



Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata



Centro de Investigación
de Proteínas Vegetales (UNLP-CICPBA)

PROSPECCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LIPASAS Y PEPTIDASAS PROVENIENTES DE LÁTEX DE PLANTAS

Nahuel E. Wanionok

Dirección: Dra. Susana Morcelle del Valle

Laboratorio de procesos biotecnológicos – Año 2017

Febrero de 2017 – La Plata, Buenos Aires, Argentina.

El presente trabajo para optar al título de Licenciado en Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CiProVe), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Susana R. Morcelle del Valle y la tutoría de la Lic. María Elisa Fait.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por posibilitar mi formación académica.

Al Centro de Investigación de Proteínas Vegetales por brindarme el lugar y equipamiento para poder realizar este trabajo.

A mi Directora, la Dra. Susana Morcelle del Valle, por su gran dedicación, confianza y apoyo.

A la Lic. M. Elisa Fait por su predisposición para atender mis inquietudes e instruirme en el manejo dentro del laboratorio.

Al Dr. Néstor Caffini por su apoyo y buen humor de siempre.

A los laboratorios de la Universidad que nos prestaron sus equipos para poder realizar este trabajo.

A Tamara Rodríguez, por seguirme y apoyarme con suma paciencia y amor en cada paso de mi vida.

A mi familia y mis amigos por acompañarme siempre.

A mi papá, que me hubiera encantado que en una oportunidad como esta, se encontrara a mi lado.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Biocatálisis.....	7
1.1.1. Inmovilización de enzimas.....	7
1.1.2. Ventajas de las enzimas frente a catalizadores químicos.....	10
1.1.3. Influencia del medio de reacción.....	10
1.1.4. Aplicaciones de las enzimas en la industria.....	11
1.1.5. Futuro de la biocatálisis.....	12
1.2. Proteasas.....	12
1.2.1. Mecanismo catalítico.....	12
1.2.2. Rol de las peptidasas en los vegetales.....	13
1.2.3. Aplicaciones de las proteasas.....	14
1.3. Lipasas.....	15
1.3.1. Mecanismo catalítico.....	18
1.3.2. Aplicaciones de las enzimas lipolíticas.....	19
1.3.3. Fuentes de lipasas.....	20
1.3.4. Lipasas de origen vegetal.....	21
1.3.4.1. Lipasas de semillas.....	21
1.3.4.2. Lipasas de látex.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivos generales.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1. Estudio de reuso de biocatalizadores basados en proteasas.....	25

3.1.1. Inmovilización de enzimas por adsorción.....	25
3.1.2. Síntesis de aminoacil alquilamidas mediante el uso de biocatalizadores...	25
3.1.3. Ensayos de reutilización.....	26
3.1.3.1. Influencia del solvente del lavado.....	26
3.1.3.2. Efecto de activadores.....	27
3.1.4. Análisis de los resultados.....	27
3.2. Caracterización de lipasas de látex de plantas apocináceas.....	27
3.2.1. Material vegetal estudiado.....	27
3.2.1.1. <i>Calotropis procera</i>	27
3.2.1.2. <i>Himatanthus drasticus</i>	28
3.2.1.3. <i>Cryptostegia grandiflora</i>	29
3.2.2. Obtención de las lipasas.....	31
3.2.3. Medidas de actividad lipolítica.....	32
3.2.3.1. Hidrólisis de ésteres de <i>p</i> -nitrofenilo.....	32
3.2.3.2. Hidrólisis de triacilglicéridos.....	33
3.2.4. Caracterización de la actividad lipolítica.....	33
3.2.4.1. Determinación de pH óptimo.....	33
3.2.4.2. Determinación de la temperatura óptima.....	34
3.2.5. Medidas de actividad en esterificación.....	34
3.2.5.1. Determinación de la preferencia del solvente.....	34
3.2.5.2. Determinación de la temperatura óptima de esterificación.....	36
3.2.5.3. Determinación de la carga enzimática óptima de esterificación.....	36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
4.1. Estabilidad operacional de biocatalizadores basados en peptidasas. Estudio del reuso del biocatalizador obtenido.....	37

4.1.1. Elección del tipo de inmovilización.....	37
4.1.2. Mediciones de la actividad en el reuso del biocatalizador.....	37
4.1.2.1. Análisis de los cromatogramas obtenidos.....	38
4.2. Caracterización de lipasas de látex de plantas apocináceas.....	44
4.2.1. Determinación de actividad lipolítica en <i>C. procera</i> , <i>C. grandiflora</i> y <i>H. drasticus</i>	44
4.2.1.1. Determinación de la medida de actividad hidrolítica sobre ésteres de <i>p</i> -nitrofenilo.....	44
4.2.1.2. Determinación de la actividad lipolítica sobre triacilglicéridos.....	45
4.2.3. Caracterización de la actividad lipolítica en <i>C. procera</i>	46
4.2.3.1. Determinación de pH óptimo.....	46
4.2.3.2. Determinación de la temperatura óptima.....	47
4.2.4. Medidas de actividad en ensayos de esterificación.....	49
4.2.4.1. Determinación de la preferencia del solvente de reacción.....	49
4.2.4.2. Determinación de la temperatura óptima.....	52
4.2.4.3. Determinación de la carga enzimática óptima.....	53
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	55
6. BIBLIOGRAFÍA.....	56

ABREVIATURAS

% IA: % del índice de acidez	IA: Índice de acidez
Abs: Absorbancia	MeOH: Metanol
ACN: Acetonitrilo	MES: (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid)
AE: Actividad enzimática	MOPS: (3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid)
AEE: Actividad enzimática específica	MPa: Megapascales
AMPSO: (3-[(1,1-Dimethyl-2-hydroxyethyl) amino]-2-hidroxypropanesulfonic acid)	PM: Peso molecular
ASL: Lipasa de <i>Araujia sericifera</i>	RPM: Revoluciones por minuto
AU: Unidades de absorbancia	TAPS: (N-tris[Hidroxymethyl]metyl-3-aminopropane sulfonic acid)
CALB: Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	TG: Triglicéridos
CAPS: (3-[Cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid)	THF: Ácido trifluoroacético
CPL: Lipasa de <i>Carica papaya</i>	Tris: tris(hidroximetil)aminometano
DHA: Ácido docosahexanoico	UE: Unidad enzimática
DNA: Ácido desoxirribonucleico	UEE: Unidad enzimática específica
DTT: 1,4-ditio-D,L-treitol	UI: Unidades internacionales
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (sal disódica)	Z- Ala- OH: N-benziloxycarbonil-L-alanina
HPLC: Cromatografía líquida de alta presión	Z-Ala-NHC ₁₂ : N-benzoil-alanina dodecilamida

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biocatálisis

El término biocatálisis se refiere a la utilización de células o sus enzimas aisladas para catalizar reacciones o transformaciones que conducen a la obtención de compuestos de interés, que satisfacen numerosas necesidades humanas. La biocatálisis ha surgido como un área de gran potencial dentro de la biotecnología, y ha permitido la aplicación de las enzimas en un amplio número de industrias dedicadas a la fabricación de fármacos y otros compuestos químicos, así como alimentos o biocombustibles (Arroyo et al., 2014).

La utilización de células o enzimas ha demostrado su eficacia en la síntesis de productos en las diferentes tipos de industrias. Posee ventajas sobre la química sintética tradicional, ya que permite el empleo de condiciones de ensayo que podrían afectar al medio ambiente, además de presentar generalmente un menor costo económico, y tener mejores rendimientos de reacción.

1.1.1. Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente (Arroyo et al., 2014).

La inmovilización de las enzimas sobre los soportes sólidos puede lograrse utilizando una amplia variedad métodos químicos y físicos (Cao 2005, Sheldon 2007, Sheldon y Van Pelt 2013). El método más utilizado es el de inmovilización por adsorción (Figura 1) y se basa en las interacciones físicas entre el soporte y la enzima. Existen fuerzas de van der Waals, interacciones iónicas, interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno. Un punto a resaltar en este tipo de inmovilización es que la enzima no cambia su estructura nativa y retiene su actividad. Para este tipo de inmovilización se requiere afinidad entre los grupos activos específicos del soporte y la enzima, pero si esto no se cumpliera, existen agentes intermedios (denominados *agentes modificadores*) que permiten la unión química entre ambos. El agente modificador debe tener al menos dos grupos reactivos en su molécula; se debe permitir que químicamente uno ancle en el soporte y el otro interactúe con la enzima (Jesionowski et al., 2014). Este caso en el cual se emplean agentes modificadores, ya no se trata de una inmovilización por adsorción simple, sino

por *enlace covalente* entre la enzima y el soporte (Figura 2). Existen varias características diferentes en ambos tipos de técnicas (Tabla 1).

Tabla 1: Ventajas y desventajas de los métodos de inmovilización.

ADSORCIÓN	ENLACE COVALENTE
Mantiene la estructura enzimática intacta	Puede modificar la estructura
Baja estabilidad en la inmovilización	Alta estabilidad de inmovilización
Económico	Más costoso
Se necesita afinidad entre el soporte y la enzima	Puede usarse si no hay afinidad entre el soporte y la enzima
Método rápido	Es necesario mayor tiempo

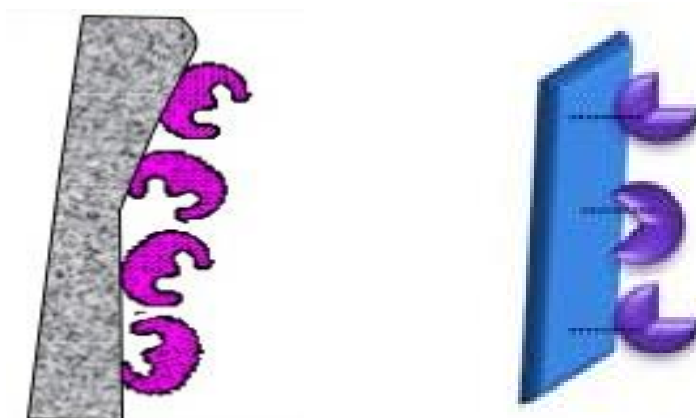


Figura 1: Inmovilización de enzimas por adsorción.

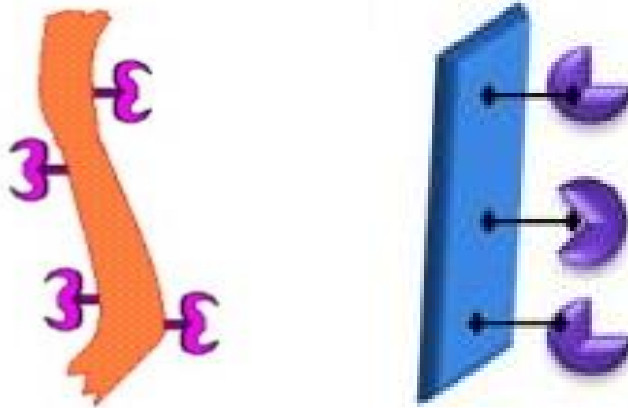


Figura 2: Inmovilización de enzimas por enlaces covalentes.

Los criterios de elección adecuados para la inmovilización de una enzima determinada y su aplicación incluyen: costo, disponibilidad, estabilidad (o reactividad si es necesario) en las condiciones específicas y el tipo de reactor. Las propiedades fisicoquímicas del soporte que deben tomarse son: superficie, tamaño de partícula, estructura de poro y el tipo de grupos funcionales presentes en la superficie (Jesionowski et al., 2014).

Entre los soportes inorgánicos utilizados para la inmovilización de enzimas por adsorción, las sílicas son los soportes que han llamado la atención (Erhardt y Jordening 2007; Magner 2013; Hartmann y Kostrov 2013). Otros soportes de sílica ampliamente utilizados para la adsorción enzimática son los geles de sílica (Bhattacharyya et al., 2010, Lee et al., 2010), que poseen estructuras porosas y gran área de superficie, como también alta resistencia mecánica y estabilidad térmica. Con el fin de aumentar la afinidad de las enzimas con la sílica, fueron propuestas las modificaciones de las matrices con polímeros. Estas consisten en la mezcla de sílicas con polímeros o recubriéndolas de estos (Kwon et al., 2012).

Otro soporte inorgánico utilizado es el oro, debido a que es fácilmente maleable. Otros materiales que tienen relevancia en la adsorción son zirconio, mica, hidroxiapatita, entre otros (Jesionowski et al., 2014).

En lo que respecta a soportes orgánicos, es muy utilizado el quitosano. Es una sustancia no tóxica, biocompatible y formadora de gel catiónico que se puede preparar fácilmente en

membranas, perlas, nanopartículas, fibras, fibras huecas o esponjas (Krajewska 2005). También puede aplicarse en forma microcristalina (Castro et al., 2007).

Dentro de los soportes orgánicos, son de gran importancia el uso de celulosa y gel de agarosa. También son utilizados los compuestos orgánicos sintéticos, los cuales poseen ventajas debido a que pueden adaptarse a las condiciones de la enzima y del proceso específicamente (Jesionowski et al., 2014).

1.1.2. Ventajas de las enzimas frente a catalizadores químicos

La catálisis enzimática es inherentemente más selectiva que la síntesis química convencional. Esta selectividad es a menudo de posición (es decir, regioselectividad) o quiral (es decir, estereoselectividad). La alta selectividad tiene algunas ventajas claves, incluyendo menor número de reacciones colaterales que lleven a la aparición de productos secundarios, separaciones más fáciles (porque al ser más selectivas los procesos de purificación suelen ser más simples), y potencialmente producen menos efectos ambientales nocivos (Dordick, 1991).

1.1.3. Influencia del medio de reacción

Las enzimas de la industria se usaron normalmente en entornos acuosos. Sin embargo, el empleo de dicho medio presenta algunas desventajas. Entre estos se encuentran: la imposibilidad de solubilizar muchos compuestos orgánicos, la producción de reacciones secundarias indeseables y la existencia de equilibrios termodinámicos desfavorables.

A fin de superar estas inconvenientes, se han desarrollado una serie de estrategias. Estos incluyen el uso de enzimas en soluciones acuosas que contienen un cosolvente orgánico miscible con agua, mezclas bifásicas orgánico-acuosas, uso de micelas, y, por último, empleo de solventes orgánicos anhidros (Dordick, 1991).

Si se desea utilizar una enzima inmovilizada, es fundamental la elección del soporte. Este influye en el microambiente de la enzima y la distribución de agua en el sistema, lo que afecta la actividad y la estabilidad de la enzima (Dordick, 1991). Existen diferentes motivos por lo cual esto ocurre, entre los que pueden nombrarse: la competencia por el agua entre enzima, soporte y

disolvente; la distribución del sustrato entre la enzima y el medio de reacción; baja difusión del sustrato en el medio, entre otras razones.

1.1.4. Aplicaciones de las enzimas en la industria

En la industria alimentaria, las enzimas (tanto libres como inmovilizadas) son utilizadas para facilitar la fabricación de productos, mejorar las propiedades organolépticas, e incluso en el control de calidad de los alimentos.

Un ejemplo importante es la producción industrial de glucosa mediante la hidrólisis enzimática del almidón de maíz, trigo, tapioca o arroz. Se utilizan α -amilasas y glucoamilasas inmovilizadas de distintas especies de *Bacillus* y/o *Aspergillus*. En la fabricación de jarabes ricos en fructosa, se recurre a una glucosa isomerasa inmovilizada, y que ha sido aislada de bacterias (*Bacillus*) o actinomicetos (*Actinoplanes* y *Streptomyces*). Los jarabes ricos en glucosa se emplean en la fabricación de bebidas refrescantes y caramelos, en panaderías y destilerías; mientras que los ricos en fructosa son usados en bebidas refrescantes, conservas, salsas, yogures y frutas enlatadas, debido a su mayor poder edulcorante (Arroyo et al., 2014).

También se utilizan en la preparación de leche sin lactosa, mediante el uso de β -galactosidasa (procedente generalmente de levaduras del género *Kluyveromyces*) inmovilizada (Arroyo et al., 2014). En el prensado de frutas y verduras para la preparación de zumos se obtiene una gran cantidad de pectinas y celulosas, por lo que requiere una etapa de clarificación para el mejoramiento del producto (menos viscosos, más estables y concentrados). Esto se realiza por medio del empleo de enzimas fúngicas como pectinesterasas, pectinliasas, hemicelulasas y celulasas.

La utilización de biocatalizadores en la industria química y farmacéutica es cada vez más frecuente. La utilización de enzimas en estas industrias está enfocada principalmente a: la obtención de precursores de fármacos y semisíntesis de fármacos, así como la resolución enzimática de mezclas racémicas (Arroyo et al., 2014).

Existen muchas otras aplicaciones en distintas industrias. Una muy importante es la fabricación de biocombustibles, como en el caso de bioetanol procedente de la fermentación de glucosa obtenida previamente en la hidrólisis enzimática del almidón. A su vez, el biodiesel es obtenido

mediante el uso de lipasas microbianas o vegetales, catalizando la reacción de transesterificación con metanol de los triglicéridos de aceites vegetales. Asimismo, los procesos de blanqueamiento del *denim* en la industria textil, y del papel en la industria papelera se logran mediante la utilización de las lacasas, un grupo de enzimas que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos (Arroyo et al., 2014). También se utilizan celulasas para la suavización de telas de algodón.

1.1.5. Futuro de la biocatálisis

Debido al gran desarrollo de tecnologías bioquímicas, biotecnológicas y de biología molecular, la biocatálisis ha obtenido grandes avances. Con la tecnología del DNA recombinante se ha logrado la expresión de enzimas en grandes cantidades, lo que ha favorecido una disminución de su precio. Por otra parte, las técnicas de mutagénesis y evolución dirigida han permitido la obtención de nuevos biocatalizadores que presentan un aumento de actividad, estabilidad y/o especificidad respecto a las nativas (Arroyo et al., 2014).

Se puede concluir que para poder lograr todos los objetivos planteados, siendo estos rentables y no contaminantes, se deberá tener un mejor conocimiento del mecanismo de acción de las enzimas, reducir costos de procesos, mejorar el procedimiento de inmovilización y la ingeniería del bioproceso, y poseer una mayor conciencia de los beneficios ambientales de la tecnología enzimática que apliquemos (McAuliffe et al., 2007).

1.2. Proteasas

Las proteasas (EC 3.4), presentes en todos los organismos vivos, son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas. Se agrupan según los residuos de aminoácidos del centro activo y los mecanismos de acción en cinco grupos: serino, cisteíno, aspártico, metalo proteasas, así como peptidasas de mecanismo catalítico desconocido (Pérez et al, 2006).

1.2.1. Mecanismo catalítico

La catálisis puede realizarse mediante dos mecanismos de acuerdo a los tipos de peptidasas:

Las aspárticas, glutámicas y metaloproteasas activan una molécula de agua, luego esta realiza un ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico para producir su hidrólisis.

Las proteasas serínicas, treonínicas y cisteínicas utilizan un residuo nucleofílico en una tríada catalítica. Ese residuo realiza un ataque nucleofílico para unir covalentemente la proteasa a la proteína sustrato, liberando la primera mitad del producto. Este intermediario acilo-enzima se hidroliza a continuación mediante una molécula de agua activada, liberando la segunda mitad del producto y regenerando la enzima libre (Figura 3).

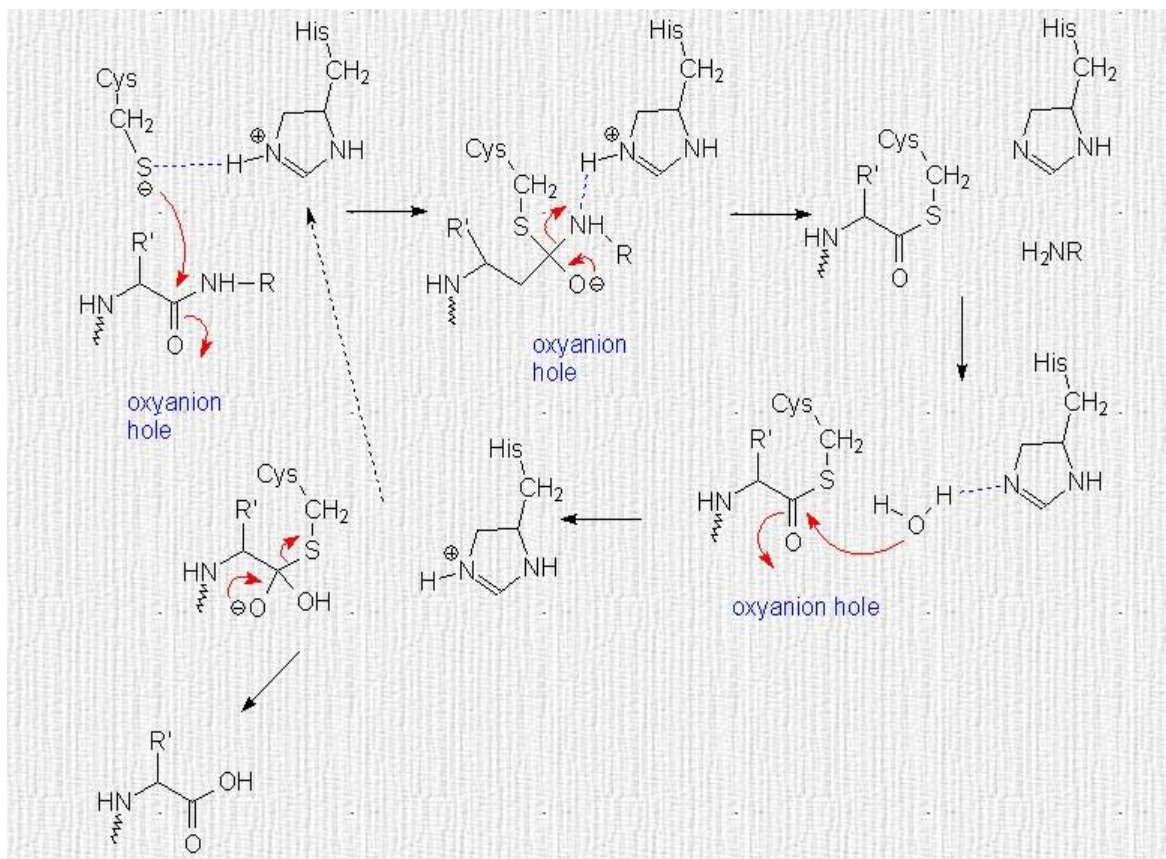


Figura 3: Mecanismo catalítico de una peptidasa cisteínica (Departamento de Química, Universidad de Maine; 2014).

1.2.2. Rol de las peptidasas en los vegetales

La proteólisis es muy importante para las células. Una de las principales funciones es la eliminación de proteínas no funcionales, ya sea porque se encuentren dañadas o mal plegadas.

De aquí se producirá la síntesis de nuevas proteínas con los aminoácidos liberados por la degradación de dichas proteínas. También es de vital importancia ya que mediante modificaciones postraduccionales las proenzimas resultan funcionales o permiten su adecuado ensamble. La proteólisis ejerce también un mecanismo de control de proteínas que tengan como función la regulación de ciertos procesos o mecanismos.

En las plantas el recambio proteico es considerado fundamental para el crecimiento. Ejemplos de ello son la degradación de proteínas de reserva durante la germinación de las semillas o la movilización de proteínas luego de la senescencia foliar, con la relocalización de fuentes de nitrógeno en los órganos reproductivos (Errasti, 2013).

Las proteasas en las plantas poseen asimismo un rol fundamental en diferentes eventos de la muerte celular programada (iniciación, regulación y autólisis), la resistencia a insectos y patógenos, la digestión de insectos en plantas carnívoras, la señalización por brasinoesteroides y en la regulación de procesos de desarrollo y crecimiento tales como la diferenciación xilemática, la densidad de estomas y la formación lateral de raíces, del patrón embrionario y del meristema apical, entre otros (Errasti, 2013).

1.2.3. Aplicaciones de las proteasas

Las peptidasas se utilizan en distintos campos dentro de la industria. Tienen gran participación en la industria química, alimentaria y farmacéutica entre otras.

Tienen una gran importancia en el desarrollo de detergentes. El uso de estos biocatalizadores disminuye el uso de productos químicos tales como disolventes y productos cáusticos, haciendo detergentes menos agresivos al medio ambiente, reduciendo el consumo de agua y energía. Los parámetros a tener en cuenta para la elección de una buena peptidasa para esta aplicación son compatibilidad con los componentes de los detergentes (tensioactivos, perfumes y blanqueadores), buena actividad para la temperatura de lavado y la eficiencia en la eliminación de manchas (Showell, 1999).

En el caso de la industria alimentaria, las enzimas proteolíticas se utilizan cada vez más para modificar los alimentos ricos en proteínas, mejorar el sabor, aroma, textura, la funcionalidad y la calidad nutricional (Torres Feced, 1997). A su vez, son usadas en la elaboración de cerveza con la

finalidad de proporcionarle buena estabilidad coloidal a bajas temperaturas, es decir, impedir que como consecuencia del enfriamiento se manifieste turbiedad o se sedimenten componentes que se mantienen solubles a temperatura ambiente, como los complejos tanino-proteína (Sicard, 1982). También poseen una gran importancia en la panificación, mejorando la textura y la elasticidad de la masa, al actuar las peptidasas sobre el gluten.

En lo que respecta a la industria farmacéutica, se utilizan enzimas proteolíticas en tratamientos postquirúrgicos para el desbridamiento de heridas y en clínica gastroenterológica como coadyuvantes en trastornos digestivos. La aplicación más trascendente de estas enzimas radica en sus probadas propiedades antiinflamatorias, siendo papaína, bromelina y ficina las peptidasas más usadas en tal sentido (López, 1995). Las peptidasas que hidrolizan secuencias específicas de la molécula de caseína pueden resultar de interés en el aislamiento e identificación de péptidos biológicamente activos. Así se han aislado péptidos derivados de caseína que poseen actividad opioidea, inmunoestimulante, antitrombótica, antibacteriana y/o antihipertensiva, entre otras (Loukas et al., 1983; Fiat et al., 1993; Dziuba et al., 1999).

Vale destacar que estas enzimas son también requeridas en la manufactura de cueros en la remoción de pelos, glándulas, células epiteliales y tejidos superficiales que no hayan podido ser eliminados en tratamientos previos (Sicard, 1982).

Otro de sus usos se produce en la industria textil, en la cual las prendas son “encoladas” mediante el uso de preparaciones de polímeros (“colas”) para aumentar su resistencia a la tracción y abrasión. Esto generalmente se hace impregnando la tela con gelatina, la cual es eliminada con las peptidasas (Sicard, 1982).

1.3. Lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los acilglicérols in vivo (Figura 4). Además, pueden catalizar la hidrólisis o síntesis de un grupo amplio de ésteres carboxílicos (Bornscheuer et al. 1994). Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, y se encuentran en microorganismos, plantas y animales (Berner y Hammond, 1970; Mukherjee, 1996; Ruiz et al., 2007).

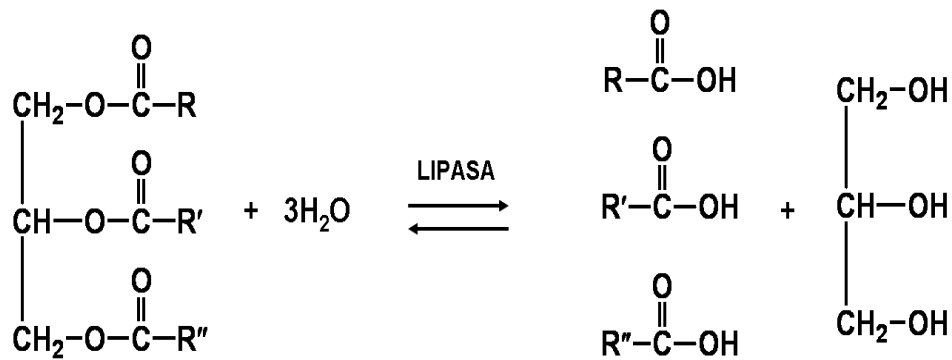


Figura 4: Ecuación general de hidrólisis de triglicéridos catalizada por una lipasa.

Igualmente, no existe una definición concreta que permita clasificar a una enzima lipolítica como lipasa. A pesar de esto, se han establecido dos criterios para poder hacerlo.

Estos son:

- 1) Debe ser activada mediante la presencia de una interfase. La actividad de la enzima debe aumentar de manera notoria cuando el sustrato de triglicéridos forme una emulsión, lo que se llama "activación interfacial".
- 2) La lipasa debe contener una tapa, la cual es un bucle de superficie de la proteína que cubre su sitio activo y al tomar contacto con la interfase ocurre su apertura (Figura 5).

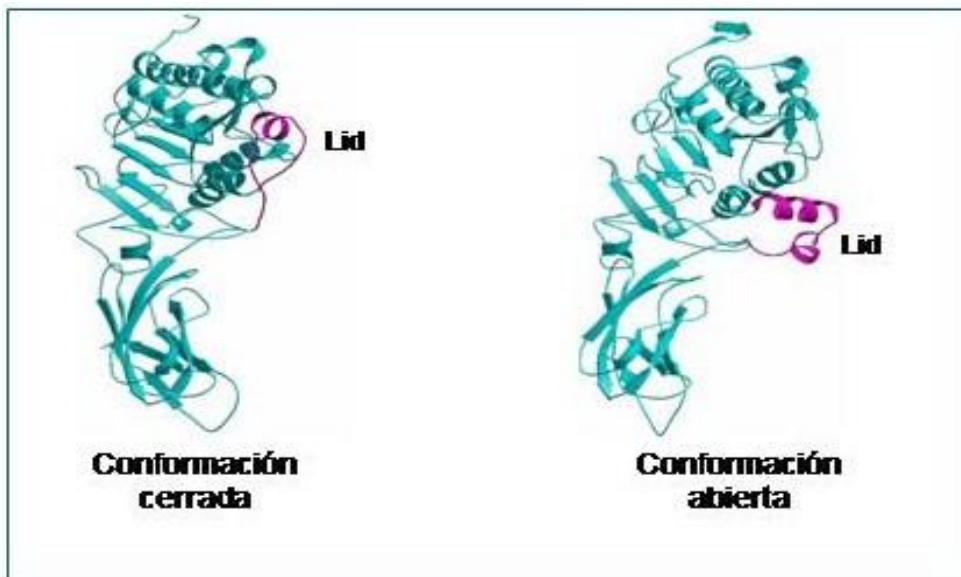


Figura 5: Conformaciones estructurales de la lipasa B de *Candida antarctica*. Tomada de Protein Data Bank (PDB), código de acceso 1TCB.

A su vez, estos criterios son inadecuados para clasificar enzimas conteniendo una tapa, que no muestran activación interfacial. Por lo tanto, las lipasas se definen como carboxilesterasas que catalizan la hidrólisis (y síntesis) de acilgliceroles de cadena larga. Se consideran “de cadena larga” los ésteres de glicerol compuestos por grupos acilo de diez o más carbonos. La hidrólisis de ésteres de glicerol que contengan grupos acilo con un número de carbonos menor a diez usualmente indica la presencia de una esterasa. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la mayoría de las lipasas son perfectamente capaces de hidrolizar los sustratos de las esterasas (Jaeger et al., 1999).

Es así que, si el sustrato es un éster cuyo componente alcohol es un residuo de glicerol, el componente ácido son ácidos grasos y el TG es insoluble en agua, la enzima capaz de hidrolizarlo será una lipasa, por lo que las lipasas pueden describirse también como enzimas que hidrolizan ésteres en la interfase agua-aceite en un sistema insoluble o heterogéneo (Figura 6) (Uligh, 1989).

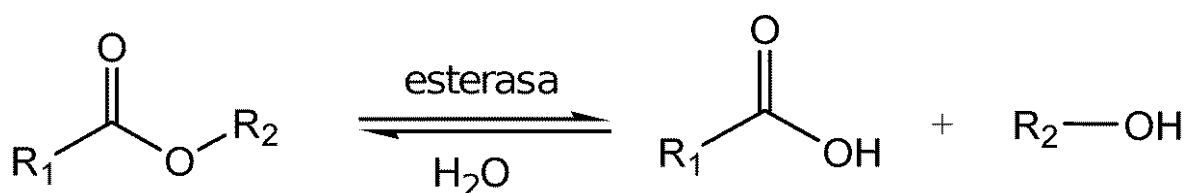


Figura 6: Ecuación general de hidrólisis catalizada por una esterasa.

Teniendo en cuenta que las lipasas pueden ser específicas, también pueden clasificarse en dos grandes grupos de acuerdo a esta característica:

1. Posicional: Cuando se hidrolizan preferentemente ciertas posiciones del TG, normalmente las posiciones 1 y 3 que son las más accesibles.
2. De ácido graso: Cuando se cataliza la hidrólisis de un determinado tipo de ácido graso particular de un TG.

1.3.1. Mecanismo catalítico

Como se dijo más arriba, las lipasas necesitan de un ambiente formado por una fase acuosa y otra lipídica, fenómeno que se conoce como activación interfacial. El mecanismo que utilizan estas enzimas consta de una serie de pasos (Figura 7):

- 1- La serina del sitio activo se activa por desprotonación, para lo cual se necesitan a los otros dos aminoácidos en el centro activo, histidina y aspartato.
- 2- El grupo hidroxilo de la serina lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo del sustrato, formando un intermediario acil-enzima.
- 3- La presencia de una cavidad oxianiónica contribuye a la estabilización de la distribución de cargas y a la reducción del estado basal de energía del intermediario tetraédrico.
- 4- El paso de desacilación está controlado por la electronegatividad de las moléculas que se hayan en la interfase. Un nucleófilo (molécula de H₂O o un monoglicérido por ejemplo) ataca a la enzima acilada dando lugar a la liberación del producto y la regeneración del sitio activo.

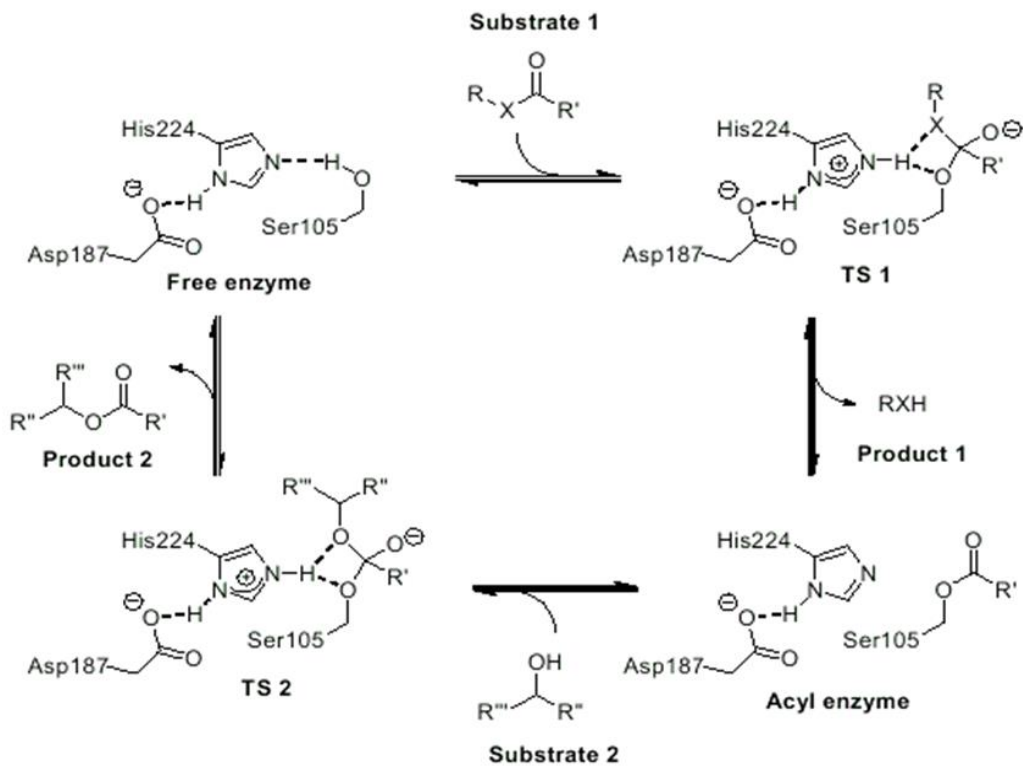


Figura 7: Mecanismo catalítico de una lipasa (Rotticci, 2000).

1.3.2 Aplicaciones de las enzimas lipolíticas

En la industria alimentaria, se utilizan para mejorar procesos químicos tradicionales, siendo mucho más sencillos que los mismos y sin la necesidad de aplicar tratamientos posteriores.

La modificación de grasas y aceites es una de las áreas en la industria del procesamiento de alimentos que más atención demanda. El uso de aceites vegetales con triglicéridos importantes y su posterior modificación fisicoquímica tienen un gran potencial en el mercado, y el uso de lipasas en la industria ha presentado ventajas considerables. Las lipasas se suelen utilizar como biocatalizadores en reacciones de interesterificación, en las que se cambia al azar la composición y estructura de un triglicérido al usarse como co-sustratos ácidos grasos y triglicéridos de distinta composición. Esto permite el cambio del punto de fusión de un aceite, obteniéndose como ventaja la producción de aceites de alto valor comercial (a partir de aquellos con un valor comercial bajo), generar grasas que pueden ser mejor metabolizada por el organismo, impedir la formación de grasas trans, entre otras (Rivera Pérez y García Carreño, 2007).

Por otro lado, se están empleando enzimas lipolíticas en la producción de biodiesel. Este se define como el monoalquil éster de cadena larga de ácidos grasos derivados de una materia prima renovable de lípidos, como aceite vegetal o grasa animal. Se obtiene mediante la transesterificación de dicho material con un alcohol, aunque solamente se ha empleado el uso de metanol o etanol para este propósito (Figura 8). El biodiesel es uno de los sustitutos de los combustibles derivados del petróleo debido a sus beneficios medioambientales y también por la disminución de la cantidad de reservas de petróleo que se están experimentando hoy día. El biodiesel es biodegradable, presenta menores emisiones de CO₂ y de azufre, y casi no posee ningún contaminante de partículas, entre otros beneficios (Matkovic et al., 2016).

El uso de enzimas para la alcoholólisis de aceites de plantas puede llevarse a cabo bajo condiciones muy suaves y a una temperatura de 30-50°C. Para evitar la reacción de hidrólisis, las condiciones en las que se llevan a cabo pueden incluir baja concentración de agua, presencia de solventes apróticos como el THF, o alcoholes estéricamente impedidos (t-BuOH). En lugar de metanol pueden usarse otros alcoholes como (bio) etanol, u otros alcoholes ramificados. Existe evidencia de que el uso de t-BuOH como solvente es beneficioso porque protege y estabiliza la lipasa.

Iniciativas recientes de productores de enzimas indican un alto interés en el desarrollo de estos procesos a escala comercial (Schneider, 2011).

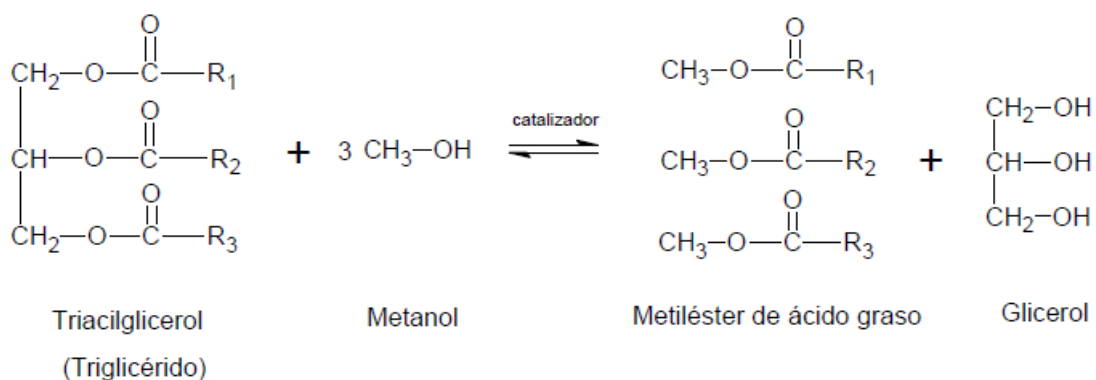


Figura 8: Reacción de transesterificación de un triglicérido para producir biodiesel (Zapata et al., 2006)

Es notable el impacto que han tenido las lipasas en la producción de fármacos más selectivos y efectivos, con efectos secundarios menores, y en la obtención de pesticidas de menor toxicidad, todo ello mediante la síntesis de compuestos ópticamente puros y la resolución de mezclas racémicas (Kirchner et al., 1985; Yoshimura et al., 2002; Zarevúcka y Wimmer, 2008). Las reacciones pueden llevarse a cabo bajo condiciones suaves, a temperatura y presión ambiente, lo que evita las condiciones extremas de reacción que pueden llevar a problemas de isomerización, racemización, epimerización y reacomodación de los compuestos. Un ejemplo de su uso es en la síntesis de ácidos carboxílicos ópticamente activos, en la que participan también lipasas de nitrilo o hidroxinitrilo en diferentes vías enzimáticas. La síntesis de ácidos 2-arylpropanoico (por ejemplo: cetoprofeno, ibuprofeno y naproxeno) se logra por medio de la resolución racémica de sustratos por lipasas de *Candida antarctica* o *Pseudomonas* spp.

1.3.3. Fuentes de lipasas

Las lipasas son ubicuas en la naturaleza y son producidas por vegetales, animales y microorganismos. Las lipasas de origen microbiano (bacterianas y fúngicas) son las enzimas más utilizadas en aplicaciones biotecnológicas y en química orgánica (Gupta et al., 2004).

1.3.4. Lipasas de origen vegetal

Las lipasas obtenidas de plantas son consideradas como una alternativa muy interesante a las microbianas debido a su bajo costo, disponibilidad en fuentes naturales y a que no es necesario producirlas utilizando técnicas de biología molecular (Villeneuve, 2003). Posee la gran ventaja que puede llevar a cabo las reacciones en condiciones suaves (entre 35 y 45 °C y a presión atmosférica) y muestra alta selectividad, dando lugar a productos de alta pureza (Shiomori et al., 1995; Villeneuve, 2003; Freitas et al., 2007; Li y Wu, 2009; Sharma et al., 2009; Mendes et al., 2012).

Estas enzimas han sido aisladas de hojas, tallos, látex, y particularmente de aceites y semillas de plantas oleaginosas y cereales (Muto y Beevers, 1974; Lin et al., 1983; Villeneuve, 2003; Eastmond, 2004; Sagiroglu y Arabaci, 2005; Barros et al., 2010; Gu et al., 2011; Su et al., 2010; You et al., 2011; Avelar et al., 2013).

En la actualidad, las lipasas de plantas son utilizadas sólo a escala laboratorio. Esto se debe a que se encuentran en bajas concentraciones en su fuente nativa y es frecuente la pérdida de actividad en su purificación. Igualmente poseen un enorme potencial a futuro en su uso como catalizadores para aceites y grasas.

1.3.4.1. Lipasas de semillas

Las lipasas vegetales se encuentran principalmente en tejidos de reserva de energía, como por ejemplo en las semillas de oleaginosas y cereales, tales como ricino, maní, soja, lino y avena. La actividad lipasa está ausente en semillas no germinadas (o latentes) y aumenta al comenzar la germinación (Villeneuve, 2003; Barros et al., 2010). Sin embargo, se ha encontrado actividad lipolítica en semillas en estadio de dormancia como el maní (Sanders y Pattee, 1975) y el ricino (Ory et al., 1962; Cavalcanti et al., 2007).

En el caso del ricino, se utilizó polvo de su semilla en estado latente, obteniéndose la actividad más elevada en aceites ricos en ácido linoleico y linolénico (aceite de soja) (Avelar et al., 2012).

1.3.4.2. Lipasas de látex

El látex se origina a partir de estructuras especializadas llamadas laticíferos. Frente a heridas, los laticíferos exudan látex, que sirve para proteger a la planta de los depredadores (Dhouib et al., 2011). El látex es un fluido tixotrópico con un aspecto lechoso, que contiene alrededor del 15%

materia seca, 85% de agua, y una gran variedad de enzimas hidrolíticas, entre otros componentes. Las lipasas están contenidas en la fracción insoluble de látex (Dhouib et al., 2011). Algunas especies de Apocináceas, Asclepiadáceas, Caricáceas, Sapotáceas, Euforbiáceas, Moráceas, Papaveráceas y Asteráceas son productoras de látex, algunos de los cuales poseen lipasas. Una muy estudiada es la de *Carica papaya* (CPL). Ha sido utilizada con éxito por Mangos et al. en la síntesis de triacilgliceroles de cadena corta y larga de bajas calorías para el uso en los preparados para lactantes. Miyazawa et al. ha ampliado el uso de CPL en la producción enantioselectiva de α -aminoácidos no esenciales. Entre otras aplicaciones de esta lipasa, se encuentra su uso para la producción de ésteres butíricos de ácidos grasos para reducir el costo en el proceso enzimático butil-biodiesel.

Otra lipasa obtenida a partir de látex fue la de *Araujia sericifera* (ASL), la cual posee una alta actividad hidrolítica tanto para sustratos sintéticos (*p*-nitrofenilo) como para naturales (aceite de semilla de algodón). En la esterificación de ácidos grasos con diferentes longitudes de cadenas en medios orgánicos mostraron buenos niveles de actividad. También es importante remarcar que posee una alta estabilidad de almacenamiento (Di Santo et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales

- 1) Llevar a cabo una búsqueda bibliográfica sobre catálisis enzimática, en particular del uso de proteasas y lipasas como biocatalizadores en reacciones de condensación de aminoácidos y síntesis de ésteres, así como la inmovilización de dichas enzimas para optimizar su actividad en las reacciones mencionadas.
- 2) Obtener adiestramiento en el manejo de procedimientos básicos de laboratorio:
 - a) preparación de soluciones buffer y otros reactivos de uso común,
 - b) cuantificación de proteínas,
 - c) determinación de la actividad enzimática empleando distintos sustratos,
 - d) preparación de los biocatalizadores,
 - e) desarrollo de distintas técnicas cromatográficas para hacer seguimientos de la cinética de las reacciones.
- 3) Desarrollo de criterios para analizar y discutir resultados experimentales.
- 4) Integrarse adecuadamente a un grupo de trabajo.

2.2. Objetivos específicos

- a) Inmovilización de proteasas de origen vegetal de procedencia comercial y ensayo de su estabilidad operacional (reutilización) en la producción de derivados aminoacídicos.
- b) Obtención de extractos vegetales con actividad proteolítica y lipolítica a partir del látex de especies vegetales de la región.
- c) Búsqueda de actividad lipasa en el látex de distintas especies de la familia Apocynaceae.

- d) Caracterización de actividad lipasa más promisorio hallada en el látex de las especies investigadas en el ítem anterior: determinación de valores de pH y temperatura óptimos para la hidrólisis de triglicéridos.

- e) Aplicación de la lipasa de hallada en la síntesis de ésteres sencillos. Influencia del tipo de solvente, efecto de la temperatura y de la carga del biocatalizador para la síntesis de los mismos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Estudio de reúso de biocatalizadores basados en proteasas

La papaína adsorbida en poliamida ha demostrado ser un muy buen biocatalizador en reacciones de síntesis de péptidos y otros derivados peptídicos en medios predominantemente orgánicos (Clapés et al 1999; Morcelle et al. 2006, 2009, 2013; Fait et al. 2015). Se ha estudiado dicha síntesis en nuestro Centro de Investigación con alta frecuencia y obteniendo resultados muy positivos. No obstante, lo que aún no se había puesto en práctica era la capacidad del reúso de estos biocatalizadores, por lo cual se decidió incursionar en el tema.

3.1.1. Inmovilización de enzimas por adsorción

Se inmovilizó por adsorción la enzima papaína (EC 3.4.22.2, 2.1 unidades/mg de sólido, una unidad hidroliza 1.0 μmol de hidroclorehidrato de éster metílico de N^α -benzoil-L-arginina por minuto a pH 6,2 y a una temperatura de 25°C), que fue adquirida de *Sigma*, utilizando como soporte poliamida (EP-700, tamaño de partícula 800 μm , diámetro del poro 50-300 nm, área superficial específica del método BET 8,4m²/g), que fue una contribución generosa de Azko (Oberburg, Alemania). Las cantidades pesadas fueron 300 mg de la primera y 3 g de soporte. Primeramente, la papaína fue pesada junto a 150 mg de 1,4-ditio-D,L-treitol (DTT, Invitrogen) (Morcelle et al., 2006). Se le agregaron 3 ml de *buffer* bórico-borato pH 8,5 conteniendo EDTA 1 mM y se agitó con vórtex hasta disolución total. Luego se añadió el soporte y se agitó nuevamente con vórtex para embeber el mismo en la solución de la enzima. Se congeló a -80°C durante al menos una hora y se procedió a liofilizar.

3.1.2. Síntesis de aminoácil alquilamidas mediante el uso de biocatalizadores

Para que las peptidasas puedan actuar como biocatalizadores en la formación de enlaces amida debe manipularse el equilibrio de la reacción. En nuestro caso, la manipulación se basa en el control termodinámico. Representa la reacción inversa directa de la proteólisis. Se emplean sustratos dadores de acilo (derivados aminoacídicos) cuya función carboxilato está libre. Esto permite que cualquier proteasa pueda emplearse como biocatalizador independientemente de su mecanismo catalítico. El desplazamiento del equilibrio hacia la reacción espontáneamente

desfavorable se logra a través del empleo de solventes orgánicos. La precipitación o extracción del producto favorece aún más este tipo de reacciones (Bordusa, 2002).

Para la síntesis de aminoácil alquilamidas (Figura 9) se utilizaron como sustratos Z-Ala-OH (derivado aminoacídico), obtenida por Bachem (California, Estados Unidos) en una concentración de 20 mM y dodecilamina (Fluka) 30 mM. El disolvente principal fue acetonitrilo anhidro (conservado en tamices moleculares de 4 Å, J.T. Baker, pureza 99,99%) y se completó con agua en 0,25% v/v.

Se incubó 2 ml de la mezcla de reacción con 200 mg de biocatalizador en viales de polipropileno con cierre hermético a 37°C con agitación magnética constante a 150 RPM, durante 24 horas bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de MeOH. El producto de síntesis se extrajo de la superficie del biocatalizador mediante tres lavados consecutivos con 2 ml de MeOH y agitación vigorosa en vórtex. Las muestras fueron reunidas en viales para su posterior análisis. Los ensayos se realizaron por duplicado.

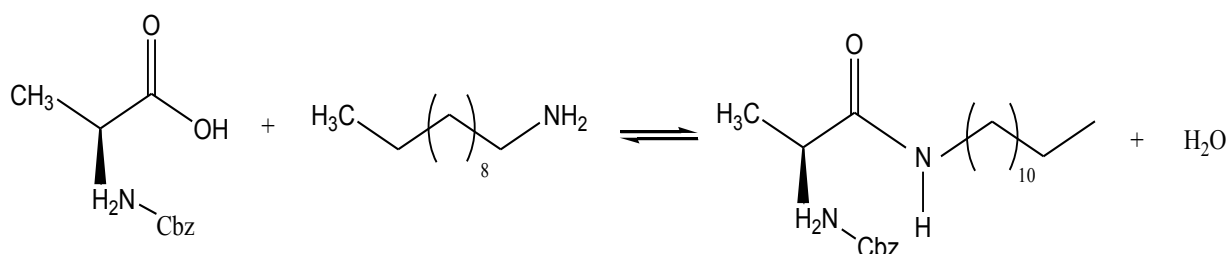


Figura 9: Síntesis de Z-Ala-NHC₁₂.

3.1.3. Ensayos de reutilización

3.1.3.1. Influencia del solvente de lavado

Para estudiar el reúso del biocatalizador se ensayaron dos solventes para su lavado y subsecuente reutilización: 1-propanol y acetonitrilo (Amorim Fernandez y Halling, 2002). Los lavados se realizaron tres veces consecutivas con un volumen de 2 ml con cada solvente, el que fue extraído con pipeta Pasteur en cada caso. La masa de biocatalizador resultante se depositó en papel de filtro y el solvente residual fue eliminado en bomba de vacío. Antes de iniciar cada reacción, se pesó la masa de biocatalizador para luego poder calcular el rendimiento obtenido.

3.1.3.2. Efecto de activadores

En una segunda instancia, luego del primer uso y del lavado del biocatalizador (según se indicó en el punto anterior) se añadió cisteína en una relación del 50% al peso de la papaína presente en el mismo (Theppakorn et al., 2003). Las condiciones de reacción fueron las mismas que las utilizadas en el primer uso.

3.1.4. Análisis de los resultados

El análisis de los resultados se realizó mediante HPLC, para lo cual las muestras fueron filtradas en membrana de nylon 0,22 μm . La columna empleada fue Lichrosorb 100 propilciano (tamaño de partícula: 5 μm , 250 \times 4 mm, Hibar). Se utilizó como fase móvil MeOH/H₂O 60:40, una presión de la bomba de aproximadamente 12 MPa y un caudal de 0,500 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 μl . La determinación cuali/cuantitativa de los reactivos y los productos se realizó según el método del estándar externo, que consiste en la inyección de soluciones de concentración conocida de los mismos (1 mg/ml en MeOH de Z-Ala-OH y de Z-Ala-NHC₁₂).

Es importante destacar que las muestras en las que se añadió cisteína se observó turbidez, por lo cual fueron centrifugadas durante 5 minutos a velocidad máxima. Luego se tomó el sobrenadante para realizar el filtrado previo al análisis.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LIPASAS DE LÁTEX DE PLANTAS APOCINÁCEAS

3.2.1. Material vegetal estudiado. Descripción botánica.

El látex fue obtenido de frutos inmaduros de las tres especies diferentes de plantas de la familia Apocynaceae. Esta familia posee plantas con flores, incluyendo árboles, arbustos y hierbas. Son originarias de Europa, Asia, África, Australia y zonas tropicales o subtropicales de América. Se pueden encontrar en zonas tropicales y templadas (Endress y Bruyns, 2000).

3.2.1.1. *Calotropis procera*. Arbusto o árbol pequeño (ca. 3 m de altura) muy ramificado, nativo de India (Figura 10). Todas las partes de la planta poseen látex de apariencia lechosa. Tallo erguido, leñoso en la parte inferior y herbáceo en la parte superior, mayormente pubescente. Hojas simples, subsésiles, opuestas y decusadas, enteras, estipuladas, oblongas, elípticas u ovaladas, enteras, cordadas, agudas, subglabras, 5-12 cm de largo y 1,5- 9 cm de ancho. Inflorescencia axilar en umbelas cimosas. Las flores son pediceladas, completas, regulares,

bisexuales, hipóginas, pentámeras, de 2 a 3 cm de diámetro. 5 sépalos profundamente divididos y levemente connados en la base, de aproximadamente 5 mm de largo. 5 pétalos gamopétalos, glabros, rosados o blanquecinos, con manchas púrpuras en el interior, plateados pálido por fuera, lóbulos erectos y agudos, 1-1,2 cm de largo. La corona consiste en escamas (6 mm de largo) carnosas comprimidas lateralmente que irradian de la columna estaminal. 5 estambres epipétalos, filamentos connados en un tubo carnososo alrededor del ovario. 2 carpelos apocarpos; ovario súpero, unilocular; pluriiovulado; placentación marginal; 2 estilos libres. Folículos 6-9 cm de largo, 3,5 cm de ancho. Numerosas semillas, ovoides, aplanadas tomentosas, con un penacho blanco de pelos sedosos (Bhatti et al., 1998).



Figura 10: Representación de *C. procera*. Arriba a la izquierda: flor y fruto cerrado. Arriba a la derecha: fruto abierto. Abajo: planta en forma de arbusto.

3.2.1.2. *Himatanthus drasticus* es una especie arbórea encontrada en la sabana brasileña que tiene una altura media inferior a 7 metros y un follaje denso en los extremos terminales de las ramas. Las hojas son obovadas, brillantes y glabras, y la planta tiene inflorescencias terminales con crecimiento. Las flores polinizadas por insectos son pequeñas, blancas y fragantes, y se disponen en una inflorescencia de tiroides, típica de la familia Apocynaceae (Liede y Weberling

1995). Los frutos son folículos en forma de cuerno que miden 15-20 cm de largo y 2,5 cm de ancho que contienen muchas semillas aladas concéntricas dispersadas por el viento. La corteza es áspera y exuda un látex blanco cuando se remueve (Plumel 1991; Lorenzi y de Abreu Matos 2002). Los aspectos morfológicos de las semillas y de la planta se muestran en la Figura 11.

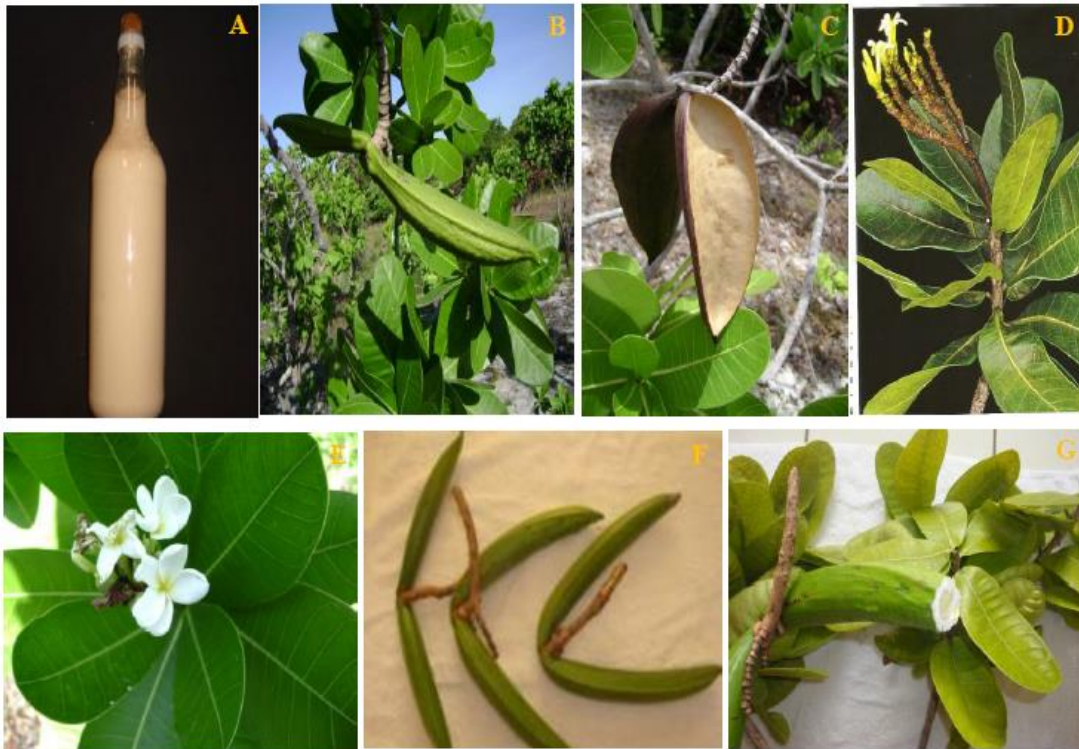


Figura 11: Representación de *Himatanthus drasticus*. A: Embalaje comercial de látex; B: *H. drasticus* en la etapa de arbustos; C: Fruto seco; D: Cumbre con inflorescencias jóvenes; E: inflorescencia; F: El fruto es un folículo; G: Resalta la presencia de látex en el fruto.

3.2.1.3. *Cryptostegia grandiflora* es una enredadera leñosa nativa en el sudoeste de Madagascar, de naturaleza tóxica, que ha sido introducida en la mayoría de otras regiones tropicales y subtropicales debido a sus atractivas flores (Figura 12). Puede crecer como un subarbusto en ambientes abiertos, con un látex blanco lechoso. Tallos con numerosas y pequeñas lenticelas; delgados y entrelazados entre sí, o apoyándose sobre otras plantas. Las enredaderas adultas pueden subir 20-30 m en el dosel superior, con tallos gruesos y corteza

escamosa y grisácea. Raíces robustas, de color marrón rojizo, que pueden penetrar hasta 12 m. Hojas brillantes, verde oscuras, glabras, verde pálido por debajo, en pares bien separados, hasta 10 cm de largo, 2-3 cm de ancho; punta aguda estrechándose abruptamente en la base en un tallo corto con una vena prominente rojo-púrpura. Inflorescencia cimosa de 1-2 fascículos. Flores grandes y vistosas, blancas internamente, rosáceas-blancas a lilas externamente; corola en forma de embudo o trompeta, 5-6 cm de largo, 5-8 cm de diámetro, con 5 puntas, lóbulos ampliamente extendidos. Columna estaminal de 2-3 mm de largo, 3-4 mm de ancho. Estilo con cabeza cónica, 3.5 x 2.5 mm. Ovarios 4 x 2 mm. Frutos (folículos), vainas verdes, 10-15 x 3-4 cm, producidos en pares horizontalmente opuestos y divergentes de la punta de un tallo común corto. Cada vaina contiene 200-350 semillas (5-10 x 1.5-3 mm). Las mismas son ovales, marrones con un mechón (coma) a lo largo (19-38 mm), fino, compuesto por pelos blancos sedosos en un extremo (Morohasy y Forster, 1991).



Figura 12: Representación de *C. grandiflora*. Arriba a la derecha: Fruto en forma de folículos. Arriba a la izquierda: flores. Abajo: Planta en forma de subarbusto.

3.2.2. Obtención de las lipasas

La recolección de frutos para la obtención del látex la realizó un grupo de investigadores pertenecientes al Laboratório de Toxinas Vegetais, Depto. de Bioquímica e Biología Molecular, Universidad de Federal do Ceará (Fortaleza, estado de Ceará, Brasil) para los casos de las plantas de *C. grandifloray C. procera*. El látex se obtuvo por remoción del pecíolo, y cada gota del mismo fue reunida en una solución de Na₂SO₃ y EDTA 5 mM en baño de hielo. El homogenato fue fraccionado y conservado a -20°C.

En el caso de *H. drasticus*, el látex fue obtenido por medio de cosechadores de la ciudad de Fortaleza, que recolectan dicho látex en botellas de vidrio. Vale aclarar que es utilizado en medicina popular de la región, por lo cual tiene importancia en la medicina popular del nordeste brasileño.

Para su posterior estudio, al homogenato se le realizó una centrifugación a 9000 RPM, a una temperatura de 4°C, durante 45 minutos. Luego se separó el sobrenadante del precipitado, y ambas fracciones fueron liofilizadas.

Mediante los métodos de Bradford (Bradford, 1976) y microKjeldhal se obtuvieron los valores de la cantidad de proteínas totales y solubles, respectivamente, en el látex de cada especie estudiada (Tabla 2).

Tabla 2: Cantidad de proteínas presentes en el látex de cada especie estudiada.

PLANTA	PROTEÍNAS TOTALES (mg/ml)	PROTEÍNAS SOLUBLES (mg/ml)
<i>C. procera</i>	13,88 ± 3,12	8,85 ± 1,87
<i>C. grandiflora</i>	3,6 ± 0,2	0,26 ± 0,03
<i>H. drasticus</i>	32,37 ± 1,44	0,133 ± 0,016

3.2.3. Medidas de actividad lipolítica

3.2.3.1. Hidrólisis de ésteres de *p*-nitrofenilo

Se estudió la reacción de hidrólisis de laurato de *p*-nitrofenilo (Sigma) utilizando el protocolo descrito por Rashid et. al. (2001). Este método está basado en la liberación de *p*-nitrofenol y su medición espectrofotométrica a 410 nm.

La mezcla de reacción del ensayo se describe a continuación:

- Solución *stock* de sustrato: 300 μ l.
- *Buffer* Tris HCl 0,05M pH:8,0; 0,0075% (v/v) Tritón X-100: 5640 μ l.
- CaCl₂ 0,5M: 60 μ l.
- Fracción liofilizada (soluble/insoluble): 10mg para el caso de *H. drasticus* y *C. grandiflora*, y 3,5 mg para *C. procera*.

La solución *stock* de sustrato tiene una concentración de 2 mM de laurato de *p*-nitrofenilo (PM: 321,41 mg/mol) para lo cual se pesaron 3,8 mg. El volumen final de dicha solución fue de 6 ml, que se compuesta por 1,2 ml de acetonitrilo y 4,8 ml de isopropanol.

En la reacción de hidrólisis enzimática se utilizó una camisa calefaccionante a una temperatura de 40°C y se realizó mediante agitación magnética. Para la medición de su absorbancia en el espectrofotómetro a 415 nm, se tomaron muestras de 1 ml luego de 5 minutos para *C. procera* y 10 minutos para *H. drasticus* y *C. grandiflora*.

En el caso de *C. grandiflora*, se realizó un ensayo blanco de hidrólisis en ausencia de enzima por una parte, y también en ausencia de sustrato, al detectarse una coloración no habitual luego del tiempo de reacción.

Se midió espectrofotométricamente la liberación de *p*-nitrofenol a 415nm. El orden de agregado de reactivos en el vial fue: *buffer* de reacción, solución de CaCl₂ y solución *stock* de sustrato, mezclando todo por inversión.

Para expresar los resultados en unidades internacionales (UI, siendo 1 UI la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenol por min en las condiciones del ensayo), los resultados se basaron en una recta de calibración con *p*-nitrofenol (Anedra) en la que se utilizó el *buffer* de reacción descrito previamente.

3.2.3.2. Hidrólisis de triacilglicéridos

Se determinó la actividad lipolítica de látex obtenido de *C. procera*, *H. drasticus* y *C. grandiflora* mediante una adaptación del método de Kwon y Rhee (1986), utilizando isooctano como solvente orgánico.

Los ácidos grasos liberados por la acción de las lipasas forman un complejo con los Cu^{2+} del reactivo. Esto se detecta mediante la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 715 nm. El sustrato utilizado fue aceite de algodón (Sigma).

La reacción de hidrólisis se realizó a una temperatura de 40°C, previa termostatación de los reactivos. Las fracciones de látex fueron pesadas en viales de vidrio (aproximadamente 10mg en cada caso), añadiéndose los reactivos en el siguiente orden:

- *Buffer* Tris-HCl 0,1M pH=8,5 conteniendo 1% v/v Tritón X-100 y EDTA 5 mM (*buffer* de reacción); 1 ml
- CaCl_2 0,15 M, 0,4 ml
- Isooctano, 9,5 ml
- Aceite de algodón, 0,5 ml

La reacción se llevó a cabo utilizando una camisa calefaccionante y con agitación magnética a 300 RPM, durante 2 minutos. Se detuvo agregando HCl 6N (1 ml) durante un tiempo de 1 minuto.

Mediante decantación se separaron las fases, tomándose la fase orgánica (fase superior). Se le añadió una solución de CuAc_2 (5% p/v), la cual mediante el uso de piridina se lleva a pH 6,1 utilizando pHmetro. Se mezcló por agitación vigorosa en vórtex durante 90 segundos y se midió la absorbancia a 715 nm en espectrofotómetro.

Se definió una unidad enzimática (UE) como la cantidad de enzima que produce un incremento de una unidad de absorbancia por minuto (Abs/min). A su vez la unidad enzimática específica (UEE) se definió como UE por mg de sólido liofilizado (Abs/mg×min).

3.2.4. Caracterización de la actividad lipolítica

3.2.4.1. Determinación del pH óptimo

El pH óptimo se determinó empleando una solución de las sales de sodio de los siguientes *buffers* de Good: MES, CAPS, TAPS, AMPSO y MOPS (Good e Izawa, 1972). La sal sódica de CAPS se

disolvió primeramente en una solución de NaOH 0,1 M. Luego se reunieron todas las sales agregando Tritón X-100 1%(v/v) y EDTA 5 mM, y se llevó a volumen final con agua destilada siendo la concentración final de cada sal de 50 mM. Los pH finales de los *buffers* se ajustaron con HCl o con NaOH.

Las medidas se realizaron según el protocolo descrito en el ítem 3.2.3.2, sustituyendo el *buffer* de reacción por el correspondiente *buffer* de Good. Los valores de pH a los que se evaluó la actividad fueron 4,0; 6,0; 7,0; 8,0; 8,5; 9,5; 10,0; 11,0 y 12,0.

3.2.4.2. Determinación de la temperatura óptima

Se realizó el protocolo descrito en la sección 3.2.3.2, con la única diferencia que se cambiaron las temperaturas a la que fue sometida la reacción enzimática. Estas temperaturas fueron 19,5°C (temperatura ambiente del día del ensayo), 30,0°C, 35,0°C, 40,0°C, 45,0°C, 50,0°C y 55,0°C.

3.2.5. Medidas de actividad en esterificación

3.2.5.1. Determinación de la preferencia de solvente

En la reacción de esterificación se empleó como sustrato ácido dodecanoico (láurico) y n-butanol (Figura 13). Se realizó en base al protocolo descrito por Vacek et. al. (2000). Los medios de reacción utilizados fueron n-hexano, n-heptano e iso-octano. Como sustrato se usó una solución de *stock*, la cual contaba con una concentración en ácido orgánico de 20 mM y de alcohol de 40 mM en el solvente de reacción.

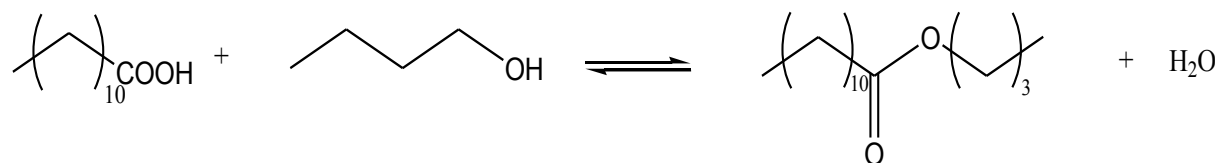


Figura 13: Reacción de esterificación utilizando como sustratos ácido dodecanoico y n-butanol.

Se pesaron 20 mg de la fracción insoluble del látex de *C. procerca*, a la cual se le agregó 10 ml de solución stock y se incubó en estufa a 40°C con agitación magnética (300 RPM) durante 1 hora en viales cerrados de manera hermética. Para detener la reacción se utilizó etanol absoluto, agregando 10 ml del mismo. Los ácidos grasos remanentes, que no formaron parte de la reacción

de esterificación, se titularon con una solución etanólica de KOH 0,01 N valorada con anterioridad con biftalato de potasio, utilizando como indicador fenolftaleína. Se debe aclarar que se realizó la titulación de un blanco constituido por la solución *stock* sin agregado de enzima bajo las mismas condiciones de la reacción. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los cálculos realizados fueron:

- Índice de acidez (IA)

$$IA = \frac{N_{KOH} \times V_{KOH} \times P_{\text{equivalente KOH}}}{M_a}$$

Siendo N_{KOH} : normalidad de la solución alcohólica de KOH; V_{KOH} : volumen de la solución de KOH gastado; $P_{\text{equivalente KOH}}$: 56 g, y M_a : masa del ácido en la mezcla.

- Conversión (X%)

$$X\% = \frac{IA_{t=0} - IA_{t=t}}{IA_{t=0}} \times 100$$

Siendo $IA_{t=0}$: índice de acidez del blanco; $IA_{t=t}$: índice de acidez de los AG remanentes una vez finalizada la reacción de esterificación catalizada por la lipasa de *C. procera*.

Se definió la actividad enzimática (AE) como los milimoles de ácido esterificados:

$$AE = \frac{\text{milimoles } AG_{t=0} \times X\%}{100}$$

A su vez, se definió la actividad enzimática específica (AEE) como la actividad enzimática (AE) por mg de látex utilizado.

Es importante remarcar que para la valoración del KOH alcohólico, el biftalato de potasio ($C_8H_5KO_4$) se secó a 110°C en estufa durante una hora. Se disolvieron 15 mg del mismo en 20 ml de agua destilada previamente hervida durante 30 minutos. La preparación de la solución de titulación se realizó mediante una dilución 1 en 100 de una solución madre de KOH 1 N en etanol absoluto (Laboratorios Oliver). El título de la solución 0,01 N de KOH alcohólico se obtuvo empleando fenolftaleína alcohólica 1% (p/v). El ensayo se realizó por quintuplicado.

3.2.5.2. Determinación de la temperatura óptima de esterificación

Se realizó el ensayo de esterificación a distintas temperaturas [26° (temperatura ambiente), 35°, 40°, 45°, 50°, 55° y 60° C] durante una hora empleando la misma metodología descrita en el ítem anterior.

3.2.5.3. Determinación de la carga enzimática óptima de esterificación

Se estudió la reacción óptima de esterificación a diferentes cargas enzimáticas (5, 10, 20, 30 y 50 mg de la preparación enzimática) durante un tiempo de una hora utilizando la misma metodología descrita en el ítem 3.2.5.1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estabilidad operacional de biocatalizadores basados en peptidasas. Estudio del reúso del biocatalizador obtenido

4.1.1. Elección del tipo de inmovilización

Para este trabajo se eligió el método de inmovilización por adsorción ya que es el más recomendado para la biocatálisis en medios orgánicos (Adlercreutz, 2006). Por otro lado, es importante destacar que es un método más económico que la inmovilización covalente, se logra con mayor rapidez y no modifica drásticamente la estructura de la enzima que utilizamos.

4.1.2. Mediciones de la actividad en el reúso del biocatalizador

Para calcular la pérdida de masa y la actividad por miligramo de biocatalizador se realizaron pesadas previas a la reacción y una vez finalizada la misma (Tabla 3).

Tabla 3: Masas de biocatalizador pesadas antes de iniciada y una vez finalizada las reacciones. Se estudió el lavado con ACN (A), con 1-propanol (B), con ACN y posterior agregado de cisteína (C) y con 1-propanol y añadiendo luego cisteína.

LAVADO	MASA DE BIOCATALIZADOR ANTES DE LA REACCIÓN (mg)	MASA DE BIOCATALIZADOR DESPUÉS DE LA REACCIÓN (mg)	% DE PERDIDA DE MASA DE BIOCATALIZADOR
A	199,5	185,9	6,82 %
B	199,7	165,5	20,66 %
C	201,1	187,5	6,76 %
D	201,9	192,3	4,75 %

4.1.2.1. Análisis de los cromatogramas obtenidos

Para el estudio de los cromatogramas se realizaron los patrones de Z-Ala-OH y de Z-Ala-NHC₁₂, con una concentración de 1 mg/ml cada una. El tiempo de retención para el sustrato fue de 2,329 minutos (Figura 14), y en el caso del producto de 6,143 minutos (Figura 15).

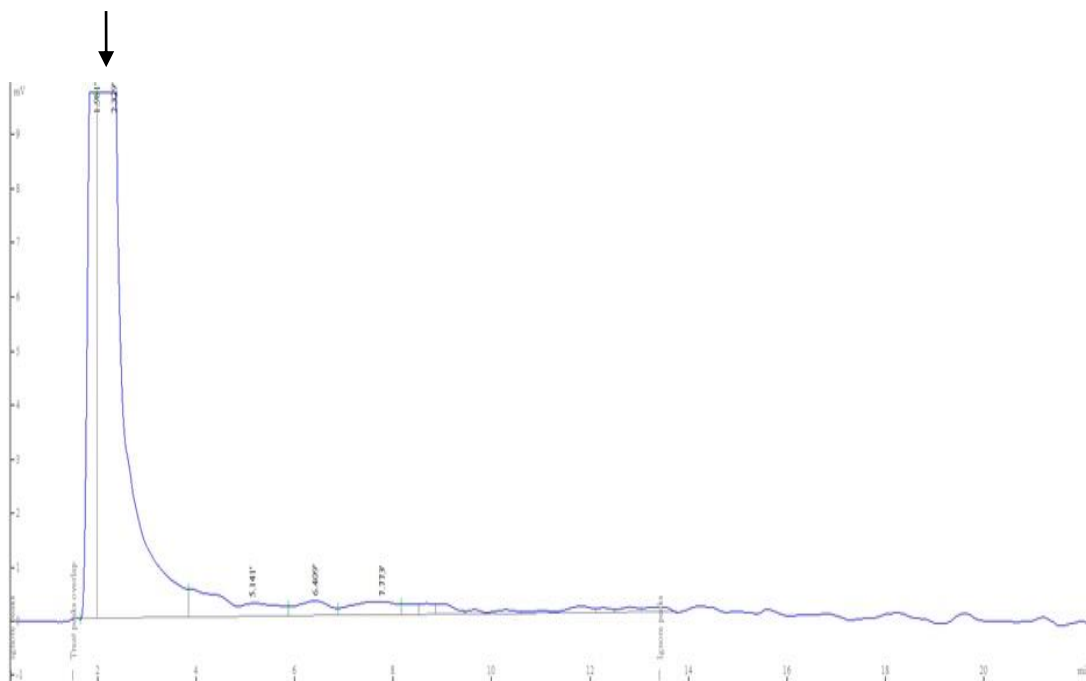


Figura 14: Cromatograma de la solución patrón de Z-Ala-OH.

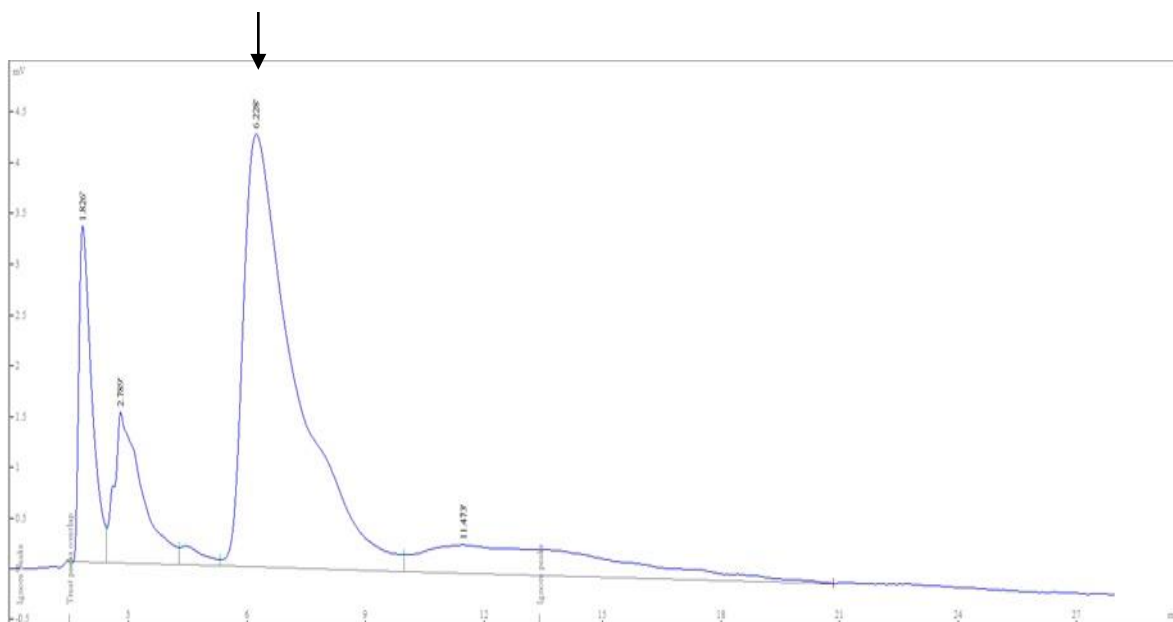


Figura 15: Cromatograma de la solución patrón de Z-Ala-NHC₁₂.

Se analizaron los cromatogramas luego de la primera y segunda reacción, para observar de forma cuali/cuantitativa la actividad en el reuso en comparación con la reacción inicial.

En la figura 16 se muestra el cromatograma de la mezcla de reacción luego de transcurridas 24 hs correspondiente al primer uso del biocatalizador. En la figura 17 se muestra el cromatograma correspondiente al primer reuso de dicho biocatalizador luego de ser lavado con ACN. Se puede apreciar que se produjo poco Z-Ala-NHC₁₂ (aproximadamente un 15% del producto obtenido luego del primer uso). Asimismo, para el caso del reuso luego del lavado con 1-propanol, se observó la misma tendencia (Figura 18).

Dado que no se obtuvieron los resultados esperados, se procedió al agregado de cisteína luego de los lavados. Como se muestra en las figuras 21 y 22, después del reuso (lavado con ACN y 1-propanol respectivamente, y posterior agregado de cisteína), no se logró un aumento en la aparición de producto respecto a los lavados sin el agregado de cisteína, ya que los porcentajes de recuperación de actividad fueron similares (entre un 15 y un 20% de Z-Ala-NHC₁₂ respecto del primer uso para ambos tratamientos).

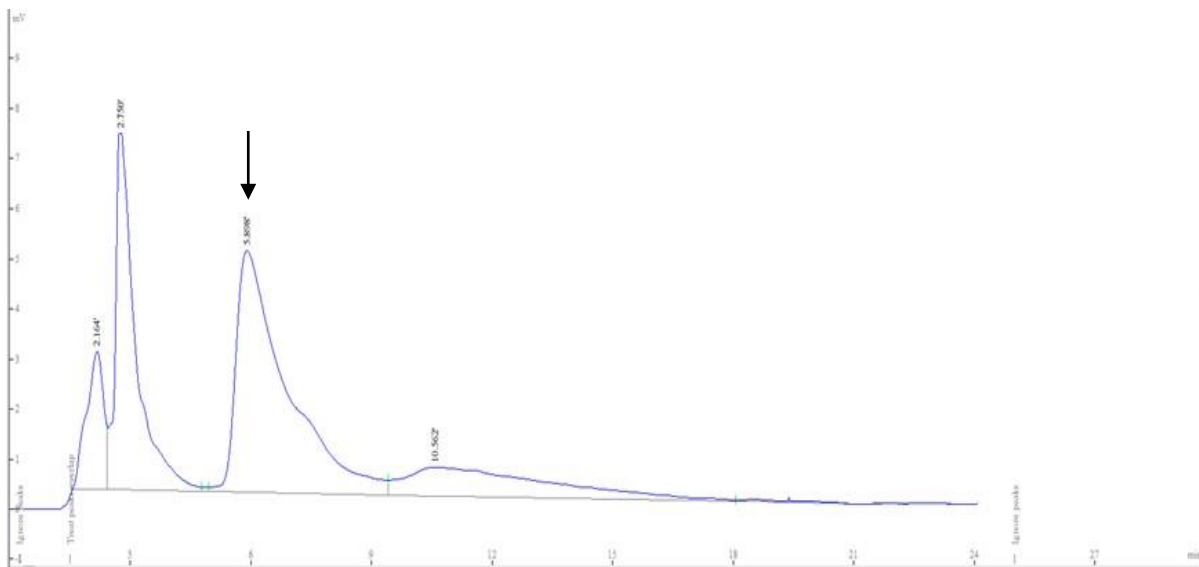


Figura 16: Cromatograma obtenido luego de la primera reacción, anterior al reúso.

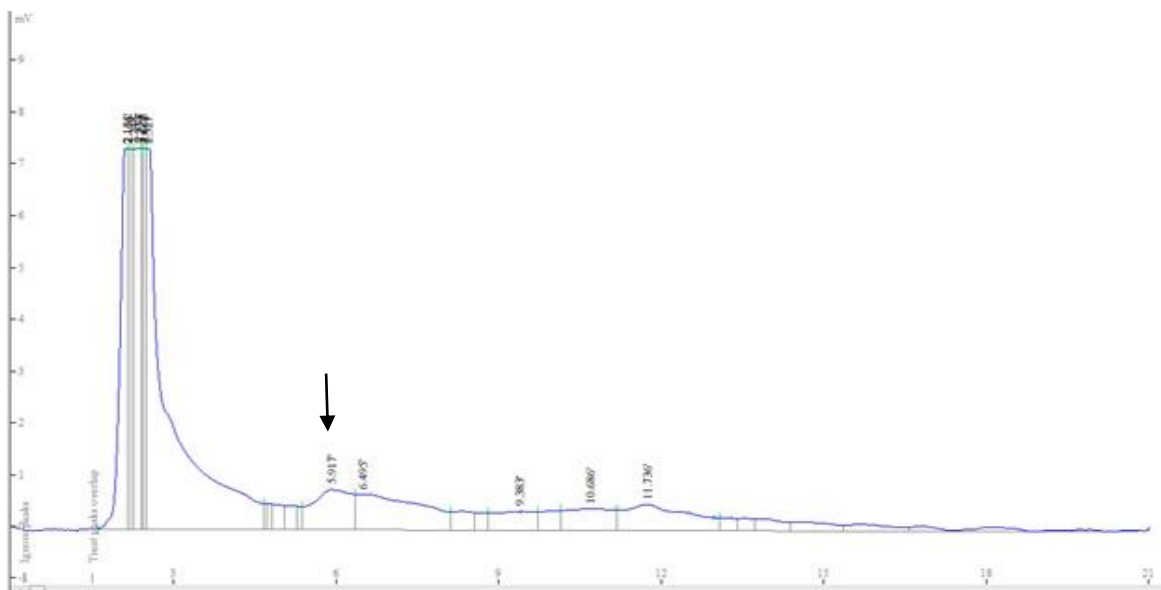


Figura 17: Cromatograma del final de la reacción correspondiente al primer reúso (biocatalizador lavado con ACN).

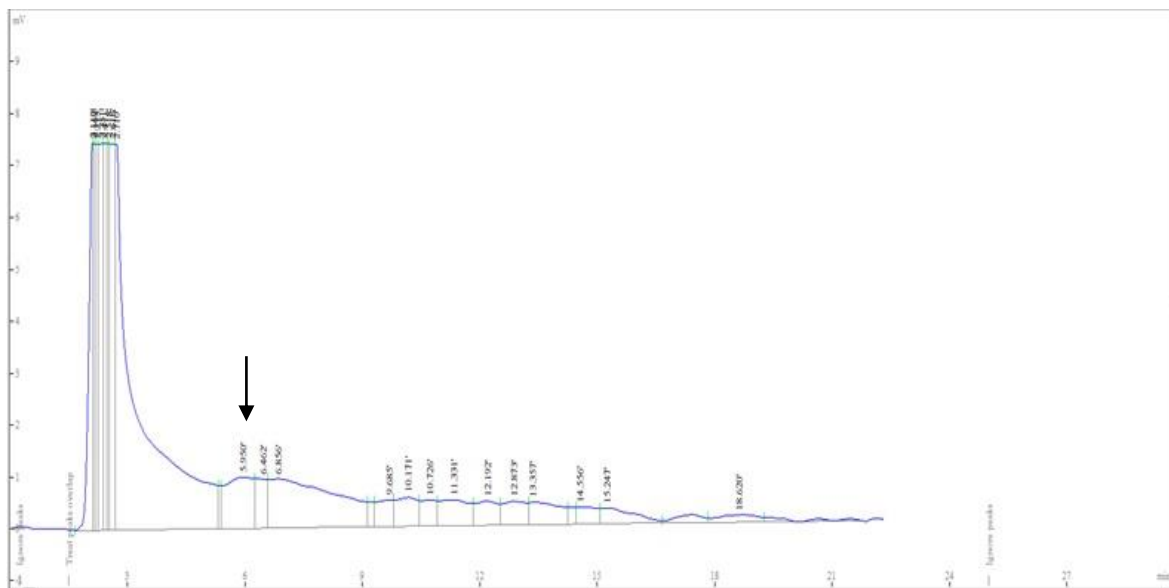


Figura 18: Cromatograma del final de la reacción correspondiente al primer reúso (biocatalizador lavado con 1-propanol).

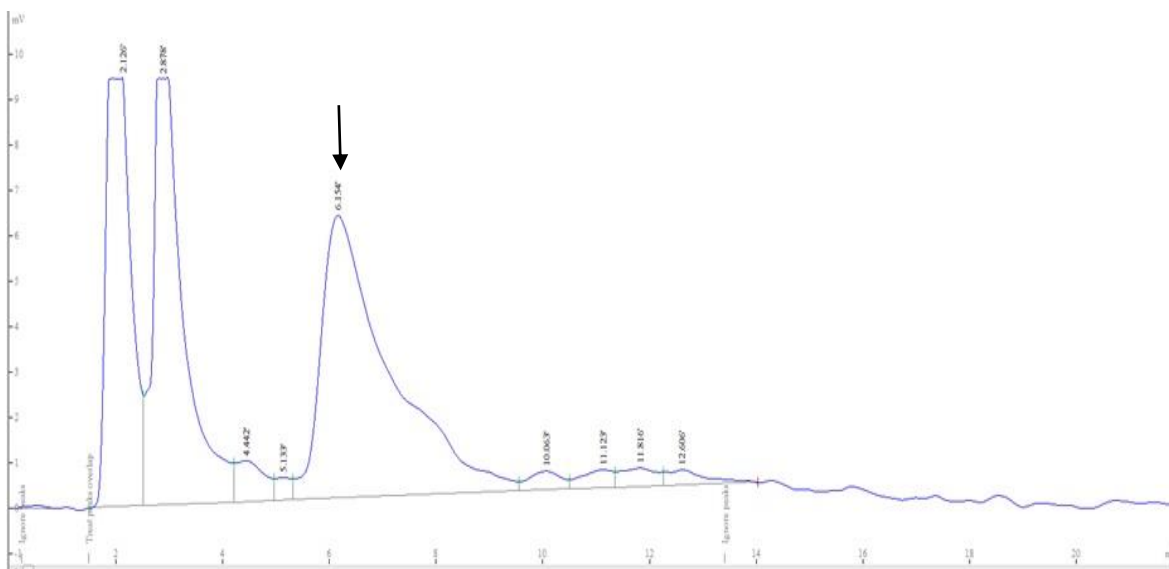


Figura 19: Cromatograma correspondiente al final de la primera reacción (previo al lavado con ACN y al agregado de cisteína).

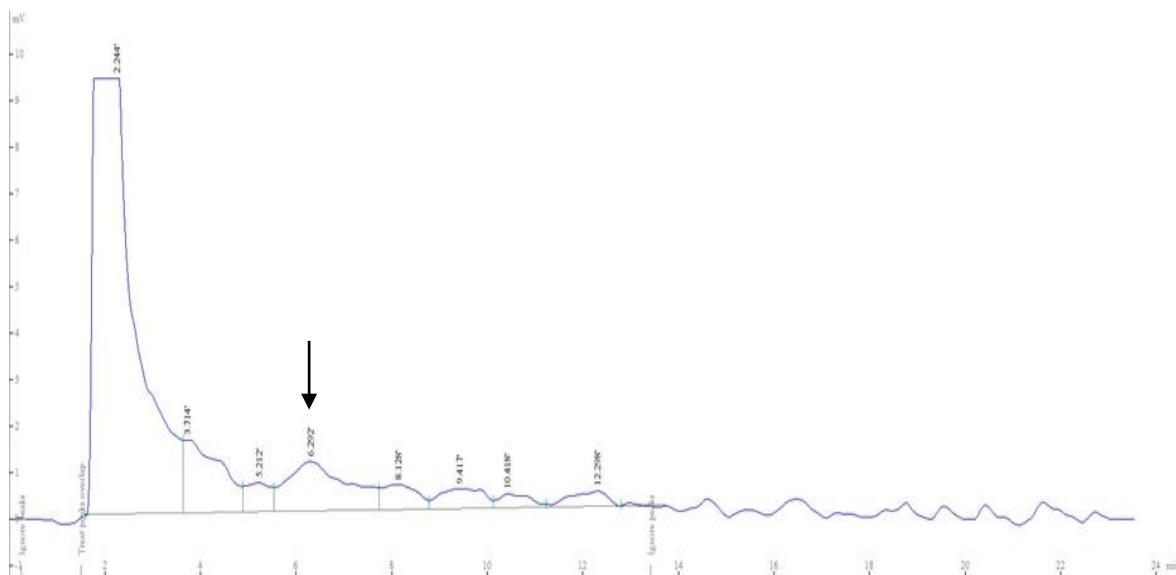


Figura 20: Cromatograma del final de la reacción correspondiente al primer reuso (posterior al lavado con ACN y agregado de cisteína).

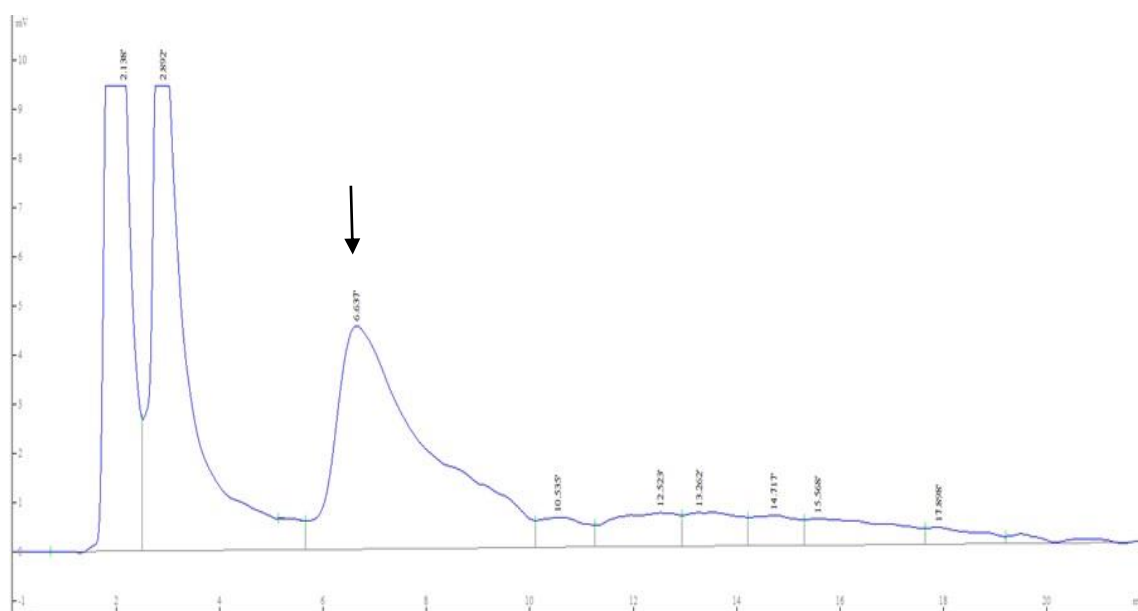


Figura 21: Cromatograma correspondiente al final de la primera reacción (previo al lavado con 1-propanol y al agregado de cisteína).

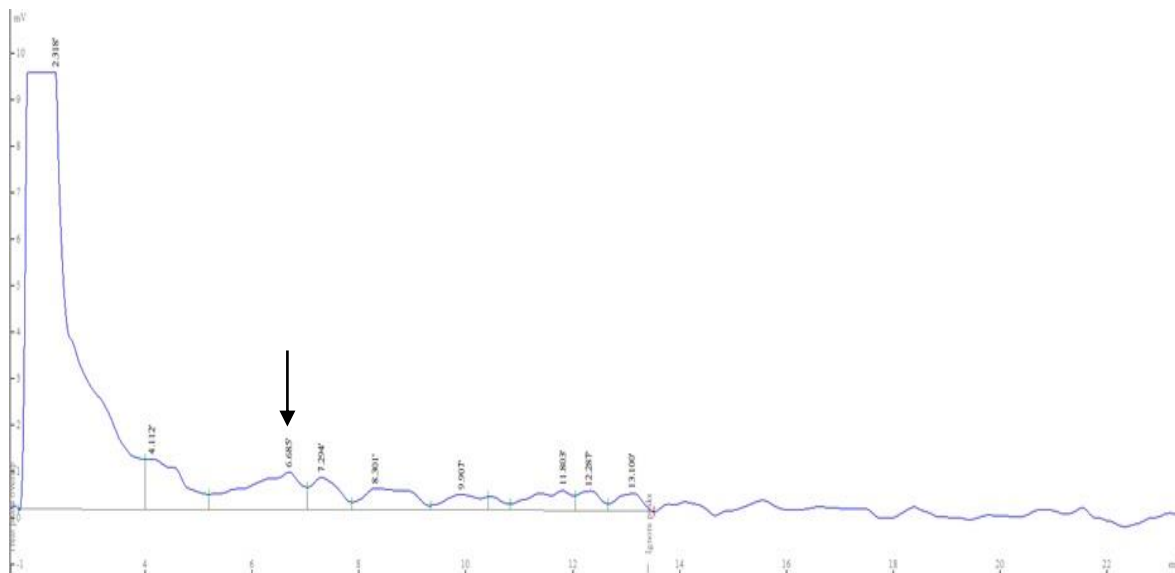


Figura 22: Cromatograma posterior al reúso (Biocatalizador lavado con 1-propanol y agregado de cisteína).

Se puede concluir que los métodos utilizados para mantener la actividad del biocatalizador en sus reúsos no permitieron la óptima recuperación de la actividad, siendo escasa o nula en el primer reúso. Se decidió hacer el lavado del biocatalizador con 1-propanol debido a que en trabajos previos se demostró que dicho solvente puede reemplazar al paso de deshidratación por liofilización (Amorim Fernandez et al., 2002; Theppakorn et al., 2003), por lo cual se consideró como un buen método para acondicionar el biocatalizador previo al reúso. Si bien en estos trabajos no se investigó la reutilización de biocatalizadores, se pudo ver que la actividad, en casos como la subtilisina Carlsberg y la α -quimotripsina, fue mil veces superior luego de la deshidratación con 1-propanol en relación al liofilizado. A su vez, la papaína puede inactivarse de manera reversible o irreversible por la oxidación del grupo tiol de la cisteína presente en su sitio activo, por lo cual se utilizan agentes reductores suaves para lograr mantener estos sitios reducidos, requisito indispensable para la catálisis. En la primera reacción, el biocatalizador original incluye en su formulación DTT como agente reductor; dicho agente reductor podría oxidarse en el transcurso de su primer uso (a pesar de realizar la reacción bajo atmósfera de nitrógeno). Por tal motivo, y antes de comenzar el reúso se agregó cisteína, que también tiene capacidad reductora. Sin embargo, este tratamiento no dio los resultados esperados (ver figuras 20 y 22).

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LIPASAS DE LÁTEX DE PLANTAS APOCINÁCEAS

4.2.1. Determinación de actividad lipolítica en *C. procera*, *C. grandiflora* y *H. drasticus*

Teniendo en cuenta el bajo costo, la buena disponibilidad y el potencial que presentan, se realizó el estudio de la presencia de actividad lipolítica en el látex de las especies *Calotropis procera*, *Cryptostegia grandiflora* e *Himatanthus drasticus*.

Se ensayó la actividad lipolítica de forma cuantitativa en estas tres especies de la familia Apocynaceae, utilizando tanto la fracción insoluble (gomas) y la soluble del látex de las mismas, siguiendo los métodos descritos por Rashid et. al (2001) y por Kwon y Rhee (1986).

4.2.1.1. Determinación de la medida de actividad hidrolítica sobre ésteres de *p*-nitrofenilo

Mediante este protocolo se midió la actividad catalítica de la parte insoluble del látex de las tres especies de plantas, utilizando como sustrato laurato de *p*-nitrofenilo (Rashid et al., 2001).

Para *C. procera* se estudió la actividad hidrolítica durante un tiempo de reacción de 5 minutos y con una carga de biocatalizador de 3,5 mg. En el caso de *H. drasticus* y *C. grandiflora*, el tiempo empleado fue de 10 minutos con una carga de biocatalizador de 10 mg.

Los resultados se expresaron en unidades internacionales (UI) utilizando la siguiente recta de calibración:

$$y = 0,0168 x + 0,0186 \quad R^2 = 0,9991$$

siendo *y*: unidades de absorbancia de distintas diluciones de una solución stock de *p*-nitrofenol y *x*: concentración micromolar de las respectivas diluciones.

A continuación se describen las actividades hidrolíticas medidas para cada caso (Tabla 4).

Tabla 4: Actividad hidrolítica sobre ésteres de *p*-nitrofenilo.

ESPECIE	UI/mg
<i>C. procera</i>	0,00927 +/- 0,00061
<i>H. drasticus</i>	0,000269 +/- 0,000055
<i>C. grandiflora</i>	---

Al ensayar la actividad de *C. grandiflora* se encontró un inconveniente. Al contactar la fracción insoluble del látex de esta especie con el solvente utilizado, se observó la aparición de un color amarillento en el medio de reacción. Esto llevó a la necesidad de realizar tres ensayos en distintas condiciones. Además de hacer el ensayo con el extracto enzimático, buffer y sustrato (muestra 1), también se hizo sin el sustrato (muestra 2) y sin el extracto enzimático (muestra 3). Dado que la absorbancia obtenida luego del ensayo de hidrólisis del *p*-nitrofenol fue similar para las muestras 1 y 2, pudo concluirse que en este caso el componente que da color al látex de *C. grandiflora* interfería con el método utilizado (medida de absorbancia producida por el *p*-nitrofenol, producto de la hidrólisis del sustrato: dicho producto también es amarillo), con lo cual se concluyó que para esta muestra era preciso realizar otro método de determinación de actividad hidrolítica.

4.2.1.2. Determinación de la actividad lipolítica sobre triacilglicéridos

Los estudios se realizaron en las tres especies de plantas. Se realizaron los ensayos tanto en la parte insoluble como la parte soluble del látex, usando el protocolo descrito en el punto 3.2.3.2. Para el caso de *C. procera* y *C. grandiflora*, el tiempo de reacción fue de 2 minutos, en cambio para *H. drasticus* de 5 minutos. Para los tres casos se utilizó una carga enzimática de 10 mg. Los datos de las actividades lipolíticas obtenidas de la fracción insoluble del látex de las distintas especies se reflejan en la siguiente tabla (Tabla 5).

Tabla 5: Actividad lipolítica sobre triacilglicéridos.

ESPECIE	UEE (AU/mg.min)
<i>C. procera</i>	0,00782 +/- 0,00102
<i>H. drasticus</i>	0,00321 +/- 0,00058
<i>C. grandiflora</i>	0

Es importante destacar que la especie que presentó mayor actividad fue *C. procera*, y en el caso de *C. grandiflora* se puede decir que la actividad es nula.

Refiriéndonos a la parte soluble, nos encontramos con que la actividad lipolítica de las tres especies es mucho menor (nula para *C. grandiflora*). Esto puede deberse a que en la fracción insoluble es la que tiene una mayor concentración de lipasas.

De esta forma, podemos concluir que la especie con mayor actividad es *C. procera*, con la cual se estudió la optimización en ciertos parámetros tanto en hidrólisis como en esterificación.

4.2.3. Caracterización de la actividad lipolítica en *C. procera*

4.2.3.1. Determinación del pH óptimo

Las enzimas poseen un pH en el cual desarrollan su mayor actividad, al cual se lo denomina pH óptimo. La mayoría de estas presentan una curva en forma de campana al evaluar su actividad en función del pH, encontrándose en su parte más alta dicho pH óptimo. Cuando varía el pH, la conformación de la enzima se altera y se produce un cambio en el estado de ionización de grupos del sitio activo, por lo que varía su actividad. Esto se debe a que la conformación proteica depende de las interacciones entre los aminoácidos cargados negativamente y positivamente.

A su vez, se puede decir que el pH óptimo de una enzima no es necesariamente el mismo en el que se encuentra inmerso en su compartimiento fisiológico. Puede encontrarse su pico de actividad en un pH más básico o ácido. Otra aclaración importante es que existen dos tipos de

curva, una en la cual existe un pico máximo en el pH óptimo, y la otra en la que tenemos un intervalo de pH en el cual se encuentra la actividad máxima (Llorente, 2002).

El pH óptimo fue determinado mediante el uso del protocolo de Kwon y Rhee (1986) utilizando los buffers de Good debido a que con estos solamente se observan cambios debido a la variación del pH. Tienen una capacidad reguladora independiente de la temperatura y de la concentración del sustrato.

La mayor actividad se observa entre en intervalo de pH de 7,0 a 10,0 (Figura 23).

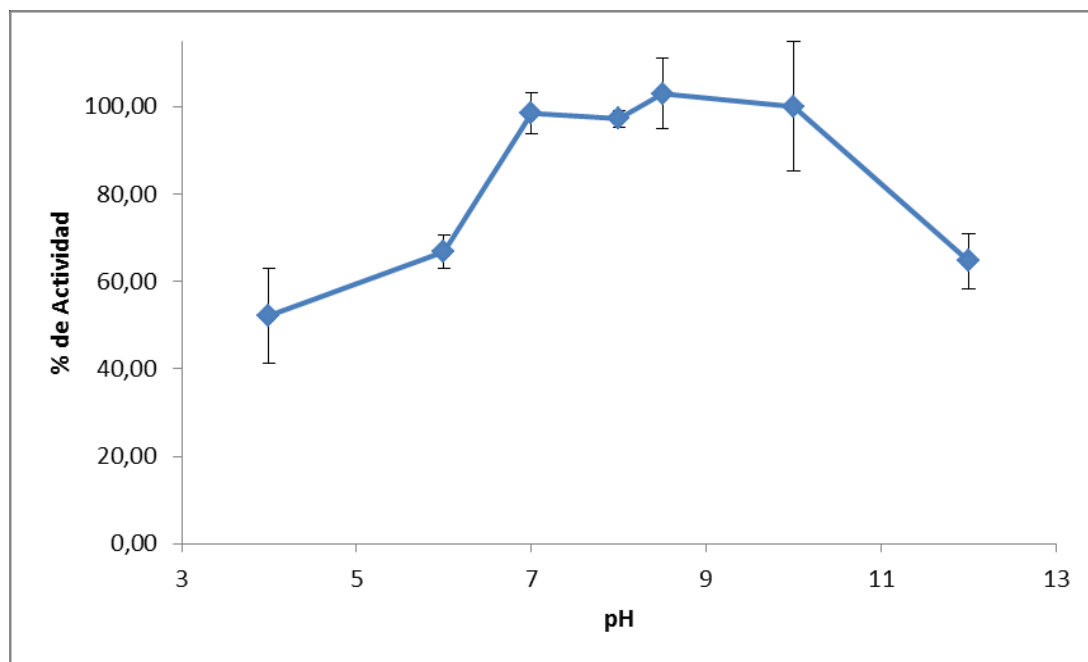


Figura 23: pH óptimo en actividad lipolítica.

4.2.3.2. Determinación de la temperatura óptima

La velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas aumenta al aumentar la temperatura, debido al incremento de la cantidad de moléculas de sustratos con suficiente energía para reaccionar, siempre y cuando no sea demasiado alta y lleve a la enzima a su desnaturalización. Se observa que muchas de las enzimas duplican la velocidad de una reacción enzimática cuando se aumenta la temperatura de unos 10° C aproximadamente.

En la temperatura óptima, la enzima se encuentra de forma estable y totalmente activa. En el gráfico, se observa un pico, a partir del cual si se sigue aumentando la entrega de calor tendremos una disminución de la actividad debido al comienzo de la desnaturalización y de la inactivación enzimática (Llorente, 2002).

Se observa que la actividad lipolítica se encuentra cercana a 40°C (Figura 24), temperatura en la cual se decidió desde un comienzo realizar los ensayos anteriores de hidrólisis. Esta elección se debió a experiencias obtenidas con lipasas anteriores y ejemplos tomados de bibliografía.

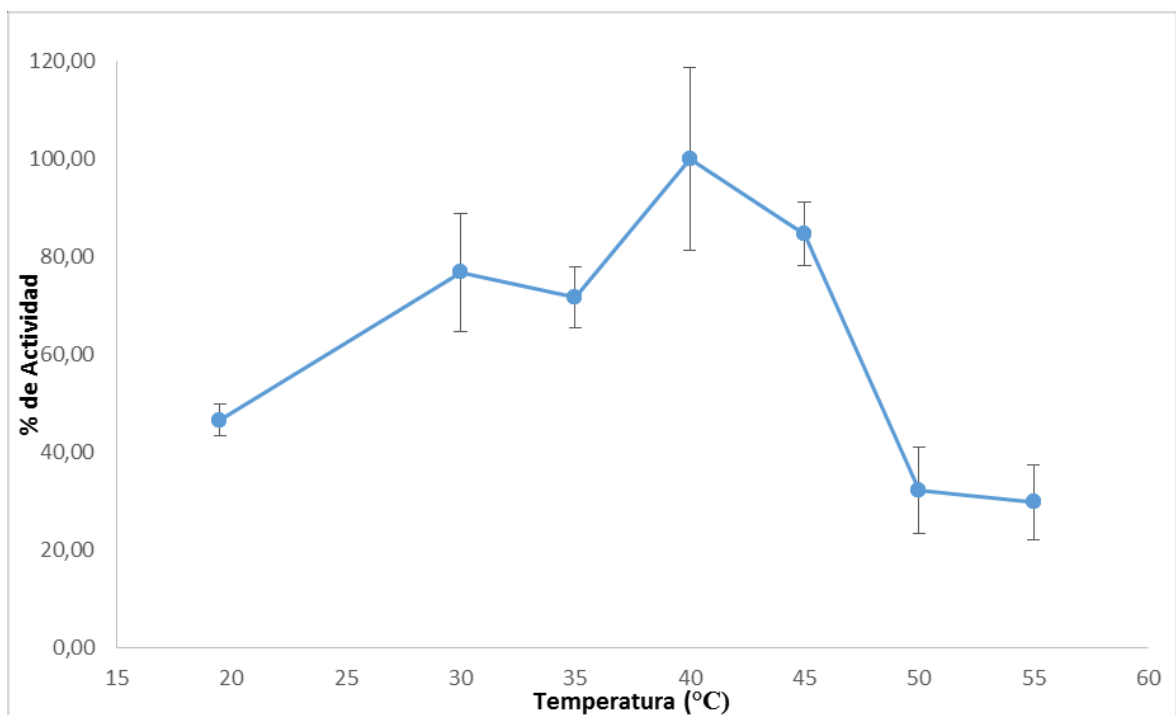


Figura 24: Temperatura óptima (actividad lipolítica).

Las lipasas poseen distintos valores de temperatura y pH óptimos (Tabla 6). Cabe destacar, como se indicó previamente, estos valores pueden no coincidir con los del estado fisiológico.

Tabla 6: pHs y temperaturas óptimos de lipasas provenientes de diferentes organismos (tomado de González Bacerio et al., 2010).

Organismo	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Referencia
<i>Cavia porcellus</i> (Conejillo de Indias, macrófagos del peritoneo)	4,5/7,0	ND	Kiyotani <i>et al.</i> , 1983
<i>Chromobacterium viscosum</i>	7,0	42	Prazeres <i>et al.</i> , 1996
<i>Rhizomucor miehei</i>	8,0	50	Wu <i>et al.</i> , 1996
<i>Oriza sativa</i> (arroz, salvado)	11,0	80	Bhardwaj <i>et al.</i> , 2001
<i>Acinetobacter</i> sp.	9,0	55	Snellman <i>et al.</i> , 2002
<i>Helicobacter pylori</i>	10,0	50	Ruiz <i>et al.</i> , 2007
<i>Todarodes pacificus</i> (Calamar, lipasa hepática)	8,0	35-40	Park <i>et al.</i> , 2008
<i>Burkholderia</i> sp.	8,0	40	Wei y Wu, 2008

La temperatura óptima hallada para la lipasa de *Calotropis procera* fue similar a las encontradas para *Chromobacterium viscosum*, *Todarodes pacificus* (calamar, lipasa hepática) y *Burkholderia* sp. Sin embargo, el rango de pH óptimo hallado para *C. procera* incluye a los valores óptimos hallados para las lipasas citadas, incluidos en el intervalo correspondiente a valores de pH de neutros a alcalinos.

4.2.4. Medidas de actividad en ensayos de esterificación

4.2.4.1. Determinación de la preferencia del solvente de reacción

Mediante el método descrito por Vacek et al. (2000), se realizó el ensayo de esterificación empleando distintos solventes para determinar en qué medio, dicha reacción tiene mayor actividad. Se siguió el protocolo establecido en el punto 3.7.1, y se valoró la solución de KOH alcohólica obtenida. Con estos resultados se calculó la actividad en esterificación específica en n-heptano (Tabla 7), en n-hexano (Tabla 8) y en isoctano (Tabla 9). Las AEE en cada solvente se vieron reflejadas en la Figura 25.

Tabla 7: Resultados de la esterificación en n-heptano.

Conversión (%)	IA	% IA	AE	AEE
15,05± 1,11	0,0591±0,0008	14,969 ± 1,066	0,1509 ± 0,0107	0,00716 ±0,00035

Tabla 8: Resultados de la esterificación en n-hexano.

Conversión(%)	IA	%IA	AE	AEE
11,83 ±1,56	0,0589 ±0,010	11,848 ±1,590	0,1194 ±0,0158	0,00572 ± 0,00038

Tabla 9: Resultados de la esterificación en isooctano.

Conversión (%)	IA	%IA	AE	AEE
11,62 ±0,71	0,0541 ±0,0004	11,616 ±0,716	0,116 ±0,007	0,00586 ± 0,00054

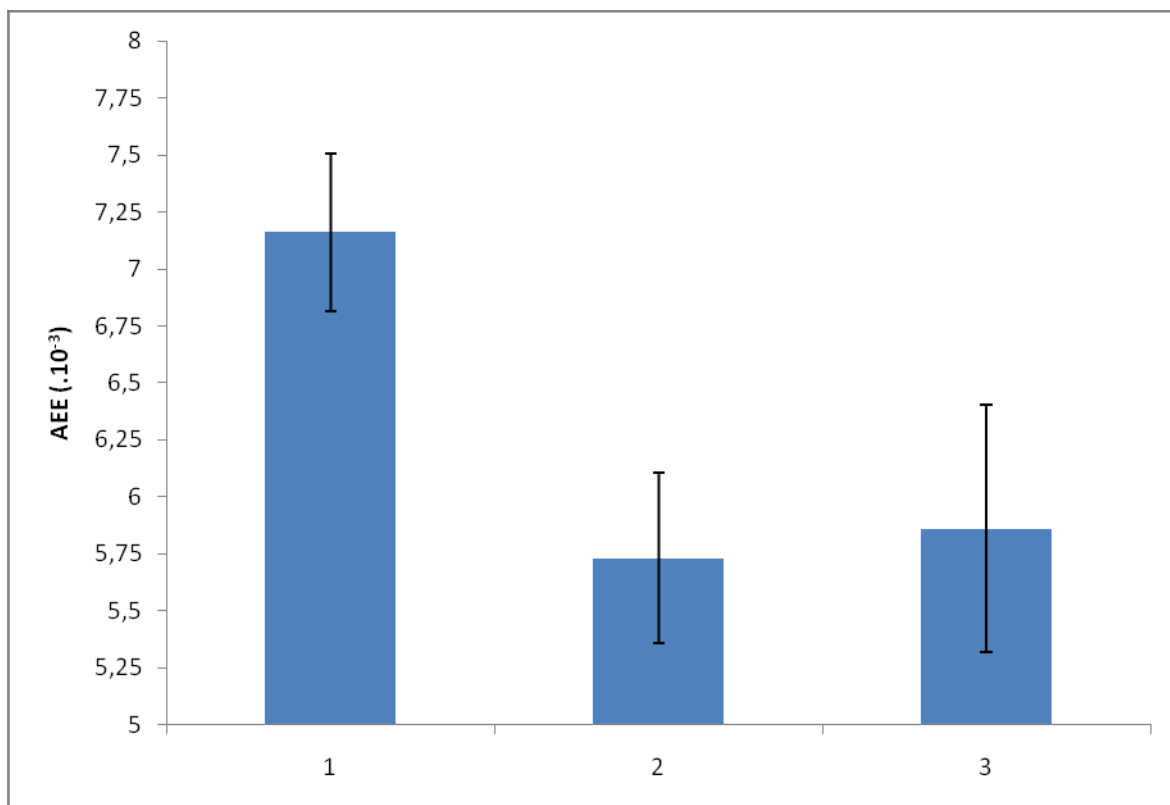


Figura 25: Resultados de la AEE en n-heptano (1), n-hexano (2) e isooctano (3).

Con estos resultados, se decidió seguir los ensayos posteriores utilizando n-heptano como solvente, ya que en este caso se midió la mayor actividad enzimática específica. También podemos agregar que en los casos de n-hexano e isooctano, las actividades fueron más bajas y similares entre sí.

Para el caso de la lipasa de *Araujia sericifera* (ASL) también se obtuvo actividad en esterificación en los solventes n-heptano y n-hexano, siendo mayor en el primero. Esto puede atribuirse a la menor tendencia del n-heptano a eliminar el agua esencial del biocatalizador y así distorsionar su conformación activa (Di Santo et al., 2014). Otro dato relevante es que ASL no demostró actividad utilizando n-octano como disolvente.

Se ha estudiado Lipozyme RM-IM® de Novozymes (nombre comercial de la lipasa de *Rhizomucor miehei* cuando se encuentra inmovilizada en Duolite ES 562, una débil resina de intercambio aniónico a base de copolímeros de fenol-formaldehído), en la esterificación de ácido butírico mediante el uso de isobutanol y 1-propanol como nucleófilos en solventes orgánicos como

n-hexano, ciclohexano, n-heptano y n-octano. En el caso de isobutanol, se obtuvieron buenas actividades para todos los solventes exceptuando el ciclohexano. Lo mismo sucedió siendo el alcohol 1-propanol, resultando muy similares las actividades (Fallavena et al., 2014). A su vez, la lipasa B de *Candida antártica* (CALB) en la esterificación de ácidos grasos ricos en ácido docosahecanoico (DHA) con glicerol, obtuvo una mayor actividad utilizando como solvente a n-hexano, siendo menor en isoctano (Bhandari et al., 2014).

4.2.4.2. Determinación de la temperatura óptima

Se realizó el ensayo de esterificación de ácido láurico con n-butanol. Las temperaturas elegidas para hacer el mismo fueron 26°C (temperatura ambiente), 35°, 40°, 45°, 50°, 55° y 60°C. La mayor actividad se obtuvo en el rango comprendido entre 45° y 50°C (Figura 26).

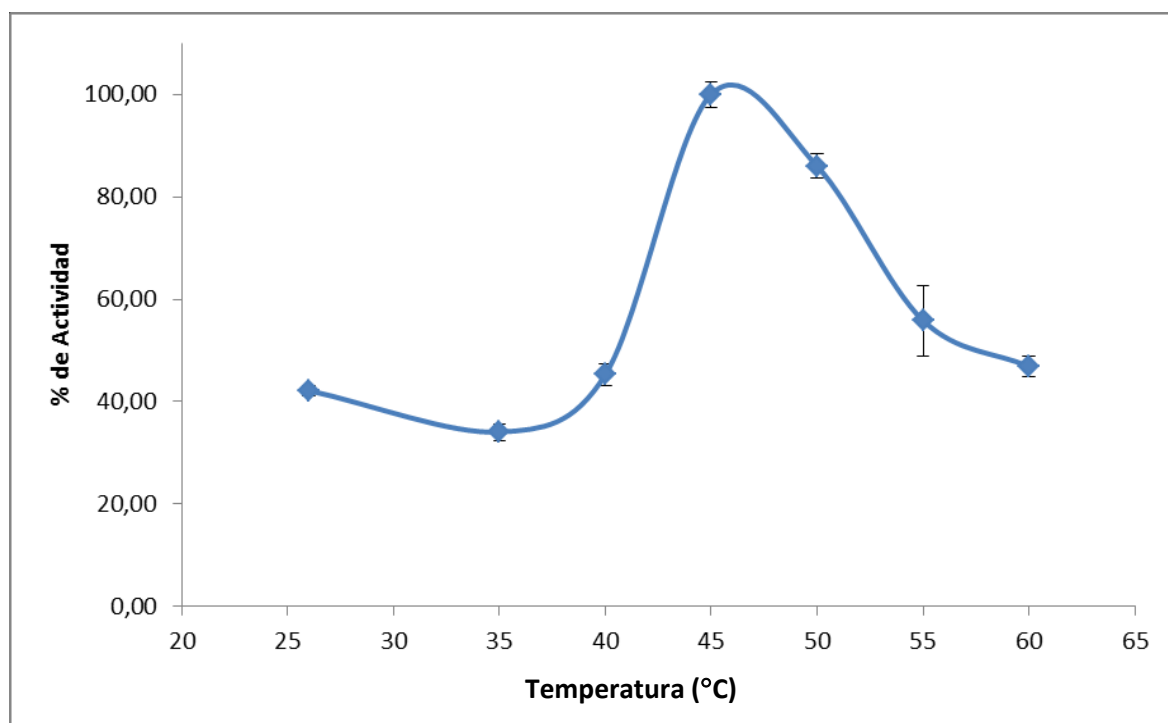


Figura 26: Temperatura óptima en la reacción de esterificación.

4.2.4.3. Determinación de la carga enzimática óptima

Los ensayos se realizaron usando el protocolo descrito en el punto 3.5.1, utilizando diferentes masas de biocatalizador en cada uno de ellos, con el fin de obtener la carga enzimática óptima para la reacción de esterificación.

La velocidad de la reacción está relacionada directamente con la concentración de la enzima. Cuando esta es constante, la velocidad aumenta hasta alcanzar un máximo, la velocidad máxima, aunque la concentración del sustrato siga aumentando. Todas las moléculas de enzima están ocupadas por moléculas de sustrato y la velocidad no puede aumentar.

Dado el carácter hidrofóbico de la zona cercana al centro activo de las lipasas, no se puede despreciar la interacción de dicha zona con otras sustancias de su misma naturaleza presentes en el medio, incluyendo las zonas hidrofóbicas de otras moléculas de enzima (González Bacerio et al., 2010). Estas interacciones conducirían a la formación de agregados enzimáticos (Snellman et al., 2002), por lo que disminuiría su actividad catalítica debido al bloqueo de sus centros activos.

De los resultados se puede apreciar que la carga enzimática óptima fue de 20 mg (Figura 27).

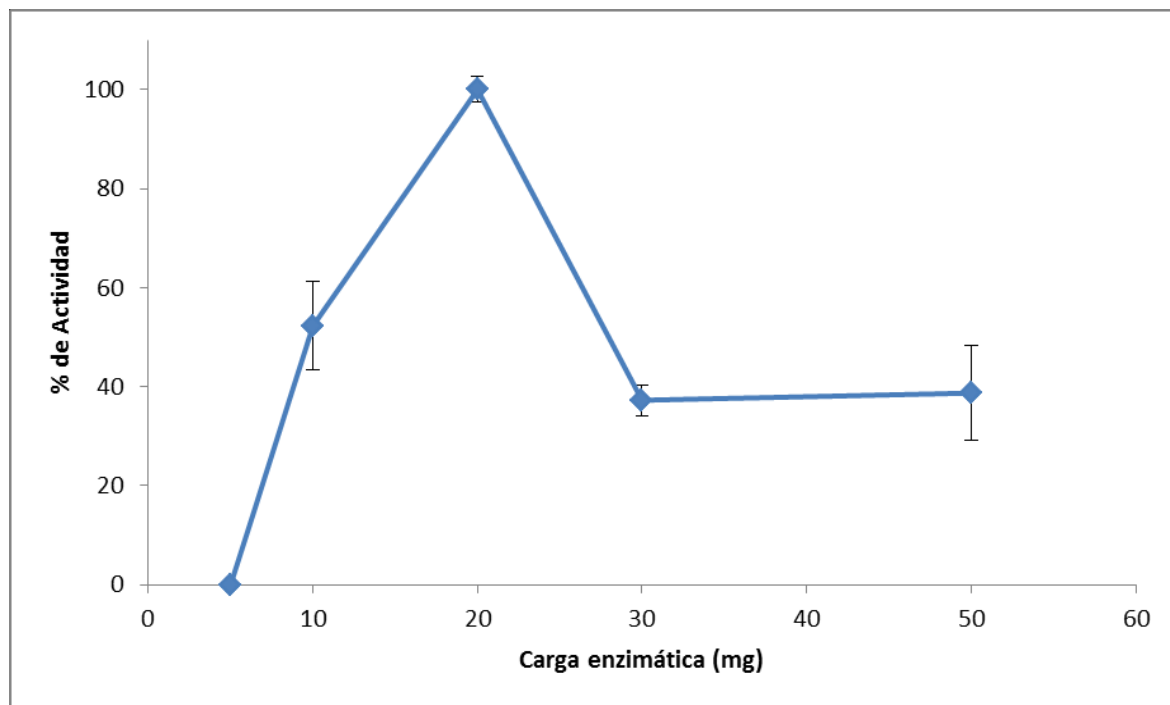


Fig. 27: Carga enzimática óptima para la reacción de esterificación.

Para ASL los datos muestran que la conversión aumentó con la masa del biocatalizador utilizada hasta 10 mg. La adición de masas ASL superiores (20 mg) no condujo a un incremento significativo en la conversión de ácidos grasos, lo que sugiere que a altas cargas de lipasa, y tal vez debido a efectos de aglomeración enzimática, el biocatalizador es menos eficiente (Di Santo et al., 2014).

En la esterificación de ácidos grasos ricos en DHA con glicerol, reacción catalizada por la CALB, se estudió el efecto de carga enzimática para 25, 35, 50 y 100 mg de biocatalizador. La mayor actividad fue lograda con una masa de 50 mg. Al incrementar dicha masa, se observó un decrecimiento de la actividad (Bhandari et al., 2014).

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se pudo llegar a las siguientes conclusiones:

- No se obtuvo una buena estabilidad operacional en el reúso de los biocatalizadores, luego de los lavados con ACN y 1-propanol, así como tampoco con el agregado, posterior a dichos lavados, de cisteína.
- La especie que presentó mayor actividad lipolítica en el látex extraído fue *C. procera*. Esta actividad se encontró en la parte insoluble del mismo.
- Se determinó que el pH óptimo se sitúa en el intervalo de 7,0-10,0.
- Se encontró que la temperatura óptima en la actividad lipolítica fue de 40°C.
- El solvente seleccionado para realizar los estudios de esterificación fue n-heptano, debido a que la lipasa presentó en dicho solvente la mayor actividad.
- La temperatura óptima en la síntesis de ésteres estuvo en el intervalo de 45-50°C.
- La carga enzimática óptima para la reacción de esterificación estudiada fue de 20 mg.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adlercreutz P., (2006). *“Immobilization of enzymes for use in organic media, in Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells”*, ed. por Guisan, J.M.; 2da edición, Humana Press Inc., Totowa, Nueva Jersey, pp. 252-256.
- Amorim Fernandes, J.F.; Halling P.J. (2002). *“Operational Stability of High Initial Activity Protease Catalysts in Organic Solvents”*. Biotechnol. Prog. 2002:1455-1457.
- Arroyo, M.; Acebal, C.; de la Mata, I. (2014). *“Biocatálisis y biotecnología”*. Arbor 190:a156.
- Avelar, M.H.M.; Cassimiro, D.M.J.; Santos, K.C.; Domingues, R.C.C.; Castro, H.F.; Mendes, A.A. (2013). *“Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds”*. Ind. Crops Prod. 44:452–458.
- Barros, M.; Fleuri, L.F.; Macedo, G.A. (2010). *“Seed lipases: sources, applications and properties – a review”*. Braz. J. Chem. Eng. 27:15–29.
- Berner, D. L.; Hammond, E. G. (1970). *“Phylogeny of lipase specificity. Lipids”*. 5:558-562.
- Bhandari , K.; Chaurasia S.P.; Dalai, A.K. (2014): *“Lipase Catalyzed Esterification of Docosahexaenoic Acid Rich Fatty Acids with Glycerol”*. Chemical Engineering Communications. 202:20-926.
- Bhardwaj, K.; Raju, A.; Rajasekharan, R. (2001). *“Identification, purification and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A new member of the (phospho)lipase family”*. Plant Physiol 127:1728-38.
- Bhattacharyya, M.S.; Singh, A.; Banerjee, U.C. (2010). *“Immobilization of intracellular carbonyl reductase from Geotrichum candidum for the stereoselective reduction of 1-naphthyl ketone. Bioresour”*. Technol. 101:1581–1586.
- Bhatti, G.R.; Qureshi, R.; Shah, S. M. (1998). *“Ethnobotany of Calotropis procera with special reference to the people of nara desert”*. Annual Research Journal. Shah Abdul Latif University, Khairpur, Sindh, Pakistan. 5:13-22.
- Bordusa, F. (2002). *“Proteases in organic synthesis”*. Chem. Rev. 102:4817-4868.

- Bornscheuer, U.; Reif, O. W.; Lausch, R.; Freitag, R.; Scheper, T.; Kolis, F. N.; Menge, U. (1994). "*Lipase of Pseudomonas cepacia for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization*". *Biochim Biophys Acta*. 1201:55-60.
- Bradford, M.M. (1976). "*A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*". *Anal. Biochem*. 72:248–254.
- Cao, L. (2005). "*Immobilised enzymes: science or art?*". *Curr. Opin. Biotechnol*. 9:217–226.
- Castro, L.B.R.; Silva, F.F.; Carmona-Ribeiro; A.M., Kappl, M.; Petri; D.F.S. (2007). "*Immobilization of hexokinase onto chitozan decorated particles*". *J. Phys. Chem. B*. 111:8520–8526.
- Cavalcanti, E.D.C.; Maciel, F.M.; Villeneuve, P.; Lago, R.C.A.; Machado, O.L.T.; Freire, D.M.G.(2007). "*Acetone powder from dormant seeds of Ricinus communis L.: lipase activity and presence of toxic and allergenic compounds*". *Appl. Biochem.Biotechnol*. 136-140:57–65.
- Cheng, Y.; Tsai, S. (2004). "*Enantioselective esterification of (RS)-2-(4-chlorophenoxy)- propionic acid via Carica papaya lipase in organic solvents*". *Tetrahedron: Asymm*. 15:2917–2920.
- Clapés, P.; Moran, C.; Infante, M. (1999). "*Enzymatic synthesis of arginine-based cationic surfactants*". *Biotechnol. Bioeng*. 63:333-343.
- Dhouib, R.; Laroche-Traineau, J.; Shaha, R.; Lapailierie, D.; Solier, E.; Rualès, J.; Pina, M.; Villeneuve, P.; Carrière, F.; Bonneu, M.; Arondel, V. (2011). "*Identification of a putative triacylglycerol lipase from papaya latex by functional proteomics*". *FEBS J*. 278:97-110.
- Di Santo Meztler, P.; Fait, M.E.; Foresti, M.L.; Morcelle, S.R. (2014). "*Biocatalytic characterization of a naturally immobilized lipase found in Araujia sericifera Brot. (Apocynaceae) latex*". *Catal. Sci. Technol*. 4:1386.
- Dordick, J. (1991). "*Biocatalysts for industry*". Ed. por Katritzky, A.R. y Sabongi G.J. Plenum Press, Nueva York, pp. 3-19.
- Dziuba, J.; Minkiewicz, P.; Nalecz, D.; Iwaniak, A. (1999). "*Database of biologically active peptide sequences*". *Die Nahrung* 43:190-195.
- Eastmond, P.J.(2004). "*Cloning and characterization of the acid lipase from castorbeans*". *J. Biol. Chem*. 279:45540–45545.

- Endress, M.E.; Bruyns, P.V. (2000). "A revised classification of the Apocynaceae s.l.". *The Botanical Review* 66:1-56.
- Erhardt, F.A.; Jordening, H.J. (2007). "Immobilization of dextranase from *Chaetomium erraticum*". *J. Biotechnol.* 131:440–447.
- Errasti, M.E. (2013). "Estudio de posibles aplicaciones farmacológicas de extractos de especies de bromeliáceas y su comparación con bromelina". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Fait, M.E.; Garrote, G.L.; Clapés, P.; Tanco, S.; Lorenzo, J.; Morcelle, S.R. (2015). "Biocatalytic synthesis, antimicrobial properties and toxicity studies of arginine derivative surfactants". *Amino Acids.* 47:1465.
- Fallavena, L.P.; Antunes, F.H.F.; Alves, J.S.; Paludo, N.; Ayub, M.A.Z.; Fernandez-Lafuente, R.; Rodrigues, R.C. (2014). "Ultrasound technology and molecular sieves improve the thermodynamically controlled esterification of butyric acid mediated by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*". *RSC Adv.*, 4:8675.
- Fiat, A.M.; Migliore-Samour, D.; Jolles, P.; Drouet, L.; Sollier, C.B.; Caen, J. (1993). "Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities". *J. Dairy Sci.* 76:301-310.
- Freitas, L.; Bueno, T.; Perez, V.H.; Santos, J.C.; Castro, H.F. (2007). "Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids". *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23:1725–1731.
- Good, N.E. and Izawa, S. (1972). "Hydrogen ion buffers". *Methods Enzymol.* 24:53.
- González-Bacerio, J.; Rodríguez Hernández, J.; del Monte Martínez, A. (2010). "Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial". *Revista Colombiana de Biotecnología.* 12:124-140.
- Gu, H.; Jiang, Y.; Zhou, L.; Gao, J. (2011). "Reactive extraction and in situ self-catalyzed methanolysis of germinated oilseed for biodiesel production". *Energy Environ. Sci.* 4:1337–1344.

- Gupta, R; Gupta N; Rathi P. (2004). *"Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties"*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64:763–781.
- Hartmann, M., Kostrov, X. (2013). *"Immobilization of enzymes on porous silicas-benefits and challenges"*. Chem. Soc. Rev. 42:6277–6289.
- Jaeger, K.; Dijkstra, B.; Reetz M.(1999). *"Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases"*. Microbiol. 53:315–351.
- Jesionowski, T.; Zdarta, J.; Krajewska, B. (2014). *"Enzyme immobilization by adsorption: a review"*. Adsorption. 20:801–821.
- Kirchner, G.; Scollar, M. P.; Klivanov, A. M. (1985). *"Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents"*. J. Am. Chem. Soc. 107:7072-7076.
- Kiyotani, K.; Tasaka, H.; Tsukiyama, F.; Matsuo, Y. (1983). *"Lipase activity of guinea pig peritoneal macrophages and mycobacterial lipase inhibitor"*. Hiroshima J. Med. Sci. 32:267-71.
- Krajewska, B. (2005) *"Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials"*. Sep. Purif. Tech. 41:305–312.
- Kwon, S.W., Jeong, B.O., Lee, E.H., Kim, Y.S., Jung, Y. (2012). *"Conducting polymer silica composites for immobilization of enzymes"*. Bull. Korean Chem. Soc. 33:1593–1596.
- Kwon, D.Y. y Rhee, J.S.(1986). *"A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay."* J. Am. Oil Chem. Soc., 63:89-92.
- Lee, S.H., Doan, T.T.N., Won, K., Ha, S.H., Koo, Y.M. (2010). *"Immobilization of lipase within carbon nanotube-silica composites for non-aqueous reaction systems"*. J. Mol. Catal. B. 62:169–172.
- Li, S.F.; Wu, W.T.(2009). *"Lipase-immobilized electrospun PAN nanofibrous membranes for soybean oil hydrolysis"*. Biochem. Eng. J. 45:48–53.
- Liede, S.; Weberling, F. (1995). *"On the inflorescence structure of the Asclepiadaceae"*. Plant Syst Evol. 197:99–109.
- Lin, Y.H.; Wimer, L.T.; Huang, A.H.C. (1983). *"Lipase in the lipid bodies of corn scutelladuring seedling growth"*. Plant Physiol. 73:460–463.

- Llorente, B.E. (2002). *“Aislamiento, purificación, caracterización y producción in vitro de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche”*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- López, L.M.I. (1995). *“Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas presentes en el látex de frutos de Madura pomífera (Raf.) Schneid. (Moraceae)”*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Lorenzi, H.; de Abreu Matos, F.J. (2002). *“Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas”*. 2da ed. Instituto Plantarum. Nova Odessa, San Pablo, Brasil.
- Loukas, S.; Varoucha, D.; Zioudrou, C.; Streaty R.A.; Klee, W.A. (1983). *“Opioid activities and structures of α -casein-derived exorphins”*. Biochem. 22:4567-4573.
- Magner, E.(2013). *“Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials”*. Chem. Soc. Rev. 42:6213–6222.
- Marohasy, J.; Forster, P.I. (1991). *“A Taxonomic Revision of Cryptostegia R. Br. (Asclepiadaceae: Periplocoideae)”*. Aust. Syst. Bot., 4:571-577.
- Matkovic, S.R.; Nilsson, J.F.; Fait, M.E.; Morcelle, S.R.; Briand, M.L. (2016). *“Screening of Novel Materials for Biodiesel Production Through the Esterification of Oleic Acid”*. Catal Lett 46:2341–2347.
- McAuliffe, J.C.; Ahle, W.; Whited, G.M.; Ward, D.E. (2007). *“Industrial Enzymes and Biocatalysis”*. Handbook of industrial chemistry and biotechnology, Vol. I and II. J.A. Kent Ed., 11^o Ed. Springer Science + Business Media LCC, New York, NY. Pp. 1375-1418.
- Mendes, A.A.; Oliveira, P.C.; Castro, H.F. (2012). *“Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase”*. J. Mol. Catal. B: Enzym. 78:119–134.
- Morcelle, S.R.; Barberis, S.; Priolo, N.; Caffini, N.O., Clapés, P. (2006). *“Comparative behaviour of proteinases from the latex of Carica papaya and Funastrum clausum as catalysts for the synthesis of Z-Ala-Phe-OMe”*. J. Mol. Catal. B: Enzymatic. 41:117–124.

- Morcelle, S.R.; Cánepa, A.S.; Padró, J.M.; Llerena-Suster, C.R.; Clapés, P. (2013). "Syntheses of dipeptide alcohols and dipeptide aldehyde precursors catalyzed by plant cysteine peptidases". *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 89:130–136.
- Morcelle, S. R.; Liggieri, C. S.; Bruno, M. A.; Priolo, N.; Clapés, P. (2009). "Screening of plant peptidases for the synthesis of arginine-based surfactants". *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 57:177-182.
- Mukherjee, K. D. (1996). "Plant lipases in lipid biotransformations". En Malcata, F. X. *Engineering of / with lipases*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 391-401.
- Muto, S.; Beevers, H.(1974). "Lipase activities in castor bean endosperm during germination". *Plant Physiol*. 54:23–28.
- Ory, L.R.; Angelo, A.J.S.; Altschul, A.A.(1962). "The acid lipase of the castor bean. Properties and substrate specificity". *J. Lipid Res*. 3:99–105.
- Park, J.; Cho, S. Y.; Choi, S. J. (2008). "Purification and characterization of hepatic lipase from *Todarodes pacificus*". *BMB Rep*. 41:254-8.
- Pérez, A.T.; Carvajal, C.; Torres, M.J.; Martín, M.I.; Pina, D.; Trujillo, R.; Lorenzo, J.C.; Natalucci, C.L.; Hernández, M. (2006). "Actividad proteolítica de extractos enzimáticos obtenidos de plantas de la familia *Bromeliaceae*". *Revista Cubana de plantas medicinales*, 11:0-0.
- Plumel, M.M. (1991). "Le genre *Himatanthus* (*Apocynaceae*). Révision taxonomique: *Bradea*. 5:1-118.
- Prazeres, D. M. F.; Lemos, F.; García, F. A. P.; Cabral, J. M.S. (1996). "Reversed micellar membrane bioreactor". En Malcata, F. X. *Engineering of/with lipases*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 483-513.
- Rashid, N.; Shimada, Y.; Ezaki, S.; Atomi H.; Imanaka, T. (2001). *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:4064.
- Rivera-Pérez, C.; García-Carreño, F. (2007). "Enzimas Lipolíticas y su Aplicación en la Industria del Aceite". *BioTecnología*, 11:37-45.

- Rotticci, D. (2000). *“Understanding and Engineering the Enantioselectivity of Candida Antarctica Lipase B towards sec-Alcohols”*. Royal Institute of Technology. Department of Chemistry. Organic Chemistry. Estocolmo, Estocolmo, Suecia.
- Ruiz, C.; Falcocchio, S.; Pastor, F. I.; Saso, L.; Díaz, P. (2007). *“Helicobacter pylori EstV: identification, cloning, and characterization of the first lipase isolated”*. Appl. Environ. Microbiol. 73:2423-2431.
- Sagioglu, A.; Arabaci, N. (2005). *“Sunflower seed lipase: extraction, purification, and characterization”*. Prep. Biochem. Biotechnol. 35:37–51.
- Sanders, T.H.; Pattee, H.E. (1975). *“Peanut alkaline lipase”*. Lipids 10:50–64.
- Schneider, M.P. (2011). *“Bioconversion of renewables-plants oils”*. J.A. Tao, R. Kazlauskas (Eds.), Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development, John Wiley and Sons Ltd., New Jersey (2011), pp. 391–428.
- Sharma, S.; Gangal, S.; Rauf, A. (2009). *“Lipase mediated hydrolysis of Mimosa elengi and Parkinsonia aculeata seed oils for the determination of positional distribution of fatty acids”*. Ind. Crops Prod. 30:325–328.
- Sheldon, R.A. (2007). *“Enzyme immobilization: the quest for optimum performance”*. Adv. Synth. Catal. 49:1289–1307.
- Sheldon, R.A., van Pelt, S. (2013). *“Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how?”* Chem. Soc. Rev. 42:6223–6225.
- Shiomori, K.; Hayashi, T.; Baba, Y.; Kawano, Y.; Hano, T. (1995). *“Hydrolysis rates of olive oil by lipase in a monodispersed OW emulsion system using membrane emulsification”*. J. Ferment. Bioeng. 80:552–558.
- Showell, M.S. (1999). *“Enzymes, detergent”*. Wiley encyclopedia of Bioprocess, Fermentation Technology, Fermentation Biocatalysis and Bioseparation. Ed. Flickinger MC, Drew SWpp 958-971, New York, USA: A Wiley Interscience Publications & Sons Inc.
- Sicard, P. (1982). *“Applications industrielles des enzymes”*. Les enzymes. Productions et Utilisations Industrielles, eds. G. Durand & P. Monsan, pp: 121-164. Gauthier Villars, Paris, Francia.

- Snellman, E. A., Sullivan, E. R., Colwell, R. R. (2002). "Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1". *Eur. J. Biochem.* 269:5771-5779.
- Su, E.R.; Zhou, Y.; You, P.Y.; Wei, D.Z.(2010). "Lipases in the castor bean seed of Chinese varieties: activity comparison, purification and characterization". *J. Shanghai Univ.* 14:137–144.
- Theppakorn, T.; Kanasawud, P.; Halling P.J. (2003). "Activity of immobilized papain dehydrated by *n*-propanol in low-water media". *Biotechnology Letters* 26:133–136.
- Torres Feced, C. (1997). "α-quimitripsina inmovilizada como catalizador en la síntesis de dipeptidos". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España.
- Uhlig, H. (1998). "Industrial Enzymes and their Applications". Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York Pág. 180.
- Universidad de Maine. (2014). "The cysteine proteases II". Departamento de Química, [umaine.edu](http://chemistry.umeche.maine.edu). Maine, Estados Unidos. (Fecha de consulta: enero de 2017). Recuperado de: <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Peptidase10.html>.
- Vacek, M.; Zarevúcka, M.; Wimmer, Z.; Stránský, K.; Demnerova, K.; Legoy, M. (2000). "Selective enzymic esterification of free fatty acids with *n*-butanol under microwave irradiation and under classical heating". *Biotechnol. Lett.* 22:1565.
- Villeneuve, P. (2003). "Plant lipases and their applications in oils and fats modification". *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105:308–317.
- Wei, H-N.; Wu, B. (2008). "Screening and immobilization *Burkholderia* sp. GXU56 lipase for enantioselective resolution of (R, S)-methyl mandelate". *Appl. Biochem. Biotechnol.* 149:79-88.
- Wu, X. Y.; Jaaskelainen, S.; Linko, Y. Y. (1996). "Purification and partial characterization of *Rhizomucor miehei* lipase for ester synthesis". *Appl. Biochem. Biotech.* 59:145-58.
- Yoshimura, Y.; Moon, H. R.; Choi, Y.; Márquez, V. E. (2002). "Enantioselective synthesis of bicyclo[3.1.0]hexane carbocyclic nucleosides via a lipase-catalyzed asymmetric acetylation. Characterization of an unusual acetal byproduct". *J. Org. Chem.* 67:5938-5945.
- You, P.; Su, E.; Yang, X.; Mao, D.; Wei, D.(2011). "Carica papaya lipase-catalyzed synthesis of terpene esters". *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 71:152–158.

Zarevúcka, M.; Wimmer, Z. (2008). *“Plant products for pharmacology: application of enzymes in their transformations”*. Int. J. Mol. Sci. 9:2447-2473.

FE DE ERRATAS

Pág. 20: La cita correspondiente al pie de la figura 8, Zapata et al. 2006, fue involuntariamente omitida del listado final de referencias. La cita completa es: Zapata, C.D.; Martínez, I.D.; Arenas Castiblanco, E.; Henao Uribe, C.A. (2006). “*Producción de biodiesel a partir de aceite crudo de palma: 1. Diseño y simulación de dos procesos continuos*”. *Dyna*, 74:71-82.

Pág. 22: Donde dice “Miyazawa et al. ha ampliado el uso de CPL en la producción enantioselectiva de α -aminoácidos no esenciales” debería decir: “Miyazawa et al. **(2005)** ha ampliado el uso de CPL en la producción enantioselectiva de α -aminoácidos no esenciales”. La cita correspondiente, que fue omitida accidentalmente en la lista final de referencias, es: Miyazawa, T.; Onishi, K.; Murashima, T.; Yamada, T.; Tsai, S.-W. (2005). “*Resolution of non-protein amino acids via Carica papaya lipase-catalyzed enantioselective transesterification*”. *Tetrahedron: Asym.* 16:2569-2573.

Pág. 30: Donde dice “Las mismas son ovals, marrones con un mechón (coma) a lo largo (19-38 mm), fino, compuesto por pelos blancos sedosos en un extremo (Morohasy y Forster, 1991).” debe decir “Las mismas son ovals, marrones con un mechón (coma) a lo largo (19-38 mm), fino, compuesto por pelos blancos sedosos en un extremo (**Marohasy** y Forster, 1991)”.

Pág. 32: Donde dice “Fracción liofilizada (soluble/insoluble): 10 mg para el caso de *H. drasticus* y *C. grandiflora*, y 3,5 mg para *C. procera*” debería decir “**Fracción insoluble:** 10 mg para el caso de *H. drasticus* y *C. grandiflora*, y 3,5 mg para *C. procera*” debería decir “Fracción insoluble: 10 mg para el caso de *H. drasticus* y *C. grandiflora*, y 3,5 mg para *C. procera*”.

Pág. 34: Donde dice “Las medidas se realizaron según el protocolo descrito en el ítem 3.2.3.2, sustituyendo el *buffer* de reacción por el correspondiente *buffer* de Good” debe decir “Las medidas se realizaron según el protocolo descrito en el ítem 3.2.3.2, sustituyendo el *buffer* de reacción por el correspondiente *buffer* de Good (**Good e Izawa, 1972**).

Pág. 47: Donde dice “El pH óptimo fue determinado mediante el uso del protocolo de Kwon y Rhee (1986) utilizando los buffers de Good debido a que con estos solamente se observan cambios debido a la variación del pH.” debe decir “El pH óptimo fue determinado mediante el uso del protocolo de Kwon y Rhee (1986) utilizando los buffers de Good (**Good e Izawa, 1972**) debido a que con estos solamente se observan cambios debido a la variación del pH”.

Pág. 52: Durante el proceso de edición del trabajo y su pasaje a formato pdf, quedó accidentalmente oculto tras la Figura 26 el siguiente párrafo:

“Comparando la actividad con el caso de la ASL, se obtuvo un máximo de actividad en un rango similar de temperatura. Para esta lipasa se observó que la temperatura óptima de reacción fue de 50°C, aunque el valor hallado fue apenas levemente superior a los del rango comprendido entre 30 y 50°C (Di Santo et al., 2014). En el caso de la lipasa B de *C. antarctica* (CALB) en la esterificación de ácidos grasos ricos en ácido docosahexanoico (DHA) con glicerol, la temperatura óptima de reacción fue también de 50°C (Bhandari et al., 2014). A su vez, si observamos la lipasa de *C. papaya* el máximo de actividad está comprendido entre los 45 y 60°C en la reacción de esterificación del ácido (R)-2-(4-clorofenoxi)-propiónico con trimetilsililmetanol en ciclohexano anhidro (Cheng y Tsai, 2004).”

El mencionado párrafo debe figurar a continuación de la Figura 26.