como consecuencia alteraciones sobre el sistema gastrointestinal, renal y la coagulación, entre otras.

Existen dos isoformas de la ciclooxigenasa, involucrada en la síntesis de prostaglandinas, comúnmente denominadas COX-1 y COX-2. Estas son similares en tamaño, especificidad de sustrato y cinética, pero tienen localizaciones y funciones diferentes, lo cual ha incentivado el estudio de AINEs que afecten selectivamente una u otra isoforma. COX-1 tiene características de enzima constitutiva, está presente en la

mayoría de las células del organismo y su actividad tiene que ver con la participación de las prostaglandinas y tromboxanos en el control de funciones fisiológicas. En cambio, la COX-2 normalmente no está presente sino que es una enzima inducida en determinadas células, bajo circunstancias patológicas (por ejemplo, en macrófagos, monocitos, células endoteliales y sinoviales en el curso de un proceso inflamatorio) por citoquinas y mediadores de la inflamación, y por lo tanto altamente responsable de la inflamación y el dolor (Bjorkman, 1998).

La mayoría de los AINEs inhiben de forma no selectiva a ambas isoformas de la COX e incluso en algunos casos inhibe en mayor medida a la COX-1 lo cual trae como consecuencia los efectos adversos sobre los sistemas gastrointestinal, cardiovascular, renal y reproductivo (Florez, 2008).

El sitio activo de estas isoenzimas se encuentra al final de un canal largo y tubular de la molécula. Los AINEs bloquean este sitio activo impidiendo la entrada del ácido araquidónico en este canal, uniéndose de forma competitiva o dependiente del tiempo. Cuando hay inhibición competitiva simple (como es el caso de ibuprofeno y naproxeno), el efecto es rápidamente reversible. En cambio, en la inhibición dependiente del tiempo (como es el caso de ketoprofeno, indometacina y diclofenac), ocurre un cambio de conformación molecular que resulta en una interacción más fuerte, aunque no covalente de los AINEs, complejizando la reversibilidad del proceso. Cuando COX-1 es inhibida por AINEs, se inactiva completamente. En cambio, COX-2 convierte el ácido araquidónico en ácido 15-R-hidroxi-eicosatetranoico (15-R-HETE). Sin embargo, ninguna de estas enzimas es capaz de producir PGH₂, el precursor de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, en presencia de AINEs (Bjorkman, 1998; DeWitt, 1999).

1.1.3. Clasificación

Los AINEs se pueden clasificar según su composición química como se presenta en la Tabla 1, en la cual se incluyen fármacos prototipo y características de cada grupo (Malgor & Valsecia, 2000).

Tabla 1. Clasificación según estructura molecular básica de los AINEs (Malgor & Valsecia, 2000).

Grupo	Derivado	Algunos fármacos	Características
Ácido salicílico	Salicilatos	Ácido acetilsalicílico	Inhibición irreversible de la ciclooxigenasa por medio de la acetilación. Poseen acción analgésica, antipirética y antiinflamatoria
		Ácido salicílico Salicilato de sodio Salicilamida	
Ácido enólico	Pirazolonas	Antipirina y aminopirina Dipirona Fenilbutazona Clofenazona	Inhibición competitiva de la ciclooxigenasa. Acción analgésica y antipirética semejante a los salicilatos y sus acciones antiinflamatorias son mayores.
	Oxicams	Piroxicam Tenoxicam Isoxicam Meloxicam	Efecto antiinflamatorio similar a pirazolona, efecto analgésico menor que aspirina. Meloxicam es un inhibidor selectivo de COX-2 y tendría menores efectos adversos gastrointestinales y
Ácido acético	Indoles	Indometacina Benzidamina Sulindac Acemetacina	Unión e inhibición preferencial a COX-1, pudiendo producir efectos adversos renales y gastrointestinales con mayor frecuencia. Es uno de los más potentes, pero más tóxicos.
		Arilacéticos o fenilacéticos	Diclofenac sódico y potásico Aceclofenac Fenclofenac
	Pirrolacético	Ketorolac Tolmetina	Uno de los más potentes, usado para analgesia posoperatoria o
	Piranoacético	Etodolac	

Continuación Tabla 1,

Grupo	Derivado	Fármacos prototipo	Características
Ácido propiónico		Ibuprofeno Ketoprofeno Naproxeno	Efectos analgésicos similares a los salicilatos, aunque sus efectos antiinflamatorios y antipiréticos son inferiores
Ácido nicotínico		Clonixinato de lisina Isonixina	
Ácido antranílico	Fenamatos o alintránlicos	Ácido mefenámico Flufenamico Paracetamol	Inhibidores reversibles y competitivos de la ciclooxigenasa. Tienen mayor actividad antiinflamatorios que analgésica y Predominantemente antipirético, también posee acciones
No ácido	Paraminofenol		analgésicas, las antiinflamatorias son más débiles que para los salicilatos. Produce menos irritación gástrica trastornos
	Naftilalcanona	Nabumetona	Prodroga con actividades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias
	Sulfonanilida	Nimesulida	Menores efectos adversos gastrointestinales

Los diferentes AINEs tienen actividad inhibitoria relativa diferente para COX-1 y COX-2. Según las funciones de estas isoformas, inhibidores de la COX-2 podrían tener un efecto antiinflamatorio sin interferir en las funciones normales de las prostaglandinas y tromboxanos. Actualmente, no existen AINEs verdaderamente selectivos de COX-2, pero los que son relativamente más selectivos por COX-2 presentarían menores efectos adversos a nivel gastrointestinal y renal (Bjorkman, 1998).

Con el advenimiento de los inhibidores selectivos de la COX-2, actualmente se clasifican según su mecanismo de acción según se muestra en la Tabla 2.

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 un 50% la actividad de la COX-2 (CI_{50}^{COX-2}) y de la COX-1 (CI_{50}^{COX-1}). Es decir cuanto menor es la relación $CI_{50}^{COX-2} / CI_{50}^{COX-1}$, mayor es la selectividad de dicho AINE hacia COX-2 (Florez, 2008).

Tabla 2. Clasificación de los AINEs según su capacidad para inhibir la COX (Kulkarni *et al*, 2000)

Selectivos a COX-1	Preferenciales a COX-1	Igualmente selectivos	Preferenciales a COX-2	Selectivos a COX-2
Flurbiprofeno	Fenoprofeno	Aspirina	Etodolac	Lumiracoxib
Ketoprofeno	Piroxicam	Ibuprofeno	Meloxicam	Rofecoxib
	Sulindac	Indometacina	Nabumetona	Etoricoxib
		Ketorolac	Nimesulida	Valdecoxib
		Naproxeno		Parecoxib
		Oxaprosina		Celecoxib
		Tenoxicam		
		Tolmetin		

1.1.4. Efectos adversos

A continuación se describen los principales efectos adversos que provocan los AINEs:

- **Gastrointestinales:** estas lesiones son los más comunes de los AINEs, fundamentalmente en estómago y duodeno. Dentro de las más leves, las de aparición más frecuente son: pirosis, dispepsia, gastritis, dolor gástrico, diarrea o estreñimiento. Mayor preocupación produce su capacidad para lesionar la mucosa gástrica o duodenal en tratamientos crónicos, causando erosiones y úlceras (las cuales pueden dar origen a hemorragias o perforaciones) (Cryer & Kimmey, 1998).
- **Renales:** en personas que padecen una enfermedad renal de base, se presenta una reducción de la función renal. La disminución de las prostaglandinas provoca la disminución del filtrado glomerular que conduce a un aumento de presión arterial. Además, provocan la retención de agua, sodio y potasio y el consumo prolongado de AINEs puede llevar a una toxicidad renal crónica (Florez, 2008).
- **Cardiovasculares:** se ha demostrado que los AINEs selectivos de la COX-2 aumentan el riesgo de infarto agudo de miocardio (Solomon *et al*, 2002). Estimulan una reducción relativa de la producción endotelial de prostaciclina PGI₂, permaneciendo intacta la producción de tromboxanos TXA₂, lo cual podría estimular una trombosis (Curiel & Katz, 2013).
- **Hepatotoxicidad.**
- **Hematológicos:** si bien la frecuencia de aparición es muy baja, algunos son muy graves. Los AINEs tienen la capacidad de inducir agranulocitosis, anemia aplásica, trombocipenia y anemia hemolítica (Florez, 2008).
- **Sistema nervioso central:** algunos AINEs pueden ocasionar dolores de cabeza, vértigo y mareos.

Debido a estos efectos adversos mencionados, algunos AINEs han sido retirados del mercado en muchos países, o al menos su toxicidad ha sido re-evaluada (Caldwell *et al*, 1988). Si bien estos efectos adversos son de gran importancia, se encuentran con mayor frecuencia en pacientes que ingieren estas drogas recurrentemente debido a dolores crónicos causados por inflamaciones (Buschmann, 2002).

1.2. DERIVADOS DEL ÁCIDO PROPIÓNICO

Este grupo está constituido por derivados del ácido fenilpropiónico. Si bien sus estructuras químicas son relativamente diferentes, sus características farmacológicas son muy similares. Dentro de este grupo, los más populares son: ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, suprofeno, entre otros, cuyas estructuras se encuentran en la Figura 2.

Todos los miembros de este grupo comparten las funciones analgésica, antipirética, antiinflamatoria y antiagregante plaquetaria. Las diferencias son principalmente farmacocinéticas, ya que no difieren significativamente en sus acciones farmacológicas o reacciones adversas.

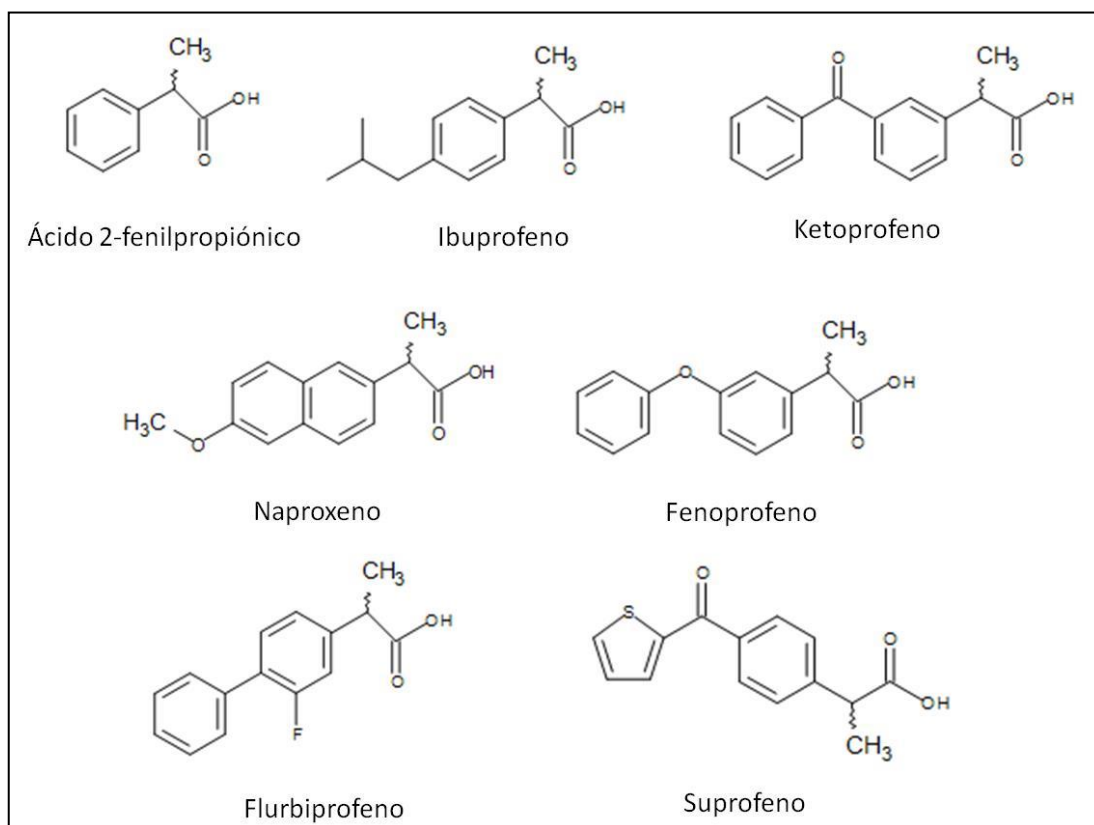


Figura 2. Estructura química de los ácidos 2-arylpropíonicos.

En industrias farmacéuticas, el 56% de las drogas en uso son productos quirales y un 88% de estos últimos son comercializados como mezclas racémicas con cantidades iguales de ambos enantiómeros (Nguyen *et al*, 2006). En su mayoría los derivados de ácido propiónico tienen un carácter quiral, es decir que en general se obtienen como mezclas racémicas de los enantiómeros R(-) y S(+). En general, los enantiómeros tienen propiedades fisicoquímicas muy similares, por lo cual es complejo diferenciarlos. La actividad farmacológica depende principalmente de su interacción con sistemas biológicos como proteínas, ácidos nucleicos o biomembranas, los cuales presentan estructuras tridimensionales complejas que son capaces de reconocer una molécula sólo en una de sus estructuras posibles (Lin, 2011). Además de las diferencias en actividad biológica, los estereoisómeros pueden diferir en sus propiedades farmacocinéticas tales como absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) como resultado de discriminación quiral durante los procesos farmacocinéticos. Estas diferencias causarán variaciones en las concentraciones de los dos enantiómeros en sus sitios de acción. Hay numerosos ejemplos en los cuales los estereoisómeros de una droga son diferentes en términos de biodisponibilidad y comportamiento en la ADME y en los cuales la estereoquímica tienen una importancia fundamental en su acción y disposición en el sistema biológico (Norbert *et al*, 2001). Muchas características de la farmacología y toxicología de estas drogas surgen de su interacción con moléculas endógenas altamente quirales presentes en receptores, enzimas, etc. El alto grado de estereoselectividad de los sistemas biológicos implica que cuando se administra una droga como mezcla racémica, los dos enantiómeros no tendrían la misma potencia (Carvalho *et al*, 2006). Muchas veces se refiere al isómero más activo como eutómero y al menos activo como distómero, el cual puede ser inactivo, tóxico o ejercer otras propiedades farmacológicas las cuales pueden ser deseadas o no (Nguyen *et al*, 2006). En particular para los profenos, se ha demostrado que el isómero S(+) es el activo farmacológicamente. En muchos casos, el enantiómero R(-) de estos fármacos muestra una menor actividad farmacológica en la inhibición de la COX. Además, muchos de los enantiómeros R(-) contribuyen a un aumento de los efectos secundarios independientes de COX-1 como por ejemplo el dolor gastrointestinal y, algunos tienen

la posibilidad de formar "híbridos" con triglicéridos y fosfolípidos, que alteran el metabolismo normal de los lípidos y función de la membrana plasmática (Sikora *et al*, 2014).

En el organismo, los ácidos 2-arilpropiónicos experimentan una inversión quiral catalizada por enzimas. Esta inversión metabólica del centro quiral ocurre sin otro cambio en la droga, la cual transforma el isómero R(-) inactivo en el enantiómero S(+) farmacológicamente activo (Caldwell *et al*, 1988). Este mecanismo de inversión mediado por enzimas es de tipo unidireccional, es decir que sólo el enantiómero R(-) puede sufrir inversión quiral hacia el isómero S(+) y no viceversa (Nguyen *et al*, 2006). La inversión quiral fue estudiada por primera vez en 1973 para el ibuprofeno, y desde ese momento varios profenos han demostrado experimentar esta inversión quiral. Entre ellos se pueden mencionar el ketoprofeno y fenoprofeno (Abas & Meffin, 1987; Hayball & Meffin, 1987).

Lee *et al* demostraron y cuantificaron la inversión de R(-) a S(+)-ibuprofeno *in vivo* y examinaron la disposición de ambos enantiómeros en el cuerpo. De estos estudios surge que un 63 ± 6 % del R(-) ibuprofeno administrado es invertido a su enantiómero S(+) en individuos sanos, siendo esta inversión en una única dirección (no se detecta inversión al administrar S(+)-ibuprofeno). Además, encontraron una alteración en la cinética de cada enantiómero individual si se administra concomitantemente el enantiómero opuesto. Esto último concuerda con las observaciones de la compañía Merck, que establece que el enantiómero S(+) actúa dentro de los 12 minutos de ingestión mientras que la mezcla racémica lo hace en 30 minutos (Lee *et al*, 1985). Si bien el isómero inactivo podría ser invertido en parte a su isómero con actividad farmacológica en el organismo, el tratamiento con el eutómero puro podría ser ventajoso por las siguientes razones:

- Reducción de la dosis administrada.
- Disminución de los efectos secundarios.
- Se evitaría la variabilidad de respuesta al no producirse la inversión quiral *in vivo*.
- Disminución del tiempo requerido para la acción terapéutica deseada.

Estas ventajas mencionadas permiten comprender la importancia de la obtención de enantiómeros simples y justifican el interés desarrollado en las últimas décadas por la obtención de ácidos S(+)-2-arilpropiónicos puros.

1.3. R/S-KETOPROFENO

1.3.1. Características

El R/S-ketoprofeno, ácido (\pm)2-(3-benzoilfenil) propiónico, es uno de los derivados del ácido fenilpropiónico de la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) que se caracterizan por su actividad antiinflamatoria, antipirética y analgésica. Fue sintetizado por primera vez por los laboratorios Rhône-Poulenc Research en París en 1967, y se aprobó su uso clínico en 1973. Actualmente, la droga es comercializada en el mundo en forma de cápsulas, soluciones inyectables, supositorios y gel tópico. En el mercado nacional se comercializan como mezcla racémica los medicamentos llamados Salicrem K (gel 100 mg, Gezzi) y Helenil (comprimidos, 50 mg, Roux-Ocefa). Mientras que también se encuentra el medicamento Enantyum (laboratorio Menarini) que contiene el enantiómero dexketoprofeno para prescripción oral e inyectable (Listado de Medicamentos). Presenta un rápido comienzo de acción y una corta vida media plasmática (Kantor, 1986). Su efecto antiinflamatorio es aproximadamente 160 veces la potencia antiinflamatoria de la aspirina en una unidad de peso (Ong *et al*, 2006).

Este fármaco es indicado preferentemente para el tratamiento de osteoartritis, artritis reumatoidea y espondilitis anquilosante, como analgésico en el tratamiento de dolor agudo leve o moderado y en la dismenorrea (Florez, 2008; Kantor, 1986).

El ketoprofeno es uno de los inhibidores más poderosos de las ciclooxigenasas. Esta inhibición de la síntesis de prostaglandinas es mucho más potente que la ocasionada por otros AINEs. Además, el ketoprofeno inhibe la vía de la lipooxigenasa de la cascada del ácido araquidónico, evitando la síntesis de HPETE y leucotrienos, sin embargo, aún no se conoce la importancia clínica de esta inhibición aunque algunos autores han

sugerido que los inhibidores de lipooxigenasas podrían atenuar la inflamación mediada por células y de esta forma retrasar la destrucción del tejido en articulaciones inflamadas (Kantor, 1986).

Las reacciones adversas más frecuentes son aquellas en el aparato gastrointestinal, tales como dispepsia, náusea y diarrea. También presentan, aunque con menor frecuencia, reacciones adversas a nivel de sistema nervioso (como pueden ser dolores de cabeza y mareos) y a nivel de función renal. No se ha encontrado evidencia de hepatotoxicidad en la administración de ketoprofeno.

Al igual que todos los AINEs, el ketoprofeno contiene un centro quiral en el carbono α de la función carboxilo y por lo tanto existe como enantiómero R(-) y S(+), como se observa en la Figura 3. Ambos isómeros se encuentran en igual proporción, sin embargo el isómero farmacológicamente activo (que presenta la actividad inhibidora de la ciclooxigenasa) del R/S-ketoprofeno es el enantiómero S(+). En su mayoría, los ácidos 2-arilpropiónicos en uso clínico son comercializados como mezclas racémicas principalmente debido a que el costo de separación de los enantiómeros con las metodologías actuales supera la potencial ventaja de un posible aumento de la actividad (Sallustio *et al*, 1988).

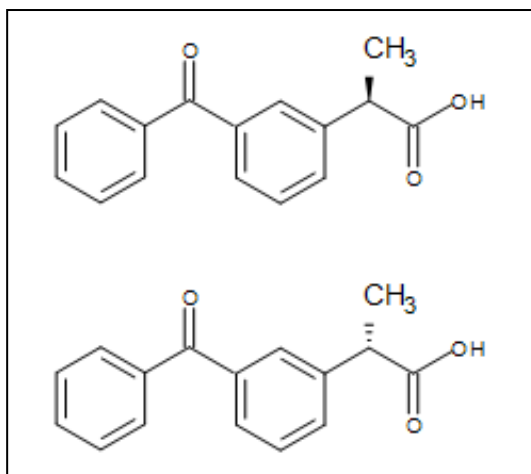


Figura 3. Isómeros R(-) y S(+), del ácido 2-(3-benzoilfenil) propiónico o ketoprofeno.

El isómero inactivo R(-) o distómero podría no sólo ser inactivo en la actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria sino que podría tener propiedades farmacológicas extrañas e incluso perjudiciales (Ong *et al*, 2006). Asimismo, tiene un papel importante en los efectos adversos más comunes de los AINEs, principalmente en los trastornos gastrointestinales.

Hasta el momento sólo se ha encontrado una utilidad al enantiómero R(-) de ketoprofeno como aditivo para pasta dental con el objetivo de prevenir enfermedades periodontales (Ong *et al*, 2005).

1.3.2. Métodos de obtención de S(+)-ketoprofeno

La separación quiral, también denominada resolución quiral, es un procedimiento empleado para separar los dos isómeros de un compuesto racémico en la industria farmacéutica. En la Figura 4 se presentan los distintos métodos empleados para obtener enantiómeros puros. Por lo general, existen tres maneras de obtener estos isómeros mediante tecnología enantiomérica. La primera es a partir de una forma racémica, de la cual se separa un enantiómero. La segunda consiste en la síntesis de compuestos enantioméricamente puros a partir de un pool de enantiómeros disponibles en la naturaleza al cual se lo denomina pool quiral. El pool quiral está integrado por hidratos de carbono, aminoácidos, hidroxácidos y terpenos. La tercera metodología para obtener enantiómeros puros consiste en la síntesis directa del enantiómero. La síntesis a partir de sustratos proquirales involucra reacciones químicas que introducen uno o más elementos de quiralidad en una molécula sustrato produciendo productos enantio- o diastereoisoméricos en iguales cantidades. Para la inducción asimétrica se requiere de un auxiliar quiral o de un catalizador (Arróniz & Escolano, 2012).

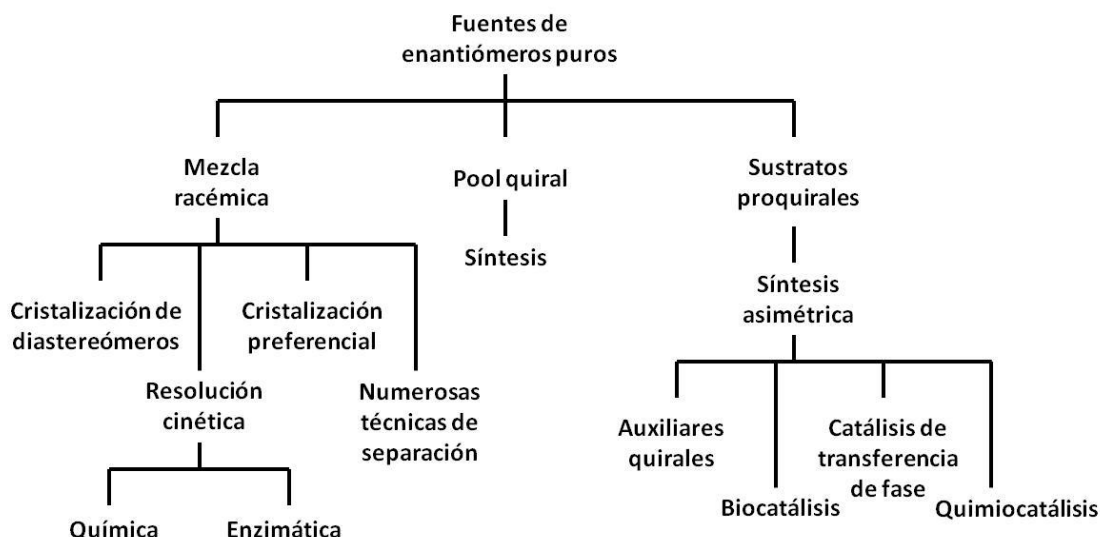


Figura 4. Métodos para obtener isómeros puros.

Los principales métodos de separación de enantiómeros son cristalización, cromatografía y resolución cinética, aunque también se han empleado electroforesis capilar, extracción con solvente y resolución basada en un receptor (Ong *et al*, 2005).

La viabilidad de un proceso dependerá 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) (Carvalho *et al*, 2006).

En la síntesis de S(+)-ketoprofeno se han empleado diversas técnicas tales como cristalización de diastereómeros (Yoneyoshi *et al*, 1996; Lukas *et al*, 1991), resolución cinética (D'Antona *et al*, 2002; Park *et al*, 1999, entre otros), síntesis asimétrica (Babin & Whiteker, 1996; Laue *et al*, 1994), separación cromatográfica (Davies, 1997; Boisvert *et al*, 1997) y cristalización preferencial (Eikeren *et al*, 1997; Manimaran & Potter, 1992). La metodología de obtención del S(+)-ketoprofeno más estudiada ha sido la resolución cinética, la cual se detallará más adelante en este capítulo en el apartado 1.4.7.

A continuación se describen brevemente estas técnicas:

- **Cristalización:** esta ha sido la técnica más usada a escala industrial para obtener enantiómeros puros. Se emplean principalmente la cristalización de diastereómeros y la cristalización preferencial. La primera utiliza un agente de resolución (ácido o base enantioméricamente puro), el cual forma sales diaestereoméricas con la mezcla racémica. Las diferentes solubilidades de las sales diastereoméricas permiten la separación de ambos productos y el tratamiento subsecuente con un ácido o una base permite obtener ambos enantiómeros (Arróniz & Escolano, 2012). Por otro lado, la cristalización preferencial no requiere agente de resolución, y la disolución sobresaturada de la mezcla racémica puede cristalizar el enantiómero deseado para luego ser separado.

Estas técnicas no son frecuentemente usadas debido a que las operaciones de recristalización consumen tiempo y no son económicas. Además, las bases empleadas en la cristalización de diaesterómeros son caras y químicamente inestables. Otro aspecto importante es la necesidad de aplicar altas y bajas temperaturas para solubilizar el ketoprofeno y aumentar la formación de sales, respectivamente. Por último, estos procesos requieren grandes volúmenes de solvente durante las etapas de lavado de las sales formadas y extracción, los cuales no son suficientes para obtener buenos rendimientos del producto final y por lo tanto se debe aplicar presión. Este proceso requiere mucha energía y consumo de tiempo (Ong *et al*, 2005).

- **Resolución cinética:** esta técnica es la más usada para la producción de fármacos ópticamente activos, especialmente S(+)-ketoprofeno. Se basa en las distintas velocidades de reacción de los enantiómeros de la mezcla racémica con un reactivo quiral (Arróniz & Escolano, 2012). La catálisis enzimática en la síntesis de enantiómeros puros es una de las preferidas debido a su alta actividad a temperatura ambiente, presión atmosférica y pH neutro. Además las enzimas se pueden degradar bioquímicamente, lo cual hace a este método ambientalmente amigable para la producción de moléculas quirales. Las enzimas empleadas son altamente selectivas comparadas con los catalizadores

químicos, tienen una velocidad de reacción mayor en condiciones de reacción más suaves y mayor enantioespecificidad (Ong *et al*, 2005). Se conocen dos métodos de resolución cinética enzimática:

- Esterificación enantioselectiva: el ácido racémico reacciona con un alcohol como dador de acilo en presencia de una enzima enantioselectiva para lograr el éster de R(-)-enantiómero o S(+)-enantiómero (dependiendo del tipo de enantioselectividad de la enzima) y agua. Dentro de las enzimas más comúnmente usadas, la lipasa es la más adecuada para síntesis orgánica debido a su estabilidad, disponibilidad, aceptación de un amplio rango de sustratos y a que no requiere de coenzimas. La lipasa de *Candida antarctica* ha sido ampliamente usada en la reacción de esterificación de ketoprofeno con enantiopreferencia por el enantiómero R(-), lo cual tiene la ventaja de que el enantiómero S(+) de interés permanece sin reaccionar y no requiere de manipulaciones químicas posteriores (Ong *et al*, 2005).
- Hidrólisis enantioselectiva: en este método el éster racémico es el sustrato de la reacción. En presencia de la enzima enantioselectiva, uno de los enantiómeros es hidrolizado para obtener el enantiómero ácido R(-) o S(+) (también dependiendo de la enantioselectividad de la enzima) y alcohol. Al igual que en la esterificación, la enzima más comúnmente usada es la lipasa. Las lipasas de *Mucor javanicus* y *Candida antarctica* presentan enantioselectividad hacia el enantiómero R(-)-ketoprofeno en la hidrólisis enzimática del éster de ketoprofeno mientras que la lipasa de *Candida rugosa* es enantioespecífica para el enantiómero S(+) (Ong *et al*, 2005).

Los procesos de resolución enzimática tienen un rendimiento máximo de 50% ya que uno de los enantiómeros no es sustrato de la enzima.

Actualmente, para superar este rendimiento una de las técnicas más estudiada es la resolución cinética dinámica (DKR, Dinamic Kinetic Resolution), la cual es una combinación de la resolución cinética “clásica” con la racemización *in situ* del enantiómero no deseado del material de partida (Rachwalski *et al*, 2013).

- Síntesis asimétrica: hace referencia a la conversión de un material de partida no quiral (proquiral) en un producto quiral en un ambiente quiral. Para este tipo de síntesis, se necesitan catalizadores químicos convencionales para facilitar la reacción global. Sin embargo, muchos de los catalizadores son altamente tóxicos y pirofóricos, dando como resultado a veces subproductos nocivos. Además, los catalizadores quirales que se emplean se preparan con extrema dificultad, son caros y la reacción es complicada (Ong *et al*, 2005).
- Separaciones cromatográficas: la resolución enantioespecífica de AINEs racémicos por HPLC en fases estacionarias quirales (CSP), generalmente se lleva a cabo mediante dos métodos. El primero consiste en seleccionar una CSP adecuada para la mezcla racémica de interés, y el segundo se basa en modificar (derivatizar) el soluto racémico para que pueda ser resuelto en una determinada CSP (Carvalho *et al*, 2006).

Las principales desventajas de la separación cromatográfica son el tiempo requerido y el bajo rendimiento. Además, este proceso es útil como herramienta analítica pero no es capaz de producir grandes cantidades de productos con utilidad comercial. Es una tecnología costosa incluso a escala de laboratorio. Por otro lado, la cantidad de fase móvil que se usa como portador de sustrato en el proceso causaría problemas ambientales si esta tecnología se emplea en una escala industrial (Ong *et al*, 2005).

1.4. ENZIMAS EN BIOCATÁLISIS

1.4.1. Definición y características

Las enzimas son macromoléculas biológicas de naturaleza proteica que catalizan reacciones bioquímicas *in vivo*. Cada una de las reacciones bioquímicas del metabolismo celular requiere ser catalizada por una enzima específica.

Las enzimas han sido adaptadas naturalmente para desempeñarse bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, la biocatálisis refiere el uso de enzimas como catalizadores de un proceso bajo condiciones artificiales (*in vitro*), por lo que es de fundamental importancia transformar estos catalizadores fisiológicos en catalizadores que sean capaces de funcionar en las condiciones de reacción generalmente complejas de un proceso industrial. Los biocatalizadores, como cualquier catalizador, aumentan la velocidad de una reacción química mediante la reducción de la barrera de energía de activación, sin ser consumidos en el proceso. La catálisis tiene lugar en una pequeña porción de la enzima llamada **sitio activo**, el cual generalmente está formado por muy pocos residuos de aminoácidos los cuales no están localizados consecutivamente en la cadena polipeptídica sino que se encuentran juntos tras el plegamiento característico de la enzima (Illanes, 2008). Las enzimas son más específicas que otros catalizadores, su actividad es afectada por agentes ambientales como la temperatura, el pH, la presión y/o agentes operacionales como la aireación.

Las enzimas son catalizadores excepcionales cuando la especificidad es de gran importancia (como ocurre en productos farmacéuticos y de química fina), generalmente permite obtener productos con mayor quimio-, regio-, diastereo- y enantioselectividad lo cual permite el acceso a moléculas complejas que podrían requerir múltiples etapas de protección y desprotección si la reacción se realizara mediante síntesis química. Las reacciones se pueden llevar a cabo en medios de reacción suaves (por ejemplo temperatura ambiente, presión atmosférica, valores de pH aproximadamente neutros) lo cual permite minimizar posibles reacciones

secundarias. Por otro lado, se refiere a las reacciones biocatalíticas como procesos verdes o amigables con el medio ambiente ya que el biocatalizador se puede autodegradar sin generar desechos dañinos. Además, estos biocatalizadores son eficaces, capaces de catalizar una gran variedad de reacciones, y en general se necesitan en pequeñas cantidades (Lin, 2011).

Si bien las enzimas son estructuras moleculares complejas, lábiles y su producción es costosa, hoy en día estas desventajas han sido resueltas o están siendo investigadas. Por ejemplo, se ha logrado mejorar la estabilidad mediante diversas estrategias como modificación química, inmovilización sobre matrices sólidas, cristalización, agregación y las técnicas modernas de ingeniería de proteínas (Illanes, 2008).

1.4.2. Estructura

Como todas las proteínas, las enzimas están compuestas por cientos de residuos de aminoácidos y poseen 4 niveles estructurales que se presentan en la Figura 5.

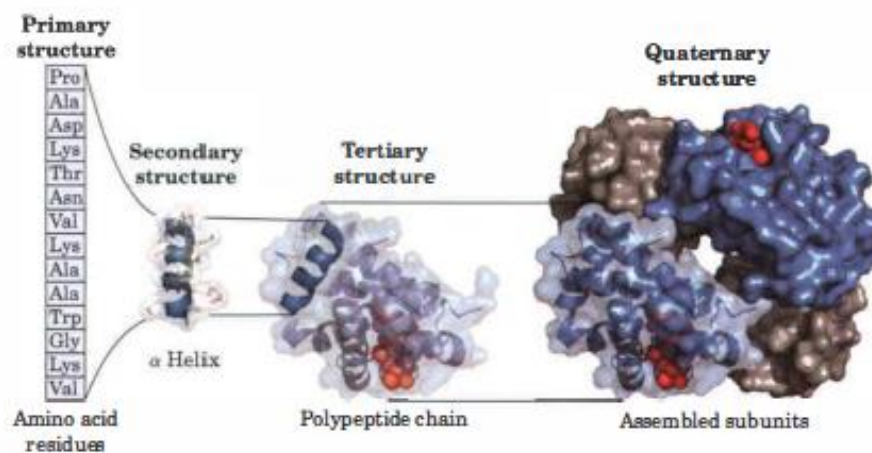


Figura 5. Niveles estructurales de las enzimas (extraída de Nelson & Cox, 2008)

La **estructura primaria** está definida por la secuencia de la cadena polipeptídica, es decir los enlaces covalentes (uniones peptídicas) que unen los residuos de aminoácidos. La **estructura secundaria** hace referencia a la disposición espacial de los residuos de aminoácidos sin considerar la conformación de sus cadenas laterales. La

estructura terciaria describe todos los aspectos del plegamiento tridimensional de un polipéptido. Por último la **estructura cuaternaria** se refiere a la disposición en el espacio debido a interacciones no covalentes o enlaces disulfuro cuando una proteína tiene una o más subunidades polipeptídicas (Voet & Voet, 2011).

A continuación se describen detalladamente estas estructuras:

- **Estructura primaria:** determina las propiedades químicas y biológicas de las proteínas. Está definida por la secuencia de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos entre sí. Esta unión es un enlace amida entre el átomo de carbono del grupo carboxilo y el átomo de nitrógeno del grupo α -amino del siguiente aminoácido (Figura 6).

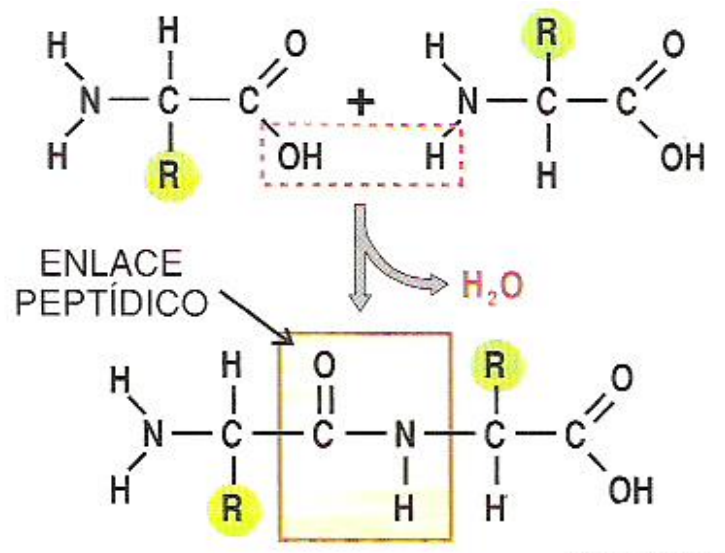


Figura 6. Esquema de la formación del enlace peptídico entre dos α -aminoácidos adyacentes.

Según la naturaleza del grupo R, los aminoácidos pueden ser no polares (hidrofóbicos) o polares (con o sin carga) y su distribución a lo largo de la molécula proteica determina su comportamiento (Nelson & Cox, 2008). Por

convención el orden de escritura siempre es desde el grupo amino N-H terminal al carboxilo C=O terminal.

- Estructura secundaria: describe la disposición de la secuencia de aminoácidos (estructura primaria) en el espacio mediante interacciones puente de hidrógeno.

Se han descrito varios tipos de estructura secundaria:

Hélice α : es una conformación helicoidal que presenta simultáneamente ángulos conformacionales y un patrón de formación de uniones de hidrógeno favorables. En esta estructura la cadena polipeptídica se enrolla helicoidalmente sobre si misma, quedando los grupos R de los residuos aminoácidos orientados hacia afuera de la hélice. La unidad de repetición es un giro simple de la hélice que se extiende aproximadamente 5.4 Å a lo largo del eje e incluye 3.6 residuos de aminoácidos. La estructura se estabiliza por un puente de hidrógeno entre el átomo de hidrógeno del grupo carbonilo C=O de un aminoácido y el amino N-H del cuarto aminoácido que le sigue en la secuencia (indicados como líneas punteadas en la Figura 7). Dentro de la hélice α , cada unión peptídica (excepto las que se encuentren cercanas a los extremos terminales) participa en este puente de hidrógeno. Cada giro sucesivo de la hélice es retenido al giro siguiente mediante tres o cuatro puentes de hidrógeno, lo cual confiere una gran estabilidad a esta estructura. Sin embargo, no todos los polipéptidos forman una estructura de hélice α igualmente estable. Cada aminoácido en la cadena polipeptídica es más o menos propenso a formar una hélice α , dependiendo de las propiedades del grupo R. También influye la posición de un residuo aminoácido con respecto a los próximos, ya que las interacciones entre los aminoácidos de la cadena

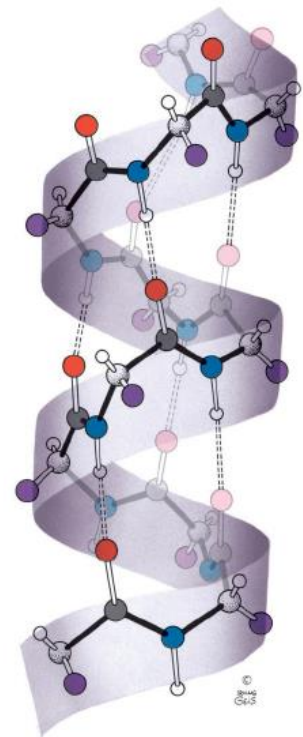


Figura 7. Estructura de hélice α (extraída de Voet & Voet, 2011)

lateral pueden estabilizar o desestabilizar esta estructura (Nelson & Cox, 2008; Voet & Voet, 2011).

Hoja o lámina β : la cadena polipeptídica se encuentra extendida en forma de zigzag. Puede estar dispuesta de lado a lado para formar una estructura parecida a una serie de pliegues. En esta disposición, se emplea la capacidad total de formación de puentes de hidrógeno de la cadena polipeptídica ya que se dan entre segmentos adyacentes de la cadena polipeptídica. Esta interacción ocurre entre cadenas cercanas en lugar de consigo misma como en las hélices α . Si bien la formación de láminas β se presenta generalmente en segmentos que se encuentren cercanos en la cadena polipeptídica, también podrían estar distanciados en la secuencia lineal del polipéptidos, y hasta podrían pertenecer a distintas cadenas.

Las cadenas polipeptídicas en una estructura de lámina β pueden encontrarse de forma paralela o antiparalela, es decir que tienen la misma u opuesta orientación amino-carboxilo, respectivamente. Las estructuras son similares, aunque el período de repetición es más corto para la conformación paralela (6.5 Å vs. 7 Å para la conformación antiparalela) y los patrones de puentes de hidrógeno son diferentes (indicados con líneas punteadas en la Figura 8).

A menudo se presentan estructuras

que conectan dos segmentos adyacentes de láminas β antiparalelas llamadas **giros β** . La estructura es un giro de 180° que involucra cuatro residuos de aminoácidos, con un puente de hidrógeno entre el grupo carbonilo C=O del primer aminoácido con el grupo amino N-H del cuarto. Los dos residuos centrales no participan de ninguna interacción

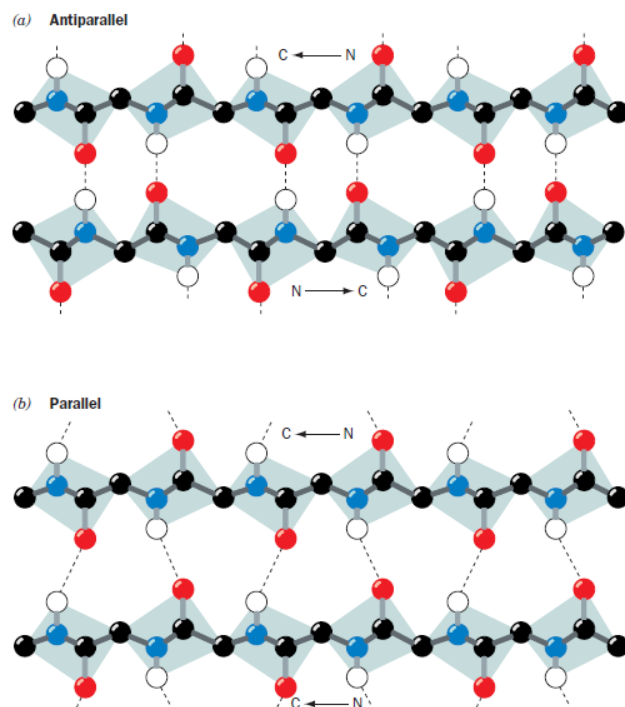


Figura 8. Estructura de lámina β plegada, a) antiparalela y b) paralela (extraída de Voet & Voet, 2011)

de hidrógeno. Estos giros β generalmente presentan una morfología de horquilla (Figura 9) (Nelson & Cox, 2008; Voet & Voet, 2011).

Las secuencias de aminoácidos que contienen varios residuos hidrofóbicos y una alta disposición a formar láminas β , probablemente tengan una importante

tendencia a formar **agregados**. Estos agregados son un plegamiento defectuoso de las proteínas (Fink, 1998).



Figura 9. Estructura de giros β con morfología de horquilla (extraída de Voet & Voet, 2011)

Aleatoria: son conformaciones totalmente desordenadas e inestables. Tanto las estructuras aleatorias como los agregados β podrían estar asociados a fenómenos de desnaturalización de las proteínas (Voet & Voet, 2011).

- Estructura terciaria: está dada por la disposición tridimensional de todos los átomos de una proteína. Es el plegamiento de los elementos de la estructura secundaria junto con la disposición espacial de sus cadenas laterales. La localización de giros (incluyendo giros β) en la cadena polipeptídica y la dirección y ángulo de estos giros están determinados por el número y ubicación de residuos específicos generadores de giros, tales como Pro, Thr, Ser y Gly. Los segmentos de las cadenas polipeptídicas que interactúan se conservan en su estructura terciaria característica por interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, enlaces hidrofóbicos y puentes disulfuro. El interior de una molécula de proteína contiene mayormente aminoácidos hidrofóbicos que tienen a agruparse y excluir al agua. Este interior 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 y esto hace que la proteína tenga mayor solubilidad en agua.

- Estructura cuaternaria: está formada por dos o más cadenas polipeptídicas separadas, o subunidades, las cuales pueden ser idénticas o diferentes. Estas subunidades se asocian de una manera geométrica específica.

1.4.3. Biocatálisis enzimática: medios de reacción

Si bien el medio acuoso es el habitual de las enzimas, una de las principales desventajas de su uso para síntesis es la baja solubilidad de la mayoría de los compuestos orgánicos con más de cuatro átomos de carbono. El agua es un solvente poco eficiente para gran parte de las aplicaciones en la industria química ya que muchos compuestos orgánicos son inestables en soluciones acuosas dando lugar a reacciones secundarias. Además, la remoción de agua es tediosa y costosa debido a que ésta tiene alto punto de ebullición y calor de vaporización, y en las reacciones de esterificación afecta la posición de equilibrio ya que es uno de los productos de la reacción (Gotor-Fernández *et al*, 2006). Sin embargo, las enzimas necesitan una pequeña cantidad de agua para retener su estado conformacional tridimensional activo. El agua contribuye a la integridad estructural, polaridad del sitio activo, y estabilidad de la proteína. Provee interacciones hidrofóbicas con los residuos polares de la enzima que de otra manera se encontrarían interactuando entre ellas, creando una estructura conformacional incorrecta (Yahya *et al*, 1998).

La necesidad de sistemas de reacción con condiciones favorables para la síntesis química llevó al uso de solventes orgánicos. El uso de estos solventes orgánicos presenta una serie de ventajas, entre las cuales se pueden mencionar: mayor estabilidad, facilidad de recuperación del sustrato y producto, posibilidad de usar sustratos no-polares, se evitan reacciones secundarias. En muchos casos las lipasas son más activas termodinámicamente y se logra un desplazamiento del equilibrio

termodinámico para favorecer la síntesis por sobre la hidrólisis (Gotor-Fernández *et al*, 2006).

Sin embargo, la naturaleza del solvente en reacciones catalizadas por lipasas en medios orgánicos puede influir en la actividad y enantioselectividad, debido a la interacción directa del solvente con la enzima o a la remoción del agua de las mismas. Además, debido a la alta rigidez de la enzima en presencia de un solvente orgánico, no puede adquirir el cambio conformacional necesario para acomodar el sustrato en su sitio activo lo cual causa una disminución en la actividad. La actividad enzimática debería correlacionarse con la hidrofobicidad del solvente teniendo en cuenta su dependencia con el agua, por lo tanto, la conveniencia de un determinado solvente podría predecirse mediante una medida de la hidrofobicidad del mismo. Para ello se emplea el parámetro $\log P_{\text{oct}}$, definido como el logaritmo del coeficiente de partición de un solvente en la mezcla octanol/agua. $\log P_{\text{oct}}$ tiene en cuenta los cambios entálpicos y entrópicos en la mezcla. Los solventes que tengan un $\log P_{\text{oct}} \leq 2$ son hidrofílicos y por lo tanto se espera que no sean muy apropiados para su uso en biocatálisis. Aquellos solventes con $\log P_{\text{oct}}$ entre 2 y 4 son menos hidrofílicos pero es poco predecible su utilidad. Los solventes con valores de $\log P_{\text{oct}}$ mayores a 4 son hidrofóbicos, no alteran el agua esencial situada alrededor del biocatalizador y por lo tanto son los de elección para procesos biocatalíticos (Yahya *et al*, 2002). Sin embargo, $\log P_{\text{oct}}$ no es un parámetro definitivo en la elección del solvente, ya que no incluye las interacciones específicas solvente-enzima, el carácter ácido/base o el efecto de la constante dieléctrica (ϵ) del solvente sobre la actividad enzimática. Este último parámetro da una idea acerca de la flexibilidad de la lipasa en el solvente y es de gran importancia, ya que las interacciones no covalentes presentes en la proteína son de tipo electrostático y están inversamente relacionadas con el valor de ϵ . Es decir, que las enzimas deberían ser más flexibles en aquellos solventes con un valor de ϵ elevado (Arroyo Sánchez, 1995).

Otra desventaja de los solventes orgánicos es su toxicidad y costo del solvente, el cual es un problema para su aplicación a escala industrial.

Un desarrollo novedoso en cuanto al uso de lipasas y otras enzimas en medios no-acuosos, es la utilización de líquidos iónicos (ILs) los cuales son medios de reacción polares. Estos ILs son líquidos a temperatura ambiente y se emplean como solventes en sistemas (H₂O/ILs) en una o dos fases. Los solventes iónicos basados en cationes de 1-alkil-3-metilimidazolio son líquidos a temperatura ambiente, con una presión de vapor despreciable, son muy estables térmica y químicamente (incluyendo tolerancia al aire y H₂O) y pueden disolver gran cantidad de compuestos, razones por las cuales se los ha llamado “solventes verdes”. El reemplazo de solventes orgánicos volátiles y tóxicos es de gran interés. Además se ha demostrado que transformaciones catalizadas por lipasas empleando este tipo de solvente mostraron un aumento en la actividad, enantioselectividad, estabilización y re-uso de las enzimas (Panke & Wubbolts, 2002; Reetz, 2002).

Alternativamente, en sistemas libres de solvente, la ausencia de solvente facilita el procesamiento del producto ya que habrá menos componentes en la mezcla de reacción al final de la reacción. Además, la eliminación de los solventes de las etapas de producción permite ahorrar en el costo del proceso. En general, en los sistemas libres de solvente uno de los reactivos cumple la función de “solvente”. Una característica distintiva de este tipo de medios de reacción es el alto impacto que tienen los sustratos y productos en las características del medio de reacción. A medida que la reacción procede, la composición (y por lo tanto, las propiedades) del medio de reacción cambia drásticamente debido a las altas proporciones de sustratos y/o productos en el sistema. Una desventaja en los sistemas libres de solvente es la posibilidad de generar medios de alta viscosidad especialmente cuando se emplean alcoholes de cadena larga lo cual puede llevar a dificultades en la mezcla y por lo tanto, bajas velocidades de reacción (Yahya *et al*, 2002).

1.4.4. Enzimas lipasas

Las enzimas lipasas (triacilglicerol ésterhidrolasas, EC 3.1.1.3) son un grupo de enzimas hidrolíticas cuya función biológica es catalizar la hidrólisis de triglicéridos de grasas animales y aceites vegetales para obtener como productos finales ácidos grasos libres y glicerol como se muestra en la Figura 10. Esta reacción tiene como productos intermedios monoglicéridos y diglicéridos.

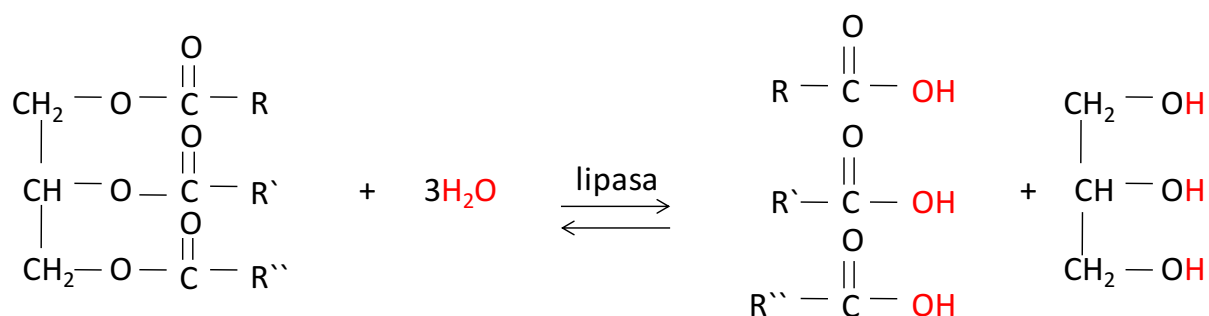


Figura 10. Hidrólisis de triglicéridos catalizado por lipasa en donde R son ácidos grasos.

En su mayoría las lipasas son activadas en una interfase orgánico-acuosa, cuando el sustrato de triglicéridos forma una emulsión, y este fenómeno es conocido como *activación interfacial*. En medios acuosos homogéneos, el sitio activo está cubierto por una cadena polipeptídica helicoidal que aísla el sitio activo comúnmente denominada tapadera (o lid), impidiendo la entrada de los sustratos (conformación cerrada). En presencia de una interfase orgánico-acuosa, esta tapadera es desplazada y la enzima adquiere una conformación abierta, dejando el sitio activo accesible a la interacción con los sustratos. La presencia de esta tapadera parecería tener un rol importante en la modulación, actividad, estabilidad, especificidad y enantioselectividad de las lipasas (Reetz, 2002; Illanes, 2008).

En el caso de las esterasas, éstas catalizan la hidrólisis de ésteres solubles, trabajando sin interfase. En este punto es necesario aclarar que la mayoría de las lipasas son también esterasas.

El sitio activo de las lipasas está compuesto por una triada catalítica que consiste en residuos de serina, ácido aspártico (o glutámico) e histidina. Los residuos de serina están localizados en un pentapéptido altamente conservado Gly-X-Ser-X-Gly formando una estructura característica de tipo β -giro- α llamado “codo nucleofílico” (Illanes, 2008).

Desde 1990 se han descrito estructuras tridimensionales de lipasas. Si bien estas difieren en las secuencias de aminoácidos y en el tamaño (varían de 22 a 60 kDa), se pliegan y poseen sitios activos similares. El plegamiento de estas lipasas se corresponde con el modelo α/β hidrolasa en el cual es característico un núcleo de láminas β (en su mayoría dispuestas paralelamente) rodeadas por hélices α . Este plegamiento incluye la tríada catalítica de las lipasas (Ser, His, Glu/Asp), así como un hueco donde encaja un oxianión (Arroyo Sánchez, 1995).

Las lipasas catalizan además otras reacciones no lipolíticas, lo que hace que estas enzimas tengan una amplia utilización en reacciones muy diversas. Estas enzimas tienen la capacidad de catalizar la síntesis de ésteres, la transesterificación y la interesterificación.

La transesterificación se define como una reacción de síntesis en la cual el donante del grupo acilo es un éster, y se pueden dividir en dos tipos: glicerólisis y alcoholólisis, según sea el glicerol o un alcohol el receptor del grupo acilo, respectivamente (Figura 11).

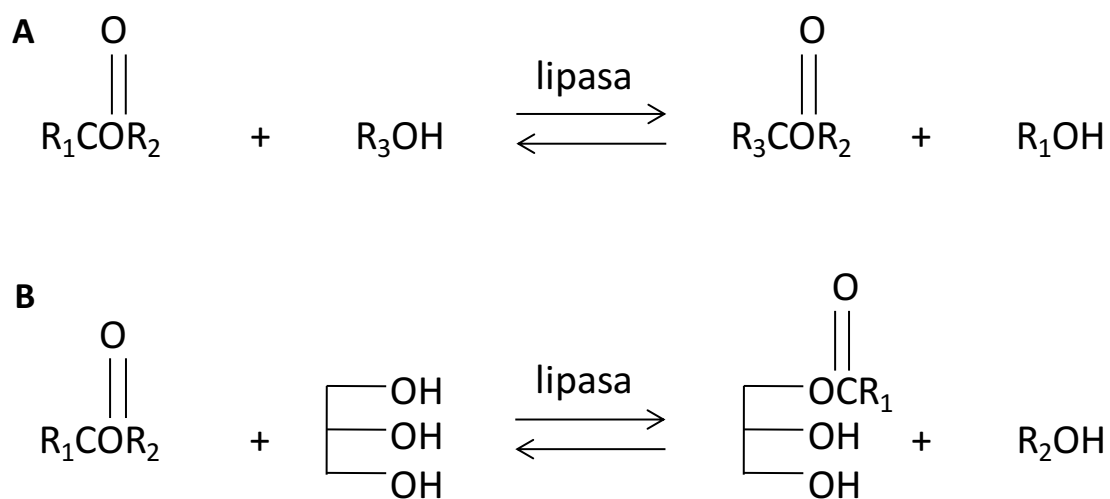


Figura 11. Esquemas de transesterificación de tipo alcoholólisis (A) y glicerólisis (B)

La interesterificación es un proceso útil para cambiar la composición de ácidos grasos de un enlace éster, en el cual el grupo acilo se intercambia entre un éster y un ácido graso (acidólisis) o entre dos ésteres (Figura 12).

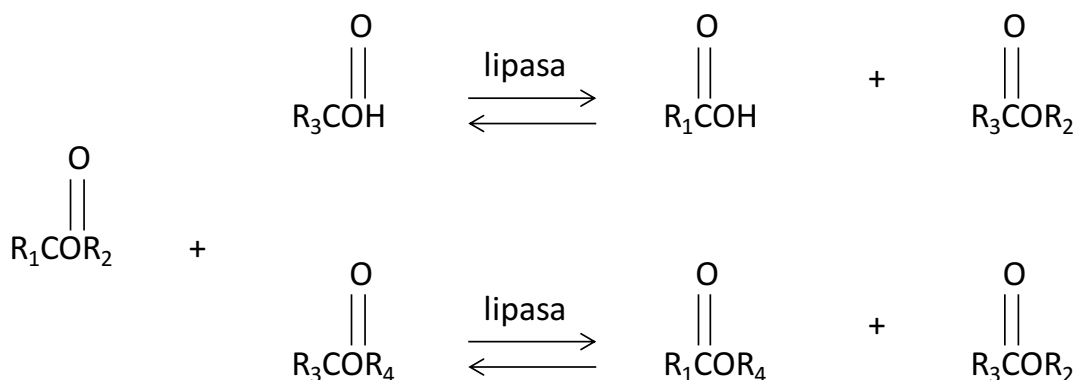


Figura 12. Esquemas de interesterificación.

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, y han sido aisladas de microorganismos, plantas y animales. En el campo de la biocatálisis, todos los esfuerzos se han enfocado en las de origen microbiano debido a su gran accesibilidad y a que su producción pudo manipularse gracias a la ingeniería genética (Pandet *et al*, 1999). La mayoría de las lipasas de origen microbiano presentan una

actividad máxima a intervalos amplios de pH que van de 5.6 a 8.5, presentando su máxima estabilidad a pH neutro. Además, son activas en intervalos amplios de temperatura, que varían de -20 a 45 °C, si bien el intervalo óptimo es de 30 a 45 °C (Arroyo Sánchez, 1995). En la actualidad, se obtienen por vía fermentativa a partir de una amplia variedad de microorganismos: bacterias, levaduras y hongos. Se han llevado a cabo numerosos estudios para definir las condiciones óptimas de cultivo y requerimientos nutricionales para la producción de lipasas. La producción de lipasas está fuertemente influenciada por un amplio rango de parámetros de fermentación tales como las fuentes de nitrógeno y carbono, pH, temperatura, agitación, concentración de oxígeno disuelto y la presencia de lípidos.

La purificación de la lipasa obtenida del cultivo simplifica el uso como biocatalizador ya que se reduce la formación de productos secundarios. Se debe considerar una alta pureza para llevar a cabo estudios estructurales o cuando la enzima se empleará en reacciones sintéticas de la industria farmacéutica. La mayoría de las lipasas microbianas son extracelulares y el proceso de fermentación es seguido por la remoción de las células del caldo de cultivo, ya sea por centrifugación o filtración. Algunas etapas de pre-purificación involucran la concentración del caldo de cultivo sin células mediante precipitación con sulfato de amonio, ultrafiltración o extracción con solventes orgánicos. Estas etapas de pre-purificación normalmente están seguidas por técnicas cromatográficas. Por lo general, una simple etapa de cromatografía no es suficiente para lograr el nivel de pureza deseado y se debería aplicar una combinación de estas técnicas.

Las características de las lipasas estarán determinadas por el microorganismo del cual provienen: peso molecular, pH y temperatura óptimos, estabilidad, especificidad de sustrato. En base a la especificidad por el sustrato, las lipasas microbianas se podrían dividir en tres categorías:

- **no específicas:** hidrolizan los triacilgliceroles en cualquiera de sus posiciones, obteniéndose como producto glicerol y ácidos grasos libres.
- **regioespecíficas:** hidrolizan preferentemente las posiciones 1 y 3 del triglicérido, las cuales son las más accesibles. Estas lipasas hidrolizan triacilglicerol para dar ácidos

grasos libres, 1,2 (o 2,3)-diacilglicerol y 2-monoacilglicerol. Esta propiedad es la utilizada en la obtención de esteres o alcoholes ópticamente puros.

- **específicas de ácidos grasos:** catalizan la hidrólisis de un tipo de ácido graso particular en un triglicérido, dependiendo del número de átomos de carbono del ácido graso y también del grado de insaturación del mismo (Alarcón Vivero, 2008).

Las lipasas tienen una gran quimio-, regio- y enantioselectividad y la capacidad de reaccionar con diferentes sustratos. Se han empleado en reacciones hidrolíticas y sintéticas. Estas enzimas son los biocatalizadores más ampliamente usados en química orgánica y han sido exitosamente empleados para la resolución de mezclas racémicas ya que se pueden emplear para la producción de compuestos ópticamente puros, los cuales son muy importantes en la industria farmacéutica, cosmética, de agricultura, síntesis orgánica y productos naturales (Illanes, 2008). Las aplicaciones biotecnológicas clásicas con interés industrial de las lipasas están relacionadas a los distintos tipos de reacciones que estas enzimas son capaces de llevar a cabo, las cuales se mencionan a continuación (Alarcón Vivero, 2008):

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 esteres 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, 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, lo cual está provocando un gran esfuerzo de investigación en el campo de las lipasas como biocatalizadores enantioméricamente activos. Algunos de los trabajos relacionados con estas aplicaciones en la industria farmacéutica se mencionan a continuación (Alarcón Vivero, 2008):

- 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 la 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 de interés en medicina y biología y en 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.

1.4.4.1. Lipasa B de *Candida antarctica*

Candida antarctica es una levadura basidiomiceto que presenta actividad lipásica aún a altas temperaturas. A partir de esta levadura se han aislado dos lipasas diferentes, denominadas A y B, con distintos puntos isoeléctricos (pI) y pesos moleculares. La lipasa A (CALA) no es específica y es la lipasa más estable. Tiene un peso molecular de 45 kDa y un pI de 7.5. La lipasa B (CALB) tiene un peso molecular de 33 kDa y un pI de 6.0. Esta enzima es muy específica tanto para la hidrólisis como para la síntesis orgánica lo que la hace aplicable a la síntesis enantioselectiva de compuestos ópticamente puros (Uppenberg *et al*, 1994). En la Figura 13 se presenta una estructura tridimensional de esta enzima.



Figura 13. Estructura tridimensional de CALB (extraída de Sikora *et al*, 2014).

La enzima CALB está compuesta por 317 residuos aminoacídicos. La secuencia de aminoácidos (Figura 14) no presenta una homología importante a las secuencias de otras lipasas. Al igual que las estructuras determinadas para otras lipasas, CALB contiene la tríada catalítica Ser105-Asp187-His224. Sin embargo, la secuencia consenso encontrada en las lipasas cercanas a la Ser105 del sitio activo, Gly-X-Ser-X-Gly, no está presente en CALB. En su lugar, la primera glicina conservada ha sido reemplazada por una treonina, dando la secuencia Thr-Trp-Ser-Gln-Gly. Por otro lado, la secuencia de aminoácidos sugiere un sitio posible de N-glicosilación, con la secuencia característica Asn-Thr en Asn74. Esta aspargina, seguida por un residuo de ácido aspártico y de treonina, es la única en la cual la densidad electrónica indica una glicosilación (Uppenberg *et al*, 1994).

ATG	AAG	CTA	CTC	TCT	-20	CTG	ACC	CGT	GTG	GCT	GGT	GTG	CTT	GCG	ACT	-10	TGC	GTT	GCA	GCC	ACT
<i>met</i>	<i>lys</i>	<i>leu</i>	<i>leu</i>	<i>ser</i>	<i>leu</i>	<i>thr</i>	<i>gly</i>	<i>val</i>	<i>ala</i>	<i>gly</i>	<i>val</i>	<i>leu</i>	<i>ala</i>	<i>thr</i>	<i>cys</i>	<i>val</i>	<i>ala</i>	<i>ala</i>	<i>ala</i>	<i>thr</i>	
CCT	TTG	GTG	AAG	CGT	-1	CTA	CCT	TCC	GGT	TCG	GAC	CCT	GCC	TTT	TCG	CAG	CCC	AAG	TCG	GTG	
<i>pro</i>	<i>leu</i>	<i>val</i>	<i>lys</i>	<i>arg</i>	<i>leu</i>	<i>pro</i>	<i>ser</i>	<i>gly</i>	<i>ser</i>	<i>asp</i>	<i>pro</i>	<i>ala</i>	<i>phe</i>	<i>ser</i>	<i>gln</i>	<i>pro</i>	<i>lys</i>	<i>ser</i>	<i>val</i>		
CTC	GAT	GCG	GGT	CTG	21	ACC	TGC	CAG	GGT	GCT	TCG	CCA	TCC	TCG	GTC	TCC	AAA	CCC	ATC	CTT	
<i>leu</i>	<i>asp</i>	<i>ala</i>	<i>gly</i>	<i>leu</i>	<i>thr</i>	<i>cys</i>	<i>gln</i>	<i>gly</i>	<i>ala</i>	<i>ser</i>	<i>pro</i>	<i>ser</i>	<i>ser</i>	<i>val</i>	<i>ser</i>	<i>lys</i>	<i>pro</i>	<i>ile</i>	<i>leu</i>		
CTC	GTC	CCC	GGA	ACC	41	GGC	ACC	ACA	GGT	CCA	CAG	TCG	TTC	GAC	TCG	AAC	TGG	ATC	CCC	CTC	
<i>leu</i>	<i>val</i>	<i>pro</i>	<i>gly</i>	<i>thr</i>	<i>gly</i>	<i>thr</i>	<i>thr</i>	<i>gly</i>	<i>pro</i>	<i>gln</i>	<i>ser</i>	<i>phe</i>	<i>asp</i>	<i>ser</i>	<i>asn</i>	<i>trp</i>	<i>ile</i>	<i>pro</i>	<i>leu</i>		
TCA	ACG	CAG	TTG	GGT	61	TAC	ACA	CCC	TGC	TGG	ATC	TCA	CCC	CCG	CCG	TTC	ATG	CTC	AAC	GAC	
<i>ser</i>	<i>thr</i>	<i>gln</i>	<i>leu</i>	<i>gly</i>	<i>tyr</i>	<i>thr</i>	<i>pro</i>	<i>cys</i>	<i>trp</i>	<i>ile</i>	<i>ser</i>	<i>pro</i>	<i>pro</i>	<i>pro</i>	<i>phe</i>	<i>met</i>	<i>leu</i>	<i>asn</i>	<i>asp</i>		
ACC	CAG	GTC	AAC	ACG	81	GAG	TAC	ATG	GTC	AAC	GCC	ATC	ACC	GCG	CTC	TAC	GCT	GGT	TCG	GGC	
<i>thr</i>	<i>gln</i>	<i>val</i>	<i>asn</i>	<i>thr</i>	<i>glu</i>	<i>tyr</i>	<i>met</i>	<i>val</i>	<i>asn</i>	<i>ala</i>	<i>ile</i>	<i>thr</i>	<i>ala</i>	<i>leu</i>	<i>tyr</i>	<i>ala</i>	<i>gly</i>	<i>ser</i>	<i>gly</i>		
AAC	AAC	AAG	CTT	CCC	101	GTG	CTT	ACC	TGG	TCC	CAG	GGT	GGT	CTG	GTT	GCA	CAG	TGG	GGT	CTG	
<i>asn</i>	<i>asn</i>	<i>lys</i>	<i>leu</i>	<i>pro</i>	<i>val</i>	<i>leu</i>	<i>thr</i>	<i>trp</i>	<i>ser</i>	<i>gln</i>	<i>gly</i>	<i>gly</i>	<i>leu</i>	<i>val</i>	<i>ala</i>	<i>gln</i>	<i>trp</i>	<i>gly</i>	<i>leu</i>		
ACC	TTC	TTC	CCC	AGT	121	ATC	AGG	TCC	AAG	GTC	GAT	CGA	CTT	ATG	GCC	TTT	GCG	CCC	GAC	TAC	
<i>thr</i>	<i>phe</i>	<i>phe</i>	<i>pro</i>	<i>ser</i>	<i>ile</i>	<i>arg</i>	<i>ser</i>	<i>lys</i>	<i>val</i>	<i>asp</i>	<i>arg</i>	<i>leu</i>	<i>met</i>	<i>ala</i>	<i>phe</i>	<i>ala</i>	<i>pro</i>	<i>asp</i>	<i>tyr</i>		
AAG	GGC	ACC	GTC	CTC	141	CCC	GGC	CCT	CTC	GAT	GCA	CTC	GCG	GTT	AGT	GCA	CCC	TCC	GTA	TGG	
<i>lys</i>	<i>gly</i>	<i>thr</i>	<i>val</i>	<i>leu</i>	<i>ala</i>	<i>gly</i>	<i>pro</i>	<i>leu</i>	<i>asp</i>	<i>ala</i>	<i>leu</i>	<i>ala</i>	<i>val</i>	<i>ser</i>	<i>ala</i>	<i>pro</i>	<i>ser</i>	<i>val</i>	<i>trp</i>		
CAG	CAA	ACC	ACC	GGT	161	TCG	GCA	CTC	ACC	ACC	GCA	CTC	CGA	AAC	GCA	GGT	GGT	CTG	ACC	CAG	
<i>gln</i>	<i>gln</i>	<i>thr</i>	<i>thr</i>	<i>gly</i>	<i>ser</i>	<i>ala</i>	<i>leu</i>	<i>thr</i>	<i>thr</i>	<i>ala</i>	<i>leu</i>	<i>arg</i>	<i>asn</i>	<i>ala</i>	<i>gly</i>	<i>gly</i>	<i>leu</i>	<i>thr</i>	<i>gln</i>		
ATC	GTG	CCC	ACC	ACC	181	AAC	CTC	TAC	TCG	CCC	ACC	GAC	GAG	ATC	GTT	CAG	CCT	CAG	GTG	TCC	
<i>ile</i>	<i>val</i>	<i>pro</i>	<i>thr</i>	<i>thr</i>	<i>asn</i>	<i>leu</i>	<i>tyr</i>	<i>ser</i>	<i>ala</i>	<i>thr</i>	<i>asp</i>	<i>glu</i>	<i>ile</i>	<i>val</i>	<i>gln</i>	<i>pro</i>	<i>gln</i>	<i>val</i>	<i>ser</i>		
AAC	TCG	CCA	CTC	GAC	201	TCA	TCC	TAC	CTC	TTC	AAC	GGA	AAG	AAC	GTC	CAG	GCA	CAG	GCC	GTG	
<i>asn</i>	<i>ser</i>	<i>pro</i>	<i>leu</i>	<i>asp</i>	<i>ser</i>	<i>ser</i>	<i>tyr</i>	<i>leu</i>	<i>phe</i>	<i>asn</i>	<i>gly</i>	<i>lys</i>	<i>asn</i>	<i>val</i>	<i>gln</i>	<i>ala</i>	<i>gln</i>	<i>ala</i>	<i>val</i>		
TGT	GGG	CCG	CTG	TTC	221	GTC	ATC	GAC	CAT	GCA	GGC	TCG	CTC	ACC	TCG	CAC	TTC	TCC	TAC	GTC	
<i>cys</i>	<i>gly</i>	<i>pro</i>	<i>leu</i>	<i>phe</i>	<i>val</i>	<i>ile</i>	<i>asp</i>	<i>his</i>	<i>ala</i>	<i>gly</i>	<i>ser</i>	<i>leu</i>	<i>thr</i>	<i>ser</i>	<i>gln</i>	<i>phe</i>	<i>ser</i>	<i>tyr</i>	<i>val</i>		
GTC	GGT	CGA	TCC	GCC	241	CTG	CGC	TCC	ACC	ACG	GGC	CAG	GCT	CGT	AGT	GCA	GAC	TAT	GGC	ATT	
<i>val</i>	<i>gly</i>	<i>arg</i>	<i>ser</i>	<i>ala</i>	<i>leu</i>	<i>arg</i>	<i>ser</i>	<i>thr</i>	<i>thr</i>	<i>gly</i>	<i>gln</i>	<i>ala</i>	<i>arg</i>	<i>ser</i>	<i>ala</i>	<i>asp</i>	<i>tyr</i>	<i>gly</i>	<i>ile</i>		
ACG	GAC	TGC	AAC	CCT	261	CTT	CCC	GCC	AAT	GAT	CTG	ACT	CCC	GAG	CAA	AAG	GTC	GCC	GCG	GCT	
<i>thr</i>	<i>asp</i>	<i>cys</i>	<i>asn</i>	<i>pro</i>	<i>leu</i>	<i>pro</i>	<i>ala</i>	<i>asn</i>	<i>asp</i>	<i>leu</i>	<i>thr</i>	<i>pro</i>	<i>glu</i>	<i>gln</i>	<i>lys</i>	<i>val</i>	<i>ala</i>	<i>ala</i>	<i>ala</i>		
GCG	CTC	CTG	GCG	CCG	281	GCA	GCT	GCA	GCC	ATC	GTG	GCG	GGT	CCA	AAG	CAG	AAC	TGC	GAG	CCC	
<i>ala</i>	<i>leu</i>	<i>leu</i>	<i>ala</i>	<i>pro</i>	<i>ala</i>	<i>ala</i>	<i>ala</i>	<i>ala</i>	<i>ala</i>	<i>ile</i>	<i>val</i>	<i>ala</i>	<i>gly</i>	<i>pro</i>	<i>lys</i>	<i>gln</i>	<i>asn</i>	<i>cys</i>	<i>glu</i>		
GAC	CTC	ATG	CCC	TAC	301	GCC	CGC	CCC	TTT	GCA	GTA	GGC	AAA	AGG	ACC	TGC	TCC	GGC	ATC	GTC	
<i>asp</i>	<i>leu</i>	<i>met</i>	<i>pro</i>	<i>tyr</i>	<i>ala</i>	<i>arg</i>	<i>pro</i>	<i>phe</i>	<i>ala</i>	<i>val</i>	<i>gly</i>	<i>lys</i>	<i>arg</i>	<i>thr</i>	<i>cys</i>	<i>ser</i>	<i>gly</i>	<i>ile</i>	<i>val</i>		
ACC	CCC	TGA																			
<i>thr</i>	<i>pro</i>	<i>OPA</i>																			

Figura 14. Secuencia de ADN y aminoácidos (estructura primaria) de CALB. Los números hacen referencia a la posición de los aminoácidos. Los residuos del sitio activo están marcados con doble subrayado, y la N-glicosilación con líneas punteadas (extraída de Uppenberg *et al*, 1994).

Es una proteína globular del tipo α/β . Las láminas β centrales están compuestas por 7 cadenas de las cuales las últimas 6 son paralelas. El número de hélices α y hojas β están graficados en la Figura 15. La mayoría de las uniones entre las estructuras están formadas por el motivo estructural β - α - β por derecha. Hay dos excepciones que involucran la conexión antiparalela entre las cadenas β_1 y β_2 , y las últimas dos láminas β forman una estructura β -bucle- β por derecha. Además, en los últimos 12 residuos de la proteína se encuentra una región tipo lámina β que forman un par de cadenas unidas por uniones de hidrógeno con una unión β tipo horquilla. En la estructura hay 10 hélices α . Las hélices α_5 , α_6 y α_{10} constituyen la mayor parte del bolsillo del sitio activo (Uppenberg *et al*, 1994).

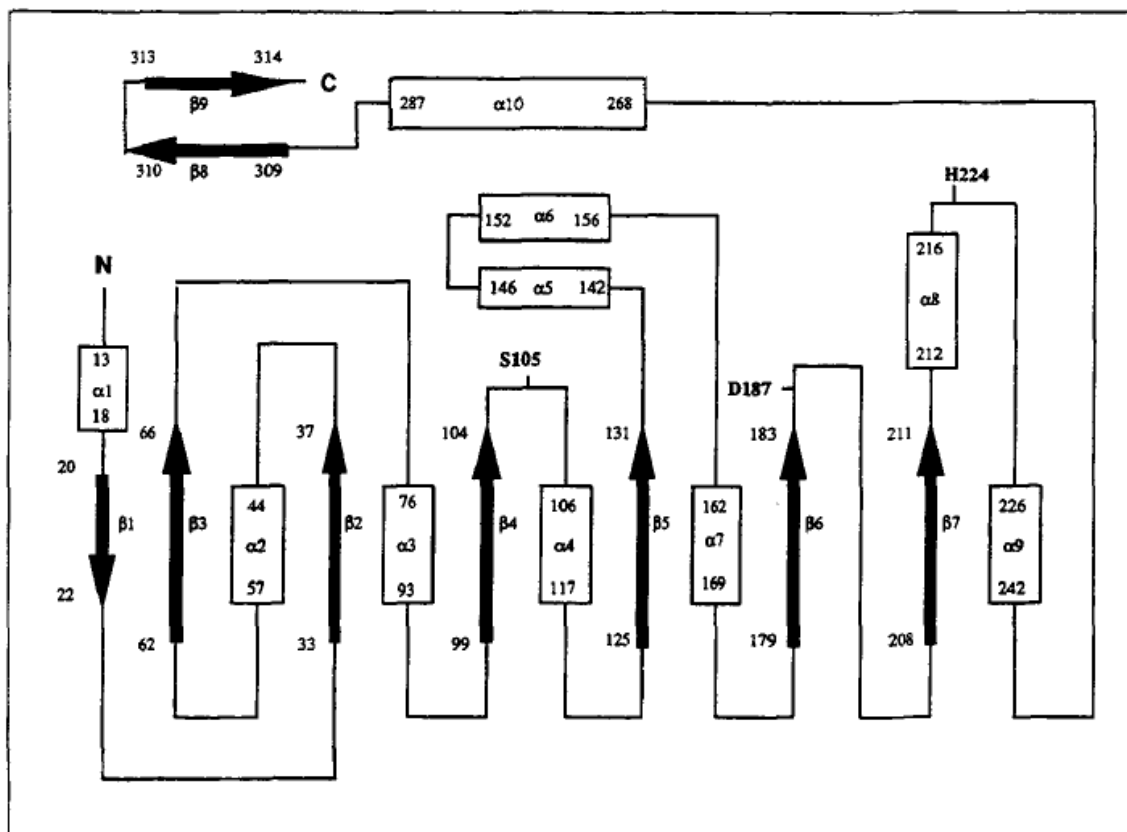


Figura 15. Estructura secundaria de CALB (extraída de Uppenberg *et al*, 1994).

La serina de la tríada catalítica se encuentra entre el extremo carboxi-terminal de la lámina β_4 y la próxima hélice α_4 . Debido a que la secuencia consenso alrededor de Ser105 no se encuentra en CALB, la orientación relativa de la lámina β y la hélice α en este sitio es diferente con respecto a otras lipasas, por lo tanto se podría decir que la sustitución de Gly por Thr causa el movimiento de la hélice α .

La histidina del sitio activo, His224, se encuentra al principio de la hélice α_9 , de forma que las cadenas laterales se orientan hacia el sitio activo. El ácido aspártico del sitio activo, Asp187, se ubica en un giro luego de la sexta lámina β . Los átomos de oxígeno forman puentes de hidrógeno con las cadenas principal y lateral así como con moléculas de agua.

CALB posee un hueco oxianiónico que mediante puentes de hidrógeno estabiliza los estados de transición y el oxianión formado en la reacción. Este hueco es una disposición espacial de tres dadores de puentes de hidrógeno, dos del grupo amida de Thr40 y Gln106 y uno de la cadena lateral de Thr40.

Se ha intentado racionalizar la preferencia enantiomérica de las lipasas basándose en los requerimientos estéricos de los sustituyentes según las denominadas “reglas de Kazlauskas”, las cuales se resumen en la Figura 16. 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 (José, 2013).

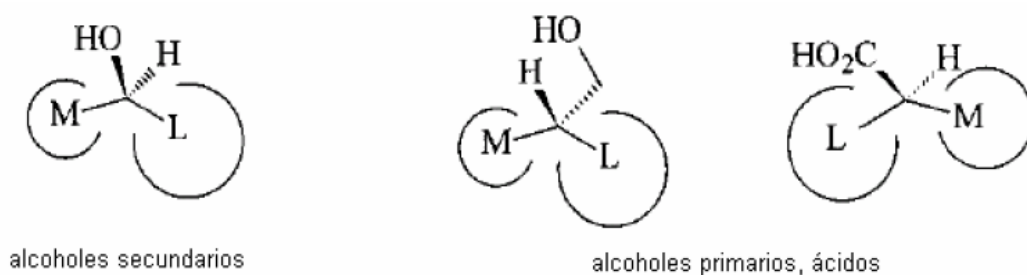


Figura 16. Reglas de Kazlauskas. M: sustituyente de tamaño medio, L: sustituyente de tamaño grande (extraída de José, 2013).

La enantioselectividad de CALB hacia los alcoholes secundarios está determinada por requerimientos estéricos. En la estructura cristalina de la enzima se determinaron dos bolsillos que los sustratos pueden ocupar (Figura 17). El bolsillo de tamaño mediano no permite un grupo mayor al etilo, mientras que la restricción de tamaño en el bolsillo grande casi es ilimitada. Esto implicaría que para enantiómeros con un grupo mayor al etilo, solo uno de los dos enantiómeros podría encajar en el sitio activo, lo cual otorga la enantioselectividad característica de CALB (Uppenberg *et al*, 1994).

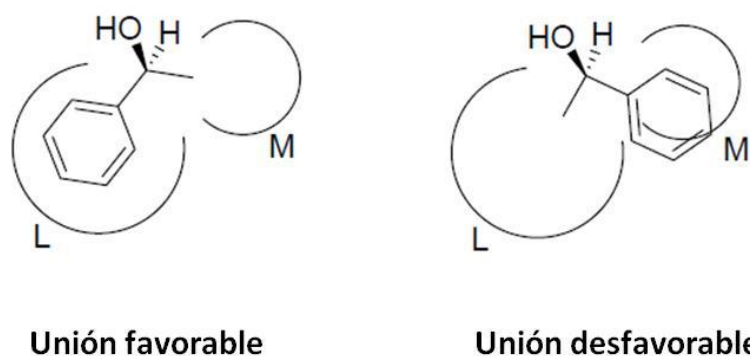


Figura 17. Esquema del sitio activo formado por los bolsillos mediano y grande.

CALB es una enzima excepcionalmente robusta que se desactiva a 50-60 °C (soporta temperaturas mayores cuando se encuentra inmovilizada). CALB es considerada una especie intermedia entre esterasa y lipasa típica, ya que no muestra un efecto pronunciado de activación interfacial. Por lo anterior, es posible que CALB no posea el polipéptido tapadera que regula el acceso al sitio activo, si no que su 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 tapadera debido a su posición y a cierta transición orden/desorden observada en esta zona al analizar mediante rayos X los cristales de CALB en diferentes entornos cristalinos (Uppenberg *et al*, 1994).

1.4.5. Inmovilización de enzimas

Como se menciona previamente en la Sección 1.4.1., una de las estrategias para mejorar la estabilidad y posibilidad de re-uso de las enzimas es la inmovilización de las mismas. Esta técnica presenta otras ventajas como el aumento de la actividad en solventes orgánicos y de la enantioselectividad. La inmovilización es un proceso en el que se confina o localiza 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 (Arroyo, 1998).

Otra ventaja que presenta la inmovilización es la posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Los diferentes tipos de reactores enzimáticos se presentan en la Figura 18. Estos reactores con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Además, pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza (Arroyo, 1998).

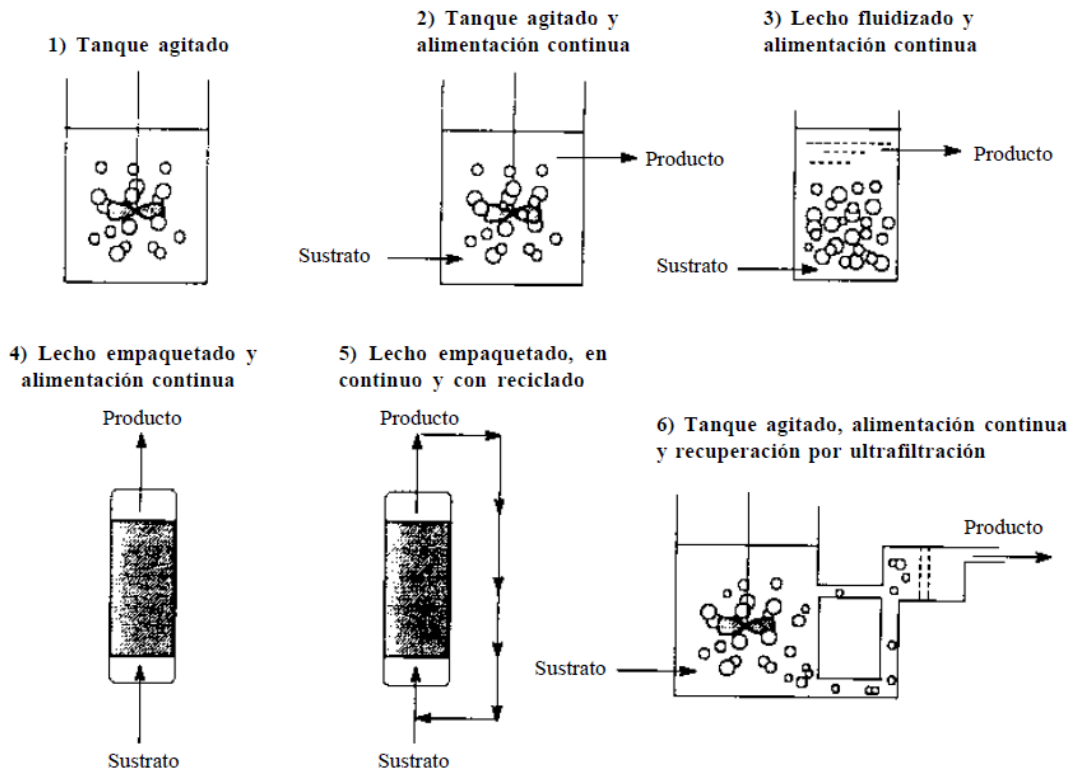


Figura 18. Reactores enzimáticos que emplean enzimas inmovilizadas.

En función de los flujos de entrada, los reactores pueden operar a través de tres modos distintos: lote (o batch), continuo o lote alimentado (fed-batch). En los reactores batch, se coloca dentro del biorreactor la carga total de cada proceso y se deja llevar a cabo la reacción el tiempo que sea necesario, luego la enzima se recupera para ser usada en procesos batch posteriores hasta que el biocatalizador es inactivado por los sucesivos reusos y debe ser reemplazado. El modo de operación continua supone un flujo de alimentación y salida uniformes y es exclusivo de enzimas inmovilizadas ya que deben ser lo suficientemente estables para justificar una operación continua. Por último, el lote alimentado tiene un flujo de alimentación pero sin remoción del medio existente (Illanes, 2008).

En general, los métodos de inmovilización se dividen en dos grupos: a) retención química: involucran la interacción de la enzima con una matriz mediante un enlace químico y b) retención física: la enzima se encuentra atrapada en un espacio

restringido. Cada uno de estos grupos incluye varios métodos de inmovilización (Illanes, 2008; Arroyo, 1998):

a) Retención química:

- Unión a soportes: es el método más utilizado. La elección del soporte y tipo de enlace son determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. 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. Existe una amplia variedad de soportes empleados para este fin. Estos difieren en tamaño, porosidad, densidad, forma, y pueden ser inorgánicos (naturales o manufacturados) u orgánicos (polímeros naturales (polisacáridos o proteínas fibrosas) o polímeros sintéticos (poliolefinas, polímeros acrílicos, otros)). La unión de las enzimas se lleva a cabo por adsorción (interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno y/o interacciones hidrofóbicas) o unión covalente (basada en la interacción de grupos químicos del soporte con nucleófilos de las proteínas).
- Reticulado: también se lo denomina entrecruzamiento o *cross-linking*. Consiste en el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima lo que las hace capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. Actualmente el método más novedoso consiste en la cristalización de la enzima y posterior reticulado con glutaraldehído (Cross-linked Enzyme Crystal o CLECs).

b) Retención física: puede ser por atrapamiento o por inclusión en membranas. La primera 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. La inclusión en membranas puede hacerse mediante microcápsulas

(las enzimas son encerradas en una membrana semipermeable, que permiten el paso de sustrato y producto pero no de enzima) o reactores de membrana (permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial e impermeables a la enzima; el sustrato atraviesa el reactor impulsado por una bomba).

En este trabajo de tesis se lleva a cabo una reacción de esterificación en condiciones de operación batch catalizada por la enzima lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada físicamente en una resina macroporosa que constituye el biocatalizador comercial Novozym® 435. El mismo se describe a continuación.

1.4.5.1. Novozym® 435: Composición y estructura

Novozym® 435 es un biocatalizador obtenido comercialmente en el cual la enzima lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) se encuentra adsorbida físicamente sobre una resina acrílica macroporosa conocidas como Lewatit VP OC 1600, el cual consiste en polimetilmetacrilato (PMMA) entrecruzado con divinilbenceno y se esquematiza en la Figura 19 (José *et al*, 2011).

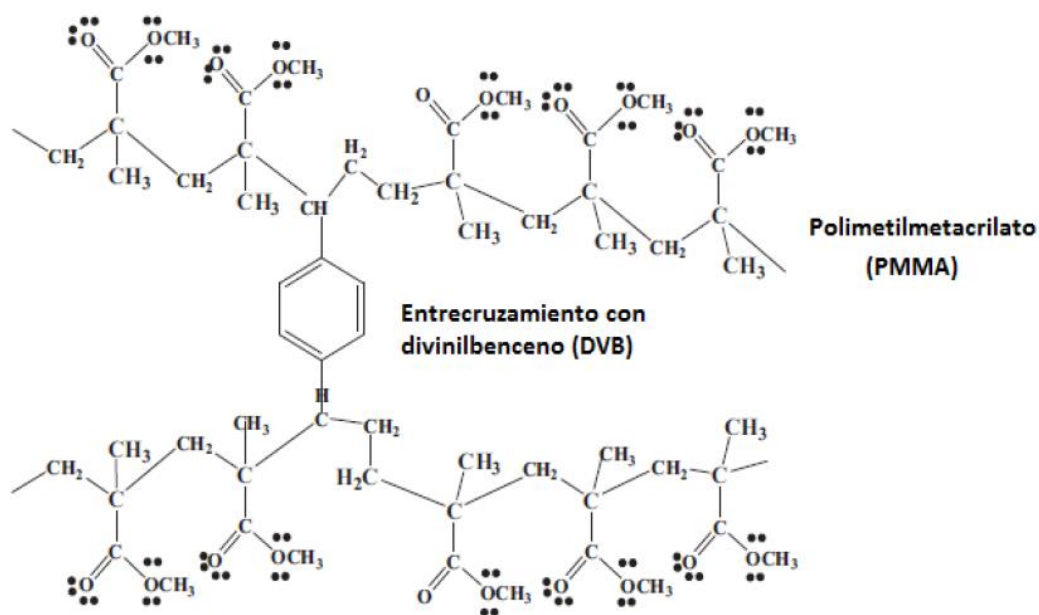


Figura 19. Estructura molecular de polimetilmetacrilato (PMMA) entrecruzado con divinilbenceno (DVB) (extraído de José *et al*, 2011).

La inmovilización se llevó a cabo mediante un protocolo desconocido, pero el hecho de que la enzima ha sido desorbida del soporte al ser incubada con detergentes y solventes orgánicos, sugiere que la interacción es de tipo hidrofóbica (Cabrera *et al*, 2009). Algunas propiedades de Novozym® 435 son muy diferentes a las de la enzima CALB inmovilizada en otros tipos de soportes hidrofóbicos en los que sólo había residuos hidrofóbicos en su superficie.

En la Figura 20 se muestran imágenes obtenidas con microscopio electrónico de barrido (SEM) de la lipasa B de *Candida antarctica* (99% Sigma Aldrich) y de una esfera del biocatalizador comercial Novozym® 435 (José, 2013). Nótese la diferencia en la magnificación en la toma de la imagen. Esta es de 10000 X y 200 X para la enzima CALB y Novozym® 435, respectivamente.

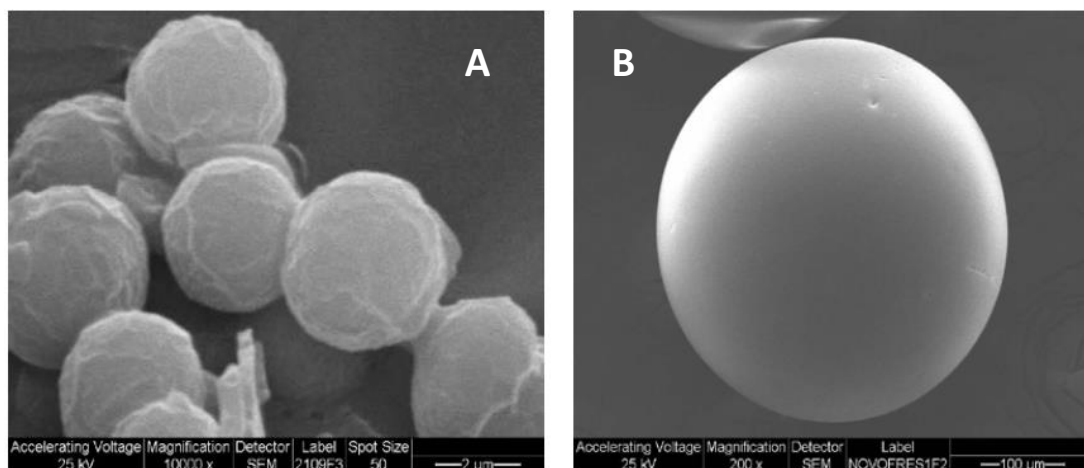


Figura 20. Imágenes obtenidas en SEM de CALB (A) y Novozym® 435 (B) (extraídas de José, 2013).

Las partículas de Novozym® 435 son esferas que poseen un tamaño de 0,30-1,00 mm, densidad aparente de 0,65-0,80 g ml⁻¹, superficie de 130 m² g⁻¹ (determinada por el método BET) y alta estabilidad térmica (de -20 a 100 °C) (Zhao & Song, 2010). Este catalizador posee una actividad catalítica de 10000 PLU/g (PLU corresponde a “Propil Laurate Units”). Tiene un contenido máximo de agua de 3% p/p y es muy tolerante a la temperatura con una actividad máxima entre los 70 y 80 °C, aunque para su productividad óptima se recomienda su uso entre los 40 y 60 °C (Pérez-Victoria Moreno de Barreda, 2006).

La distribución de la enzima CALB inmovilizada en Novozym® 435 fue determinada por Mei *et al.* Los autores llevaron a cabo estudios de microespectroscopia infrarroja (SIRMS) y determinaron que la proteína se encuentra localizada en una capa externa de la esfera de 80-100 µm de espesor y que la misma se distribuye de forma no homogénea en la esfera de Novozym® 435 (Figura 21) (Mei *et al.*, 2003).

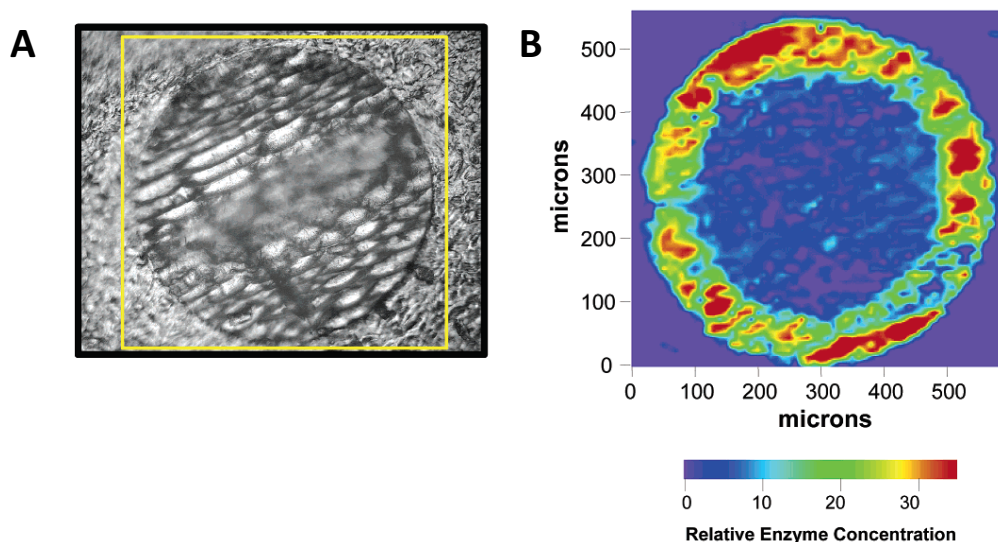


Figura 21. (A) Micrografía de una partícula de Novozym® 435 embebida en parafina y seccionada transversalmente con un espesor de 12 μm . El cuadrado amarillo indica la sección que luego se muestra como una imagen de microscopía IR. (B) Imagen obtenida por microscopía IR de la distribución de enzima en un corte transversal de la sección central de la esfera de Novozym® 435 (extraído de Mei *et al*, 2003).

Además, mediante la microscopía electrónica de barrido se estableció el tamaño del poro de Novozym® 435 el cual es de aproximadamente 100 nm, más de 10 veces mayor que el tamaño de la molécula de CALB, por lo tanto no hay barrera física que prevenga la difusión de la enzima en el centro de la esfera.

1.4.5.1.2. Aplicaciones

Novozym® 435 es una de las lipasas comerciales más ampliamente utilizadas en distintos procesos industriales durante los últimos 20 años para la síntesis de esteres sencillos, amidas, alcoholes, aminas y ácidos carboxílicos ópticamente puros (José, 2013). Este biocatalizador ha sido aplicado en una gran variedad de procesos involucrando diferentes reacciones. Su aplicación en la resolución cinética de AINEs será detallada en la Sección 1.4.7 específicamente para la obtención de S(+)-ketoprofeno. Entre otras de las aplicaciones de este biocatalizador se puede

mencionar la producción de biodiesel en los últimos años, en los cuales Novozym® 435 cataliza reacciones de metanólisis, etanólisis y transesterificación (Tan *et al*, 2010; Fjerbaek *et al*, 2009; Lai *et al*, 2005). Además mediante reacciones de alcoholisis, se han sintetizado esteres alifáticos, aromáticos y terpenos (Gryglewicz *et al*, 2000). En el campo de la industria farmacéutica, Novozym® 435 ha sido aplicado en la síntesis de ácido R(-) mandélico (precursor de penicilinas y cefalosporinas) mediante reacciones de hidrólisis (Yadav *et al*, 2008), así como en la síntesis de derivados de drogas y preparación de esteres de ibuprofeno como prodrogas mediante reacciones de acilación y esterificación (Liu *et al*, 2008; Zhao *et al*, 2005; Ducret *et al*, 1998). Adicionalmente a través de reacciones de acilación se han obtenido antivirales anti-hepatitis C y antileucémicos (Patel, 2008). Por otro lado, se han obtenidos derivados de vitaminas mediante acetilación (Torres *et al*, 2008) y esterificación (Maugard *et al*, 2000), y se han sintetizado alcanolamidas por transesterificación (Abe *et al*, 2008) y condensación (Tufvesson *et al*, 2007) y n-butilacetamida por reacción de amidación (Yadav & Borkar, 2009). Así mismo se ha utilizado en la resolución cinética dinámica (DKR) para la síntesis de aminas primarias, alcoholes secundarios, azido alcoholes e hidroxinitrilos (Patel, 2008; Pámies & Bäckvall, 2005; Paetzold & Bäckvall, 2005). Por último, este biocatalizador ha sido empleado para catalizar reacciones de polimerización (en la síntesis de poliésteres), de benzoilación (en la síntesis del antitumoral 5'-o-benzoil-5-fluorouridina), de amoniólisis de ésteres (en la síntesis del inhibidor de la dipeptidil-peptidasa IV) y de N-acilación (para obtener N-araquidonil-glicina) (José, 2013).

1.4.6. Mecanismo de la resolución de ácidos 2-arilpropiónicos empleando enzimas

El mecanismo de resolución cinética de los ácidos 2-arilpropiónicos catalizado por lipasas ha sido descrito como un mecanismo Ping Pong Bi Bi (Foresti *et al*, 2009; Duan *et al*, 1997). En este tipo de mecanismo se liberan uno o más productos antes de que reaccionen todos los sustratos (Figura 22).

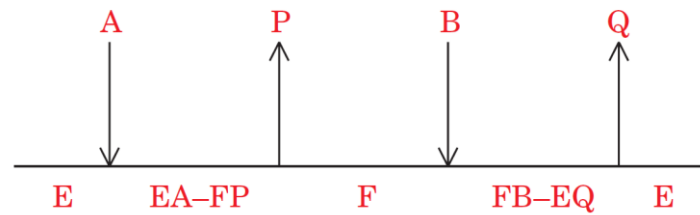


Figura 22. Mecanismo Ping Pong Bi Bi de acuerdo a la simbología Cleeland (extraído de Voet & Voet, 2011).

En este mecanismo, el primer sustrato **A** ingresa al sitio activo de la enzima y forma el primer intermediario tetraédrico, luego un grupo funcional X del primer sustrato **A** es desplazado del sustrato por acción de la enzima **E** para obtener el primer producto **P** y una forma estable de la enzima **F** en la cual X está fuertemente unido (a menudo de forma covalente) a la enzima, formando un complejo acil-enzima (Ping). En la segunda etapa de la reacción, el segundo sustrato **B** ingresa al sitio activo y se forma el segundo intermediario tetraédrico, para que luego X sea desplazado de la enzima por el segundo sustrato **B** para lograr el segundo producto **Q**, regenerándose la enzima **E** (Pong). Estas reacciones también son conocidas como reacciones de doble desplazamiento (Voet & Voet, 2011).

La reacción de hidrólisis sucede mediante un mecanismo representado en la Figura 23 (Arroyo Sánchez, 1995):

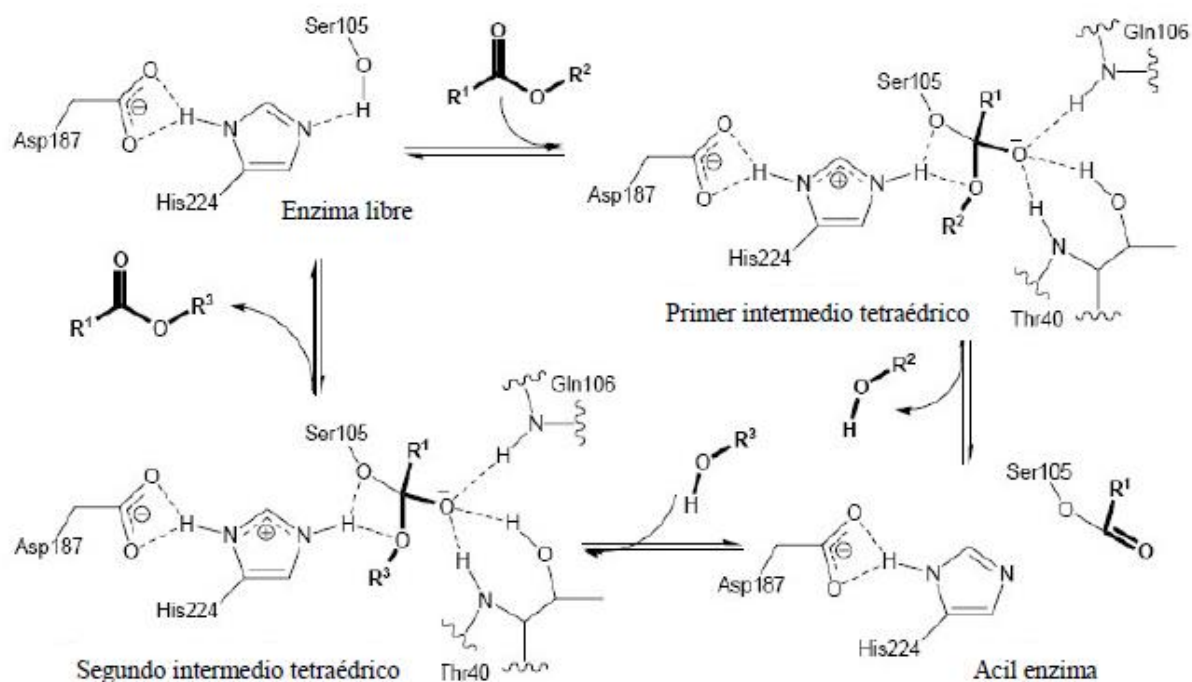


Figura 23. Mecanismo de reacción de CALB.

El sustrato se sitúa en el centro activo de la lipasa de tal manera que el carbono carbonílico se encuentra cercano al grupo $-OH$ de la Ser105 y es coordinado por el hueco oxianiónico formado por Thr40 y Gln106. El protón del grupo hidroxilo de la serina se transfiere al Nε de la His224 de la triada catalítica y el Oγ con carga negativa de Ser105 ataca nucleofílicamente al grupo carbonilo del sustrato, originando un oxianión, el cual es estabilizado por el hueco oxianiónico. De esta manera se produce un primer intermediario tetraédrico (Td1). Seguidamente se forma un complejo acil-enzima cuando el protón cedido a la His224 se transfiere al átomo de oxígeno para liberar un alcohol del intermediario (o agua si R_2 corresponde a un átomo de H).

Se produce un segundo ataque nucleofílico (agua o alcohol según sea una reacción de hidrólisis o esterificación, respectivamente) sobre el carbono carbonílico del complejo acil-enzima. Se forma un nuevo intermediario tetraédrico (Td2) que, a continuación se rompe, el producto es liberado y el $-OH$ de la Ser105 es regenerado.

La función del ácido aspártico¹⁸⁷, presente en la triada catalítica, es la estabilización de la carga positiva generada sobre la histidina en los intermedios tetraédricos.

1.4.7. Antecedentes en la resolución cinética de R/S-ketoprofeno

En la Tabla 3 se detallan los resultados reportados en los últimos 20 años con respecto a la resolución cinética de R/S-ketoprofeno. Se presentan las distintas condiciones de reacción empleadas (biocatalizador, sustratos (relación molar), temperatura, agitación, entre otras), agregado de co-solventes, conversión y exceso enantiomérico de la resolución de R/S-ketoprofeno. Se ha reportado la producción de S(+)-ketoprofeno ópticamente puro mediante reacciones de esterificación del ácido racémico y de hidrólisis de esteres racémicos de ketoprofeno catalizadas por distintas lipasas inmovilizadas o no. En las reacciones de esterificación, Novozym® 435 ha sido el biocatalizador más ampliamente usado. La esterificación enantiomérica de ketoprofeno racémico con alcoholes como metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol y dodecanol se llevó a cabo con varios co-solventes orgánicos (1,2 diisopropil éter, CCl₄, isooctano, hexano, diisopropil éter, dicloruro de metileno, isubutil metil cetona, acetonitrilo, etc.). La investigación llevada a cabo por Park *et al* es probablemente la más completa. Los autores evidenciaron que los alcoholes de cadena corta aumentan la conversión y exceso enantiomérico en 9 h de reacción en presencia de una mezcla de dicloruro de etileno y n-hexano 20% (v/v) como co-solvente. En particular, empleando etanol como aceptor de acilo y solvente obtuvieron un 6% de conversión con un 2% de exceso enantiomérico hacia el enantiómero S(+) a 37 °C a las 75 h de reacción (Park *et al*, 1999). Una investigación más reciente llevada a cabo por De Crescenzo *et al* (2000) informó que no se observaba reacción entre 1-dodecanol y ketoprofeno en un medio libre de solvente. Sin embargo, estos autores produjeron propil ketoprofenato por esterificación directa con 1-propanol durante 4 días con el único objetivo de obtener el éster con fines de calibración. Los autores determinaron

una velocidad de reacción mayor cuando se empleó 1-propanol ($900 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de enzima) en lugar de 1-dodecanol ($200 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de enzima) con xileno como solvente. Además, la velocidad de reacción fue menor ($48 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de enzima) cuando se empleó sólo 1-propanol. Luego en el año 2002, D'Antona *et al* desarrollaron un método de resolución cinética en escala "multigram" empleando Novozym® 435 en dicloropropanol y en 2005, Zhu *et al* propusieron un método de resolución cinética de enantiómeros de ketoprofeno en dos etapas (D'Antona *et al*, 2002; Zhu *et al*, 2005). Más recientemente, en 2006, Wu *et al* investigaron la separación de los enantiómeros de ketoprofeno por esterificación enzimática seguida de la hidrólisis enzimática del éster producido (Wu *et al*, 2006).

Tabla 3. Antecedentes del uso de lipasas en la obtención de S(+)-ketoprofeno.

Reacción	Condiciones de reacción	Co-solvente	Conversión (X%) y exceso enantiomérico (ee %)	Referencia
Esterificación	Biocatalizador: SP435A (lipasa B de <i>Candida antarctica</i> , actualmente Novozym® 435). Sustratos: R/S-ketoprofeno y 1-propanol. Relación molar: 1:1. 50 °C, 300 rpm, 3 h. Enantioselectividad: (R)-ketoprofeno	Isobutil metil cetona	X %= 55.6, E = 2.6	Arroyo & Sinisterra, 1994
Hidrólisis	Biocatalizador: lipasa de <i>Candida rugosa</i> comercial (CRL) y CRL en forma de cristal de enzima entrecruzado (CRL-CLECs). Sustrato: cloroetil ester de R/S-ketoprofeno y buffer de acetato de sodio 0.1 M pH 5. 40 °C, 200 rpm, 40 h Enantioselectividad: (S)-ketoprofeno	no	CRL: ee % R-keto= 54.7, ee % S-keto= 33.3, X %= 36.7, E _{app} = 5.2 CRL-CLECs: ee % R-keto= 88.6, ee % S-keto= 91.1, X %= 49.3, E _{app} = 64	Lalonde <i>et al</i> , 1995
Esterificación	Biocatalizador: Novozym® 435 (lipasa B de <i>Candida antarctica</i> , CALB) Sustratos: R/S-ketoprofeno y 1-propanol. Relación molar: 1:1 40 °C, 210 rpm. Enantioselectividad: (R)-ketoprofeno	Dipropileter	V _{max} (mmol/h. g of lipase): R-ketoprofeno= 2096, S-ketoprofeno= 754	Duan <i>et al</i> , 1997
Esterificación	Biocatalizador: Lipozyme® IM (lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>) Sustratos: R/S-ketoprofeno y 1-butanol. Relación molar: 1:1 37 °C, agitación, 72 h. Enantioselectividad: (R)-ketoprofeno	diisopropileter	X %= 20, ee % S-keto= 9.5, EF= 0.38, E= 2.4	López-Belmonte <i>et al</i> , 1997
Hidrólisis	Biocatalizador: lipasa OF (de <i>Candida rugosa</i>) Sustratos: 2-cloroetil ester de R/S-ketoprofeno y buffer citrato 0.1 M/Na ₂ HPO ₄ 0.2 M 30 °C, 160 rpm Enantioselectividad: (S)-ketoprofeno	no	pH 4.0: E= 1.2, A= 172 pH 2.2: E= 13.6, A= 202	Liu <i>et al</i> , 1999

Reacción	Condiciones de reacción	Co-solvente	Conversión (X%) y exceso enantiomérico (ee%)	Referencia
Esterificación	<p>Biocatalizadores: Lipozyme® IM, Lipozyme® 10000L y Lipasa MAP-10 (<i>Mucor miehei</i>), Novozym® 435, lipasa CRL (<i>Candida rugosa</i>) y Lipasa M (<i>Mucor javanicus</i>)</p> <p>Sustratos: R/S-ketoprofeno y etanol. Relación molar: 1:4. 37 °C, 250 rpm</p>	tetracloruro de carbono	<p>Lipozyme® IM: X %= 52 (76 h), ee S-keto % = 53, E = 5</p> <p>Novozym® 435: X %= 76 (76 h), ee S-keto % = 97, E = 7</p> <p>Lipozyme® 10000L: X %= 82 (76 h), ee S-keto % = 65, E = 2</p> <p>Lipasa MAP-10: X %= 22 (144 h), ee S-keto % = 20, E = 7</p> <p>Lipasa CRL: X %= 1 (144 h), ee R-keto % = 0, E = 1</p> <p>Lipasa M: X %= 23 (144 h), ee R-keto % = 20, E = 71</p>	
	<p>Biocatalizador: Novozym® 435</p> <p>Sustratos: R/S-ketoprofeno y etanol. Relación molar: 1:4 37 °C, 250 rpm, 75 h (31 h de reacción con n-hexano como cosolvente)</p> <p>Enantioselectividad: (R)-ketoprofeno</p>	varios solventes	<p>Diisopropil eter: X % = 43, ee % = 17, E = 2</p> <p>Dicloruro de metileno: X % = 4, ee % = 3, E = 7</p> <p>Isobutil metil cetona: % = 19, ee % = 17, E = 6</p> <p>Dicloruro de etileno: X % = 31, ee % = 37, E = 15</p> <p>Tetracloruro de carbono: X % = 76, ee % = 97, E = 7</p> <p>1,4-dioxano: X % = 3, ee % = 2, E = 3</p> <p>Acetonitrilo: X % = 7, ee % = 5, E = 4</p> <p>Etanol: X % = 6, ee % = 2, E = 2</p> <p>Tolueno: X % = 67, ee % = 84, E = 6</p> <p>n-hexano: X % = 89, ee % = 81, E = 2</p>	Park <i>et al</i> , 1999
	<p>Biocatalizador: Novozym® 435.</p> <p>Sustratos: R/S-ketoprofeno y varios alcoholes (metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-hexanol, octanol. Relación molar: 1:4. 37 °C, 250 rpm.</p> <p>Enantioselectividad: (R)-ketoprofeno</p>	Dicloruro de etileno: n-hexano	<p>Metanol: X % = 59 (9 h), ee % = 75, E = 6</p> <p>Etanol: X % = 46 (9 h), ee % = 58, E = 10</p> <p>1-propanol: X % = 38 (9 h), ee % = 48, E = 9</p> <p>1-butanol: X % = 29 (18 h), ee % = 31, E = 10</p> <p>1-hexanol: X % = 35 (18 h), ee % = 33, E = 6</p> <p>Octanol: X % = 25 (18 h), ee o % = 23, E = 8</p>	

Reacción	Condiciones de reacción	Co-solvente	Conversión (X%) y exceso enantiomérico	Referencia
Esterificación	<p>Biocatalizador: Novozym® 435</p> <p>Sustratos: R/S-ketoprofeno y 1-propanol. Relación molar: 1:4</p> <p>30 h.</p> <p>Enantioselectividad: (R)-ketoprofeno</p>	Ciclohexano	X% = 68, ee S-keto % = 92	Du <i>et al</i> , 2000
Esterificación	<p>Biocatalizador: Novozym® 435 y Lipozyme® IM20 (<i>Mucor miehei</i>)</p> <p>Sustratos: R/S-ketoprofeno y 1-dodecanol con relación molar de 1:1 (sin y con distintos solventes) y R/S-ketoprofeno y 1-propanol y 1-dodecanol con relación molar 1:1.5</p> <p>60 °C (con solvente) y 75 °C (sin solvente), bajo presión reducida para la remoción continua de agua.</p> <p>Enantioselectividad: (R)-ketoprofeno</p>	Sin solvente; co-solventes con log P de 1.36 a 3.5; xileno	<p>- No hay reacción en un medio libre de solvente con 1-dodecanol</p> <p>- La velocidad inicial aumenta con log P</p> <p>- Xileno:</p> <p>1-propanol: 900 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de enzima</p> <p>1-dodecanol: 200 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de enzima</p>	De Crescenzo <i>et al</i> , 2000
Hidrólisis	<p>Biocatalizador: lipasa OF (de <i>Candida rugosa</i>) y CRL tratada con acetona en dos etapas</p> <p>Sustratos: etil ester de R/S-ketoprofeno y buffer MES 50 mM pH 6.0</p> <p>24 h</p> <p>Enantioselectividad: (S)-ketoprofeno</p>	No	<p>Lipasa OF: X% = 11.6, ee S-keto % = 36, E = 2.2</p> <p>Lipasa tratada con acetona en dos etapas: X% = 11.3, ee S-keto % = 100, E > 100</p>	Kim <i>et al</i> , 2000
Hidrólisis	<p>Biocatalizador: lipasa OF (de <i>Candida rugosa</i>)</p> <p>Sustratos: 2-cloroetil ester de R/S-ketoprofeno y buffer fosfato de sodio pH 7.0</p> <p>30 °C, 160 rpm, 10 h</p> <p>Enantioselectividad: (S)-ketoprofeno</p>	Tween-80	X % = 46, ee S-keto % = 60, E = 1.2	Liu <i>et al</i> , 2000

Reacción	Condiciones de reacción	Co-solvente	Conversión (X%) y exceso enantiomérico	Referencia
Hidrólisis	<p>Biocatalizador: lipasa M (de <i>Mucor javanicus</i>) y lipasa M inmovilizada en Hyflo Super-Cel y Toyonite 200-M y 200-A</p> <p>Sustratos: monocloroetil ester/trifluoretil ester de R/S-ketoprofeno y buffer fosfato 0.1 M pH 7.0</p> <p>30 °C, 120 rpm, 3 h (excepto lipasa inmovilizada en Toyonite 200-M, 0.5 h)</p> <p>Enantiopreferencia: (R)-ketoprofeno</p>	<p>Sin co-solvente, tert-butil metil eter, tert-butil alcohol, metanol, acetonitrilo, DMSO, DMF, acetona</p>	<p>Lipasa M:</p> <p>Monocloroetil ester de R/S-ketoprofeno:</p> <p>Sin co-solvente: X % = 32, ee R-keto % = 40, E = 3</p> <p>Tert-butil metil eter: X % = 18, ee R-keto % = 62, E = 5</p> <p>Tert-butil alcohol: X % = 23, ee R-keto % = 49, E = 3</p> <p>Metanol: X % = 38, ee R-keto % = 82, E = 17</p> <p>Acetonitrilo: X % < 5</p> <p>DMSO: X % = 50, ee R-keto % = 54, E = 6</p> <p>DMF: X % = 44, ee R-keto % = 86, E = 27</p> <p>Acetona: X % = 31, ee R-keto % = 93, E = 41</p> <p>Trifluoretil ester de R/S_ketoprofeno:</p> <p>Acetona: X % = 32, ee R-keto % = 94, E = 50</p> <p>Lipasa inmovilizada:</p> <p>Trifluoretil ester de R/S_ketoprofeno:</p> <p>Toyonite 200-M: X % = 66, ee R-keto % = 46, E = 8</p> <p>Toyonite 200-A: X % = 53, ee R-keto % = 86, E = 55</p> <p>Hyflo Super-Cel: X % = 43, ee R-keto % = 91, E = 44</p>	Kato et al, 2000
Esterificación	<p>Biocatalizador: Novozym® 435</p> <p>Sustratos: R/S-ketoprofeno y etanol</p> <p>45 °C, 300 rpm, 5 días.</p> <p>Enantiopreferencia: (R)-ketoprofeno</p>	dicloropropano	E = 12, ee S-keto % = 90	D'Antona et al, 2002
Hidrólisis	<p>Biocatalizador: Novozym® 435</p> <p>Sustratos: propil ester de R/S-ketoprofeno y agua</p> <p>50 °C, 10 h</p> <p>Enantiopreferencia: (R)-ketoprofeno</p>	no	X % = 56, E = 8	Jin et al, 2003

Reacción	Condiciones de reacción	Co-solvente	Conversión (X%) y exceso enantiomérico	Referencia
Esterificación	Biocatalizador: lipasa comercial de <i>Candida rugosa</i> Sustratos: R/S-ketoprofeno y 1-propanol. Relación molar: 1:4 30 °C, agitación magnética, 500 h. Enantioselectividad: (S)-ketoprofeno	Isooctano	X % = 17, ee R-keto % = 79	Alcántara et al, 2004
Hidrólisis	Biocatalizador: lipasa de <i>Candida rugosa</i> Sustratos: etil ester de R/S-ketoprofeno, buffer fosfato/NaCl 50 mM pH 7 y ciclodextrinas HP- β -CD 37 °C, 200 rpm, 5 días Enantioselectividad: (S)-ketoprofeno	no	X % = 49, ee S-keto % = 99	Kim et al, 2004
Hidrólisis	Biocatalizador: lipasa de <i>Acinetobacter</i> sp ES-1 Sustratos: etil ester de R/S-ketoprofeno disuelto en etanol y buffer Tris/HCl 40 mM pH 7 30 °C, 200 rpm, 48 h Enantioselectividad: (S)-ketoprofeno	Triton X-100	X % = 35, ee S-keto % = 96	Lee et al, 2004
Hidrólisis	Biocatalizador: lipasa OF (de <i>Candida rugosa</i>) libre e inmovilizada en SP-Sephadex C-50 Sustratos: 2-cloroetil ester de R/S-ketoprofeno disuelto en etanol y buffer citrato 7 mM/ Na ₂ HPO ₄ 15 mM pH 3.5 30 °C, 160 rpm, 10 h (con Tween-80) y 72 h (sin co-solvente) Enantioselectividad: (S)-ketoprofeno	Sin co-solvente y Tween-80	Sin co-solvente: Lipasa OF libre: X % = 11.4, ee S-keto % = 17.1, E = 1.4 Lipasa OF inmovilizada: X % = 8.7, ee S-keto % = 70.1, E = 6.1 Con Tween-80: Lipasa OF libre: X % = 32.2, ee S-keto % = 80.2, E = 13 Lipasa OF inmovilizada: X % = 22.3, ee S-keto % = 94.9, E = 50	Liu et al, 2004 (a)

Reacción	Condiciones de reacción	Co-solvente	Conversión (X%) y exceso enantiomérico	Referencia
Hidrólisis	<p>Biocatalizador: lipasa mutante extraída de <i>T. laibacchii</i> CBS 5791</p> <p>Sustratos: etil ester de R/S-ketoprofeno</p> <p>23 °C, 150 rpm, 72 h</p> <p>Enantiopreferencia: (S)-ketoprofeno</p>	Tween-80	X% = 47, ee S-keto % = 94, E = 82.55	Liu et al, 2004 (b)
Esterificación	<p>Biocatalizador: lipasa de <i>Candida rugosa</i>, lipasa MY (<i>Candida rugosa</i>), lipasa PS (<i>Burkholderia cepacia</i>), lipasa AK (<i>Pseudomonas fluorescens</i>) y lipasa A (<i>Aspergillus niger</i>)</p> <p>Sustratos: R/S-ketoprofeno y 1,4-butanediol.</p> <p>Relación molar: 1:25.</p> <p>37 °C, 24 h</p> <p>Lipasa de <i>Candida rugosa</i>, lipasa MY y lipasa AK: Enantiopreferencia: (S)-ketoprofeno.</p> <p>Lipasa PS y lipasa A: Enantiopreferencia: (R)-ketoprofeno.</p>	Isooctano	<p>Lipasa de <i>Candida rugosa</i>: X % = 46.15, ee R-keto % = 70.3, lipasa MY: X % = 49.32, ee R-keto % = 73.2 y lipasa AK: X % = 3.54, ee R-keto % = 16.4</p> <p>Lipasa PS: X % = 1.02, ee S-keto % = 66.6 y lipasa A: X % = 9.13, ee S-keto % = 87.3</p>	Chang & Hsu, 2005
Esterificación	<p>Biocatalizador: Novozym® 435</p> <p>Sustratos: R/S-ketoprofeno y etanol. Relación molar: 1:3</p> <p>45 °C, 160 rpm. Enantiopreferencia: (R)-ketoprofeno</p>	Dicloropropano	E = 10.5	Zhu et al, 2005 (a)

Reacción	Condiciones de reacción	Co-solvente	Conversión (X%) y exceso enantiomérico	Referencia
Hidrólisis	<p>Biocatalizadores: Lipasa OF (de <i>Candida rugosa</i>) libre e inmovilizada en 5 soportes terpolímeros de ácido metacrílico (sensibles al pH)</p> <p>Sustratos: 2-cloroetil ester de R/S-ketoprofeno y buffer citrato 0.1 M/Na₂HPO₄ 0.2 M</p> <p>30 °C, 160 rpm</p> <p>Enantioselectividad: (S)-ketoprofeno</p>	no	<p>Lipasa OF libre: Actividad relativa % = 1.0, E = 1.2</p> <p>Soporte 1: Actividad relativa % = 1.53, E = 10.5</p> <p>Soporte 2: Actividad relativa % = 1.55, E = 5.6</p> <p>Soporte 3: Actividad relativa % = 1.38, E = 3.9</p> <p>Soporte 4: Actividad relativa % = 1.42, E = 4.7</p> <p>Soporte 5: Actividad relativa % = 1.46, E = 5.5</p>	Zhu <i>et al</i> , 2005 (b)
Hidrólisis	<p>Biocatalizadores: Lipasa OF (de <i>Candida rugosa</i>) libre e inmovilizada en soportes inorgánicos porosos (silica gel y Toyonite 200-M), resinas de adsorción macroporosas (Amberlite XAD-7 y HZ 802) y una resina epóxica (HZ PGET)</p> <p>Sustratos: 2-cloroetil ester de R/S-ketoprofeno y buffer citrato 0.1 M/Na₂HPO₄ 0.2 M pH 2.5</p> <p>30 °C, 120 rpm</p> <p>Enantioselectividad: (S)-ketoprofeno</p>	Tween-80	<p>Lipasa OF libre: X % = 18.2, ee S-keto % = 95, E = 48</p> <p>Lipasa OF inmovilizada en</p> <p>Silica gel: X % = 33.4, ee S-keto % = 97.4, E = 125</p> <p>Toyonite 200-M: X % = 21.1, ee S-keto % = 96.8, E = 79</p> <p>HZ 802: X % = 11.2, ee S-keto % = 96.9, E = 153</p> <p>XAD-7: X % = 4.7, ee S-keto % = 98.6, E = 46</p> <p>HZ PGET: X % = 5.3, ee S-keto % = 95.5, E = 48</p>	Xi & Xu, 2005

Reacción	Condiciones de reacción	Co-solvente	Conversión (X%) y exceso enantiomérico	Referencia
Esterificación e hidrólisis	<p>Biocatalizador: CALB inmovilizada</p> <p>Esterificación:</p> <p>Sustratos: R/S-ketoprofeno y etanol. Relación molar: 5:1 45 °C, 180 rpm, 8 h.</p> <p>Hidrólisis:</p> <p>Sustratos: etil ester de ketoprofeno generado en la esterificación y buffer fosfato 0.1 M pH 7.0 45 °C, 180 rpm. Enantioselectividad: (R)-ketoprofeno</p>	<p>Esterificación:</p> <p>Isooctano: acetona (95:5 % v/v)</p>	<p>Esterificación: X% = 58.3 ee S-keto % = 83.0, formación de ester con 59.4 % de isómero R(-)</p> <p>Hidrólisis: X% = 50, ee R-keto % = 77 (1.5 h); X% = 30, ee R-keto % = 90 (0.5 h)</p>	Wu <i>et al</i> , 2006
Esterificación	<p>Biocatalizadores: lipasas de <i>Aspergillus niger</i>, <i>Aspergillus terreus</i>, <i>Fusarium oxysporum</i>, <i>Mucor javanicus</i>, <i>Penicillium solitum</i> y <i>Rhizopus javanicus</i>, Novozym® 435 y crudo de lipasa de <i>Candida rugosa</i> comercial</p> <p>Sustratos: R/S-ketoprofeno y 1-propanol. Relación molar: 1:1 35 °C, 180 rpm</p> <p>Enantioselectividad: (R)-ketoprofeno</p>	isooctano	<p>Lipasa con enantioselectividad hacia (R)-ketoprofeno:</p> <p><i>A. niger</i>: X % = 18.3 (212 hs), ee S-keto % = 8.9, E = 2.7</p> <p><i>A. terreus</i>: X % = 14.1 (212 hs), ee S-keto % = 3.3, E = 1.5</p> <p>Novozym® 435: X % = 62.0 (54 hs), ee S-keto % = 55.0, E = 3.3</p> <p>Lipasas con enantioselectividad hacia (S)-ketoprofeno</p> <p><i>F. oxysporum</i>: X % = 15.0 (212 hs), ee R-keto % = 4.0, E = 1.6</p> <p><i>M. javanicus</i>: X % = 12.2 (212 hs), ee R-keto % = 3.0, E = 1.5</p> <p><i>P. solitum</i>: X % = -</p> <p><i>R. javanicus</i>: X % = -</p> <p>Crudo de lipasa <i>C. rugosa</i> comercial: X % = 42.0 (54 hs), ee R-keto % = 41.3, E = 5.4</p>	Carvalho <i>et al</i> , 2006

Reacción	Condiciones de reacción	Co-solvente	Conversión (X%) y exceso enantiomérico	Referencia
Esterificación	<p>Biocatalizador: CALB libre</p> <p>Sustratos: R/S-ketoprofeno y 1-butanol. Relación molar: 1:1</p> <p>40 °C, 250 rpm, 24 h.</p> <p>Enantioselectividad: (R)-ketoprofeno</p>	Hexano: dicloropropano (80:20 % v/v)	X % = 81, ee S-keto % = 59.4	Ong <i>et al</i> , 2006
Hidrólisis	<p>Biocatalizador: lipasa de <i>Serratia marcescens</i></p> <p>Sustratos: metil ester, etil ester, 2-cloroetil ester, isopropil ester, butil ester y octil ester de R/S-ketoprofeno y agua</p> <p>30 °C, 1000 rpm, 24 h.</p> <p>Enantioselectividad: (S)-ketoprofeno</p>	DMSO	<p>metil ester: X% = 51.3, ee S-keto % = 69.1, E = 12</p> <p>etil ester: X% = 48.2, ee S-keto % = 91.6, E = 63</p> <p>2-cloroetil ester: X% = 41.0, ee S-keto % = 50.4, E = 4</p> <p>isopropil ester: X% = 31.1, ee S-keto % = 59.2, E = 5</p> <p>butil ester: X% = 42.4, ee S-keto % = 78.8, E = 15</p> <p>octil ester: X% = 47.9, ee S-keto % = 85.2, E = 30</p>	Long <i>et al</i> , 2007
Esterificación	<p>Biocatalizador: CALB libre e inmovilizada en un reactor de membrana enzimático (EMR)</p> <p>Sustratos: R/S-ketoprofeno y 1-butanol. Relación molar: 1:1</p> <p>40 °C, 250 rpm, 24 h</p> <p>Enantioselectividad: (R)-ketoprofeno</p>	hexano:1,2- dicloropropano (80:20, %v/v)	<p>CALB-EMR: E = 27, X% = 73, ee S-keto % = 57</p> <p>Free CALB: E = 10</p>	Ong <i>et al</i> , 2008
Esterificación	<p>Biocatalizador: Novozym® 435</p> <p>Sustratos: R/S-ketoprofeno y 1-butanol. Relación molar: 20:1</p> <p>60 °C, agitación, 24 h</p> <p>Enantioselectividad: (R)-ketoprofeno</p>	Líquidos iónicos (ILs)	ee S-keto % = 40, E = 5	Lozano <i>et al</i> , 2010

Reacción	Condiciones de reacción	Co-solvente	Conversión (X%) y exceso enantiomérico	Referencia
Hidrólisis	Biocatalizador: lipasa de <i>T. laibacchii</i> inmovilizada Sustratos: etil ester de R/S-ketoprofeno y buffer fosfato pH 7.5 45 °C, 33 h. Enantioselectividad: (S)-ketoprofeno	Tween-80	E = 87.4, ee S-keto % = 94.4	Zhang & Liu, 2011
Esterificación	Biocatalizador: lipasa de <i>Burkholderia cepacia G63</i> inmovilizada Sustratos: R/S-ketoprofeno y 1-octanol (1:100) 37 °C, 200 rpm, 24 h. Enantioselectividad: (R)-ketoprofeno	heptano	SA = 169.4, E = 1.42	Li <i>et al</i> , 2012

X%: conversión

ee S-keto % : exceso enantiomérico hacia S-ketoprofeno

ee R-keto % : exceso enantiomérico hacia R-ketoprofeno

E: relación enantiomérica

E_{app}: relación enantiomérica dependiente de la presencia de efector e inhibidores de producto

EF: Factor Enantiomérico

A: Actividad (U)

SA: Actividad específica (U/ g protein)

1.5. OBJETIVO DE LA TESIS

El tema de investigación tiene como objetivo la síntesis de sustancias quirales que pertenecen a la familia de los antiinflamatorios no-esteroides o AINES cuya actividad antiinflamatoria, antipirética y analgésica reside en el isómero S(+). Específicamente, se estudia la esterificación enantioselectiva de ácido (\pm) 2-(3-benzoilfenil) propiónico o R/S-ketoprofeno a los fines de obtener el enantiómero con actividad farmacológica. La resolución de la mezcla racémica de ketoprofeno se realizó por vía enzimática (Figura 24) mediante el empleo del biocatalizador comercial Novozym® 435 que consiste en la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en una resina macroporosa de polimetilmetacrilato según se describió en las secciones anteriores.

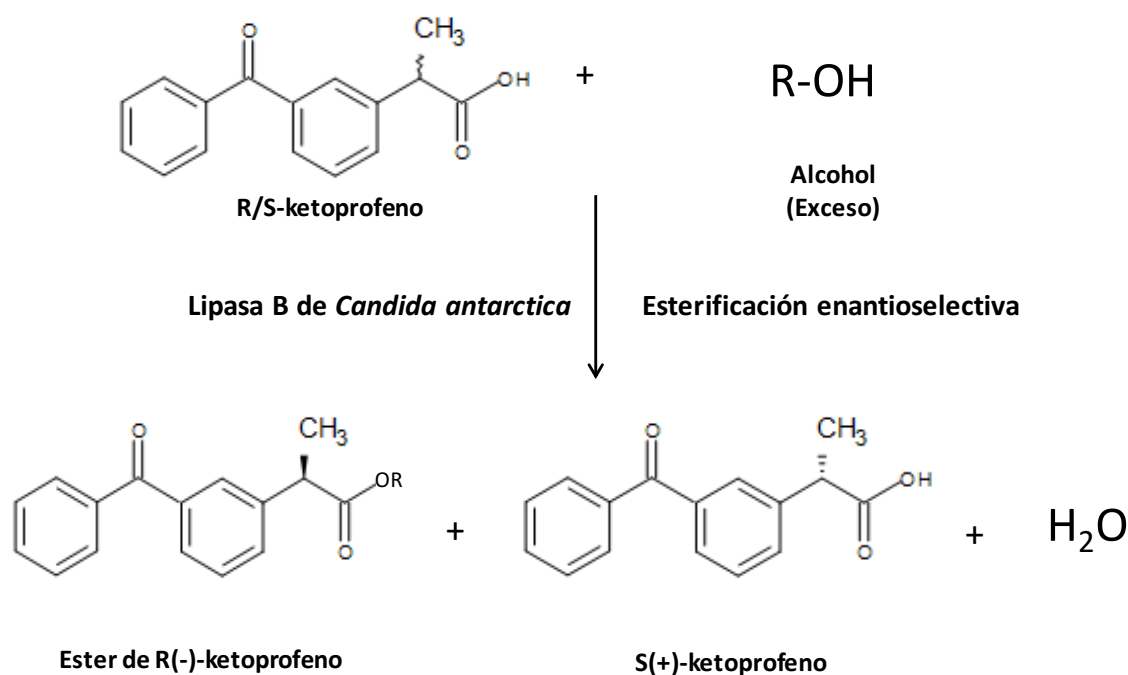


Figura 24. Esterificación enantioselectiva de R/S-ketoprofeno.

Estas reacciones se llevaron a cabo en medios libres de co-solvente, es decir, el alcohol empleado en la esterificación es el reactivo y solvente de las mismas. Adicionalmente, se estudió mediante espectroscopia infrarroja el mecanismo de

resolución de esta reacción. Por otro lado, se estudió el efecto que presentan los alcoholes empleados en la reacción sobre el biocatalizador, en términos de la integridad física y actividad catalítica.

1.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abas A, Meffin PJ. Disposition of 2-arulpropionic acid nonsteroidal anti-inflammatory drugs. IV. Ketoprofen disposition. *J Pharmac Exp Ther* 1987, 240, 637-641.

Abe Y, Kude K, Hayase S, Kawatsura M, Tsunashima K, Itoh T. Design of phosphonium ionic liquids for lipase-catalyzed transesterification. *J Mol Catal B: Enzym* 2008, 51, 81-85.

Alarcón Vivero MR. Tesis doctoral: "Producción de la lipasa LIP2 de *Candida rugosa* en el sistema *Pichia Pastoris*: caracterización y aplicación en reacciones de síntesis", 2008, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España.

Alcántara AR, Domínguez de María P, Fernández M, Hernaíz MJ, Sanchez-Montero JM, Sinisterra JV. Resolution of racemic acids, esters and amines by *Candida rugosa* lipase in slightly hydrated organic media. *Food Technol Biotechnol* 2004, 42, 343-354.

Arróniz C, Escolano C. Strategies for the synthesis of enantiopure compounds focused on organocatalysis. In *Recent advances in pharmaceutical sciences II*, Muñoz-Torrero D, Haro D, vallès J. Editorial Transworld Research Network, 2012, Trivandrum, India, pp. 115-134.

Arroyo M, Sinisterra JV. High enantioselective esterification of 2-arylpropionic acids catalyzed by immobilized lipase from *Candida antarctica*: a mechanistic approach. *J Org Chem* 1994, 59, 4410-4417.

Arroyo M. Immobilized enzymes: theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica* 1998, 39, 23-39.

Arroyo Sánchez M. Tesis doctoral: "Síntesis de ácidos 2-aryl-propiónicos homoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas", 1995, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

Babin JE, Whiteker GT. *Asymmetric syntheses*. USP 5.491.266, 1996.

Bjorkman DJ. The effect of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on prostaglandins. *Am J Med*, 105, 8S-12S.

Boisvert J, Caille G, Mcgilveray IJ, Qureshi SA. Quantification of ketoprofen enantiomers on human plasma based on solid-phase extraction and enantioselective column chromatography. *J Chromatogr* 1997, 690, 189-193.

Buschmann H, Christoph T, Friderichs E, Maul C, Sundermann B. Analgesics: from chemistry and pharmacology to clinical application. Editorial Weinheim: Wiley VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA, 1° edición, 2002, Datenschutz, Alemania.

Cabrera Z, Fernandez-Lorente G, Fernandez-Lafuente R, Palomo JM, Guisan JM. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* adsorbed on other hydrophobic supports. *J Mol Catal B: Enzym* 2009, 57, 171-176.

Caldwell J, Hutt AJ, Fournel-Gigleux S. The metabolic chiral inversion and dispositional enantioselectivity of the 2-arylpropionic acids and their biological consequences. *Biochem Pharmacol* 1988, 37, 105-114.

Carvalho PdeO, Cass QB, Calafatti SA, Contesini FJ, Bizaco R. Review- alternatives for the separation of drug enantiomers: ibuprofen as a model compound. *Braz J Chem Eng* 2006, 23, 291-300.

Carvalho PdeO, Contesini FJ, Ikegaki M. Enzymatic resolution of (R,S)-ibuprofen and (R,S)-ketoprofen by microbial lipases from native and commercial sources. *Braz J Microbiol* 2006, 37, 329-337.

Chang C-S, Hsu C-S. Enhancement of enantioselectivity and reaction rate on the synthesis of (S)-ketoprofen hydroxyalkyl ester in organic solvents via isopropanol-dried immobilized lipase. *J chem Technol Biotechnol* 2005, 80, 537-544.

Cryer B, Kimmey MB. Gastrointestinal side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998, 105, 20S-30S.

Curiel RV, Katz JD. Mitigating the cardiovascular and renal effects of NSAIDs. *Pain Med* 2013, 14, S23-S28.

D'Antona N, Lombardi P, Nicolosi G, Salvo G. Large scale preparation of enantiopure S-ketoprofen by biocatalysed kinetic resolution. *Process Biochem* 2002, 38, 373-377.

Davies NM. Methods of analysis of chiral non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Chromatogr B* 1997, 691, 229-261.

De Crescenzo G, Ducret A, Trani M, Lortie R. Enantioselective esterification of racemic ketoprofen in non-aqueous solvent under reduced pressure. *J Mol Catal B: Enzym* 2000, 9, 49-56.

DeWitt DL. Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol Pharmacol* 1999, 55, 625-631.

Du W, Zong MN, Chen WF, Guo Y, Li Q. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ketoprofen in organic media. *Microbiology* 2000, 6, 429-432.

Duan G, Ching CB, Lim E, Ang CH. Kinetic study of enantioselective esterification of ketoprofen with n-propanol catalysed by an lipase in an organic medium. *Biotechnol Lett* 1997, 19, 1051-1055.

Ducret A, Trani M, Lortie R. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity. *Enzym Microb Technol* 1998, 22, 212-216.

Eikeren PV, McConville FX, Lopez JL. Process for resolving chiral acids with 1-aminoindan-2-ols. *USP 5.677.469*, 1997.

Fink AL. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des* 1998, 3, R9-R23.

Fjerbaek L, Christensen KV, Norddahl B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnol Bioeng* 2009, 102, 1298-1315.

Florez J. *Farmacología humana*. Editorial Elsevier Masson, 5° edición, 2008, Barcelona, España.

Foresti ML, Galle M, Ferreira ML, Briand LE. Enantioselective esterification of ibuprofen with ethanol as reactant and solvent catalyzed by immobilized lipase: experimental and molecular modeling aspects. *J Chem Technol Biotechnol* 2009, 84, 1461 – 1473.

Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001, 5548, 1871-1875.

Gotor-Fernández V, Brieva R, Gotor V. Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *J Mol Catal B: Enzym* 2006, 40, 111-120.

Gryglewicz S, Jadownicka E, Czerniak A. Lipase catalyzed synthesis of aliphatic, terpene and aromatic esters by alcoholysis in solvent-free medium. *Biotechnol Lett* 2000, 22, 1379-1382.

Hayball PJ, Meffin PJ. Enantioselective disposition of 2-arylpropionic acid nonsteroidal anti-inflammatory drugs. III. Fenopropendisposition. *J Pharmac Exp Ther*, 1987, 240, 631-636.

Hernández-Fernández FJ. 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.

Illanes A. *Enzyme biocatalysis: principles and applications*. Editorial Springer Science + Business Media B.V., 1° edición, 2008, Berlín, Alemania.

Jin JN, Lee SH, Lee SB. Enzymatic production of enantiopure ketoprofen in a solvent-free two-phase system. *J Mol Catal B: Enzym* 2003, 26, 209-216.

José C, Bonetto RD, Gambaro LA, Guauque Torres MP, Foresti ML, Ferreira ML, Briand LE. Investigation of the causes of deactivation-degradation of the commercial biocatalyst Novozym® 435 in ethanol and ethanol-aqueous media. *J Mol Catal B: Enzym* 2011, 71, 95-107.

José C. Tesis doctoral: "Resolución biocatalítica de los enantiómeros de ibuprofeno", 2013, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

Kato K, Gong Y, Saito T, Kimoto H. Efficient preparation of optically active ketoprofen by *Mucor javanicus* lipase immobilized on an inorganic support. *J Biosci Bioeng* 2000, 90, 332-334.

Kantor TG. Ketoprofen: a review of its pharmacologic and clinical properties. *Pharmacotherapy* 1986, 6, 93-103.

Kim MG, Lee EG, Chung BH. Improved enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase towards ketoprofen ethyl ester by a simple two-step treatment. *Process Biochem* 2000, 35, 977-982.

Kim S-H, Kim T-K, Shin G-S, Lee k-W, Shin H-D, Lee Y-H. Enantioselective hydrolysis of insoluble (R,S)-ketoprofen ethyl ester in dispersed aqueous reactions system induced by chiral cyclodextrin. *Biotechnol Lett* 2004, 26, 965-969.

Kulkarni SK, Jain NK, Singh A. Cyclooxygenases isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2000, 22, 291-298.

Lai C-C, Zullaikah S, Ramjan Vali S, Ju Y-H. Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil. *J Chem Technol Biotechnol* 2005, 80, 331-337.

Lalonde JJ, Govardhan C, Khalaf N, Martinez AG, Visuri K, Margolin AL. Cross-linked crystals of *Candida rugosa* lipase: highly efficient catalysts for the resolution of chiral esters. *J Am Chem Soc* 1995, 117, 6845-6852.

Laue C, Schroeder G, Arlt D. Intermediates and their use in the preparation of s-ketoprofen. *USP 5.362.907*, 1994.

Lee EJD, Williams K, Day R, Graham G, Champion D. Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in man. *Br J Clin Pharmacol* 1985, 19, 669-674.

Lee K-W, Shin G-S, Bae H-A, Shin H-D, Lee Y-H. Isolation and characterization of *Acinetobacter* sp. ES-1 excreting a lipase with high enantioselectivity for (S)-ketoprofen ethyl ester. *Biotechnol Lett* 2004, 26, 1639-1642.

Lewis RA, Austen KF. The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology. *J Clin Invest* 1984, 73, 889-897.

Li X, Liu T, Xu L, Gui X, Su F, Yan Y. Resolution of racemic ketoprofen in organic solvents by lipase from *Burkholderia cepacia* G63. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2012, 17, 1147-1155.

Lin G-Q, You Q-D, Cheng J-F. Chiral drugs: chemistry and biological action. Editorial John Wiley & Sons, 1° edición, 2011, New Jersey, Estados Unidos.

Liu Y-Y, Xu J-H, Xu Q-G, Hu Y. Significant enhancement of lipase enantioselectivity toward (S)-ketoprofen ester at pH 2. *Biotechnol Lett* 1999, 21, 143-146.

Liu Y-Y, Xu J-H, Hu Y. Enhancing effect of Tween-80 on lipase performance in enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. *J Mol Catal B: Enzym* 2000, 10, 523-529.

Liu Y-Y, Xu J-H, Wu H-Y, Shen D. **(a)** Integration of purification with immobilization of *Candida rugosa* lipase for kinetic resolution of racemic ketoprofen. *J Biotechnol* 2004, 110, 209-217.

Liu J, Zhang Y, hui Qiu L, Yang F, Ye L, Xia Y. **(b)** Kinetic resolution of ketoprofen ester catalyzed by lipase from a mutant of CBS 5791. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2004, 31, 495-499.

Liu B, Qian X, Wu Q, Lin X. Two lipase catalyzed sequential synthesis of drug derivatives in organic media. *Enzym Microb Technol* 2008, 43, 375-380.

López-Belmonte MT, Alcántara AR, Sinisterra JV. Enantioselective esterification of 2-arylpropionic acids catalyzed by immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. *J Org Chem* 1997, 62, 1831-1840.

Long Z-D, Xu J-H, Zhao L-L, Pan J, Yang S, Hua L. Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen. J Mol Catal B: Enzym 2007, 47, 105-110.

Lozano P, De Diego T, Manjón A, Abad MA, Vaultier M, Iborra JL. Enzymatic membrane reactor for resolution of ketoprofen in ionic liquids and supercritical carbon dioxide. ACS Symp Ser 2010, 1038, 25-34.

Lukas H, Schuster O, Rau G. Process to separate mixtures of enantiomeric arylpropionic acids. USP 4.983.765, 1991.

Malgor LA, Valsecia ME. Farmacología médica, volumen 4, capítulo 7, 2° edición, 2000. Soporte electrónico disponible en:

http://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/0000cap7_ aines.pdf.

Manimaran T, Potter AA. Resolution of ketoprofen. USP 5.162.576, 1992.

Maugard T, Tudella J, Legoy MD. Study of vitamin ester synthesis by lipase-catalyzed transesterification in organic media. Biotechnol Prog 2000, 16, 358-362.

Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. Editorial W.H. Freeman and Company, 5° edición, 2008, New York, Estados Unidos.

Nguyen La, He H, Pham-Huy C. Chiral drugs: an overview. Int J Biomed Sci 2006, 2, 85-100.

Norbert MM, Franco P, Lindner W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. J Chromatogr 2001, 906, 03-33.

Ong AL, Kamaruddin AH, Bathia S. Current technologies for the production of (S)-ketoprofen: process perspective. Process Biochem 2005, 40, 3526-3535.

Ong AL, Kamaruddin AH, Bhatia S, Long WS, Lim TS, Kumari R. Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (R)-ketoprofen. *Enzyme Microb Technol* 2006, 39, 924-929.

Ong AL, Kamaruddin AH, Bhatia S, Aboul-Enein HY. Enantioseparation of (R,S)-ketoprofen using *Candida antarctica* lipase B in an enzymatic membrane reactor. *J Sep Sci* 2008, 31, 2476-2485.

Paetzold J, Bäckvall JE. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of primary amines. *J Am Chem Soc* 2005, 127, 17620-17621.

Pámies O, Bäckvall JE. Combination of Enzymes and Metal Catalysts. A Powerful Approach in Asymmetric Catalysis. *Chem Rev* 2003, 103, 3247-3261.

Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 1999, 29, 119-131.

Panke S, Wubbolts MG. Enzyme technology and bioprocess engineering. *Curr Opin Biotechnol* 2002, 13, 111-116.

Park HJ, Choi WJ, Huh EC, Lee EY, Choi CY. Production of optically active ketoprofen by direct enzymatic esterification. *J Biosci Bioeng* 1999, 87, 545-547.

Patel RN. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coord Chem Rev* 2008, 252, 659-701.

Pérez Ruiz AO, Cartaya Padrón L, Valencia Fernández V, Sanjurjo Gámez V, Ilisástigui Ortueta T. Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Rev Cubana Estomatol* 1998, 35, 56-61.

Pérez-Victoria Moreno de Barreda I. Tesis doctoral: "Aplicaciones regioselectivas de oligosacáridos catalizada por enzimas: caracterización y propiedades de los productos", 2006, Universidad de Granada, Granada, España.

Rachwalski M, Vermue N, Rutjes FPJT. Recent advances in enzymatic and chemical dercemisation of racemic compounds. *Chem Soc Rev* 2013, 42, 9268-9282.

Reetz MT. Lipases as practical biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* 2002, 6, 145-150.

Sallustio BC, Purdie YJ, Whitehead AG, Ahern MJ, Meffin PJ. The disposition of ketoprofen enantiomers in man. *Br J Clin Pharmac* 1988, 26, 765-770.

Sikora A, Siódmiak T, Marszall MP. Kinetic resolution of profens by enantioselective esterification catalyzed by *Candida antarctica* and *Candida rugosa* lipase. *Chirality* 2014, 26, 663-669.

Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004, 56, 387-437.

Solomon DH, Glynn RJ, Avorn J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and acute myocardial infarction. *Arch Intern Med* 2002, 162, 1099-1104.

Tan T, Lu J, Nie K, Deng L, Wang F. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. *Biotechnol Adv* 2010, 28, 628-634.

Torres P, Reyes-Duarte D, López-Cortés N, Ferrer M, Ballesteros A, Plou FJ. Acetylation of vitamin E by *Candida antarctica* lipase B immobilized on different carriers. *Process Biochem* 2008, 43, 145-153.

Tufvesson P, Annerling A, Hatti-Kaul R, Adlercreutz D. Solvent-free enzymatic synthesis of fatty alkanolamides. *Biotechnol Bioeng* 2007, 97, 447-453.

Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 1994, 2, 293-308.

Voet D, Voet JG. Biochemistry. Editorial John Wiley & Sons Inc, 4° edición, 2011, Estados Unidos.

Wu JC, Low HR, Leng Y, Chow Y, Li R, Talukder NMR, Choi WJ. Ketoprofen resolution by enzymatic esterification and hydrolysis of the ester product. Biotechnol Bioprocess Eng 2006, 11, 211-214.

Xi W-W, Xu J-H. Preparation of enantiopure (S)-ketoprofen by immobilized *Candida rugosa* lipase in packed bed reactor. Process Biochem 2005, 40, 2161-2166.

Yadav GD, Sajgure AD, Shoot SB. Insight into microwave irradiation and enzyme catalysis in enantioselective resolution of RS-(±)-methyl mandelate. J Chem Technol Biotechnol 2008, 83, 1145-1153.

Yadav GD, Borkar IV. Synthesis of n-butyl acetamide over immobilized lipase. J Chem Technol Biotechnol 2009, 84, 420-426.

Yahya AR, Anderson WA, Moo-Young M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. Enzyme Microb Technol 1998, 23, 438-450.

Yoneyoshi Y, Kudo J, Nishioka T. Optically active secondary amine compound, process for producing optically active secondary amine compound and process for producing optically active carboxylic acid by using said compound. USP 5.510.519, 1996.

Zhang Y-Y, Liu J-H. Kinetic study of enantioselective hydrolysis of (R,S)-ketoprofen ethyl ester using immobilized *T. laibacchii* lipase. Biochem Eng J 2011, 54, 40-46.

Zhao X-G, Wei D-Z, Song Q-X. A facile enzymatic process for the preparation of ibuprofen ester prodrug in organic media. J Mol Catal B: Enzym 2005, 36, 47-53.

Zhao H, Song Z. Migration of reactive trace compounds from Novozym® 435 into organic solvents and ionic liquids. Biochem Eng J 2010, 49, 113-118.

Zhu S, Wu Y, Yu Z.(a) Optimization for two-step biochemical kinetic resolution of enantiomers. *Biocatal Biotransform* 2005, 23, 97-101.

Zhu S, Wu Y, Yu Z.(b) Immobilization of *Candida rugosa* lipase on a pH-sensitive support for enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. *J Biotechnol* 2005, 116, 397-401.

CAPÍTULO 2

**METODOLOGÍA UTILIZADA PARA LA
INVESTIGACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE
LOS ALCOHOLES DE CADENA CORTA
CON EL BIOCATALIZADOR COMERCIAL
NOVOZYM® 435**

La literatura reporta varias investigaciones que dan cuenta de la desactivación de Novozym® 435. En particular, investigaciones dedicadas a la producción de biodiesel manifiestan que el exceso de metanol o etanol inhibe la reacción de transesterificación. 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 (José *et al*, 2011).

Estudios llevados a cabo previamente por la Dra. José demostraron que el biocatalizador Novozym® 435 se disuelve en etanol y en un medio etanol-agua ocasionando la pérdida de soporte y de proteína. En este contexto, se llevaron a cabo estudios que permitieron determinar el efecto que otros alcoholes de cadena corta (metanol, 1- y 2-propanol) ejercen sobre la integridad del biocatalizador Novozym® 435. En las secciones siguientes se presenta la metodología utilizada para investigar tales efectos.

2.1. PROCEDIMIENTO PARA EL TRATAMIENTO CON LOS ALCOHOLES

Se investigó el efecto que los alcoholes ejercen sobre el biocatalizador poniendo en contacto una muestra de Novozym®435 (Novozymes Brasil, batch LC200217, 72 m²/g) con 10.00 mL de una mezcla de alcohol: 4.76% (v/v) de agua. Los alcoholes empleados fueron metanol (Tedia), etanol (Carlo Erba, 99.8%), 1-propanol (Sigma Aldrich, ≥ 99.5%) y 2-propanol (J.T. Baker, 99.93%). El período de incubación fue de 8 días (imitando 4 ciclos de reacción de 48 h) a una temperatura de 45 °C y agitación en baño de agua a 200 rpm. Este periodo de incubación fue elegido en base a estudios previos en los cuales se observó la desactivación del biocatalizador Novozym®435 luego del cuarto ciclo de 48 h de uso consecutivo en la esterificación de R/S-ibuprofeno con etanol como reactivo y solvente (Foresti *et al*, 2009).

Transcurrido este tiempo, las esferas del biocatalizador se separaron del medio de reacción y fueron lavadas 4 veces con 5.00 mL del alcohol correspondiente. Tanto el medio de reacción como los alcoholes usados en el lavado fueron filtrados empleando

membranas hidrofílicas de nylon (de 0.45 μm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro) de Osmonic Inc. para retener las sustancias no solubles como el polimetilmetacrilato. El biocatalizador se dejó secar en desecador por 8 días (con el objetivo de deshidratarlo) y luego se calentó en ciclos de 10 minutos a cierta temperatura necesaria para desorber cada alcohol (las temperaturas de desorción se determinaron mediante Desorción Térmica Programada (TPD)), enfriando cada vez y determinando la masa del biocatalizador. Este procedimiento se repitió hasta que la masa medida fue constante, y permitió determinar la pérdida total de masa del biocatalizador y la cantidad de alcohol adsorbida.

Los líquidos remanentes de cada una de las 4 etapas de lavado luego del filtrado se adicionaron al medio de reacción adicional y se dejaron evaporar. El sólido resultante se disolvió en 2.00 mL de agua destilada, se centrifugó para separar las sustancias no solubles y recuperar la enzima para su cuantificación por el ensayo de ácido bicinconínico.

2.2. METODOLOGÍA GENERAL

Las esferas de biocatalizador luego de esta exposición prolongada se analizaron por desorción térmica programada TPD (los detalles de esta técnica se describen en la Sección 2.3) con el objetivo de determinar si los alcoholes continuaban adsorbidos a las esferas del biocatalizador pese a que éstas fueron colocadas en desecador para deshidratarlas. Las temperaturas de desorción de los alcoholes permitieron determinar la intensidad de la interacción entre cada alcohol y el biocatalizador Novozym® 435.

Por otro lado, estas esferas de biocatalizador luego del contacto con los alcoholes y los sólidos retenidos en los filtros se analizaron por espectroscopia infrarroja FTIR (técnica descrita en la Sección 2.5) con el objetivo de determinar cualitativamente el efecto de estos alcoholes sobre Novozym® 435. Luego en base a los datos cualitativos obtenidos previamente, se cuantificó la pérdida total de masa y proteína mediante el calentamiento de las esferas a la temperatura de desorción determinada y la

cuantificación de proteína desprendida por el ensayo de ácido bicinonínico (como se describe en la Sección 2.4).

Seguidamente, el biocatalizador sin tratamiento previo y luego del contacto con los alcoholes fue analizado mediante espectroscopia infrarroja de reflectancia difusa por transformada de Fourier (DRIFTS, Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy) acoplado con intercambio isotópico para determinar las modificaciones de la estructura secundaria de la enzima CALB inmovilizada. La estructura secundaria de la enzima CALB pura se analizó mediante FTIR por reflectancia total atenuada (ATR, Attenuated Total Reflectance) con el objetivo de evaluar los posibles cambios producidos en la inmovilización en el soporte polimérico.

Adicionalmente se estudió la textura/rugosidad del catalizador, antes y después de someterse a la acción de los alcoholes, por microscopía electrónica medioambiental ESEM como se describe en la Sección 2.6. En los siguientes apartados de este capítulo se detallan los fundamentos de las técnicas empleadas, condiciones de desarrollo de cada etapa así como el equipamiento utilizado. Posteriormente en el Capítulo 3 se muestran los resultados obtenidos y las conclusiones que surgen a partir de estos estudios.

2.3. DESORCIÓN A TEMPERATURA PROGRAMADA

Las técnicas de desorción térmica programada (TPD, Temperature Programmed Desorption) y reacción superficial a temperatura programada (TPSR, Temperature Programmed Surface Reaction) permiten estudiar procesos de desorción o reacciones de descomposición de moléculas adsorbidas en una superficie determinada. La superficie se expone a un aumento de la temperatura a una velocidad de calentamiento programada (típicamente $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) lo que provoca la desorción o reacción superficial, y las especies resultantes son detectadas mediante un espectrómetro de masas (Schroeder & Gottfried, 2002).

El detalle del equipamiento utilizado se muestra en la Figura 1. El equipo posee flujos controlados de oxígeno y helio de alta pureza para el pre-tratamiento de las muestras y estudios de adsorción-desorción, respectivamente. La muestra se coloca dentro de un reactor de cuarzo con forma de U que se calienta con un horno eléctrico. La velocidad de calentamiento es controlada electrónicamente y registrada en una computadora.

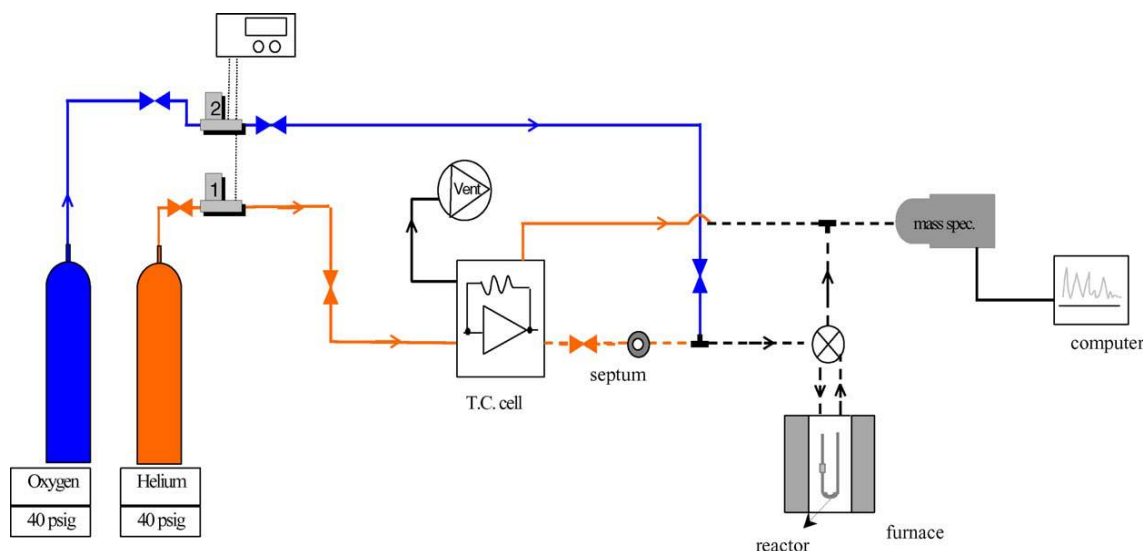


Figura 1. Diagrama de flujo del equipo de TPD. (---) Líneas calefaccionadas (extraído de Gambaro & Briand, 2004).

Para estudiar la interacción de los alcoholes sobre la superficie de Novozym®435 se llevó a cabo un estudio de desorción a temperatura programada TPD sobre las esferas del biocatalizador que estuvieron en contacto con las mezclas alcohol-agua durante 8 días.

Las muestras (49.9 mg de biocatalizador) se calentaron hasta alcanzar los 400 °C a 10 °C/min bajo flujo de Helio puro ($35 \text{ cm}^3 \text{ (NTP) min}^{-1}$). Las especies resultantes de la desorción y/o reacción superficial se detectaron en el espectrómetro de masas y registraron en una computadora. En la Tabla 1 se presentan las relaciones masa/carga (m/e) empleadas para identificar las especies desorbidas en el tratamiento con cada uno de los alcoholes (entre paréntesis se incluyen las intensidades relativas):

Tabla 1. Relación carga masa (m/e) de las posibles especies desorbidas en el tratamiento de Novozym®435 con metanol, etanol, 1-propanol y 2-propanol.

Alcohol	Especie	Relación m/e (intensidad relativa)
Metanol	Metanol (CH ₄ O)	m/e = 31 (100), m/e = 32 (75), m/e = 29 (43)
	Formaldehído (CH ₂ O)	m/e = 29 (100), m/e = 30 (58), m/e = 28 (23)
	H ₂ O	m/e = 18
	CO ₂	m/e = 44
	CO	m/e = 28
Etanol	Etanol (C ₂ H ₆ O)	m/e = 31 (100), m/e = 45 (52), m/e = 29 (30)
	Acetaldehído (C ₂ H ₄ O)	m/e = 29 (100), m/e = 44 (83), m/e = 43 (48)
	Ácido acético (C ₂ H ₄ O ₂)	m/e = 43 (100), m/e = 45 (90), m/e = 60 (75)
	Acetato de etilo (C ₄ H ₈ O ₂)	m/e = 43
	Etil éter (C ₄ H ₁₀ O)	m/e = 31 (100), m/e = 59 (68), m/e = 29 (45)
	Etileno (C ₂ H ₄)	m/e = 28 (100), m/e = 27 (62), m/e = 26 (52)
	H ₂ O	m/e = 18
	CO ₂	m/e = 44
CO	m/e = 28	
1-propanol	1-propanol (C ₃ H ₇ OH)	m/e = 31 (100), m/e = 29 (16), m/e = 27 (15)
	Propanal (C ₃ H ₆ O)	m/e = 58 (100), m/e = 29 (88), m/e = 28 (58)
	Ácido propanoico (C ₃ H ₆ O ₂)	m/e = 74 (100), m/e = 28 (93), m/e = 45 (90)
	Propeno C ₃ H ₆	m/e = 41 (100), m/e = 39 (73), m/e = 42 (70)
	H ₂ O	m/e = 18
	CO ₂	m/e = 44
	CO	m/e = 28
2-propanol	2-propanol (C ₃ H ₇ OH)	m/e = 45 (100), m/e = 43 (19), m/e = 27 (17), 29 (10)
	Acetona (C ₃ H ₆ O)	m/e = 43 (100), 58 (27)
	Propileno (C ₃ H ₆)	m/e = 41 (100), m/e = 39 (74), m/e = 42 (70)
	H ₂ O	m/e = 18
	CO ₂	m/e = 44
	CO	m/e = 28

2.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA: ENSAYO DE ÁCIDO BICINCONÍNICO

2.4.1. Fundamento

La cuantificación de proteína se llevó a cabo mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA, bicinchoninic acid). Esta es una técnica sencilla, rápida, sensible y tolerante a detergentes y sustancias que interfieren con otros métodos (Brown *et al*, 1989). En una primera etapa, este método se basa en la reacción de Biuret en la cual las uniones peptídicas reducen los iones Cu^{+2} en medio alcalino. La cantidad de cobre reducido es proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución. Luego el BCA, que se utiliza en forma de sal sódica soluble en agua, se une a los iones Cu^{+1} , formando un complejo de color púrpura intenso (Figura 2). El color producido en esta reacción es estable y aumenta de manera proporcional con la concentración de la proteína (Smith *et al*, 1985). La cuantificación se lleva a cabo midiendo el espectro de absorción (presenta una absorbancia máxima a 562 nm) y comparando con una curva de calibración.

El método BCA implica la preparación de 3 soluciones acuosas llamadas 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 NaHCO_3 (Anedra), 0.1581 g NaOH (Carlo Erba, $\geq 97\%$) y 0.0641 g de tartrato de sodio dibásicodihidratado (Fluka, $\geq 99\%$) en 40 mL de agua destilada. La solución B contiene 4% (p/v) de CuSO_4 y la solución C es una mezcla de las soluciones A y B con una relación 100:2 (v/v). Las soluciones A y B son estables a temperatura ambiente, sin embargo la solución C se debe preparar en el momento previo a la cuantificación.

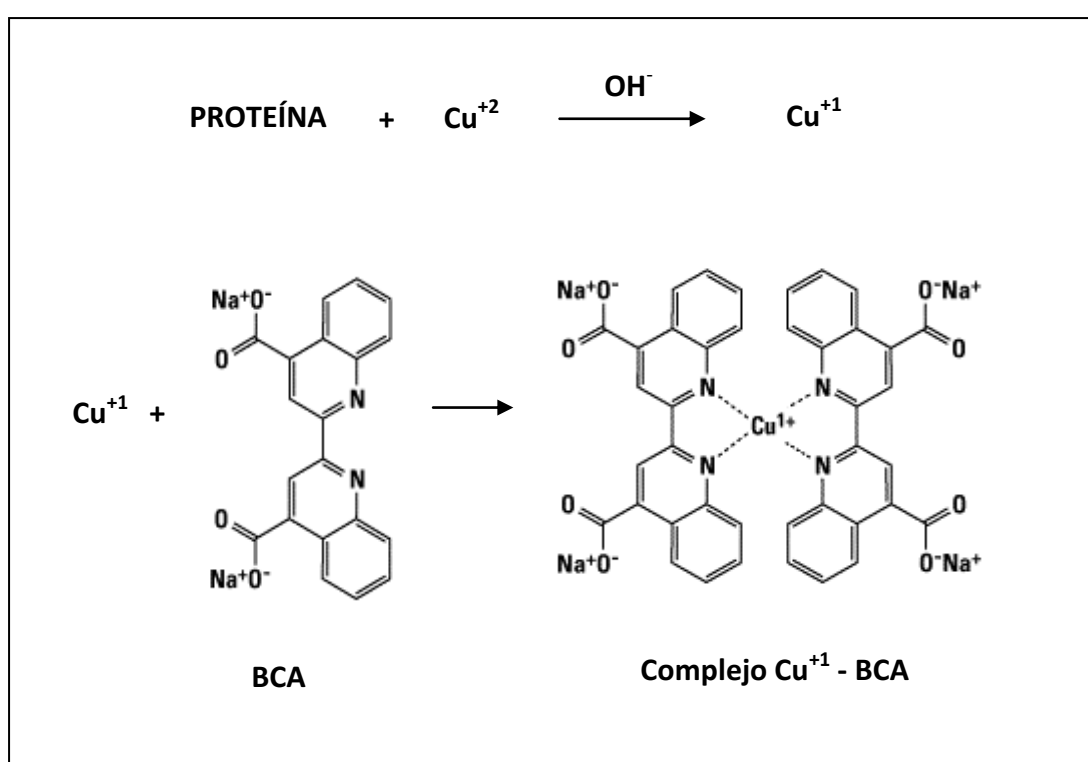


Figura 2. Formación del complejo púrpura formado por BCA y el ión cuproso Cu^{+1} generado por la reacción de Biuret.

2.4.2. Enzima adsorbida en Novozym® 435.

El biocatalizador se sometió al procedimiento descrito por chen *et al* con el fin de desorber la proteína (lipasa B de *Candida antarctica*) inmovilizada sobre la resina macroporosa Lewatit VP OC 1600. 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 (Chen *et al*, 2008). 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 OC 1600 y

cuantificar la cantidad total de enzima contenida en Novozym®435 por medio de la técnica del ácido bicinconínico (José, 2013).

2.4.3. Proteína desorbida por acción de los alcoholes.

En el tratamiento de Novozym® 435 con los alcoholes descrito en la Sección 2.1 se dejó evaporar el líquido remanente del medio de reacción y de las 4 etapas de lavado del biocatalizador. El sólido resultante se disolvió en 2.00 mL de agua, se centrifugó para separar las sustancias no solubles y recuperar la enzima para su cuantificación mediante la técnica de BCA. Para ello se preparó la solución C, que en este caso corresponde a 30.00 mL de solución A y 0.60 mL de solución B. Se tomaron 170 μ L de muestra y se hicieron reaccionar con 1.70 mL de reactivo de trabajo durante 10 minutos en un baño de agua a temperatura controlada a 60 °C (la reacción se lleva a cabo por duplicado). Posteriormente se midió la absorbancia empleando un equipo Perkin Elmer Lambda 35 empleando cubetas Uvette®220-1600 nm con 1 cm de camino óptico.

La curva de calibración (Figura 3) se obtuvo empleando la lipasa B de *Candida antarctica* de alta pureza (Sigma Aldrich Argentina 10.9 U/mg) disuelta en agua destilada. Inicialmente, se obtuvo una solución de CALB (0.0044 g) en 4.00 mL de agua destilada. La concentración real de la solución se obtuvo del valor de absorbancia a 280 nm (A^{280}) y el coeficiente de extinción de la enzima (ϵ^{280} CALB = 41285 M^{-1}) según la ley de Beer-Lambert: $A^{280} = \epsilon^{280} \times b \times c$ (Llerena-Suster *et al*, 2014). La concentración de esta solución inicial fue 0.1956 mg/mL. Luego se obtuvieron diferentes soluciones de calibración por dilución con agua destilada, resultando en 9 soluciones de calibración de concentraciones entre 0 y 200 μ g/mL. El ensayo de ácido bicinconínico llevado a cabo consistió en 170 μ L de cada solución de calibración con 1.70 mL de solución C (reactivo de trabajo) durante 10 minutos a 60 °C. Las mezclas se dejaron enfriar y luego se midió la absorbancia a 562 nm. La curva de calibración obtenida se ajusta a la siguiente ecuación lineal:

$$A^{562} = 0.0029 * [\text{proteína } (\mu\text{g/mL})] - 0.0354$$

$$r^2 = 0.9917$$

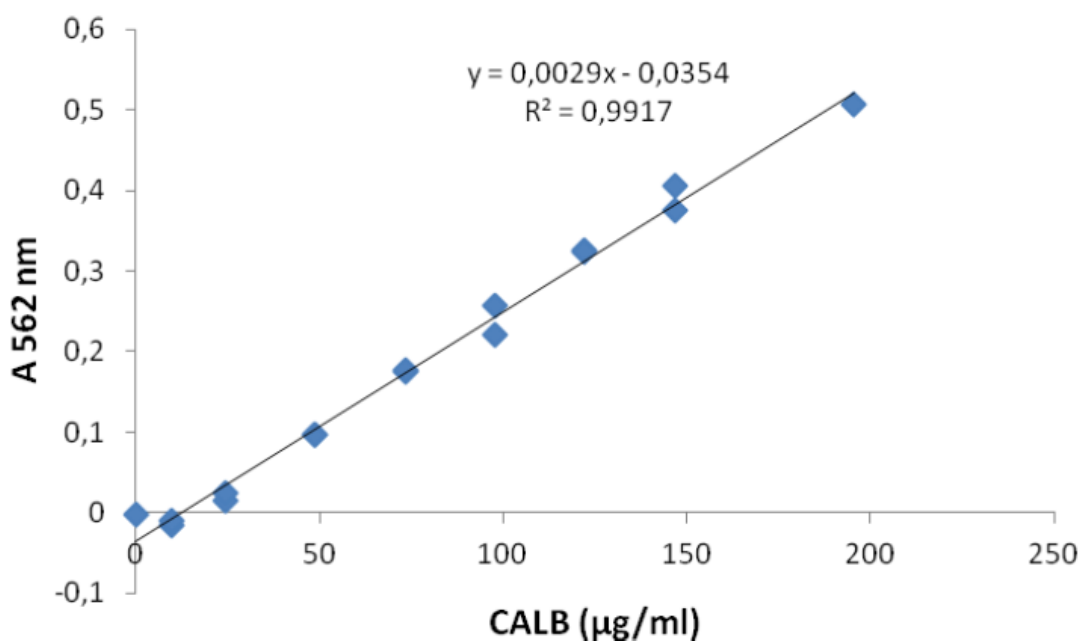


Figura 3. Curva de calibración ensayo de ácido bicinconónico CALB-agua destilada.

2.5 ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

2.5.1. Fundamento

La Espectroscopia Infrarroja (IR) es una de las técnicas clásicas que permiten obtener rápida y fácilmente información sobre la estructura de compuestos orgánicos. Esto es debido a la sensibilidad del método a la composición química y la arquitectura de las moléculas. Cada molécula presenta un espectro IR característico (huella dactilar). Los diferentes grupos funcionales absorben frecuencias características de la radiación IR.

El alto contenido de información en un espectro infrarrojo también es aplicable a sistemas biológicos, esto hace a la espectroscopia infrarroja una técnica útil para el

estudio de la estructura, del mecanismo molecular de las reacciones y del plegamiento/desplegamiento o incluso desnaturalización de proteínas. Cuando los análisis espectroscópicos se realizan *in situ*, a temperatura programada y bajo atmósfera controlada, es posible investigar la evolución de un mecanismo durante el transcurso de la reacción (Barth, 2007).

La zona de radiación infrarroja del espectro electromagnético se encuentra situada entre los límites de las regiones del espectro visible y de las microondas, es decir entre 13300 cm^{-1} y 20 cm^{-1} . La porción infrarroja del espectro electromagnético se divide en tres regiones: el infrarrojo cercano, medio y lejano, respecto al espectro visible. El infrarrojo medio presenta un intervalo de frecuencias entre 4000 y 400 cm^{-1} , y es utilizado para el estudio de las vibraciones fundamentales (Conley, 1979).

Cuando una molécula absorbe radiación en esta zona del espectro electromagnético, los cambios en la energía de estas vibraciones moleculares pueden detectarse y medirse obteniendo un espectro infrarrojo. Esto ocurre cuando la energía de la radiación IR es igual a la necesaria para que se produzca una transición vibracional en la molécula, y cuando el momento dipolar cambia durante la vibración. Debido a que la frecuencia de vibración y la probabilidad de absorción dependen de la fuerza y polaridad de las uniones vibrantes, estas están influenciadas por efectos intra e intermoleculares. La posición aproximada de una banda de absorción de infrarrojo está determinada por las masas vibracionales y el tipo de enlace (simple, doble o triple), el efecto de la posición exacta de aceptores o dadores de electrones del medio intra e intermolecular y por acoplamiento con otras vibraciones. La fuerza de la absorción aumenta con el aumento de la polaridad de los enlaces involucrados en la vibración. En el estudio de proteínas, el efecto del medio en las frecuencias de vibración suele ser un indicador de cómo funcionan las proteínas (Barth, 2007).

El número total de bandas de absorción observado es generalmente diferente del número total de vibraciones fundamentales. Esta disminución se debe a que algunas vibraciones no son activas en IR y una sola frecuencia puede causar más de un tipo de vibración. Por otro lado, se generan bandas adicionales por la aparición de armónicos (múltiplos enteros de las frecuencias fundamentales de absorción), combinaciones,

diferencias e interacciones de acoplamiento de frecuencias fundamentales de absorción, y las interacciones de acoplamiento entre vibraciones fundamentales y armónicos o bandas de combinación (resonancia Fermi). Las intensidades de armónicos, combinación, y bandas de diferencia son menores que las de las bandas fundamentales. La combinación y mezcla de todos estos factores crean un espectro IR único para cada compuesto (Sherman, 1997).

Las vibraciones fundamentales son siempre simétricas o asimétricas con respecto a un centro de simetría. Una vibración que es simétrica con respecto al centro de simetría es aquella para la que el vector de desplazamiento con respecto a cualquier otro átomo, cuando se refleje en el centro de simetría, coincidirá con el vector del correspondiente átomo que sea su imagen especular. Para una vibración asimétrica, cada vector de desplazamiento, cuando se refleje en el centro de simetría, será el opuesto del vector real de desplazamiento del átomo que sea su imagen especular. Las vibraciones que son simétricas al centro de simetría no pueden producir un cambio en el momento dipolar. El momento dipolar es cero para la configuración de equilibrio y permanece con dicho valor durante la vibración completa, puesto que un desplazamiento de cualquier átomo está contrarrestado por el desplazamiento del átomo opuesto. Tales vibraciones están “prohibidas” en el infrarrojo. Por el contrario, las vibraciones asimétricas producen un cambio en el momento dipolar. El momento es cero en la posición de equilibrio, pero no es cero en ambos extremos de la vibración, y por consiguiente esta vibración es permitida en el infrarrojo (Conley, 1979).

El movimiento de los átomos puede expresarse como combinación lineal de un número limitado de vibraciones independientes. En la Figura 4 se representan los distintos tipos de vibraciones moleculares. Las vibraciones de tensión, simétricas o asimétricas (ν_s o ν_{as} , stretching), son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre los átomos. Las vibraciones de flexión, en el plano (δ , bending in the plane) o fuera del plano (γ , bending out of the plane) están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces. Estas flexiones pueden ser de: tijera en el plano

(δ , scissoring) y de balanceo (ρ , rocking) en el plano, o de cabeceo o aleteo (ω , wagging) o de torsión (τ , twisting) fuera del plano.

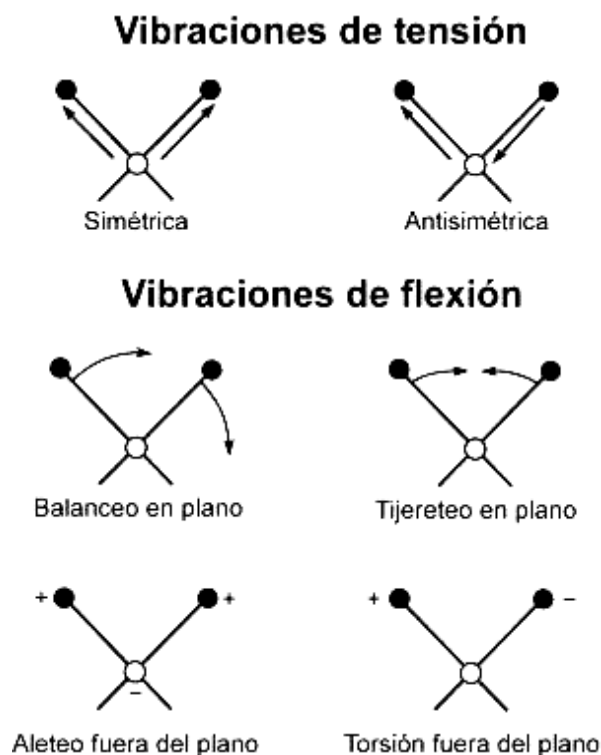


Figura 4. Tipos de vibraciones moleculares.

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). Estas técnicas se describen más detalladamente en Sección 2.5.3.

Para detectar los espectros infrarrojos se emplea un espectrofotómetro de infrarrojo, basado en los mismos principios ópticos que los espectrofotómetros de ultravioleta y visible. Los tres componentes básicos que caracterizan a todos los espectrofotómetros (Figura 5) son: una fuente de radiación infrarroja, que suministra la iluminación incidente sobre la muestra que se estudia; un monocromador, que dispersa la energía radiante en sus muchas frecuencias, y, luego por una serie de rendijas o aberturas, selecciona la banda estrecha de frecuencias que incide sobre el detector. Este último componente transforma la energía de la banda de frecuencias en una señal eléctrica, que se amplifica lo suficiente para ser registrada (Conley, 1979).

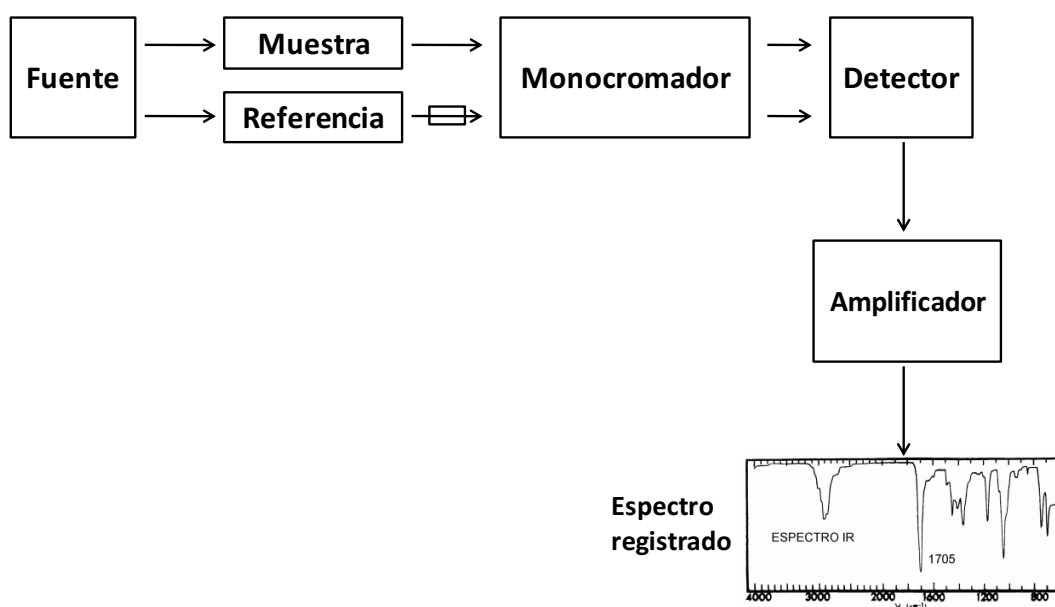


Figura 5. Esquema de un espectrofotómetro infrarrojo.

2.5.2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier: FTIR

Los instrumentos comerciales separan y miden la radiación IR empleando espectrofotómetros dispersivos o espectrofotómetros por transformada de Fourier (FTIR, Fourier Transform InfraRed).

La mayoría de los equipos modernos son espectrofotómetros por transformada de Fourier. Su nombre proviene del hecho de que la señal del detector de estos espectrofotómetros se relaciona mediante una transformada de Fourier con el espectro medido. En un equipo FTIR hay tres componentes básicos: fuente de radiación, interferómetro y detector.

El interferómetro divide la radiación incidente y genera una diferencia de camino óptico entre los haces. Luego los recombina para producir señales de interferencia repetitivas que son medidas en función de la diferencia de camino óptico por un detector. El interferograma contiene la información requerida para reconstruir el espectro por medio de la ecuación matemática conocida como transformada de Fourier (Sherman, 1997).

El interferómetro más comúnmente usado es el interferómetro de Michelson (Figura 6). Está compuesto por un espejo fijo, otro móvil y un divisor de haz. Los dos espejos se encuentran perpendiculares el uno al otro, siendo el espejo móvil el que genera una diferencia de camino óptico variable entre dos haces lo cual permite dar una señal al detector que contiene la información espectral. La luz emitida por la fuente de luz se divide por un divisor de haz: aproximadamente la mitad se refleja hacia el espejo fijo y desde allí se refleja nuevamente hacia el divisor de haz donde el 50% pasa para llegar al detector (flechas negras en la Figura 6). La otra mitad de la luz, atraviesa el divisor de haz y se refleja en el espejo móvil nuevamente al divisor de haz donde el 50% se refleja hacia el detector (flechas grises en la Figura 6). Ambos haces se recombinan. Esta recombinación da lugar a una interferencia, la cual puede ser constructiva o destructiva dependiendo de la diferencia de camino óptico. El haz resultante pasa a través de la muestra, en donde sucede la absorción selectiva de longitudes de onda, y finalmente llega al detector. El equipo mide la intensidad de luz relativa a la posición del espejo móvil y toma el interferograma. Es decir, que un interferograma es el registro de la intensidad de la radiación en función del tiempo. Luego la transformada de Fourier convierte el interferograma en un espectro IR. El espectro es la intensidad de la radiación en función del número de onda (Sherman, 1997 y Barth, 2007).

La principal ventaja de estos espectrofotómetros por transformada de Fourier es la velocidad y sensibilidad con respecto a los espectrofotómetros dispersivos. Además permiten examinar todas las frecuencias en simultáneo y presentan una alta relación señal/ruido.

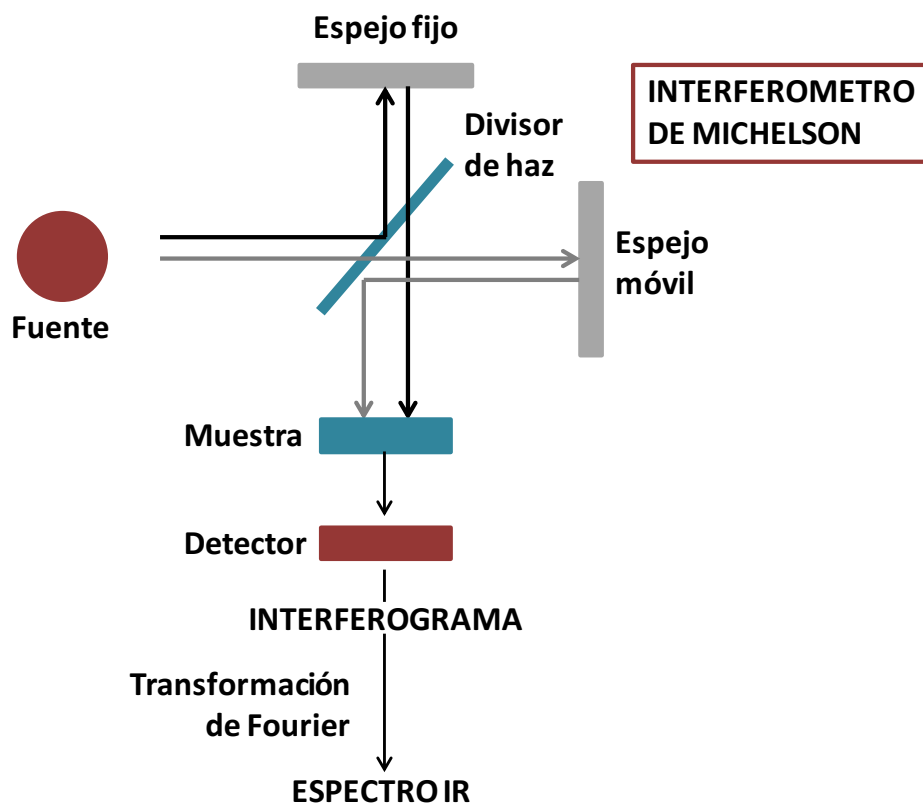


Figura 6. Esquema de un espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).

2.5.3. Reflectancia Total Atenuada (ATR) y Espectroscopia por Transformada de Fourier por Reflectancia Difusa (DRIFTS)

La reflectancia total atenuada (ATR, Attenuated Total Reflectance) es una técnica empleada especialmente para obtener espectros IR de muestras que no pueden ser examinadas fácilmente por los métodos de transmisión tradicionales. Es una metodología adecuada para el estudio de muestras sólidas y líquidas densas o

altamente absorbentes, incluyendo películas, recubrimientos, polvos, adhesivos, polímeros y soluciones acuosas. Las muestras a analizar no requieren preparación previa y es una de las técnicas de muestreo más versátiles.

La reflectancia total atenuada se presenta cuando la radiación pasa de un medio de mayor densidad (con un índice de refracción mayor) a uno de menor densidad (con un índice de refracción menor). La fracción del haz incidente que se refleja es mayor a medida que aumenta el ángulo de incidencia. La radiación incidente es completamente reflejada en la interfaz entre la muestra y el cristal, cuando el ángulo de incidencia es mayor que el ángulo crítico (éste es función del índice de refracción). El haz penetra una distancia muy corta más allá de la interfaz y en el medio de menor densidad previo a la reflexión total. La radiación que penetra se denomina onda evanescente y generalmente tiene una profundidad de unos pocos micrómetros (μm). Esta profundidad 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 interfaz. En las regiones del espectro IR, donde la muestra absorbe energía, la onda evanescente será atenuada (su intensidad se reduce), y este es el fenómeno conocido como reflectancia total atenuada (Sherman, 1997). La Figura 7 presenta esquemáticamente el recorrido del haz infrarrojo en una celda ATR.

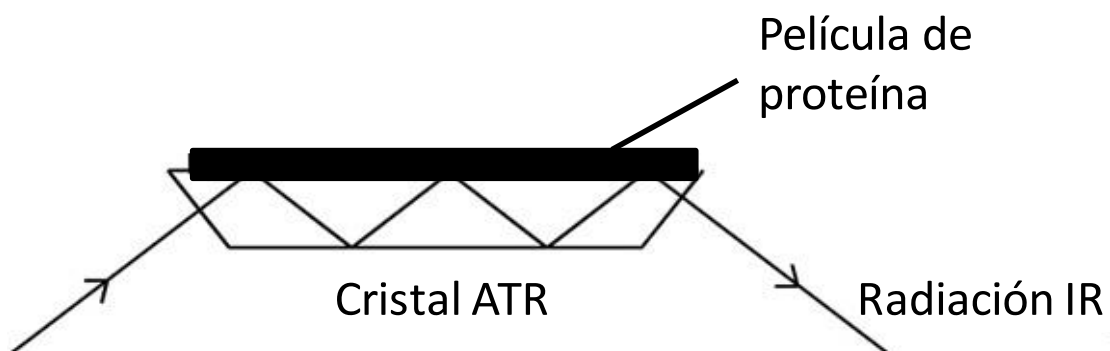


Figura 7. Esquema de funcionamiento de una celda ATR

La muestra se coloca como una fina película sobre un cristal transparente de alto índice de refracción. Mediante el ajuste adecuado del 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.

Por otro lado, la espectroscopia por transformada de Fourier por reflectancia difusa (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 radiación IR procedente del interferómetro se focaliza en la superficie de una muestra sólida en una copa y produce dos tipos de reflexiones: reflectancia especular, la cual refleja directamente fuera de la superficie y tiene ángulos iguales de incidencia y reflectancia, y la reflectancia difusa, que penetra en la muestra y luego se dispersa en todas las direcciones. Para recoger y reorientar la radiación difusamente esparcida hacia el detector se emplean grandes espejos elipsoidales. Estos minimizan o eliminan la reflectancia especular, la cual distorsiona los espectros IR (Figura 8) (Sherman, 1997).

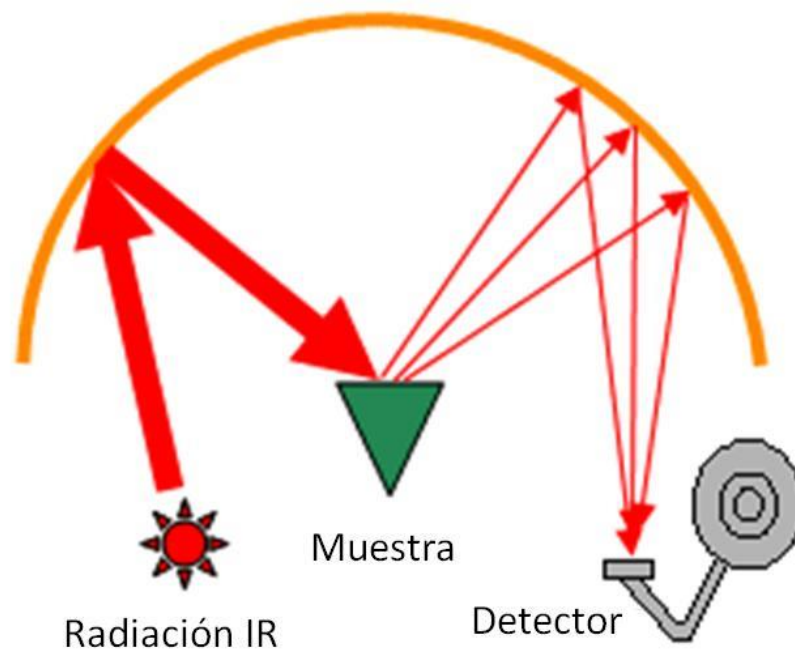


Figura 8. Esquema de funcionamiento de una celda DRIFT.

2.5.4. Metodología de análisis

En esta tesis se analizó el biocatalizador que estuvo en contacto con las mezclas alcohol-agua y los sólidos retenidos en los filtros como se describió previamente en la Sección 2.1.

El análisis se realizó con un equipo FTIR Bruker Vertex 70 en el modo absorción (70 scans, 4 cm^{-1}) y en condiciones ambientales, empleando un detector DLaTGS. Para el análisis de muestras sólidas, el material se molió y homogeneizó con KBr (Riedel-de Haën). Este es un haluro inorgánico que no absorbe en la región del infrarrojo. La mezcla homogénea se comprimió para obtener una pastilla transparente, aplicando una compresión de 1000 kg/cm^2 .

2.5.5. Determinación de estructura secundaria de proteínas

2.5.5.1. Fundamento

Como se mencionó previamente, las técnicas de espectroscopia infrarroja también son aplicables a sistemas biológicos, esto hace una técnica útil para el estudio de la estructura de proteínas. La espectroscopia FTIR es una herramienta útil para estudiar la conformación de las proteínas en solución acuosa, así como en forma deuterada o seca, lo cual ha resultado en un uso ampliamente expandido en estudios de estructura secundaria y dinámica de proteínas en la última década. Aunque la cristalografía de rayos X provee información más detallada en cuanto a la posición de átomos individuales en la estructura de la proteína, no es posible para todas las proteínas formar un cristal de la calidad necesaria para su análisis. Además, la información que brinda la cristalografía de una proteína no puede ser extrapolada fácilmente a las propiedades dinámicas de las proteínas en solución. La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (MNR, Magnetic Nuclear Resonance) podría ser una alternativa a la cristalografía de rayos X en solución pero la interpretación de espectro RMN de una

proteína de gran tamaño es un proceso muy tedioso (Kong & Yu, 2007). Por lo tanto, las espectroscopias vibracionales, entre las cual se incluyen FTIR y dicroísmo circular (CD, Circular Dichroism), continúan siendo comúnmente usadas para el estudio de proteínas.

El espectro infrarrojo de una proteína está compuesto por 4 bandas de absorción en infrarrojo características (y sus respectivas frecuencias de absorción):

- Amida A y amida B (3070 a 3300 cm^{-1}): la vibración de tensión del enlace $\nu(\text{N-H})$ da lugar a la banda amida A localizada entre 3310 y 3270 cm^{-1} . Esta banda se debe exclusivamente a la vibración del grupo N-H y es insensible a la conformación de la cadena principal o “backbone” de la proteína. Su frecuencia depende de la fuerza del enlace de hidrógeno. La banda amida A generalmente es parte de un doblete de resonancia de Fermi con un segundo componente que absorbe débilmente entre 3030 y 3100 cm^{-1} (amida B) (Barth, 2007).
- Amida I (1600 a 1700 cm^{-1}): la vibración amida I, centrada en 1650 cm^{-1} , surge principalmente por la vibración de tensión del enlace carbonilo $\nu(\text{C=O})$ de la cadena principal de las proteínas (aproximadamente un 80%) y por lo tanto es sensible a la estructura secundaria. En esta banda se encuentran superpuestas un grupo de señales, que corresponden a las frecuencias de los componentes de la estructura secundaria de la proteína (Kong & Yu, 2007). Esta sensibilidad de la vibración de la banda amida I a la estructura secundaria permite el estudio del plegamiento, como así también el desplegamiento y agregación de las proteínas.

En esta región también se presentan contribuciones menores correspondientes a las vibraciones de tensión del enlace $\nu(\text{C-N})$ fuera de fase, la deformación C-N-N y la flexión en el plano del enlace $\delta(\text{N-H})$. 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 los aminoácidos en la cadena lateral, sin embargo, como se mencionó anteriormente, es fuertemente dependiente de la estructura secundaria de la proteína.

El mecanismo fundamental que hace que la amida I sea sensible a la estructura secundaria es la transición dipolar de acoplamiento (TDC, Transition Dipole Coupling) 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. El acoplamiento es más fuerte cuando los osciladores acoplados vibran con la misma frecuencia.

Por otro lado, la frecuencia de la banda amida I de los polipéptidos puede ser modificada en distintos grados por puentes de hidrógeno. Cada uno de los posibles puentes de hidrógeno al grupo C=O disminuye la frecuencia de la banda amida I en 20 o 30 cm^{-1} y un puente de hidrógeno al grupo N-H en 10 a 20 cm^{-1} (Barth, 2007).

- Amida II (1550 cm^{-1}): es la combinación fuera de fase de la flexión en el plano del enlace $\delta(\text{N-H})$ y la vibración de tensión del enlace $\nu(\text{C-N})$ con pequeñas contribuciones de la flexión en el plano de enlace $\delta(\text{C-O})$ y la vibración de tensión del enlace $\nu(\text{C-C})$ y $\nu(\text{N-C})$. Al igual que la vibración de la banda amida I, amida II difícilmente es afectada por las vibraciones de la cadena lateral 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 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 entre 1490 y 1460 cm^{-1} . La vibración de flexión de $\delta(\text{N-}^2\text{H})$ 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 (Barth, 2007).
- Amida III (1200 a 1400 cm^{-1}): el modo amida III es combinación en fase de la flexión $\delta(\text{N-H})$ y la vibración de tensión del enlace $\nu(\text{N-C})$, con pequeñas

contribuciones de la flexión de $\delta(\text{C-O})$ en el plano y de la vibración de tensión del enlace $\nu(\text{C-C})$. Además depende de la estructura de la cadena lateral y desde la flexión $\delta(\text{N-H})$ contribuye a diversos modos en la región $1400 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ (Barth, 2007).

También se conocen otras bandas de absorción IR características de las proteínas. Estas se llamaron amida IV, V, VI y VII. Sin embargo, estas son muy complejas, dependen de la naturaleza de la cadena lateral y los puentes de hidrógeno, lo que las convierte en bandas inútiles para los estudios de conformación de proteína (Kong & Yu, 2007). En la Tabla 2 se resumen las frecuencias aproximadas que componen un espectro infrarrojo de proteínas, indicando las vibraciones responsables de dicha absorción. La Figura 9 muestra el espectro infrarrojo obtenido para la lipasa B de *Candida antarctica* (Sigma Aldrich Argentina) detectándose claramente las bandas amida A, amida I y amida II.

Tabla 2. Bandas características de uniones peptídicas de proteínas

Banda amida	Frecuencia aproximada (cm^{-1})	Descripción
A	3270-3310	$\nu(\text{O-H})$
B	3030-3100	$\nu(\text{N-H})$
I	1600-1700	$\nu(\text{C=O})$
II	1550	$\nu(\text{C-N}), \delta(\text{N-H})$
III	1200-1400	$\nu(\text{C-N}), \delta(\text{N-H})$
IV	620-770	$\delta(\text{OCN})$
V	640-800	$\gamma(\text{N-H})$
VI	540-600	$\gamma(\text{C=O})$
VII	200	Torsión del esqueleto

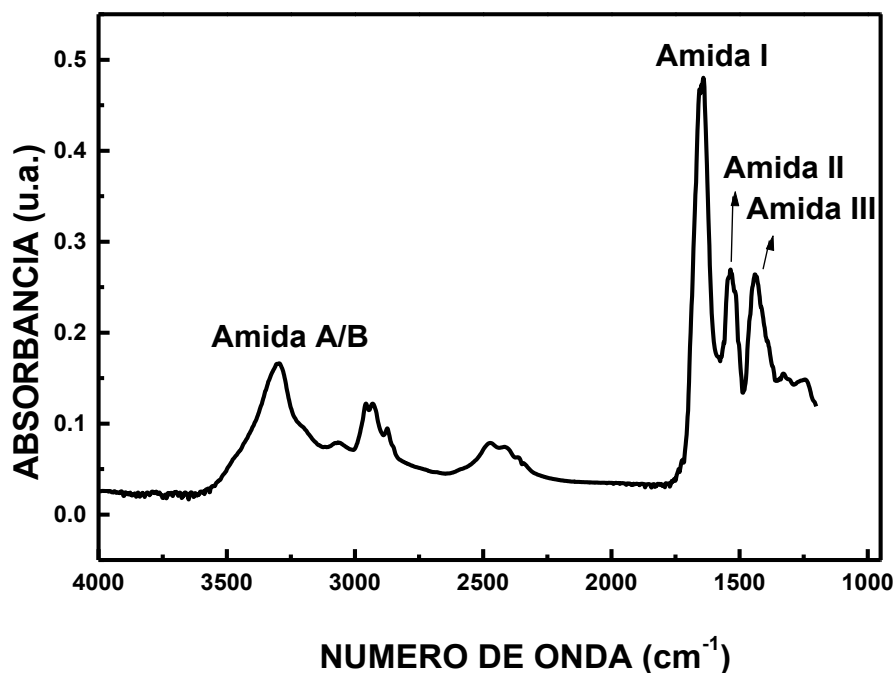


Figura 9. Espectro FTIR de la lipasa B de *Candida antarctica*.

2.5.5.2. Información provista por la banda amida I respecto de la estructura secundaria de proteínas

El uso más común de la espectroscopia infrarroja en el estudio de proteínas es el análisis de la estructura secundaria. Este se lleva a cabo principalmente empleando la banda amida I, sin embargo las bandas amida II y III también pueden ser de utilidad.

Los componentes de la estructura secundaria de proteínas fueron descritos con detalle en el Capítulo 1. En la Tabla 3, estos componentes de la estructura secundaria se encuentran asignados a distintas posiciones de las señales IR de la zona amida I y fueron las que se emplearon en esta investigación. Esta tabla es una recopilación de asignaciones empleadas por diversos autores (Barth, 2007; Collins *et al*, 2011; Llerena-Suster *et al*, 2012). Así, las hélices α muestran una banda de absorción intensa a 1654 cm^{-1} . También es posible identificar una banda a 1643 cm^{-1} , la cual es asignada usualmente a estructuras desordenadas o aleatorias (random structure). Las láminas β

(β -sheets) presentan tres señales a 1631, 1637 y 1683 cm^{-1} . Además, los agregados de proteínas presentan una a banda 1619 cm^{-1} , característica de láminas β intermoleculares (Barth, 2007). Por último, los giros β muestran 3 señales a 1664, 1666 y 1676 cm^{-1} .

Tabla 3. Asignaciones de las posiciones de las bandas en la zona amida I correspondientes a los componentes de la estructura secundaria.

Componente	Posición en D ₂ O (cm^{-1})	
	Promedio	Extremos
Hélice α	1654	1642 - 1660
Lámina β	1631	1615 - 1638
	1637	
	1686	1672 - 1694
Giros β	1664	1653-1691
	1666	
	1676	
Aleatoria	1643	1639 - 1654
Agregados β	1619	1605 - 1625

2.5.5.3. Eliminación de interferencia del H₂O: Intercambio isotópico

La hidratación de proteínas involucra la protonación de grupos carboxilato, formación de puentes de hidrógeno entre el agua y grupos C=O/N-H del esqueleto de las proteínas, pudiendo algunos de estas enlaces sustituir puentes de hidrógeno N-H---O=C pre-existentes, e inserción de moléculas de agua sin afectar uniones de hidrógeno de las proteínas. Un considerable número de moléculas de agua permanecen asociadas en proteínas secas (Barth, 2007). La vibración de flexión del enlace $\delta(\text{O-H})$ de estas moléculas de H₂O absorbe comúnmente en el infrarrojo a 1640 cm^{-1} (Kong & Yu, 2007).

En la Figura 10, se muestran el espectro de la enzima CALB disuelta en agua con las bandas características de IR asignadas. A modo de referencia, se incluye un espectro de agua pura adquirido en las mismas condiciones.

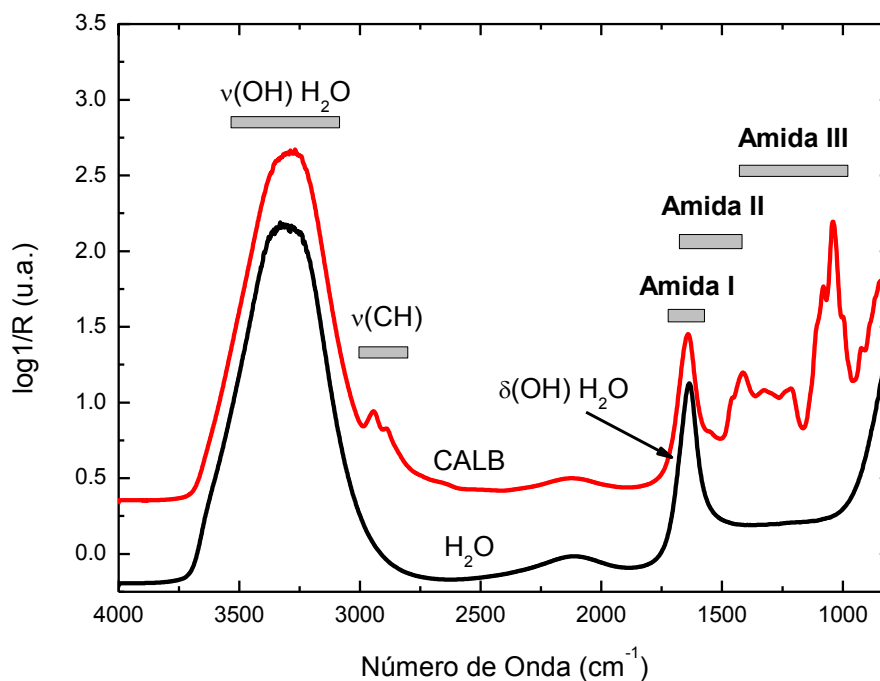


Figura 10. Espectros ATR-FTIR de CALB disuelta en agua y de agua pura.

Como se puede observar en la figura, las señales muy intensas correspondientes al solvente, H_2O , impedirían el correcto análisis de la banda amida I, la cual como se mencionó anteriormente permite obtener información sobre la estructura secundaria de la enzima. Para evitar esta interferencia, se intercambian las moléculas de H_2O por óxido de deuterio (D_2O), lo cual al desplazar las señales de espectro por un factor de 1.37 debido al efecto isotópico, permite el registro correcto de la banda amida I (Llerena-Suster *et al*, 2012).

Para evaluar la evolución del intercambio isotópico se sigue la disminución en la intensidad en la banda amida II, ya que esta no se ve afectada por las bandas de absorción del H_2O , HOD o D_2O (Kong & Yu, 2007). En general, las asignaciones en IR

características de las proteínas se desplazan entre 5 y 10 cm^{-1} números de onda menos cuando la proteína es expuesta a D_2O (Meskers *et al*, 1999).

2.5.5.4. Metodología de análisis

Se estudió la estructura secundaria de la lipasa B de *Candida antarctica* pura e inmovilizada en Novozym® 435. La estructura de la enzima en el biocatalizador se analizó sin tratamiento previo, luego de la exposición de 8 días a las mezclas alcohol-agua y se siguió su evolución durante las reacciones de esterificación de R/S-ketoprofeno (reacciones que se describen en el Capítulo 3).

El análisis de la enzima pura se llevó a cabo mediante reflectancia total atenuada (ATR-FTIR). Para ello se empleó la enzima CALB purificada a partir del extracto crudo de Novozymes y posteriormente liofilizada facilitada por el Dr. Carlos Llerena-Suster (Llerena-Suster *et al*, 2014). Se disolvieron 5 mg de la misma en 500 μL de D_2O (Cambridge Isotope Laboratories, $\text{D}>99\%$). La mezcla se colocó en la celda de ATR de modo de preparar una película homogénea de la enzima sobre el cristal. El cristal de ATR empleado de ZnSe trapezoidal de 45° posee dimensiones de 80 mm x 10 mm x 4 mm y provee 10 reflexiones internas ($d_p = 1, 7 \mu\text{m}$ para $n_2=1, 5$ a 1000 cm^{-1}). Los espectros de infrarrojo se colectaron usando un espectrofotómetro FTIR Nicolet 8700 equipado con un detector criogénico MCT-A. Se adquirieron 25 scans a una resolución de 4 cm^{-1} . La bancada del espectrofotómetro y los espejos que direccionan la radiación a la celda de ATR fueron continuamente purgados con aire seco (con un generador Parker Balston) para eliminar las contribuciones del CO_2 y de vapor de agua en los espectros. La película se dejó secar toda la noche mediante esta corriente de aire seco.

Los distintos estudios de la enzima inmovilizada se realizaron mediante espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia difusa (DRIFT). Previamente al análisis por DRIFT, se llevó a cabo el intercambio isotópico con D_2O . El intercambio isotópico se realizó poniendo en contacto la muestra con 100 μL de óxido de deuterio bajo agitación vigorosa por 10 minutos y posterior incubación durante la

noche a temperatura ambiente. Los espectros DRIFT se registraron utilizando un módulo Harrick con sistema de espejos del tipo Praying Mantis. Para adquirir los espectros (4 cm^{-1} , 25 scans) se utilizó el espectrofotómetro FTIR Nicolet 8700 con un detector criogénico MCT-A. El espectrómetro y los espejos que dirigen la radiación hacia la celda son continuamente purgados con aire seco para eliminar la contribución del CO_2 y el vapor de agua del espectro.

A los fines de estimar la estructura secundaria se realizó la deconvolución de los componentes de la banda amida I empleando sumas de curvas Lorentzianas, para identificar la posición de los picos y sus intensidades relativas. El software usado con este propósito fue un módulo especial de ajuste de picos de Origin 5.0. Las posiciones y número de componentes se determinaron a través del análisis de la segunda derivada del espectro. La contribución de cada componente de la banda Amida I se evaluó mediante la integración del área bajo la curva y luego normalizando el área total de la banda Amida I (esta metodología será descrita con mayor detalle en la Sección 3.1.4.1. del Capítulo 3).

2.6. ANÁLISIS DE TEXTURA

2.6.1. Fundamentos de Microscopía Electrónica de Barrido

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 es uno de los instrumentos más versátiles para el 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) (Bonetto, 2000).

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 (Bonetto, 2000).

Cuando un haz de electrones choca con la superficie de una muestra se producen distintos y complejos fenómenos en una profundidad que va hasta 500 Å. Las interacciones más importantes son 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 (≈ 1 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 (Bonetto, 2000).

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 eV), de 50 a 500 Å de profundidad.

Aproximadamente el 98 % de las interacciones son de tipo elástico y el 2 % restante son inelásticas.

Las interacciones inelásticas pueden ser de dos tipos:

- 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 radiactiva, es decir la energía disponible de tal transición es utilizada por el átomo para eyectar otro electrón. Este efecto, que se produce hasta una profundidad de 10 Å, 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 (Bonetto, 2000).

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) que permite coleccionar los rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis e imágenes de distribución de elementos en superficies pulidas.

2.6.2. Metodología de análisis

Se investigó la textura interna de Novozym® 435 antes y después del tratamiento con las mezclas alcohol-agua por 8 días, y el biocatalizador (con y sin previa exposición al alcohol) luego de 72 h de reacción empleando un microscopio electrónico de barrido ambiental ESEM FEI Quanta 400. Las muestras se prepararon como películas ultradelgadas en un portaobjetos mediante la incorporación del biocatalizador en una resina LR White y el corte con un micrótopo. Estas muestras, cubiertas por una capa de oro conductiva para evitar cargas eléctricas en la superficie, se observaron en el microscopio electrónico en modo alto vacío.

Se tomaron imágenes de las muestras a 8400x y se analizaron con el programa FERImage de modo de obtener la dimensión fractal, D, y el parámetro d_{min} usando el método del variograma (Bianchi & Bonetto, 2001; Ladaga & Bonetto, 2003; Pentland, 1984). El variograma, empleado para determinar los parámetros que caracterizan la rugosidad superficial, consiste en un gráfico de discrepancia (varianza) de la variación de altura en una superficie en diferentes pasos, como una función de tales pasos y en escala logarítmica. La pendiente del gráfico se relaciona con la dimensión fractal D mediante la ecuación:

$$D = 3 - \text{pendiente} / 2$$

Otra manera de obtener información acerca de la 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 (Pentland, 1984).

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} (Bonetto & Ladaga, 1998). Los parámetros D y d_{min} se utilizaron en esta investigación para caracterizar la textura de las imágenes correspondientes a las diferentes muestras. El parámetro d_{min} corresponde al extremo inferior de la región de la escala periódica descrita anteriormente. En definitiva, representa la celda de menor tamaño con suficiente peso estadístico para producir periodos.

Los valores de dimensión fractal que van desde $2 < D < 2.5$ indican una superficie lisa persistente mientras que valores $2.5 < D < 3$ son una indicación de anti persistencia, siendo una superficie completamente rugosa cuando D es cercano a 3. Vale la pena notar que el parámetro D determinado en este trabajo, es estrictamente un estimador de la dimensión fractal ya que el rango lineal en el gráfico (correspondiente al comportamiento fractal de la muestra) no es muy extenso y además, la región lineal incluye información combinada: correspondiente a la propia muestra y al micrófono utilizado para cortar porciones de la muestra.

2.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *BiochimBiophysActa* 2007, 1767, 1073-1101.

Bianchi FD, Bonetto RD. FERImage: an interactive program for fractal dimension, dper and dmin calculation. *Scanning* 2001, 23, 193-197.

Bonetto RD. Tesis doctoral "Determinación de parámetros físicos de señales provenientes del microscopio electrónico de barrido", 2000, Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

Bonetto RD, Ladaga JL. The variogram method for characterization of scanning electron microscopy images. *Scanning* 1998, 20, 457-463.

Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem* 1989, 180, 136-139.

Chen B, Hu J, Miller EM, Xie W, Cai M, Gross RA. *Candida antarctica* lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: catalysts for polyester synthesis. *Biomacromolecules* 2008, 9, 463-471.

Collins SE, Lassalle V, Ferreira ML. FTIR-ATR characterization of free *Rhizomucormieheilipase* (RML), Lipozyme RM IM and chitosan-immobilized RML. *J MolCatal B Enzym* 2011, 72, 220-228.

Conley RT. *Espectroscopia infrarroja*. Editorial Alhambra S.A., 2° edición, 1979, Madrid, España.

Foresti ML, Galle M, Ferreira ML, Briand LE. Enantioselective esterification of ibuprofen with ethanol as reactant and solvent catalyzed by immobilized lipase: experimental and molecular modeling aspects. *J Chem Technol Biotechnol* 2009, 84, 1461-1473.

Gambaro LA, Briand LE. In situ quantification of the active acid sites of $H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot nH_2O$ heteropoly-acid through chemisorptions and temperature programmed surface reaction of isopropanol. *Appl Catal A: Gen* 2004, 264, 151-159.

José C, Bonetto RD, Gambaro LA, Guauque Torres MP, Foresti ML, Ferreira ML, Briand LE. Investigation of the causes of deactivation-degradation of the commercial biocatalyst Novozym® 435 in ethanol and ethanol-aqueous media. *J Mol Catal B: Enzym* 2011, 71, 95-107.

José C. Tesis doctoral: "Resolución biocatalítica de los enantiómeros de ibuprofeno", 2013, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim Biophys Sin* 2007, 39, 549-559.

Ladaga JL, Bonetto RD. Characterization of texture in scanning electron microscope images. *Advances in Imaging and Electron Physics* 2002, 120, 135-191.

Leach AR. *Molecular modeling: principles and applications*. Editorial Pearson Education, 2° edición, 2001, Edinburgh Gate, Harlow England.

Llerena-Suster CR, José C, Collins SE, Briand LE, Morcelle SR. Investigation of the structure and proteolytic activity of papain in aqueous miscible organic media. *Process Biochem* 2012, 47, 47-56.

Llerena-Suster CR, Briand LE, Morcelle SR. Analytical characterization and purification of a commercial extract of enzymes: a case study. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014, 121, 11-20.

Meskers S, Ruyschaert J-M, Goormaghtigh E. Hydrogen-deuterium exchange of streptavidin and its complex with biotin studied by 2D-Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J Am Chem Soc* 1999, 121, 5115-5122.

Pentland AP. Fractal based description of natural scenes. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* 1984, 6, 661-674.

Schroeder SLM, Gottfried M. Temperature-Programmed Desorption (TPD) and Thermal Desorption Spectroscopy (TDS). Advanced Physical Chemistry Laboratory, Freie University, Berlin, 2002. URL: <http://www.chemie.fu-berlin.de/~pcprakt/tds.pdf>

Sherman HsuC-P. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. infrared spectroscopy. F. Settle (Ed.), Prentice-Hall, Inc., 1997, 247–283, Upper Saddle River, New Jersey.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 1985, 150, 76-85.

CAPÍTULO 3

**EFFECTO DE LOS ALCOHOLES DE CADENA
CORTA EN EL BIOCATALIZADOR
COMERCIAL NOVOZYM® 435**

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos al llevar a cabo la metodología descrita en el Capítulo 2 para dilucidar el efecto de los alcoholes de cadena corta sobre el biocatalizador comercial Novozym® 435. Adicionalmente, se incluyen los resultados obtenidos por la Dra. José en el tratamiento del biocatalizador con etanol-agua bajo las mismas condiciones.

3.1. ESTABILIDAD DE NOVOZYM® 435 LUEGO DEL CONTACTO CON LAS MEZCLAS ALCOHOL- AGUA

Como se detalla a continuación la exposición prolongada del biocatalizador comercial Novozym® 435 a las mezclas alcohol-agua provoca la disolución del mismo, lo que conlleva a la pérdida de soporte polimérico y enzima.

3.1.1. Efecto de la exposición prolongada del biocatalizador a los alcoholes

El tratamiento llevado a cabo sobre el biocatalizador permitió obtener información sobre el efecto que los medios alcohol-agua tienen sobre la integridad física del mismo. Luego del contacto de 8 días, el biocatalizador y los sólidos retenidos en los filtros se analizaron por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.

En la Tabla 1 se resumen las posiciones de las bandas y asignaciones de las señales de infrarrojo para Novozym® 435 antes y después del tratamiento con cada medio alcohol-agua, el soporte polimérico Lewatit VP OC 1600, la enzima CALB y los sólidos recuperados luego del tratamiento.

Tabla 1. Señales infrarrojas y naturaleza de los grupos orgánicos que se detectaron en Novozym® 435, Lewatit VP OC 1600, lipasa *Candida antarctica* (CALB), el biocatalizador y los sólidos recuperados luego de tratar Novozym® 435 con las mezclas alcohol-agua.

	Números de onda (cm ⁻¹)										
	$\nu(\text{O-H})^1$	$\nu(\text{N-H})^2$	$\nu(\text{CH}_3)^3$	$\nu(\text{C=O})^4$	Amida I	Amida II	$\nu(\text{C=C})^5$	$\delta_{\text{as}}(\text{C-H})^6$	$\delta_{\text{s}}(\text{C-H})^6$	$\omega(\text{CH}_2)$ $\tau(\text{CH}_2)^7$	$\gamma(\text{C-H})^8$
Lipasa CALB		3331	2931 2951		1653	1540					
Lewatit VPOC 1600	3444		2873 2950	1730			1511 1456	1385	1363	1270-1090	990, 950, 834, 799, 759, 708
Novozym® 435	3438		2876 2952	1734	1654		1456	1387	1363	1270-1090	990, 950, 843, 801, 760, 706
Novozym® 435/metanol	3550 3434 3293		2960 2923 2850	1733	1649	1540	1457	1385		1264-1117	992, 960, 840, 798, 758, 708
Sólidos recuperados (metanol)	3429 3300		2950 2875	1731	1653	1538	1451	1385		1271-1070	988, 963, 894, 842, 796, 760, 706
Novozym® 435/etanol	3562 3438 3280		2955 2925 2876	1735	1650	1545	1455	1390		1271-1142	992, 902, 843, 798, 763, 708
Sólidos recuperados (etanol)	3438		2950 2875	1735	1665	1540	1459	1390		1271-1141	847, 797, 762, 707, 667

Tabla 1, continuación

	Números de onda (cm ⁻¹)										
	$\nu(\text{O-H})^1$	$\nu(\text{N-H})^2$	$\nu(\text{CH}_3)^3$	$\nu(\text{C=O})^4$	Amida I	Amida II	$\nu(\text{C=C})^5$	$\delta_{\text{as}}(\text{C-H})^6$	$\delta_{\text{s}}(\text{C-H})^6$	$\omega(\text{CH}_2)$ $\tau(\text{CH}_2)^7$	$\gamma(\text{C-H})^8$
Novozym® 435/1-propanol	3548 3435 3288		2950 2874	1730	1648	1543	1454	1385		1267-1070	990, 965, 898, 840, 793, 760, 705
Sólidos recuperados (1-propanol)	3434		2950 2925 2854	1730	1636	1540	1454	1383		1275-1033	990, 906, 835, 789, 760, 702
Novozym® 435/2-propanol	3548 3438 3289		2954 2872	1732	1657	1545	1452	1385		1270-1070	990, 957, 900, 842, 795, 762, 708
Sólidos recuperados (2-propanol)	3435 3301		2876 2952	1735	1655	1544	1455	1385		1274-1070	992, 962, 902, 841, 796, 762, 710

¹ $\nu(\text{O-H})$: vibración de tensión de enlace O-H

² $\nu(\text{N-H})$: vibración de tensión del enlace N-H

³ $\nu(\text{CH}_3)$: vibración de tensión del enlace metilo

⁴ $\nu(\text{C=O})$: vibración de tensión del enlace carbonilo

⁵ $\nu(\text{C=C})$: vibración de tensión del enlace C=C del anillo aromático

⁶ $\delta(\text{C-H})$: vibración de flexión del enlace metilo. as: asimétrica; s: simétrica

⁷ $\omega(\text{CH}_2)$ y $\tau(\text{CH}_2)$: vibración de torsión y cabeceo de los grupos metileno

⁸ $\gamma(\text{C-H})$: vibración de flexión fuera de plano de los grupos aromáticos C-H

La Figura 1 compara los espectros infrarrojos de la enzima lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) comercial de Sigma Aldrich, Novozym®435 y el soporte sólido Lewatit VP OC 1600.

El espectro infrarrojo de la lipasa B de *Candida antarctica* posee una señal intensa centrada en 3331 cm^{-1} debido a las vibraciones de tensión de las especies $\nu(\text{N-H})$ que se superponen a las vibraciones de tensión de los enlaces $\nu(\text{O-H})$ (José *et al*, 2011; Barth, 2007; Foresti *et al*, 2010). Adicionalmente, la lipasa posee las bandas intensas correspondientes a las señales amida I y amida II centradas en 1653 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} , respectivamente (Barth, 2007). La señal de infrarrojo conocida como amida I surge de la vibración de tensión del enlace carbonilo $\nu(\text{C=O})$ de la cadena principal 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 fuera del plano de la vibración de flexión en el plano del enlace $\delta(\text{N-H})$ y la vibración de tensión del enlace $\nu(\text{C-N})$ de las proteínas. Estas señales se describieron más detalladamente en la Sección 2.5.5.1. del Capítulo 2.

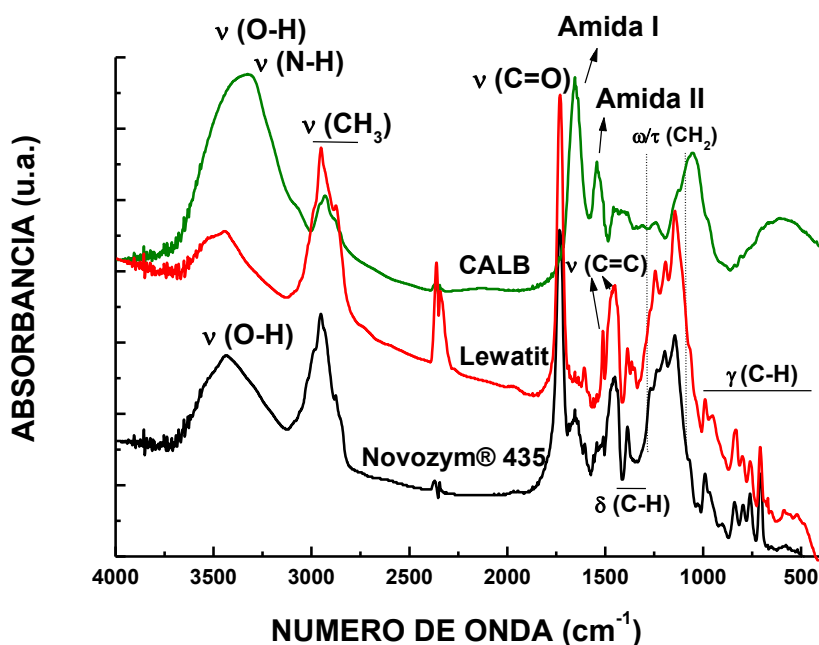


Figura 1. Espectro infrarrojo de Novozym®435, lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) de alta pureza y el soporte sólido Lewatit VP OC 1600.

El soporte Lewatit VP OC 1600 posee una señal intensa en 1730 cm^{-1} debido a la vibración de tensión de los grupos carbonilo $\nu(\text{C}=\text{O})$ del polimetilmetacrilato (PMMA) – $(\text{CH}_2\text{CCH}_3)_n\text{-CO-O-CH}_3$ (detalles de este polímero fueron descritos en el Capítulo 1, Sección 1.4.5.1., Figura 19) (José *et al*, 2011; José & Briand, 2010; Mei *et al*, 2003; Silverstein, 1991). Además, se observan las señales intensas pertenecientes a las vibraciones de tensión simétrica y asimétrica de los grupos metilo ($\nu_s(\text{CH}_3)$ en 2950 cm^{-1} y $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ en 2873 cm^{-1} , respectivamente) junto con las vibraciones de flexión simétrica y asimétrica (de intensidad débil) de los mismos grupos ($\delta_s(\text{CH}_3)$ en 1385 cm^{-1} y $\delta_{as}(\text{CH}_3)$ en 1363 cm^{-1} , respectivamente) (José *et al*, 2011; Silverstein, 1991; NIST Chemistry Webbook). Estas últimas dos señales son características de la vibración C-H de los grupos metilo y metileno unidos a un átomo de carbono terciario tal como se encuentran en el PMMA. El conjunto de señales intensas observado entre 1270 cm^{-1} y 1090 cm^{-1} son características de las vibraciones de torsión y cabeceo de los grupos metileno ($\tau(\text{CH}_3)$ y $\omega(\text{CH}_3)$) fuera del plano. La presencia de divinilbenceno (empleado como agente de reticulación en el PMMA) se evidencia a través del doblete de intensidad media en 1511 cm^{-1} y 1456 cm^{-1} debido a las vibraciones de tensión de enlaces $\nu(\text{C}=\text{C})$ en el anillo aromático. Además el grupo de señales débiles que se observan entre 990 cm^{-1} y 708 cm^{-1} es característico de vibraciones de flexión fuera del plano del enlace $\gamma(\text{C-H})$ de bencenos alquil sustituidos (Silverstein, 1991; NIST Chemistry Webbook).

La resina de PMMA no posee especies O-H por lo tanto, la señal ancha de intensidad media en 3444 cm^{-1} podría atribuirse a moléculas de agua adsorbidas.

Como es de esperarse, el biocatalizador comercial Novozym® 435 posee tanto las señales pertenecientes a la enzima CALB (la señal amida I se observa en 1654 cm^{-1}) como las características del polímero macroporoso Lewatit VP OC 1600.

En la Figura 2 se presentan los espectros infrarrojos obtenidos para los sólidos retenidos en los filtros. Estos filtros permitieron separar los restos insolubles en el líquido remanente del tratamiento de 1.000 g de biocatalizador con 10.00 mL de alcohol-agua y los sólidos remanentes en los sucesivos lavados con alcohol. El análisis de estos espectros muestra señales de infrarrojo compatibles tanto con la enzima

CALB como con especies del soporte macroporoso Lewatit VP OC 1600 según la similitud de las señales de infrarrojo (ver Tabla 1), por lo tanto se puede verificar la presencia de estas especies en los sólidos retenidos en los filtros lo cual evidencia cierta disolución del biocatalizador que estuvo en contacto con los distintos medios alcohol-agua. Estos resultados son similares a los reportados previamente por José *et al* en términos del efecto perjudicial de etanol sobre Novozym® 435 (José *et al*, 2011).

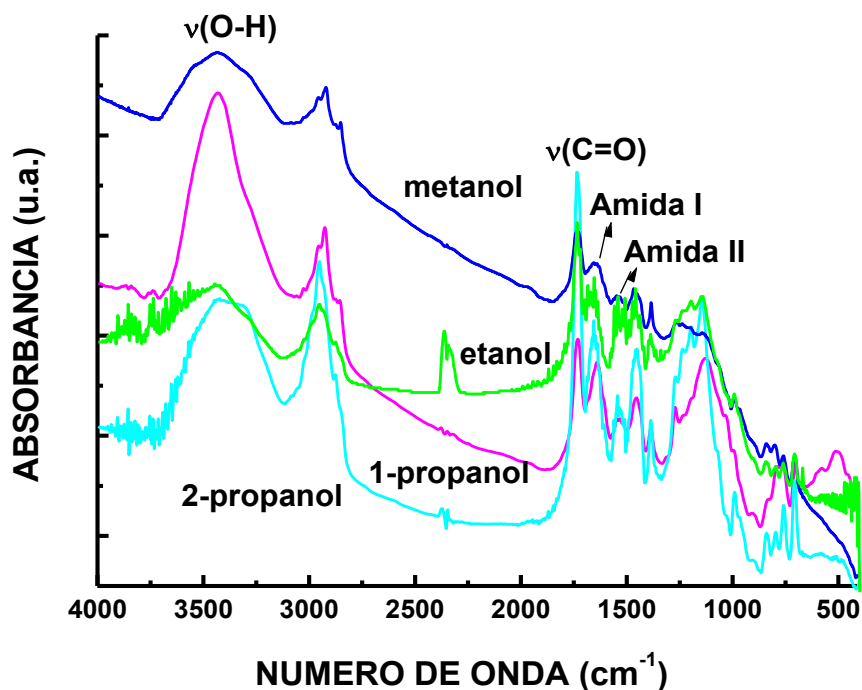


Figura 2. Espectros infrarrojos de sólidos retenidos en filtros luego del tratamiento de Novozym® 435 con los alcoholes metanol, etanol, 1- y 2-propanol con 4.76 % (v/v) de agua.

Los espectros infrarrojos del biocatalizador luego de 8 días de exposición a las mezclas alcohol-agua se presentan en la Figura 3. Se observan señales nuevas en aproximadamente 3550 cm^{-1} , 3290 cm^{-1} y 2925 cm^{-1} . Las señales observadas como hombros en 3550 cm^{-1} y 3290 cm^{-1} corresponden a la vibración de tensión del enlace $\nu(\text{O-H})$ de los alcoholes que permanecieron adsorbidos aunque el biocatalizador se haya dejado evaporar previo a su análisis. Esta señal fue previamente atribuida a vibraciones de tensión del enlace $\nu(\text{O-H})$ de moléculas de los alcoholes por distintos

autores. En primer lugar, Zawadzki *et al* reportaron la adsorción de moléculas de 2-propanol no disociado en muestras que contienen carbono (Zawadzki *et al*, 2001). De la misma manera, esta señal fue asignada al metanol adsorbido en la superficie de $\text{MoO}_3/\text{TiO}_2$ (Burchman *et al*, 2001 (a)). Además, se atribuyó esta señal a los grupos (clusters) de puentes de hidrógeno que se forman entre las moléculas de etanol adsorbidas (Mizukami *et al*, 2002). Por último, se asignó a las vibraciones de tensión del grupo $\nu(\text{O-H})$ del 1-propanol unido por puentes de hidrógeno en una matriz de argón (Michniewicz *et al*, 2008).

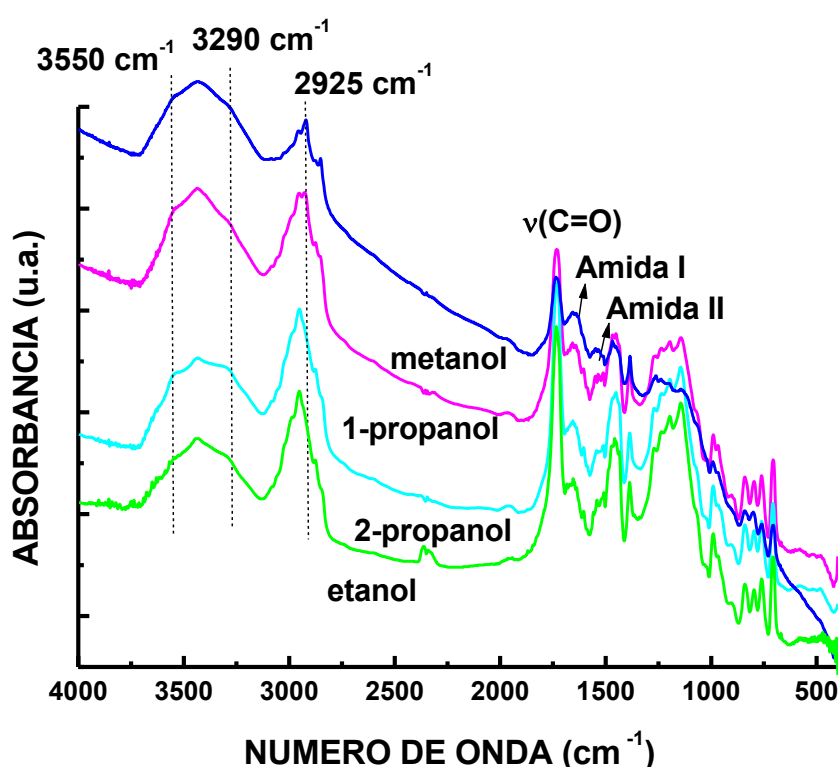


Figura 3. Espectros infrarrojos del biocatalizador comercial Novozym® 435 luego del tratamiento con los alcoholes metanol, etanol, 1- y 2-propanol con 4.76 % (v/v) de agua.

Por otro lado, la señal observada en 2925 cm^{-1} corresponde a la vibración de tensión de los grupos metileno $\nu(\text{CH}_2)$ de los alcoholes adsorbidos (Burchman *et al*,

2001 (a)). Como se puede apreciar en la Figura 3, esta señal sólo es apreciable para los tratamientos con metanol y 1-propanol.

Esta interacción con los alcoholes observada se corroboró mediante el análisis de TPD como se describirá en la Sección 3.1.2.

3.1.2. Interacción superficial de los alcoholes con Novozym® 435

La interacción del metanol, etanol y 1- y 2-propanol con 4.76% (v/v) de agua con el biocatalizador Novozym® 435 se estudió mediante análisis de desorción térmica programada TPD de las especies que permanecen adsorbidas en la superficie del biocatalizador luego de estar en contacto con estos alcoholes por un período de 8 días a 45 °C como se describió en el Capítulo 2, Sección 2.3.

Estos estudios demostraron que el metanol, 1- y 2-propanol se adsorben sobre la superficie del biocatalizador al igual que se observó cuando el biocatalizador estuvo en contacto con etanol-agua. Los espectros TPD se muestran en las Figuras 4 (A) a (D).

Los perfiles de desorción demuestran que el metanol ($m/e = 31$), 1-propanol ($m/e = 31$) y 2-propanol ($m/e = 45$) desorben molecularmente a 154 °C, 200 °C y 187 °C, respectivamente. La temperatura de desorción encontrada previamente para etanol fue de 184 °C. Estas temperaturas de desorción fueron empleadas en el calentamiento de las esferas del biocatalizador para determinar la cantidad del alcohol que permanece adsorbido luego del contacto de 8 días con Novozym® 435 como se describió en el Capítulo 2, Sección 2.1.

Las altas temperaturas de desorción determinadas indican una fuerte interacción alcohol – biocatalizador que puede atribuirse a una fisorción considerando que los alcoholes desorben como moléculas intactas (Briand, 2005; González-Benito & Koenig, 2006; Miller-Chou & Koenig, 2003). Sin embargo, la presencia de dimetileter ($m/e = 45$ en la Figura 4 (A)) y propileno ($m/e = 41$ en la Figura 4 (C)) es una evidencia de cierto grado de quimisorción para metanol y 1-propanol, respectivamente. La quimisorción de estos alcoholes genera especies metoxi y propoxi como intermediarios que además

se deshidratan sobre los sitios activos de naturaleza ácida (Burchman *et al*, 2001 (a); Burchman *et al*, 2001 (b); Burchman *et al*, 2001 (c)).

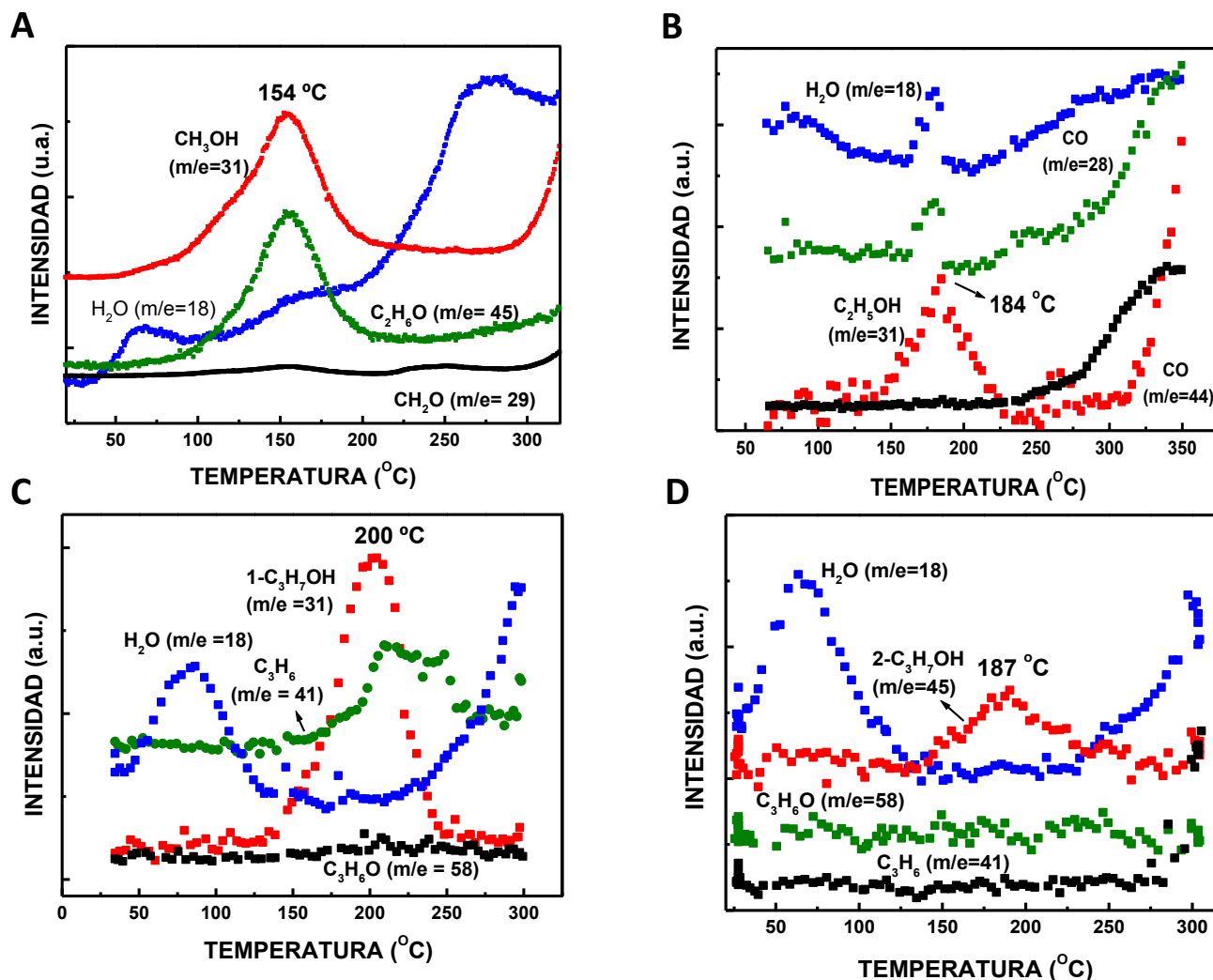


Figura 4. Espectros de desorción térmica programa TPD in situ de Novozym® 435 luego del contacto con metanol (A), etanol (B), 1-propanol (C) y 2-propanol (D).

En investigaciones previas el biocatalizador Novozym® 435 sin tratamiento previo se analizó por TPD. El análisis demostró (ver Figura 5) que las moléculas de agua desorbían en diferentes rangos de temperatura: 37-150 °C, 157-207 °C y una tercera desorción que comienza a 222 °C y continuó incluso a 400 °C. Esta desorción de moléculas de agua a altas temperaturas está acompañada de CO y CO_2 y se asignaron a

la descomposición de aminoácidos y PMMA del soporte (José, 2013). Estos resultados demuestran inequívocamente que las especies detectadas en los análisis TPD mostrados en la Figura 4 corresponden a los alcoholes y no a la descomposición térmica del biocatalizador.

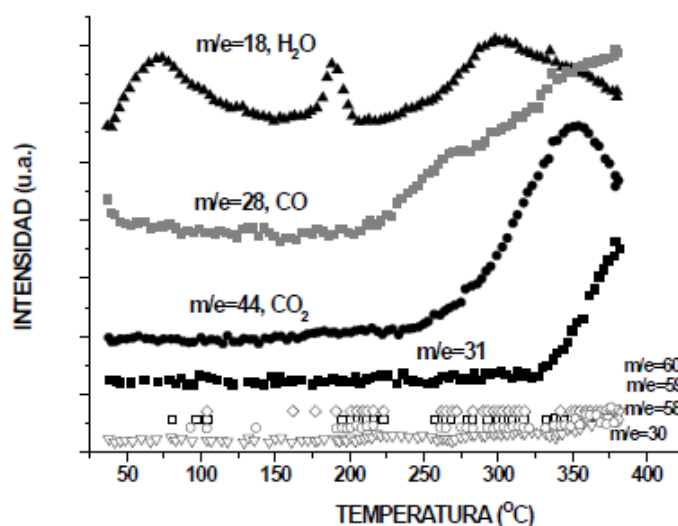


Figura 5. Espectros de desorción térmica programa TPD in situ de Novozym® 435 sin previo uso (extraída de José, 2013).

3.1.3. Cuantificación de pérdida de masa y proteína

Los resultados hallados en las secciones anteriores proveen evidencias de la disolución-disgregación de Novozym® 435 en contacto con los distintos medios alcohol-agua provocando la pérdida tanto de proteína de superficie (lipasa B de *Candida antarctica*, CALB) como de polimetilmetacrilato PMMA que constituye el núcleo interno de las esferas de biocatalizador. La cantidad de proteína y PMMA que permanecen en la fase líquida luego del contacto con los distintos alcoholes se cuantificó para establecer el grado de disolución de Novozym® 435. Como se detalla en el Capítulo 2, Sección 2.1., una masa determinada del biocatalizador se dejó interactuar con 10.00 mL de cada uno de los medios alcohol-agua durante 8 días a 45

°C y 200 rpm en un baño de agua. Luego de separadas las esferas de biocatalizador, el líquido remanente y los 4 volúmenes del alcohol correspondiente empleados para el lavado de Novozym® 435 se dejaron evaporar. El precipitado resultante se disolvió en 2.00 mL de agua destilada y se centrifugó para separar las sustancias no solubles y recuperar la enzima para su cuantificación por el ensayo de ácido bicinconínico (detalles en el Capítulo 2, Sección 2.4).

Por otro lado, las esferas del biocatalizador luego de ser deshidratadas en un desecador por varios días se calentaron secuencialmente a la temperatura de desorción determinada previamente para cada alcohol en ciclos de 10 minutos, enfriando cada vez y determinando la masa del biocatalizador. Este procedimiento se repitió hasta que la masa medida fue constante, y permitió determinar la pérdida total de masa del biocatalizador y la cantidad de alcohol adsorbida.

La Tabla 2 presenta los resultados obtenidos en la cuantificación de polimetilmetacrilato, aditivos y enzima perdidos y la cantidad de alcohol adsorbido luego de la exposición de 8 días de Novozym® 435 con los distintos alcoholes. Además, se comparan los porcentajes de pérdida de masa total y de proteína. Se incluyen los valores obtenidos previamente para el tratamiento de Novozym® 435 con etanol a modo de comparación (José *et al*, 2011).

Tabla 2. Cuantificación de polimetilmetacrilato, aditivos y enzima perdida y alcohol adsorbido luego del contacto de 8 días con los distintos medios alcohol-agua

Alcohol	Masa (g)						% pérdida de masa	% pérdida proteica ¹	Masa alcohol ads./g de biocat.	Mmoles de alcohol ads./g de biocat.
	Biocatalizador inicial	Biocatalizador seco	Biocatalizador recuperado	Soporte/aditivos disueltos en fase líquida	Proteína disuelta	Alcohol desorbido				
Metanol	0.5001	0.5470	0.4423	0.0565	1.312x10 ⁻³	0.1047	11.6	1.70	0.2094	6.5
Etanol²	1.0000	1.2221	0.8340	0.1640	1.962x10 ⁻³	0.3881	16.6	1.27	0.3881	8.4
1-propanol	1.0005	0.9816	0.9412	0.0584	0.880x10 ⁻³	0.0404	5.9	0.57	0.0404	0.7
2-propanol	2.0022	2.0517	1.9778	0.0220	2.433x10 ⁻³	0.0739	1.2	0.79	0.0369	0.6

¹ Relación entre la cantidad de proteína perdida debido al tratamiento con el alcohol y la cantidad total de proteína en Novozym® 435 (154.192 mg proteína/g Novozym® 435).

² Datos correspondientes al tratamiento del biocatalizador con etanol extraídos de José et al, 2011.

La masa de biocatalizador recuperado corresponde a la determinada en el último ciclo de calentamiento a la temperatura de desorción correspondiente. La cantidad de alcohol adsorbido y los sólidos remanentes del contacto (soporte, aditivos y proteína) con alcohol se determinaron a través de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Masa biocatalizador seco} = \text{masa de biocatalizador recuperado} + \text{masa alcohol adsorbido} \quad (1)$$

$$\text{Masa biocatalizador inicial} = \text{masa de biocatalizador recuperado} + \text{masa sólidos perdidos} \quad (2)$$

Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 2. En esta tabla se presenta la pérdida de soporte y aditivos por un lado, y la pérdida de proteína por otro ya que ésta pudo ser cuantificada por el ensayo de ácido bicinónico.

Por último, a partir de estos datos se calcularon los porcentajes de pérdida de masa total, de pérdida de proteína y la cantidad de alcohol adsorbido (masa y número de moles) por cada gramo de biocatalizador. El porcentaje de proteína desorbida se determinó teniendo en cuenta que la cantidad de proteína inmovilizada en Novozym® 435 es de 154.192 mg por gramo de catalizador, determinada según se describe en la Sección 2.4.2., del Capítulo 2.

El contacto con los alcoholes 1- y 2-propanol provocó una pérdida de proteína de 0.57% y 0.79%, respectivamente. El efecto que estos alcoholes ejercen sobre el biocatalizador en cuanto a la pérdida de proteína es menos pronunciado que el observado para metanol y etanol los cuales presentan un 1.70% y 1.27% de pérdida proteica, respectivamente. Además, el porcentaje de pérdida de masa total con metanol y etanol (11.6% y 16.6%, respectivamente) es un orden de magnitud mayor que el provocado por el tratamiento con 1- y 2-propanol (5.9% y 1.2%, respectivamente). Estas observaciones evidencian un marcado efecto de la longitud de la cadena del alcohol sobre la estabilidad del biocatalizador.

En cuanto a la cantidad de alcohol adsorbida por gramo de Novozym® 435 se observó una tendencia similar, los valores hallados para metanol y etanol (6.5 y 8.4 mmoles/g de biocatalizador, respectivamente) fueron mayores a los obtenidos para 1- y 2-propanol (0.7 y 0.6 mmoles/g de biocatalizador, respectivamente). Estos valores respaldan la fuerte interacción alcohol-biocatalizador mencionada en la Sección 3.1.2.

3.1.4. Evolución de la estructura secundaria de la lipasa B de *Candida antarctica*

La enzima lipasa B de *Candida antarctica* se analizó por espectroscopia infrarroja para investigar los cambios producidos en la estructura secundaria de la proteína luego de la inmovilización en el soporte polimérico Novozym® 435 como así también luego de la exposición a los distintos medios alcohol-agua empleados en la reacción de esterificación de R/S-ketoprofeno.

3.1.4.1. Estructura secundaria de CALB pura

El análisis de la estructura secundaria de la enzima lipasa B de *Candida antarctica* CALB se llevó a cabo mediante ATR-FTIR. La metodología empleada se describe en la Sección 2.5.5.4. del Capítulo 2. El intercambio isotópico de las moléculas de H₂O por D₂O permite evitar la interferencia de las moléculas de H₂O, las cuales absorben en la región entre 1700 y 1500 cm⁻¹ superponiéndose a la banda amida I y de esta forma permite obtener un espectro con mejor resolución (más detalles en Capítulo 2, Sección 2.5.5.3).

El espectro de la enzima CALB intercambiada con D₂O durante toda la noche se presenta en la Figura 6 (A). Adicionalmente, en la Figura 6 (B) se puede apreciar la región entre 1700 y 1600 cm⁻¹, o amida I, la cual provee tanto información cualitativa como cuantitativa de los elementos de la estructura secundaria que componen la enzima.

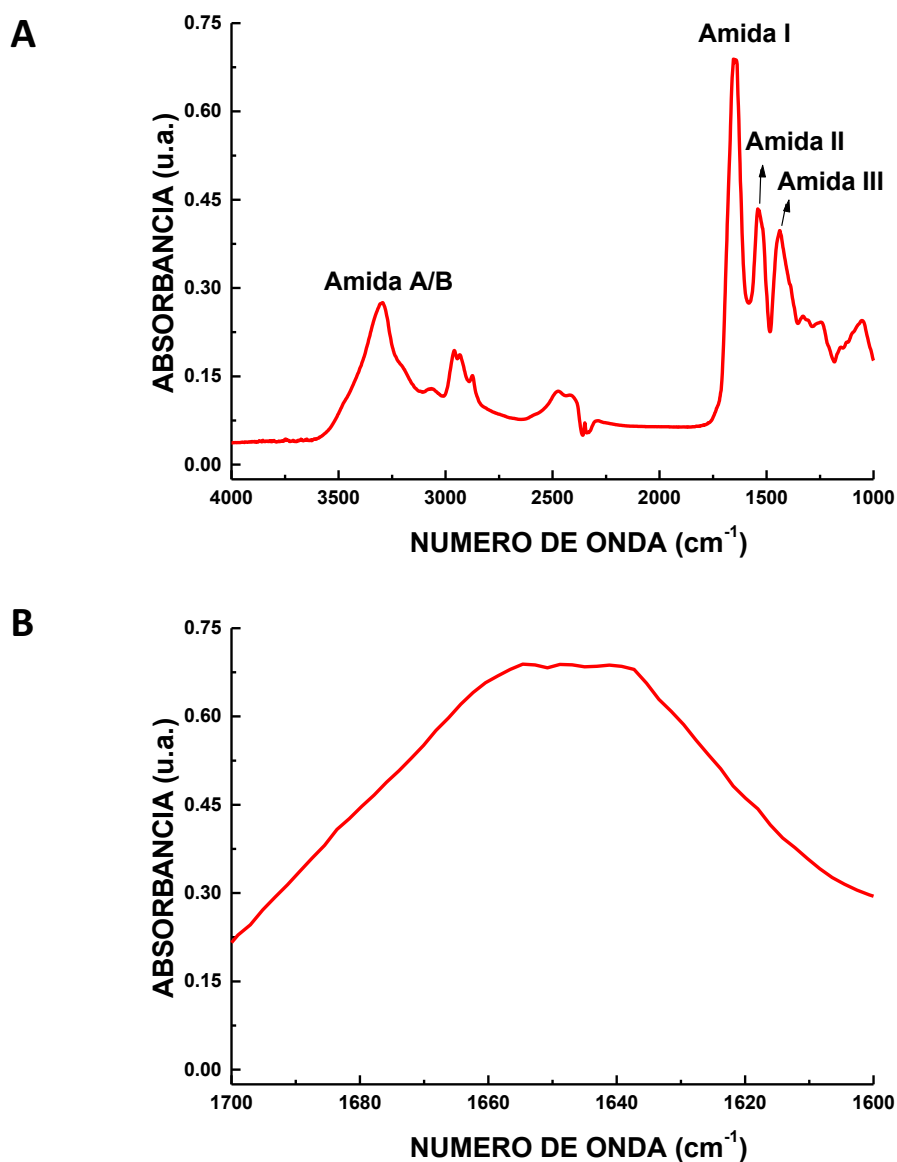


Figura 6. Enzima CALB intercambiada con D₂O. (A) Espectro ATR-FTIR. (B) Región amida I.

Como se describe en la Sección 2.5.5.1 del Capítulo 2, esta banda amida I se origina de las vibraciones de tensión de los grupos carbonilo $\nu(\text{C}=\text{O})$ de la cadena principal de las proteínas y por lo tanto es sensible a la estructura secundaria de las proteínas.

Para estimar la estructura secundaria, se realizó la deconvolución de la banda amida I debido al alto grado de solapamiento de las señales que la componen. Para ello se emplearon sumas de curvas Lorentzianas en los espectros no deconvolucionados. El

programa empleado para este propósito fue un módulo especial de ajuste de picos de Origin 5.0. Las posiciones y número de componentes se determinaron de la segunda derivada del espectro, y la contribución de cada componente de la banda amida I se obtuvo mediante la integración del área bajo la curva empleando una función de sumas gaussianas y luego normalizando el área total de la banda amida I. La Figura 7 presenta un ejemplo de la segunda derivada en la región amida I de un espectro de la enzima CALB pura. En ella es posible identificar 10 señales que pueden ser asignadas a 5 componentes de la estructura secundaria. Los números de onda y las asignaciones empleadas en esta investigación se muestran en la Tabla 3.

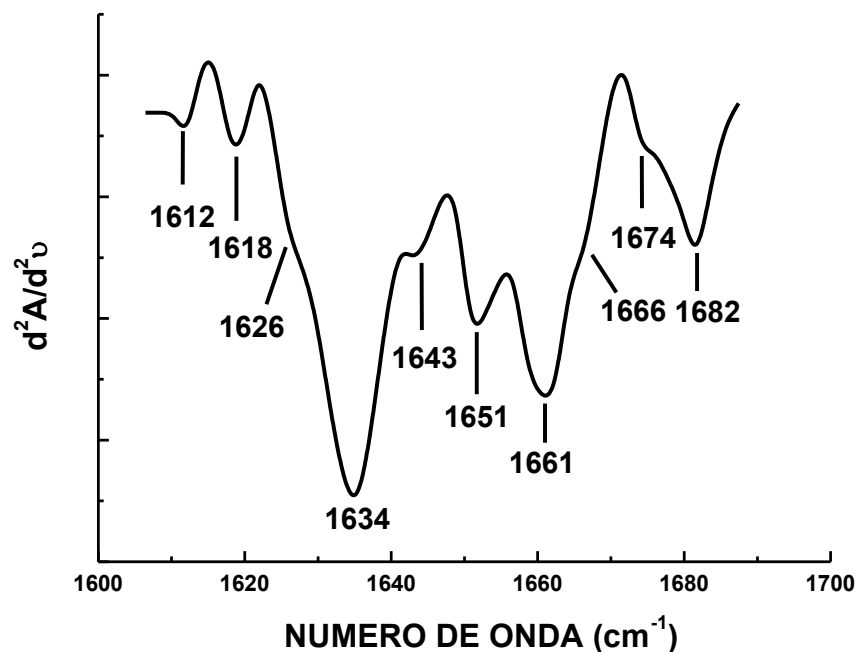


Figura 7. Segunda derivada del espectro infrarrojo de la región amida I de la enzima CALB pura.

Tabla 3. Asignaciones características de las señales de infrarrojo que componen la banda amida I para la enzima lipasa B de *Candida antarctica*

Número de onda (cm^{-1})	Asignación
1610 – 1626	Agregados intermoleculares
1631 – 1640	Lámina β
1640 – 1650	Aleatoria
1651 – 1660	Hélice α
1661 – 1675	Giros β
1680 – 1690	Lámina β

En la Figura 8 se presenta el espectro deconvolucionado de la enzima CALB, en la cual se pueden apreciar las señales características que componen la estructura secundaria de la enzima.

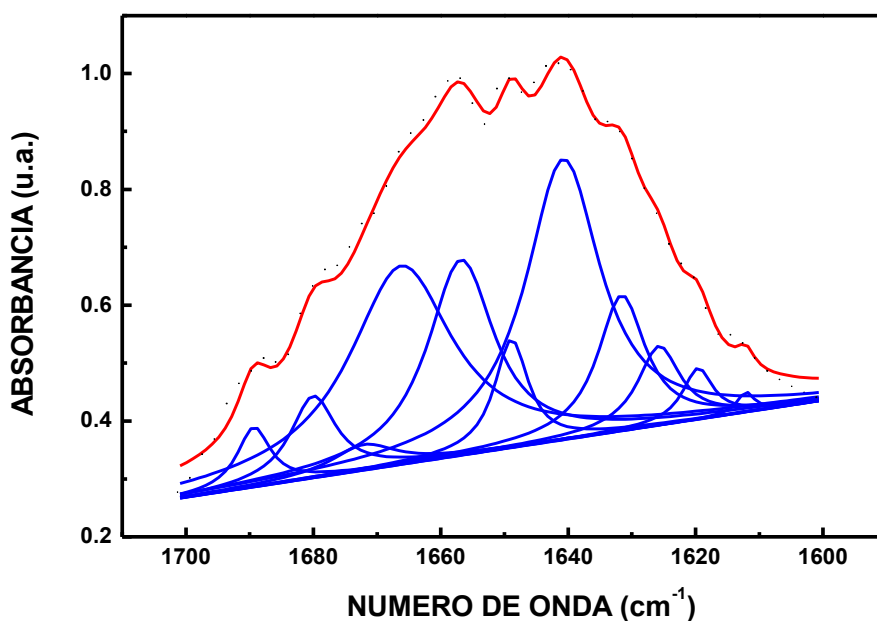


Figura 8. Espectro deconvolucionado de la región amida I de la enzima CALB pura.

En la Tabla 4 se presentan los porcentajes de contribución de cada componente de la estructura secundaria presentes en la enzima lipasa B de *Candida antarctica* CALB.

En ella se incluyen los agregados moleculares, estructuras aleatorias, hélice α , lámina β y giros β .

Tabla 4. Contribución porcentual de agregados, hélice α , estructuras aleatorias, lámina β y giros β en la estructura secundaria de la enzima CALB.

Estructura	Porcentaje de contribución (%)
Agregados ¹	7.3
Aleatoria ²	10.5
Hélice α ³	18.6
Lámina β ⁴	33.8
Giros β ⁵	29.9

¹ Corresponde a la suma de señales en 1612, 1618 y 1626 cm^{-1} .

² Corresponde a la señal en 1643 cm^{-1} .

³ Corresponde a la señal en 1651 cm^{-1} .

⁴ Corresponde a la suma de señales en 1634 y 1682 cm^{-1} .

⁵ Corresponde a la suma de señales en 1661, 1666 y 1674 cm^{-1} .

Estudios previos han determinado la estructura secundaria de la lipasa B de *Candida antarctica* empleando métodos como dicroísmo circular y microespectroscopia infrarroja con radiación sincrotrón (McCabe *et al*, 2005; Fang *et al*, 2014; Mei *et al*, 2003). Los resultados obtenidos en este trabajo no son coincidentes con los encontrados empleando otras metodologías. Esto puede deberse a los errores propios de cada técnica, como así también a los diferentes orígenes de las muestras analizadas, solventes y condiciones experimentales. Sin embargo, se emplearán las asignaciones y señales de infrarrojo obtenidas en este trabajo de tesis para estudiar las modificaciones de la estructura secundaria de la proteína ocasionadas por la inmovilización y el contacto prolongado con los alcoholes.

3.1.4.2. Estructura secundaria de CALB inmovilizada

El biocatalizador comercial Novozym® 435 se analizó por espectroscopia infrarroja en modo DRIFTS con el objetivo de determinar la estructura secundaria de la enzima CALB sobre el soporte, y las posibles modificaciones con respecto a la enzima CALB pura libre.

Al igual que con CALB pura, las esferas del biocatalizador se pusieron en contacto con D₂O toda la noche para producir el intercambio isotópico. Previo a esto fueron molidas para aumentar la superficie de contacto del D₂O con la enzima. Cabe aclarar que en la Figura 1 de la Sección 3.1.1. se observa que el soporte polimérico Lewatit VP OC 1600 no absorbe en la región del infrarrojo de la banda amida I, por lo cual no interfiere en el estudio de la enzima soportada. El análisis y deconvolución de los espectros se llevó a cabo como se describe en la sección anterior. A modo de ejemplo se presenta en la Figura 9 el espectro del biocatalizador Novozym® 435 luego de la deconvolución.

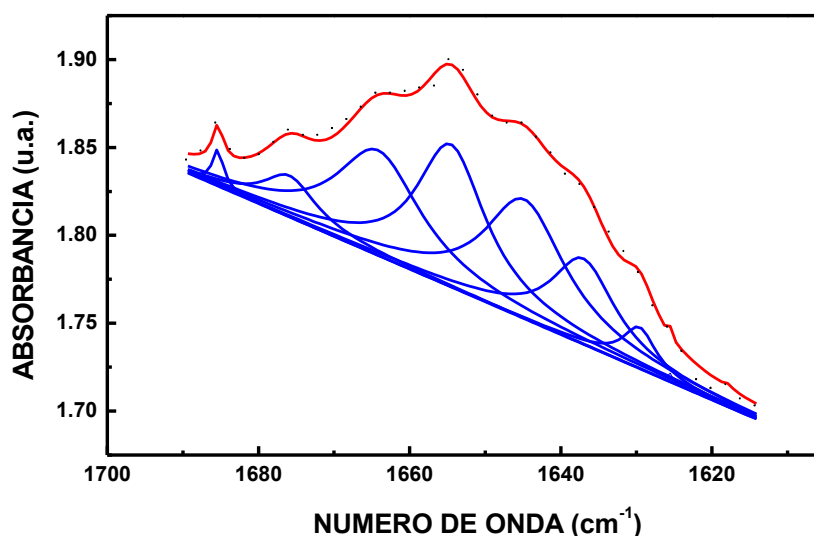


Figura 9. Espectro deconvolucionado de la región amida I del biocatalizador Novozym® 435.

En la Tabla 5 se presenta la contribución de agregados, estructuras aleatorias, hélice α , lámina β y giros β encontradas para el biocatalizador Novozym® 435. Para comparar, se incluyen los valores obtenidos para la enzima CALB pura. Adicionalmente, en la Figura 10 se presentan los cambios producidos en la estructura secundaria de CALB luego de la inmovilización. Para obtener este gráfico la contribución de cada estructura para la enzima soportada fue restada del porcentaje de cada componente de estructura secundaria en CALB libre.

Tabla 5. Contribución porcentual de agregados, estructuras aleatorias, hélice α , lámina β y giros β en la estructura secundaria del biocatalizador Novozym® 435 y CALB.

Estructura	Novozym® 435	CALB
Agregados ¹	0.2	7.3
Aleatoria ²	25.3	10.5
Hélice α ³	26.4	18.6
Lámina β ⁴	19.4	33.8
Giros β ⁵	28.7	29.9

¹ Corresponde a la señal en 1619 y 1626 cm^{-1} .

² Corresponde a la señal en 1645 cm^{-1} .

³ Corresponde a la señal en 1655 cm^{-1} .

⁴ Corresponde a la suma de señales en 1631, 1637 y 1685 cm^{-1} .

⁵ Corresponde a la suma de señales en 1661, 1666 y 1674 cm^{-1} .

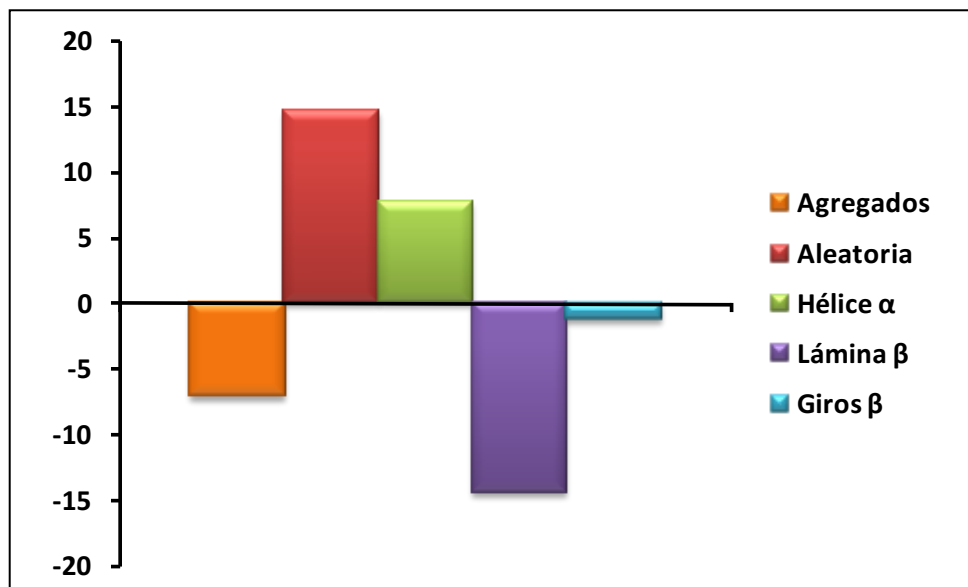


Figura 10. Cambios en la estructura secundaria de la enzima CALB inmovilizada en el soporte de Novozym® 435 con respecto a la estructura de CALB pura.

La estructura secundaria de la enzima CALB inmovilizada en el soporte de Novozym® 435 está compuesta por 0.2% de agregados moleculares, 25.3% de estructuras aleatorias, 26.4% de hélice α , 19.4% de láminas β y 28.7% de giros β . Como se puede apreciar en la Tabla 5 y la Figura 10, la inmovilización de la enzima al soporte polimetilmetacrilato PMMA provoca un aumento en las estructuras aleatorias y hélice α , junto con una disminución en los agregados moleculares y las láminas β . Sólo la contribución de los giros β permanece prácticamente constante.

3.1.4.3. Estructura secundaria luego del tratamiento y reacción

Novozym® 435 empleado en el tratamiento del biocatalizador con los distintos medios alcohol-agua y en la cinética de esterificación de R/S-ketoprofeno durante 72 h se analizó por espectroscopia infrarroja en modo DRIFTS con el propósito de investigar el efecto de los medios de reacción sobre la estructura secundaria de la enzima CALB sobre el soporte polimérico. La preparación de la muestra se llevó a cabo como se

describe en la Sección 3.1.4.2, mediante molienda e intercambio isotópico durante la noche.

El análisis y deconvolución de los espectros se llevó a cabo como se describió anteriormente en la Sección 3.1.4.1. A modo de ejemplo, en la Figura 11 se muestran los espectros deconvolucionados del biocatalizador Novozym® 435 luego del contacto de 8 días a 45 °C con los medios metanol, etanol, 1- y 2-propanol con 4.76% (v/v) agua. Los porcentajes de agregados moleculares, estructuras aleatorias, hélice α , láminas β y giros β de la enzima CALB en Novozym® 435 antes y después del tratamiento con los alcoholes se presentan en la Tabla 6, y los cambios producidos en la estructura secundaria de CALB sobre Novozym® 435 por el contacto con los alcoholes se muestra en la Figura 12. De igual manera que en la sección anterior, este gráfico se obtuvo de restar la contribución de cada componente de la estructura secundaria de CALB en Novozym® 435 luego del contacto prolongado con los alcoholes del porcentaje de cada uno de los componentes de la estructura secundaria de CALB en el biocatalizador sin tratamiento previo.

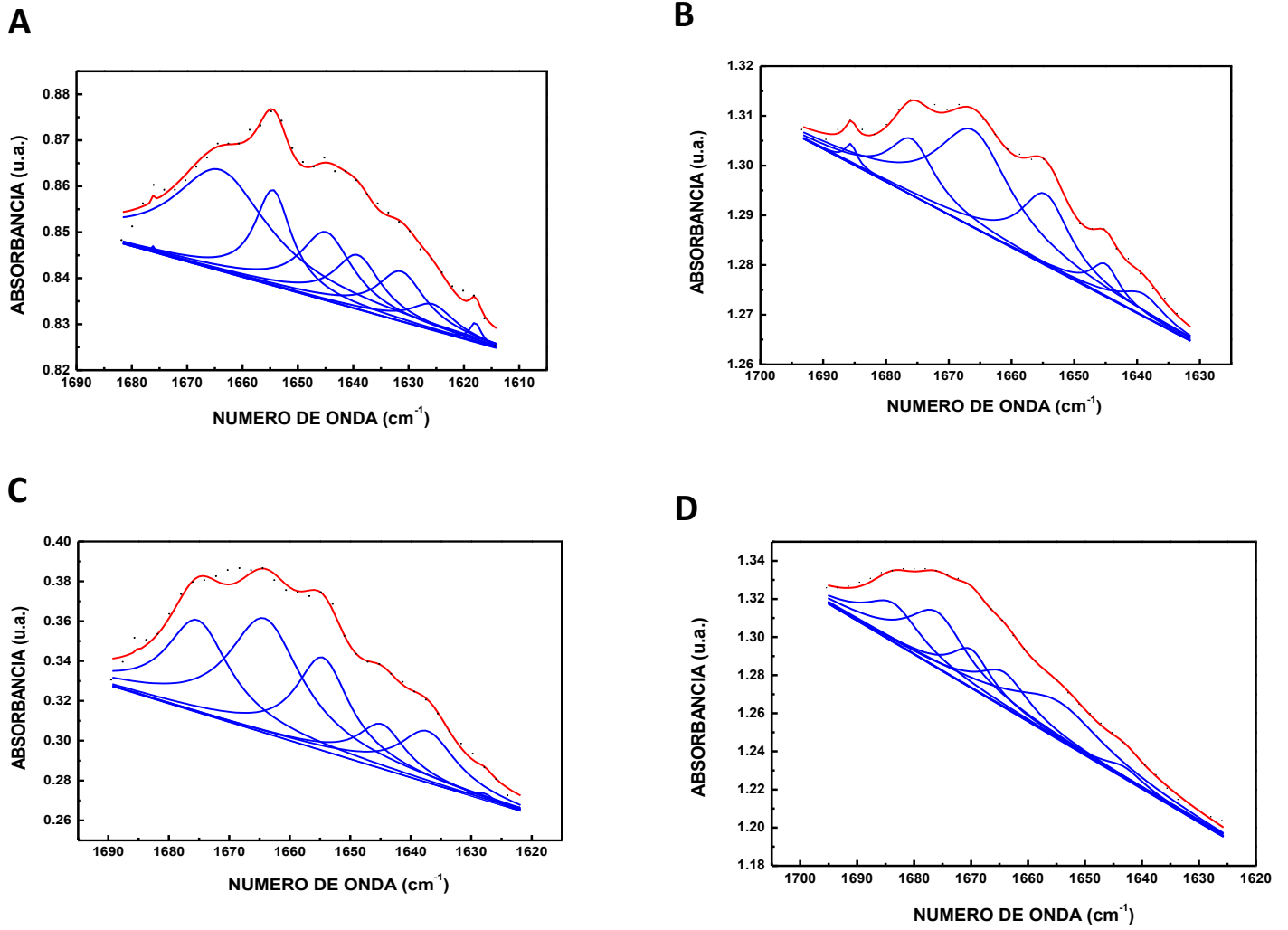


Figura 11. Espectros deconvolucionados de Novozym® 435 luego del tratamiento con los medios alcohol-agua. (A) metanol, (B) etanol, (C) 1-propanol, (D) 2-propanol.

Tabla 6. Contribución porcentual de agregados, estructuras aleatorias, hélice α , lámina β y giros β de la estructura secundaria de Novozym® 435 sin tratamiento previo y luego del tratamiento con metanol, etanol, 1- y 2-propanol durante 8 días a 45 °C sin reacción.

Novozym® 435	Estructura				
	Agregados ¹	Aleatoria ²	Hélice α ³	Lámina β ⁴	Giros β ⁵
Inicial	0.2	25.3	26.4	19.4	28.7
Metanol	6.0	16.3	16.6	22.3	38.8
Etanol	0.2	7.5	23.6	5.7	63.0
1-propanol	0.4	9.3	23.8	13.2	53.3
2-propanol	0.0	3.6	25.3	18.6	52.5

¹ Corresponde a la señal en 1619 y 1626 cm^{-1} .

² Corresponde a la señal en 1645 cm^{-1} .

³ Corresponde a la señal en 1655 cm^{-1} .

⁴ Corresponde a la suma de señales en 1631, 1637 y 1685 cm^{-1} .

⁵ Corresponde a la suma de señales en 1661, 1666 y 1674 cm^{-1} .

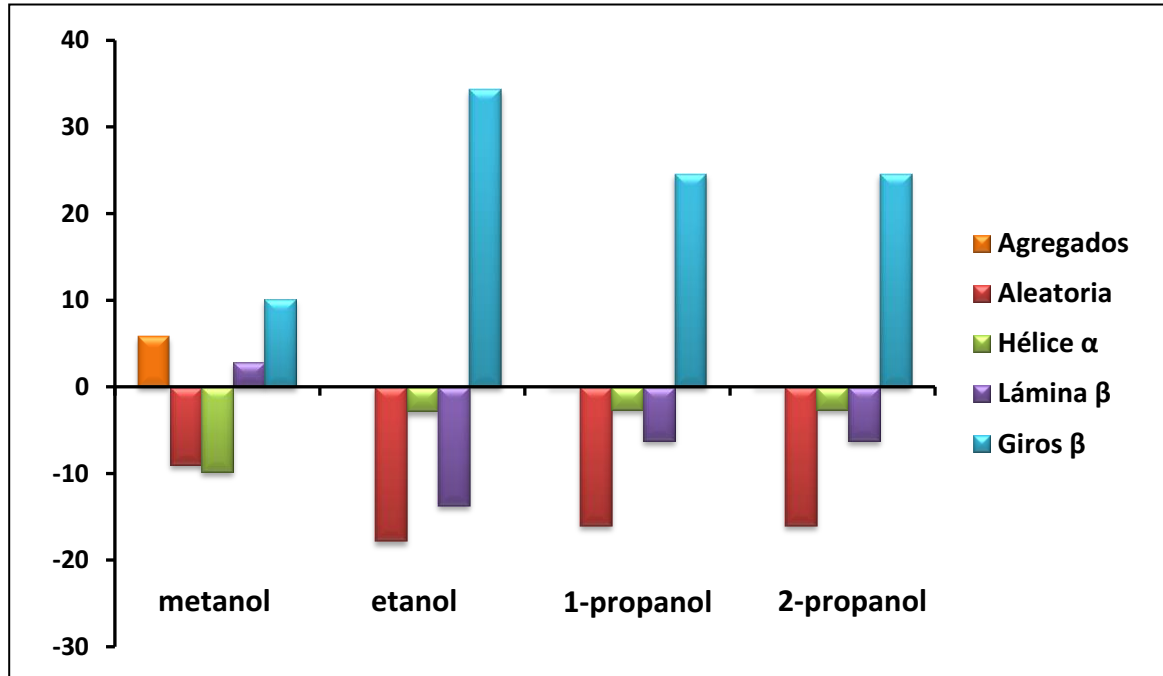


Figura 12. Cambios en la estructura secundaria de la enzima CALB en Novozym® 435 luego del tratamiento de 8 días con los distintos medios alcohol-agua.

La enzima CALB en el biocatalizador expuesto a las distintas mezclas alcohol-agua presenta una estructura secundaria modificada en la cual el porcentaje de giros β aumenta y la contribución de láminas β y estructuras aleatorias disminuye, mientras que el contenido de agregados moleculares y hélices α permanece prácticamente inalterado. Esta modificación descrita en la estructura secundaria se puede observar cuando el biocatalizador estuvo en contacto con los medios que contenían etanol, 1- y 2-propanol. Sin embargo, cuando el biocatalizador se expuso al medio metanol-agua se observó un aumento en el porcentaje de agregados moleculares (6%) y láminas β , y la disminución del porcentaje de hélices α . Los giros β aumentan y las estructuras aleatorias disminuyen al igual que sucede con el contacto con los otros alcoholes, pero en una menor medida.

En el caso del biocatalizador usado en las reacciones de esterificación (según se describirá en el Capítulo 4) se observó una tendencia similar en los primeros 60 minutos de reacción. En este sentido el biocatalizador previamente tratado con los alcoholes o no y empleado en la esterificación de R/S-ketoprofeno con los alcoholes (etanol, 1- y 2-propanol por 72 h) mostró un elevado contenido de giros β , una disminución de la contribución de láminas β y estructuras aleatorias y un porcentaje de hélice α y agregados moleculares casi constante. En cuanto a la estructura secundaria de CALB en Novozym® 435 empleado en la cinética de esterificación de R/S-ketoprofeno con metanol se observó una tendencia similar con respecto al tratamiento de 8 días con este alcohol. En este caso se detectó un aumento en la contribución de agregados moleculares. Sin embargo, la contribución de los demás componentes fue muy variable, lo cual puede estar relacionado con el efecto perjudicial que ejerce este alcohol sobre la enzima. Estos resultados se muestran en las Tablas 7 a 10.

Tabla 7. Contribución porcentual de agregados, estructuras aleatorias, hélice α , lámina β y giros β en la estructura secundaria de CALB en Novozym® 435 durante la esterificación de R/S-ketoprofeno con metanol de 1 a 72 h de reacción empleando el biocatalizador sin tratamiento previo y luego del contacto de 8 días con el medio metanol: 4.76% (v/v) de agua.

Novozym® 435	Estructura				
	Agregados	Aleatoria	Hélice α	Lámina β	Giros β
Inicial	0.2	25.3	26.4	19.4	28.7
1 hora de reacción	7.6	15.3	20.0	19.1	38.0
3 h	8.4	16.3	18.8	8.6	47.8
6h	6.1	18.8	29.9	13.0	32.2
12 h	7.4	20.8	17.7	1.2	52.9
24 h	6.6	19.0	19.7	8.8	46.0
30 h	4.2	22.4	22.9	11.0	39.6
48 h	10.2	15.7	21.7	15.0	37.5
72 h	5.4	24.5	17.9	7.2	45.0
8 días con metanol	6.0	16.3	16.6	22.3	38.8
1 h	4.3	11.4	18.6	1.3	64.4
3 h	8.2	15.3	16.1	2.7	57.7
6h	4.9	10.9	15.5	4.8	63.8
12 h	3.2	6.6	17.7	2.9	69.6
24 h	2.0	8.0	16.9	1.3	71.8
30 h	5.9	5.2	18.8	5.9	64.1
48 h	3.6	13.1	21.6	11.3	50.4
72 h	2.6	18.7	19.5	5.6	53.6

Tabla 8. Contribución porcentual de agregados, estructuras aleatorias, hélice α , lámina β y giros β en la estructura secundaria de CALB en Novozym® 435 durante la esterificación de R/S-ketoprofeno con etanol de 1 a 72 h de reacción empleando el biocatalizador sin tratamiento previo y luego del contacto de 8 días con el medio etanol: 4.76% (v/v) de agua.

Novozym® 435	Estructura				
	Agregados	Aleatoria	Hélice α	Lámina β	Giros β
Inicial	0.2	25.3	26.4	19.4	28.7
1 hora de reacción	1.4	9.1	18.4	5.1	66.0
3 h	0.2	15.6	22.0	14.4	47.8
6h	3.1	5.9	21.3	2.0	67.7
12 h	3.5	18.8	22.1	2.1	53.5
24 h	1.1	29.8	0	7.1	61.9
30 h	0.3	17.1	26.5	1.3	54.8
48 h	0.4	15.6	27.2	5.2	51.7
72 h	1.5	18.1	25.1	6.9	48.4
8 días con etanol	0.2	7.5	23.6	5.7	63.0
1 h	4.1	5.6	21.8	7.0	61.4
3 h	3.9	15.3	21.7	0.9	58.3
6h	1.5	3.7	24.2	3.0	67.6
12 h	7.3	4.6	22.3	6.5	59.3
24 h	2.1	12.7	23.2	5.6	56.5
30 h	6.2	16.6	17.2	3.8	56.1
48 h	3.8	4.4	24.0	17.0	50.7
72 h	1.1	16.1	18.5	5.9	58.3

Tabla 9. Contribución porcentual de agregados, estructuras aleatorias, hélice α , lámina β y giros β en la estructura secundaria de CALB en Novozym® 435 durante la esterificación de R/S-ketoprofeno con 1-propanol de 1 a 72 h de reacción empleando el biocatalizador sin tratamiento previo y luego del contacto de 8 días con el medio 1-propanol: 4.76% (v/v) de agua.

Novozym® 435	Estructura				
	Agregados	Aleatoria	Hélice α	Lámina β	Giros β
Inicial	0.2	25.3	26.4	19.4	28.7
1 hora de reacción	2.1	13.7	23.6	7.9	52.6
3 h	7.2	19.8	24.2	5.8	43.1
6h	1.4	4.4	24.4	9.1	60.6
12 h	1.0	3.1	23.6	12.8	59.4
24 h	2.5	3.5	22.0	8.8	63.2
30 h	4.9	2.6	18.9	4.0	68.6
48 h	2.1	5.2	18.0	14.6	60.0
72 h	2.8	4.2	17.9	8.2	66.9
8 días con 1-propanol	0.4	9.3	23.8	13.2	53.3
1 h	2.6	2.6	24.8	16.6	53.4
3 h	2.0	4.9	26.0	6.4	60.6
6h	1.4	5.3	24.3	12.1	56.8
12 h	0.4	6.4	25.7	7.8	59.6
24 h	0.1	9.0	25.6	10.5	54.8
30 h	1.7	7.5	18.4	11.0	61.4
48 h	1.1	3.3	20.1	7.9	67.6
72 h	7	15.2	20.3	9.5	47.9

Tabla 10. Contribución porcentual de agregados, estructuras aleatorias, hélice α , lámina β y giros β en la estructura secundaria de CALB en Novozym® 435 durante la esterificación de R/S-ketoprofeno con 2-propanol de 1 a 72 h de reacción empleando el biocatalizador sin tratamiento previo y luego del contacto de 8 días con el medio 2-propanol: 4.76% (v/v) de agua.

Novozym® 435	Estructura				
	Agregados	Aleatoria	Hélice α	Lámina β	Giros β
Inicial	0.2	25.3	26.4	19.4	28.7
1 hora de reacción	0.2	2.2	26.8	20.1	50.6
3 h	1.6	12.1	17.2	15.2	53.9
6h	2.3	10.4	15.1	15.5	56.6
12 h	1.2	12.6	23.5	10.6	52.1
24 h	0.5	11.7	17.5	16.9	53.3
30 h	0.4	17.7	20.9	19.7	41.2
48 h	1.2	9.8	15.5	19.1	54.5
72 h	3.5	18.1	20.9	13.9	43.6
8 días con 2-propanol	0.0	3.6	25.3	18.6	52.5
1 h	1.3	8.9	22.0	10.8	56.9
3 h	2.9	14.1	21.5	13.3	48.2
6h	3.3	10.0	21.5	11.5	53.7
12 h	2.6	4.9	23.0	9.4	60.0
24 h	5.6	11.0	24.0	15.6	43.8
30 h	4.0	6.2	24.5	17.5	47.7
48 h	2.3	12.9	26.1	8.2	50.6
72 h	9.2	9.8	18.3	8.3	54.4

3.1.5. Estudio de textura interna

Se investigó la textura interna de Novozym® 435 inicial, luego de interactuar con los distintos medios alcohol-agua por 8 días, y el biocatalizador (con y sin tratamiento previo con los medios alcohólicos) luego de 72 h de reacción.

Las Figuras 13 (A) y (B) muestran micrografías obtenidas con un microscopio electrónico de barrido de esferas del biocatalizador comercial Novozym® 435 enteras y seccionadas transversalmente (José, 2013).

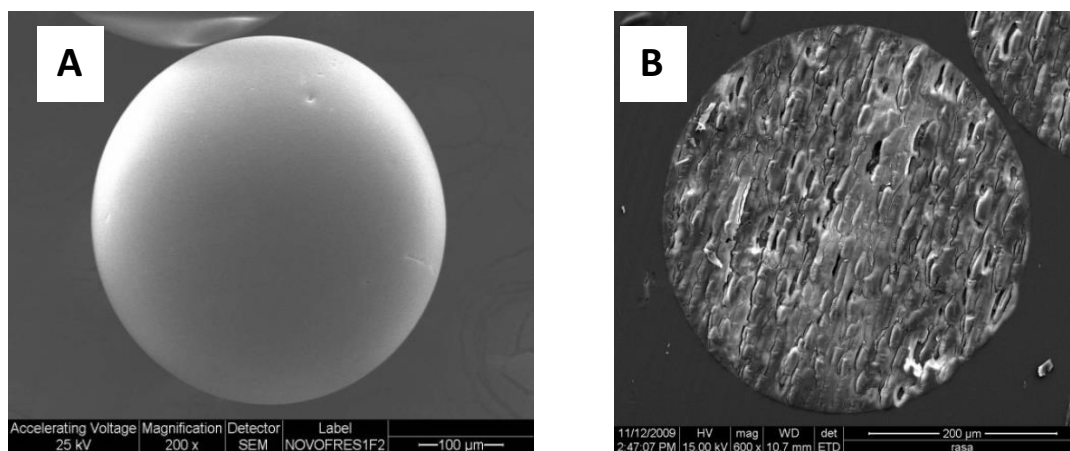


Figura 13. Micrografía SEM de (A) una esfera (magnificación 200X) y (B) de la sección transversal (magnificación 600X) de Novozym® 435 antes del contacto con los alcoholes (extraída de José, 2013).

Seguidamente, la Figura 14 muestra micrografías de un corte transversal de Novozym® 435 inicial (A) y luego del tratamiento del mismo con metanol (B), etanol (C), 1- propanol (D) y 2-propanol (E).

Las micrografías muestran diferencias texturales entre Novozym® 435 sin tratamiento previo (Figura 14 (A)) y luego de que estuvo expuesto a los distintos alcoholes (Figuras 14 (B) a (E)). A los fines de parametrizar estas diferencias observables a simple vista, se determinaron estimadores de textura como son la dimensión fractal D y el parámetro d_{min} (Bianchi & Bonetto, 2001). En este contexto, se analizaron porciones centrales de $8.748 \mu\text{m} \times 8.748 \mu\text{m}$ de las imágenes. 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° .

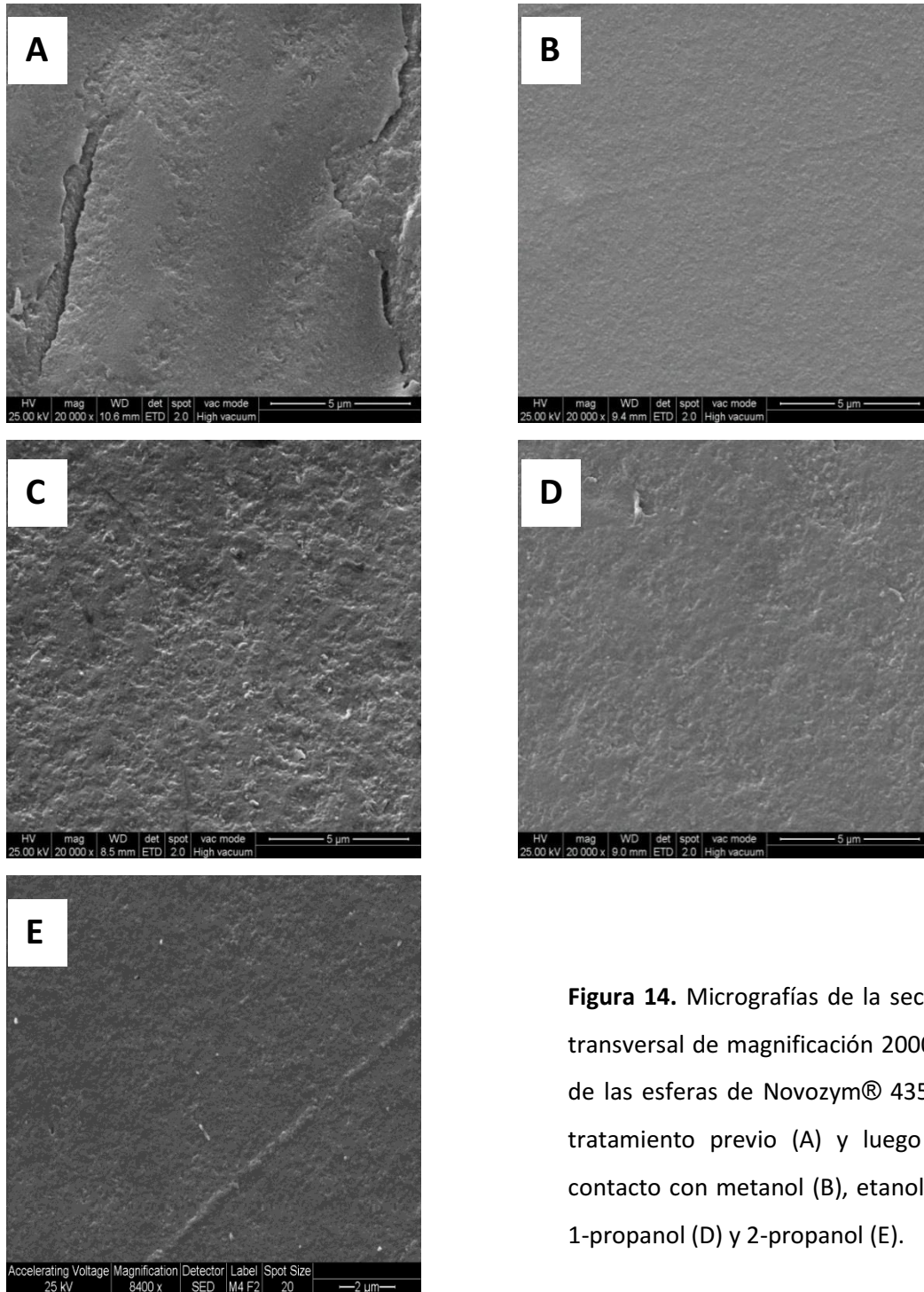


Figura 14. Micrografías de la sección transversal de magnificación 20000 X de las esferas de Novozym® 435 sin tratamiento previo (A) y luego del contacto con metanol (B), etanol (C), 1-propanol (D) y 2-propanol (E).

La Figura 15 muestra a modo de ejemplo, un gráfico de varianza en función de los pasos en una imagen de un corte transversal de Novozym® 435 sin previo uso. En la misma se indica el valor de d_{min} .

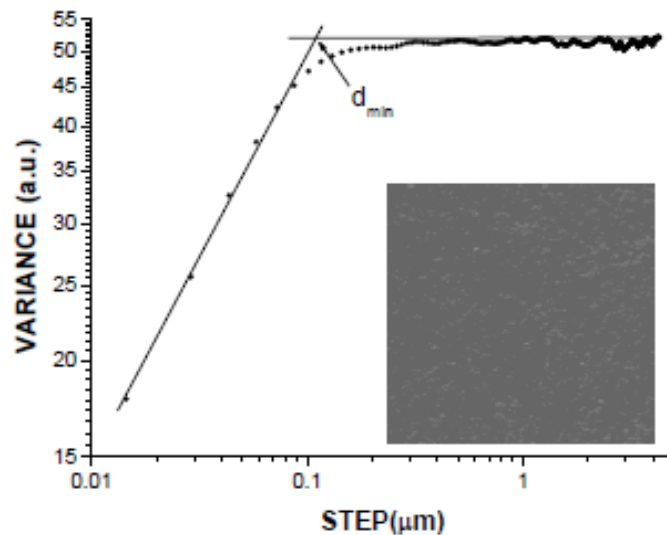


Figura 15. Variograma correspondiente a la porción central de $8.69 \times 8.69 \mu\text{m}^2$ de la imagen con una magnificación de 8400x de un corte transversal de Novozym® 435.

La pendiente del gráfico se relaciona con la dimensión fractal D mediante la ecuación $D = 3 - \text{pendiente} / 2$. Los valores de dimensión fractal D de $2 < D < 2.5$ indican superficies lisas persistentes mientras que valores de $2.5 < D < 3$ son indicio de 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 (Bianchi & Bonetto, 2001; Ladaga & Bonetto, 2002).

La Tabla 11 presenta los valores obtenidos para el estimador de dimensión fractal D y el mínimo tamaño de celda d_{min} de Novozym® 435 sin previo uso y luego del tratamiento de 8 días a 45°C con los distintos medios alcohol-agua.

Tabla 11. Estimador de dimensión fractal D y mínimo tamaño de celda d_{min} de Novozym® 435 sin tratamiento previo y luego de la exposición a los distintos medios alcohol-agua por 8 días a 45 °C.

Novozym® 435 tratado con los alcoholes por 8 días					
Estimadores de textura	Novozym® 435	Metanol	etanol	1-propanol	2-propanol
Dimensión fractal D	2.8347 ± 0.0027	2.595 ± 0.054	2.665 ± 0.004	2.460 ± 0.042	2.727 ± 0.022
d_{min} [μm]	0.0582 ± 0.0022	0.05952 ± 0.0017	0.1015 ± 0.022	0.0692 ± 0.017	0.0651 ± 0.0032

Los resultados obtenidos en estos estudios de textura interna evidencian que la adsorción de los alcoholes y la degradación de la matriz polimérica no sólo ocurren en la superficie de las esferas del biocatalizador sino también en su interior. Novozym® 435 sin tratamiento previo posee un factor de dimensión fractal de 2.8347 indicando un comportamiento fractal antipersistente ($3 > D > 2.5$), lo cual indica cierta textura rugosa, y un tamaño mínimo de celda d_{min} de 0.0582 μm. Sin embargo, la exposición prolongada a los alcoholes e incluso a las condiciones de reacción empleando el biocatalizador previamente tratado o no (Tabla 12) disminuye el valor del parámetro D y aumenta el valor de d_{min} . Si bien el estimador de dimensión fractal D disminuye, estos valores aún siguen siendo $D > 2.5$ (excepto para el tratamiento con 1-propanol), por lo tanto siguen presentando un comportamiento antipersistente. Sin embargo, esta disminución evidencia que la exposición a los alcoholes provoca un suavizado en la textura interna de las esferas del biocatalizador. El incremento de d_{min} indica que los alcoholes provocaron un incremento de la estructura (o patrón estructural) interna.

Estos resultados evidenciaron que todos los alcoholes difunden dentro de las esferas del biocatalizador y suavizan la textura interna debido a la degradación de la matriz polimérica como se concluyó previamente en las Secciones 3.1.1. y 3.1.3.

Tabla 12. Estimador de dimensión fractal D y mínimo tamaño de celda d_{min} de Novozym® 435 usado en la esterificación de R/S-ketoprofeno por 72 h sin tratamiento previo y luego de la exposición a los distintos alcoholes y empelado en la reacción por 72 h.

Novozym® 435	Alcohol	D	d_{min} [μm]
Usado sin tratamiento previo	Metanol	No medido	No medido
Usado luego del tratamiento		No medido	No medido
Usado sin tratamiento previo	Etanol	2.823 ± 0.018	0.217 ± 0.080
Usado luego del tratamiento		2.693 ± 0.008	0.146 ± 0.018
Usado sin tratamiento previo	1-propanol	2.525 ± 0.038	0.0647 ± 0.026
Usado luego del tratamiento		2.549 ± 0.036	0.0661 ± 0.027
Usado sin tratamiento previo	2-propanol	2.598 ± 0.034	0.097 ± 0.010
Usado luego del tratamiento		2.698 ± 0.051	0.096 ± 0.017

3.2. CONCLUSIONES

La presente investigación es una continuación de los estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo sobre el efecto del etanol en la integridad del biocatalizador Novozym® 435. Estos estudios demostraron que el biocatalizador se inactiva luego de 8 días de uso consecutivo en la esterificación de R/S-ibuprofeno con etanol como reactivo y solvente (Foresti *et al*, 2009). Además, numerosas investigaciones evidenciaron la desactivación de Novozym® 435 bajo diversas condiciones de reacción (Zhao& Song, 2010; Tan *et al*, 2010; Fjerbaek *et al*, 2009; Lai *et*

al, 2005; Chang *et al*, 2005; Santos *et al*, 2007; Arroyo & Sinisterra, 1994). En este contexto, los resultados obtenidos luego del contacto de 8 días con metanol, 1- y 2-propanol con 4.76% (v/v) de agua evidenciaron la disolución de soporte polimérico polimetilmetacrilato VP OC 1600 y de enzima CALB en la superficie del biocatalizador, siendo los alcoholes de cadena corta los más perjudiciales.

Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo evidenciaron la disolución/disgregación de Novozym®435 en contacto con etanol, lo cual induce la pérdida de proteína superficial (lipasa B de *Candida antarctica*) y el polímero macroporoso PMMA que forma el núcleo interno de las esferas del biocatalizador (José *et al*, 2011). En este contexto, la presente investigación demuestra que los alcoholes metanol, 1- y 2-propanol también ejercen un efecto perjudicial en el biocatalizador Novozym® 435. En un principio, se observó cualitativamente la pérdida de soporte polimetilmetacrilato (PMMA) y enzima CALB mediante los estudios de FTIR. Seguidamente, la cuantificación evidenció una mayor disolución de soporte y proteína luego de 8 días de contacto con los alcoholes de cadena más corta metanol y etanol. La capacidad del metanol, etanol, 1- y 2-propanol (con y sin agua agregada) de disolver el PMMA a temperatura ambiente fue estudiada por Cowie *et al* (Cowie *et al*, 1987). Estos autores demostraron un efecto de co-solvencia que ocurre cuando los componentes de la mezcla pueden solvatar preferencialmente (y separadamente) diferentes sitios en la cadena polimérica. En este contexto, el PMMA posee cadenas laterales hidrofóbicas (grupos metilo) y grupos aceptores de puentes de hidrógeno (grupos éster O=C-O-CH₃). Hoogenboom *et al* demostraron que el efecto de la co-solvencia implica la generación de puentes de hidrógeno del agua a las fracciones éster del polímero formando una película de hidratación alrededor de los grupos carbonilo que facilita de alguna manera la acción del alcohol (Hoogenboom *et al*, 2010).

Adicionalmente, la disolución de la resina de PMMA ha sido reportada por González-Benito & Koenig y Hoogenboom *et al* quienes demostraron que el PMMA se disuelve en contacto con mezclas de tetracloruro y acetonitrilo con alcoholes de bajo peso molecular (metanol, etanol y 1-propanol) y mezclas de alcohol/agua independientemente de la composición de la mezcla. La disolución ejercida por los

solventes conduce a la migración del polímero y otras sustancias a la fase líquida (González-Benito & Koenig, 2006; Hoogenboom *et al*, 2010). Zhao & Song reportaron la migración de sustancias desde Novozym® 435 hacia solventes orgánicos y líquidos iónicos. Dentro de ellas, se encontraban en mayor proporción glicerol, ácido benzoico, 2-hidroxietil benzoato, 2-hidroxietil sorbato y ácido sórbico. Estos últimos 4 compuestos son potenciales dadores de acilo en las reacciones catalizadas por lipasas (Zhao & Song, 2010). Si bien la migración de estos compuestos es probablemente insignificante cuando la concentración de sustrato es elevada, el empleo del biocatalizador previamente tratado con los medios de reacción durante 8 días eliminaría las posibles interferencias que podrían provocar estos compuestos en las reacciones de esterificación de R/S-ketoprofeno que serán mencionadas en el Capítulo 4.

Por otra parte, los resultados obtenidos en los estudios de Desorción Térmica Programada TPD permitieron establecer una fuerte interacción de los alcoholes con Novozym® 435, ya sea con la enzima o matriz polimérica a pesar de que las esferas de biocatalizador se dejaron secar luego del tratamiento. Las temperaturas de desorción halladas para metanol, etanol, 1- y 2-propanol fueron de 154 °C, 187 °C, 200 °C y 187 °C, respectivamente. Estas altas temperaturas indican que bajo las condiciones de reacción empleadas en este trabajo de tesis (45 °C) estos alcoholes probablemente permanecen adsorbidos como especies espectadoras formando especies dead-end que inhiben el proceso de esterificación. La masa de alcohol adsorbido se determinó como se indica en la Sección 3.1.3, siendo mayor la masa de los alcoholes de cadena corta adsorbidos por cada gramo de biocatalizador. Este efecto inhibitorio fue reportado previamente por Foresti *et al* en base a observaciones tanto experimentales como teóricas. Se llevaron a cabo cálculos por modelado molecular de la esterificación de ibuprofeno con etanol como reactivo y solvente catalizada por CALB. Los resultados permitieron postular que la formación irreversible de especies dead-end entre el etanol adsorbido y los residuos de serina (Ser 105) e histidina (His 224) de la tríada catalítica de CALB es termodinámicamente factible. Además, esta interacción podría suceder antes de la coordinación del ibuprofeno provocando de esta manera la

inhibición de los sitios activos de la enzima en el proceso de esterificación (Foresti *et al*, 2009).

La fuerte interacción de las moléculas de alcohol o de R/S-ketoprofeno empleado en la reacción de esterificación (Capítulo 4) con los residuos de aminoácidos de la enzima pueden perturbar los puentes de hidrógeno entre átomos de la proteína que podrían provocar cambios en la estructura secundaria de CALB. En este sentido, las proteínas en solventes hidrofóbicos conservan su estructura nativa debido a interacciones de hidrógeno entre los átomos de la proteína y a que conservan una estructura más rígida en ausencia de agua. Por otro lado, las 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 (José *et al*, 2011).

La exposición de Novozym® 435 a los distintos medios alcohol-agua ocasiona cambios en la estructura secundaria de la enzima CALB inmovilizada. La contribución de los giros β aumenta de un 28.7 % en el biocatalizador inicial a más de 50 % con el contacto con etanol, 1- y 2-propanol durante los 8 días, lo cual va acompañado de una disminución del porcentaje de láminas β y estructuras aleatorias. La hélice α permanece prácticamente inalterada. En contraste, el metanol induce la disminución de la contribución de hélice α y un incremento de los agregados lo cual evidencia la desnaturalización de la proteína. Los estudios llevados a cabo por Fang *et al* también demostraron que el metanol induce una modificación en la conformación de la enzima CALB. Si bien estos autores observaron una disminución en la estructura hélice α (de acuerdo con esta investigación), no detectaron la formación de agregados moleculares. Sin embargo, relacionaron la inactivación de la enzima con el desplegamiento de la proteína causado por el alcohol (Fang *et al*, 2014).

Los cambios producidos en la estructura secundaria de CALB durante la esterificación del R/S-ketoprofeno con los distintos medios alcohol-agua son muy similares a los producidos por el tratamiento sólo con el medio alcohol-agua. Esto indicaría que la modificación de la estructura secundaria de la proteína es consecuencia principalmente de la interacción con los alcoholes.

Por otra parte, la interacción de los alcoholes no ocurre sólo a nivel superficial, sino que mediante el análisis de textura por microscopía electrónica, se pudo determinar que estos difunden al interior de las esferas de biocatalizador provocando el hinchamiento y disolución del PMMA. González-Benito & Koenig estudiaron el proceso de disolución del PMMA, el cual comienza con el hinchamiento del polímero por el CCl_4 que permite a los alcoholes penetrar en el PMMA. El alcohol interactúa con el PMMA a través de puentes de hidrógeno hidroxilo-carbonilo y separa las cadenas del polímero. En particular el metanol, por su bajo peso molecular, aumenta su habilidad para difundir en estructuras poliméricas (González-Benito & Koenig, 2006).

Los cálculos de parametrización de las imágenes obtenidas de secciones transversales de las esferas del biocatalizador confirman la difusión de los alcoholes en el interior de las esferas modificando su textura interna. El incremento de la longitud del patrón estadístico d_{min} que describe la textura de Novozym® 435 al interactuar con los alcoholes indica que estos incrementan la porosidad interna del soporte. Por otro lado, la disminución en la dimensión fractal D se correlaciona con un efecto de alisado de la textura.

3.3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Arroyo M, Sinisterra JV. High enantioselective esterification of 2-arylpropionic acids catalyzed by immobilized lipase from *Candida antarctica*: a mechanistic approach. J Org Chem 1994, 59, 4410-4417.

Base de datos de espectros infrarrojos del National Institute of Standards and Technology (<http://webbook.nist.gov>) de metilacrilato C₄H₆O₂ (CAS: 96-33-3) y divinilbenceno C₁₀H₁₀ (CAS: 108-57-6).

Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. Biochim Biophys Acta 2007, 1767, 1073-1101.

Bianchi FD, Bonetto RD. FERImage: an interactive program for fractal dimension, dper and dmin calculation. Scanning 2001, 23, 193-197.

Briand LE, en: Metal Oxides: Chemistry and Applications, CRC Press Taylor & Francis, Florida, JLG Fierro (Ed), 2005, 353-390.

Burchman LJ, Badlani M, Wachs IE. **(a)** The origin of the ligand effect in metal oxide catalysts: novel fixed-bed *in situ* infrared and kinetic studies during methanol oxidation. J Catal 2001, 203, 104-121.

Burchman LI, Briand LE, Wachs IE. **(b)** Quantification of active sites for the determination of methanol oxidation turn-over frequencies using methanol chemisorptions and *in situ* infrared techniques. 1. Supported metal oxide catalysts. Langmuir 2001, 17, 6164-6174.

Burchman LI, Briand LE, Wachs IE. **(c)** Quantification of active sites for the determination of methanol oxidation turn-over frequencies using methanol chemisorptions and *in situ* infrared techniques. 1. Bulk metal oxide catalysts. Langmuir 2001, 17, 6175-618

Chang H-M, Liao H-F, Lee C-C, Shieh C-J. Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. J Chem Technol Biotechnol 2005, 80, 307-312.

Cowie JMG, Moshin MA, McEwen IJ. Alcohol-water cosolvent systems for poly(methyl methacrylate). *Polymer* 1987, 28, 1569-1572.

Fang X, Zhan Y, Yang J, Yu D. A concentration-dependent effect of methanol on *Candida antarctica* lipase B in aqueous phase. *J Mol Catal B: Enzym* 2014, 104, 1-7.

Fjerbaek L, Christensen KV, Norddahl B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic esterification. *Biotechnol Bioeng* 2009, 102, 1298-1315.

Foresti ML, Galle M, Ferreira ML, Briand LE. Enantioselective esterification of ibuprofen with ethanol as reactant and solvent catalyzed by immobilized lipase: experimental and molecular modeling aspects. *J Chem Technol Biotechnol* 2009, 84, 1461-1473.

Foresti ML, Valle GM, Bonetto RD, Ferreira ML, Briand LE. FTIR, SEM and fractal dimension characterization of lipase B from *Candida antarctica* immobilized onto titania at selected conditions. *Appl Surf Sci* 2010, 256, 1624-1635.

González-Benito J, Koenig JL. Nature of PMMA dissolution process by mixtures of acetonitrile/alcohol (poor solvent/nonsolvent) monitored by FTIR-imaging. *Polymer* 2006, 47, 3065-3072.

Hoogenboom R, Becer CR, Guerrero-Sanchez C, Hoepfener S, Schubert US. Solubility and thermoresponsiveness of PMMA in alcohol-water solvent mixtures. *Aust J Chem* 2010, 63, 1173-1178.

José C, Briand LE. Deactivation of Novozym® 435 during the esterification of ibuprofen with ethanol: evidences of the detrimental effect of the alcohol. *React Kinet Mech Catal* 2010, 99, 17-22.

José C, Bonetto RD, Gambaro LA, Guauque Torres MP, Foresti ML, Ferreira ML, Briand LE. Investigation of the causes of deactivation-degradation of the commercial biocatalyst Novozym® 435 in ethanol and ethanol-aqueous media. *J Mol Catal B: Enzym* 2011, 71, 95-107.

José C. Tesis doctoral: "Resolución biocatalítica de los enantiómeros de ibuprofeno", 2013, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

Ladaga JL, Bonetto RD. Characterization of texture in scanning electron microscope images. *Advances in Imaging and Electron Physics* 2002, 120, 135-191.

Lai C-C, Zullaikah S, Ramjan Vali S, Ju Y-H. Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil. *J Chem Technol Biotechnol* 2005, 80, 331-337.

Llerena-Suster CR, Briand LE, Morcelle SR. Analytical characterization and purification of a commercial extract of enzymes: a case study. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014, 121, 11-20.

McCabe RW, Rodger A, Taylor A. A study of the secondary structure of *Candida antarctica* lipase B using synchrotron radiation circular dichroism measurements. *Enzym Microb Technol* 2005, 36, 70-74.

Mei Y, Miller L, Gao W, Gross RA. Imaging the distribution and secondary structure of immobilized enzymes using infrared microspectroscopy. *Biomacromolecules* 2003, 4, 70-74.

Michniewicz N, Muszynski AS, Wrzeszcz W, Czarnecki MA, Golec B, Hawranek JP, Mielke Z. Vibrational spectra of liquid 1-propanol. *J Mol Struct* 2008, 887, 180-186.

Miller-Chou BA, Koenig JL. A review of polymer dissolution. *Prog Polym. Sci.* 2003, 28, 1223-1270.

Mizukami M, Moteki M, Kurihara K. Hydrogen-bonded macrocluster formation of ethanol on silica surfaces in cyclohexane. *J Am Chem Soc* 2002, 124, 12889-12897.

Santos JC, Bueno T, Molgero PC, Rós D, de Castro HF. Lipase-catalyzed synthesis of butyl esters by direct esterification in solvent-free system. *J Chem Technol Biotechnol* 2007, 82, 956-961.

Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TS, en *Spectrometric identification of organic Compounds*, J. Wiley & Sons eds., 1991, 102-131.

Tan T, Lu J, Nie K, Deng L, Wang F. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. *Biotechnol Adv* 2010, 28, 628-634.

Zawadzki J, Wisniewski M, Weber J, Heintz O, Azambre B. IR study of adsorption and decomposition of propan-2-ol on carbon and carbon-supported catalysts. *Carbon* 2001, 39, 187-192.

Zhao H, Song Z. Migration of reactive trace compounds from Novozym® 435 into organic solvents and ionic liquids. *Biochem Eng J* 2005, 49, 113-118.

CAPÍTULO 4

RESOLUCIÓN CINÉTICA ENZIMÁTICA DE R/S-KETOPROFENO

Como se detalló en el Capítulo 1, la resolución cinética de fármacos con un centro quiral ha sido ampliamente estudiada mediante el uso de enzimas hidrolíticas. Las lipasas son las más comúnmente usadas y en particular la lipasa B de *Candida antarctica*. Además, esta enzima se ha empleado en gran parte en su forma inmovilizada, siendo el de mayor uso el biocatalizador comercial Novozym® 435. En este capítulo se describe la metodología llevada a cabo para la esterificación de R/S-ketoprofeno con distintos alcoholes en un medio libre de solvente. Se emplean alcoholes de distinta longitud de cadena y clasificación. La reacción se lleva a cabo a 45 °C y con agitación a 200 rpm catalizada por el biocatalizador Novozym® 435 sin previo tratamiento y luego de la exposición prolongada a los distintos medios alcohol: 4.76% (v/v) de agua durante 8 días como se describió en el Capítulo 2.

La reacción en estudio se encuentra representada en la Figura 1.

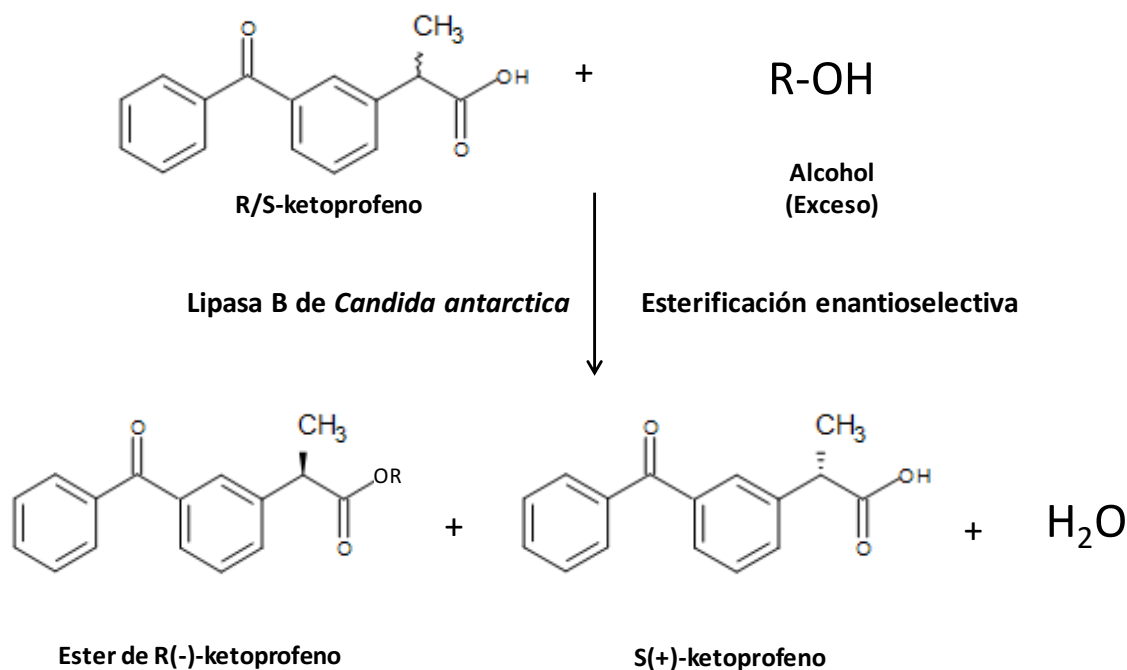


Figura 1. Esterificación enantioselectiva de R/S-ketoprofeno.

4.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1.1. Sistema de reacción

Las reacciones de esterificación de R/S-ketoprofeno con diversos alcoholes como reactivos y solventes catalizadas por el biocatalizador Novozym® 435 (proporcionado por Novozymes Brasil, Paraná) se llevaron a cabo en frascos de vidrio de 100 mL de capacidad cerrados herméticamente (para evitar pérdidas por evaporamiento del alcohol), los cuales fueron mantenidos a una temperatura de 45 °C y agitación de 200 rpm en un baño de agua (Julabo SW22, Alemania) durante 72 h. Los alcoholes empleados fueron metanol (Tedia, grado HPLC), etanol (Carlo Erba, 99.8%), 1-propanol (Sigma Aldrich, $\geq 99.5\%$) y 2-propanol (J.T. Baker, 99.98%). La reacción se llevó a cabo bajo las condiciones óptimas previamente determinadas por Foresti *et al* para la esterificación de R/S-ibuprofeno con etanol sin co-solvente (Foresti *et al*, 2009). Se disolvieron 0.5000 g (1.966 mmoles) de R/S-ketoprofeno (Parafarm, 99.80%) en los volúmenes correspondientes a la mínima cantidad de alcohol necesario para disolverlo. En este contexto se utilizaron 0.70 mL (17.28 mmoles) de metanol, 1.00 mL (17.15 mmoles) de etanol, 1.90 mL (24.98 mmoles) de 1-propanol y 3.10 mL (40.96 mmoles) de 2-propanol. En todos los casos se utilizaron 4.76% (v/v) de agua adicionada que corresponde a la cantidad óptima de agua para la actividad del biocatalizador. La relación molar de alcohol: R/S-ketoprofeno fue 9 para metanol y etanol, 13 para 1-propanol y 21 para 2-propanol. En todos los casos, la reacción fue catalizada por 160 mg de Novozym® 435 empleado sin tratamiento previo y luego del contacto prolongado de 8 días con los distintos alcoholes (según la metodología descrita en la Sección 2.1. del Capítulo 2). Para el seguimiento de la cinética de esterificación, se detuvo la reacción a 1, 3, 6, 12, 24, 30, 48 y 72 h, analizando cada vez conversión y exceso enantiomérico hacia S(+)-ketoprofeno.

Paralelamente, 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. Estos ensayos indicaron que no hay reacción transcurridas 72 h.

4.1.2. Metodología de análisis

4.1.2.1. Determinación de la conversión del profeno

Una vez transcurridos los tiempos de reacción programados, la cantidad de R/S-ketoprofeno remanente, sin esterificar, se determinó por medio de su titulación con una solución de hidróxido de potasio en etanol (KOH Carlo Erba, 97%; etanol absoluto, Carlo Erba, 99.8%) de concentración conocida. Esta solución fue estandarizada empleando ftalato ácido de potasio como patrón primario empleando fenolftaleína como indicador del punto final (Harris, 2001). Esta determinación se basa en la presencia de ketoprofeno racémico remanente como único compuesto ácido del sistema y por ello es posible emplear una titulación ácido-base para su cuantificación (Foresti *et al*, 2009) siendo la metodología reconocida por ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) para el dosaje de este principio activo (www.anmat.gov.ar/principal.asp). Esta titulación tiene un error relativo de 4% y una desviación estándar de 3 unidades (José, 2013).

El cálculo de la masa de ketoprofeno remanente se realizó a través de la ecuación (1) que se presenta a continuación:

$$\text{Masa R/S-ketoprofeno} = ((V \times N)_{\text{KOH}} / 1000) \times PE_{\text{R/S-ketoprofeno}} \times F \quad (1)$$

Donde **V** y **N** corresponden al volumen y normalidad del hidróxido de potasio involucrados en la titulación, respectivamente, y **PE_{R/S-ketoprofeno}** es el peso equivalente de R/S-ketoprofeno expresado en gramos por equivalente (254.28 g/equiv). El término **F** corresponde al factor de corrección que debe emplearse debido a la sustracción de una alícuota del sistema de reacción (25 µL) para el análisis de los enantiómeros por

HPLC (como se describe en la siguiente Sección 4.1.2.2). Para el cálculo del factor de corrección **F** se utilizó la ecuación (2):

$$F = V_{\text{inicial}} / V_{\text{final}} = V_{\text{inicial}} / (V_{\text{inicial}} - 0.025 \text{ mL}) \quad (2)$$

Donde V_{final} y V_{inicial} corresponden al volumen inicial del medio de reacción y al volumen luego de la extracción de la alícuota para el análisis por HPLC, respectivamente.

La conversión de R/S-ketoprofeno (X %) se determinó empleando la ecuación (3):

$$X\% = 100 \times \frac{[(\text{masa de R/S-ketoprofeno})_i - (\text{masa de R/S-ketoprofeno})_f]}{(\text{masa de R/S-ketoprofeno})_i} \quad (3)$$

Donde los subíndices “i” y “f” indican el tiempo inicial y final de reacción, respectivamente.

En este contexto, es importante aclarar que no fue posible determinar la conversión de R/S-ketoprofeno por HPLC debido a que los alcoholes en general difunden en el interior de las esferas de Novozym® 435 como se discutió en el Capítulo 3 (Sección 3.1.5). Como informaron Heinsman *et al* parte del sustrato ácido (en nuestro caso ketoprofeno racémico) es retenido en el interior de las esferas del biocatalizador (Heinsman *et al*, 2003). Por lo tanto, esta cantidad de ketoprofeno que permanece retenida debería ser removida para su cuantificación, de modo de no obtener un valor erróneo de conversión que sucedería al determinar este parámetro por medio de HPLC. Por esto, la única metodología confiable para la determinación del ketoprofeno que no reaccionó es la titulación ácido-base por sacrificio, es decir, que la titulación se realizó directamente en el recipiente donde se llevó a cabo la reacción.

A partir de los datos obtenidos en la titulación se determinaron los valores de actividad específica del biocatalizador. Esta se calculó como la relación entre la conversión del profeno a esteres (en micromoles) por unidad de masa (en mg) de

proteína y el tiempo de reacción (en minutos). La cantidad de proteína corresponde a la contenida en 160 mg de Novozym® 435 con o sin tratamiento con alcoholes según corresponda (Ver anexo I).

4.1.2.2. Determinación del exceso enantiomérico

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por high pressure (performance) liquid chromatography) es la técnica de separación más ampliamente utilizada. Es una técnica sensible, se adapta fácilmente a las determinaciones cuantitativas exactas y permite separar especies no volátiles o termolábiles. Es aplicable a sustancias que son de primordial interés en la industria, entre las cuales se pueden mencionar aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas, terpenoides, plaguicidas, antibióticos esteroides, especies organometálicas y una cierta variedad de sustancias inorgánicas, y sólo se requiere que la muestra sea soluble en la fase móvil empleada (Meyer, 2010; Lindsay, 1992).

En esta técnica un pequeño volumen de muestra líquida (del orden de 10 µL) 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 µm). 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 (Meyer, 2010).

La separación de enantiómeros por HPLC es una técnica que cada vez es más importante, especialmente en la industria farmacéutica. La formación preferencial de complejos entre el agente de resolución quiral (generalmente fase estacionaria) y uno de los isómeros da como resultado la separación de los enantiómeros. Este agente de resolución quiral debe tener carácter quiral en sí mismo para identificar la naturaleza quiral del soluto (Skoog, 2008). 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 ligante, éteres corona, antibióticos macróidos y polímeros quirales. Esta gran variedad de CSPs ha hecho que la cromatografía de líquidos quiral tengo hoy día un alto grado de sofisticación y, por tanto, una gran variedad de aplicaciones (Morante Zarcero, 2007).

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 (Morante Zarcero, 2007). En la Figura 2 se muestra un esquema del equipo de HPLC.

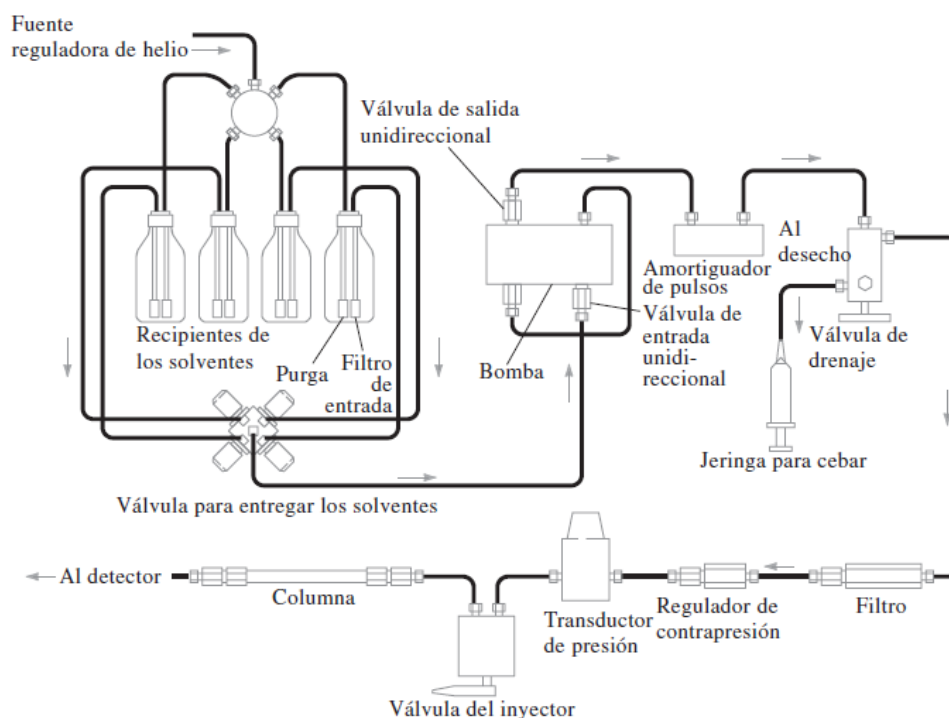


Figura 2. Esquema general de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (extraído de Skoog, 2008).

En este trabajo se emplea una columna Nucleodex beta-PM (Macherey-Nagel, Alemania) cuya fase estacionaria consiste en β -ciclodextrinas permetiladas unidas a partículas porosas de sílice de 5 a 10 μm de diámetro (Figura 3) (www.mn-net.com).

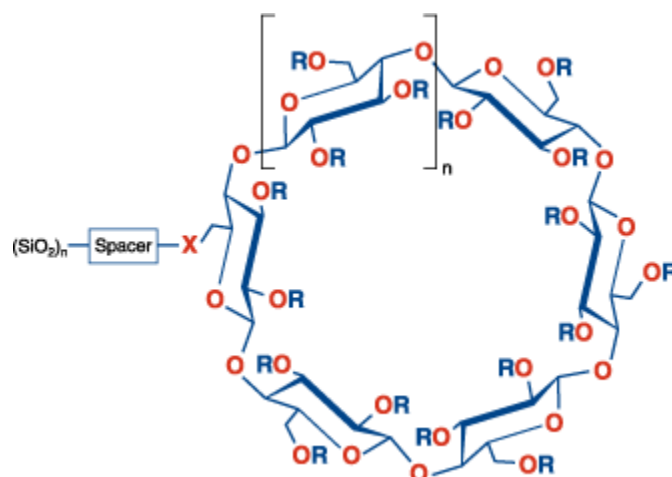


Figura 3. Representación de la fase estacionaria empleada. Columna Nucleodex β -PM, Macherey-Nagel. $R = \text{CH}_3$, $n = 2$. Obtenida de www.mn-net.com.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos compuestos por unidades de alfa D-glucosa unidas en posiciones 1,4. Las β y α -ciclodextrinas contienen 7 y 8 unidades de glucosa, respectivamente. La separación de este tipo de fase estacionaria (conocidas como fases de cavidad) se lleva a cabo mediante la formación de compuestos de inclusión. Las β -ciclodextrinas tienen una cavidad quiral hidrófoba. 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 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 (Morante Zarcero, 2007).

Como se mencionó previamente, esta fase estacionaria interactúa con el analito mediante la formación de un complejo de inclusión dentro de la cavidad de la ciclodextrina y la interacción π - π entre la porción π -ácida del analito y la porción π -básica de la columna. Estas interacciones controlan el orden de elución de los enantiómeros que tienen una función ácido carboxílico. En este sentido, la literatura demuestra que el enantiómero dextrorrotatorio eluye en primer lugar en el cromatograma y el levorrotatorio a continuación. Esto ha sido estudiado en aminoácidos (Lee *et al*, 1995); AINEs y algunos fármacos (Osorio Grisales *et al*, 2012; Vandenbosch *et al*, 1992), incluyendo ibuprofeno racémico (Foresti *et al*, 2009) y ketoprofeno racémico (Ameyibor & Stewart, 1998). Por lo tanto, estas referencias y el hecho de que la lipasa B de *Candida antarctica* cataliza la esterificación del enantiómero R(-) ha proporcionado las evidencias necesarias para establecer la identidad de los picos en el cromatograma siendo los tiempos de retención para S(+), R(-) y ésteres de 13 min, 14 min y 24 min, respectivamente.

El equipo HPLC y las condiciones empleadas para este trabajo de tesis fueron:

- Columna Nucleodex β -PM
- Detector UV operando a 230 nm.
- Programa Peak ABC para la adquisición de los datos cromatográficos y cuantificación de áreas
- Fase móvil compuesta por metanol: 0.1% (v/v) TEAA (50: 50 (v/v)). El buffer TEAA (trietilamonio acetato) está compuesto de trietilamina TEA (Anedra, 99%) y ácido acético glacial (Anedra, \geq 99.7%). El mismo se preparó mediante la adición de 300 μ L de TEA (trietilamina) y 700 μ L de ácido acético glacial y se llevó a un volumen de 1 L con agua destilada para obtener una concentración de 0.1% (v/v) y pH = 4.10-4.15.
- Volumen de inyección: 10 μ L.

- Caudal de fase móvil: 0.700 mL/min.
- Presión: 2000 psi.
- Temperatura ambiente.
- Tiempo de análisis: aproximadamente 30 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo programado de reacción, se procedió a la extracción de una alícuota de 25 μL del medio líquido y se diluyó en 10.00 mL de metanol: H_2O 60:40 (v/v). Luego se realizaron las diluciones necesarias (siempre con metanol: H_2O 60:40 (v/v)), de acuerdo al valor hallado de masa remanente de R/S-ketoprofeno, de modo de obtener una concentración del orden de 30 ppm. Por último, las diluciones se filtraron empleando filtros de nylon (0.45 μm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro) de Osmonic Inc. En todo momento, las muestras se conservaron en frascos de vidrio color caramelo cerrados herméticamente y en heladera hasta el momento de su análisis. Esta concentración y filtración de las muestras son necesarias para el posterior análisis de los enantiómeros de ketoprofeno mediante HPLC empleando una columna quiral.

Todas las muestras se corrieron con un mínimo de 3 veces con un error relativo de 2.4 % y una desviación estándar de 0.5 unidades (José, 2013).

A continuación se presenta a modo de ejemplo un cromatograma de R/S-ketoprofeno obtenido bajo las condiciones detalladas:

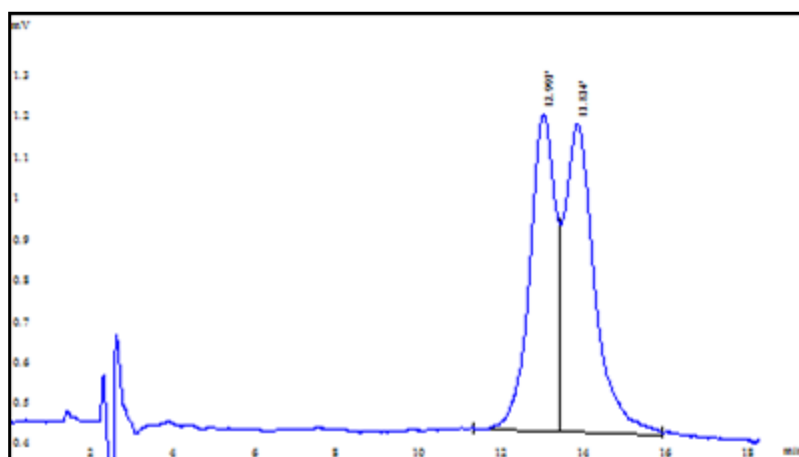


Figura 4. Cromatograma de R/S-ketoprofeno.

4.1.3. Cálculos de parámetros de enantioselectividad

El progreso de resolución cinética de una reacción más comúnmente usado es el descrito por Chen *et al.* Estos autores definen el parámetro E (relación enantiomérica) y ee% (exceso enantiomérico) (Chen *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1987).

- **Exceso enantiomérico (ee %):**

El cálculo del exceso enantiomérico se realiza típicamente a través de la ecuación (4), donde $[S]_t$ indica la concentración molar del enantiómero S(+)-ketoprofeno remanente al final de la reacción y $[R]_t$ indica la concentración molar del enantiómero R(-)-ibuprofeno remanente al final de la reacción.

$$\text{eeS(+)} \% = \frac{[S]_t - [R]_t}{[S]_t + [R]_t} \times 100 \qquad \text{eeR(-)} \% = \frac{[R]_t - [S]_t}{[S]_t + [R]_t} \times 100 \qquad (4)$$

El exceso enantiomérico se refiere a uno de los dos enantiómeros S(+) o R(-) de los productos o los reactivos, dependiendo de la facilidad de análisis de los mismos. Este parámetro tomará valores entre 0 y 100 %.

Previamente en nuestro grupo de trabajo, fue demostrada la relación lineal que vincula la concentración de cada enantiómero de ibuprofeno en una muestra con el área correspondiente en el cromatograma (José, 2013). Esto permite expresar el eeS(+) % y el eeR(-) % en función de dichas áreas. Así, la expresión que se empleó en el cálculo del exceso enantiomérico de sustrato (eeS(+) %), S(+)-ketoprofeno en nuestro caso particular, fue la representada por la ecuación (5), donde Área S(+) y Área R(-) son las áreas cromatográficas de los enantiómeros S(+) y R(-), respectivamente.

$$\text{ee S(+)} \% = \frac{[\text{Área S(+)} - F_C \times \text{Área R(-)}]}{[\text{Área S(+)} + F_C \times \text{Área R(-)}]} \times 100 \qquad (5)$$

“ F_c ” es un factor de corrección empleado para solucionar la diferencia en la sensibilidad del detector hacia cada enantiómero. Este se calculó como la relación entre las áreas del enantiómero S(+) y R(-) de una solución de R/S-ketoprofeno de concentración 30 ppm (ecuación (6)).

$$F_c = \text{Area S(+)} / \text{Area R(-)} \quad (6)$$

- **Relación enantiomérica E:**

Este parámetro relaciona la conversión total (X) con el exceso enantiomérico de sustrato (eeS) o de producto (eeP), tal como se muestra en la ecuación (7):

$$E = \frac{\ln [(1-X)(1-ee_s)]}{\ln [(1-X)(1+ee_s)]} \quad E = \frac{\ln [1-X(1+ee_p)]}{\ln [1-X(1-ee_p)]} \quad (7)$$

En términos generales se considera que una reacción es enantioselectiva a valores de $E > 20$ aunque este valor depende fuertemente de la fuente consultada (Ghanem & Aboul-Enein, 2004). 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 *et al* para reacciones irreversibles en las cuales un único sustrato se convierte en un único producto siguiendo una cinética de primer orden o pseudo primer orden, en un sistema homogéneo y en ausencia de reacciones secundarias (Chen *et al*, 1982). Posteriormente, los mismos autores extendieron la definición a reacciones reversibles. En estos casos, el cálculo del parámetro E está sujeto al conocimiento de la constante de equilibrio de la reacción (Chen *et al*, 1987).

Straathof & Jongejan hacen 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. 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 (7) para su cálculo, expresión que no es de aplicación general (Straathof & Jongejan, 1997). 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 (Straathof & Jongejan, 1997). 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 (Heinsman *et al*, 2003).

Aunque los parámetros descritos por Chen *et al* han sido ampliamente utilizados en todo tipo de resoluciones algunos autores proponen otra forma de cuantificar la enantioselectividad (Kazlauskas *et al*, 1991; Chiou *et al*, 1992; Santaniello *et al*, 1993; Secundo *et al*, 1997). López-Belmonte *et al*.propusieron un nuevo parámetro denominado Factor Enantiomérico **EF**. Este es independiente de la cinética de reacción y se calcula empleando la ecuación (8), como el cociente del exceso enantiomérico experimental (calculado mediante la ecuación (4)) y el denominado exceso enantiomérico teórico (ecuación (8)), 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 (López-Belmonte *et al*, 1997).

$$\mathbf{EF = ee/ee\ te\acute{o}rico} \qquad \mathbf{ee\ te\acute{o}rico = \frac{X \times 100}{(100 - X)}} \qquad (8)$$

En la resolución cinética de racematos, cuando la conversión (X %) es 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 decidió centrar el estudio del rendimiento enantioselectivo de la reacción de interés mediante el cálculo del exceso enantiomérico de sustrato, S(+) ibuprofeno.

4.1.4. Exploración del efecto de la actividad acuosa a_w

El agua juega un papel fundamental en la estructura y función enzimática. Se requiere una pequeña cantidad de agua para mantener la conformación tridimensional activa incluso cuando la enzima se encuentra unida a un soporte. El agua contribuye a la integridad estructural, polaridad del sitio activo, y estabilidad proteica. Así mismo, provee interacciones hidrofóbicas con residuos polares en la molécula de la enzima, los cuales de otra manera estarían interactuando entre sí, creando una estructura conformacional incorrecta (Yahya *et al*, 1998). Usualmente su efecto en medio orgánico es analizado en términos de la actividad acuosa (a_w), la cual se define como la relación entre la presión de vapor del agua en la mezcla y la del agua pura a una determinada temperatura. La actividad enzimática como función de la actividad acuosa depende principalmente de propiedades intrínsecas de la molécula de enzima. Las lipasas parecerían presentar distintos comportamientos con el aumento de la a_w (Yoshidaa *et al*, 2011). El nivel de hidratación de la enzima influye en la flexibilidad de la proteína. Los bajos niveles de hidratación llevan a una enzima menos flexible, la cual normalmente es menos activa (Wehtje *et al*, 1997 (a)). Este hecho afecta la enantioselectividad de una manera que no es completamente conocida. En la literatura se encuentran estudios en los cuales los altos valores de actividad acuosa aumentan la enantioselectividad (Kitaguchi *et al*, 1990; Högberg *et al*, 1993) y otros en

los que la enantioselectividad disminuye (Bodnar *et al*, 1990; Orrenius *et al*, 1995). En este sentido, la a_w ha sido descrita como un parámetro importante a optimizar en reacciones enzimáticas.

Adicionalmente, en una reacción de esterificación de un ácido carboxílico con un alcohol, los productos obtenidos son un éster y agua. Esta liberación de agua provoca un cambio en la a_w del sistema. Además, las moléculas de agua podrían revertir la posición de equilibrio y aumentar la reacción inversa de hidrólisis del éster formado.

La cantidad óptima de agua depende del solvente y sustratos empleados, de la enzima y de las condiciones de operación. Cuando el contenido de agua es demasiado bajo, la hidratación de la enzima parecería no estar completa, llevando a una catálisis ineficiente. Por el contrario, cuando los niveles de agua son elevados, la enzima cataliza con mayor facilidad la hidrólisis del éster que la esterificación (Gayot *et al*, 2003).

Se han empleado diversos métodos para controlar la a_w . La mayoría de estos métodos se basan en la capacidad de algunas sales de tener un estado de hidratación fijo lo cual otorga una a_w definida. Las soluciones saturadas de sales se pueden emplear para ajustar la a_w antes y durante la reacción en la cual se consume o produce agua. Otra técnica empleando sales consiste en el control con pares de sales hidratadas. Además se ha logrado la deshidratación mediante la adición de un tamiz molecular y aplicación de vacío durante la reacción (Adamczak & Bornschewer, 2009; Sabbani & Hedenström, 2009; Wehtje *et al*, 1997 (b)).

Los estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación evidenciaron que el agregado de un determinado porcentaje de agua en el medio de reacción es un requisito indispensable para mantener la actividad enzimática durante la esterificación enantioselectiva de R/S-ibuprofeno (Foresti *et al*, 2009). En este contexto, se realizó la esterificación de R/S-ketoprofeno con el menor volumen posible de etanol, con una masa constante de biocatalizador (160 mg) a 45 °C y 200 rpm (según se describe en la Sección 4.1.1. del presente capítulo) y se investigó la influencia de la actividad acuosa a_w de los alcoholes en la conversión y exceso enantiomérico. En principio se investigó el alcohol deshidratado con tamiz molecular 4A y luego se moduló la actividad acuosa

del etanol por medio de soluciones saturadas de: cloruro de litio LiCl (Biopack, $\geq 99.0\%$; $a_w = 0.11$), acetato de potasio KCH_3COO (Biopack, $\geq 99.0\%$; $a_w = 0.23$), cloruro de sodio NaCl (Mallinckrodt, 99.0% ; $a_w = 0.75$) y cloruro de potasio KCl (Anedra, 99.8% ; $a_w = 0.86$) (Sabbani y Hedenström, 2009). La adecuación del sistema profeno-alcohol a la actividad acuosa deseada se realizó en una bolsa seca que permite el flujo controlado de nitrógeno y los valores de actividad acuosa se determinaron empleando un termohigrómetro HANNA HI 9564.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Esterificación de R/S-ketoprofeno con alcoholes de cadena corta

Se llevó a cabo la esterificación de R/S-ketoprofeno con metanol, etanol, 1-propanol y 2-propanol (con 4.76% (v/v) de agua) como reactivos y solventes catalizada por Novozym® 435. El biocatalizador se empleó sin tratamiento previo y luego del contacto de 8 días a $45\text{ }^\circ\text{C}$ con los distintos alcoholes con el objetivo de obtener evidencias del efecto del alcohol en la actividad del biocatalizador. Se calcularon los parámetros de conversión (%), exceso enantiomérico hacia el enantiómero S(+) (eeS(+)) (%) y actividad específica ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) en función del tiempo de reacción.

La Figura 5 muestra los resultados en términos de conversión de R/S-ketoprofeno (%) y exceso enantiomérico hacia S(+)-ketoprofeno (%) empleando Novozym® 435 sin tratamiento previo. La esterificación de R/S-ketoprofeno con etanol y 1-propanol alcanza valores de conversión de 50% a las 48 h de reacción. En contraste, la conversión no supera el 12% cuando se utiliza metanol y 2-propanol como aceptores de acilo. En cuanto al exceso enantiomérico hacia el enantiómero S(+) se observa un comportamiento similar alcanzando valores cercanos a 56% a las 72 h de reacción empleando etanol y 1-propanol, y es prácticamente nulo para la esterificación con metanol y 2-propanol.

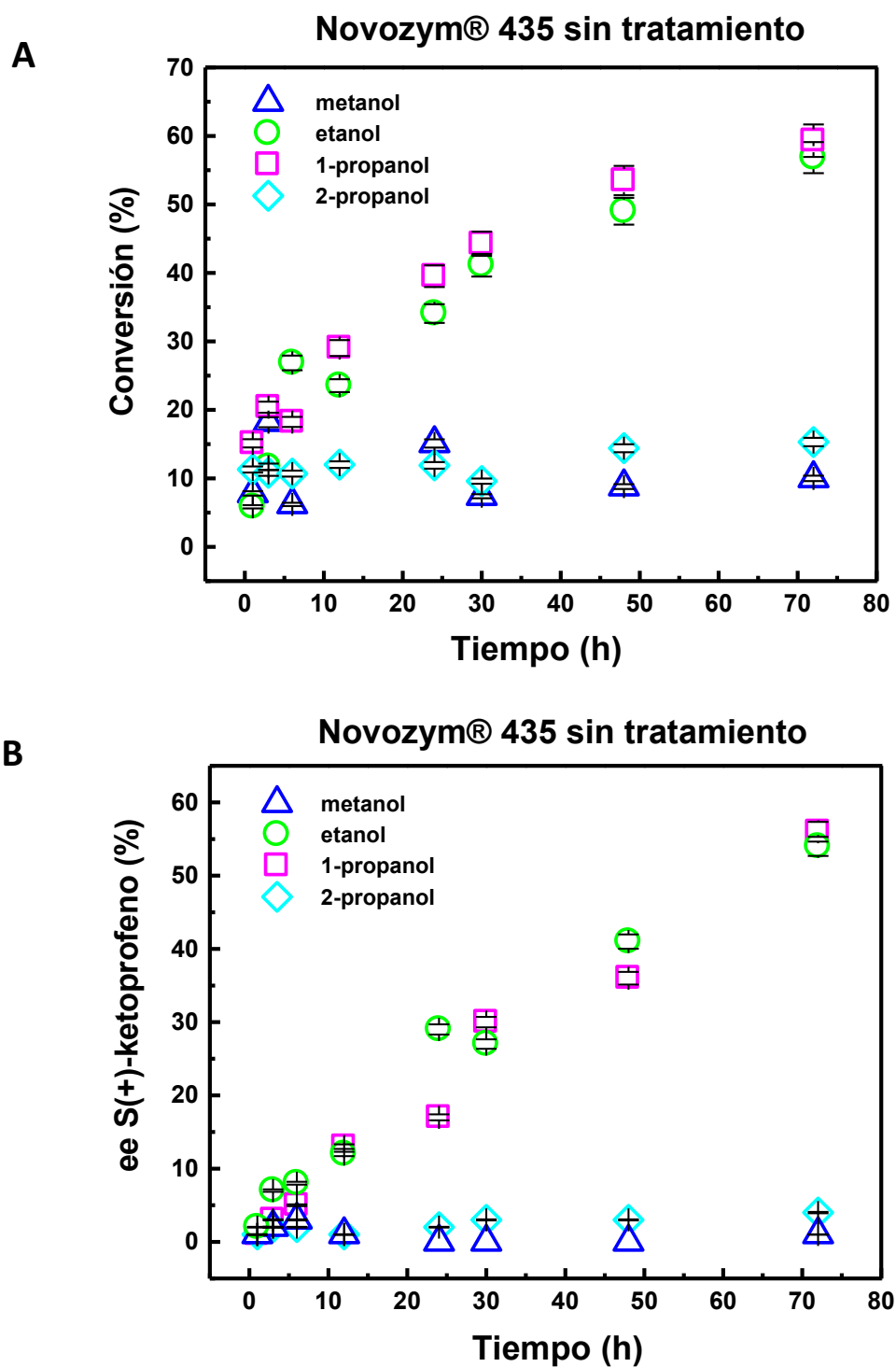


Figura 5. Conversión (%) (A) y exceso enantiomérico hacia S(+)-ketoprofeno (eeS(+)) (%) (B) obtenidos en la esterificación de R/S-ketoprofeno con metanol, etanol, 1- y 2-propanol como reactivos y solventes empleando Novozym® 435 sin tratamiento previo.

Cabe aclarar, que se debería lograr un alto porcentaje de exceso enantiomérico hacia S(+)-ketoprofeno cuando la conversión obtenida sea de un 50%. Valores mayores indicarían que ambos enantiómeros están siendo esterificados. Una situación “ideal” sería aquella en la que se logra una conversión de 50%, y un eeS(+) de 100%, lo cual indicaría que se esterificó la totalidad del isómero R(-) mientras que el S(+) completo permaneció sin reaccionar.

Los excesos enantioméricos hacia S(+)-ketoprofeno de 48% y 56% logrados con 1-propanol y etanol respectivamente (con una conversión aproximada de 50%), podrían atribuirse a la modificación en la flexibilidad de la proteína expuesta a estos alcoholes. Estudios previos llevados a cabo por Broos *et al* evidenciaron la relación existente entre flexibilidad y enantioselectividad. Los autores demostraron que la flexibilidad de la enzima en el orden de los sub-nanosegundos permite la rápida interconversión de múltiples conformaciones enzimáticas, aumentando la probabilidad de alcanzar un estado conformacional capaz de unirse y convertir un sustrato enantiomérico (Broos *et al*, 1995). Investigaciones previas sugieren que los solventes fijan una cierta conformación del sitio activo que regula la accesibilidad de los sustratos. Los factores de temperatura o valores-B están linealmente relacionados con el desplazamiento cuadrático medio de un átomo y provee una indicación de la flexibilidad atómica en su estado cristalino (Yuan *et al*, 2003). Estos autores determinaron que los residuos en el sitio activo son menos flexibles que los residuos que no pertenecen al sitio activo. El comportamiento catalítico de varias enzimas (entre las que se incluye la lipasa B de *Candida antarctica*) está influenciado por la presencia de solventes hidrofóbicos e hidrofílicos adicionados al medio de reacción. En este contexto, Trodler & Pleiss emplearon el valor-B para estudiar la estructura y flexibilidad de la enzima CALB en agua y solventes orgánicos. Por lo general, en los solventes orgánicos se pueden encontrar moléculas de agua “internas”, que están en el interior de la proteína y juegan un papel importante en la conformación activa mediante una red de puentes de hidrógeno. Por otro lado, las moléculas de agua de “de contacto”, están débilmente unidas a la superficie de la enzima y pueden ser rápidamente intercambiadas por otras moléculas de agua. En solventes orgánicos la cantidad de moléculas de agua en la fase

orgánica es baja y por lo tanto la probabilidad de intercambio de las moléculas de agua superficiales es baja. La alta velocidad de intercambio de las moléculas de agua en la superficie, es la razón de un aumento en la flexibilidad, lo cual indica que la movilidad de la proteína aumenta con un aumento en la cantidad de agua. Adicionalmente, los solventes orgánicos polares remueven mayor cantidad de agua de la superficie que los no polares, lo cual indica que la constante dieléctrica de los solventes está relacionada con la remoción de estas moléculas de agua. La baja constante dieléctrica de los solventes orgánicos permite un bajo intercambio de las moléculas de agua en la superficie y produce un aumento en el número de moléculas de agua unidas a la superficie formando una red. Los grupos polares favorecen las interacciones directas de las moléculas de agua y forman puentes de hidrógeno, mientras que los grupos no polares aumentan las interacciones entre las moléculas de agua y de esta forma se intensifica la interacción entre moléculas de agua vecinas y el intercambio de las mismas se ve restringido (Trodler & Pleiss, 2008).

Si bien en los estudios previos llevados a cabo por otros autores en la esterificación de R/S-ketoprofeno catalizada por Novozym® 435 empleando distintos solventes se ha logrado obtener valores de conversión y exceso enantiomérico más altos, en aquellos donde el valor de conversión supera el 50%, una parte del isómero S(+) ha sido esterificado. Una de las investigaciones más completas en este sentido fue reportada por Park *et al.* Los autores estudiaron la esterificación de ketoprofeno con un exceso de etanol empleando tetracloruro de carbono (X % = 76, ee % = 97), n-hexano (X % = 89, ee % = 81) y tolueno (X % = 67, ee % = 84) como co-solventes (Park *et al.*, 1999). Si bien estos valores aparentan buenos resultados en la resolución enantiomérica del R/S-ketoprofeno, en la realidad parte del enantiómero S(+), el cual debería permanecer sin reaccionar, ha sido esterificado. En el caso particular de la esterificación con etanol como aceptor de acilo y solvente, la conversión fue de 6 % con un exceso enantiomérico de 2% hacia el isómero S(+). Resultados similares se observaron en estudios llevados a cabo por D'Antona *et al.*, en los cuales obtuvieron una conversión de 79 % y eeS(+) de 90% y por Ong *et al.* en los que obtuvieron una conversión de 81 % y un eeS(+) de 59.4% (D'Antona *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2006). Los

resultados obtenidos en la presente investigación son similares a los logrados por Carvalho *et al* quienes obtuvieron valores de conversión y exceso enantiomérico de 62 % y 55 %, respectivamente, a las 54 h de reacción con 1-propanol empleando isooctano como co-solvente (Carvalho *et al*, 2006).

En la Figura 6 se pueden apreciar los valores de conversión (%) y exceso enantiomérico (eeS(+)% en la conversión de R/S-ketoprofeno empleando Novozym® 435 previamente tratado durante 8 días con los alcoholes.

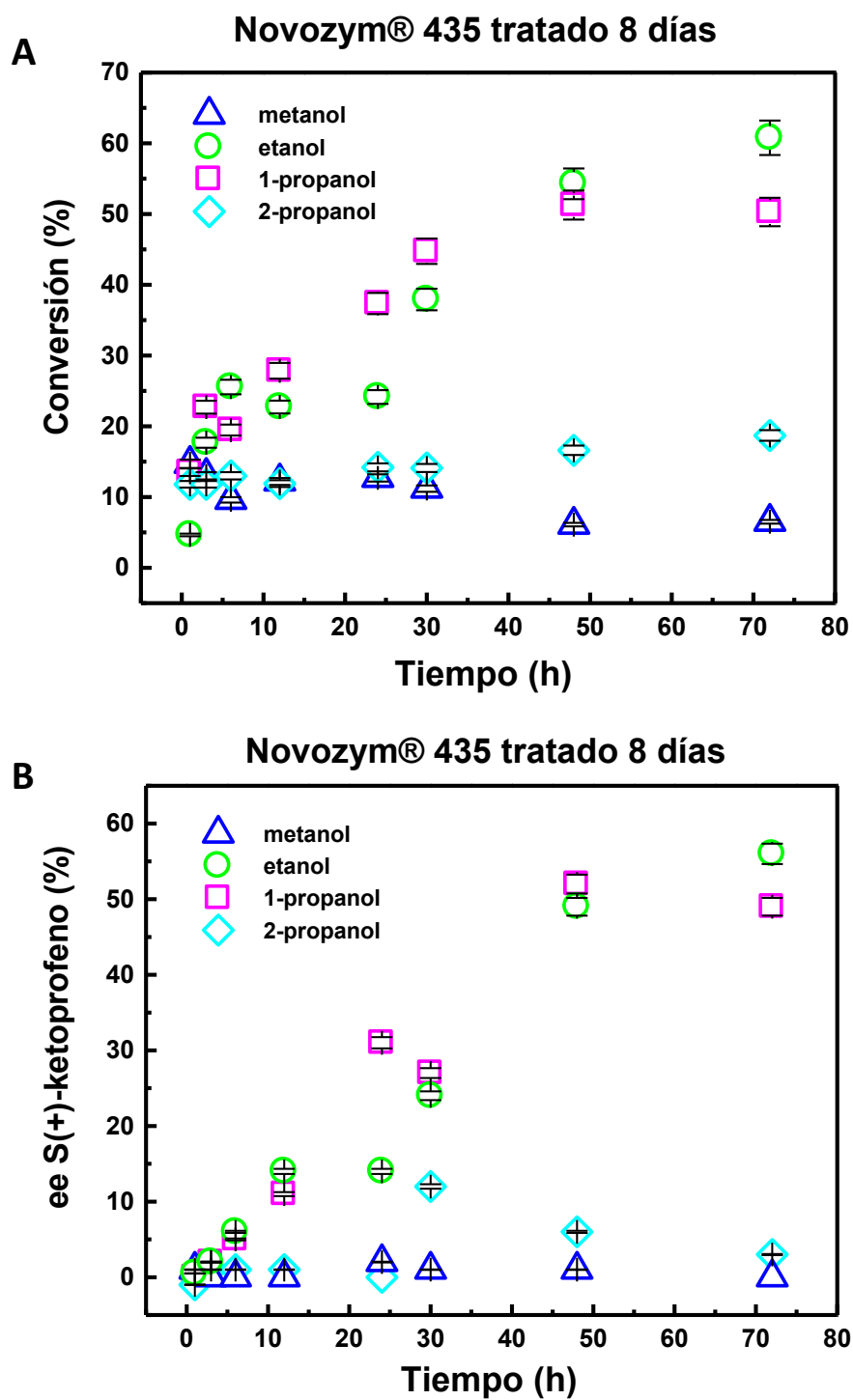


Figura 6. Conversión (%) (A) y exceso enantiomérico hacia S(+)-ketoprofeno (eeS(+)) (%) (B) obtenidos en la esterificación de R/S-ketoprofeno con metanol, etanol, 1- y 2-propanol como reactivos y solventes empleando Novozym® 435 previamente expuesto a los alcoholes durante 8 días a 45 °C

Al comparar los resultados expuestos en estos gráficos con los obtenidos empleando el biocatalizador sin tratamiento previo, se puede concluir que los efectos perjudiciales que ejercen los alcoholes sobre la integridad de Novozym® 435 no tendrían un efecto importante en la actividad del biocatalizador.

El cálculo de actividad específica permitió obtener mayores evidencias en lo que a actividad del biocatalizador respecta. La actividad específica indica la cantidad de R/S-ketoprofeno convertidos a éster (μ moles) por unidad de tiempo (min) y unidad de proteína (mg) presente en las esferas del biocatalizador. Este parámetro permite una comparación directa del rendimiento de la proteína activa independientemente de la cantidad de proteína (sitios activos) y el tiempo de reacción.

Las Figura 7 muestra la actividad específica de Novozym® 435 en la esterificación de R/S-ketoprofeno con los alcoholes empleando el biocatalizador sin tratamiento previo (A) y luego del contacto de 8 días con los alcoholes (B).

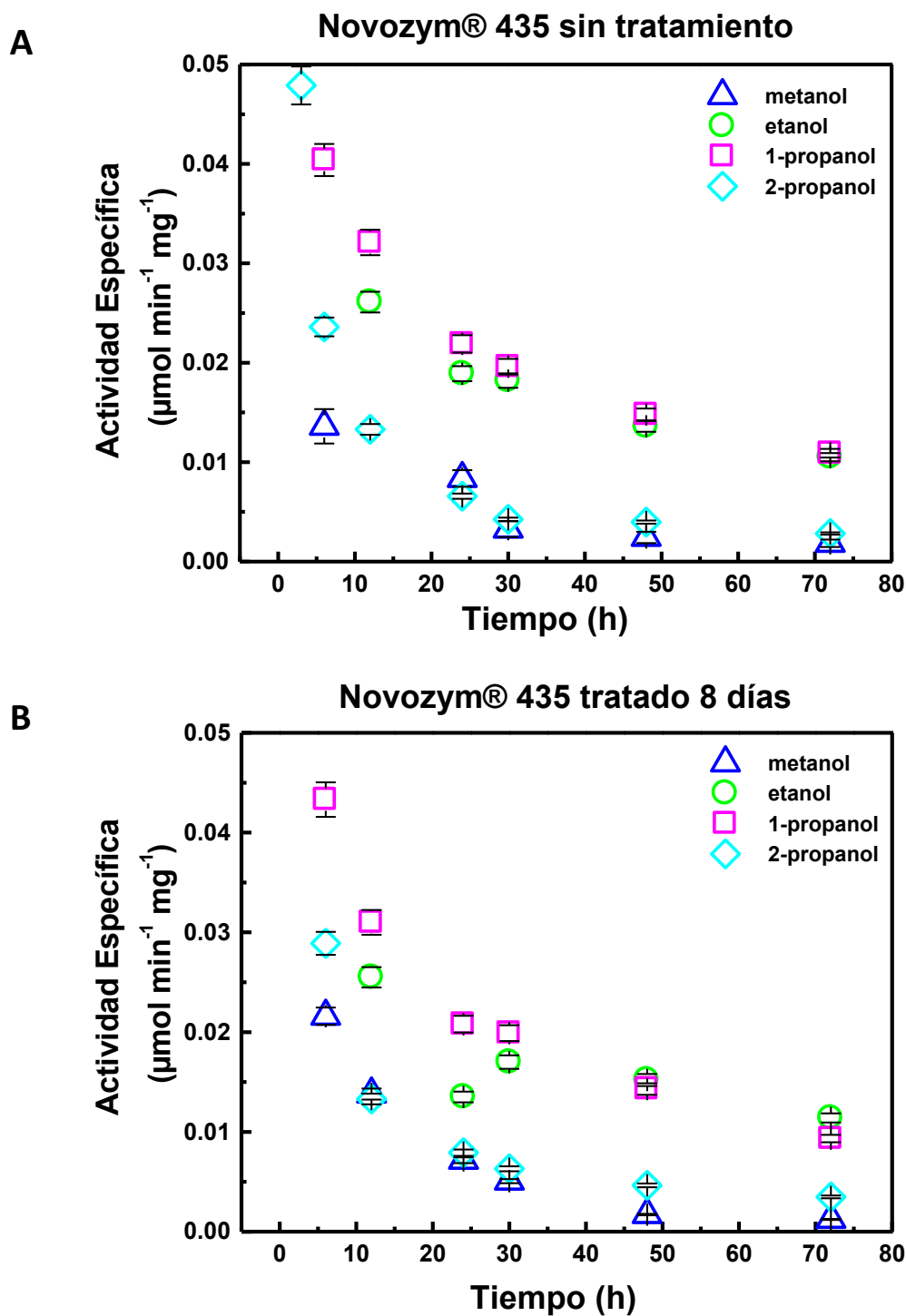


Figura 7. Actividad específica de Novozym® 435 (A) sin tratamiento previo y (B) previamente expuesto a los alcoholes durante 8 días a 45 °C, empleado en la esterificación de R/S-ketoprofeno con metanol, etanol, 1- y 2-propanol como reactivos y solventes.

La comparación de las actividades específicas obtenidas con el biocatalizador sin tratar y previamente tratado con los alcoholes evidencia que la esterificación de R/S-ketoprofeno con metanol y 2-propanol no es factible.

En este sentido, investigaciones previas llevadas a cabo por Arroyo & Sinisterra indicaron que la velocidad de esterificación de ácidos 2-arilpropiónicos catalizada por lipasas microbianas está influenciada por la naturaleza del alcohol. Los autores demostraron que la velocidad máxima de esterificación de ácidos (R/S)-2-arilpropiónicos se alcanza empleando alcoholes primarios, disminuye con alcoholes secundarios y es casi nula con alcoholes terciarios (tales como alcohol tertbutílico). En este caso, se empleó isooctano como co-solvente y la reacción fue llevada a cabo a 50 °C con la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (Arroyo & Sinisterra, 1994). Adicionalmente, López-Belmonte *et al* demostraron que no se obtenían buenos rendimientos hacia los ésteres cuando emplearon 2-propanol en la esterificación de ibuprofeno racémico catalizada por la lipasa de *Rhizomucor miehei* (López-Belmonte *et al*, 1997). Más recientemente, resultados similares fueron reportados en la esterificación de ibuprofeno empleando *Candida* sp (Liu *et al*, 2009). Estos estudios atribuyeron las causas de la baja actividad del biocatalizador al impedimento estérico del alcohol. En este sentido, se obtuvieron resultados similares para el R/S-ketoprofeno que se discuten en el Capítulo 5. Se presentarán un estudio teórico de la esterificación de R/S-ketoprofeno catalizada por CALB empleando los distintos alcoholes, los cuales serán un complemento y justificativo de las conclusiones obtenidas hasta el momento.

La baja actividad específica de Novozym® 435 empleando metanol como reactivo y solvente podría estar relacionada con el efecto perjudicial que este alcohol ejerce sobre la integridad física del biocatalizador. Sin embargo, el etanol ejerce un efecto similar sobre el biocatalizador sin disminuir la actividad del mismo. Por este motivo, la baja actividad con metanol se atribuye a la modificación de la estructura secundaria de la enzima CALB inducida por el alcohol. Como se discutió en el Capítulo 3, a partir de la primera hora de reacción empleando el biocatalizador sin tratamiento previo se

observa un aumento en los agregados moleculares que evidencian la desnaturalización de la enzima.

En los estudios llevados a cabo en esta investigación, los valores de conversión (%) y exceso enantiomérico (eeS(+)) % de R/S-ketoprofeno son muy similares ya sea empleando el biocatalizador previamente tratado o no, es decir que la actividad del biocatalizador no disminuyó de manera significativa luego del contacto prolongado con los medios alcohol- agua. Debido a esto se continuó con ciclos de esterificación de 48 h en las mismas condiciones. Este experimento sólo se realizó con etanol y 1-propanol ya que la reacción sólo es factible con estos alcoholes. Al finalizar el ciclo de 72 h de reacción empleando el biocatalizador previamente tratado con cada alcohol, el mismo fue separado del medio de reacción y lavado con alcohol para asegurar que no permanezcan adsorbidas moléculas de sustrato ni producto. Luego se emplea este biocatalizador para llevar a cabo nuevos ciclos de esterificación de R/S-ketoprofeno de 48 h. En la Figura 8 se presentan los resultados obtenidos en términos de conversión y ee hacia S(+)-ketoprofeno empleando 1-propanol a las 72 h de reacción empleando el biocatalizador sin tratamiento previo, luego de 72 h de reacción empleando Novozym® 435 previamente tratado 8 días y luego del reuso de 48 h de este último biocatalizador.

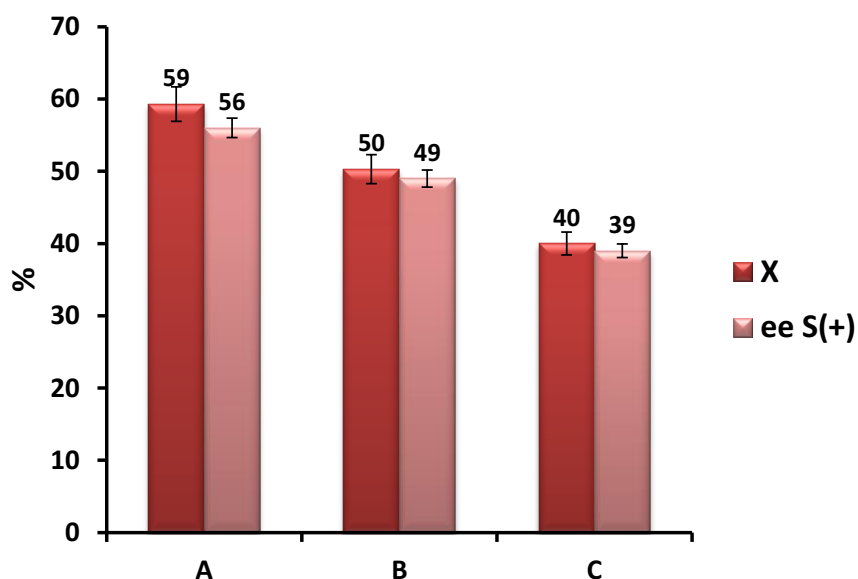


Figura 8. Conversión (X) y exceso enantiomérico hacia el enantiómero S(+) (ee S(+)) de la esterificación de R/S-ketoprofeno con 1-propanol en las condiciones óptimas. **A:** 72 h de reacción con Novozym® 435 sin tratamiento previo, **B:** 72 h de reacción empleando Novozym® 435 tratado 8 días con 1-propanol, **C:** reuso de 48 h del biocatalizador de B

Como se puede apreciar en la Figura 8, la conversión y exceso enantiomérico a las 72 h empleando el biocatalizador tratado sólo disminuyen aproximadamente un 15% con respecto al valor obtenido a las 72 h de reacción con Novozym® 435 sin tratamiento previo. Sin embargo, luego del reuso de 48 h del biocatalizador tratado y empleado en la reacción de 72 h, los valores de conversión y exceso enantiomérico ya disminuyeron un 30% del valor inicial.

La Figura 9 presenta los resultados obtenidos en el reuso del biocatalizador en la esterificación de R/S-ketoprofeno con etanol.

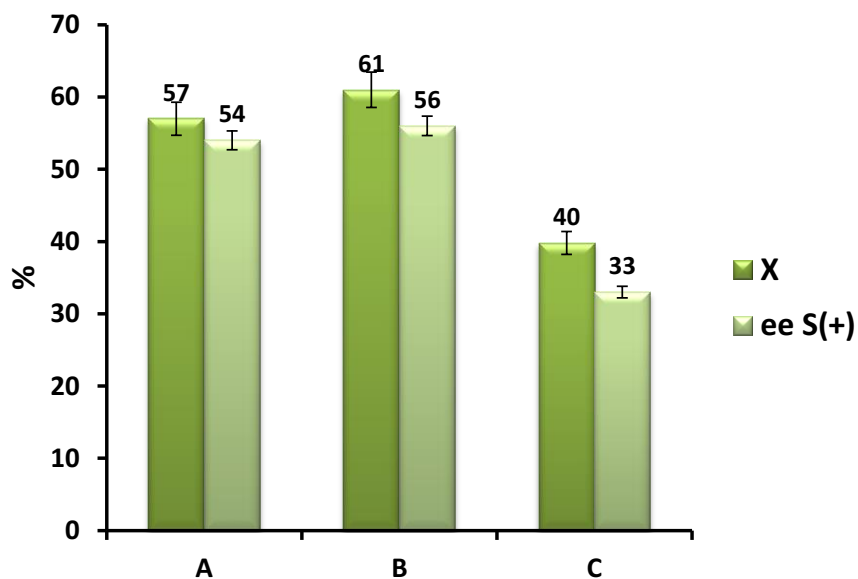


Figura 9. Conversión (X) y exceso enantiomérico hacia el enantiómero S(+) (ee S(+)) de la esterificación de R/S-ketoprofeno con etanol en las condiciones óptimas. **A:** 72 h de reacción con Novozym® 435 sin tratamiento previo, **B:** 72 h de reacción empleando Novozym® 435 tratado 8 días con etanol, **C:** reúso de 48 h del biocatalizador de B

Luego de 72 h de reacción empleando Novozym® 435 previamente tratado con etanol, la actividad del biocatalizador no se ve afectada por el tratamiento con el alcohol. Sin embargo, en el primer reúso posterior de 48 h la actividad del mismo decayó aproximadamente un 35%.

En contraste con los resultados obtenidos, el tratamiento de Novozym® 435 con los alcoholes durante 8 días disminuye su actividad en la esterificación enantioselectiva de ibuprofeno (Figura 10). Como se puede apreciar en la figura, las actividades y excesos enantioméricos son siempre bajas cuando se emplean metanol y 2-propanol. En términos generales, se puede concluir que la actividad específica y el exceso enantiomérico hacia el isómero S(+) aumenta o permanece constante en la esterificación de R/S-ketoprofeno con etanol y 1-propanol luego del tratamiento de 8 días con los alcoholes. Sin embargo, ocurre lo contrario cuando se emplean estos alcoholes en la esterificación de R/S-ibuprofeno, observándose una disminución de los valores de estos parámetros. En general, se observan mejores resultados para la

esterificación de R/S-ketoprofeno, lo cual podría deberse a que esta molécula podría acoplarse con mayor facilidad al sitio activo de la enzima debido a la posibilidad de giro que tiene su grupo cetónico (Arroyo Sánchez, 1998).

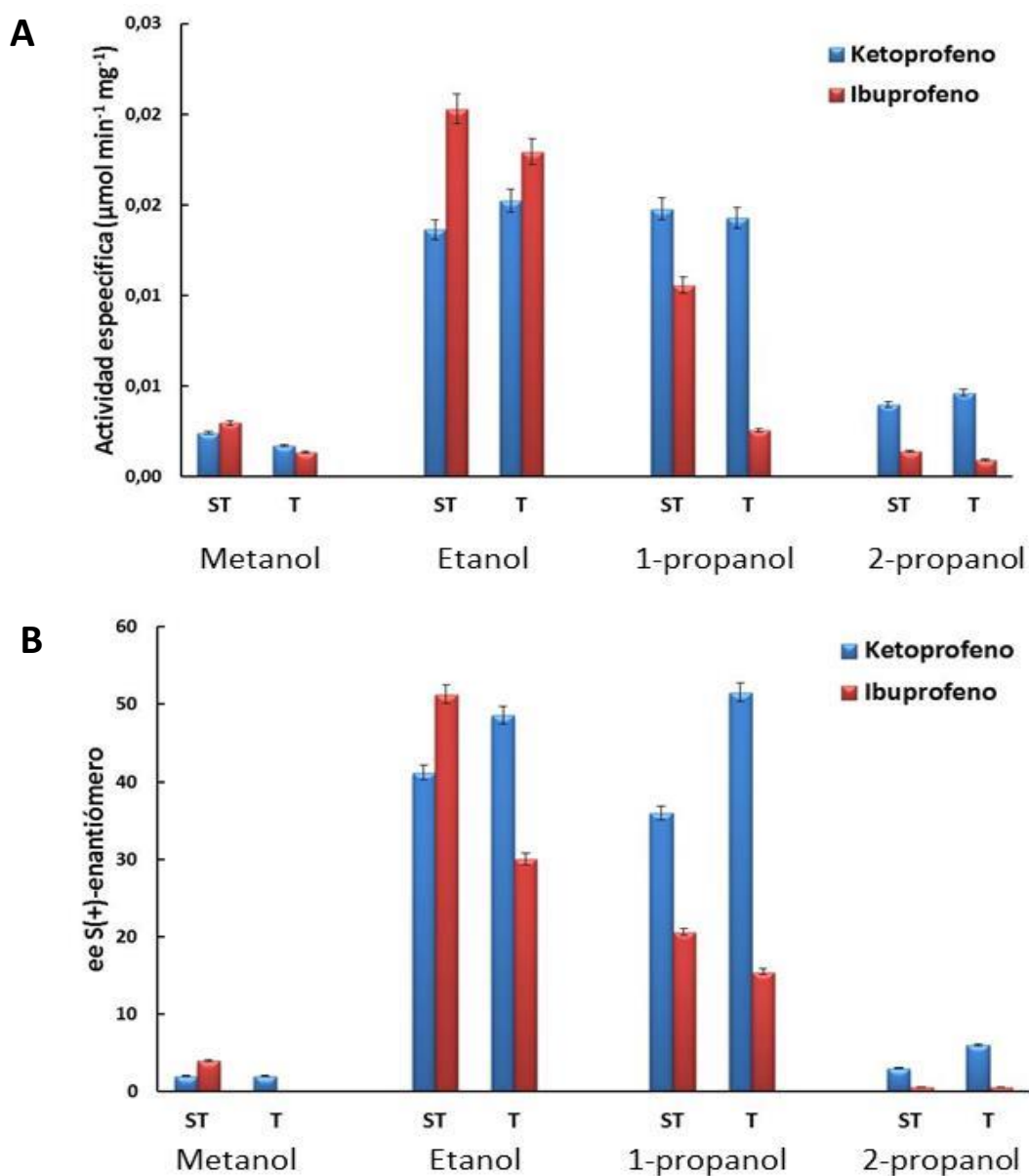


Figura 10. Actividad específica (A) y exceso enantiomérico hacia el enantiómero S(+) (B) de la esterificación de R/S-ketoprofeno y R/S-ibuprofeno con alcoholes de cadena corta a 45 °C durante 48 h de reacción catalizada por Novozym® 435 sin tratamiento previo (ST) y luego del contacto de 8 días con los distintos alcoholes (T).

4.2.2. Estudios preliminares de control de la actividad acuosa a_w

Se estudiaron diferentes estrategias para el control de la actividad acuosa durante la reacción de esterificación de R/S-ketoprofeno con etanol.

En una primera instancia, se estudió el control de la actividad acuosa empleando el alcohol previamente deshidratado con tamiz molecular 4A. La zeolita se activó durante 3 h a 300 °C previo al ensayo. Los resultados obtenidos en términos de conversión y exceso enantiomérico hacia S(+)-ketoprofeno se presentan en la Tabla 1, junto con los valores de una reacción sin control. La reacción se llevó a cabo durante 6 horas, midiendo los valores de a_w antes y después de la reacción.

Tabla 1. Valores de conversión (X %) y exceso enantiomérico hacia S(+)-ketoprofeno (ee S(+)) % empleando etanol previamente deshidratado con tamiz molecular 4A durante 6 h de reacción. Se incluye la reacción de 6 h sin control para comparar.

	a_w inicial	a_w final	X %	ee S(+)
Sin control	0.43	0.46	20	5
Tamiz molecular 4A	0.10	0.26	15	2

La deshidratación previa del alcohol con el tamiz molecular, permitió obtener un valor de a_w inicial menor a pesar de la adición de 4.76% (v/v) de agua, aumentando el mismo en mayor medida al finalizar la reacción con respecto a la reacción sin deshidratar. Sin embargo, los resultados obtenidos para ambas reacciones son muy similares. Una alternativa sería emplear el tamiz molecular en el reactor durante la reacción de esterificación con el objetivo de adsorber el agua formada por la reacción. Sin embargo, investigaciones previas han demostrado que su presencia afecta la actividad o estabilidad de las enzimas (Wehtje *et al*, 1997 (b)). Estos autores emplearon los reactivos deshidratados y llevaron a cabo la reacción ya sea conteniendo el tamiz molecular en el reactor o no, y obtuvieron mejores resultados sin la presencia del mismo probablemente, debido a la a_w demasiado baja. Chamouleau *et al* estudiaron la reacción de esterificación de fructosa con ácido palmítico catalizada por Novozym® 435 empleando los reactivos deshidratados y el tamiz molecular dentro

del reactor. En estas condiciones lograron aumentar el rendimiento de la reacción, pero se vio afectada la selectividad de la enzima. Los autores atribuyeron esta disminución en la selectividad a la remoción del agua alrededor de la misma (Chamuleau *et al*, 2001). Otros autores adicionaron el tamiz molecular luego de 24 h de reacción para remover el agua producida en la esterificación de narginina con ácido palmítico. En estas condiciones lograron obtener el doble de conversión con un contenido de agua reducido hasta cierto punto en el cual permanece constante (Gayot *et al*, 2003).

A continuación se estudió el control de la actividad acuosa por medio de soluciones salinas saturadas. En la siguiente tabla (Tabla 2), se presentan los valores de a_w teóricos correspondientes a cada sal.

Tabla 2. Valores de actividad acuosa de soluciones salinas saturadas a 25 °C.

Sal	a_w teórica
Cloruro de litio (LiCl)	0.11
Acetato de potasio (KCH ₃ COO)	0.23
Cloruro de sodio (NaCl)	0.75
Cloruro de potasio (KCl)	0.86

Se llevaron a cabo reacciones de esterificación empleando estas soluciones saturadas en un tubo concéntrico dentro del reactor. De esta manera la solución saturada no estuvo en contacto con la mezcla de reacción. Las mismas se llevaron a cabo durante 24 h, lográndose un buen control de la actividad acuosa (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de actividad acuosa obtenidos antes y después de las 24 h de reacción con y sin control con soluciones salinas saturadas.

Reacción	a_w inicial	a_w final
Sin control	0.36	0.49
LiCl	0.20	0.24
KCH ₃ COO	0.26	0.33
NaCl	0.74	0.76
KCl	0.86	0.88

Como se puede apreciar en la Tabla 3, se logra mantener aproximadamente constante este valor de a_w con respecto a la reacción sin control. Los resultados obtenidos a las 24 h de reacción se presentan en la Figura 11.

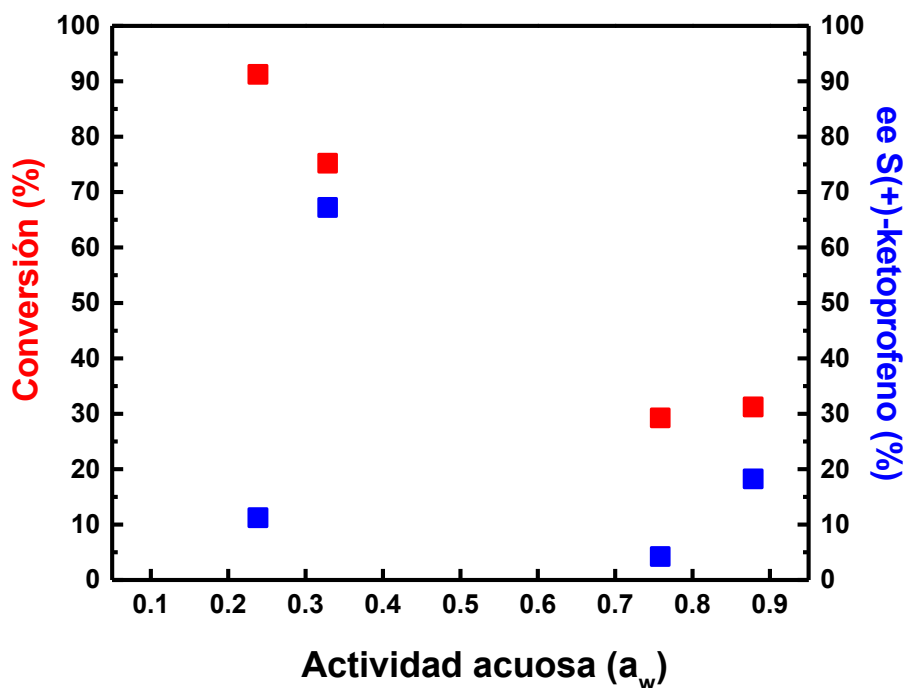


Figura 11. Valores de conversión y exceso enantiomérico hacia S(+)-ketoprofeno obtenidos a los distintos valores de a_w .

En la reacción sin control, a las 24 h se obtuvieron valores de conversión y exceso enantiomérico hacia S(+)-ketoprofeno de 40 y 23 %, respectivamente (no se muestra en el gráfico). Como se puede apreciar en la Figura 11, estos valores se incrementan mediante el control de actividad acuosa con una solución saturada de acetato de potasio la cual controla el valor de actividad acuosa cercano a 0.3. En estas condiciones, a las 24 h de reacción se obtienen valores de conversión y exceso enantiomérico de 75 y 67 %, respectivamente. Si bien, el valor óptimo de conversión corresponde a un 50%, el empleo de este valor de a_w permitiría disminuir el tiempo de reacción. En cuanto al cloruro de litio con una actividad acuosa correspondiente a 0.24,

se obtiene el mayor valor de conversión a las 24 h (91 %), aunque el exceso enantiomérico obtenido es demasiado bajo (11 % hacia S(+)-ketoprofeno). Este último valor se debe a que la alta conversión lograda involucra la esterificación de ambos isómeros, es decir que la enzima a bajas actividades acuosas disminuye su enantioselectividad. Los resultados obtenidos a altos valores de a_w (cloruro de sodio y cloruro de potasio) no superan el 30% tanto para conversión como para exceso enantiomérico.

Estudios previos han evidenciado que el efecto de la a_w es diferente para cada tipo de lipasa y reacción específica (Persson *et al*, 2002). Por lo general, los estudios de actividad acuosa llevados a cabo con CALB han consistido en el pre-equilibrio con las soluciones salinas saturadas pero no se lleva a cabo la reacción con el valor de a_w controlada por lo que no se estaría controlando la hidrólisis del éster con el agua formada en la reacción. Además, estos controles se han llevado a cabo siempre en medios con co-solvente agregado. Estas investigaciones demostraron una mayor actividad de la enzima a valores relativamente bajos de a_w , lo que coincide con los valores preliminares hallados en esta investigación (Wehtje *et al*, 1997 (a); Chamouleau *et al*, 2001; Adamczak *et al*, 2001). En los estudios llevados a cabo por Kang *et al* emplearon un reactor batch de pervaporación asistida para controlar el valor de a_w en línea durante una reacción de esterificación empleando Novozym® 435, obteniéndose la máxima velocidad inicial y conversión a $a_w = 0.1$ (Kang *et al*, 2005).

Si bien llevando a cabo la reacción con una actividad acuosa controlada de valor correspondiente a 0.33 se lograría mejorar el rendimiento de la esterificación de R/S-ketoprofeno, las condiciones operativas disponibles hacen este método muy poco eficiente y reproducible. Es por esto, que para realizar una cinética de esterificación de R/S-ketoprofeno con actividad acuosa controlada, las condiciones operativas deberían ser mejoradas y optimizadas. Por otro lado, el medio libre de solvente podría ser un factor más en la complejidad del sistema, debido a la alta afinidad existente entre la solución acuosa y el alcohol, por lo cual la solución saturada podría no sólo remover el agua formada en la reacción si no también el alcohol empleado como reactivo y solvente.

En base a estos resultados, se propone estudiar a futuro diferentes estrategias para lograr un buen control de la a_w . Se planea diseñar un sistema de reacción que consiste en dos cilindros concéntricos colocando por fuera la solución salina saturada. Por otro lado, se equilibrará la solución salina saturada con el alcohol empleado en la reacción durante un tiempo prolongado a 45 °C. Por último, se propone otra alternativa que sería emplear una solución alcohólica saturada con la sal, en lugar de la solución acuosa.

4.3. CONCLUSIONES

Esta investigación es una continuación de los estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo en la esterificación enantioselectiva de R/S-ibuprofeno con etanol en ausencia de solventes orgánicos. La esterificación de R/S-ketoprofeno catalizada por el biocatalizador comercial Novozym® 435 fue llevada a cabo satisfactoriamente empleando etanol y 1-propanol (con 4.76 % (v/v) de agua adicionada) como sustratos y solventes de la reacción sin agregado de co-solvente orgánico. Se lograron valores de conversión y exceso enantiomérico hacia S(+)-ketoprofeno de aproximadamente ~48% luego de 48 h d incubación a 45 °C y 200 rpm en una reacción batch. Las bajas actividades logradas con metanol y 2-propanol se explican de manera diferente. Como se detalla en el Capítulo 3, el metanol junto con etanol fueron los alcoholes que mayor efecto perjudicial tuvieron sobre la integridad física del biocatalizador. Sin embargo, las actividades obtenidas para ambos fueron muy diferentes. Por lo tanto, la baja actividad con metanol se atribuye al aumento de los agregados moleculares (relacionados con la desnaturalización enzimática) de la estructura secundaria de la enzima CALB en la superficie del biocatalizador observado desde el primer contacto de la enzima con metanol. Adicionalmente, en el Capítulo 5 se describirá cierto impedimento estérico relacionado con la molécula de metanol. Por otro lado, en el siguiente capítulo se describirá la esterificación de R/S-ketoprofeno

con 2-propanol la cual presenta baja actividad debido exclusivamente a impedimentos estéricos.

En contraste con los resultados hallados previamente en los cuales la actividad del biocatalizador en la esterificación de R/S-ibuprofeno disminuye luego del cuarto ciclo de reuso consecutivo de 48 h, la actividad de Novozym® 435 en la esterificación enantioselectiva de R/S-ketoprofeno no se ve influenciada por el contacto prolongado con los alcoholes. El análisis de la estabilidad del catalizador evidenció que la actividad disminuye luego del primer ciclo de 48 h de reuso del biocatalizador tratado y empleado en la reacción de 72 h de esterificación.

Si bien los valores de conversión obtenidos son los esperados, el exceso enantiomérico hacia S(+)-ketoprofeno podría ser mejorado. Para lograr esto se están optimizando las reacciones bajo control de actividad acuosa. Sin embargo, las condiciones operativas deben ser mejoradas para lograr obtener resultados confiables y reproducibles.

4.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Adamczak M, Bornscheuer UT. Improving ascorbyl oleate synthesis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids and water activity control by salt hydrates. *Process Biochem* 2009, 44, 257-261.

Ameyibor E, Stewart JT. HPLC determination of ketoprofen enantiomers in human serum using a nonporous octadecylsilane 1.5 μm column with hydroxypropyl β -cyclodextrin as mobile phase additive. *J Pharm & Biomed Anal* 1998, 17, 83-88.

Arroyo M, Sinisterra JV. High enantioselective esterification of 2-arylpropionic acids catalyzed by immobilized lipase from *Candida antarctica*: a mechanistic approach. *J Org Chem* 1994, 59, 4410-4417.

Arroyo Sánchez M. Tesis doctoral: "Síntesis de ácidos 2-aryl-propiónicos homoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas", 1995, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

Bodnar J, Gubizca L, Szabo L-P. Enantiomeric separation of 2-chloropropionic acid by enzymatic esterification in organic solvents. *J Mol Catal* 1990, 61, 353-361.

Broos J, Visser AJWG, Engersen JFJ, Verboom W, van Hoek A, Reinhoudt DN. Flexibility of enzymes suspended in organic solvents probed by time-resolved fluorescence anisotropy. Evidence that enzyme activity and enantioselectivity are directly related to enzyme flexibility. *J Am Chem Soc* 1995, 117, 12657-12663.

Chamouleau F, Coulon D, Girardin M, Ghoul M. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *J Mol Catal B Enzym* 2001, 11, 949-954.

Chen CS, Fujimoto Y, Girdaukas G, Sih CJ. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. *J Am Chem Soc* 1982, 104, 7294-7299.

Chen CS, Wu SH, Girdaukas G, Sih CJ. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. 2. Enzyme-catalyzed esterification in water-organic solvent biphasic systems. *J Am Chem Soc* 1987, 109, 2812-2817.

Chiou AJ, Wu SH, Wang KT. Enantioselective hydrolysis of hydrophobic amino acid derivatives by lipases. *Biotechnol Lett* 1992, 14, 461-464.

D'Antona N, Lombardi P, Nicolosi G, Salvo G. Large scale preparation of enantiopure S-ketoprofen by biocatalyzed kinetic resolution. *Process Biochem* 2002, 38, 373-377.

Foresti ML, Galle M, Ferreira ML, Briand LE. Enantioselective esterification of ibuprofen with ethanol as reactant and solvent catalyzed by immobilized lipase: experimental and molecular modeling aspects. *J Chem Technol Biotechnol* 2009, 84, 1461-1473.

Gayot S, Santarelli X, Coulon D. Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content. *J Biotechnol* 2003, 101, 29-36.

Ghanea A, Aboul-Enein HY. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry* 2004, 15, 3331-3351.

Harris DC. *Análisis Químico Cuantitativo*. Editorial Reverté, 2° edición (5° edición norteamericana), 2001, Barcelona, España.

Heinsman NWJT, Schroën CGPH, van der Padt A, Franssen MCR, Boom RM, van't Riet K. Substrate sorption into the polymer matrix of Novozym® 435 and its effect on the enantiomeric ratio determination. *Tetrahedron: Asymmetry* 2003, 14, 2699-2704.

Högberg H-E, Edlund H, Berglund P, Hedenström E. Water activity influences enantioselectivity in a lipase-catalysed resolution by esterification in an organic solvent. *Tetrahedron Asymmetry* 1993, 4, 2123-2126.

José C. Tesis doctoral: "Resolución biocatalítica de los enantiómeros de ibuprofeno", 2013, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

Kang IJ, Pfromm PH, Rezac ME. Real time measurement and control of thermodynamic water activities for enzymatic catalysis in hexane. *J Biotechnol* 2005, 119, 147-154.

Kazlauskas RJ, Weissfloch ANE, Rappaport AT, Cuccia LA. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by *cholesterol esterase*, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugose*. *J Org Chem* 1991, 56, 2656-2665.

Kitaguchi H, Itoh I, Ono M. Effect of water and water-mimicking solvents on lipase-catalyzed Esterification in an apolar solvent. *Chem Lett* 1990, 7, 1203-1206.

Lee SH, Kim BH, Lee YC. Chiral recognition models of enantiomeric separation on cyclodextrin chiral stationary phases. *Bull Korean Chem Soc* 1995, 16, 305-309.

Lindsay S. High Performance Liquid Chromatography. Editorial John Wiley & Sons, 2° edición, 1992, Sussex Occidental, Inglaterra.

Liu Y, Wang F, Tan T. Effects of alcohol and solvent on the performance of lipase from *Candida* sp. in enantioselective esterification of racemic ibuprofen. *J Mol Catal B: Enzym* 2009, 56, 126-130.

López-Belmonte MT, Alcántara AR, Sinisterra JV. Enantioselective esterification of 2-arylpropionic acids catalyzed by immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. *J Org Chem* 1997, 62, 1831-1840.

Meyer VR. Practical High Performance Liquid Chromatography. Editorial John Wiley & Sons, 5° edición, 2010, Sussex Occidental, Inglaterra.

Morante Zarcero S. Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación a la síntesis asimétrica. Editorial Dykinson S.L., 2007, Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, España.

Ong AL, Kamaruddin AH, Bhatia S, Aboul-Enein HY. Enantioseparation of (R,S)-ketoprofen using *Candida antarctica* lipase B in an enzymatic membrane reactor. *J Sep Sci* 2008, 31, 2476-2485.

Orrenius C, Norin T, Hult K, Garrea G. The *Candida antarctica* lipase B catalysed kinetic resolution of seudenol in non-aqueous media of controlled water activity. *Tetrahedron Asymmetry* 1995, 6, 3023-3030.

Osorio Grisales J, Arancibia JA, Castells CB, Olivieri AC. Determination of enantiomeric composition of ibuprofen in pharmaceutical formulations by partial least-squares regression of strongly overlapped chromatographic profiles. *J Chrom B*, 2012, 910, 78-83.

Park HJ, Choi WJ, huh EC, Lee EY, Choi CY. Production of optically active ketoprofen by direct enzymatic esterification. *J Biosci Bioeng* 1999, 87, 545-547.

Persson M, Costes D, Wehtje E, Adlecreutz P. Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. *Enzym Microb Technol* 2002, 30, 916-923.

Sabbani S, Hedenström E. Control of water activity in lipase catalysed esterification of chiral alkanolic acids. *J Mol Catal B: Enzym* 2009, 58, 6-9.

Santaniello E, Ferraboschi P, Grisenti P. Lipase-catalyzed transesterification in organic solvents: applications to the preparation of enantiomerically pure compounds. *Enzym Microb Technol* 1993, 15, 367-382.

Secundo F, Ottolina G, Riva S, Carrea G. The enantioselectivity of lipase PS in chlorinated solvents increases as a function of substrate conversion. *Tetrahedron: Assymetry* 1997, 13, 2167-2173.

Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principios de análisis instrumental*. Editorial Cengage Learning, 6° edición, 2008, México DF, México.

Straathof AJJ, Jongegan JA. The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction. *Enzym Microb Technol* 1997, 21, 559-571.

Trodler P, Pleiss J. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. BMC StructBiol 2008, 8: 9.

Vandenbosch C, Massart DL, Lindner W. Evaluation of six chiral stationary phases in LC for their selectivity towards drug enantiomers. J Pharm & Biomed Anal 1992, 10, 895-908.

Wehtje E, Costes D, Adlercreutz P. **(a)** Enantioselectivity of lipases: efectos of water activity. J Mol Catal B Enzym 1997, 3, 221-230.

Wehtje E, Kaur J, Adlercreutz P, Chand S, Mattiasson B. **(b)** Water activity control in enzymatic esterification processes. Enzym Microb Technol 1997, 21, 502-510.

Yahya AR, Anderson WA, Moo-Young M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. Enzyme Microb Technol 1998, 23, 438-450.

Yoshida A, Hama S, Nakashima K, Kondo A. Water activity dependence of performance of surface-displayed lipase in yeast cells: a unique water requirement for enzymatic synthetic reaction in organic media. Enzym Microb Technol 2011, 48, 334-338.

Yuan Z, Zhao J, Wang Z-X. Flexibility analysis of enzyme active sites by crystallographic temperature factors. Protein Eng 2003, 16, 109-114.

CAPÍTULO 5

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE
REACCIÓN EN LA ESTERIFICACIÓN DE
R/S-KETOPROFENO CATALIZADA POR
LA LIPASA B DE *Candida antarctica***

Como se detalla en el Capítulo 1, el mecanismo de la reacción de mezclas racémicas de ácidos 2-arilpropiónicos empleando lipasas ha sido descrito mediante el mecanismo conocido como Ping Pong Bi Bi. Este mecanismo involucra la formación de un complejo enzima-sustrato **ES** que evoluciona hacia un enlace acil-enzima **AE** que es la especie intermediaria en la síntesis del producto **P** (Figura 1).

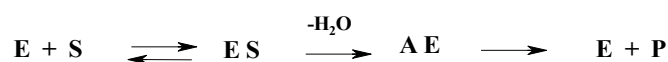


Figura 1. Mecanismo Ping Pong Bi Bi de la esterificación enzimática de ácidos carboxílicos con alcoholes.

El modelado molecular de la reacción demostró que la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) forma el complejo acil-enzima preferentemente con el enantiómero R(-) del ibuprofeno a través de los aminoácidos Ser 105, His 224 y Asp 187 que constituyen la triada catalítica (Foresti *et al*, 2009). Asimismo, estudios previos han postulado la formación del complejo acil-enzima entre el enantiómero R(-) del ketoprofeno y la lipasa *Rhizomucor miehei* (Arroyo & Sinisterra, 1994).

La presencia del complejo acil-enzima se ha comprobado experimentalmente en la hidrólisis de antibióticos betalactámicos con la enzima β -lactamasa pero según el conocimiento de los autores, no hay evidencias experimentales de esta especie intermediaria en la esterificación de ácidos 2-arilpropiónicos con lipasas (Hokenson *et al*, 2000; Iqbal *et al*, 2009; Wilkinson *et al*, 1999).

En este contexto, se llevó a cabo un estudio de la reacción de esterificación de R/S-ketoprofeno catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* empleando técnicas de espectroscopia *in situ* FTIR-ATR resuelta en el tiempo (Sección 5.1) y modelado molecular (Sección 5.2). Los resultados del estudio teórico fueron realizados por la Dra. María Luján Ferreira (Planta Piloto de Ingeniería Química, PLAPIQUI, CCT-Bahía Blanca). La integración entre las investigaciones teóricas y experimentales logradas a partir de esta colaboración no solo proveyó evidencias irrefutables acerca del mecanismo de la

reacción sino que resultó relevante para la formación científica alcanzada en este trabajo de Tesis.

5.1. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA (ATR-FTIR)

A los fines de obtener evidencias del mecanismo de la esterificación enantioselectiva de R/S-ketoprofeno, se investigó la formación del complejo acil-enzima a través de espectroscopia infrarroja por reflectancia total atenuada (técnica descrita en la Sección 2.5.3. del Capítulo 2).

La enzima lipasa B de *Candida antarctica* empleada para este fin se obtuvo a partir de la purificación de un extracto crudo de Novozymes en colaboración del Dr. Carlos Llerena-Suster. Este proceso de purificación involucró una serie de etapas de centrifugación, cromatografía de exclusión molecular y de intercambio catiónico que permitió eliminar la interferencia de ácidos nucleicos, benzoatos, sorbatos, sales, constituyentes celulares y pequeñas cantidades de otras proteínas presentes en el extracto crudo original (Llerena-Suster *et al*, 2014).

Los espectros de infrarrojo se realizaron empleando una celda para estudios en fase líquida en modo de Reflexión Total Atenuada (ATR). Detalles del cristal de ATR y metodología utilizados se describen en la Sección 2.5.5.4. del Capítulo 2. La deconvolución de los espectros obtenidos se llevó a cabo según se describe en la Sección 3.1.4.1. del Capítulo 3.

5.1.1. Concentración óptima de R/S-ketoprofeno

Para comenzar, se estudió la concentración óptima de R/S-ketoprofeno en CCl₄ para el estudio del mecanismo de reacción empleando un equipo FTIR Bruker Vertex 70. El R/S-ketoprofeno se disolvió en CCl₄ debido a que este solvente es transparente en la región del IR en la que absorbe el profeno. En este sentido, se prepararon dos soluciones de concentraciones 0.02 M y 0.16 M, y se obtuvieron los espectros recién

preparadas, transcurridas 24 h, parcial y totalmente evaporadas luego de las 24 horas. Estos análisis se presentan en la Figura 2, en la cual se incluye el espectro del R/S-ketoprofeno sólido como referencia.

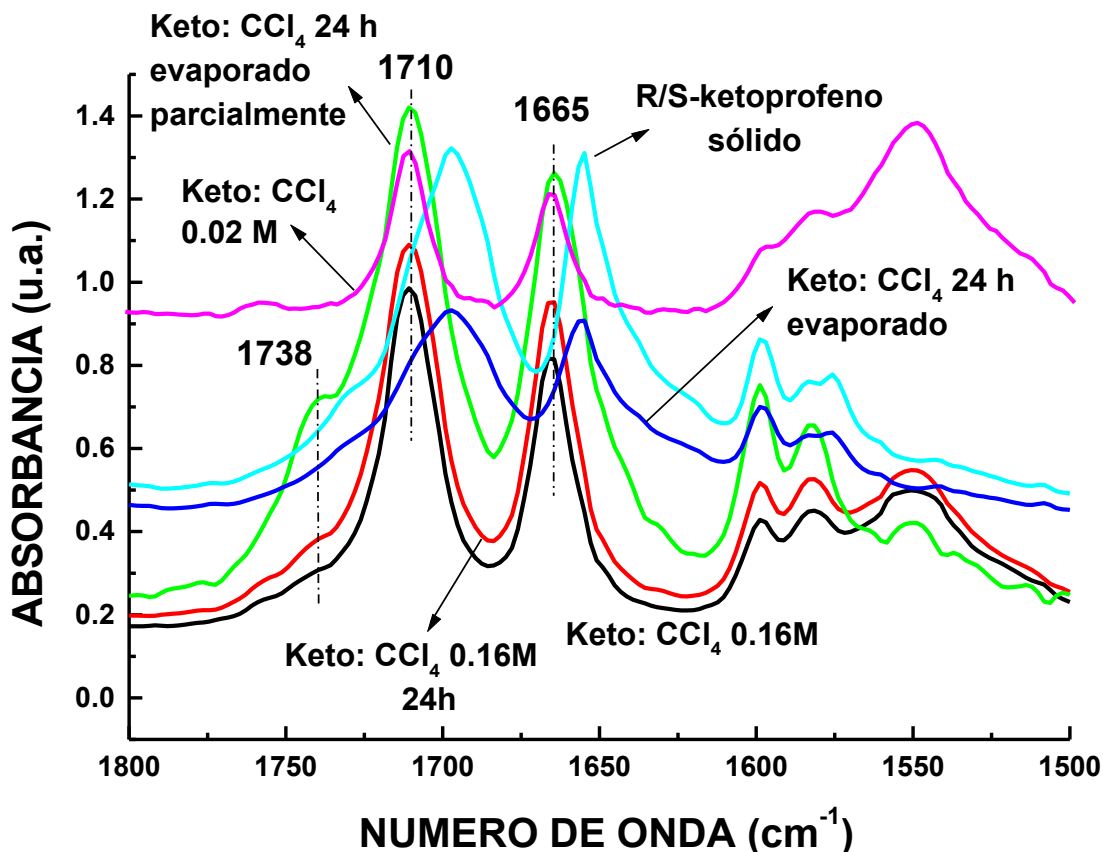


Figura 2. Espectros FTIR de una solución 0.16 M de R/S-ketoprofeno en CCl_4 a tiempo cero, luego de 24 horas, luego de evaporación parcial y total del solvente; R/S-ketoprofeno disuelto en CCl_4 de concentración 0.02 M y R/S-ketoprofeno sólido.

Como se puede apreciar en la figura, las señales de absorción características del R/S-ketoprofeno disuelto en CCl_4 se presentan en 1710 y 1665 cm^{-1} . Estas señales corresponden a las vibraciones de tensión de los grupos carbonilo $\nu(\text{C}=\text{O})$ y carboxilo $\nu(\text{OC}=\text{O})$, respectivamente. El ketoprofeno sólido presenta estas señales en 1697 y 1655 cm^{-1} . Estas últimas coinciden con las observadas para el resto de ketoprofeno cuando el solvente CCl_4 se dejó evaporar completamente. En cuanto a la concentración

óptima de ketoprofeno, los espectros de la solución 0.16 M presentan una nueva señal en 1738 cm^{-1} , la cual va aumentando con el tiempo y en la medida que el solvente CCl_4 se evapora. En cambio, cuando la concentración de ketoprofeno fue de 0.02 M esta nueva señal no apareció pasadas las 24 h ni aunque la solución se haya dejado evaporar. Este hombro en 1738 cm^{-1} podría atribuirse a la formación de un dímero, trímero o agregado entre las moléculas de R/S-ketoprofeno. En base a estos análisis, se selecciona la solución más diluida de R/S-ketoprofeno en CCl_4 (0.02 M) ya que la nueva señal en 1738 cm^{-1} podría interferir en los estudios del mecanismo molecular.

5.1.2. Seguimiento del intercambio isotópico de la enzima

El intercambio isotópico de las moléculas de H_2O por D_2O permite la investigación de la señal amida I ($1700 - 1600\text{ cm}^{-1}$) sin la interferencia de la vibración de flexión de las especies $\delta(\text{O-H})$ (principalmente de agua adsorbida) que aparece en 1640 cm^{-1} .

Previo al análisis en ATR-FTIR de la enzima CALB purificada, se disolvieron 5 mg de la misma en 500 μL de D_2O (Cambridge Isotope Laboratories, 99%). Esta mezcla se colocó en la celda de ATR de modo de preparar una película homogénea de la enzima sobre el cristal. Con el objetivo de estudiar la evolución del intercambio isotópico, se tomó una serie inicial de 1 espectro por segundo durante los primeros 3 minutos de intercambio (1 scans por espectro), y se continuó durante las próximas dos horas tomando un espectro cada 3 minutos (20 scans por espectro). Pasado este periodo, se procedió al secado de la película durante toda la noche mediante el contacto con una corriente de aire seco.

En la Figura 3 se presentan los espectros obtenidos durante el intercambio isotópico de la enzima CALB durante las 2 primeras horas. En la misma se muestran las variaciones en las intensidades de las señales IR entre 1750 y 1400 cm^{-1} lo cual incluye las señales amida I y II de las proteínas. Como se describe en el Capítulo 2, se espera que mediante el intercambio isotópico los números de onda se desplacen aproximadamente 5 a 10 cm^{-1} . Meskers *et al* describieron los cambios observados en el

espectro IR de una la proteína streptavidina luego del intercambio isotópico (Meskerset *al*, 1999). En este contexto, como se menciona anteriormente, la banda amida II cambia su ubicación en 10 cm^{-1} y en la figura se observa que la señal en 1450 cm^{-1} aumenta (amida II – D_2O) mientras que en 1550 cm^{-1} (amida II – H_2O) la intensidad de la señal comienza a disminuir con el tiempo. Asimismo, en la banda amida I (entre 1700 y 1600 cm^{-1}) la intensidad de la señal aumenta en números de onda bajos (esto es cerca de 1600 cm^{-1}) mientras que la intensidad comienza a disminuir cerca de los números de onda mayores (cerca de 1700 cm^{-1}). Como es de esperarse, el intercambio isotópico permite mejorar la visibilidad de la banda amida I sin la interferencia de las moléculas de agua y es por esto que la intensidad de la banda entre 1600 y 1700 cm^{-1} en general aumenta.

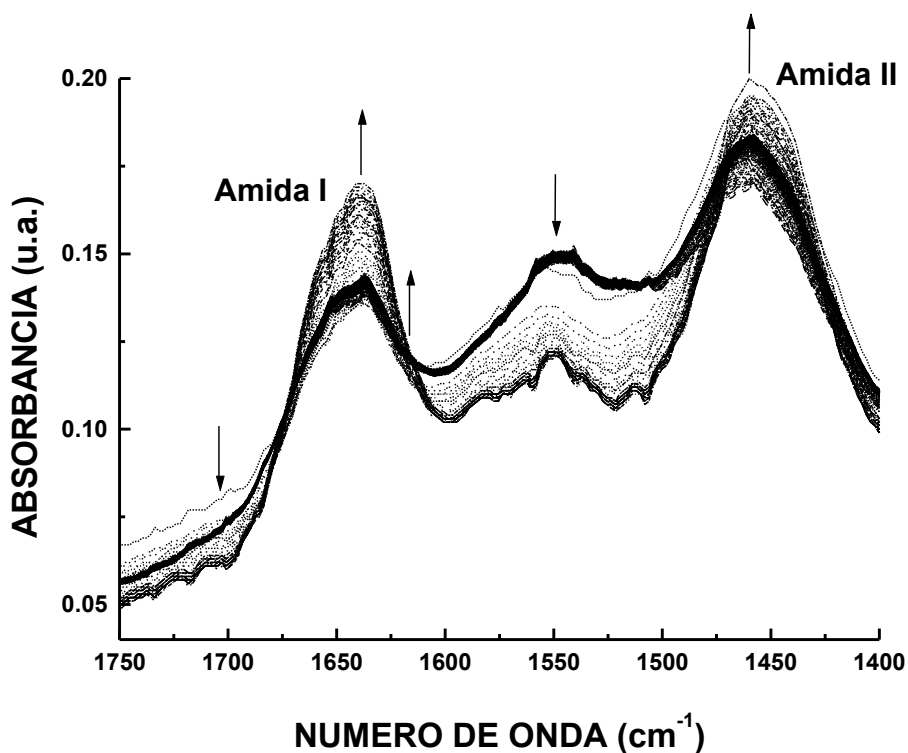


Figura 3. Espectros ATR-FTIR de 5 mg de CALB durante el intercambio isotópico.

Una vez finalizado el intercambio isotópico (una noche de incubación), se toma un nuevo espectro de la enzima CALB completamente intercambiada a temperatura ambiente. Luego la celda se calentó a 45 °C con un baño de agua termostático (Julabo)

conectado a una camisa de calefacción con el objetivo de obtener condiciones similares a las empleadas en la reacción. En estas nuevas condiciones se tomó un espectro de la enzima CALB.

En la siguiente Figura (Figura 4), se presenta el espectro de la enzima CALB con D_2O luego de una noche de incubación a temperatura ambiente y a $45\text{ }^\circ\text{C}$. Para comparar se incluye un espectro de la enzima CALB con D_2O en el instante que comienza el intercambio.

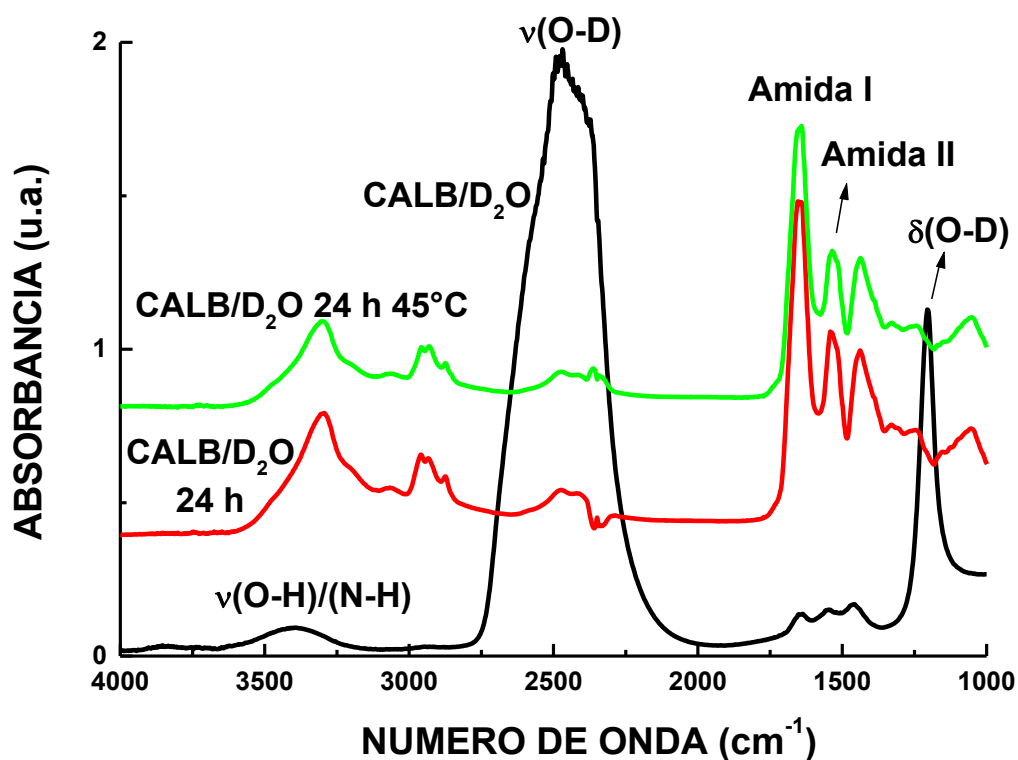


Figura 4. Espectros ATR-FTIR de la enzima CALB en D_2O al inicio del intercambio y luego de 24 h a temperatura ambiente y a $45\text{ }^\circ\text{C}$.

Como describen los autores Llerena-Suster *et al* se observa una banda en 3378 cm^{-1} compuesta por las vibraciones de tensión de $\nu(\text{O-H})$ y $\nu(\text{N-H})$ (las bandas amida A y amida B). Adicionalmente se aprecian las señales características del D_2O , estas son la vibración de tensión $\nu(\text{O-D})$ en 2472 cm^{-1} junto con la vibración de flexión $\delta(\text{O-D})$ en 1206 cm^{-1} . El reemplazo de los átomos de hidrogeno en las especies O-H por un átomo

de deuterio modifica la frecuencia de la vibración de flexión con una relación de 1.37 (Llerena-Suster *et al*, 2012).

5.1.3. Identificación de especies intermediarias en la interacción enzima – R/S-ketoprofeno

Se analizó la interacción de la enzima CALB con R/S-ketoprofeno. Para esto, sobre la película con la lipasa CALB purificada sobre el cristal de ATR se adicionaron 300 μL de la solución de ketoprofeno disuelto en CCl_4 de concentración 0.02 M y se adquirieron espectros durante 3 horas. Inicialmente, se tomó un espectro por segundo durante 3 minutos seguido de un espectro cada 5 minutos (25 scans por espectro) hasta completar las 3 horas. Este experimento se realizó a 45 °C de modo que las condiciones son similares a las empleadas en la reacción de esterificación.

El conjunto de espectros colectados durante las 3 horas de experimento se muestra en la Figura 5 (A), en la cual se incluye el de la CALB intercambiado con D_2O a 45 °C como referencia. Como puede apreciarse en la Figura, se observa la aparición de una señal en aproximadamente 1740 cm^{-1} , la cual comienza a crecer en el espectro tomado a los 19 segundos de interacción (Figura 5 (B)) y permanece hasta finalizadas las 3 horas. La banda registrada en esta interacción no puede ser asignada la formación de ésteres ya que solamente se ha producido la interacción R/S-ketoprofeno-CALB sin alcoholes presentes. En general, las señales de ketoprofeno aumentan con el tiempo, lo cual puede deberse a la difusión de la solución de ketoprofeno dentro de la película de CALB.

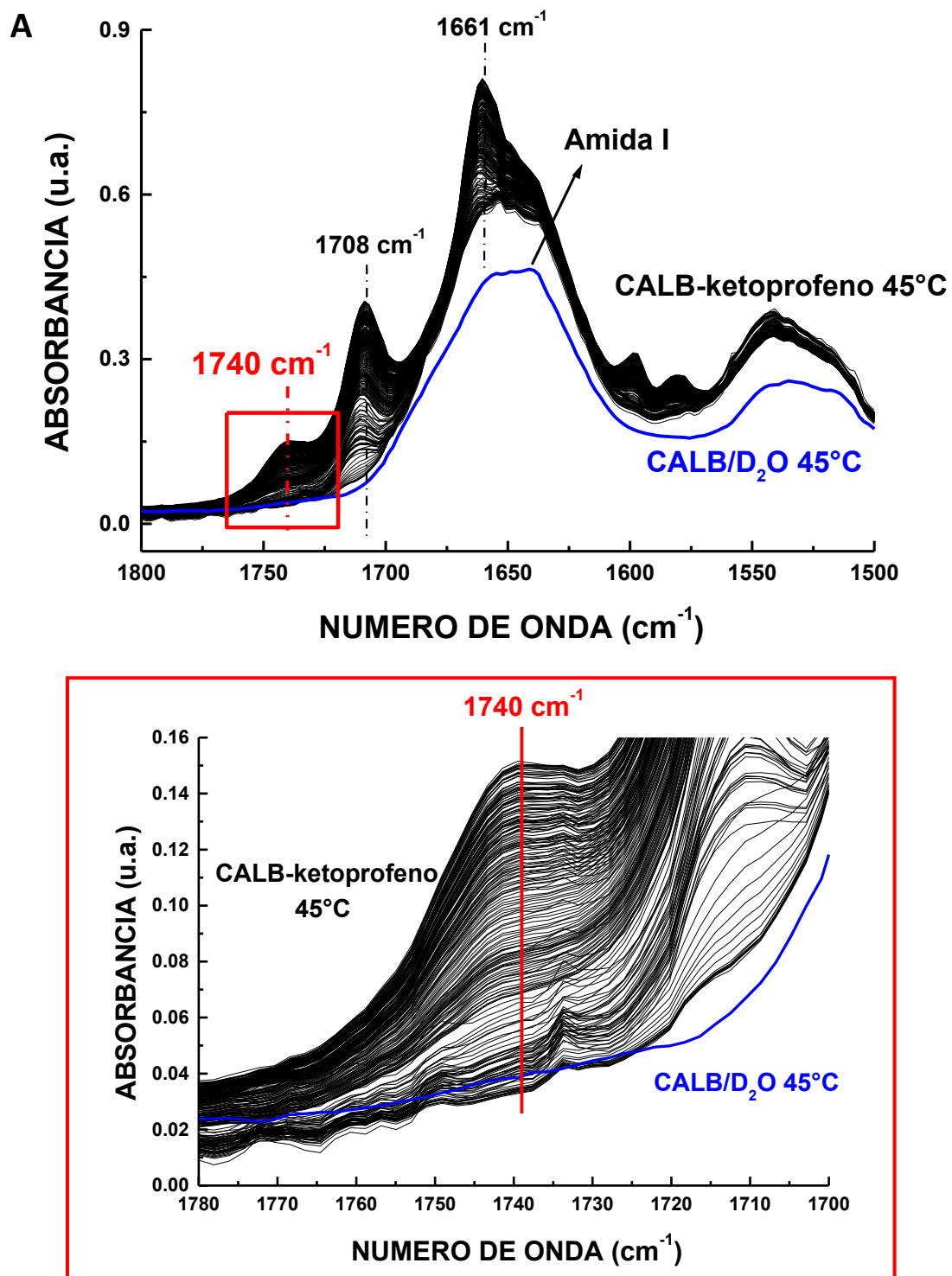


Figura 5. Espectros de la interacción de R/S-ketoprofeno con CALB. (A) Espectros ATR-FTIR de CALB y de la interacción durante 3 horas a 45 °C. (B) Segmento centrado en 1740 cm^{-1} .

Esta banda en 1740 cm^{-1} puede asignarse a una estructura intermedia en el mecanismo de acción de la lipasa el cual fue descrito como Ping Pong Bi Bi. Se forma un intermediario tetraédrico cuando la enzima interactúa con el primer sustrato (R/S-ketoprofeno), seguido por la formación de un complejo acil-enzima cuando se libera el primer producto (agua). Estudios por espectroscopia FTIR in situ han mostrado la formación de intermediarios acil-enzima en sistemas análogos. Las primeras investigaciones comenzaron aproximadamente 25 años atrás cuando Swedberg *et al* estudiaron mediante ATR-FTIR un intermediario acil-enzima de la α -quimotripsina. Este se observó mediante dos números de onda a 1723 y 1710 cm^{-1} , lo cual sugirió la existencia de dos conformaciones diferentes del sustrato en el sitio activo (Swedberg *et al*, 1990). Por otro lado Iqbal *et al* estudiaron la ornitina acetil transferasa (OATs) de *Streptomyces clavuligerus*, enzima involucrada en la biosíntesis del ácido clavulánico inhibidor de la enzima β -lactamasa, que forma el complejo acil-enzima con el sustrato N-acetil-L-ornitina. Este complejo se observó como una banda ancha desde 1691 cm^{-1} a 1710 cm^{-1} , compuesta por dos estructuras con frecuencias de tensión de carbonilo a 1691 y 1702 cm^{-1} , con esta última surgiendo como un hombro en la anterior, lo cual sugiere la formación de dos complejos en equilibrio (Iqbal *et al*, 2009). Además, Hokenson *et al* demostraron la formación de un complejo acil-enzima entre la enzima β -lactamasa y diferentes sustratos en un rango de números de onda de $1755 \pm 2\text{ cm}^{-1}$, representando una disminución promedio de 13 cm^{-1} en el número de onda con respecto a los sustratos no unidos (Hokenson *et al*, 2000). Por último, en el estudio de la hidrólisis de metilicina catalizada por la enzima β -lactamasa, Wilkinson *et al* asignaron las señales en 1742 , 1728 y 1707 cm^{-1} a la formación del complejo acil-enzima (Wilkinson *et al*, 1999). Adicionalmente, estos autores hallaron al menos cuatro conformaciones que coexisten para el grupo éster carbonilo del complejo acil-enzima estable formado entre el antibiótico aztreonam y la β -lactamasa de *Citrobacter freundii*. Las bandas de absorción para estos complejos fueron 1746 cm^{-1} , 1727 cm^{-1} , 1708 cm^{-1} y 1690 cm^{-1} (Wilkinson *et al*, 2003). En nuestro conocimiento, este es el primer reporte de la identificación espectroscópica del complejo acil-enzima, a partir de la interacción de ketoprofeno con una enzima lipasa.

A continuación se presenta en la Figura 6 a modo de ejemplo el espectro obtenido a los 72 segundos de interacción (tiempo en el cual se alcanza la máxima intensidad de señal en 1740 cm^{-1}), junto con los espectros de ketoprofeno disuelto en CCl_4 0.02 M y de la película de CALB tomado a $45\text{ }^\circ\text{C}$. Se puede distinguir claramente la nueva señal en 1740 cm^{-1} asignada como complejo acil-enzima.

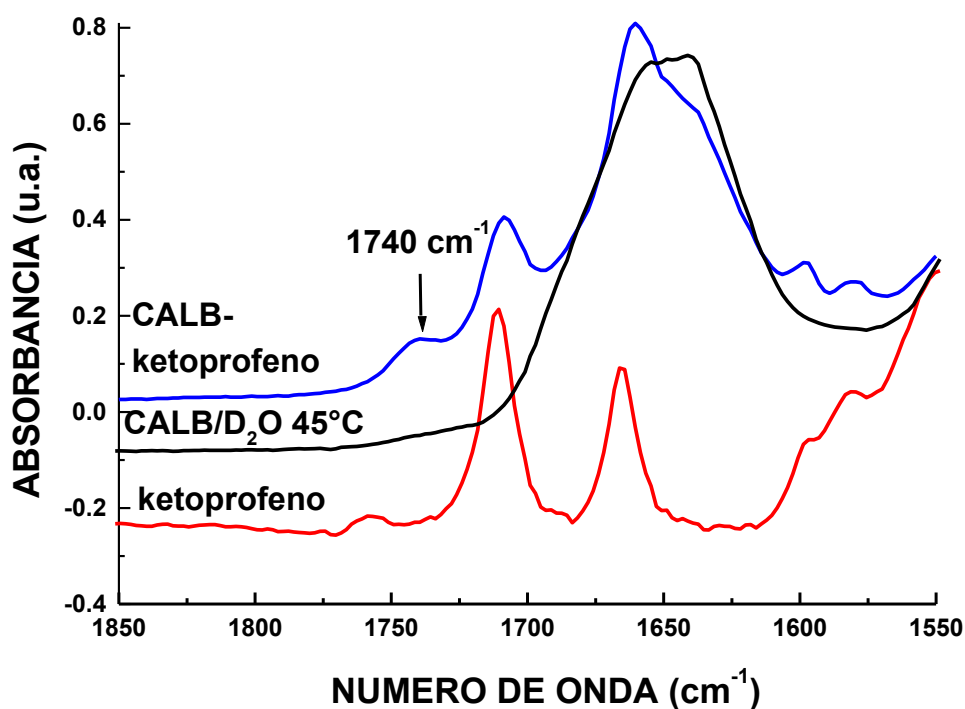


Figura 6. Espectros ATR-FTIR de la película de la enzima CALB a $45\text{ }^\circ\text{C}$, de ketoprofeno disuelto en CCl_4 y de la interacción ketoprofeno-CALB a $45\text{ }^\circ\text{C}$ a los 79 segundos.

El análisis de la segunda derivada de los espectros permite identificar la posición de cada señal detectada en una región específica. Se llevó a cabo en los espectros obtenidos para la interacción de R/S-ketoprofeno con la enzima CALB cada 10 segundos hasta llegar a los 80 segundos en la región de 1750 a 1700 cm^{-1} . Los resultados se presentan en la Figura 7 incluyendo la segunda derivada de la enzima CALB pura (tiempo 0) con el objeto de comparar.

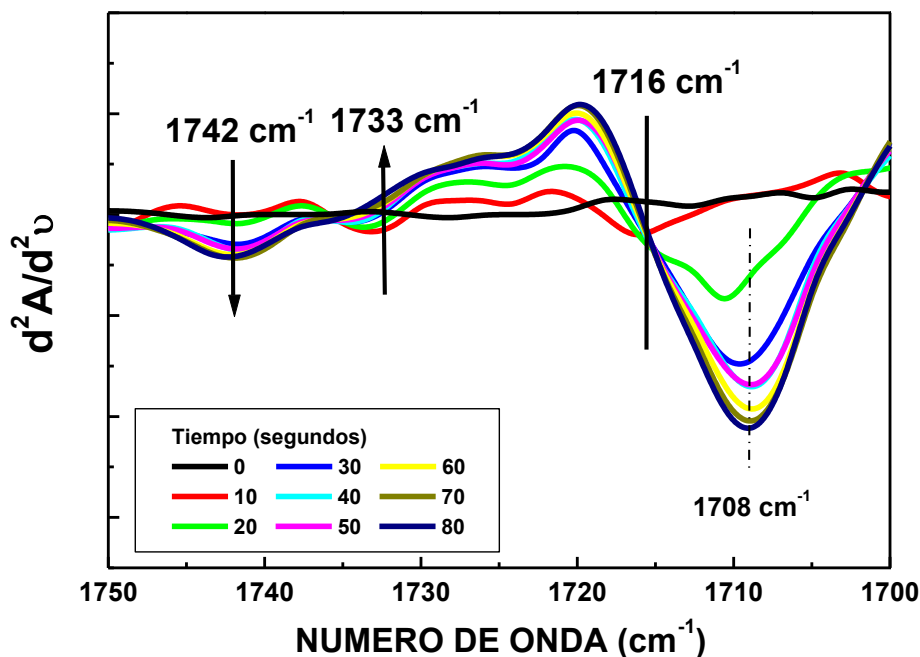


Figura 7. Segundas derivadas de los espectros de CALB intercambiada con D_2O (tiempo 0) y luego de la interacción con R/S-ketoprofeno durante los primeros 80 segundos de interacción.

Como se puede apreciar en esta figura, pasados 10 segundos de interacción aparecen tres nuevas señales en 1716 cm^{-1} , 1733 cm^{-1} y 1742 cm^{-1} . La primera de estas señales observó hasta los 20 segundos de interacción, probablemente debido a que la señal en 1708 cm^{-1} asignada a la vibración de tensión del grupo carbonilo $\nu(C=O)$ del R/S-ketoprofeno comenzó a ser apreciable y se superpuso. La señal en 1733 cm^{-1} disminuye mientras que la intensidad de la banda en 1742 cm^{-1} aumenta con el tiempo. Cuanto más negativo sea el pico en la segunda derivada del espectro, mayor será la intensidad de la señal. Vale la pena aclarar que la deconvolución sobre los espectros no pudo llevarse a cabo ya que la intensidad de la banda centrada en 1740 cm^{-1} en los primeros momentos de interacción es muy débil. La presencia de estas tres señales indicaría la existencia de tres mecanismos diferentes de adsorción entre el ketoprofeno y la enzima.

Seguidamente se presenta en la Figura 8 la deconvolución del espectro obtenido de la interacción de ketoprofeno con CALB. En esta última se observan claramente las señales que los componen. En este contexto, se observan los distintos componentes de la estructura secundaria que corresponden a los agregados (señal en 1617 cm^{-1}), hélice α (señal en 1654 cm^{-1}), láminas β (señales en 1630 y 1637 cm^{-1}), estructuras aleatorias (señal en 1644 cm^{-1}) y giros β (señal en 1660 cm^{-1}). Adicionalmente, se observan las señales de los grupos carbonilo y carboxilo de R/S-ketoprofeno en 1710 y 1660 cm^{-1} . Esta última se encuentra superpuesta a la asignación correspondiente a los giros β de la estructura secundaria. Y por último, se observa la nueva señal en 1740 cm^{-1} que en este estudio ha sido asignada a la formación del complejo acil enzima.

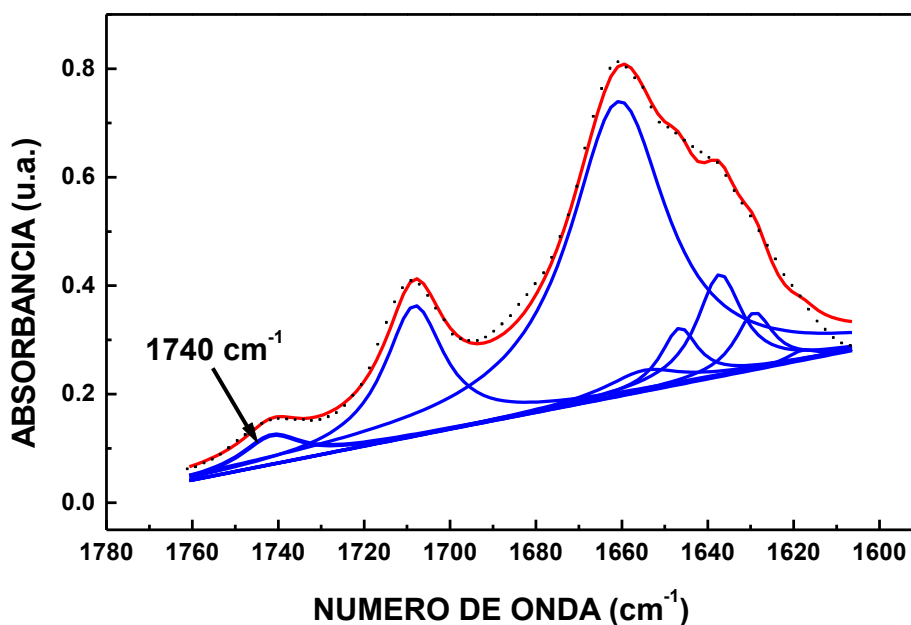


Figura 8. Espectro de la interacción de R/S-ketoprofeno con CALB luego de la deconvolución.

Si bien se obtuvieron evidencias de la formación de un complejo acil-enzima, no fue posible determinar la deacilación del complejo para que la reacción prosiga con la siguiente etapa del mecanismo. Esto es debido a que se observa una disminución en la

intensidad de la señal IR de todo el rango del espectro, por lo cual es imposible discriminar en qué momento ocurre la deacilación. Esta disminución en la intensidad de la señal puede estar asociada a la baja presión de vapor del solvente CCl_4 , el cual comienza a evaporarse rápidamente, y provoca variaciones en la concentración de los reactivos.

5.2. MODELADO MOLECULAR

En el modelado molecular, la estructura y función molecular se investigan para poder comprender y predecir el comportamiento de una molécula. El término modelado molecular hace referencia al estudio de moléculas mediante modelos físicos que, al combinarse con un conjunto de reglas teóricas, permiten racionalizar datos experimentales, planificar futuras investigaciones y proporcionar una información que no es posible obtener con las herramientas puramente experimentales (Buereng Calabuig, 2011).

Hoy en día el modelado molecular está íntimamente ligado al uso de computadoras y gráficos interactivos. El desarrollo de los ordenadores y de las técnicas computacionales ha permitido la incorporación de modelos teóricos para el tratamiento de todos aquellos problemas relacionados con la geometría y la energía de las moléculas, hasta tal punto que, con suficiente poder de cálculo y un nivel de teoría elevado, se podría modelar cualquier sistema biológico. Sin embargo, en la práctica, esto no es siempre posible debido a limitaciones tanto de tiempo, de recursos materiales, como de modelos suficientemente sofisticados para poder tomar en cuenta la complejidad de esos sistemas. Por este motivo, es necesario introducir aproximaciones para mantener la viabilidad del experimento, aplicando distintos niveles de teoría en función del sistema que va a ser analizado. Como norma general, a medida que aumenta el nivel teórico aumenta la calidad de los resultados obtenidos, pero también se incrementa notablemente el coste computacional. La descripción más completa de un sistema se obtiene a partir de la mecánica cuántica (Quantum

Mechanics, QM) que tiene en cuenta tanto a los núcleos como a los electrones en el cálculo, haciendo posible el estudio de la estructura, las propiedades que dependen de la distribución electrónica y la reactividad química (formación y ruptura de enlaces) (Leach, 2001). Sin embargo, su aplicabilidad está restringida a sistemas con centenares de átomos como máximo, siendo inviable para aquellos constituidos por miles de átomos en ausencia de recursos de supercomputación. Por otro lado, la mecánica molecular (Molecular Mechanics, MM) ignora los movimientos electrónicos y calcula la energía de una molécula o conjunto de moléculas únicamente en función de la disposición espacial de los núcleos atómicos. En general, este es el método que se utiliza para estudiar macromoléculas biológicas como el ADN o las proteínas. Ambas técnicas, no obstante, se pueden combinar en aproximaciones de mecánica cuántica/mecánica molecular (QM/MM). Con este método híbrido, por ejemplo una pequeña parte del sistema, implicada en una reacción química, se trata mediante QM mientras que el resto de los átomos se considera mediante MM (Buereng Calabuig, 2011).

Para el modelado molecular de proteínas, se requiere una estructura tridimensional de la misma, la cual se puede obtener experimentalmente mediante cristalografía de rayos-X, RMN o por métodos de modelado por homología. Una vez modelada la estructura, se aplica la minimización de energía para disminuir la energía global (Svendendahl, 2010).

En esta sección se estudia la esterificación enantioselectiva de R/S-ketoprofeno mediante modelado molecular. Los estudios de modelado molecular simple contribuyen a la comprensión de las etapas de coordinación, mecanismos de reacción y reacciones de inhibición de las lipasas (Foresti *et al*, 2009). En el caso de reacciones de esterificación enantioselectivas catalizadas por lipasas, el estudio de la unión de los distintos enantiómeros de sustratos quirales ha otorgado algunos indicios sobre la enantiopreferencia de las lipasas usando las reacciones de esterificación o transesterificación como reacciones modelo (Hæffner *et al*, 1998).

A continuación se exploran las etapas del mecanismo de reacción de esterificación de R/S-ketoprofeno a partir de herramientas de la química teórica, específicamente la

reacción de esterificación con los alcoholes estudiados en esta Tesis desde el punto de vista energético.

Se empleó el método MM2 (Molecular Mechanics versión 2) del programa Chem3D 5.0 Ultra. La estructura de CALB se obtuvo del banco de datos de proteínas (PDB, Protein Data Bank) según los estudios llevados a cabo por Uppenberg *et al* (Uppenberg *et al*,1994). Según se detalla en la Sección 1.4.4.1. del Capítulo 1, la enzima CALB está compuesta por 317 residuos de aminoácidos con un plegamiento del tipo α/β y la tríada catalítica la constituyen los residuos Serina 105, Histidina 224 y Ácido Aspártico 187. El sitio de unión para los sustratos incluye un bolsillo de unión de acilo (residuos 134, 138, 157, 189 y 190) y un bolsillo de unión grande (residuos 141, 144, 154, 285, 289 y 290) y mediano (residuos 39, 42, 47, 104 y 225) para los restos de alcohol pequeño y grande, respectivamente (Trodler & Pleiss, 2008). En este estudio se incluyó la porción de la tríada catalítica y el bolsillo grande y mediano. El R/S-ketoprofeno y los alcoholes se modelaron considerando su mínima energía estérica. Las estructuras se minimizaron hasta que se obtuvo un punto de corte de 0.1 kcal/mol entre uno y el siguiente.

El mecanismo de reacción de la lipasa B de *Candida antarctica* en la esterificación de R/S-ketoprofeno se estudió considerando las distintas etapas del mecanismo de reacción Ping Pong Bi Bi (descrito en la Sección 1.4.6. del Capítulo 1). Las etapas consideradas en este mecanismo de reacción son:

1. Adsorción de R/S-ketoprofeno cerca de la Serina 105.
2. Formación del intermediario tetraédrico **1**.
3. Formación del complejo acil-enzima de R/S-ketoprofeno.
4. Adsorción del alcohol cerca del grupo carbonilo del complejo acil enzima considerando la distancia al nitrógeno de la His 224.
5. Formación del intermediario tetraédrico**2**: R/S-ketoprofeno coordinado con el alcohol.
6. Desorción del éster de ketoprofeno y regeneración de la Serina 105.

Cuando se analiza el 2-propanol en la interacción con el intermediario acil-enzima de R/S-ketoprofeno, hay al menos dos formas diferentes de adsorción (escalonada y eclipsada) cerca del grupo Serina. En este trabajo se analiza la forma escalonada, en la cual la energía es menor. Si bien la forma con 2 átomos de hidrógeno lado a lado escalonados es preferida por cerca de -1.5 kcal/mol, la adsorción es posible de ambas formas. Esto implica que la transferencia del hidrógeno del 2-propanol a la His 224 (una etapa clave en el mecanismo) podría estar obstaculizada estérica y electrónicamente si la forma de adsorción del 2-propanol es escalonada pero el grupo metilo se localiza cerca de la His. En la Figura 9 se presentan las tres conformaciones eclipsadas del 2-propanol interaccionando con el complejo acil-enzima. La conformación del alcohol en la cual los grupos metilo están más alejados de la His presentan la energía estérica más baja, y por lo tanto es la vía de interacción más favorable. Se propone entonces que la estructura conformacional del alcohol y el impedimento estérico para la transferencia del hidrógeno a la Histidina, disminuyen la velocidad de reacción del profeno. De esta forma la reacción es controlada por el cambio conformacional del 2-propanol más que por la distribución de los sustituyentes alrededor del C quiral del profeno.

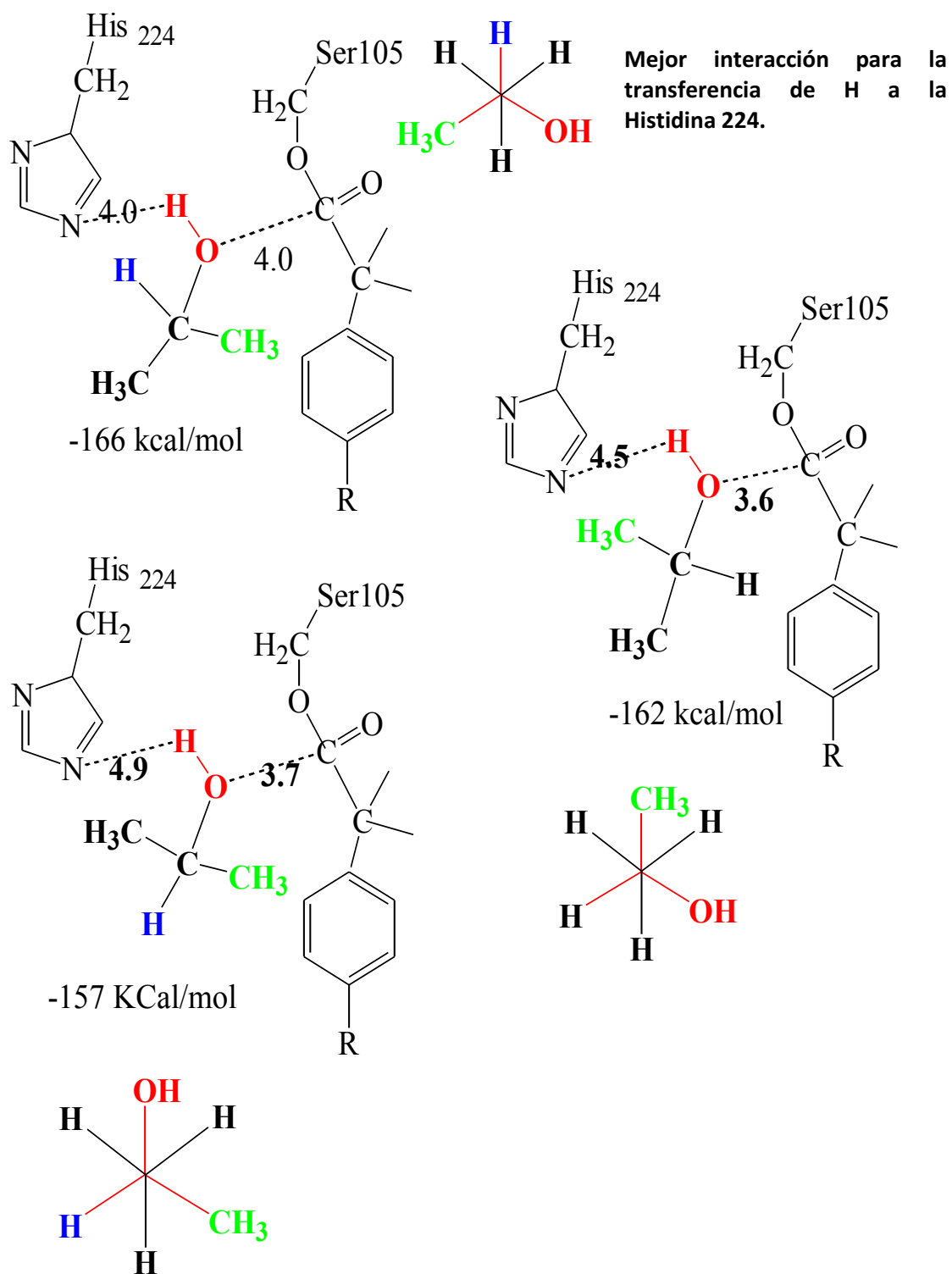


Figura 9. Energías estéricas involucradas en las distintas interacciones de 2-propanol con el complejo acil-enzima (se incluyen las proyecciones de Newman de 2-propanol en su forma escalonada).

Por lo tanto, el 2-propanol posee al menos tres conformaciones eclipsadas que pueden intercambiarse a los fines de facilitar la transferencia del átomo de H del grupo OH a la His 224 de la triada catalítica durante la formación del intermediario tetraédrico **2**. De acuerdo a lo presentado anteriormente, las barreras estéricas y electrónicas en la etapa de coordinación del alcohol inducen a la baja actividad.

La adsorción de 2-propanol cerca del complejo acil enzima en el ketoprofeno produce distancias de aproximadamente 4.0 Å desde el hidrógeno del OH del alcohol al nitrógeno de la Histidina. La aproximación del 2-propanol cerca de la Histidina genera una distancia O-C del carbonilo de 4.0 Å. La energía estérica aumenta cerca de 9 kcal/mol para la transferencia de hidrógeno cuando se fuerza una aproximación (este dato no se muestra). Esta situación podría deberse al aumento de la interacción repulsiva entre los grupos metilo del 2-propanol con el grupo fenilo del ketoprofeno.

En base a los resultados obtenidos, se propone que el 2-propanol aumenta la energía de activación de la reacción para lograr el intermediario **2** y también tiene interacciones repulsivas que hacen solo algunas de las especies conformacionales más capaces de proceder con la reacción.

En el estudio llevado a cabo con los alcoholes primarios, el principal interés se fijó en el alcohol debido a la importancia de las interacciones estéricas con el sitio activo y su influencia en la actividad catalítica de la enzima. En este caso se modelaron las reacciones de esterificación de ketoprofeno con los alcoholes metanol, etanol y 1-propanol considerando la situación inicial, la formación del intermediario tetraédrico **1** y del complejo acil enzima. En la Figura 10 se presentan las energías estéricas de las distintas etapas del mecanismo.

Es importante tener en cuenta que los enlaces involucrados son similares pero el número total de átomos no lo es. La comparación es sólo cualitativa considerando más estable el conformero cuanto menor sea la energía estérica.

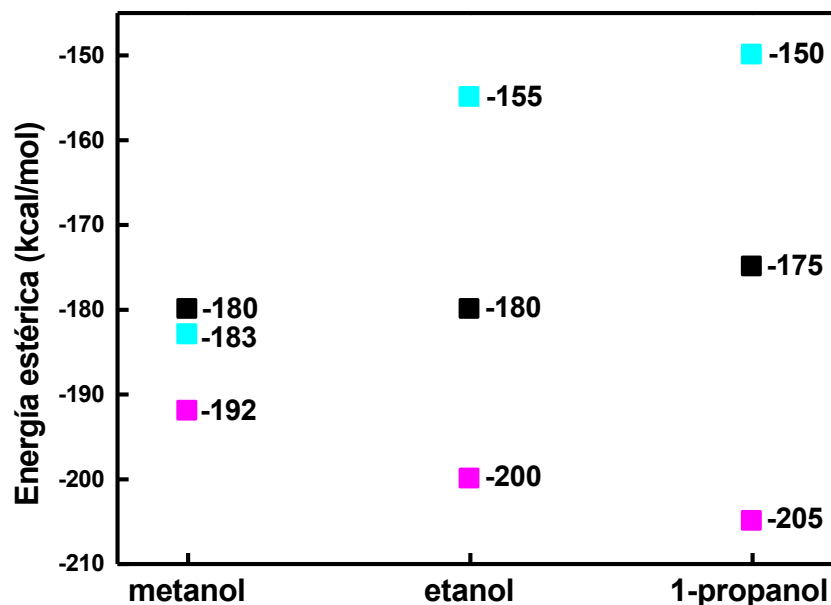


Figura 10. Energía estérica de R/S-ketoprofeno y metanol, etanol y 1-propanol cerca de CALB. Se incluyen las etapas: ■ inicial, ■ intermediario 1 (tetraédrico) y ■ acil enzima

Cuando se emplea metanol, este se localiza en el bolsillo donde debe interactuar el grupo carbonilo del ketoprofeno de forma que interfiere en la formación del intermediario tetraédrico posicionándose entre el ketoprofeno y el residuo Thr 40. De esta manera, el metanol presenta impedimentos estéricos y electrónicos en la etapa de coordinación del R/S-ketoprofeno. En cambio, el etanol y 1-propanol, permiten la formación del complejo acil enzima para que luego reaccione con los alcoholes. Las diferencias en las energías estéricas para estos alcoholes probablemente sean debido al impacto del grupo metilo adicional del 1-propanol. En el caso del 2-propanol se verificó que la energía estérica en las etapas de adsorción en el sitio activo, la formación de intermediario **1** y del complejo acil-enzima resultaron superiores a las del resto de los alcoholes (-148.5, -150.9, -145.6, respectivamente).

El efecto de la inhibición del metanol parece estar relacionado a: a) la ocupación relativa del alcohol antes de la coordinación de la molécula de ketoprofeno y la energía estérica involucrada, b) cómo afecta el alcohol la coordinación del ketoprofeno, y el

grupo carboxilato del ketoprofeno con el residuo de serina 105 para producir el intermediario **1** y la estabilización mediante el hueco oxianiónico, c) cómo la formación del acil enzima se estabiliza o no, y d) la correcta orientación del alcohol para producir la reacción con el acil enzima, una vez que éste se formó.

5.3. CONCLUSIONES

En el mecanismo de acción de las lipasas primero debe formarse el intermediario tetraédrico **1** seguido del complejo acil-enzima. Este complejo se forma por la interacción del ácido carboxílico del ketoprofeno con el grupo serina de la triada catalítica de la enzima. Luego, tiene lugar la reacción con los alcoholes.

El estudio experimental del mecanismo de reacción mediante ATR-FTIR permitió determinar la formación del complejo acil-enzima ($\sim 1740\text{ cm}^{-1}$) entre el R/S-ketoprofeno y la enzima CALB. Adicionalmente, la señal IR de dicho complejo está compuesta por tres señales que varían en el tiempo y que fueron asignadas a distintos mecanismos de adsorción entre ketoprofeno y la enzima. Sin embargo, estas especies adsorbidas aún no han sido identificadas y se propone a futuro, llevar a cabo un estudio teórico de modelado molecular con el fin de completar esta investigación.

Los estudios de modelado molecular realizados en esta investigación proveen por primera vez en la literatura un estudio de las distintas etapas del mecanismo y energía estérica involucrada en cada una de ellas. Cuando la lipasa es expuesta a una mezcla de alta relación molar de alcohol corto y lineal con un ácido carboxílico, está claro que el alcohol alcanza la triada catalítica más rápidamente y esto podría introducir problemas estéricos. Investigaciones previas indican que la velocidad de esterificación de los ácidos 2-arilpropiónicos catalizada por lipasas está influenciada por la naturaleza del alcohol. La mayor velocidad de esterificación se logra empleando alcoholes primarios, disminuye al emplear alcoholes secundarios y es casi nula con alcoholes terciarios (Arroyo & Sinisterra, 1994). Más recientemente, estas bajas actividades se atribuyeron a impedimentos estéricos de los alcoholes (Liu *et al*, 2009).

Los resultados obtenidos en este modelado demostraron que el bajo rendimiento catalítico de la enzima CALB empleando 2-propanol como aceptor de acilo no puede ser atribuido a la molécula del profeno sino a los arreglos conformacionales del alcohol secundario cuando se adsorbe al complejo acil-enzima. En este contexto, un arreglo conformacional de 2-propanol con ambos grupos metilo lejos de las especies OH favorece la transferencia del átomo de hidrógeno a la Histidina y la formación subsecuente del propiléster de ketoprofeno. En contraste, la adsorción de alcohol de tal forma que el grupo metilo se sitúe cerca de la Histidina aumenta la energía de activación para lograr las especies intermediarias.

Por otro lado, el conformero inicial, el intermediario tetraédrico **1** y el complejo acil enzima fueron energéticamente muy similares cuando se utilizó 1-propanol y etanol. Las diferencias probablemente puedan encontrarse en los estados de transición o estados de transición inestables y energías de activación más altas en el caso del 1-propanol con respecto a etanol (excepto en la etapa de coordinación). La inhibición de la actividad por parte del metanol es comprensible, pero las diferencias entre etanol y 1-propanol están basadas en interacciones estéricas en etapas de transición inestables. Esta propuesta debería ser evaluada con cálculos de mecánica molecular con mayor nivel y/o semiempíricos o ab-initio.

Estos estudios presentan una evidencia preliminar de la coordinación de alcoholes cortos y lineales unidos por puentes de H a la triada catalítica de CALB y su influencia en el mecanismo. La coadsorción de alcoholes y ketoprofeno (u otro profeno) debe considerarse porque introduce impedimentos estéricos adicionales a la coordinación del profeno cerca de la serina de la triada catalítica de CALB. Estos impedimentos estéricos se minimizan a través de la conformación que genera la menor interacción posible con los grupos laterales de la enzima y dificultan lo menos posible la transferencia de hidrógeno necesaria para regenerar la serina.

5.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Arroyo M, Sinisterra JV. High enantioselective esterification of 2-arylpropionic acids catalyzed by immobilized lipase from *Candida antarctica*: a mechanistic approach. J Org Chem 1994, 59, 4410-4417.

Buereng Calabuig JA. Tesis doctoral: "Modelado molecular de la interacción de fármacos antitumorales y nucleasas con el ADN", 2011, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, España.

Foresti ML, Galle M, Ferreira ML, Briand LE. Enantioselective esterification of ibuprofen with ethanol as reactant and solvent catalyzed by immobilized lipase: experimental and molecular modeling aspects. J Chem Technol Biotechnol 2009, 84, 1461-1473.

Hokenson MJ, Cope GA, Lewis ER, Oberg KA, Fink AL. Enzyme-induced strain/distortion in the ground-state ES complex in β -lactamase catalysis revealed by FTIR. Biochemistry 2000, 39, 6538-6545.

Iqbal A, Clifton IJ, Bagonis M, Kershaw NJ, Domene C, Claridge TDW, Wharton CW, Schofield CJ. Anatomy of a simple acyl intermediate in enzyme catalysis: combined biophysical and modeling studies on ornithine acetyl transferase. J Am Chem Soc 2009, 131, 749-757.

Leach AR. Molecular Modeling: Principles and applications. Editorial Prentice Hall, 2ª edición, 2001, Edinburgh Gate, Reino Unido.

Liu Y, Wang F, Tan T. Effects of alcohol and solvent on the performance of lipase from *Candida* sp. in enantioselective esterification of racemic ibuprofen. J Mol Catal B: Enzym 2009, 56, 126-130.

LLerena-Suster CR, José C, Collins SE, Briand LE, Morcelle SR. Investigation of the structure and proteolytic activity of papain in aqueous miscible organic media. Process Biochem 2012, 47, 47-56.

Llerena-Suster CR, Briand LE, Morcelle SR. Analytical characterization and purification of a commercial extract of enzymes: a case study. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014, 121, 11-20.

Meskers S, Ruyschaert J-M, Goormaghtigh E. Hydrogen-deuterium exchange of streptavidin and its complex with biotin studied by 2D-Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J Am Chem Soc* 1999, 121, 5115-5122.

Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. Editorial John Wiley & Sons Inc., 5ª edición, 1991, Nueva York, Estados Unidos.

Svendendahl M. Tesis doctoral: "Lipase and ω -transaminase - biocatalytic investigation", 2010, División de Bioquímica, Escuela de Biotecnología, Royal Institute of Technology, Estocolmo, Suiza.

Swedberg SA, Pesek JJ, Fink AL. Attenuated total reflectance fourier transform infrared analysis of an acyl-enzyme intermediate of α -chymotrypsin. *Anal Biochem* 1990, 186, 153-158.

Trodler P, Pleiss J. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC StructBiol* 2008, 8: 9.

Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 1994, 2, 293-308.

Wilkinson A-S, Ward S, Kania M, Page MGP, Wharton CW. Multiple conformations of the acyl-enzyme formed in the hydrolysis of methicillin by *Citrobacter freundii* β -lactamase: a time-resolved FTIR spectroscopic study. *Biochemistry* 1999, 38, 3851-3856.

Wilkinson A-S, Bryant PK, Meroueh SO, Page MG P, Mobashery S, Wharton CWA. Dynamic structure for the acyl-enzyme species of the antibiotic aztreonam with the *Citrobacter freundii* β -Lactamase revealed by infrared spectroscopy and molecular dynamics simulations. *Biochemistry* 2003, 42, 1950-1957.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La actividad farmacológica de R/S-ketoprofeno, perteneciente a la familia de los AINEs, reside principalmente en el isómero S(+), mientras que el enantiómero R(-) es biológicamente inactivo y puede presentar propiedades farmacológicas perjudiciales. Uno de los métodos más comúnmente empleados para la obtención de enantiómeros puros es la resolución cinética enzimática, siendo las lipasas las enzimas más comúnmente usadas.

Este trabajo de tesis doctoral es una continuación de los estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo sobre la reacción de esterificación de R/S-ibuprofeno. En la presente investigación se estudió la esterificación enantioselectiva del R/S-ketoprofeno catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) empleando distintos alcoholes como reactivos y solventes de la reacción. Al evitar el uso de co-solventes orgánicos, el sistema de reacción es eco-compatible y más económico. La enzima utilizada se encuentra inmovilizada en una resina macroporosa y fue adquirida comercialmente como Novozym® 435. Los resultados obtenidos en esta investigación evidenciaron que la esterificación de R/S-ketoprofeno empleando etanol y 1-propanol en un sistema libre de solvente es un proceso factible, sin embargo esto no ocurre cuando la reacción se lleva a cabo con metanol y 2-propanol.

La literatura reporta varias investigaciones sobre la inactivación de Novozym® 435 con diversos alcoholes. En este trabajo se llevó a cabo un tratamiento del biocatalizador con distintos medios alcohol- agua, y se estudió el efecto de los mismos sobre la integridad física y actividad catalítica del biocatalizador. Se evidenció una fuerte interacción de los alcoholes, los cuales permanecen adsorbidos en el soporte o proteína de Novozym® 435 a pesar de que el mismo se dejó secar luego del contacto prolongado con los mismos. Las temperaturas requeridas para desorber estos alcoholes alcanzan aproximadamente los 200 °C. Esta interacción no sólo ocurre en la superficie de Novozym® 435 sino en el interior del mismo. Los alcoholes difunden al interior de las esferas provocando un efecto de alisado en su textura y aumentando la porosidad interna. Adicionalmente, los resultados obtenidos por FTIR y la cuantificación de pérdida de masa y de proteína luego del contacto de 8 días con metanol, 1- y 2-propanol con 4.76% (v/v) de agua evidenciaron la disolución de

soporte polimérico polimetilmetacrilato VP OC 1600 y la desorción de la enzima CALB, siendo los alcoholes de cadena corta los más perjudiciales. Finalmente, el etanol, 1- y 2-propanol modifican la estructura secundaria de la enzima CALB en Novozym® 435 provocando un aumento en los giros β , disminución de estructuras aleatorias y láminas β . En el caso particular del metanol se produjo la disminución de la hélice α y lámina β , y un aumento en la contribución de agregados moleculares, que no fue observado luego del tratamiento con los otros alcoholes. En el contexto de estos efectos perjudiciales que los alcoholes ejercen sobre el biocatalizador, no se observaron cambios significativos en términos de actividad catalítica.

Según los resultados obtenidos en esta investigación, la estabilidad del biocatalizador en el medio de reacción debe ser investigada previo al desarrollo de una aplicación específica. En este contexto, el empleo del biocatalizador previamente tratado con los medios de reacción eliminaría las posibles interferencias que podrían provocar en la reacción de esterificación de R/S-ketoprofeno los compuestos que migran desde Novozym® 435 al medio de reacción.

Los estudios de modelado molecular y ATR-FTIR proveen evidencias de las distintas etapas del mecanismo de esterificación de la lipasa a nivel molecular. Este mecanismo descrito como Ping Pong Bi Bi involucra la formación de un primer intermediario tetraédrico entre el sitio activo de la lipasa y el R/S-ketoprofeno que evoluciona hacia un complejo acil-enzima. Luego, tiene lugar la reacción con los alcoholes para formar un segundo intermediario tetraédrico y regenerar la enzima. En este trabajo, se obtuvieron evidencias a través de ATR-FTIR de la formación del complejo acil-enzima, en el cual coexisten tres conformaciones diferentes.

Además, mediante los cálculos de energías estéricas se lograron determinar las causas de la baja actividad empleando el alcohol secundario 2-propanol y el alcohol primario de cadena corta metanol. Investigaciones previas determinaron una disminución en la velocidad de esterificación al emplear alcoholes secundarios. En este trabajo, se logró establecer que el bajo rendimiento catalítico al emplear 2-propanol se atribuye a los arreglos conformacionales del mismo cuando interacciona con el complejo acil-enzima. La situación con metanol es diferente. Este alcohol se sitúa en el

sitio de coordinación del ketoprofeno con la enzima, produciendo un impedimento estérico en la etapa inicial de coordinación. Adicionalmente, la baja actividad empleando metanol se atribuye a los cambios provocados en la estructura secundaria desde la primera hora de reacción.

Las investigaciones realizadas en esta Tesis doctoral dejan abiertos nuevos campos de estudio. Con los resultados obtenidos se logró obtener una mezcla enriquecida en S(+)-ketoprofeno no esterificado. Sin embargo, el éster de R(-)-ketoprofeno se encuentra en la mezcla de reacción. En base a esto, se planea desarrollar en mi carrera pos-doctoral una estrategia para lograr el aislamiento del S(+)-ketoprofeno. Para ello, se explorarán dos estrategias, una de ellas basada en la precipitación selectiva del isómero de interés y la segunda involucra un nuevo concepto de gran actualidad que es la utilización de solventes eutécticos conocidos como DESs (Deep-Eutectic-Solvents).

Adicionalmente, se estudiarán otras estrategias para la esterificación de R/S-ketoprofeno. Una de ellas será empleando glicerol como dador de acilo en la reacción. En este sentido, el uso del glicerol resulta relevante ya que es un subproducto de la industria del biodiesel, con lo cual su valoración a través de la esterificación enzimática de profenos es de potencial transferencia tecnológica. Por otro lado, se estudiará la reacción empleando biocatalizadores propios compuestos por la lipasa B de *Candida antarctica* (purificada a partir de un extracto enzimático crudo) inmovilizada sobre nano-partículas de TiO₂ y SiO₂, quitosano con y sin funcionalización con glutaraldehído, polipropileno (material polimérico) y magnetita.

ANEXO I

CÁLCULOS DE CONVERSIÓN Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA

La conversión de R/S-ketoprofeno se determinó por titulación por sacrificio con una solución de hidróxido de potasio en etanol. Esta titulación permitió determinar la cantidad de ketoprofeno remanente luego de la reacción de esterificación. A continuación, se presentan a modo de ejemplo los cálculos llevados a cabo para determinar la conversión y actividad específica del biocatalizador con y sin tratamiento previo empleando etanol como reactivo y solvente de la reacción de esterificación durante 48 h.

Para determinar la masa de ketoprofeno remanente se utilizó la ecuación (1):

$$\text{Masa R/S-ketoprofeno} = ((V \times N)_{\text{KOH}} / 1000) \times \text{PE}_{\text{R/S-ketoprofeno}} \times F \quad (1)$$

La concentración de KOH empleada corresponde a 0.244 N, el Peso equivalente (PE) de R/S-ketoprofeno es igual a 254.28 g/equivalente, y el factor de corrección **F** corresponde a 0.975. Este factor debe utilizarse debido a la sustracción de una alícuota de 25 µL del sistema de reacción para el análisis de los enantiómeros por HPLC y se obtiene a partir de la ecuación (2):

$$F = V_{\text{inicial}} / V_{\text{final}} = V_{\text{inicial}} / (V_{\text{inicial}} - 0.025 \text{ mL}) \quad (2)$$

Mediante el empleo de estas ecuaciones se determinó la masa remanente de ketoprofeno al finalizar las 48 de reacción, a partir de la cual se calculó el valor de conversión. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 1A.

Tabla 1A. Cálculos de la conversión de R/S-ketoprofeno

Novozym® 435	Masa inicial de ketoprofeno	Masa final de ketoprofeno	Conversión (%)
Sin tratamiento	0.5003	0.2551	49
Tratado 8 días con etanol	0.5006	0.2289	54

La actividad específica (**AE**) indica la cantidad de R/S-ketoprofeno convertidos a éster por unidad de tiempo y unidad de proteína presente en las esferas del biocatalizador, y se calculó según la siguiente ecuación (3):

$$AE = \frac{[(\text{masa de R/S-ketoprofeno})_i - (\text{masa de R/S-ketoprofeno})_f] \times 10^6 (\mu\text{mol})}{PM_{\text{R/S-ketoprofeno}} \times \text{Tiempo (min)} \times \text{Masa de proteína (mg)}} \quad (3)$$

Donde los subíndices “i” y “f” indican el tiempo inicial y final de reacción, respectivamente. La masa de proteína es la que se encuentra en los 160 mg de Novozym® 435 empleados en la reacción, según se determinó en la Sección 3.1.3. del Capítulo 3. En un gramo de Novozym® 435 se encuentran adsorbidas 154.192 mg de proteína, por lo cual en 160 mg de biocatalizador hay 24.671 mg de proteína. En el cálculo de la actividad específica del biocatalizador previamente tratado 8 días con el medio etanol-agua, se debe considerar la pérdida de proteína. A partir de los datos de proteína disuelta presentados en la Tabla 2 de del Capítulo 3, la exposición prolongada a etanol causa una pérdida proteica de 1.962 mg de proteína por cada gramo de biocatalizador. Por lo tanto para 160 mg de Novozym® 435 se desorbieron 0.314 mg de proteína. En conclusión, la masa de proteína remanente corresponde a 24.357 mg. Los cálculos de actividad específica se presentan en la Tabla 2A.

Tabla 2A. Cálculos de actividad específica en la esterificación de R/S-ketoprofeno con etanol a las 48 h de reacción

Novozym® 435	μmoles convertidos	μmoles por minuto	Masa proteína (mg)	AE (μmoles min ⁻¹ mg ⁻¹)
Sin tratamiento	964.291	0.335	24.671	1.36 x 10 ⁻²
Tratado 8 días con etanol	1068.507	0.371	25.357	1.50 x 10 ⁻²

**PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA
INVESTIGACIÓN**

A continuación se presentan los trabajos científicos que se elaboraron a partir de los resultados obtenidos en esta investigación:

1. Trabajos Científicos Publicados en Revistas Periódicas Internacionales:

- María V. Toledo; Carla José; Sebastián E. Collins; Rita D. Bonetto; María L. Ferreira; Laura E. Briand. Esterification of R/S-ketoprofen with 2-propanol as reactant and solvent catalyzed by Novozym® 435 at selected conditions. *J Mol Catal B Enzym* 2012, 83, 108-119.
- Carla José, María V. Toledo, Laura E. Briand. Enzymatic kinetic resolution of racemic ibuprofen: past, present and future. *Crit Rev Biotechnol*, 2015, 1-13. DOI: 10.3109/07388551.2015.1057551.
- Carla José, María V. Toledo, Jaiver Osorio Grisales, Laura E. Briand. Effect of co-solvents in the enantioselective esterification of (R/S)-ibuprofen with ethanol. *Current Catalysis*, 2014, 3, 131-138.
- María V. Toledo, Carla José, Sebastián E. Collins, María L. Ferreira, Laura E. Briand. Towards a green enantiomeric esterification of R/S-ketoprofen: a theoretical and experimental investigation. *J Mol Catal B Enzym* 2015, 118, 52-61. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.05.003>

2. Trabajos Científicos Publicados en Actas de Congreso

- “Esterificación de R/S-ketoprofeno con isopropanol como reactivo y solvente catalizada por Novozym® 435 bajo condiciones seleccionadas”. Toledo, M. Victoria; Mencias, Regina; Collins, Sebastián E.; José, Carla y Briand, Laura E. Acta del XXIII Congreso Iberoamericano de Catálisis. Santa Fé, Santa Fé, Argentina, 2 al 7 de Septiembre de 2012. Sección PC3, página 9.

- “Esterificación de R/S-ketoprofeno con isopropanol como reactivo y solvente catalizada por Novozym® 435 bajo condiciones seleccionadas”. Toledo, M. Victoria; Collins, Sebastián E.; Bonetto, Rita D.; Ferreira, M. Luján; Briand, Laura E. Acta del V Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones (EnReBB 2012), La Plata, Buenos Aires, Argentina, 5 al 8 de Noviembre de 2012. Trabajo presentado en forma de poster en el Área Biotransformaciones PP-B12, página 104.
- “Biocatalizadores basados en Lipasa B de *Candida antarctica* aplicadas a la esterificación de ibuprofeno”. José, Carla; Toledo, M. Victoria; Briand, Laura E.; Ferreira, M. Luján. Acta del V Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones (EnReBB 2012), La Plata, Buenos Aires, Argentina, 5 al 8 de Noviembre de 2012. Trabajo presentado en forma de comunicación oral en el Área Diseño de Biocatalizadores CO-DB2, página 28.
- “Efecto de la naturaleza del alcohol en la resolución enantiomérica de R/S-ibuprofeno y la estabilidad de Novozym® 435”. José, Carla; Toledo, M. Victoria; Briand, Laura E. Acta del V Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones (EnReBB 2012), La Plata, Buenos Aires, Argentina, 5 al 8 de Noviembre de 2012. Trabajo presentado en forma de comunicación oral en el Área Biotransformaciones CO-B3, página 43.
- “Actividad y estabilidad de un biocatalizador para la resolución racémica eco-compatible de fármacos antiinflamatorios”. Toledo, M. Victoria. XXI Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades de Grupo Montevideo (AUGM). Corrientes, Corrientes, Argentina, 14 al 16 de Octubre de 2013. Trabajo presentado en forma de poster y comunicación oral en el tema “Ciencia e Ingeniería de los Materiales”, página 109.

- "1-propanol como reactivo y solvente en la esterificación enantioselectiva de R/S-ketoprofeno catalizada por Novozym® 435 y su efecto en la integridad del biocatalizador". Toledo, M.V.; José, C.; Gambaro, L.A.; Collins, S.E.; Briand, L.E. XVIII Congreso Argentino de Catálisis. San Luis, San Luis, Argentina, 30 de octubre al 1 de noviembre de 2013. Trabajo presentado en forma de comunicación oral.
- "Estimadores de textura aplicados a la biocatálisis". Theiller, M.; Toledo, M.V.; Bonetto, R.D.; Briand, L.E. III Congreso Argentino de Microscopía. Mendoza, Mendoza, Argentina, 26 al 28 de Marzo de 2014. Trabajo presentado en modalidad poster.
- "Investigación experimental y teórica de la resolución cinética eco- compatible de R/S-ketoprofeno". M. V. Toledo, C. José, M. Theiller, L. A. Gambaro, S. E. Collins, M. L. Ferreira, L. E. Briand. XIX Congreso Argentino de Catálisis y VIII Congreso de Catálisis del Mercosur. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina, 21 al 23 de Septiembre de 2015. Trabajo presentado en forma de comunicación oral.
- "Screening de nuevos biocatalizadores en la resolución cinética de (R/S)-ibuprofeno". José, Carla; Nicolás, Paula; Toledo, M. Victoria; Lasalle, Verónica; Briand, Laura E; Ferreira, María L. XIX Congreso Argentino de Catálisis y VIII Congreso de Catálisis del Mercosur. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina, 21 al 23 de Septiembre de 2015. Trabajo presentado en forma de poster.