



DESARROLLO DE NUEVOS BIOCATALIZADORES DE LIPASAS MICROBIANAS PARA LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DE PROPANOLOL Y ATENOLOL

MÓNICA IRENE RUIZ CAMACHO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2012**



DESARROLLO DE NUEVOS BIOCATALIZADORES DE LIPASAS MICROBIANAS PARA LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DE PROPANOLOL Y ATENOLOL

Trabajo de grado para optar al título de Magister en Química

MÓNICA IRENE RUIZ CAMACHO

Directores:

RODRIGO GONZALO TORRES SAEZ

CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LÓPEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2012

*Con todo mi amor:
A mi familia por su amor y comprensión
y a todos aquellos que contribuyeron
a mi empeño de alcanzar la meta.*

Agradezco:

A mis padres y a mi hermana, por su constante apoyo, comprensión y aguante, por guiarme con amor y llenarme de razones para seguir adelante. Gracias por todas las veces que me han demostrado su orgullo.

A los profesores: Rodrigo Torres y Claudia Cristina Ortiz, por brindarme esta oportunidad, por compartirme sus conocimientos, su colaboración y su disposición. Gracias por acogerme en su grupo.

A Roberto Fernandez-Lafuente y a Ove, por el cariño e interés que han demostrado tener en mí y en mi trabajo.

A mis compañeros de estudio y de trabajo por compartir el camino con mí y aguantarme en los buenos y en los malos ratos.

A todos aquellos que no han sido una simple casualidad en mi vida y de una u otra forma han participado en mi crecimiento espiritual, personal e intelectual.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	16
OBJETIVOS	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
MARCO TEÓRICO	20
1 LIPASAS	20
1.1 <i>Mecanismo catalítico de las lipasas</i>	21
1.2 <i>Lipasa B de Candida antarctica (CAL B)</i>	23
1.3 <i>Lipasa de Pseudomona fluorescens (PFL)</i>	24
2 LIPASAS COMO BIOCATALIZADORES	25
2.1 <i>Inmovilización de lipasas</i>	26
2.1.1 <i>Inmovilización por adsorción interfacial sobre soportes hidrofóbicos</i>	27
2.1.2 <i>Inmovilización de lipasas por unión covalente</i>	29
2.2 <i>Modificación química de la superficie enzimática de lipasas</i>	32
2.2.1 <i>Aminación química de grupos carboxilo con etilendiamina</i>	34
2.2.2 <i>Carboxilación química de los grupos amino con anhídrido succínico</i> 35	
2.2.3 <i>Pegilación química de los grupos amino con mPEG-COOH</i>	36
3 RESOLUCIÓN CINÉTICA CATALIZADA POR LIPASAS	38
3.1 <i>Hidrólisis enantioselectiva en medios acuosos</i>	41
3.2 <i>Catálisis enzimática en medio orgánico</i>	41
3.2.1 <i>Importancia del agua en las reacciones biocatalizadas en medios orgánicos</i>	42

3.3 Resolución enzimática de fármacos quirales	42
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1 MATERIALES Y REACTIVOS	45
2 MÉTODOS EXPERIMENTALES	45
2.1 Purificación de CALB y PFL mediante inmovilización por adsorción hidrofóbica sobre Octil-agarosa	46
2.2 Modificación química en fase sólida de la superficie enzimática de CAL B.	47
2.2.1 Carboxilación de grupos amino con anhídrido succínico.....	47
2.2.2 Aminación de grupos carboxilo con etilendiamina.....	48
2.2.3 PEG-ilación de grupos amino con mPEG-COOH.....	48
Preparación de mPEG-COOH.....	48
2.3 Evaluación de la estabilidad de lipasas modificadas en fase sólida	49
2.3.1 Estabilidad térmica.....	49
2.3.2 Estabilidad frente a solventes	49
2.4 Inmovilización por unión covalente - Eupergit C.....	49
2.5 Estudio del efecto de la modificación química de los derivados CALB en EC y octil-agarosa, frente a la actividad hidrolítica del pNPB.....	50
2.6 Estudio del efecto de la modificación química de los derivados CALB en EC y octil-agarosa, sobre la hidrólisis enantioselectiva del (R/S) mandelato de metilo	50
2.7 Estudio del efecto de la modificación química de los derivados CALB en EC, sobre la transesterificación enantioselectiva de (R/S)-propanolol y (R/S)-atenolol	51
3 MÉTODOS ANALÍTICOS	52
3.1 Determinación de la actividad catalítica frente al p-nitrofenilbutirato	52
3.2 Determinación de la concentración de proteína	52
3.3 Electroforesis de proteínas en condiciones denaturalizantes (SDS-PAGE) y en condiciones no desnaturalizantes (nativa-PAGE)	53
3.4 Determinación del grado de modificación	53

3.5 Estudio de la actividad específica y enantioselectividad de lipasas de CALB y PFL inmovilizadas y modificadas químicamente sobre octil agarosa y EC en la resolución cinética de sustratos quirales.....	54
3.5.1 Determinación del exceso enantiomérico (ee) y la Enantioselectividad (E) de una reacción irreversible	54
3.5.2 Determinación del exceso enantiomérico (ee _s y ee _p) y de la enantioselectividad (E) de una reacción reversible	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
1 PURIFICACIÓN DE CAL B Y PFL MEDIANTE INMOVILIZACIÓN POR ADSORCIÓN HIDROFÓBICA SOBRE OCTIL-AGAROSA	56
2 MODIFICACIÓN QUÍMICA EN FASE SÓLIDA DE LA SUPERFICIE ENZIMÁTICA DE CAL B.....	58
3 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS GRUPOS AMINO DE LA LIPASA B DE <i>Candida antártica</i> (CALB) INMOVILIZADA EN OCTIL AGAROSA CON ANHÍDRIDO SUCCÍNICO	60
3.1 Caracterización electroforética de la lipasa de CALB succinilada en fase sólida.....	61
3.2 Efecto de la succinilación en la actividad hidrolítica de la lipasa de CALB inmovilizada en octil-agarosa frente al p-NPB.....	62
3.3 Efecto de la succinilación en la estabilidad térmica y frente a solventes de CALB modificada en fase sólida	63
4 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS GRUPOS CARBOXILO DE LA LIPASA B DE <i>Candida antártica</i> (CALB) INMOVILIZADA EN OCTIL AGAROSA CON ETILENDIAMINA	65
4.1 Caracterización electroforética de la lipasa de CALB aminada en fase sólida	66
4.2 Efecto de la aminación en la actividad hidrolítica de la lipasa de CALB inmovilizada en octil-agarosa frente al p-NPB.....	68
4.3 Efecto de la aminación en la estabilidad térmica y frente a solventes de CALB inmovilizada en octil agarosa.....	69

5	MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS GRUPOS AMINO DE LA LIPASA B DE <i>Candida antarctica</i> (CALB) INMOVILIZADA EN OCTIL AGAROSA CON METOXY POLIETILENGLICOL SUCCINATO	71
5.1	Caracterización electroforética de la lipasa de CALB PEGilada en fase sólida 72	
5.2	Efecto de la pegilación en la actividad hidrolítica de la lipasa de CALB inmovilizada en octil-agarosa frente al p-NPB.....	73
5.3	Efecto de la pegilación en la estabilidad térmica y frente a solventes de CALB inmovilizada en octil agarosa.....	74
5.4	Inmovilización por unión covalente - Eupergit C.....	75
6	ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA Y ENANTIOSELECTIVIDAD DE LIPASAS DE CALB INMOVILIZADA Y MODIFICADA QUÍMICAMENTE SOBRE OCTIL AGAROSA Y EC EN LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DE SUSTRATOS QUIRALES.	76
6.1	Hidrólisis enantioselectiva del (R,S) mandelato de metilo por medio de CALB inmovilizada en EC y octil-agarosa	76
6.2	Estudio del efecto de la modificación química de los derivados CALB en EC, sobre la transesterificación enantioselectiva de (R/S)- propanolol y (R/S)- atenolol.....	78
	CONCLUSIONES.....	83
	RECOMENDACIONES.....	85
	REFERENCIAS	86
	ANEXOS	100
	DIVULGACIÓN DE RESULTADOS	108

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacciones catalizadas por lipasas.....	21
Figura 2. Mecanismo de activación interfacial de las lipasas.....	22
Figura 3. Mecanismo catalítico de las lipasas.....	23
Figura 4. Triada catalítica de: a) lipasa B de la <i>Candida antarctica</i> (CALB), b) Lipasa de <i>Pseudomona fluorescens</i>	24
Figura 5. Métodos de inmovilización física y química de enzimas	26
Figura 6. Inmovilización por adsorción hidrofóbica a diferente fuerza iónica ...	27
Figura 7. Impedimento estérico ocasionado por el soporte hidrofóbico	29
Figura 8. Aminoácidos reactivos en la superficie enzimática	30
Figura 9. Tipos de uniones covalente enzima-soporte.....	30
Figura 10. Etapas de inmovilización covalente multipuntual	31
Figura 11. Aminación química de los grupos carboxilo de la superficie enzimática.....	34
Figura 12. Succinilación química de la superficie enzimática	36
Figura 13. PEGilación de proteínas.....	38
Figura 14. Resolución cinética catalizada por lipasa para un sistema reversible	39
Figura 15. Hidrólisis y esterificación de compuestos racemicos catalizadas por lipasas en diferentes medios de reacción.....	40
Figura 16. Estructura del (A). R/S-Propanolol y (B). R/S-Atenolol	44
Figura 17. Cinética de inmovilización de lipasas sobre el soporte de Octil- agarosa.....	57

Figura 18. Electroforesis SDS-PAGE de las lipasas. A) CALB. B) PFL	57
Figura 19. Estructura tridimensional de la lipasa B de la <i>Candida antártica</i> ...	59
Figura 20. Número de residuos ionizables susceptibles a ser modificados en la lipasa de <i>Candida antártica</i> B (CALB).....	59
Figura 21. Electroforesis de la lipasa CALB succinilada en fase sólida.	62
Figura 22. Efecto de la succinilación de la lipasa de CALB inmovilizada en octil agarosa en la estabilidad.....	64
Figura 23. Electroforesis de la lipasa CALB aminada en fase sólida.....	67
Figura 24. Efecto de la aminación de la lipasa de CALB inmovilizada en octil agarosa en la estabilidad.....	70
Figura 25. Electroforesis de la lipasa CALB pegilada en fase sólida	72
Figura 26. Efecto de la pegilación de la lipasa de CALB inmovilizada en octil agarosa en la estabilidad.....	75
Figura 27. Cinética de la reacción de esterificación del (R/S)-Propanolol catalizada por derivados de CAL B.	79
Figura 28. Cinética de la reacción de esterificación del (R/S)-Atenolol catalizada por derivados de CAL B.....	81

INDICE DE FIGURAS

Tabla 1. Grado de modificación de los grupos amino de las lisinas de CALB inmovilizada sobre octil agarosa y después succinilada	60
Tabla 2. Efecto de la succinilación en la actividad hidrolítica de la lipasa de CALB.....	63
Tabla 3. Grado de modificación de los grupos amino de las lisinas de CALB..	66
Tabla 4. Efecto de la aminación en la actividad hidrolítica de la lipasa de CALB	69
Tabla 5. Efecto de la PEGilación en la actividad hidrolítica de la lipasa de CALB	73
Tabla 5. Enantioselectividad de las preparaciones inmovilizadas de CALB en la transesterificación del propanolol.....	80
Tabla 6. Efecto de la naturaleza del soporte sobre la actividad y enantioselectividad de los derivados de CALB.....	77
Tabla 6. Enantioselectividad de las preparaciones inmovilizadas de CALB en la transesterificación del atenolol	81

RESUMEN

Título:

DESARROLLO DE NUEVOS BIOCATALIZADORES DE LIPASAS MICROBIANAS PARA LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DE PROPANOLOL Y ATENOLOL

Ruiz Camacho Mónica Irene*, Rodrigo Gonzalo Torres**, Claudia Cristina Ortiz***.

Palabras claves: Aminación, Succinilación, PEGilación, Modificación química, lipasas, *Candida antarctica B*, Enantioselectividad

La inmovilización y la modificación química son estrategias de ingeniería de proteínas que permiten la modulación de las propiedades biocatalíticas de las enzimas. En esta investigación, se evaluó el efecto de la modificación química de los grupos carboxilo y de los grupos amino de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB). CALB fue previamente inmovilizada por adsorción hidrofóbica sobre un soporte de octil agarosa y por unión covalente a un soporte Eupergit C 250L a fin de estabilizar la forma abierta de la enzima. Estas preparaciones inmovilizadas de CALB se modificaron a través de reacciones de aminación, succinilación y pegilación a diferentes grados (10, 50 y 100%), mediante la activación con carbodiimida, anhídrido succínico y polietilenglicol succinato, respectivamente. A continuación, se evaluó la actividad y la estabilidad enzimática de los derivados modificados a diferentes valores de pH, temperatura y en presencia de diferentes solventes orgánicos. Adicionalmente, los derivados obtenidos fueron probados en la resolución cinética del (R/S)-mandelato de metilo, (R/S)-propranolol y (R/S)-atenolol. Estas pruebas permitieron determinar cambios en las propiedades biocatalíticas (actividad y enantioselectividad) bajo las condiciones experimentales utilizadas. Por ejemplo, en la resolución del mandelato de metilo, se produjo una alteración en los valores de enantioselectividad, alcanzando un $E=7.5$ para el derivado EC-CALB y un $E=19.1$ para el derivado modificado EC-CALB-PEG. A su vez, el derivado aminado de EC-CALB exhibió la mayor relación enantiomérica ($E=7.9$) en la resolución cinética del propranolol en medio orgánico. Por otro lado, en la resolución cinética del (R/S)-atenolol, el derivado de EC-CALB-B mostró una mayor relación enantiomérica ($E=54.6$) que los derivados modificados químicamente, presentando el derivado EC-CALB-PEG la mayor enantioselectividad ($E=39$).

* Proyecto de grado

** Facultad de ciencias, Escuela de Química, Director. Ph.D.

*** Facultad de Salud, Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Directora. Ph.D.

ABSTRACT

Title:

DEVELOPMENT OF NEW BIOCATALYSTS OF MICROBIAL LIPASES FOR THE KINETIC RESOLUTION OF PROPRANOLOL AND ATENOLOL

Ruiz Camacho Mónica Irene*, Rodrigo Gonzalo Torres**, Claudia Cristina Ortiz***.

Keywords: Amination, Succinylation, PEGylation, Chemical modification, lipases, *Candida antarctica B*, Enantioselectivity.

Both chemical modification and immobilization are strategies of protein engineering that allow modulation of biocatalytic properties from enzymes. In this work, the effect of chemical modification of amine and carboxylic groups of lipase B from *Candida antarctica* (CALB). For this aim, CAL-B was immobilized previously on octyl-agarose and Eupergit C 250L in order to stabilize the open form of the enzyme. This immobilized CALB preparations were modified through reactions of amination, succinylation and PEGylation at different extensions (10, 50 y 100%), by means of activation with carbodiimide, succinic anhydride and succinic polyethylene glycol, respectively. Subsequently, enzyme activity and stability of modified derivatives was evaluated at different pH and temperature values, and in presence of different organic solvents. Additionally, these obtained derivatives were tested on the kinetic resolution of (R/S)-methyl mandelate, (R/S)-propranolol and (R/S) atenolol in organic phase. These tests allowed determination of changes on biocatalytical properties (activity and enantioselectivity) under utilized experimental conditions. For example, in methyl mandelate resolution, an alteration on enantioselectivity values were produced, achieving an $E=7.5$ for EC-CALB derivative and $E=19.1$ for modified EC-CALB-PEG. At the same time, an aminated EC-CALB derivative exhibited the higher enantiomeric ratio ($E=7.9$) in the kinetic resolution of propranolol in organic medium. On the other hand, in the kinetic resolution of (R/S)-atenolol, the EC-CAL-B showed a higher enantiomeric ratio ($E=54.6$) than those chemically modified derivatives, displaying the EC-CALB-PEG derivative the high enantioselectivity ($E=39$).

* Undergraduate project

** Faculty of Sciences, School of Chemistry, Director, Ph.D.

*** Faculty of Health, School of Bacteriology and Clinical Laboratory. Director. Ph.D.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances entre los cuales sobresale la implementación de procesos catalizados por enzimas en la industria química, farmacéutica y alimentaria, entre otras (Fernández-Lafuente *et al.*, 1998; Gotor-Fernández *et al.*, 2006; Reetz, 2002; Wang and Tsai, 2009).

Entre el amplio grupo de enzimas usadas en la industria, las lipasas presentan un gran potencial de aplicabilidad en una variedad de reacciones de relevancia en química orgánica fina. Esto se debe esencialmente a las características de alta especificidad y elevada regio- y enantio-selectividad de las enzimas (Arroyo, 1998).

En general, es de gran interés la obtención de fármacos enantioméricamente puros que permitan incrementar actividad biológica por unidad de masa y disminuir efectos secundarios. En el sector farmacéutico, una de las aplicaciones fundamentales de las lipasas ha estado dirigida a la resolución de compuestos quirales o racematos, como es el caso de los fármacos de tipo amino alcoholes (agentes bloqueadores de los receptores beta-adrenérgicos usados comúnmente para el tratamiento de hipertensión arterial (ATH) y desordenes cardiovasculares) (Main, 1990; Bart *et al.*, 1999; Gotor-Fernández *et al.*, 2006; Kamal *et al.*, 2009; Ghanem, 2007).

Las propiedades de enantioselectividad de las lipasas se debe esencialmente a su estructura proteica. Estudios estructurales han permitido establecer que las lipasas presentan dos conformaciones diferentes (Sabuquillo *et al.*, 1998; Bastida *et al.*, 1998; Fernández-Lafuente 1998; Rasor and Voss, 2001). Sin embargo, en medios acuosos homogéneos, la lipasa presenta una estructura con el centro activo aislado del medio de reacción por una cadena polipeptídica, llamada tapadera ("flat o lid"), impidiendo la entrada de los sustratos y originando una forma inactiva de la enzima (conformación cerrada). Esta conformación cerrada se encuentra en un cierto equilibrio con una forma

minoritaria en la que el lid se encuentra desplazado dejando expuesto el centro activo al medio de reacción (forma abierta y activa). Este mecanismo se debe a la interacción de los residuos hidrofóbicos de la cara interna del lid con otras zonas de la superficie de la lipasa a través de puentes salinos, de hidrógeno, etc. Sin embargo, las lipasas en presencia de interfases hidrofóbicas se absorben sobre la interfase con el centro activo completamente abierto, lo que se denomina “mecanismo de activación interfacial de lipasas” (Desnuelle, 1972; Verger, 1997; Brzozowski *et al.*, 1991; Mingarro *et al.*; 1995; Miled *et al.*, 2001).

A pesar de las excelentes propiedades de actividad, especificidad, enantio y regio selectividad (Desnuelle, 1972; Rasor and Voss, 2001; Koeller and Wong, 2001; Queiroz and Nascimento, 2002; Rantwijk and Sheldon, 2004; Secundo *et al.*, 2006; Rivera y Garcia, 2007; Ramesh and Plate, 2008; Tufvesson 2011), al igual que la mayoría de las enzimas, las lipasas no siempre poseen la estabilidad necesaria para ser utilizadas en procesos industriales. Teniendo en cuenta los cambios conformacionales que pueden ocasionarse en el entorno del centro catalítico de las lipasas y el gran número de fuerzas de interacción implicadas en la estructura molecular del centro activo de las lipasas, pareciera ser que sus propiedades biocatalíticas podrían ser fácilmente alterables. A su vez estos cambios conducirían a una posible modulación de las propiedades biocatalíticas con relativa facilidad utilizando diferentes técnicas de Ingeniería enzimática (Hernaíz *et al.*, 1997; Arroyo, 1998; <http://www.icp.csic.es/biocatalisis/web3/Palomoweb/uusframe/interes3.html>).

Una de las estrategias utilizadas para la modulación de propiedades biocatalíticas es la ingeniería del medio de reacción. Se ha demostrado por diferentes estudios el efecto de cambios en las condiciones del medio de reacción (pH, fuerza iónica, y el solvente utilizado) sobre el equilibrio conformacional de las lipasas y la modificación de propiedades biocatalíticas de la enzima (Sánchez, 1998; Sugimura *et al.*, 2000; Carrea and Riva, 2000; Azanza, 2001; Bornscheuer, 2002; Palomo *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2011; Godoy *et al.*, 2011b). Otra de las estrategias es la ingeniería conformacional, en la que mediante el uso de diferentes técnicas de inmovilización, se pueden

conseguir diferentes orientaciones al unir la enzima a través de diferentes zonas de la superficie enzimática, unión que además puede ser por uno o varios puntos rigidificando a la enzima de distinta forma. Se ha demostrado que diferentes orientaciones y/o grados de rigidez de las enzimas producen cambios en las propiedades biocatalíticas, y con ello un incremento de la estabilidad térmica y operacional, y la posibilidad de recuperación y reutilización de la misma (Bastida *et al.*, 1998; Sabuquillo *et al.*, 1998; Mateo *et al.*, 2000; Fernandez-Lorente *et al.*, 2001; Ghanem, 2007; Bolivar *et al.*, 2008; Forde *et al.*, 2010).

Otra estrategia metodológica utilizada para modificar las propiedades biocatalíticas de las enzimas es la modificación químico-estructural de los diferentes grupos funcionales de la superficie proteica, como son: el grupo amino, tiol o carboxílico de la cadena lateral de los aminoácidos, lisina, cisteína, ácido aspártico y glutámico. Entre las técnicas de modificación química que se pueden implementar y que permiten la introducción de diferentes grupos reactivos cambiando la reactividad de la enzima, se encuentran PEGilación, succinilación y aminación (Bart *et al.*, 1999; Sabuquillo *et al.*, 1998; Bastida *et al.*, 1998; Rasor and Voss, 2001). Las ventajas que ofrece la modificación química se incrementan aún más si la modificación es realizada en enzimas previamente inmovilizadas. Con esta metodología se tienen ventajas como: fácil control de la reacción y tiempo de la misma, sencillez del proceso (siempre y cuando el soporte no reaccione con los reactantes usados en el proceso de modificación), protección de grupos importantes (evitando efectos negativos que lleven a una pérdida de actividad), así como otras relacionadas con la naturaleza de la proteína (Sabuquillo *et al.*, 1998; Bart *et al.*, 1999; Rasor and Voss, 2001; Ghanem, 2007; Baslé *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2011).

En este trabajo, se evaluó el efecto de la modificación química (aminación, succinilación y pegilación) sobre las propiedades biocatalíticas de actividad, estabilidad y enantioselectividad de la lipasa B de *Cándida antártica* y la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* en la resolución cinética de los enantiómeros del éster del mandelato de metilo y de los aminoalcoholes propanolol y atenolol mediante técnicas de cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de modificaciones químicas sobre las propiedades biocatalíticas de la lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B) y *Pseudomonas fluorescens* (PFL) en la resolución cinética de los amino alcoholes: propanolol y atenolol.

Objetivos específicos

- ✓ Estudiar el efecto de la modificación química de las enzimas inmovilizadas CAL-B y PFL, mediante reacciones de PEGilación, aminación y succinilación, sobre las propiedades biocatalíticas de actividad y estabilidad.
- ✓ Determinar el efecto del grado de modificación química sobre las propiedades catalíticas de las enzimas comerciales CAL-B y PFL.
- ✓ Modular las propiedades biocatalíticas de CAL-B y PFL mediante modificación química e inmovilización covalente en soportes poliméricos con grupos epóxidos de Eupergit C.
- ✓ Evaluar el efecto de la modificación y de la inmovilización de las lipasas de CALB y PFL sobre la resolución cinética del mandelato de metilo, propanolol y atenolol.

MARCO TEÓRICO

1 LIPASAS

Las lipasas (triacil glicerol acil-hidrolasas EC 3.1.1.3) o carboxilesterasas, son enzimas que naturalmente catalizan la hidrólisis de los enlaces éster de aceites y grasas para formar ácidos grasos libres (diglicéridos, monoglicéridos) y glicerol. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pero solamente las de origen microbiano son comercialmente significativas.

Las aplicaciones que tienen las lipasas en la industria actual son múltiples y van desde la fabricación de detergentes, alimentos (leche, queso, panadería), obtención de productos químicos de interés, industria del papel, industria química farmacéutica, industria agroquímica, cosmética, e incluso se hacen investigaciones para la producción de biodiesel, entre otras. Las lipasas de origen microbiano, son las más utilizadas en la industria química por presentar alta especificidad y elevada regio- y enantio-selectividad. (Taylor, 1996; Jaeger and Reetz, 1998; Benjamin and Pandey, 1998; Lyer and Ananthanarayan, 2008; Gaur *et al.*, 2008)

Las lipasas tienen la capacidad de catalizar una gran variedad de reacciones que incluyen esterificación, trans-esterificación, acidólisis, alcoholólisis y aminólisis además de la hidrólisis de triglicéridos, tal como se muestra en la **Figura 1** (Koeller and Wong, 2001; Rantwijk and Sheldon, 2004; Secundo *et al.*, 2006; Gotor-Fernández *et al.*, 2006).

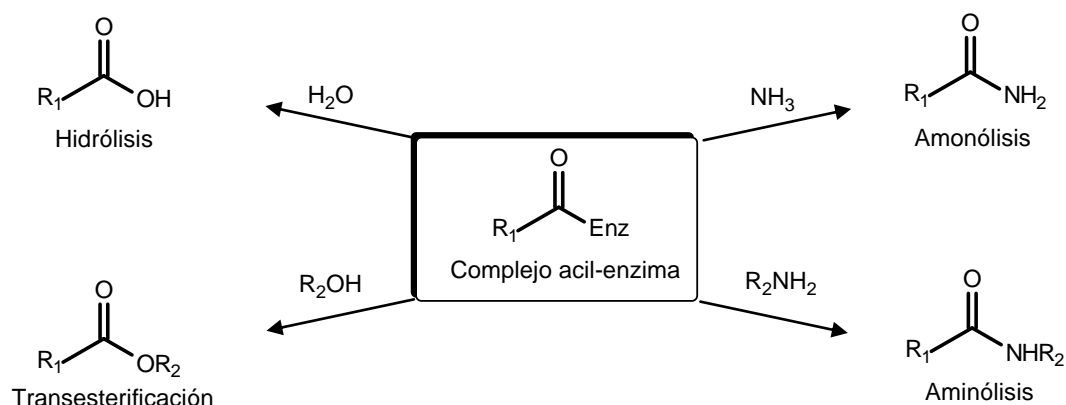


Figura 1. Reacciones catalizadas por lipasas.

Por otro lado, las lipasas son enzimas solubles en agua que catalizan la hidrólisis de sustratos apolares generalmente insolubles en este medio, por lo que actúan unidas a interfaces lípido-agua mostrando un incremento en la actividad catalítica, el cual es atribuido a un cambio en la estructura conformacional (Sarda and Desnuelle, 1985; Cambillau and Tilbeurgh, 1993; Martinelle *et al.*, 1995; Derewenda, 1994; Balcao *et al.*, 1996; Bastida *et al.*, 1998; Fernández-Lafuente *et al.*, 1998; Brockman, 2004; Aloulou *et al.*, 2006).

1.1 Mecanismo catalítico de las lipasas

La información obtenida a partir de estudios cristalográficos y de rayos X realizadas en los años 90, permitió establecer que la estructura nativa de las lipasas presenta un mecanismo catalítico complejo, denominado mecanismo de “activación interfacial”, el cual es indispensable para la función biológica de las lipasas. Este mecanismo es un sistema dinámico de interconversión entre dos conformaciones de la proteína, una cerrada y otra abierta.

Las conformaciones abierta y cerrada, se deben a la presencia de una estructura molecular cercana al sitio activo de la enzima denominada lid o tapadera (segmento helicoidal de la cadena proteica), la cual presenta en la cara interna residuos hidrofóbicos. En medios acuosos homogéneos la zona hidrofóbica del lid interacciona con las zonas hidrofóbicas que rodean al sitio activo, desplazando el equilibrio hacia la conformación cerrada de la proteína, disminuyendo así la posibilidad de interacción entre la enzima y el sustrato. Mientras que en medios o fases hidrofóbicas (como por ejemplo, gotas de grasa o aceite, superficies hidrofóbicas, etc.) este lid interacciona con otras zonas de la superficie dejando el sitio activo expuesto como se observa en la **figura 2**, adquiriendo una conformación abierta, estable y accesible al sustrato (Martinelle *et al.*, 1995; Verger, 1997; Kim *et al.*, 1997; Bastida *et al.*, 1998; Fernández-Lafuente *et al.*, 1998; Sabuquillo *et al.*, 1998; Rasor and Voss, 2001; Brockman, 2004; Aloulou *et al.*, 2006; Ericsson *et al.*, 2008; Godoy *et al.*, 2009; Godoy *et al.*, 2011 a; Fernández-Lorente *et al.*, 2012).

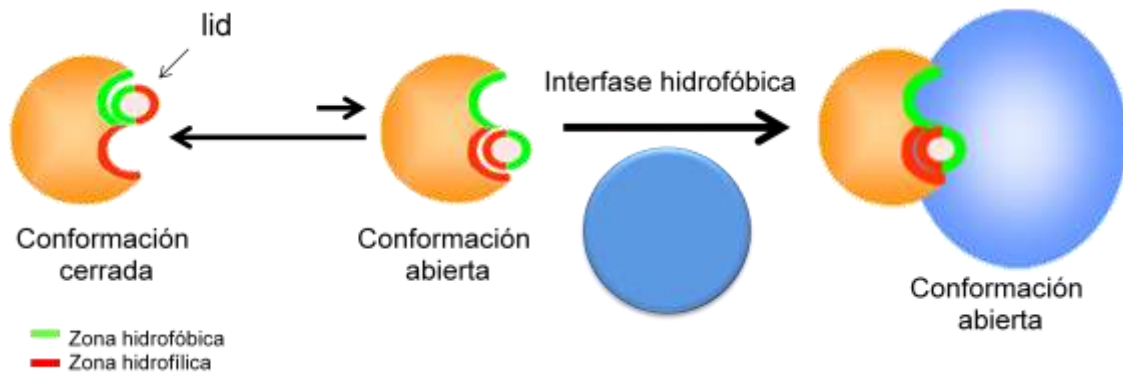


Figura 2. Mecanismo de activación interfacial de las lipasas.

Por otro lado, las lipasas forman parte del grupo de las serina-hidrolasas, por lo que el sitio activo está conformado por una triada catalítica que contiene una serina que es activada por una histidina y un residuo de glutámico o aspártico. También posee un grupo de residuos hidrofóbicos dispuestos alrededor de la serina catalítica que constituye una región electrofílica conocida como hueco oxianiónico cuya función es la de estabilizar la carga negativa del grupo carbonilo del sustrato durante el estado de transición.

El sustrato (éster) forma un intermediario tetraédrico acil-enzima al reaccionar con el grupo OH de la serina (**Figura 3**), donde finalmente la carga negativa que se localizó en el átomo de oxígeno de la serina, sufre una traslocación hacia el oxígeno del grupo carbonilo, originando un oxianión el cual encaja en el hueco oxianiónico que se forma tras la apertura del lid. Tras la liberación del grupo alcohol el intermediario tetraédrico se rompe, formando el complejo acil-enzima. Se produce un segundo ataque nucleofílico sobre el carbono carbonilo del complejo acil-enzima, siendo la molécula de agua el nucleófilo en el caso de la hidrólisis. Se forma un nuevo intermediario tetraédrico que finalmente se rompe, liberando un ácido graso y regenerando el OH de la serina (Arroyo, 1999; Muralidhar *et al.*, 2002; Rantwijk and Sheldon, 2004; Baltz *et al.*, 2010).

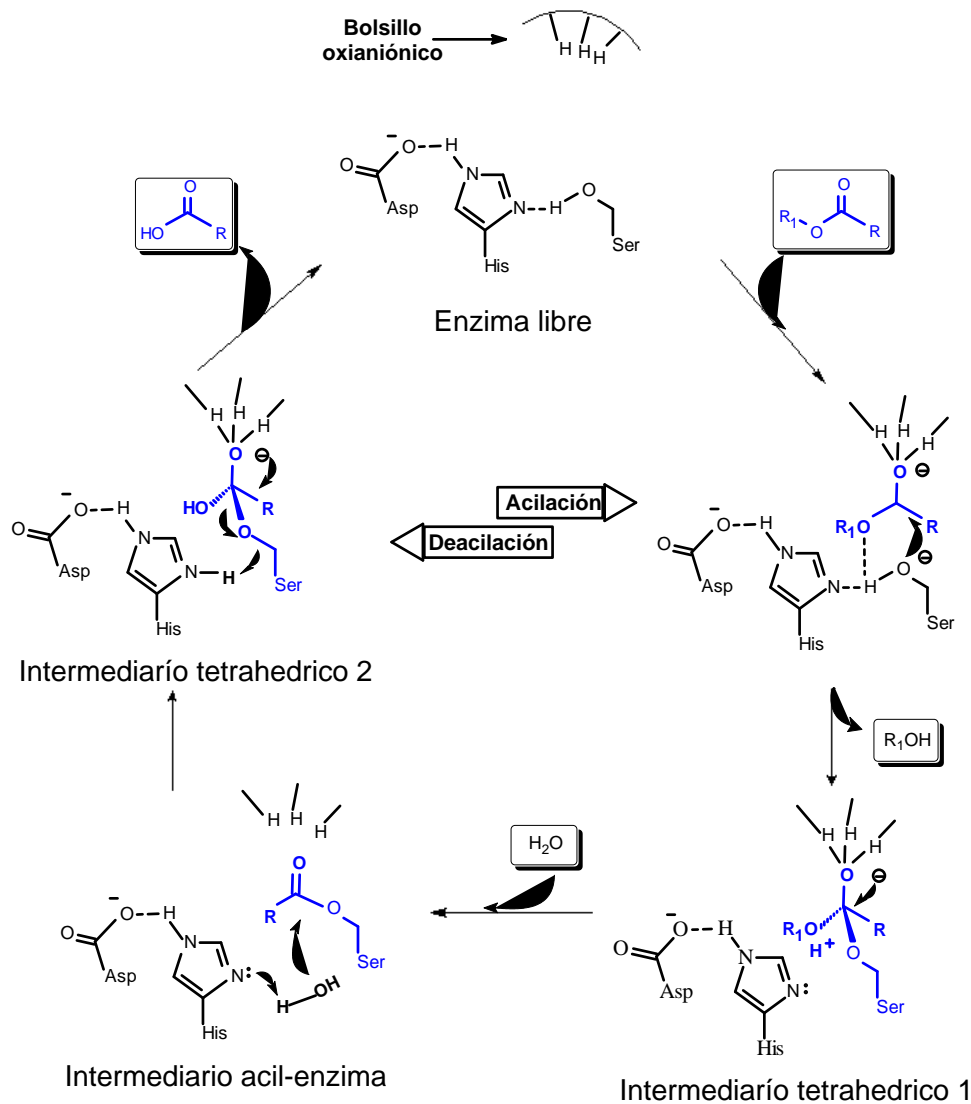


Figura 3. Mecanismo catalítico de las lipasas.

1.2 Lipasa B de *Candida antarctica* (CAL B)

La lipasa B de *Candida antarctica* es probablemente la lipasa más utilizada a nivel industrial (Jaeger and Reetz, 1998; Arroyo, 1998; Zhang *et al.*, 2003; Hollmann *et al.*, 2009). Estas lipasas catalizan diversas reacciones, presentan estabilidad frente a solventes orgánicos y estabilidad térmica, además de estéreo-especificidad y alta enantio-selectividad. Estudios cristalográficos concluyeron que la enzima posee 317 aminoácidos, peso molecular aproximado de 33 KDa y punto isoeléctrico de 6.0. En comparación con otras lipasas su lid es una cadena polipéptica que no recubre totalmente el sitio activo. Razón por la que no presenta un incremento claro de actividad en

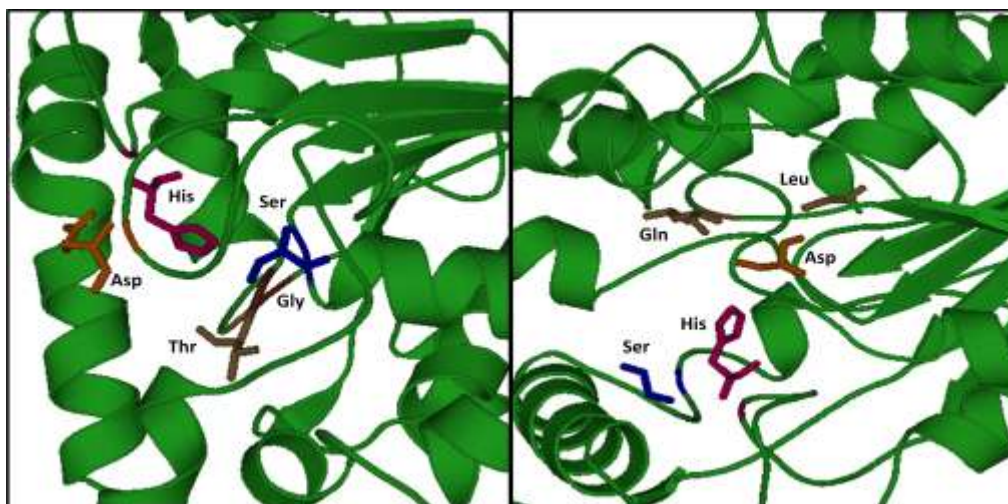
presencia de interfases hidrofóbicas (Uppenberg *et al.*, 1994; Patkar *et al.*, 1997; Domínguez *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2006; Ericsson *et al.*, 2008; Forde *et al.*, 2010).

Los aminoácidos que conforman la triada catalítica de la lipasa B son serina 105, histidina 224 y el ácido aspartico 187. Los aminoácidos glicina 39 y treonina 40 corresponden al hueco o bolsillo oxianiónico (**figura 4a**) (Uppenberg *et al.*, 1994).

1.3 Lipasa de *Pseudomona fluorescens* (PFL)

Las lipasas de *Pseudomona fluorescens* son usadas principalmente en reacciones orgánicas en la producción quiral de compuestos racémicos. Debido a que existen diferentes cepas de *Pseudomona fluorescens* productoras de lipasas, se encuentran lipasas con pesos moleculares que van desde 16KDa hasta 450KDa, siendo más utilizadas las de 33 KDa. Las lipasas de PFL poseen puntos isoeléctricos entre 4.6-4.9, presentan actividades óptimas en rango de pH neutros y algunas baja estabilidad frente a la temperatura (Gilbert, 1996; Makhzoum *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997; Fernández-Lorente *et al.*, 2001; Francesco, 2001; Kojima and Shimizu, 2003).

Los aminoácidos que conforman la triada catalítica son: serina 87, histidina 286 y el ácido aspártico 264. Los aminoácidos glutamina 88 y leucina 17 corresponden al hueco o bolsillo oxianiónico (**figura 4 b**)(Palomo *et al.*, 2005).



Fuente. PDB a) 1TCA y b) 2LIP

Figura 4. Triada catalítica de: a) lipasa B de la *Candida antarctica* (CALB), b) Lipasa de *Pseudomona fluorescens*.

2 LIPASAS COMO BIOCATALIZADORES

Las lipasas, son hidrolasas que han atraído considerable atención como biocatalizadores representando en la actualidad el 25% de todas las enzimas utilizadas en procesos industriales.

Las lipasas forman parte de una de las familias de enzimas más utilizadas en la industria por su gran versatilidad, con diversas aplicaciones biotecnológicas. Estas enzimas aceptan una gran variedad de sustratos y catalizan una amplia gama de reacciones químicas de impacto tecnológico, exhibiendo alta especificidad y enantioselectividad (Mingarro, 1995; Sharma *et al.*, 2001; Reetz, 2002; Yadav and Sivakumar, 2004; Ghanem, 2007; Illanes, 2008).

Sin embargo, en medios orgánicos las lipasas son insolubles y presentan bajas actividades específicas, por lo que se requiere el uso de grandes cantidades de enzima para la biocatálisis, lo cual a nivel industrial es poco atractivo desde el punto de vista económico. Desde el punto de vista operacional, al ser solubles en agua, son difíciles de separar del producto causando contaminación e imposibilitando la posterior reutilización (Koops *et al.*, 1999; Hernaíz., *et al.*, 1999; Knezevic *et al.*, 2006; Cowan and Fernández-Lafuente, 2011).

Entre las diferentes estrategias para mejorar las propiedades biocatalíticas, la inmovilización de enzimas sobre soportes insolubles y la modificación química, constituyen alternativas que normalmente permiten incrementar la estabilidad térmica y operacional. La inmovilización permite un mejor control de la reacción, lo que supone además poder trabajar en continuo y automatizar los procesos (Kodera *et al.*, 1998; Bai and Zhou, 2004; Rodríguez *et al.*, 2009 a; Tardioli *et al.*, 2010; Tufvesson *et al.*, 2011). La modificación química controlada de las enzimas solubles y/o inmovilizadas también ha permitido la modificación de las propiedades catalíticas de las lipasas (khajeh *et al.*, 2001; López-Gallego *et al.*, 2005; Wang and Tsai, 2009, Cabrera *et al.*, 2009; Godoy *et al.*, 2009; Baslé *et al.*, 2010; Cowan and Fernández-Lafuente, 2011).

2.1 Inmovilización de lipasas

Desde los años 90, se han venido desarrollando métodos de inmovilización de enzimas, que permiten desarrollar nuevos derivados de forma controlada. Estos métodos disponibles para la inmovilización de enzimas pueden ser divididos en dos clases generales: métodos químicos en los cuales se forman enlaces covalentes entre la enzima y el soporte y métodos físicos en los cuales se presentan interacciones hidrofóbicas, iónicas, puentes de hidrógeno, covalentes entre el soporte y la enzima, como lo muestra la **figura 5** (Bastida *et al.*, 1998; Koeller and Wong, 2001; Reetz, 2002; Cabrera *et al.*, 2009). Los métodos de inmovilización pueden ser reversibles, como la adsorción, enlace metálico, enlace iónico, formación de puentes disulfuro; e irreversibles, como unión covalente, atrapamiento en fibras y geles, encapsulación y entrecruzamiento (Baldo *et al.*, 1996; Katchalski-Katzir *et al.*, 2000; De la Casa *et al.*, 2002; Chiou and Wu, 2004; knezevic *et al.*, 2006; Mateo *et al.*, 2007 a; Pedroche *et al.*, 2007; Cowan and Fernández-Lafuente *et al.*, 2011).

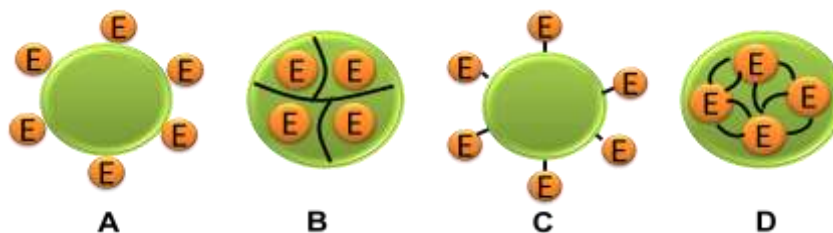


Figura 5. Métodos de inmovilización física y química de enzimas: A) Adsorción, B) Atrapamiento, C) Unión covalente, D) Entrecruzamiento.

La utilización de diferentes estrategias de inmovilización, va a permitir alterar mediante cambios de orientación y rigidez, el equilibrio entre la conformación cerrada y abierta de las lipasas, es decir, del sitio activo. De esta manera, se ven alteradas las propiedades biocatalíticas (actividad, selectividad y estabilidad) (Fernández-Lafuente *et al.*, 1998; Mateo *et al.*, 2000 a; Fernández-Lorente *et al.*, 2001; Bolívar *et al.*, 2008; Lyer and Ananthanarayan, 2008).

Estudios recientes, realizados por Hernández y colaboradores (2011), describen cómo una diferente orientación y grado de rigidez de la lipasa B de

Candida antarctica, puede proteger zonas importantes en la enzima frente al medio de reacción. Los derivados inmovilizados de la CALB en soportes de glutarandehido-sephabeads, Novozyme 435 y octadecil-Sephabeads, se sometieron a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (superácido subproducto de algunas reacciones industriales que afecta en gran medida a las enzimas) presentando grandes diferencias en la estabilidad. La CALB inmovilizada hidrófobicamente sobre el soporte de octadecil-sephabeads mantuvo la mayor estabilidad con una actividad de 75% contra el 40 y 55% de actividad de la misma lipasa inmovilizada de forma unipuntual al soporte glutaraldehido-Sephabeads e inmovilizada por atrapamiento (Novozyme 435) sobre una resina acrílica respectivamente al cabo de 24 h de incubación.

2.1.1 Inmovilización por adsorción interfacial sobre soportes hidrofóbicos

Normalmente las lipasas se absorben a baja fuerza iónica (condición en la que otras enzimas no logran ser inmovilizadas) sobre soportes poliméricos activados con grupos hidrofóbicos (Sabuquillo *et al.*, 1998; Bastida *et al.*, 1998). A baja fuerza iónica, las lipasas se adsorben fuertemente a través de un gran bolsillo hidrofóbico (formado por la cara interna del “lid” y las zonas que rodean al centro activo). Sin embargo, al aumentar la fuerza iónica, las lipasas se adsorben a través de las zonas hidrofóbicas de la superficie enzimática, estabilizando en ambos casos la forma abierta de la lipasa (**figura 6**).

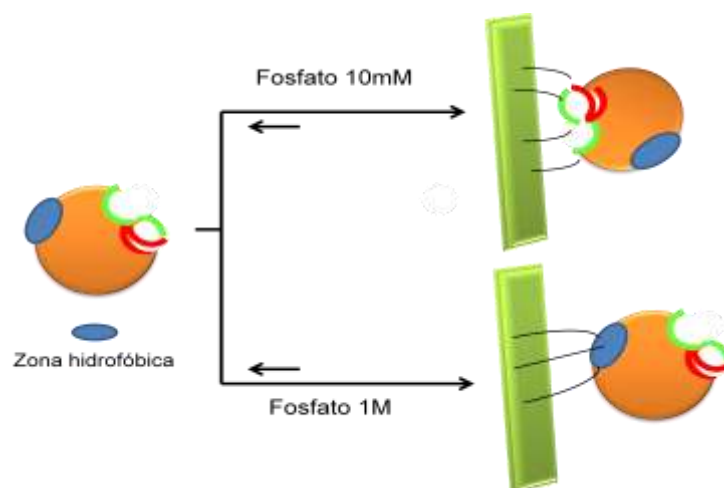


Figura 6. Inmovilización por adsorción hidrofóbica a diferente fuerza iónica

Este mecanismo de adsorción interfacial permite además: la purificación, inmovilización e hiperactivación interfacial de las lipasas en un solo paso. Además, se logra la recuperación del soporte, debido a la reversibilidad parcial de las interacciones enzima-soporte (Mingarro *et al.*, 1995; Balcao *et al.*, 1996; Sabuquillo *et al.*, 1998; Bastida *et al.*, 1998; Fernández-Lafuente *et al.*, 1998; Miled *et al.*, 2001; Mateo *et al.*, 2007 a; Fernández-Lorente *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que la modificación de las condiciones del medio también permite modular las propiedades biocatalíticas al alterar las interacciones en la superficie de las lipasas (Cao, 2005; Illanes *et al.*, 2012). Además de las condiciones del medio (fuerza iónica, temperatura o pH), algunas características de los soportes como la hidrofobicidad afectará la fuerza con la que ésta se adsorba al soporte. A mayor hidrofobicidad mejor será la capacidad del soporte para retener la mayor cantidad de actividad enzimática. Entre los soportes hidrofóbicos, se encuentra el soporte de octil-agarosa con un grado de hidrofobicidad mayor que los soportes de butil-agarosa, fenil-agarosa y octadecil-sephabeads (Fernández-Lorente *et al.*, 2008).

Generalmente las lipasas inmovilizadas sobre octil-agarosa presentan cinéticas de primer orden (con altas constantes de afinidad K_m) debido a la baja afinidad de la enzima por el sustrato. Este comportamiento se debe a que el soporte altamente hidrofóbico puede llegar a interferir en cierto grado con la normal difusión de sustratos hidrofílicos o muy grandes hacia el centro activo de la enzima tal y como lo muestra la **figura 7**; lo cual genera una disminución en la velocidad de reacción (Bastidas *et al.*, 1998; Fernández-Lafuente *et al.*, 1998; Palomo *et al.*, 2002a; Mateo *et al.*, 2007b). De esta manera, la actividad enzimática de lipasas inmovilizadas sobre soportes muy hidrofóbicos, dependerá de la naturaleza del sustrato. Un ejemplo lo constituye el estudio realizado por Fernández-Lorente y colaboradores (2008) en el cual se inmovilizó la lipasa de *Bacillus termocatenuatus* (BTL) sobre soportes de diferente hidrofobicidad. La BTL inmovilizada sobre octil agarosa fue más enantioespecífica en la hidrólisis del ácido (S)-2-O-butiril-2-fenil-acético (Enantioselectividad (E) mayor a 100) que la inmovilizada sobre butil-Toyopearl (E= 8). Por el contrario, cuando se evaluó la hidrólisis asimétrica del ácido di-etil diéster fenil-glutárico, la enantioselectividad más baja (E=3) se presentó con

el soporte Butil-toyopearl comparada con (E mayor a 100) el soporte de octil-agarosa.

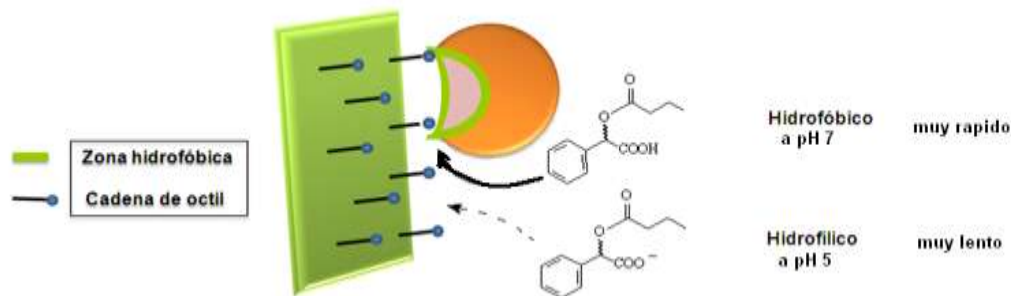


Figura 7. Impedimento estérico ocasionado por el soporte hidrofóbico sobre sustratos de naturaleza diferente (hidrofóbicos e hidrofílicos). Figura modificada de Palomo, 2002 a.

2.1.2 Inmovilización de lipasas por unión covalente

La inmovilización por unión covalente se basa en la capacidad que presentan los grupos funcionales de los soportes (por ejemplo grupos epóxido, metálicos, amino, etc) con las cadenas laterales de los aminoácidos en la superficie de la proteína (ϵ -NH₂ de las lisinas, -SH de las cisteínas, -OH de las tirosinas y serinas; -COOH de ácidos aspárticos, glutámicos e histidina, y en menor medida, la metionina, el triptófano y la arginina). El resto de aminoácidos no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica debido al carácter hidrófobo, y no pueden unirse covalentemente (**figura 8**) a través de bases de Schiff, dando lugar a otros tipos de enlace (amida, éter, tio-éter o enlaces carbamatos) (Fernández-Lafuente *et al.*, 1998; Cao, 2005; Fernández-Lafuente *et al.*, 2006; Mateo *et al.*, 2007 a y b; Bolívar *et al.*, 2008).

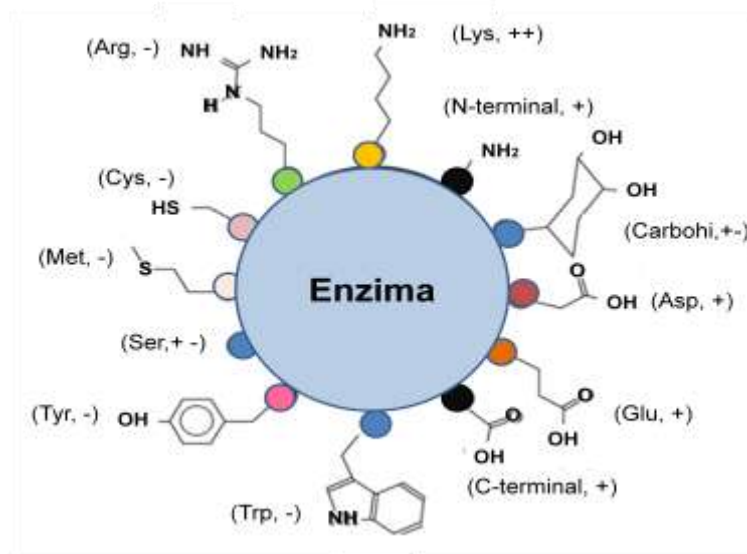


Figura 8. Aminoácidos reactivos en la superficie enzimática: (++) utilizados con mayor frecuencia en la inmovilización; (+) usados con frecuencia; (+-) escasamente usados; (-) no usados. Figura tomada de Cao, 2005.

Por otro lado, la formación del enlace covalente puede presentarse por la unión de un solo grupo reactivo (inmovilización unipuntual, **figura 9**). En este caso la inmovilización no afecta la rigidez de la enzima y prácticamente simula la enzima en su forma libre.

Cuando la unión covalente es multipuntual (**figura 9**), se producen diferentes grados de rigidez de la estructura enzimática generando diferentes grados de estabilidad (Fernández-Lafuente *et al.*, 1998; Mateo *et al.*, 2000 a y b; Cao, 2005; Fernández-Lafuente *et al.*, 2006; Mateo *et al.*, 2007 b; Bolívar *et al.*, 2008; Tardioli *et al.*, 2010; Godoy *et al.*, 2011).

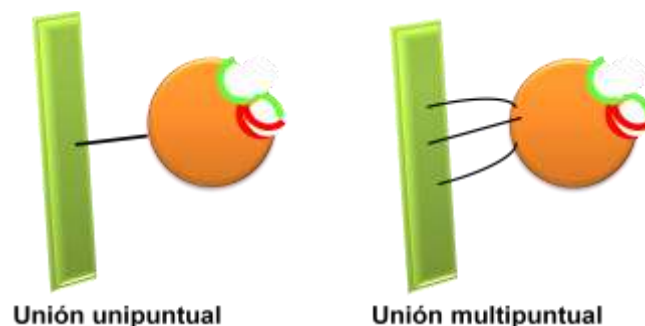


Figura 9. Tipos de uniones covalente enzima-soporte

La inmovilización covalente multipuntual se realiza través de dos etapas como lo muestra la **figura 10**. Durante la primera etapa, la proteína se adsorbe físicamente al soporte generalmente en condiciones de alta fuerza iónica, seguida por la unión covalente “intramolecular” entre algunos grupos nucleofílicos de la enzima adsorbida (amino, tio y hidroxilo) y la densa capa de grupos epóxido del soporte (Cao, 2005; Knezevic *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2009 b).



Figura 10. Etapas de inmovilización covalente multipuntual.

Entre los diferentes soportes capaces de generar uniones covalentes (como los soportes glioxil-agarosa, cloruro de tosilo, bromuro de cianógeno, MANAE-agarosa, soportes activados con glutaraldehído, etc.) se encuentran los soportes comerciales activados con grupos epóxido Eupergit C y Sephabeads.

Eupergit C y Sephabeads, son soportes acrílicos capaces de reaccionar con los diferentes grupos de la superficie proteica (aminos, carboxilos, sulfidrilos, etc), generando inmovilizaciones de tipo multipuntual muy estables (Mateo *et al.*, 2000 a y b; Katchalski-katzir *et al.*, 2000; Cao, 2005; Knezevic *et al.*, 2006).

Debido a que estos soportes acrílicos son capaces de reaccionar en condiciones operacionales suaves, los procesos de inmovilización puede durar horas o incluso días (Grazú *et al.*, 2003; Mateo *et al.*, 2006). Siendo esta la razón por la que varios autores (Mateo *et al.*, 2000 a y b; López-Gallego *et al.*, 2004; Mateo *et al.*, 2007 b; Bolívar *et al.*, 2009 y 2010; Escorcía *et al.*, 2010) ensayaron la modificación de los soportes epóxidos mediante la adición de nuevos grupos reactivos, obteniendo así soportes epóxido multifuncionales con grupos amino, carboxilo, borato o quelatos metálicos que facilitan esa primera

adsorción sin necesidad de emplear alta fuerza iónica. De esta manera, lograron mejorar los tiempos y rendimientos de inmovilización; además, la modificación de los soportes permitió su utilización en medio con valores de pH menores a 10 (pH donde la formación de enlaces covalentes es rápida).

2.2 Modificación química de la superficie enzimática de lipasas

La modificación química de proteínas ha sido una estrategia ampliamente usada para modular las propiedades biocatalíticas de las enzimas. Se realiza mediante la alteración de interacciones moleculares o de la estructura molecular de las enzimas, utilizando técnicas como: la modificación genética (mutagénesis sitio-dirigida) o la modificación química.

Para llevar a cabo la modificación química no es necesario conocer la estructura tridimensional de la proteína y en comparación con la modificación genética, resulta mucho más rápida y fácil de controlar (Khajeh *et al.*, 2001; López-Gallego *et al.*, 2005; Wang and Tsai, 2009, Cabrera *et al.*, 2009; Godoy *et al.*, 2009; Baslé *et al.*, 2010; Cowan and Fernández-Lafuente, 2011).

La modificación química hace uso de los grupos ionizables en la superficie enzimática que son capaces de actuar como nucleófilos permitiendo la introducción de una gran variedad de grupos con reactividades diferentes a los grupos naturales de la proteína.

Entre las técnicas de modificación química se destacan: a) la PEGilación, que produce la unión de polietilenglicol (PEG) de diferentes pesos moleculares a la enzima (Kodera *et al.*, 1998, Hernáiz *et al.*, 1999, Godoy *et al.*, 2011b); b) la introducción de grupos hidroxilos, que aumenta la carga negativa de la enzima; c) la succinilación, que aumenta cargas negativas (Sashiwa and Aiba, 2004; Jurcek *et al.*, 2008; Cabrera *et al.*, 2009); d) la aminación, que aumenta los grupos amino y cargas positivas mediante el uso de poli(amidoamina) (PAMAM) o polietilenimina (PEI) (Koeller and Wong, 2001; Cabrera *et al.*, 2009); y e) reemplazo de grupos amino con grupos hidrofóbicos sin carga con benziloxycarbonilos o lauroilos (Davis, 2003).

Otras alternativas de modificación química constituyen la formación de complejos o de uniones covalentes con dextran celulosa, etil-celulosa,

glicolípidos, polisacáridos, dextranos o carbohidratos (Cabrera *et al.*, 2009, Kodera *et al.*, 1998, Hernáiz *et al.*, 1999; De la casa *et al.*, 2002; Godoy *et al.*, 2010 y 2011 b) y el uso de surfactantes no iónicos como el Brij 35, Triton X 100 o Tween 80 (Jene *et al.*, 1997; Wheatley and Schmidt Jr, 1999; Biasutti *et al.*, 2008).

En algunos casos, la modificación química puede ser utilizada para modificar la forma en que la enzima puede ser inmovilizada sobre un soporte. Por ejemplo: López-Gallego y colaboradores (2005), Rodrigues y colaboradores (2009b), y Tardioli y colaboradores (2010) adelantaron estudios en los que utilizaron enzimas de gran aplicación con poca cantidad de residuos lisínicos disponibles como la amiloglucosidasa 200L (AMG), penicilina G acilasa (PGA) y glutaril acilasa (GA), sobre las cuales los procesos de inmovilización en soportes de glioxil-agarosa son ineficaces. Las enzimas modificadas vía química mostraron significativos incrementos en estabilidad, acompañados de gran disminución en el tiempo de inmovilización. Esto debido a que la introducción de nuevos grupos amino, ocasionó una disminución en los valores de la constante de disociación (pK), permitiendo la inmovilización de las enzimas en condiciones de pH más bajos.

Además de las modificaciones químicas que se pueden realizar sobre la enzima soluble, es posible modificar los derivados enzimáticos (ya inmovilizados en fase sólida). De esta manera, se ha logrado un mayor control, la disminución de interacciones proteína-proteína, favorecer el uso de medios no compatibles (medios orgánicos anhidros), protección de inhibidores y disminución del efecto inactivante de muchos de los procesos de modificación. En este caso se han utilizado polímeros solubles polifuncionales como polialdehídos obtenidos a partir de dextranos; poliaminas (polietilienimina); polisulfatos (carragenatos) y el entrecruzamiento de las subunidades que no se unieron covalentemente al soporte con polialdehídos (Cabrera *et al.*, 2009; Cowan and Fernández-Lafuente, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011; Talbert and Goddard, 2012).

Finalmente, el grupo hidroxilo de los residuos de tirosina puede ser afectado por el proceso de modificación, razón por la cual se hace necesaria la regeneración del grupo hidroxilo del residuo de tirosina a través de la técnica de hidroxil-aminación a pH básico (Carraway and Koshland Jr, 1968; Geoghegan, 2001; Hermanson, 2008).

Palomo y colaboradores (2007) modificaron por aminación con etilendiamina las lipasas reversiblemente-inmovilizadas de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) y lipasa B de *Candida antarctica* (CALB). Las dos enzimas presentaron un aumento en la actividad catalítica después de ser modificadas, en especial la TLL en un factor de 3 veces. En este sentido el derivado aminado de CNBr-CALB, presentó un incremento en la enantioselectividad en la hidrólisis del ácido (\pm)-2-hidroxi-fenil-acético metil éster de $E=2$ en la enzima sin modificar a E mayor a 100 en la enzima aminada y con una preferencia por el isómero R.

2.2.2 Carboxilación química de los grupos amino con anhídrido succínico

La modificación de los grupos amino (acilación de lisinas y aminos terminal), con anhídrido succínico, permite obtener derivados modificados (**figura 12a**) estables con carga negativa a valores de pH donde el grupos carboxilo están desprotonados (pH mayor a 5). El control del grado de modificación se hace mediante el control de la cantidad de anhídrido succínico sólido adicionado a la reacción.

El anhídrido succínico es un compuesto neutro, que reacciona con la proteína y con agua, liberando grupos ácidos que suprimen los grupos aminos básicos.

Esta modificación de los grupos amino, puede llegar a alterar la solubilidad de la proteína o capacidad para participar en asociaciones intermoleculares. Además, es posible la modificación de los residuos aminoácidos con grupos hidroxilo (de las tirosinas, tiol de las Cisteínas y amino de las Histidinas) en baja proporción (**figura 12b**). Sin embargo, los residuos de histidina y cisteína son espontáneamente deacilados bajo las condiciones de reacción. Por el contrario, los derivados alifáticos de las tirosina eventualmente no se hidrolizan

espontáneamente, por lo que requieren un proceso de hidroxilaminación para volver a su estado natural (Carraway and Koshland Jr, 1968; Alcalde *et al.*, 2001; Geoghegan, 2001; Fuentes *et al.*, 2005).

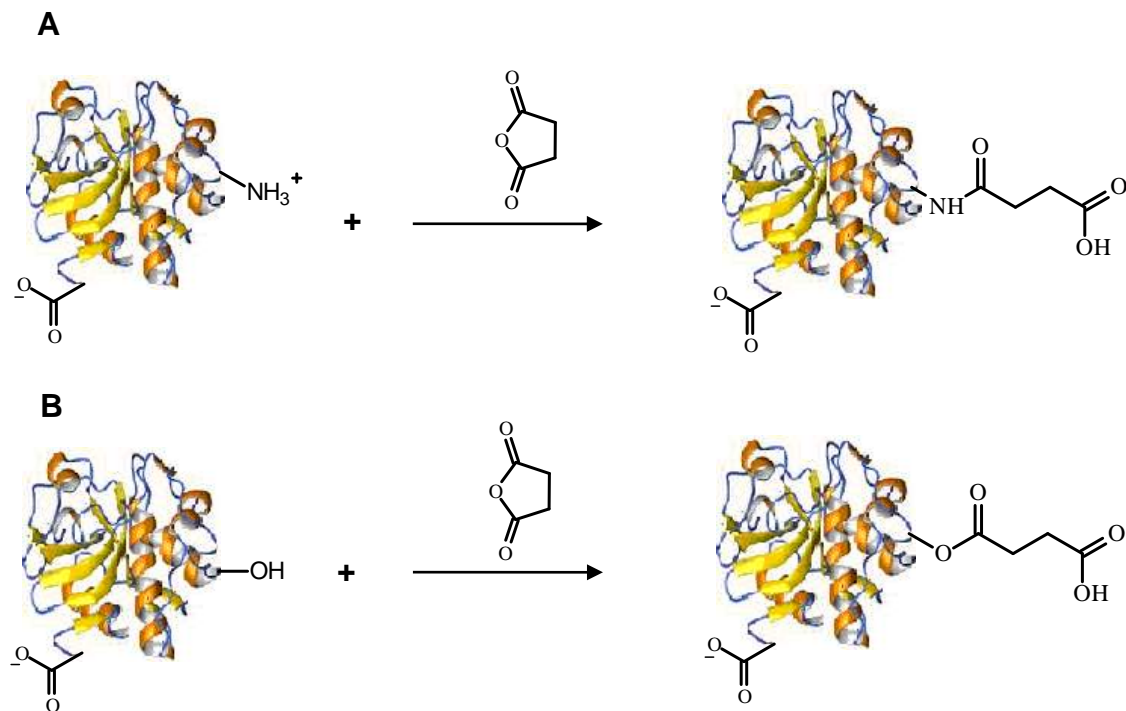


Figura 12. Succinilación química de la superficie enzimática. A) succinilación de grupos amino. B) succinilación de tirosinas. Figura modificada de Geoghegan, 2001.

Cabrera y colaboradores (2009), modificaron la CALB previamente inmovilizada mediante succinilación (Novozyme 435). Se alcanzó un aumento de la enantioselectividad de $E=1$ a $E=13$ en la hidrólisis del (\pm)- mandelato de metilo. En la hidrólisis del ácido (\pm)-2- o-butil-2-fenil-acético, la enantioespecificidad fue alta hacia el enantiómero S ($E>100$), contraria al caso en que la misma enzima había sido modificada por hidroxil-etilaminación ($E=6.6$) con una enantiopreferencia sobre el isómero R.

2.2.3 Pegilación química de los grupos amino con mPEG-COOH

Una estrategia altamente estudiada para incrementar la solubilidad, actividad y estabilidad de las enzimas en solventes orgánicos es la modificación de los

residuos reactivos de la superficie enzimática con polietilenglicol (PEG) a través de uniones covalentes. Se trata de una modificación de gran aplicación a nivel biológico y terapéutico, cuyos estudios iniciaron en 1970 con la pegilación de la albúmina y la catalasa. En la actualidad estos estudios se han expandido al campo de la inmunología y la biocatálisis, entre otros.

El PEG es un polímero anfifílico, inerte y no tóxico con residuos de etileno que confieren hidrofobicidad a la cadena incrementando la solubilidad en medio orgánico, y un oxígeno que permite fuertes interacciones con el agua, lo que ayuda a mantener una capa de agua al rededor de la enzima modificada, resultando esencial para la actividad en solventes orgánicos (Bailon and Berthold, 1998; Hernaíz *et al.*, 1999; Pozzo *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2002; Godoy, *et al.*, 2009; Pinholt *et al.*, 2010).

La conjugación del PEG a otras moléculas se hace a través de los dos grupos hidroxilo terminales de la cadena lineal. Este proceso es típicamente hecho por la generación de un intermediario electrofílico (PEG activado) capaz de acoplarse espontáneamente a un residuo nucleofílico de una segunda molécula (proteína). Dentro de los agentes activantes del polietilenglicol se encuentra el cloruro cianúrico que es altamente tóxico y otros agentes menos tóxicos como p-nitrofenil cloroformato, succinimidil succinato o carbonato, cloruro de tresilo, diclorotriazina entre otros (Koops *et al.*, 1999; Veronese, 2001; Roberts *et al.*, 2002).

De las rutas utilizadas para llevar a cabo pegilación de proteínas y que han sido documentadas por Koderá y colaboradores (1998), Kim y colaboradores (2007), Yamasaki y colaboradores (1988) y Roberts (2002), se encuentra aquella en la que el PEG es activado con grupos funcionales adecuados para la reacción de aminas primarias o ε-amino de los residuos de lisina a través de la generación de un intermediario carboxílico como por ejemplo el mPEG-COOH, SS-mPEG (succinimidil succinato mPEG) (**figura 13**).

Otros autores como Woghiren y colaboradores (1993), Godoy y colaboradores (2010) utilizaron agentes activantes con presencia de grupos tiol para activar polietilenglicoles que posteriormente reaccionaron con los grupos tiol de las

cisteínas (los cuales se encuentran en menor proporción que las lisinas en la superficie enzimática) de la papaína y de la lipasa de *Geobacillus thermocatenulatus* BTL2. De esta manera, se generaron modificaciones sitio dirigidas tras la formación de enlaces di-sulfuro.

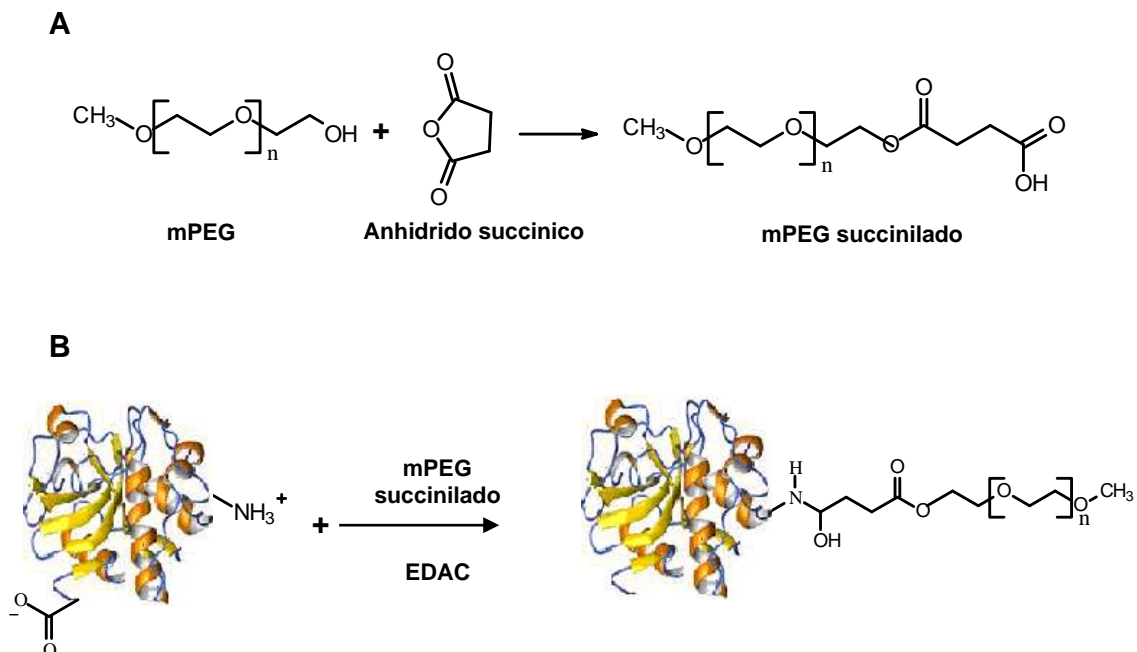


Figura 13. PEGilación de proteínas. A) Obtención de mPEG succinilado. B) Reacción del PEG con los grupos amino de la superficie enzimática. Figura modificada de Godoy, 2010.

3 RESOLUCIÓN CINÉTICA CATALIZADA POR LIPASAS

La resolución cinética de compuestos racémicos es probablemente la biotransformación por excelencia de las lipasas en procesos de síntesis orgánica. Al igual que las esterasas, las lipasas son proteasas serínicas empleadas en la síntesis de drogas quirales y agroquímicos, donde su centro activo cataliza la hidrólisis o la síntesis de ésteres mediante mecanismos de acilación – deacilación, siendo los aminoalcoholes enantioméricamente puros los compuesto más importantes con actividad biológica en este tipo de catálisis quirales (Bianchi, 1989; Gotor-Fernández *et al.*, 2006; Wang and Tsai, 2009).

Los acildonores seleccionados y utilizados en la resolución de alcoholes racémicos para el proceso de trans-esterificación son ésteres de enol, como acetato de vinilo o acetato de isopropenil, donde el primero forma una tautomerización cetoenólica para obtener acetaldehído, mientras que el segundo tautomeriza la formación de la acetona.

El éxito de la resolución cinética de racematos depende de las diferencias de velocidad entre los dos enantiómeros al reaccionar con una entidad quiral, las cuales aparecen cuando k_1 es diferente de k_3 , lo cual permite aumentar la concentración del enantiómero que es transformado más rápido (**figura 14**) (Chen *et al.*, 1982; Ghanem, 2004 y 2007; Cammenberg *et al.*, 2006)

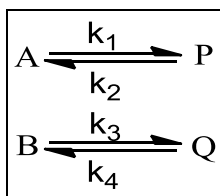


Figura 14. Resolución cinética catalizada por lipasa para un sistema reversible. La resolución ocurre cuando k_1 es diferente de k_3 , tal que entre mayor sea la diferencia una mejor resolución es obtenida. Para un sistema irreversible $k_2 = k_4 = 0$

Para la reacción de resolución cinética catalizada por lipasas para un sistema reversible, en el estado inicial de la reacción la enzima reacciona preferiblemente sobre el enantiómero A (reactante más rápido) y lo transforma en su respectivo producto P, mientras la concentración del enantiómero B (reactante lento) se mantiene casi intacta. Cuando se establece el equilibrio entre el enantiómero A y el producto P, la concentración del enantiómero B comienza a cambiar, disminuyendo la pureza óptica del enantiómero A remanente y del producto P. Por esta razón, el tiempo óptimo para terminar la resolución es cuando se haya alcanzado el equilibrio del reactante rápido (Chen *et al.*, 1982; Ghanem, 2004).

Por otra parte, en una reacción de resolución cinética irreversible la velocidad de transformación de cada enantiómero varía con el grado de conversión, debido a que la relación entre los dos enantiómeros no se mantiene constante a lo largo del proceso.

En este sentido, las reacciones de resolución cinética tanto reversible como irreversible, van a depender de las condiciones del medio de reacción. En medios acuosos se producirá la reacción irreversible de hidrólisis donde el nucleófilo es el agua y en medios orgánicos las reacciones reversibles reemplazaran el agua como nucleófilo, por otros compuestos para llevar a cabo reacciones de transesterificación (**figura 15**) (Carrea and Riva, 2000; Ghanem, 2004; Baltz *et al.*, 2010).

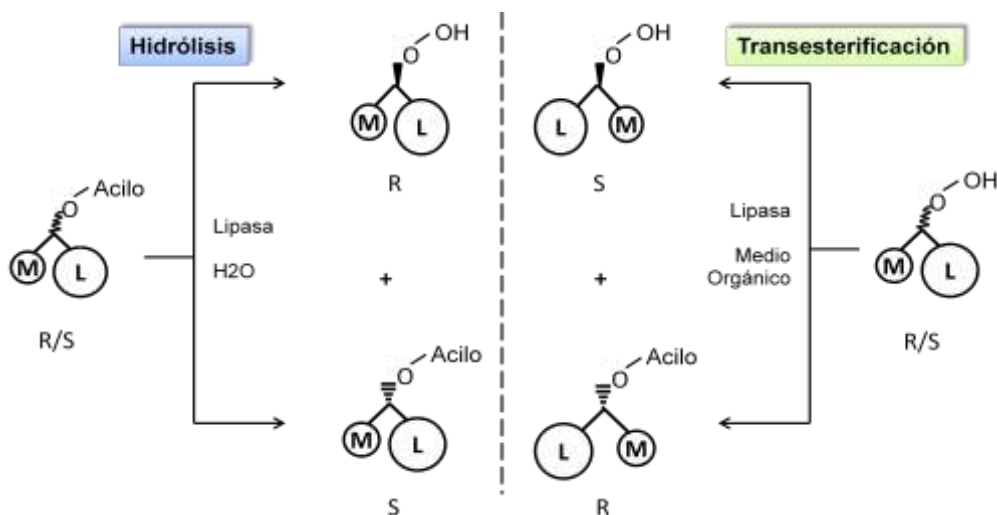


Figura 15. Hidrólisis y esterificación de compuestos racémicos catalizadas por lipasas en diferentes medios de reacción. Figura tomada de Ghanem, 2004.

Entre los métodos de resolución cinética de racematos catalizados por lipasas, se encuentra la transesterificación de sustratos en medios de reacción con solventes orgánicos. En este sentido, Ghanem and Schurig (2003), Gotor-Fernández y col (2006), Chojnacka y col. (2007), Barbosa y col. (2011), Zhou y col. (2011) probaron la resolución de varios alcoholes, especialmente secundarios, usando diferentes lipasas modificadas y no modificadas e inmovilizadas en soportes de diferente naturaleza. De forma mayoritaria se encontró que el R-alcohol fue el enantiómero que mas rápido reaccionó produciendo el R-éster. Adicionalmente, fue posible obtener S-alcohol de forma pura.

Recientemente, los métodos de resolución cinética catalizados por lipasas se han extendido a la resolución en presencia de solventes hidrofluorocarbonados y líquidos iónicos con mejores resoluciones en la obtención de enantiómeros puros (Ulbert *et al.*, 2004; Ghanem, 2007; Ball *et al.*, 2009; Durand *et al.*, 2007; Quijano *et al.*, 2010; Vidya *et al.*, 2010). Finalmente, se ha logrado resolución cinética dinámica en la que mediante el uso de catalizadores metálicos como el rutenio y el paladio permite conseguir el 100% de la resolución de uno de los enantiómeros (Huerta *et al.*, 2000; Ghanem *et al.*, 2004; Hudson *et al.*, 2010).

3.1 Hidrólisis enantioselectiva en medios acuosos

Durante muchos años las lipasas se han empleado ampliamente en la hidrólisis enantioselectiva de ésteres racémicos en medios acuosos (Arroyo, 1995). Sin embargo, el agua es un solvente que representa algunas dificultades en la industria química. Por ejemplo, resulta complicada su eliminación una vez obtenido el producto debido al alto punto de ebullición. A su vez, la mayoría de los ésteres son insolubles en agua y algunos productos de reacciones poseen baja estabilidad en agua. Debido a estos inconvenientes, se ha incrementado el interés hacia el desarrollo de procesos de resolución de mezclas racémicas en otros medios de reacción no-acuosos (Arroyo, 1995; Bell *et al.*, 1995; Secundo and Carrea, 2002; Ghanem, 2004).

3.2 Catálisis enzimática en medio orgánico

La necesidad de realizar reacciones de resolución en medios no acuosos se ha incrementado considerablemente debido a ventajas tales como: el incremento en la solubilidad del sustrato, una mejor termoestabilidad, facilidad de recuperación de la enzima por ser insoluble, y la posibilidad de catalizar reacciones en ausencia de agua.

La biocatálisis en medios no acuosos ha sido de gran aplicación en la resolución de alcoholes, ácidos o lactonas a través de reacciones de

transesterificación enzimática usando diferentes lipasas (Carrea and Riva, 2000; Ghanem *et al.*, 2004; Gotor-Fernández *et al.*, 2006; Rajagopalan and Kroutil, 2011). De esta forma, se han logrado alcanzar mayores valores de enantioselectividad en la resolución enzimática de alcoholes secundarios (Ghanem, 2004; Gotor-Fernández *et al.*, 2006)

3.2.1 Importancia del agua en las reacciones biocatalizadas en medios orgánicos

La actividad de las enzimas en medio orgánico es altamente dependiente del grado de hidratación de la misma. El contenido de agua en el medio de reacción en bajas cantidades es esencial para la catálisis enzimática, ya que le permite a las enzimas tener movimientos conformacionales indispensables para interactuar de forma adecuada con el sustrato. De esta manera, se logra incrementar la actividad catalítica, la polaridad del sitio activo y la enantioselectividad (Hernáiz *et al.*, 1999; Persson *et al.*, 2002; De la Casa *et al.*, 2002).

Por otra parte, se hace necesario controlar el agua en el medio de reacción, ya que puede actuar como nucleófilo de la reacción, compitiendo por el sustrato en el intermediario acil-enzima o bien hidrolizando el agente acilante. Para ello se han desarrollado algunas estrategias para su control. Leonard-Nevers y col (2009), por ejemplo, probaron cuatro alcoholes secundarios utilizando metil propanoato como acil donador, para varios alcoholes secundarios de diferentes tamaños. Los resultados, evidenciaron una disminución en la velocidad de las reacciones de acilación a medida que se incrementó la actividad de agua (*a_w*) del medio de reacción. Esto se debe a que el agua actúa como un nucleófilo que compite con los alcoholes.

3.3 Resolución enzimática de fármacos quirales

Las lipasas son utilizadas como biocatalizadores para la resolución cinética de racematos en la producción de precursores quirales en la química fina y farmacéutica debido a la capacidad que tienen para discriminar entre

enantiómeros (Koops *et al.*, 1999; Hernáiz *et al.*, 1999; Yadav and Sivakumar, 2004; Gotor-Fernández *et al.*, 2006; Wang and Tsai, 2009).

Entre las aplicaciones más importantes se encuentra la resolución de compuestos quirales puros o racematos y la producción de intermediarios o bloques constructores de moléculas farmacéuticas que presentan actividad biológica y especificidad. De esta forma, se logra disminuir la toxicidad o los efectos secundarios debidos a la presencia de mezclas racémicas en los fármacos, los cuales pueden interactuar con blancos diferentes o inhibir competitivamente la acción biológica del enantiómero apropiado (Main, 1990; Maier *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Kamal *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta lo anterior, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA), exige desde 1985 a todos los fabricantes de medicamentos realizar investigaciones sobre las propiedades de cada enantiómero que van a ser usados en las drogas que existen en el mercado. De acuerdo con esta normatividad se han dedicado mayores esfuerzos al uso de herramientas biotecnológicas, tales como la biocatálisis y se han conseguido avances en la síntesis de compuestos ópticamente puros y la reducción de efectos secundarios (Ghanem *et al.*, 2004; Kamal *et al.*, 2009).

Un ejemplo de esto lo constituyen los amino-alcoholes quirales como el propanolol (1-isopropylamino-3-(1-naphthoxy)-2-propanolol) (**figura 16a**) y el atenolol (4-[2-hidroxi-3-[(1-metiletil)amino] propoxi]bencen acetamida) (**figura 16b**), los cuales son usados como agentes bloqueadores de los receptores beta-adrenérgicos y juegan un importante rol en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades.

Estos amino-alcoholes son administrados en forma racémica y se han observado efectos secundarios en pacientes que han sido tratados con fármacos sintetizados en forma de racematos, los cuales se han asociado a uno de los enantiómeros. Entre los efectos que se han identificado se presentan: bronco-constricción en pacientes asmáticos y diabetes en pacientes hipertensivos atribuidos al enantiómero (R) del propanolol (Goodman and

Gillman, 1985; Stoschitzky *et al.*, 1997; Avila *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2010). A su vez, la administración del atenolol en su forma racémica ocasiona una disminución de la actividad farmacológica del mismo, ya que esta reside en el enantiómero (S) (Stoschitzky *et al.*, 1994; Stoschitzky *et al.*, 1997; Egholm *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2011).

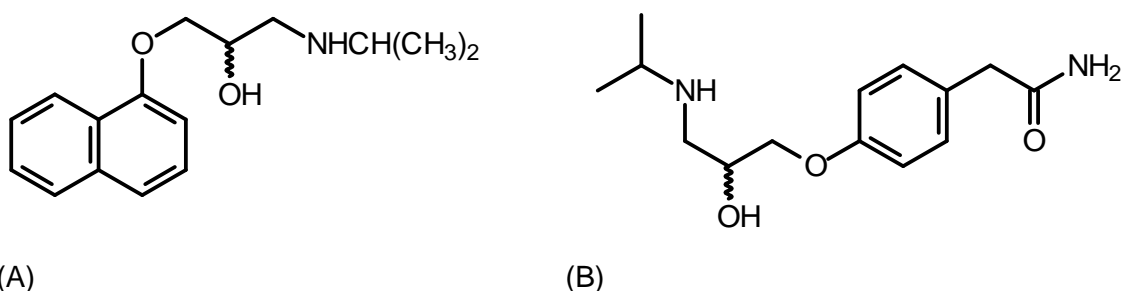


Figura 16. Estructura del (A). R/S-Propranolol y (B). R/S-Atenolol

En la obtención de estos dos fármacos (propranolol y atenolol) enantioméricamente puros se han llevado a cabo diferentes estudios, en los que se han estandarizado las condiciones de resolución para obtener así mejores enantioselectividades y rendimientos. Se han probado diferentes lipasas en la resolución cinética de estas moléculas con diferentes resultados (Avila y col, 2005; Bolivar y col, 2009; Ema, 2004). Recientemente, Barbosa y col., 2010 y 2011, estudiaron la resolución cinética del propranolol y atenolol catalizada por la lipasa de CALB previamente inmovilizada sobre soportes multifuncionales de Eupergit C. Los resultados obtenidos después de la estandarización de condiciones de trabajo y usando vinil acetato como agente acilante, mostraron que los derivados de EC-CALB presentaron excesos enantioméricos (ee) del 96% y valor de E=57 en la conversión del 30% de enantiómero R de propranolol en tan solo 5 horas de reacción, el cual comparado con estudios anteriores resultó tener valores de E mayores. Con respecto a la resolución del atenolol este mismo derivado de EC-CALB presentó un ee=89% con una E=43 en la conversión del 23% de enantiómero R de atenolol.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 MATERIALES Y REACTIVOS

La lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B) fue obtenida de Novozymes y la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) (Amano-Japon) donada por la profesora Lorena Wilson de la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Católica de Valparaíso. El Octil agarosa 4BCL, Tritón X-100, p-nitrofenilbutirato (pNPB), el ácido picril sulfónico (TNBS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC), N-hidrosuccinimida (NHS), el monometoxy polietilenglicol Mn 5000 (mPEG), (R/S)-mandelato de metilo, (R/S)-Propanolol-HCl, (R/S)-Atenolol-HCl y cada uno de los isómeros puros fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, Mo, USA). El soporte de Eupergit C fue donado por Rohm Pharma (Darstamdt, Alemania). Los marcadores de peso molecular de proteínas para electroforesis de proteínas 1D se obtuvieron de Fermentas. Los reactivos utilizados en la síntesis y en las reacciones fueron todos de grado analítico y suministrados por Sigma Aldrich y Merck.

2 MÉTODOS EXPERIMENTALES

En el **diagrama 1** se presenta el esquema de la metodología propuesta para el logro de los objetivos. Inicialmente, se purificaron los extractos CALB y PFL mediante adsorción sobre octil agarosa y posterior desorción con Tritón X-100, para posteriormente ser inmovilizados sobre soportes Eupergit C (EC).

Antes de la preparación de derivados sobre EC, se realizó el estudio de la modificación química mediante succinilación, aminación y PEGilación, de los derivados de CALB inmovilizadas sobre octil agarosa. La evaluación se hizo con base en el estudio de estabilidad frente a solventes y temperatura, determinando su actividad enzimática sobre el sustrato p-nitrofenil-butirato (pNPB). De esta manera, se estandarizaron las mejores condiciones de modificación química que posteriormente se realizó en derivados de CALB sobre EC.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la modificación de los derivados obtenidos de lipasas inmovilizados en octil-agarosa sobre la hidrólisis enantioselectiva del mandelato de metilo, atenolol y propanolol.

Finalmente, los derivados EC-CALB (modificados de acuerdo con las condiciones estandarizadas en octil-agarosa) se utilizaron para estudiar el efecto de las diferentes modificaciones (succinilación, aminación y PEGilación) sobre la hidrólisis enantioselectiva del mandelato de metilo, el propanolol y el atenolol.

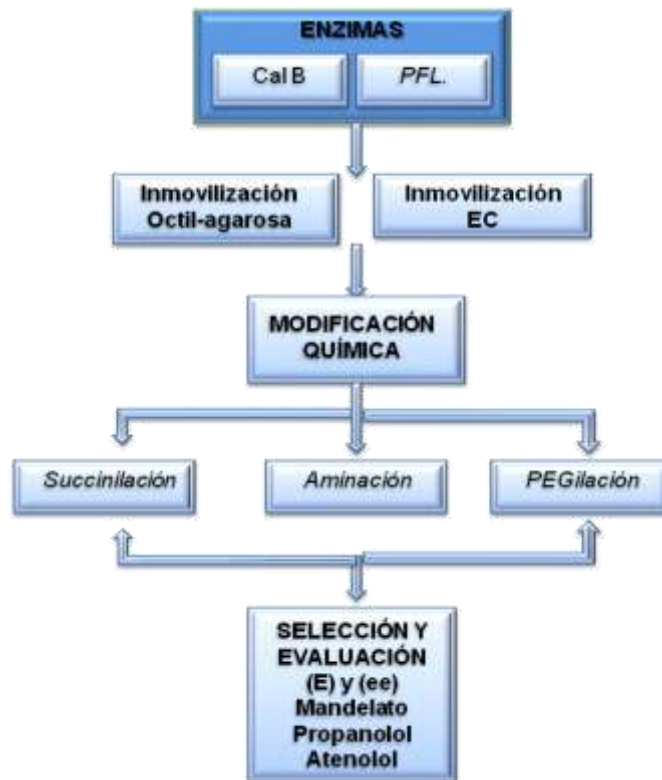


Diagrama 1. Metodología propuesta para el estudio de la modificación por aminación, succinilación y pegilación de las lipasas de CALB y PFL sobre las propiedades catalíticas en la resolución de aminoalcoholes.

2.1 Purificación de CALB y PFL mediante inmovilización por adsorción hidrofóbica sobre Octil-agarosa

Las CALB y PFL fueron inmovilizadas y purificadas sobre el soporte octil-agarosa a baja fuerza iónica como lo describe Bastidas y col., 1998.

Para ello, 0.128 mg de CALB y 5 mg de PFL, fueron diluidos en 1 mL de fosfato de sodio 5mM a pH 7, en cada caso. Posteriormente, las soluciones fueron incubadas con octil-agarosa manteniendo una relación 1:10 soporte: solución enzimática, durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron muestras periódicamente a partir de la suspensión y el sobrenadante para evaluar la inmovilización mediante el ensayo de actividad enzimática descrito en el **numeral 3.1**. El porcentaje de inmovilización se definió como porcentaje de actividad residual en el sobrenadante en el tiempo (**Ecuación 1**).

$$\text{Actividad residual (\%)} = \frac{(\text{Actividad sobrenadante } t=x) \times 100}{\text{Actividad sobrenadante } t=0} \quad (\text{Eq. 1})$$

2.2 Modificación química en fase sólida de la superficie enzimática de CAL B

Las lipasas fueron inmovilizadas inicialmente sobre octil agarosa para posteriormente ser sometidas a modificación química, como se describe a continuación.

2.2.1 Carboxilación de grupos amino con anhídrido succínico

Un gramo de derivado CALB inmovilizada en Octil-agarosa se incubó en 10 mL de buffer fosfato 10mM pH 8 bajo agitación magnética continua a temperatura ambiente. La reacción de modificación se inició con la adición de anhídrido succínico en diferentes concentraciones, 1mM, 20mM y 100mM para obtener modificaciones de 10%, 50% y 100%, respectivamente. Después de 120 minutos de agitación, los derivados de las dos lipasas succiniladas (CALB-S), se lavaron con buffer fosfato pH 7 y un exceso de agua destilada. Posteriormente, se filtraron al vacío, y se almacenaron a 4°C (Alcalde *et al.*, 2001; Cabrera *et al.*, 2009).

Este proceso de modificación fue realizado con la colaboración de la Qca. Magaly Galvis.

2.2.2 Aminación de grupos carboxilo con etilendiamina

Un gramo de derivado inmovilizado de Octil-CALB se incubó en 10 mL de una solución de etilendiamina (EDA) 1M a pH 4.75 bajo agitación continua, para cada caso, respectivamente. La reacción de modificación para las dos lipasas se inició con la adición de diferentes concentraciones de carbo-di-imida (EDAC): 3mM, 10mM y 100mM para modificaciones de 10%, 50% y 100%, respectivamente. Después de 90 minutos de agitación a temperatura ambiente, los derivados aminados de las lipasas CALB-A se lavaron con buffer fosfato 25mM, pH 7 y un exceso de agua destilada. Posteriormente, se filtraron al vacío y almacenaron a 4°C (Carraway and Koshland Jr, 1966; Cabrera *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2009 c). Una vez obtenidos los derivados de CALB modificados por aminación, fueron incubados en hidroxilamina-HCl 1M a pH 7 durante aproximadamente 1h a 25°C para recuperar los residuos hidroxilo de las tirosinas que hubieran resultado afectados por el proceso de modificación química (Hermanson, 2008; Geoghegan, 2001; Carraway and Koshland Jr, 1968).

2.2.3 PEG-ilación de grupos amino con mPEG-COOH

Un gramo de derivado de CALB inmovilizado sobre octil-agarosa y modificado por aminación (al 10, 50 y 100%) se incubó en una solución 10mM de metoxi-poli-etilenglicol succinilado (mPEG-COOH) en agua a pH 8. La reacción de modificación se inició con la adición de 19.2 mg de EDAC (para una concentración final de 100mM de carbodiimida (EDAC)). Después de 90 minutos de agitación a temperatura ambiente, se lavaron con un exceso de agua destilada los derivados modificados CALB-mPEG, filtraron al vacío y almacenaron a 4°C (Hermanson, 2008 cap 25; Godoy *et al.*, 2009).

Preparación de mPEG-COOH.

Se tomaron 15 gr de mPEG, 1 gr de anhídrido succínico (en relación molar 1:1) y se disolvieron en 100ml de CH₂Cl₂. Se adicionaron 1.3 mL de tri-etil-amina para facilitar la disolución del anhídrido y la mezcla se mantuvo en agitación a

25 °C por 20 horas. Una vez finalizado este tiempo de modificación, el solvente se removió por evaporación en un rota-evaporador y el producto se caracterizó mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) comparándolo con el espectro FTIR del m-PEG sin modificar (**Ver anexo 1 datos espectrales**) (Son *et al.*, 2007; Godoy *et al.*, 2009).

2.3 Evaluación de la estabilidad de lipasas modificadas en fase sólida

2.3.1 Estabilidad térmica

La termo-estabilidad de los derivados enzimáticos (CALB-A, CALB-S, CALB-mPEG) se determinó por triplicado a 70°C tal como se describe a continuación: se tomaron 100 mg de los diferentes derivados y se incubaron en 5ml de buffer fosfato 25mM a pH 7. 100µL de suspensión se tomaron a diferentes tiempos para la determinación de actividad residual (**Ver punto 3.1**) usando como sustrato p-NPB. Todas las medidas se realizaron por triplicado y los errores experimentales siempre fueron menores al 10%.

2.3.2 Estabilidad frente a solventes

Las preparaciones enzimáticas (CALB-A, CALB-S, CALB-PEG), fueron incubadas en una mezcla al 50% de tetrahidrofurano (THF)/ buffer Tris-HCl 50mM a pH 7 y 40°C. Se tomaron muestras periódicamente a partir de la suspensión y el sobrenadante para evaluar la actividad enzimática residual frente al sustrato p-NPB tal como se describe en el punto 3.1.

2.4 Inmovilización por unión covalente - Eupergit C

Inicialmente, se purificó la enzima CALB por adsorción hidrofóbica sobre soportes de octil-agarosa a baja fuerza iónica y desorbidas mediante el uso del detergente Tritón X-100 al 1% (v/v) tal como se describe en Sabuquillo y col, (1998).

Una vez desorbida la CALB de los soportes de octil-agarosa, se utilizaron 9 ml de solución y se añadieron 0,9 gr de soporte Eupergit C (EC) para la inmovilización covalente, manteniendo la mezcla en un agitador de rodillos a temperatura ambiente durante 48 horas (Barbosa *et al.*, 2010; Escorcía *et al.*, 2010). Periódicamente, se evaluó el proceso de inmovilización de CAL-B sobre el soporte, midiendo la actividad residual del sobrenadante mediante ensayo espectrofotométrico usando como sustrato p-nitrofenil-Butirato (pNPB) (**Ver numeral 3.1**) y por electroforesis de proteínas en SDS-PAGE (**ver numeral 3.3**) (Laemmli, 1970).

Una vez obtenidos los derivados inmovilizados covalentemente sobre el soporte de EC, se procedió a realizar las modificaciones químicas descritas en el numeral 2.2.

2.5 Estudio del efecto de la modificación química de los derivados CALB en EC y octil-agarosa, frente a la actividad hidrolítica del pNPB

La actividad hidrolítica de los derivados inmovilizados por adsorción y por unión covalente a soportes de octil-agarosa y Eupergit C, fue determinada por el método descrito en el numeral 3.1.

2.6 Estudio del efecto de la modificación química de los derivados CALB en EC y octil-agarosa, sobre la hidrólisis enantioselectiva del (R/S) mandelato de metilo

Se preparó una solución 50mM de cada uno de los enantiómeros de mandelato de metilo (R y S) en buffer fosfato 25mM de pH 7. El volumen de reacción fue de 3mL conformados por: 2.4mL de buffer fosfato 25mM, 600 µL de mandelato de metilo 50mM (para una concentración final de 10mM) (Escorcía *et al.*, 2010) y derivado enzimático a una razón de: 25mg soporte CALB-A, CALB-PEG, CALB-S.

Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo a pH 7, 25°C y agitación de 200rpm, hasta alcanzar conversiones de 20-30%.

Los productos de la reacción, fueron determinados por cromatografía líquida en fase reversa, usando un equipo HPLC (marca Agilent 1100) y usando una columna Zorbax C-18 (5 μ m, 250 x 4.6mm). La fase móvil consistió de una mezcla isocrática de acetonitrilo-buffer fosfato 25mM pH 3, en una proporción volumétrica 35:65 (v/v). Los compuestos se determinaron utilizando un detector de arreglo de diodos UV a 225 nm y un flujo de 1 mL/min, con un volumen de inyección de 5 μ L, y detectados a tiempos de retención de 3.300 min para el ácido mandélico y 5.646 min para el mandelato de metilo.

2.7 Estudio del efecto de la modificación química de los derivados CALB en EC, sobre la transesterificación enantioselectiva de (R/S)-propanolol y (R/S)-atenolol

Una vez obtenidos los diferentes derivados de EC-CALB aminados, succinilados y pegilados, se evaluó la enantioselectividad expresada por estos biocatalizadores en la resolución cinética de los amino-alcoholes mediante reacciones de trans-esterificación de los sustratos quirales propanolol y atenolol (**curvas de calibración anexo 2**). Se utilizó acetato de vinilo como donador acilo y tolueno como solvente orgánico.

Inicialmente, se preparó una solución 200mM de (R/S)-propanolol y atenolol en metanol para facilitar la dilución de los mismos. A continuación, para las reacciones de transesterificación del propanolol (Barbosa *et al.*, 2010) se llevó a cabo la siguiente mezcla de reacción: 0.1mmol (25.93 mg) de (R/S)-propanolol, 0.3 mmol (27.71 μ L) de acetato de vinilo, tolueno hasta completar un volumen final de 3 mL y derivado enzimático a razón de: 50mg soporte EC-CALB-A, EC-CALB-PEG, EC-CALB-S.

Finalmente, para las reacciones de transesterificación del atenolol (Barbosa *et al.*, 2011), se fijó un volumen de reacción en 3mL conformados por: 0.05mmol (13.3 mg) de (R/S)-atenolol, 0.1 mmol (9.23 μ L) de acetato de vinilo, tolueno hasta completar el volumen final y derivado enzimático a razón de: 50 mg soporte EC-CALB-A, EC-CALB-PEG, EC-CALB-S.

Los productos de la reacción fueron determinados por HPLC en fase reversa, usando un equipo HPLC (Agilent 1100) con una columna Zorbax C-18 (5µm, 250 x 4.6mm). La fase móvil consistió de una mezcla isocrática de acetonitrilo-buffer fosfato 25mM pH 6, en una proporción volumétrica 70:30 (v/v). Los compuestos se determinaron utilizando un detector con arreglo de diodos UV a 289 nm y un flujo de 1 mL/min, con un volumen de 5µl de inyección y tiempos de retención de 2.8 min R-propanol, 3.0 min S-propanol, 3.4 min R butiril propanol, 2,8 min R-atenolol, 2.9 min S-atenolol, 3.3 min R-O-butiril atenolol y 6.4 min para el tolueno.

3 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.1 Determinación de la actividad catalítica frente al p-nitrofenilbutirato

La actividad hidrolítica de las lipasas se determinó midiendo el incremento de absorbancia del p-nitrofenol a 348 nm, producido por la hidrólisis de p-nitrofenilbutirato (p-NPB) de concentración 0.4mM. La reacción comienza con la disolución de 20 µL de lipasa en 2.5 mL de buffer fosfato 25mM a pH 7 y 25°C (Quinn *et al.*, 1982). Una unidad internacional de actividad (U) fue definida como la cantidad de enzima que hidroliza 1 µmol de p-NPB por minuto bajo condiciones descrita previamente. El cálculo de la actividad se describe en el **anexo 3**.

3.2 Determinación de la concentración de proteína

La proteína fue determinada por el método colorimétrico del Bradford a 595 nm usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar (Tsaffir *et al.*, 1996). La curva de calibración se muestra en el **anexo 4**.

3.3 Electroforesis de proteínas en condiciones denaturalizantes (SDS-PAGE) y en condiciones no denaturalizantes (nativa-PAGE)

Las electroforesis de proteínas se realizaron en condiciones denaturalizantes en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) y no denaturalizantes o (Nativa-PAGE), como se describe a continuación.

En la electroforesis en condiciones denaturalizantes o SDS-PAGE (Laemmli 1970), se utilizó el buffer de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM pH 6.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 5% glicerol) y geles de poliacrilamida al 12%(p/v) en la zona de separación y de 5% (p/v) en la zona de concentración. A 10 mg de derivado enzimático se le adicionaron 30 μ L de buffer de ruptura y se calentaron en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos. Posteriormente, fueron mantenidas en baño de hielo durante 5 minutos. Finalmente, se adicionaron 20 μ L de muestra. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo PowerPac HC (BIORAD), a temperatura ambiente y a un voltaje de 150V durante 1 hora.

Para la electroforesis en condiciones no denaturalizantes o nativa-PAGE (Laemmli, 1970 modificado), 50 mg de derivado enzimático se re-suspendieron en 0.5 mL de una solución de Tritón al 1% (v/v) en buffer fosfato 25mM pH 7 por 24 h a 4 °C. Al sobrenadante se le adicionó buffer de corrida sin SDS ni mercaptoetanol. Finalmente, se adicionaron 20 μ L de muestra en geles de concentración 5%(p/v) y de separación 12%(p/v) de poliacrilamida sin SDS, a temperatura ambiente y a un voltaje 150V durante 4h en un equipo PowerPAC HC (BIORAD).

Finalmente, los geles se tiñeron con azul brillante de Coomasie R-250 y usando marcadores de peso molecular (200-7 kDa).

3.4 Determinación del grado de modificación

El grado de modificación fue determinado mediante la titulación de los grupos aminos primarios usando la metodología del ácido picril sulfónico (Montes *et al.*, 2006; Snyder *et al.*, 2005). A 350 mg derivado enzimático de CALB

modificado, se adicionaron 3 mL de solución de ácido picril sulfónico o TNBS 0.1% (w/v) a pH 8. Después de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente, el derivado se lavó con agua destilada. 200 mg se resuspendieron en 2.1 mL de borato de sodio 1M pH 9 y la medición de absorbancia se llevó a cabo a 430nm. Se usó como referencia octil-agarosa libre de enzima.

3.5 Estudio de la actividad específica y enantioselectividad de lipasas de CALB y PFL inmovilizadas y modificadas químicamente sobre octil agarosa y EC en la resolución cinética de sustratos quirales.

La actividad específica (AE) se definió como μ moles de sustrato hidrolizado por minuto y por miligramo de lipasa derivado lipásico inmovilizado y modificado:

$$AE = \frac{[S]*c*v}{m*t} \quad (\text{Eq.2})$$

Donde:

[S] = Concentración de sustrato (mM)

c = grado de conversión

v = volumen de reacción (mL)

m = cantidad de derivado enzimático (mg)

t = tiempo de reacción (min)

3.5.1 Determinación del exceso enantiomérico (ee) y la Enantioselectividad (E) de una reacción irreversible

El ácido mandélico formado (P) a partir de la resolución por separado de los enantiómeros del mandelato de metilo (entre 20-30% de conversión) se analizó por HPLC como se describió en el apartado anterior.

La enantioselectividad (E) (parámetro que describe la selectividad de una resolución= razón enantiomérica) se calculó a partir de la relación entre las velocidades aparentes de la reacción enzimática de hidrólisis de cada uno de

los enantiómeros puros (R y S) bajo las mismas condiciones de reacción realizadas en simultáneo.

Se tomaron a diferentes tiempos muestras de la hidrólisis enzimática para monitorear la concentración de sustrato y de producto a lo largo de la reacción.

$$E = \frac{(k_{cat}/K_M)R}{(k_{cat}/K_M)S} \quad \text{R, enantiómero reactante más rápido} \quad (\text{Eq.3})$$

El grado de conversión C, se determinó por la siguiente ecuación:

$$C = \frac{P - P_{t=0}}{S + P_{t=0}} \quad (\text{Eq.4})$$

Donde P es el ácido mandélico producido y S corresponde al sustrato inicial (éster).

3.5.2 Determinación del exceso enantiomérico (ee_s y ee_p) y de la enantioselectividad (E) de una reacción reversible

Los excesos enantiomérico (ee_s) del S-Propanolol, del S-Atenolol y del éster formado (ee_p) se analizaron por HPLC quiral (curvas de calibración en **anexo 5**), cuando la reacción enzimática alcanzó una conversión de 20 – 30%. Los productos de reacción se determinaron usando una columna quiral (ES-OVM, Agilent technologies, USA). Para su separación se utilizó como fase móvil una mezcla isocrática de metanol/buffer fosfato pH 6 (30:70 v/v) a un flujo de 1 ml/min utilizando un equipo de HPLC (Agilent 1100). La relación enantiomérica se calculó usando un estándar interno y la ecuación reportada por Chen *et al.*, 1982.

$$E = \frac{\ln [(1-c)(1-ee_R)]}{\ln [(1-c)(1+ee_S)]} \quad \text{R, enantiómero reactante más rápido} \quad (\text{Eq.5})$$

Donde c está expresada por la siguiente ecuación:

$$C = \frac{ee_S}{ee_S + ee_P} \quad (\text{Eq.6})$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 PURIFICACIÓN DE CAL B Y PFL MEDIANTE INMOVILIZACIÓN POR ADSORCIÓN HIDROFÓBICA SOBRE OCTIL-AGAROSA

Las enzimas CALB y PFL fueron purificadas a partir de los extractos crudos comerciales. En estos extractos enzimáticos de lipasa existen en algunas ocasiones esteresas y aditivos contaminantes, así como estructuras macromoleculares (dímeros u oligómeros), todo lo cual podría afectar las propiedades biocatalíticas de las lipasas.

La purificación de CALB y PFL se realizó mediante adsorción sobre geles de octil-agarosa a baja fuerza iónica, obteniéndose inmobilizaciones cuantitativas y rápidas, tal como se ha descrito en la literatura (Bastida et al., 1998). Los procesos de inmobilización y purificación de las lipasas de CALB y de PFL, fueron realizados según lo descrito en el **numeral 2.1**. En la **figura 17** se describe la cinética de inmobilización de la CALB. En ella se observa que al cabo de 60 minutos de incubación de la suspensión enzimática, se logró una inmobilización 93 % de la lipasa CALB. Por su parte, la PFL tuvo un porcentaje de inmobilización sobre el soporte de octil del 77 % al cabo de 3 horas.

A su vez, se observaron aumentos de la actividad enzimática de 60% para la CALB y 300% para la PFL, lo cual sugiere una hiper-activación de la enzima inmobilizada. Esta hiper-activación es consecuente con el mecanismo de activación interfacial de las lipasas, sugiriendo la presencia de un *lipid* que es muy pequeño o casi inexistente en la CALB comparado con el de la PFL (Secundo et al., 2006; Angkawidjaja, et al., 2010).

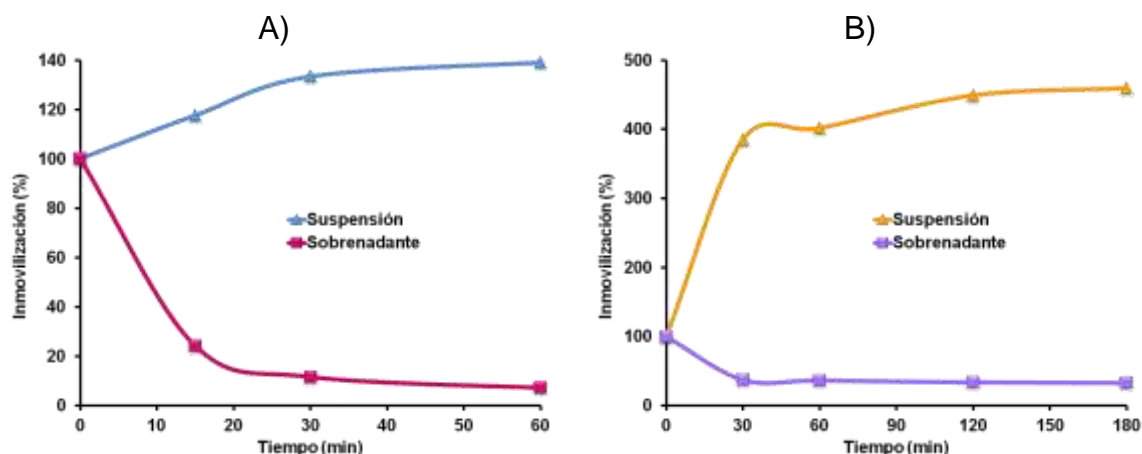


Figura 17. Cinética de inmovilización de lipasas sobre el soporte de Octil-agarosa. A) Inmovilización de CALB. B) inmovilización de PFL.

En la **figura 18** se muestra el perfil electroforético por SDS-PAGE de los extractos crudos de CALB y PFL, antes y después de su purificación por cromatografía de adsorción interfacial sobre geles de octil-agarosa. En ella se puede observar como CALB se adsorbió de forma específica sobre el soporte, presentándose una banda característica de 33 KDa, la cual corresponde al PM de la CALB en su forma monomérica, comprobando así el éxito del proceso de purificación de CALB. Sin embargo, para el caso particular de PFL, se encontró que la cromatografía de adsorción interfacial no permitió una completa purificación del extracto crudo comercial de PFL.

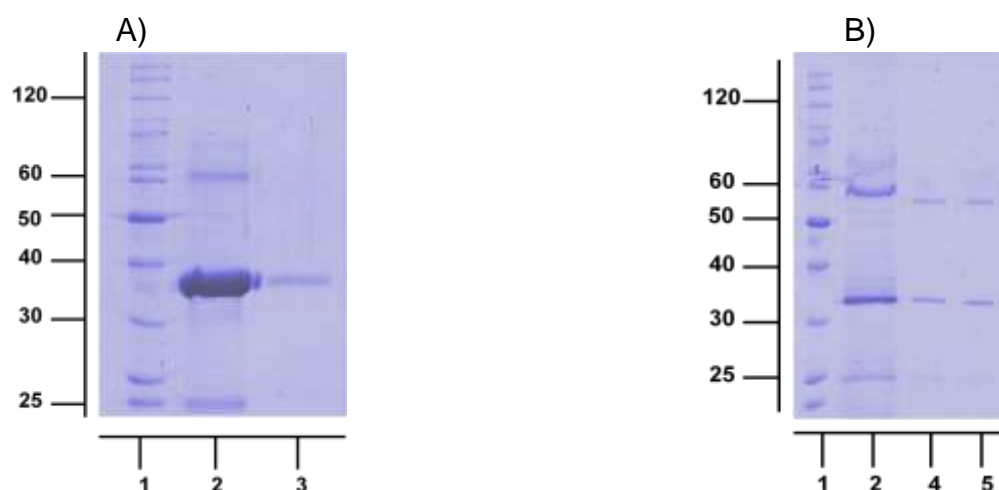


Figura 18. Electroforesis SDS-PAGE de las lipasas. A) CALB. B) PFL. Línea 1. Marcador de peso molecular. Línea 2. Extracto comercial. Línea 3. CALB purificada. Línea 4. PFL inmovilizada a 5mM de fuerza iónica. Línea 5. PFL inmovilizada a 25mM de fuerza iónica.

En la **figura 18b** se puede observar que además de la aparición de la banda de 33KDa correspondiente al peso molecular de PFL, aparece una segunda banda de alrededor de 60 kDa que no corresponde con estudios previos llevados a cabo con esta enzima (Gilbert, 1996).

Por otro lado, es necesario para el proceso de modificación química posterior que las lipasas estén libres de contaminantes, para así controlar y asegurar que la modificación está afectando únicamente a la enzima de interés, y poder evitar efectos adicionales sobre las propiedades de la lipasa. De acuerdo con lo anterior y a que las modificaciones se realizarían en fase sólida (sobre la enzima inmovilizada en octil agarosa) para tener un mejor control de la modificación evitando inactivaciones y formación de precipitados, se decidió realizar las modificaciones químicas de aminación, succinilación y pegilación sobre el derivado enzimático de CALB en su forma pura.

2 MODIFICACIÓN QUÍMICA EN FASE SÓLIDA DE LA SUPERFICIE ENZIMÁTICA DE CAL B

Para el estudio, evaluación y caracterización de la modificación química de CALB, se utilizó la enzima inmovilizada de manera reversible sobre el soporte de octil-agarosa. Dicho soporte permite fijar la forma abierta de la lipasa. Además, este soporte posee una transparencia óptica que permite la determinación de los diferentes grados de modificación a través de métodos sencillos como por ejemplo métodos espectrofotométricos.

La **figura 19**, muestra la distribución de grupos ionizables más abundantes en la superficie enzimática (lisinas, argininas, ácidos aspártico y glutámico) de la lipasa B de la *Candida antártica*, susceptibles a ser modificados químicamente.

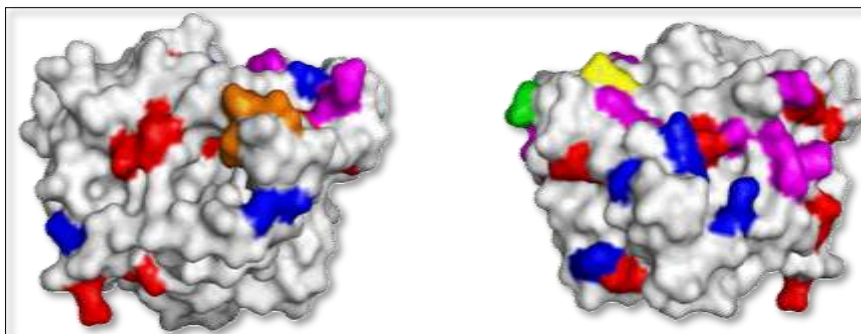


Figura 19. Estructura tridimensional de la lipasa B de la *Candida antarctica* (Estructura 3D obtenida de la base de datos (PDB) usando Pymol versión 0.99. El código PDB es 1TCA). Referencia de colores: Naranja (LID), Rosado (Argininas), Azul (Lisinas), Rojo (ácidos aspártico y glutámico), Amarillo (-NH₂ terminal), Verde (-C terminal).

La accesibilidad del agente modificante a los residuos aminoacídicos de CALB (**figura 20**), fueron calculados por la base de datos program ASA-view (<http://www.netasa.org/asaview/>) (ver **anexo 6**). El programa divide la accesibilidad de cada residuo frente a la presencia de un solvente y lo divide en tres grados: muy expuestos, moderadamente expuestos y no expuestos a los solventes.

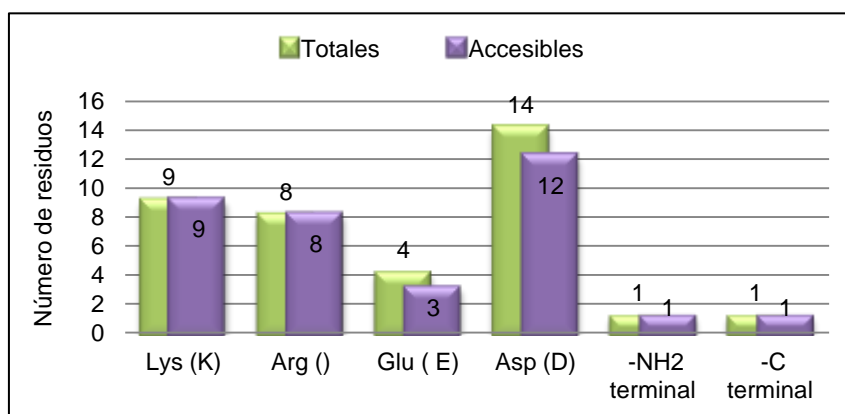


Figura 20. Número de residuos ionizables susceptibles a ser modificados en la lipasa de *Candida antarctica* B (CALB). En verde, el número total de residuos ionizables, en morado el número de residuos expuestos al medio con respecto al total de cada grupo

Del estudio de los residuos susceptibles de modificación, se encontró para la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) un total de 19 residuos carboxílicos distribuidos en 14 ácidos aspártico, 4 ácidos glutámicos, 2 grupos terminales

(uno carboxílico y uno amino). Adicionalmente, posee 9 grupos amino primario de los residuos de lisinas y 8 más de las argininas.

3 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS GRUPOS AMINO DE LA LIPASA B DE *Candida antártica* (CALB) INMOVILIZADA EN OCTIL AGAROSA CON ANHÍDRIDO SUCCÍNICO

La primera modificación química que se realizó sobre el derivado de CALB inmovilizado sobre el soporte Octil-agarosa, fue la introducción de grupos carboxilo en la superficie proteica mediante reacción de los grupos ϵ -amino de las lisinas con anhídrido succínico como se describió en materiales y métodos **numeral 2.2.1**. Esta modificación genera un aumento en la densidad de cargas negativas cuando los nuevos grupos introducidos son desprotonados al ser sometidos a valores de pH por encima del pKa.

La lipasa B de *Candida antarctica* presenta 9 lisinas con grupos ϵ -amino primarios, además del grupo amino terminal. Todos estos grupos son susceptibles a la modificación por succinilación y completamente accesibles al medio.

Estudios iniciales permitieron concluir que las concentraciones requeridas para obtener los grados de modificación especificados en los objetivos de este trabajo fueron los presentados en la **tabla 1**

Tabla 1. Grado de modificación de los grupos amino de las lisinas de CALB inmovilizada sobre octil agarosa y después succinilada. Las condiciones de modificación fueron descritas en materiales y métodos. Modificación realizada a pH 8

Grado Modificación (%)	Adición Anhídrido succínico (mM)	Referencia
10	1	ND
50	20	ND
100	100	Cabrera, 2009

ND : no determinada en estudios publicados anteriormente.

Los grados de modificación 10, 50 y 100% fueron controlados mediante la concentración de anhídrido succínico en el medio, y la comprobación se realizó mediante la reacción del ácido picrilsulfónico (TNBS) con los grupos amino primarios disponibles después de la succinilación en la superficie de la enzima. Este ácido (el TNBS) se une a los grupos amino de proteína formando derivados altamente cromogénicos de color amarillo que pueden ser cuantificados por medio de medidas espectrofotométricas (Hermanson, 2008). Los ensayos se realizaron según se describieron en la metodología **numeral 3.4.**

3.1 Caracterización electroforética de la lipasa de CALB succinilada en fase sólida

La caracterización electroforética de los derivados de CALB inmovilizados en octil agarosa y modificados por succinilación al 10, 50 y 100% se realizó mediante estudios electroforéticos en condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes.

En la **figura 21a** se muestra el perfil electroforético por SDS-PAGE de los derivados de CALB modificados químicamente por succinilación. En ella se puede observar como el proceso de modificación química no causó la formación de dímeros o macromoléculas sobre la enzima.

Por su parte, la electroforesis en condiciones no desnaturizantes (Nativa-PAGE) (**figura 22 a**) permitió observar como el incremento en la densidad de cargas negativas por la introducción de grupos carboxilos ionizables sobre la superficie proteica de la enzima altera la carga neta de CALB, ocasionando con ello un cambio en su punto isoeléctrico. Efecto que puede ser apreciado debido a que en ausencia del detergente aniónico dodesil sulfato de sodio (SDS), las moléculas enzimáticas se desplazarán del ánodo al cátodo de acuerdo a la carga neta en su superficie.

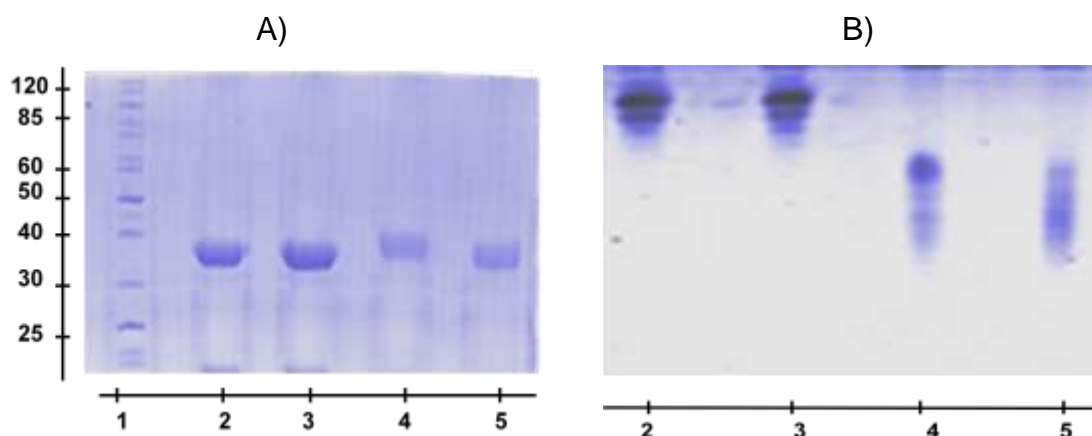


Figura 21. Electroforesis de la lipasa CALB succinilada en fase sólida. A) SDS-PAGE. B) Nativa- PAGE. Línea 1. Marcador de peso molecular. Línea 2. Enzima inmovilizada sin modificar. Línea 3. Enzima succinilada al 10%. Línea 4. Enzima succinilada al 50%. Línea 5. Enzima succinilada al 100%.

Al introducir grupos cargados negativamente sobre la superficie de la enzima, las proteínas con menor velocidad de corrida serán aquellas menos modificadas (Octil-CALB sin modificar y succinilada al 10%). Los derivados con modificaciones del 50 y 100% de los grupos amino fueron los que presentaron grandes velocidades de migración hacia el ánodo, precisamente por la presencia de cargas negativas en su superficie y por ende de su punto isoeléctrico.

3.2 Efecto de la succinilación en la actividad hidrolítica de la lipasa de CALB inmovilizada en octil-agarosa frente al p-NPB

La modificación química con anhídrido succínico ocasiona un cambio en la actividad catalítica de CALB frente a pNPB. La **tabla 2** muestra como el incremento en el grado de modificación de los residuos lisínicos superficiales, mediante reacción con anhídrido succínico, ocasiona una disminución en la expresión de la actividad catalítica de CALB hasta de un 76% con respecto al derivado enzimático no modificado. Esta disminución se debe posiblemente a cambios conformacionales por la introducción de nuevos grupos que alteran la naturaleza iónica de la superficie de las enzima, generando interacciones

electrostáticas repulsivas en la superficie de la enzima con la consiguiente desestabilización de la estructura terciaria y pérdida de la actividad enzimática (Montes *et al.*, 2006, Barbosa *et al.*, 2012).

Adicionalmente, el incremento en el grado de succinilación, hace que el punto isoeléctrico de la lipasa baje debido al cambio en la carga neta de la enzima por el incremento de cadenas laterales con carga negativa. Se produce también un aumento en la electronegatividad, causando un descenso en la hidrofobicidad de la misma. Este descenso en la hidrofobicidad puede afectar la capacidad del hueco oxianiónico de interactuar con el sustrato (Rantwijk and Sheldon, 2004).

Tabla 2. Efecto de la succinilación en la actividad hidrolítica de la lipasa de CALB inmovilizada en octil-agarosa frente al p-NPB 0.4mM. Las reacciones fueron llevadas a cabo a 25°C y pH 7.

CALB Succinilada	Modificación (%)	Actividad relativa^a (%)
Octil-CALB	0	100±3
Octil-CALB-S	10	94±1
Octil-CALB-S	50	37±3
Octil-CALB-S	100	34±3

^a Relación = (enzima sin modificar/ enzima modificada) *100

3.3 Efecto de la succinilación en la estabilidad térmica y frente a solventes de CALB modificada en fase sólida

Se estudió la estabilidad de las distintas preparaciones de CALB inmovilizada en octil agarosa y modificada químicamente por succinilación, frente a la temperatura (70 °C) y frente la presencia de tetrahidrofurano como co-disolvente (50%(v/v) y 40 °C). Después de análisis previos, las pruebas se

realizaron en las condiciones descritas en las que los procesos de inactivación fueron rápidos.

En la **figura 22 a** se observó que después de 5 horas de incubación a 70 °C, los derivados de octil-CALB modificados por succinilación al 50% y 100%, perdieron cerca del 45% de su actividad inicial. Aun así, fueron 2 veces más estables que los derivados octil-CALB y octil-CALB-S al 10%, los cuales a este mismo tiempo habían perdido el 58% de su actividad. Estos mismos derivados succinilados al 50 y 100%, mantuvieron una similitud en los tiempos de vida media (**anexo 7**) de aproximadamente 8 h.

Lo anterior nos permite concluir, que quizás al realizar una mayor modificación y con ella un mayor cambio en la estructura de la enzima Octil-CALB (100%), el aumento en la energía cinética de las moléculas internas de la lipasa ocasionada por la temperatura, tiene efectos menores sobre la actividad catalítica frente al p-NPB. En consecuencia, los derivados que sufrieron menor pérdida de las interacciones débiles aun presentes después del proceso de modificación, fueron los más afectadas por el aumento en la temperatura al desfavorecer dichas interacciones, modificándose tanto la actividad y la estabilidad de CALB (Klibanov, 1986; Shakya *et al.*, 2010).

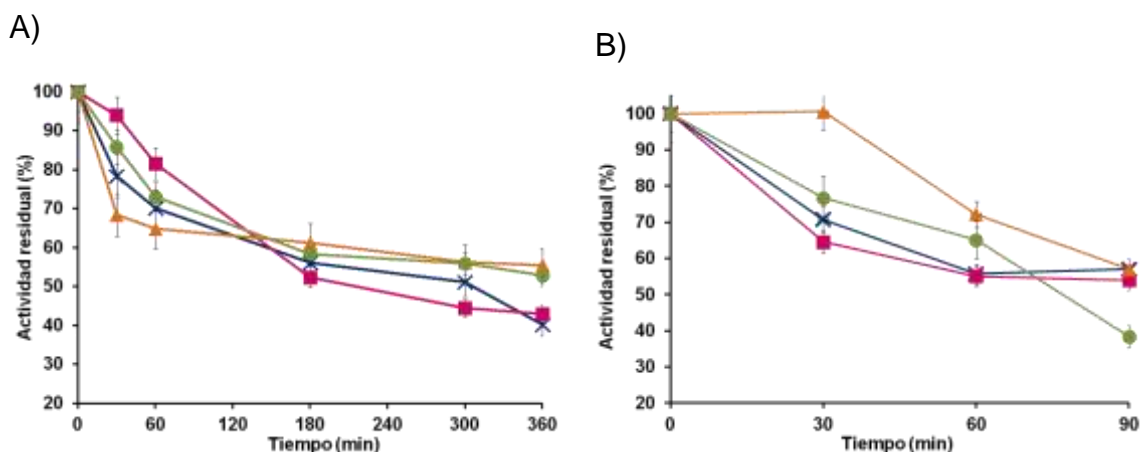


Figura 22. Efecto de la succinilación de la lipasa de CALB inmovilizada en octil agarosa en la estabilidad. A) Estabilidad térmica realizada a 70 °C y pH 7. B) Estabilidad frente a co-disolvente realizada a 40°C y 50% (THF/Buffer tris pH 7). Los derivados usados en el estudio fueron: (X) Octil-CALB, (■) Octil-CALB-S-10%, (▲) Octil-CALB-S-50%, (●) Octil-CALB-S-100%.

Respecto a la estabilidad en presencia de co-disolvente (THF), se observó (**Figura 22 b**) que los derivados octil-CALB modificados con anhídrido succínico al 50% y 100% fueron más estables que los derivados sin modificar Octil-CALB y succinilado al 10%, los cuales perdieron 40% de su actividad inicial. Después de 90 minutos de incubación bajo las condiciones de trabajo (THF al 50% y 40°C), estos derivados de octil-CALB modificados al 50 y 100% por succinilación, fueron afectados más drásticamente por las interacciones del solvente polar aprótico que genera cambios en las interacciones apolares en la superficie de la enzima. Además, produce interacciones iniciales de repulsión creadas por el proceso de succinilación, que finalmente se ven reflejadas en una posible pérdida de actividad catalítica al afectar directamente el mantenimiento de la estructura terciaria de las enzimas y de las zonas cercanas al centro activo (Illanes *et al.*, 2012).

La presencia de co-disolvente en el medio de incubación de la enzima genera inactivaciones más rápidas debido a que el solvente produce la solvatación de la enzima ocasionando la ruptura de los puentes de hidrógeno, de las interacciones polares y las fuerzas de London que mantienen la conformación de la enzima (Lyer and Ananthanarayan, 2008; Illanes *et al.*, 2012).

4 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS GRUPOS CARBOXILO DE LA LIPASA B DE *Candida antártica* (CALB) INMOVILIZADA EN OCTIL AGAROSA CON ETILENDIAMINA

En este proceso de aminación, el efecto de la modificación fue mayor que en la succinilación, ya que el número de cargas positivas introducidas fue mucho mayor por tener mayor cantidad de grupos carboxilos reactivos en la superficie (**ver figura 20**). En este caso, 16 de los 19 grupos carboxilo totales de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) inmovilizada sobre octil agarosa fueron involucrados en la modificación, incluido el grupo carboxilo terminal.

Al igual que en la modificación por succinilación en fase sólida de los derivados de CALB inmovilizada en octil agarosa, se realizaron estudios previos que permitieron concluir que las concentraciones requeridas para obtener los

grados de modificación especificados en los objetivos de este trabajo fueron los presentados en la **tabla 3**.

Tabla 3. Grado de modificación de los grupos amino de las lisinas de CALB inmovilizada sobre octil agarosa y después aminada. Las condiciones de modificación fueron descritas en materiales y métodos. Modificación realizada a pH 4.75

Grado modificación (%)	Adición Carbodiimida (mM)	Referencia
10	3	ND
50	10	López-Gallego, 2005
100	100	Carraway and Koshland Jr, 1966

ND : no determinada en estudios publicados anteriormente.

De la misma forma, el grado de modificación de los derivados modificados por aminación de CALB inmovilizada en octil agarosa fue controlado mediante la concentración del agente activante (carbodiimida) de los grupos carboxilo en el medio de reacción. La adición de grupos aminos se comprobó mediante la titulación de los grupos amino primarios disponibles en la enzima mediante el ácido picrilsulfónico (TNBS) (Snyder *et al.*, 2005; Montes *et al.*, 2006; Hermanson, 2008).

Como la modificación química en ningún caso es completamente específica, algunos grupos, como por ejemplo, los grupos hidroxilos de las cadenas laterales de los residuos de tirosinas, pueden ser afectados por la carbodiimida. Sin embargo esta modificación sobre las tirosinas es revertida mediante la incubación de los derivados en una solución de hidroxilamina, obteniendo así nuevamente las tirosinas libres (Carraway and Koshland Jr, 1968).

4.1 Caracterización electroforética de la lipasa de CALB aminada en fase sólida

Al igual que para la caracterización de los derivados succinilados, los derivados aminados de CALB inmovilizados en octil agarosa, fueron caracterizados

mediante estudios electroforéticos en condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes.

La electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se realizó para comprobar que el proceso de modificación por aminación de los derivados inmovilizados en octil agarosa CALB, no causaba formación de dímeros y oligómeros de la enzima (**figura 23a**).

Por el contrario, la electroforesis en condiciones no desnaturizantes (Nativa-PAGE) fue realizada para comprobar el cambio en la densidad de carga causado por los diferentes grados de modificación de la CALB inmovilizada en octil agarosa.

La **figura 23b** muestra como la modificación masiva (100% de modificación) de los grupos carboxílicos retarda drásticamente la movilidad electroforética de CALB, debido a la repulsión producida por la lipasa cargada durante la electroforesis y al incremento del punto isoelectrico (pI) de la enzima que aumenta de 5.9 a un pI de 11 (Barbosa *et al.*, 2012). Comportamiento seguido por el derivado en menor grado Octil-CALB modificado al 50%.

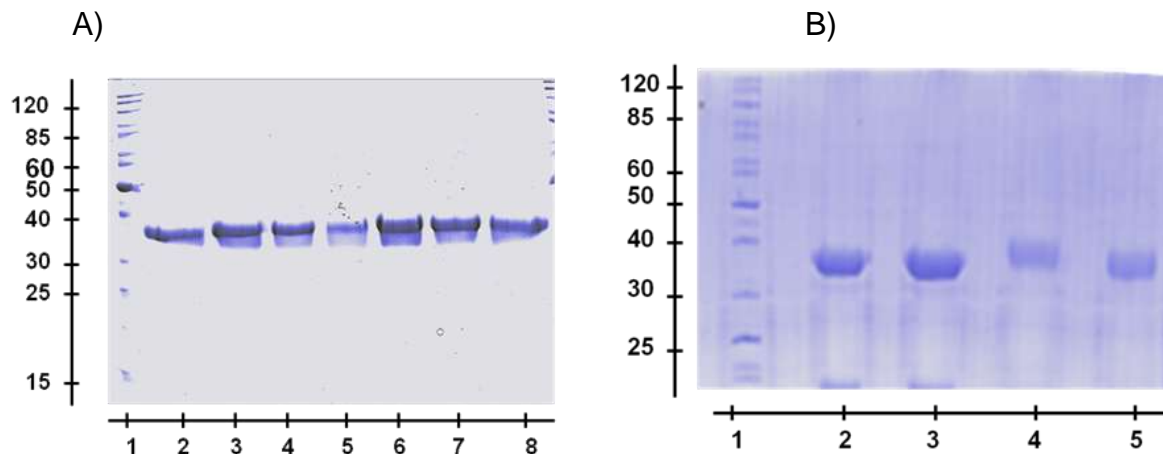


Figura 23. Electroforesis de la lipasa CALB aminada en fase sólida. A) SDS-PAGE. B) Nativa-PAGE. Línea 1. Marcador de peso molecular. Línea 2. Enzima inmovilizada sin modificar. Línea 3. Enzima aminada al 10%. Línea 4. Enzima aminada al 50%. Línea 5. Enzima aminada 100%. Línea 6. Enzima aminada e hidroxilaminada 10%. Línea 7. Enzima aminada e hidroxilaminada 50%. Línea 8. Enzima aminada e hidroxilaminada 100%.

De la misma manera, se observa que la incubación de los derivados de CALB-octil-agarosa en hidroxilamina no produjo cambios en el comportamiento

electroforético comparado con los derivados no hidroxilaminados. Este comportamiento era esperado, ya que no afecta la densidad de carga adicionada.

4.2 Efecto de la aminación en la actividad hidrolítica de la lipasa de CALB inmovilizada en octil-agarosa frente al p-NPB

La **tabla 4** muestra el efecto de la modificación química en fase sólida por aminación de los residuos carboxílicos ionizables en la superficie proteica de la CALB inmovilizada en octil agarosa sobre la actividad hidrolítica frente al p-NPB. Las actividades enzimáticas de los derivados aminados de CALB inmovilizada en octil agarosa no presentaron efectos significativos, ya que mantuvieron casi inalterada su actividad con respecto a la enzima CALB inmovilizada en octil-agarosa no-modificada. Únicamente, los derivados cuyos grupos carboxilo fueron modificados por completo (octil-CALB-A al 100%), presentaron leves cambios en la actividad expresada, tal como lo observado por Palomo (2007) para la misma enzima CALB, aunque inmovilizada en el soporte agarosa-bromo cianógeno (Agarosa-CNBr).

Estos cambios leves sobre la actividad hidrolítica frente al p-NPB, que presenta la lipasa de CALB-octil cuando fue sometida a la modificación del 100 % de sus grupos carboxilo, pueden ser explicados en términos de incrementos del número de grupos con carga positiva, cambiando las interacciones iónicas de atracción a interacciones de repulsión lo cual puede alterar la conformación de la enzima. Adicionalmente, se pueden estar generando cambios en las interacciones del lid con otros sitios de la proteína, generando así cambios en la actividad enzimática (Palomo *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009 c; Barbosa *et al.*, 2012)

Por otra parte, en ninguno de los casos de intentar la regeneración de los grupos hidroxilos de las cadenas laterales de los residuos de tirosina que pudieron haber sido modificados por la carbodiimida, se generaron resultados positivos que permitieran aumentar la actividad de la enzima modificada

comparada con la enzima sin regenerar. Por lo tanto, no se afectó la actividad de la enzima frente a la hidrólisis del p-NPB y por ende no resultó relevante.

Tabla 4. Efecto de la aminación en la actividad hidrolítica de la lipasa de CALB inmovilizada en octil-agarosa frente al p-NPB 0.4mM. Las reacciones fueron llevadas a cabo a 25°C y pH 7.

CALB Aminada	Modificación (%)	Actividad relativa ^a (%)	
		Derivados tratados sin hidroxilamina	Derivados tratados con hidroxilamina
Octil-CALB	0	100±3	98±2
Octil-CALB-A	10	100±7	92±4
Octil-CALB-A	50	100±2	102±5
Octil-CALB-A	100	113±5	111±5

^a Relación = (enzima sin modificar/ enzima modificada) *100

4.3 Efecto de la aminación en la estabilidad térmica y frente a solventes de CALB inmovilizada en octil agarosa

Una vez obtenidos los derivados modificados por aminación de CALB inmovilizada en octil agarosa, se realizaron estudios de estabilidad frente a temperatura y a co-disolventes. Las pruebas fueron realizadas de la siguiente forma: la primera prueba fue a 70°C en buffer fosfato (concentración) pH 7 y la segunda en 50%(v/v) de tetrahidrofurano (THF) y temperatura de 40°C, con el objetivo de acelerar el proceso de inactivación enzimática.

Se encontró que a medida que fueron introducidos mayor cantidad de grupos amino para la lipasa de CALB inmovilizada en octil agarosa (los cuales a pH 7 se encuentran como NH₃⁺), se generó una mayor pérdida de estabilidad enzimática (**figura 24a**). Este efecto se debería posiblemente al cambio dramático en su densidad de carga superficial, causando un cambio en su conformación proteica debido a interacciones de repulsión que no permiten que esta pueda llegar a generar interacciones adicionales inter o intra-moleculares iónicas que la puedan estabilizar. En consecuencia, se generarían grandes

cambios conformacionales en la estructura terciaria de la enzima promovidos por la temperatura, lo que causa la disminución de su estabilidad térmica (López-Gallego *et al.*, 2005).

Los tiempos de vida media a 70°C de los derivados modificados por aminación en fase sólida de CALB inmovilizada en octil agarosa, disminuyeron con el aumento del grado de aminación, pasando de 2.9 horas, para el derivado de octil-agarosa-CALB sin modificar, a 0.3 horas para el modificado con octil-agarosa-CALB al 100%, lo cual se traduce en una pérdida de estabilidad de casi 10 veces (**anexo 7**). Se obtuvo un comportamiento similar para los tiempos de vida media de los derivados hidroxilaminados.

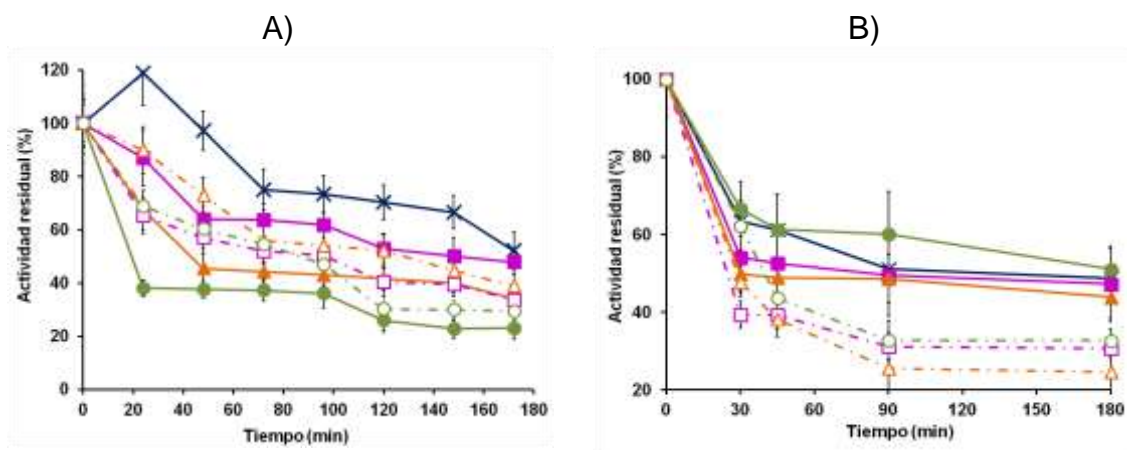


Figura 14. Efecto de la aminación de la lipasa de CALB inmovilizada en octil agarosa en la estabilidad. A) Estabilidad térmica realizada a 70 °C y pH 7. B) Estabilidad frente a co-disolvente realizada a 40°C y 50% (THF/Buffer tris pH 7). Los derivados usados en el estudio fueron: Derivados sin hidroxilaminar: (X) Octil-CALB, (■) Octil-CALB-A-10%, (▲) Octil-CALB-A-50%, (●) Octil-CALB-A-100%. Derivados hidroxilaminados: (□) Octil-CALB-A-10%-H, (△) Octil-CALB-A-50%-H, (○) Octil-CALB-A-100%-H.

En el estudio de inactivación de los derivados de CALB inmovilizados en octil agarosa usando 50%(v/v) de solvente orgánico tetrahidrofurano (THF) y 40°C (**figura 25 b**), se observó que aquellos sometidos al proceso de hidroxilaminación resultaron en promedio 20% más inestables que los derivados que no fueron hidroxilaminados.

El uso de un solvente de polaridad media como lo es el tetrahidrofurano, crea una tensión superficial que genera una fuerte alteración de la conformación

estructural que mantiene a la lipasa (Ogino *et al.*, 2001; Lyer and Ananthanarayan, 2008).

En este sentido, se observó que todos los derivados hidroxilaminados fueron menos estables que su correspondiente no hidroxilaminado. Este resultado permite concluir que para el derivado de octil-CALB, la incubación en hidroxilamina no representa cambios significativos en las propiedades de la enzima por lo que no es un paso necesario para esta investigación.

5 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LOS GRUPOS AMINO DE LA LIPASA B DE *Candida antarctica* (CALB) INMOVILIZADA EN OCTIL AGAROSA CON METOXY POLIETILENGLICOL SUCCINATO

La última de las modificaciones químicas realizada sobre los derivados de CALB inmovilizados en octil-agarosa fue la introducción de cadenas hidrofóbicas de metoxi-poli-etilenglicol succinato (m-PEG-COOH). Este polietilenglicol (m-PEG-COOH) contiene un grupo carboxílico terminal reactivo que reacciona fácilmente con los grupos amino, como los ε-amino de los residuos de lisina.

Para ello fueron utilizados los derivados de CALB inmovilizados en octil agarosa y aminados al 10, 50 y 100%. Estos derivados aminados fueron sometidos a una segunda modificación química al adicionar m-PEG-COOH y carbodiimida según lo descrito en el **numeral 2.2.3**.

La introducción de estos nuevos grupos hidrofóbicos generan un aumento de la hidrofobicidad de la enzima, gracias al enlace del PEG sobre la superficie proteica. El aumento de estas cadenas hidrofóbicas en la superficie de la enzima hace que la enzima disminuya las interacciones (puentes de hidrógeno) con el medio que la rodea, haciendo que la enzima se contraiga al interactuar con otras zonas hidrofobicas en la lipasa (Palomo *et al.*, 2002) .

5.1 Caracterización electroforética de la lipasa de CALB PEGilada en fase sólida

Al igual que para la caracterización de los derivados succinilados y aminados, los derivados pegilados de CALB fueron caracterizados mediante estudios electroforéticos en condiciones desnaturalizantes y no-desnaturalizantes.

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), permitieron ver que al introducir moléculas hidrofóbicas de polietilenglicol a la superficie de la enzima, se genera un cambio de la migración de las proteínas tal como se observa en la **figura 25 a**.

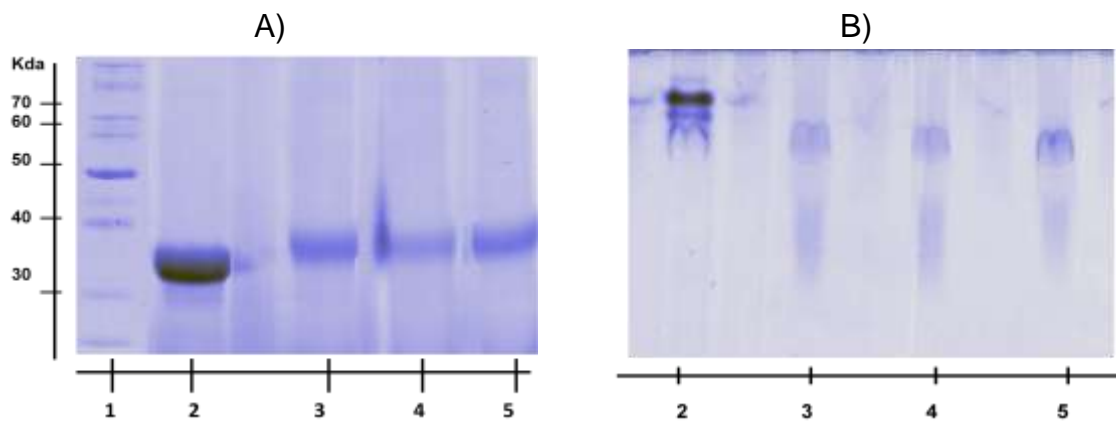


Figura 25. Electroforesis de la lipasa CALB pegilada en fase sólida. A) SDS-PAGE. B) Nativ-PAGE. Línea 1. Marcador de peso molecular. Línea 2. Enzima inmovilizada sin modificar. Línea 3. Enzima pegilada al 10%. Línea 4. Enzima pegilada al 50%. Línea 5. Enzima pegilada al 100%.

En el caso de la caracterización por electroforesis en condiciones no-desnaturalizantes (PAGE-Nativa), en la cual las proteínas corren de acuerdo con su carga y su forma (**Figura 25b**), se observó que los grupos hidrofóbicos introducidos en la superficie enzimática, provocan problemas de difusión, lo cual ocasiona que la banda perteneciente a la proteína, sea ancha a lo largo de la corrida electroforética, lo cual comprueba la presencia de cadenas polares en la superficie enzimática de los derivados de CALB-PEG.

5.2 Efecto de la pegilación en la actividad hidrolítica de la lipasa de CALB inmovilizada en octil-agarosa frente al p-NPB

Al comparar los resultados de actividad obtenidos después de realizar la modificación por pegilación en fase sólida de la CALB inmovilizada en octil agarosa (**tabla 5**), con los datos de actividad de los derivados aminados (**tabla 4**), se observa que se produce un incremento en los porcentajes de actividad hidrolítica. Este comportamiento se debería a que al aumentar la hidrofobicidad de la superficie enzimática, la carga neta positiva de la superficie enzimática es disminuida causando una reducción de las interacciones repulsivas ocasionadas en un principio por el proceso de aminación. Además, se estarían mejorando las interacciones hidrofóbicas cercanas al sitio activo que ayudan a mejorar la conformación del bolsillo hidrofóbico, el desplazamiento del lid y con ello la actividad de la enzima (Schrag *et al.*, 1997; Gutierrez *et al.*, 2007; Rotticci *et al.*, 2001).

Tabla 5. Efecto de la PEGilación en la actividad hidrolítica de la lipasa de CALB inmovilizada en octil-agarosa frente al p-NPB 0.4mM. Las reacciones fueron llevadas a cabo a 25°C y pH 7.

CALB PEGilada	Modificación (%)	Actividad relativa ^a (%)
Octil-CALB	0	100±3
Octil-CALB-PEG	10	92±4
Octil-CALB-PEG	50	103±8
Octil-CALB-PEG	100	160±10

^a Relación = (enzima sin modificar/ enzima modificada)*100

5.3 Efecto de la pegilación en la estabilidad térmica y frente a solventes de CALB inmovilizada en octil agarosa

Al igual que las modificaciones anteriores se estudio la estabilidad de las distintas preparaciones del derivado de Octil-CALB-PEG, frente a la temperatura (70°C) y frente a la presencia de tetrahidrofurano como co-solvente (50%(v/v) y 40°C).

En la **figura 26a**, se observa que a los primeros 30 minutos de incubación, los derivados de octil-CALB PEGilados disminuyeron notablemente su actividad perdiendo entre el 49 y 54% de la actividad inicial, siendo los derivados pegilados al 10 y 50% los más afectados por el aumento en la temperatura, la cual le ocasiona la perdida de las interacciones débiles que mantienen la estructura.

Esta inestabilidad térmica puede explicarse debido a que el derivado modificado completamente (Octil-PFL-PEG 100%) redujo las interacciones de repulsión ocasionadas cuando se introdujeron las cargas positivas en el proceso de aminación inicial. Al disminuir las interacciones repulsivas en la superficie de la enzima por grupos hidrofóbicos, la estructura conformacional posiblemente pudo haber sido estabilizada. Por esta razón, su conformación estructural fue menos afectada durante el proceso de inactivación térmica, comportamiento que además fue muy similar a la enzima que no fue modificada (Octil-CALB).

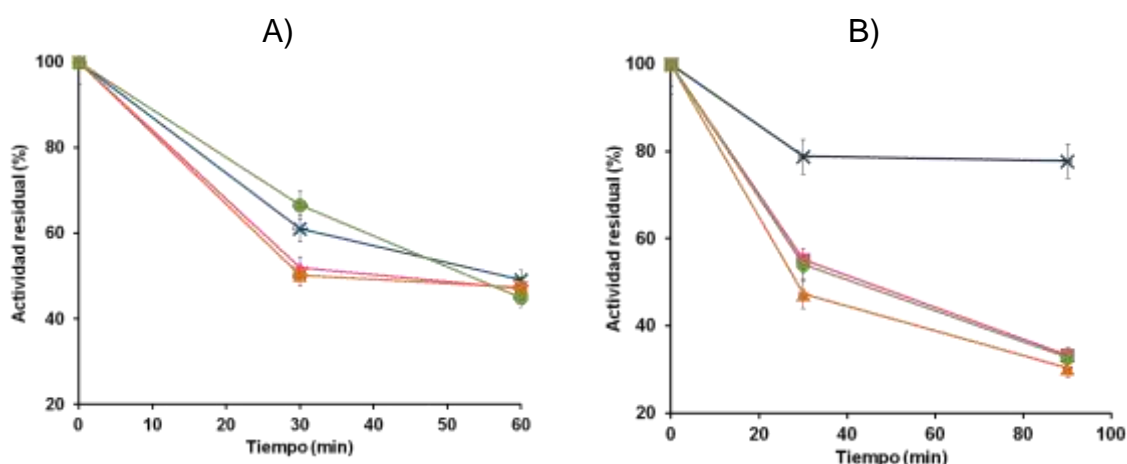


Figura 26. Efecto de la pegilación de la lipasa de CALB inmovilizada en octil agarosa en la estabilidad. A) Estabilidad térmica realizada a 70 °C y pH 7. B) Estabilidad frente a 50% de co-disolvente (THF/Buffer tris pH 7) a temperatura ambiente. Los derivados usados en el estudio fueron: (x) Octil-CALB, (■) Octil-CALB-PEG-10%, (▲) Octil-CALB-PEG-50%, (●) Octil-CALB-PEG-100%.

En cuanto al comportamiento de los derivados de Octil CALB PEGilados frente a la presencia del co-solvente (THF), se observó en promedio, (**Figura 27 b**) una pérdida del 54% con respecto a la actividad inicial.

La introducción de largas cadenas de carbono como es el caso del polietilengliol, además de dotar a la enzima de mayor hidrofobicidad, puede generar impedimentos estéricos (problemas difusionales) que limiten el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima (Schrag *et al.*, 1997; Gutierrez *et al.*, 2007; Rotticci *et al.*, 2001).

5.4 Inmovilización por unión covalente - Eupergit C

Una vez terminado el estudio de modificación química mediante succinilación, aminación y PEGilación, del derivado de CALB inmovilizado sobre octil agarosa, además de pruebas de estabilidad frente a solventes y temperatura, se procedió inmovilizar de forma covalente la CALB sobre el soporte de Eupergit C bajo las condiciones descritas en el **numeral 2.4**. Apartir de las cuales, tras 48 horas de incubación de la suspensión enzimática, se logró

inmovilizar el 50% (1mg de proteína por gramo de soporte), lo cual corresponde al 40% de la capacidad del soporte de EC 250L.

La modificación de este derivado de EC-CALB fue realizada completamente (modificación al 100%) mediante succinilación, aminación y PEGilación.

6 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA Y ENANTIOSELECTIVIDAD DE LIPASAS DE CALB INMOVILIZADA Y MODIFICADA QUÍMICAMENTE SOBRE OCTIL AGAROSA Y EC EN LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DE SUSTRATOS QUIRALES.

Para los estudios de actividad específica y enantioselectividad, fueron seleccionados los derivados enzimáticos inmovilizados sobre octil-agarosa y Eupergit C cuyos grupos ionizables fueron modificados al 100%. Esta selección fue realizada debido a que en los estudios previamente discutidos los derivados cuyos grupos iónizables fueron modificados al 10 y 50% no presentaron cambios significativos de incremento o descenso de actividad y estabilidad.

Por el contrario, los derivados modificados a tope (100% de modificación) se vieron afectados de manera más notoria en la mayoría de los procesos estudiados.

6.1 Hidrólisis enantioselectiva del (R,S) mandelato de metilo por medio de CALB inmovilizada en EC y octil-agarosa

Se evaluaron los derivados modificados químicamente y previamente inmovilizados de CALB sobre soportes de octil-agarosa y Eupergit C, con el fin de estudiar el efecto de la inmovilización sobre las propiedades catalíticas de enantioselectividad y actividad frente al mandelato de metilo.

Apartir de los resultados en la **tabla 6**, se pudo observar que los derivados de CALB inmovilizados sobre octil-agarosa presentaron velocidades de reacción frente al mandelato de metilo (representado como la actividad específica)

similares al derivado Octil-CALB sin modificar. Únicamente, el derivado de Octil-CALB PEGilado, presentó una disminución en la velocidad de la reacción. Comportamiento atribuido muy posiblemente a la presencia de largas cadenas carbonadas acopladas a la superficie de la enzima en el proceso de pegilación que puedan estar interfiriendo con el ingreso eficiente del mandelato al centro activo, afectando así la velocidad de conversión del sustrato a producto (Léonard-Nevers *et al.*, 2009).

Tabla 6. Efecto de la naturaleza del soporte sobre la actividad y enantioselectividad de los derivados de CALB. La actividad fue determinada con (R,S) mandelato de metilo 10mM, pH 7 y 25°C.

Derivados CALB	Enantio- preferencia	Actividad (U/g)	E
Octil-CALB	R	10.2±1	15.8±1
Octil-CALB-A 100%	R	10.8±1	16.2±1.2
Octil-CALB-S 100%	R	10.0±2	16.3±0.5
Octil-CALB-PEG 100%	R	5.2±0.7	18.5±1
EC- CALB	R	23.4±1.4	7.5±0.7
EC-CALB-A 100%	R	10.4±0.8	16.6±1
EC-CALB-S 100%	R	13.6±0.3	13.2±0.8
EC-CALB-PEG 100%	R	10.3±0.8	19.1±1.2

Por su parte, los derivados de CALB inmovilizados covalentemente al soporte Eupergit C, presentaron una disminución de la actividad hidrolítica (velocidad) en un factor de casi 2 veces con respecto al derivado EC-CALB sin modificar. Muy posiblemente la disminución en la actividad se deba a que la inmovilización covalente se da a través de zonas que pueden estar lejanas al centro activo y al lid, lo cual hace que los procesos de modificación puedan perturbar más fuertemente las interacciones que mantienen el lid alejado del

sitio activo de la enzima, interfiriendo con el acceso de las moléculas de mandelato al sitio activo (Schrag *et al.*, 1997; Gutierrez *et al.*, 2007; Rotticci *et al.*, 2001).

De la misma forma este cambio en las interacciones, favorecieron gradualmente la flexibilidad del sitio activo, haciendo que la enantioselectividad se incrementará de diferentes maneras. Adicional a lo anteriormente expuesto, el aumento de las interacciones hidrofóbicas en el derivado de EC-CALB PEGilado produjo un incremento adicional en la capacidad de su sitio activo de discriminar entre el enantiomero R y S, presentando una mayor enantioselectividad frente al mandelato de metilo.

Finalmente, bajo las condiciones de trabajo (pH 7 y 25°C), todos los derivados evaluados en la resolución del mandelato de metilo, presentaron una enantiopreferencia por el enantiomero R.

6.2 Estudio del efecto de la modificación química de los derivados CALB en EC, sobre la transesterificación enantioselectiva de (R/S)-propanolol y (R/S)-atenolol

- **(R/S)-Propanolol**

La enantioselectividad de las reacciones de transesterificación del (R/S)-propanolol catalizadas por los derivados de EC-CALB modificados por aminación, succinilación y pegilación, fue evaluada en un rango comprendido entre el 15 y 20% de conversión (**figura 27**) y analizada por HPLC quiral.

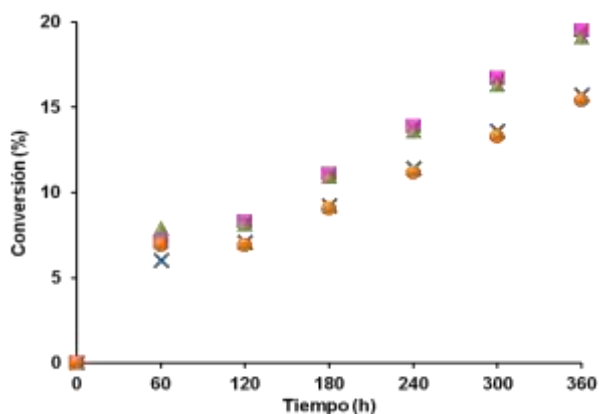


Figura 27. Cinética de la reacción de esterificación del (R/S)-Propanolol catalizada por derivados de CAL B. Condiciones de reacción: (R/S)-propranolol (0,1mmol), acetato de vinilo (0,3mmol), derivado (50mg) y tolueno (hasta completar un volumen de 3 ml).

Los derivados usados en el estudio fueron: (X) EC-CALB, (■) EC-CALB-A-100%, (▲) EC-CALB-S-100%, (●) EC-CALB-PEG-100%.

Los resultados obtenidos (**tabla 7**) mostraron que el derivado de Octil-CALB fue el que presentó la mayor actividad específica frente a la esterificación del propanolol (0.61 U/g), comparada con los derivados modificados los cuales en promedio presentan actividades de 0.46 U/g de soporte, lo cual sugiere que los procesos de modificación realizadas (aminación, succinilación y pegilación) afectaron la velocidad con que la enzima es capaz de convertir el sustrato en producto. Lo cual es consecuente con el comportamiento presentado frente a la hidrólisis del mandelato de metilo.

Lo anterior, refuerza una vez más la hipótesis de que la modificación genera una perturbación en las interacciones generando una interferencia del acceso de las moléculas de propanolol al sitio activo (Schrag *et al.*, 1997; Gutierrez *et al.*, 2007; Rotticci *et al.*, 2001).

Tabla 7. Enantioselectividad de las preparaciones inmovilizadas de CALB en la transesterificación del propanolol.

Derivado CALB	Enantio- preferencia	Actividad específica (U/g)	ee _p (%)	E _p
EC- CALB	R	0.61±0.5	50.2	3.2±0.2
EC-CALB-A 100%	R	0.49±0.4	77.4	8.6±0.2
EC-CALB-S 100%	R	0.48±0.6	75.7	7.9±0.7
EC-CALB-PEG 100%	R	0.40±0.4	78.3	7.8±0.3

Conversión y ee_p (%) fue estimado por HPLC. Condiciones de reacción: propanolol (0,1mmol), acetato de vinilo (0,3mmol), derivado (50mg) y tolueno (hasta completar un volumen total de 3 ml).

Por otra parte el cambio favoreció de diferente forma la flexibilidad del sitio activo, haciendo que la enantioselectividad se incrementará de diferentes maneras, con respecto al derivado EC-CALB sin modificar. Sin embargo, la capacidad de los derivados de Octil-CALB modificados y sin modificar presentaron valores de E muy bajos, concluyentes con una baja capacidad de la enzima inmovilizada covalentemente de acomodar eficientemente y de manera selectiva uno de los enantiomeros de la mezcla racémica del propanolol. Por otra parte, puede ser que las interacciones que afectan la velocidad de reacción afecten la forma en que el derivado se acopla a el sitio activo permitiendo que tanto el enantiómero R como al enantiómero S reaccionen a constantes de velocidad muy cercanas (Bastida *et al.*, 1998; Palomo *et al.*, 2004).

- **(R/S)-Atenolol**

La enantioselectividad de cada uno de los derivados de CALB (EC-CALB, EC-CALB-A 100%, EC-CALB-S 100% y EC-CALB-PEG 100%) fue evaluada en la reacción de transesterificación del (R/S)-Atenolol en un rango comprendido entre el 15 y 20% de conversión (**figura 28**) y analizada por HPLC quiral.

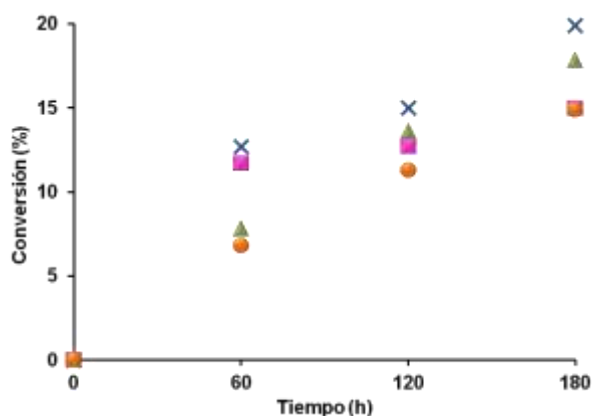


Figura 28. Cinética de la reacción de esterificación del (R/S)-Atenolol catalizada por derivados de CAL B. Condiciones de reacción: (R/S)-atenolol (0,05mmol), acetato de vinilo (0,1mmol), derivado (50mg) y tolueno (hasta completar un volumen de 3 ml), según lo descrito por Barbosa 2011.

Los derivados usados en el estudio fueron: (X) EC-CALB, (■) EC-CALB-A-100%, (▲) EC-CALB-S-100%, (●) EC-CALB-PEG-100%.

Los resultados mostrados en la **tabla 8** muestran que el derivado de EC-CALB, presentó la mayor actividad (0.88 U/g) en la resolución cinética del (R/S)-Atenolol comparada con los derivados modificados por aminación, succinilación y pegilación.

De la misma manera, el derivado EC-CALB mostró la mayor enantioselectividad ($E=54.6$) en comparación con los derivados EC-CALB-A, EC-CALB-S y EC-CALB-PEG.

Tabla 8. Enantioselectividad de las preparaciones inmovilizadas de CALB en la transesterificación del atenolol.

Derivado CALB	Enantio-preferencia	Actividad específica (U/g)	ee _p (%)	E _p
EC- CALB	R	0.88±0.07	95.5	54.6±0.1
EC-CALB-A 100%	R	0.66±0.05	90.3	22.8±0.3

EC-CALB-S 100%	R	0.79±0.08	85.3	15.1±0.5
EC-CALB-PEG 100%	R	0.66±0.04	94.3	39.8±0.2

Conversión y ee_p (%) fue estimado por HPLC. Condiciones de reacción: Atenolol (0,05mmol), acetato de vinilo (0,15mmol), derivado (50mg) y tolueno (hasta completar un volumen total de 3 ml).

Estos resultados sugieren que los procesos de modificación (aminación y succinilación), los cuales generaron grandes cambios en las interacciones electrostáticas de atracción en la superficie enzimática de la CALB, originaron una deformación del sitio activo de la enzima favorable para el acceso del enantiómero R. Siendo el derivado de EC-CALB-PEG cuyos grupos carboxílicos fueron modificados por completo (aumento de la densidad de cargas hidrofóbicas), el que presentó un mayor favorecimiento del sitio activo, seguido por el derivado modificado por aminación EC-CALB-A. En contraste, el acceso del enantiómero R al sitio acil enlazante del bolsillo hidrofóbico puede posiblemente ser impedido por efectos estéricos (Léonard-Nevers *et al.*, 2009), producto de la presencia de cargas negativas introducidas en la succinilación.

Por otro lado, la enantioselectividad mostrada por los derivados de CAL B en la resolución cinética del atenolol fue mayor que la exhibida por los mismos derivados en la resolución del propanolol. Los resultados sugieren que la estructura del sustrato influye de una manera significativa sobre la enantioselectividad mostrada por los derivados. Además la baja enantioselectividad obtenida en la reacción de esterificación del (R/S)-atenolol, sugiere el grado de flexibilidad del sitio activo permite que el enantiómero R como al enantiómero S reaccionen a constantes de velocidad muy cercanas (Bastida *et al.*, 1998; Palomo *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

- Se determinaron las mejores condiciones de reacción para llevar a cabo las modificaciones (aminación, succinilación y PEGilación) en fase sólida del derivado Octil-CALB en los rangos de modificación propuestos 10, 50 y 100%.
- La modificación química por aminación, succinilación y PEGilación del derivado CALB inmovilizado sobre Octil-agarosa no produjo cambios en la actividad hidrolítica del p-NPB ni en la estabilidad enzimática determinada a 70°C, o en presencia del co-solvente THF.
- Las modificaciones químicas de los derivados de CALB inmovilizados en Octil agarosa (por adsorción) y Eupergit (por enlace covalente) produjeron una disminución de la actividad enzimática frente al mandelato de metilo. Sin embargo, se logró un aumento en los valores de enantioselectividad de los derivados inmovilizados en Eupergit C 250L (desde E= 7.5, hasta E=19.1).
- La modificación química por aminación, succinilación y PEGilación del derivado CALB inmovilizado sobre Eupergit C 250L produjo una alteración en los valores de enantioselectividad frente a los sustratos mandelato de metilo (E=7.5 y E=19.1) y los amino alcoholes propanolol (E= 3.2 y E=7.9) y atenolol (E=54.6 y E=15.1).
- Los derivados de CALB inmovilizados en Eupergit C 250L presentaron la actividad específica más alta de la enzima frente a los aminoalcoholes propanolol y atenolol (de 0.61 y 0.88 U/g de soporte respectivamente).
- La modificación química de los derivados de CALB inmovilizados en Eupergit C aumentaron la enantioselectividad frente al propanolol de E=

3.6 (EC-CALB) hasta E= 8.6 (EC-CALB-A) y la disminuyeron frente al atenolol de E= 54.6 (EC-CALB) hasta E= 15.1 (EC-CALB-S).

RECOMENDACIONES

- ❖ Emplear técnicas adicionales como por ejemplo MALDI-TOF para el análisis del grado de modificación química.

- ❖ Desorber la CALB modificada por aminación, succinilación y pegilación del soporte de Octil-agarosa y probar sus propiedades al inmovilizarlas sobre soportes heterofuncionales.

- ❖ Evaluar el efecto de la cantidad de agua en el medio de reacción al realizar la transesterificación de los amino alcoholes estudiados (propranolol y atenolol).

REFERENCIAS

- Alcalde M, Plou FJ, Teresa Martín M, Valdés I, Méndez E, Ballesteros a. "Succinylation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacter* sp. 501 enhances its transferase activity using starch as donor". *Journal of Biotechnology* . **(2001)**; 86,71–80.
- Aloulou A, Rodriguez J a., Fernandez S, van Oosterhout D, Puccinelli D, Carrière F. "Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. **(2006)**; 1761,995–1013
- Arroyo Miguel. Síntesis de ácidos 2-aril-propionicos hommoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas. Universidad complutense; **(1995)**. Tesis doctoral
- Arroyo Miguel, M S-MJ, Sinisterra JV. "Stabilization of lipase B from *candida antarctica* by immobilization on different supports". *Stability and stabilization of biocatalysts*. **(1998)**,565–70.
- Avila-González R, Pérez-Gilabert M, López-López M a, García-Carmona F. "Candida rugosa lipase-catalyzed intramolecular O- to N- transacylation of butyryl propranolol in the presence of cyclodextrins". *Biotechnology progress* **(2005)**; 21(2):338–42.
- Bai ZW, Zhou YK. "A novel enzyme support derived from aminated silica gel and polysuccinimide: preparation and application for the immobilization of porcine pancreatic lipase". *Reactive and Functional Polymers* **(2004)**; 59(1):93–8.
- Bailon P, Berthold W. "Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins". *Research focus*. **(1998)**; 1(8):352–6.
- Balcão VM, Paiva a L, Malcata FX. "Bioreactors with immobilized lipases: state of the art". *Enzyme and microbial technology*. **(1996)**; 18(6):392–416.
- Ball AJ, Corr S, Micklefield J. "Lipase-catalysed kinetic resolutions of secondary alcohols in pressurised liquid hydrofluorocarbons". *Tetrahedron Letters* **(2009)**; (26):3543–6.
- Barbosa O, Ariza C, Ortiz C, Torres R. "Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphoxy)-2-propanolol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B)." *New Biotechnology*. **(2010)**; 7(6):844–50.

- Barbosa O, Ortiz C, Torres R, Fernandez-Lafuente R. "Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* in organic media: Enantiospecific production of atenolol acetate". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2011);71(3-4):124–32.
- Baslé E, Joubert N, Pucheault M. "Protein chemical modification on endogenous amino acids". *Chemistry & biology*. (2010); 17(3):213–27.
- Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, Fernandez-Lafuente R, Huguet J, Guisan J. "A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports". *Biotechnology and bioengineering*. (1998);58(5):486–93.
- Bell G, Halling J, Moore B, Partridge J, Rees G. "Biocatalyst behavior in low-water systems". *Trends in Biotechnology*. (1995),13,(11)468-473
- Betancor L, Fernandez-Lafuente G, Guisan JM. "Modulation of the Selectivity of Immobilized Lipases by Chemical and Physical Modifications: Release of Omega-3 Fatty Acids from Fish Oil". *Journal Of The American Oil Chemists Society*. (2012); 97–102.
- Bianchi D, Cesti P, Golini P. "Enzymatic preparation of optically active α and β -hydroxyaldehydes" *Tetrahedron* (1989), 45(3), 869-876.
- Biasutti M, Abuin EB, Silber JJ, Correa NM, Lissi E . "Kinetics of reactions catalyzed by enzymes in solutions of surfactants". *Advances in colloid and interface science*. (2008); 136(1-2):1–24.
- Bogdanov A A, Klivanov A L, Torchilin VP. "Protein immobilization on the surface of liposomes via carbodiimide activation in the presence of N-hydroxysulfosuccinimide". *FEBS letters*. (1988); 231(2):381–4.
- Bolivar JM, Mateo C, Godoy C, Pessela BCC, Rodrigues DS, Giordano RLC, et al. "The co-operative effect of physical and covalent protein adsorption on heterofunctional supports". *Process Biochemistry*. (2009); 44(7):757–63.
- Bolivar JM, Mateo C, Grazu V, Carrascosa AV, Pessela BC, Guisan JM. "Heterofunctional supports for the one-step purification, immobilization and stabilization of large multimeric enzymes: Amino-glyoxyl versus amino-epoxy supports". *Process Biochemistry*. (2010); 45(10):1692–8.
- Bornscheuer U. "Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases". *Current Opinion in Biotechnology*. (2002); 543–7.
- Brockman HL. Lipases. *Eccyclopedia of biological chemistry*. (2004); 2:571–5.

- Cabrera Z, Fernandez-Lorente G, Fernandez-Lafuente R, Palomo JM, Guisan JM. "Enhancement of Novozym-435 catalytic properties by physical or chemical modification". *Process Biochemistry*. (2009); 44(2):226–31.
- Cambillau C, Van Tilbeurgh H. "Structure of hydrolases: lipases and cellulases". *Current Opinion in Structural Biology*. (1993);3(6):885–95.
- Cao L. Covalent Enzyme Immobilization. In: Sons JW&, editor. *Carrier-bound Immobilized Enzymes Principles, Applications and Design*. (2005).
- Carraway KL. Carbodiimide Modification of Proteins. *Proteins*. (1966); 439(1956): 616–23.
- Carraway KL, Koshland DE. "Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimide reagents". *Biochimica et Biophysica Acta*. (1968); 160:272–4.
- Carrea G, Riva S. "Medium Engineering of Enzymatic Reactions: Enzyme selectivity in organic solvents can differ from that in water and Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents". *Angew.Chem.Int.Ed.* (2000); 39:2226–54.
- Chen C-shih, Charles, J Sih. "General aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: the use of lipases". *Angew.Chem.Int.Ed.* (1989); 28(6):695–707.
- Chiou S-H, Wu W-T. "Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups". *Biomaterials*. (2004); 25(2):197–204.
- Cowan DA, Fernandez-lafuente R. *Enzyme and Microbial Technology* "Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization." *Enzyme and Microbial Technology*. (2011); 49(4):326–46
- Damle SV, Patil PN, Salunkhe MM. "Biotransformations with *Rhizopus arrhizus* and *Geotrichum candidum* for the preparation of (S)-Atenolol and (S)-Propranolol". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. (2000); 8(8), 2067–2070.
- Davis BG. "Chemical modification of biocatalysts". *Current Opinion in Biotechnology*. (2003); 14(4):379–86.
- De la Casa R., Sanchez JM, Guisan JM, M S-MJ, Sinisterra JV. "Modification of the activities of two different lipases from *Candida rugosa* with dextrans". *Enzyme*. (2002); 30:30–40.
- Derewenda ZS, Dodson GG, Lawson D., Turkenburg J., Bjorkling F, et al. "A model for interfacial activation in lipases from the structure of fungal lipase-inhibitor complex". *Nature*. (1991); 351:491–4.

- Derewenda ZS. "Structure and function of lipases". *Advances in Protein Chemistry*. (1994); 45:1–52.
- Desnuelle P. The lipase. In: Boyer P., editor. *The enzyme*. New York: Press, Academic; 1972. p. 575.
- Diaz-Rodríguez and Davis BG. "Chemical modification in the creation of novel biocatalysts". *Current Opinion in Chemical Biology*. (2011); 15:211–9.
- Dominguez de Maria P, Carbonioerlemans C, Tuin B, Bargeman G, Vandermeer a, Vangemert R. "Biotechnological applications of lipase A: State-of-the-art". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2005); 37(1-6):36–46.
- Durand J, Teuma E, Gomez M. "Ionic liquids as a medium for enantioselective catalysis". *Comptes Rendus Chimie*. (2007); 10(3):152–77.
- Egholm E, Andersen L, Anthonsen T. "Immobilization does not influence the enantioselectivity of CAL-B catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols" *Tetrahedron: Asymmetry*, (2005), 16(4), 847-850.
- Ericsson DJ, Kasrayan A, Johansson P, Bergfors T, Sandström AG, Bäckvall J-E, et al. "X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation". *Journal of Molecular Biology*. (2008); 376(1):109–19.
- Escorcía A, Cruz J, Torres R, Ortiz C. "Resolución del mandelato de metilo por preparaciones inmovilizadas de lipasa de *Candida antarctica* B". *Vitae*. (2011); 18(1):33–41.
- Fernandez-Lafuente R, Armisén P, Sabuquillo P, Fernández-Lorente G, Guisán JM. "Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports". *Chemistry and physics of lipids*. (1998); 93(1-2):185–97.
- Fernández-Lorente G, Terreni M, Mateo C, Bastida a, Fernández-Lafuente R, Dalmases P, et al. "Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilized *Pseudomonas* lipase". *Enzyme and microbial technology*. (2001); 8;28(4-5):389–96.
- Fernandez-Lorente G, Godoy C a, Mendes A a, Lopez-Gallego F, Grazu V, de Las Rivas B, et al. "Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* to improve its stabilization via covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose". *Biomacromolecules*. (2008); 9(9):2553–61.
- Fernández-Lorente G, Palomo JM, Cabrera Z, Guisán JM, Fernández-Lafuente R. "Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of

- lipases by interfacial activation on hydrophobic supports". *Enzyme and Microbial Technology*. (2007); 41(5):565–9.
- Forde J, Vakurov A, Gibson TD, Millner P, Whelehan M, Marison IW, et al. "Chemical modification and immobilisation of lipase B from *Candida antarctica* onto mesoporous silicates". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2010); 66(1-2):203–9.
 - Fuentes M, Palomo JM, Mateo C, Venteo A, Sanz A, Fernández-Lafuente R, et al. "Optimization of the modification of carrier proteins with aminated haptens". *Journal of immunological methods*. (2005); 307(1-2):144–9.
 - Geoghegan KF. Modification of amino groups. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan*. (2001); Chapter 15
 - Ghanem A, Schurig V. "Entrapment of *Pseudomonas cepacia* lipase with peracetylated β -cyclodextrin in sol-gel: application to the kinetic resolution of secondary alcohols". *Tetrahedron: Asymmetry*. (2003); 14(17):2547–55.
 - Ghanem A, Aboul-Enein HY. "Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents". *Tetrahedron: Asymmetry*. (2004); 15(21):3331–51
 - Ghanem A. "Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds". *Tetrahedron*. (2007); 63(8):1721–54.
 - Gilbert EJ, Leicester U. "*Pseudomonas* lipases: Biochemical properties and molecular cloning". *Enzyme*. (1993); 15:634–45.
 - Godoy C a., de las Rivas B, Filice M, Fernández-Lorente G, Guisan JM, Palomo JM. "Enhanced activity of an immobilized lipase promoted by site-directed chemical modification with polymers". *Process Biochemistry*. (2010)
 - A) Godoy CA, Fernández-lorente G, De B, Filice M, Guisan JM, Palomo JM. "Medium engineering on modified *Geobacillus thermocatenulatus* lipase to prepare highly active catalysts". *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*. (2011); 70(3-4):144–8.
 - B) Godoy CA, De B, Bezbradica D, Bolivar JM, López-gallego F, Fernandez-lorente G, et al. "Reactivation of a thermostable lipase by solid phase unfolding / refolding Effect of cysteine residues on refolding efficiency". *Enzyme and Microbial Technology*. (2011); 49:388–94.
 - Gotor-fernandez V, Brieva R, Gotor V. "Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2006); 40(3-4):111–20.

- Grazu V, Betancor L, Montes T, Lopez-Gallego F, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. "Glyoxyl agarose as a new chromatographic matrix". *Enzyme and Microbial Technology* . (2006); 38(7):960–6.
- Guisan JM, Sabuquillo P, Fernandez-lafuente R, Fernandez-lorente G. "Preparation of new lipases derivatives with high activity – stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine". *Journal of Molecular Catalysis*. (2001); 817–24.
- Gutierrez-Ayesta, C., Carelli, A., Ferreira, M. "Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids". *Enzyme and Microbial Technology*. (2007). 41, 35–43.
- Hasan F, Shah AA, Hameed A. "Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review". *Biotechnology advances*. (2009); 27(6):782–98.
- Hermanson G. Cleavable reagent systems. In: *Bioconjugates techniques*. Amsterdam: Elsevier Inc.; (2008).
- Hernáiz MJ S-MJM, Sinisterra JV. "Influence of the Nature of Modifier in the Enzymatic Activity of Chemical Modified Semipurified Lipase from *Candida rugosa*". *Biotechnology and bioengineering*. (1997); 55(2).
- Hernandez K, Fernandez-Lafuente R. "Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on octadecyl Sepabeads: A very stable biocatalyst in the presence of hydrogen peroxide". *Process Biochemistry*. (2011); 46(4):873–8.
- Hollmann F, Grzebyk P, Heinrichs V, Doderer K, Thum O. "On the inactivity of *Candida antartica* lipase B towards strong acids". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2009) ; 57(1-4):257–61.
- Hudson EP, Liszka MJ, Clark DS. The use of enzymes for nonaqueous organic transformations. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* (3rd Edition). American Society for Microbiology (ASM); (2010). p. 509.
- Huerta F, Laxmi Y, Backvall J. "Dynamic kinetic resolution of alpha-hydroxy acid esters". *Organic letters*. (2000); 2(8):1037–40.
- Illanes Andres, Alvarez Lorena AG. "Esterificación quimioselectiva de fitosteroles de madera mediante lipasas Chemoselective transesterification of wood steroles by lipases". *Rev colomb biotecnol*. (2008); 17–35.
- Lyer PV, Ananthanarayan L. "Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment". *Process Biochemistry*.(2008),43(10):1019–32.

-
- Jaeger K-E, Holliger P. "Chemical biotechnology-a marriage of convenience and necessity". *Current opinion in Biotechnology* . **(2010)**; 21(6):711–2.
 - Jene Q, Pearson JC, Lowe CR. "Surfactant modified enzymes: Solubility and activity of surfactant-modified catalase in organic solvents". *Solutions*. **(1997)**;229(96):69–74.
 - José C, Bonetto RD, Gambaro L a., Torres MDPG, Foresti ML, Ferreira ML, et al. "Investigation of the causes of deactivation–degradation of the commercial biocatalyst Novozym® 435 in ethanol and ethanol–aqueous media". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **(2011)** 71(3-4):95–107.
 - Jurček O, Wimmerová M, Wimmer Z. "Selected chiral alcohols: Enzymic resolution and reduction of convenient substrates". *Coordination Chemistry Reviews*. **(2008)**; 252(5-7):767–81.
 - Kamal A, Malik MS, Shaik AA, Azeeda S. "Lipase mediated resolution of γ -azidoalcohols in aqueous and organic media: Synthesis of (R)- and (S)-fluoxetine and duloxetine". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **(2009)** ; 58(1-4):132–7.
 - Katchalski-Katzir E, Kraemer DM. "Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **(2000)**; 10(1-3):157–76.
 - Khajeh K, Ranjbar B, Naderi-manesh H. "Chemical modification of bacterial α -amylases: changes in tertiary structures and the effect of additional calcium". *Enzyme*. **(2001)**; 1548:229–37.
 - Kim KK, Song HK, Shin DH, Hwang KY, Suh SW. "The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor". *Structure*. **(1997)**; 5(2):173–85.
 - Knezevic Z, Milosavic N, Bezbradica D, Jakovljevic Z, Prodanovic R. "Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment". *Biochemical Engineering Journal* . **(2006)**; 30(3):269–78.
 - Kodera, Yoh, Matsushima A, Hiroto M, Nishimura H, Ishi A, Ueno T, et al. "Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications". *Science*. **(1998)**; 23(97):1233–71.
 - Koeller KM, Wong CH. "Enzymes for chemical synthesis". *Nature*. **(2001)**; 409(6817):232–40.

- Kojima Y, Shimizu S. "Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. (2003); 96(3):219–26.
- Koops BC, Verheij HM, Slotboom AJ, Egmond MR. "Effect of chemical modification on the activity of lipases in organic solvents". *Enzyme and Microbial Technology*. (1999); 25(7):622–31.
- Kurt F, Ramesh P. "Chemical biotechnology A happy marriage between chemistry and biotechnology: asymmetric synthesis via green chemistry". *Current Opinion in Biotechnology*. (2000); 11:517–9.
- Laszlo J A., Jackson M, Blanco RM. "Active-site titration analysis of surface influences on immobilized *Candida antarctica* lipase B activity". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2011); 69(1-2):60–5.
- Léonard-Nevers V, Marton Z, Lamare S, Hult K, Graber M. "Understanding water effect on *Candida antarctica* lipase B activity and enantioselectivity towards secondary alcohols". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2009); 59(1-3):90–5.
- Liu Y-Y, Xu J-H, Wu H-Y, Shen D. "Integration of purification with immobilization of *Candida rugosa* lipase for kinetic resolution of racemic ketoprofen". *Journal of biotechnology*. (2004);110(2):209–17
- López-Gallego F, Montes T, Fuentes M, Alonso N, Grazu V, Betancor L, et al. "Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports". *Journal of biotechnology*. (2005); 116(1):1–10.
- M QD, Kohji S, Jackson R, Harmony J. "Lipoprotein lipase-catalyzed hydrolysis of water-soluble p-nitrophenyl esters. Inhibition by apolipoprotein C-II". *Biochemistry*. (1982); 21(26):6872– 6879.
- Maier NM, Franco P, Lindner W. "Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives". *Journal of chromatography. A* .(2001);906(1-2):3–33.
- Main B. "Problems and wonders of chiral". In: Kiado A, editor. Problems and wonders of chiral. Budapest: 1990. p. 329–48.
- Makhzoum A, Knappb JS. "Purification and Properties of Lipase from *Pseudomonas fluorescens* Strain 2D". *Int. Dairy Journal* (1996); 6:459–72.
- Martinelle M, Holmquist M, Hult K. "One the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *humicola lanuginosa* lipase". *Biochimica et Biophysica acta*.(1995);1258:272–6.

- A) Mateo C, Abian O, Fernandez-Lafuente R, Guisan J. "Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment". *Enzyme and microbial technology*. **(2000)**; 26(7):509–15.
- B) Mateo C, Fernández-Lorente G, Abian O, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. "Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage". *Biomacromolecules* **(2000)**; 1(4):739–45.
- Mateo C, Palomo JM, Fuentes M, Betancor L, Grazu V, López-Gallego F, et al. "Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins." *Enzyme and Microbial Technology*. **(2006)**; 39(2):274–80.
- A) Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques". *Enzyme and Microbial Technology*. **(2007)**; 40(6):1451–63.
- B) Mateo C, Grazú V, Pessela BCC, Montes T, Palomo JM, Torres R, et al. "Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization". *Biochemical Society transactions*. **(2007)**; 35(6):1593–601.
- Miled N, Beisson F, de Caro J, de Caro a, Arondel V, Verger R. "Interfacial catalysis by lipases". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **(2001)**; 11(4-6):165–71.
- Mingarro I, Abad C, Braco L. "Interfacial activation-based molecular bioimprinting of lipolytic enzymes". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **(1995)**; 92(8):3308–12.
- Montes T, Grazú V, Lopez-Gallego F, Hermoso J, Guisán JM, Fernandez-lafuente R. "Chemical modification of protein surfaces to improve their reversible enzyme immobilization on ionic exchangers". *Biomacromolecules*. **(2006)**; 11:3052–8.
- Muralidhar RV, Chirumamilla RR, Marchant R, Ramachandran VN, Ward OP, Nigam P. "Understanding lipase stereoselectivity". *Journal of Microbiology*. **(2002)**:81–97.
- A) Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. "Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters". *Enzyme and Microbial Technology*. **(2002)**; 31(6):775–83.
- B) Palomo JM, Ferna G, Mateo C, Fuentes M, Guisan JM. "Enzymatic production of using a commercial preparation of lipase A from *Candida antarctica*: the role of a contaminant esterase". *Tetrahedron*. **(2002)**; 13:2653-2659.

- Palomo JM, Fernandez-lorente G, Guisan JM, Fernandez-lafuente R. "Modulation of Immobilized Lipase Enantioselectivity via Chemical Amination". *Advance synthesis and catalysis*. (2007); 349:1119– 1127.
- Patel RN. "Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis". *Coordination Chemistry Reviews*. (2008) ; 252(5-7):659–701.
- Pedroche J, del Mar Yust M, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Girón-Calle J, Alaiz M, et al. "Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability". *Enzyme and Microbial Technology* . (2007); 40(5):1160–6.
- Perea JRA. "Interferones pegilados: revisión preliminar de sus características farmacocinéticas". *Revista clínica española*. (2010); 201, 205-211
- Persson M, Costes D, Wehtje E, Adlercreutz P. "Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity". *Enzyme and Microbial Technology*. (2002); 30(7):916–23.
- Pinholt C, Bukrinsky JT, Hostrup S, Frokjaer S, Norde W, Jorgensen L. "Influence of PEGylation with linear and branched PEG chains on the adsorption of glucagon to hydrophobic surfaces". *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* . (2011); 77(1):139–47.
- Pozzo AD, Vanini L, Fagnoni M, Guerrini M, Benedittis AD, Muzzarelli RAA. "Preparation and characterization of poly (ethylene glycol) -crosslinked reacylated chitosans". *Carbohydrates polymers*. (2000); 42:201–6.
- Queiroz J a, Tomaz CT, Cabral JM. "Hydrophobic interaction chromatography of proteins". *Journal of biotechnology* . (2001);87(2):143–59.
- Queiroz N, Grac M. "Pseudomonas sp . lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (R,S)-methyl mandelate". *Tetrahedron Letters*. (2002); 43:5225–7.
- Quijano G, Couvert A, Amrane A. "Ionic liquids: applications and future trends in bioreactor technology". *Bioresource technology*. (2010); 101(23):8923–30.
- Rajagopalan A, Kroutil W. "Biocatalytic reactions: selected highlights". *Materials Today*. (2011); 14(4):144–52.
- Rantwijk FV, Sheldon R a. "Enantioselective acylation of chiral amines catalysed by serine hydrolases". *Tetrahedron*. (2004); 60(3):501–19.

- Rasor JP, Voss E. "Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry". *Drug Discovery Today*. (2001); 221:145–58.
- Reetz MT. "Lipases as practical biocatalysts". *Current Opinion in Chemical Biology*. (2002); 6(2):145–50.
- Rivera-pérez C, García-Carreño F, Paz L, Sur BC. "Enzimas lipolíticas y su aplicación en la industria del aceite". *Biotecnología*. (2007); 11(2):37–45.
- Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. "Chemistry for peptide and protein PEGylation". *Advanced Drug Delivery Reviews*. (2002); 54(4):459–76.
- A) Rodrigues RC, Bolivar JM, Volpato G, Filice M, Godoy C, Fernandez-Lafuente R, et al. "Improved reactivation of immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus* by its coating with highly hydrophilic polymers". *Journal of biotechnology*. (2009); 144(2):113–9.
- B) Rodrigues RC, Bolivar JM, Palau-Ors A, Volpato G, Ayub M a. Z, Fernandez-Lafuente R, et al. "Positive effects of the multipoint covalent immobilization in the reactivation of partially inactivated derivatives of lipase from *Thermomyces lanuginosus*." *Enzyme and Microbial Technology*. (2009); 44(6-7):386–93.
- C) Rodrigues RC, Godoy C a., Volpato G, Ayub M a. Z, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. "Immobilization–stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination". *Process Biochemistry*. (2009); 44(9):963–8.
- Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. "Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2010); 64(1-2):1–22.
- Rodrigues, Rafael C, Berenguer-Murcia ANgel, Fernandez-lafuente R. "Coupling Chemical Modification and Immobilization to Improve the Catalytic Performance of Enzymes". *Advanced Synthesis and Catalysis*. (2011); 353:2216–38.
- Sabuquillo P, Reina J, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. "Interfacial affinity chromatography" of lipases: separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups". *Biochimica et biophysica acta*. (1998); 1388(2):337–48.
- Sanchez A. "Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa* aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático". Universitat Autònoma de Barcelona; (1998). Tesis doctoral.
- Sarda L, Desnuelle P. "Action of Pancreatic Lipase on Es- ters in Solution". *Btochtm Biophys Acta* (1958), 30:513-521.

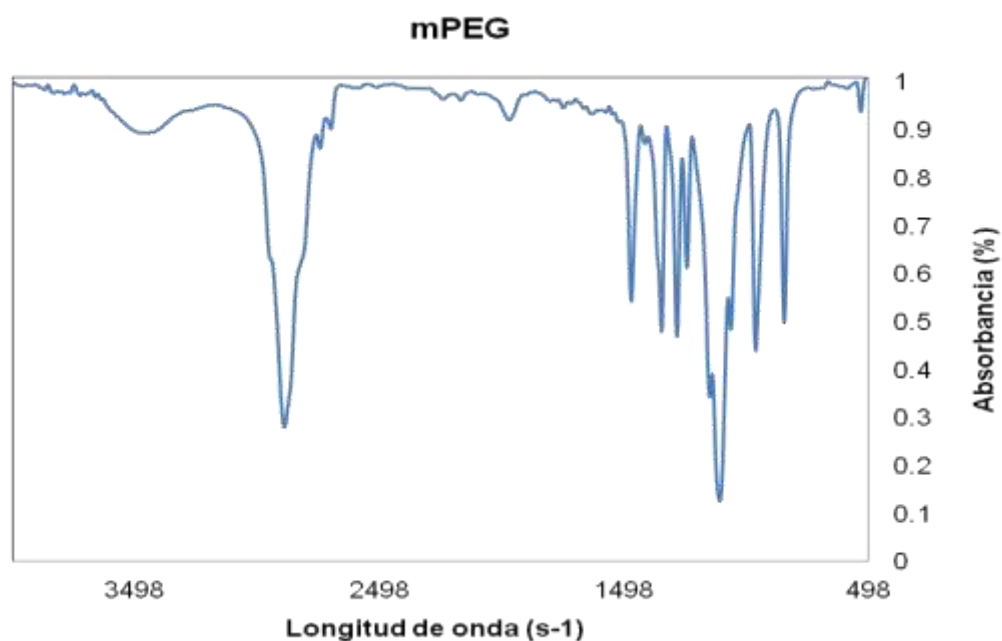
- Sashiwa H, Aiba S-ichi. "Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials". *Progress in Polymer Science*. (2004); 29(9):887–908.
- Schrag, J., Li, Y., Cygler, M. "The open conformation of a *Pseudomonas* lipase". *Structure*. (1997). 5, 187-202.
- Secundo F, Carrea G. "Lipase activity and conformation in neat organic solvents". *Journal of Molecular Catalysis*. (2002); 93–102.
- Secundo F, Carrea G, Tarabiono C, Gatti-Lafranconi P, Brocca S, Lotti M, et al. "The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2006); 39(1-4):166–70.
- Sharma R, Chisti Y, Chand U. "Production, purification, characterization and applications of lipases". *Biotechnology Advances*. (2001); 19:627–62.
- Stoschitzky K, Klein W, Lindner W. Royal Society Muller Award. *Science*. (1997); 18:306–7.
- Son T, Kim D, Kim B, Koo K, Park Y, Kim J, Lim H. Stoichiometric and nonstoichiometric polyelectrolyte complex of chitosan and polyethyleneglycol-monosuccinate: Preparation and characterization. *Journal of applied polymer science*. (2007); 104 (5):3057-3070
- Sugimura Y, Fukunaga K, Matsuno T, Nakao K, Goto M, Nakashio F. "A study on the surface hydrophobicity of lipases". *Biochemical engineering journal*. (2000); 5(2):123–8.
- Talbert JN, Goddard JM." Enzymes on material surfaces." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. (2012):1–12.
- Tardioli PW, Vieira MF, Vieira AMS, Zanin GM, Betancor L, Mateo C, et al. "Immobilization–stabilization of glucoamylase: Chemical modification of the enzyme surface followed by covalent attachment on highly activated glyoxyl-agarose supports". *Process Biochemistry*. (2011); 46(1):409–12.
- Torres R, Ortiz C, Pessela BCC, Palomo JM, Mateo C, Guisán JM, et al. "Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions". *Enzyme and Microbial Technology*. (2006) 39(2):167–71.
- Tufvesson P, Törnvall U, Carvalho J, Karlsson AJ, Hatti-Kaul R. "Towards a cost-effective immobilized lipase for the synthesis of specialty chemicals". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2011); 68(2):200–5.

- Ulbert O, Fráter T, Bélafi-Bakó K, Gubicza L. "Enhanced enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in ionic liquids as compared to organic solvents". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2004); 31(1-3):39–45.
- Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones T a. "The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*". *Structure*. (1994); 2(4):293–308.
- Verger R. "Interfacial activation of lipases: facts and artifacts". (1997); 15(1989):32–8.
- Veronese FM, Mammucari C, Schiavon F, Schiavon O, Lora S, Secundo F, et al. "Pegylated enzyme entrapped in poly(vinyl alcohol) hydrogel for biocatalytic application". *Farmaco (Società chimica italiana: 1989)*. (2001); 56(8):541–7.
- Vidya P, Chadha A. "Pseudomonas cepacia lipase catalyzed esterification and transesterification of 3-(furan-2-yl) propanoic acid/ethyl ester: A comparison in ionic liquids vs hexane". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2010) ; 65(1-4):68–72.
- Villeneuve P, Muderhwa JM, Graille J, Haas MJ. "Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2000); 9(4-6):113–48.
- Waldir P, Fernandes M, Marquetotti A, Vieira S, Maria G, Betancor L, et al. "Enzyme surface followed by covalent attachment on highly activated". *Process Biochemistry*. (2010):8–11.
- Wang P-Y, Tsai S-W. "Modification of enzyme surface negative charges via covalent immobilization for tailoring the activity and enantioselectivity". *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. (2009); 40(4):364–70.
- Wheatley JB, Schmidt DE. "Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports". *Journal of chromatography. A*. (1999); 849(1):1–12.
- Woghiren C, Sharma B, Stein S. "Protected thiol-polyethylene glycol: a new activated polymer for reversible protein modification". *Bioconjugate chemistry*. (1993);4(5):314–8
- Yadav GD, Lathi PS. "Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: kinetic studies". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2004); 27(2-3):113–9.
- Zor T, Selinger Z. "Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies". *Analytical*. (1996); 236(2):302–8

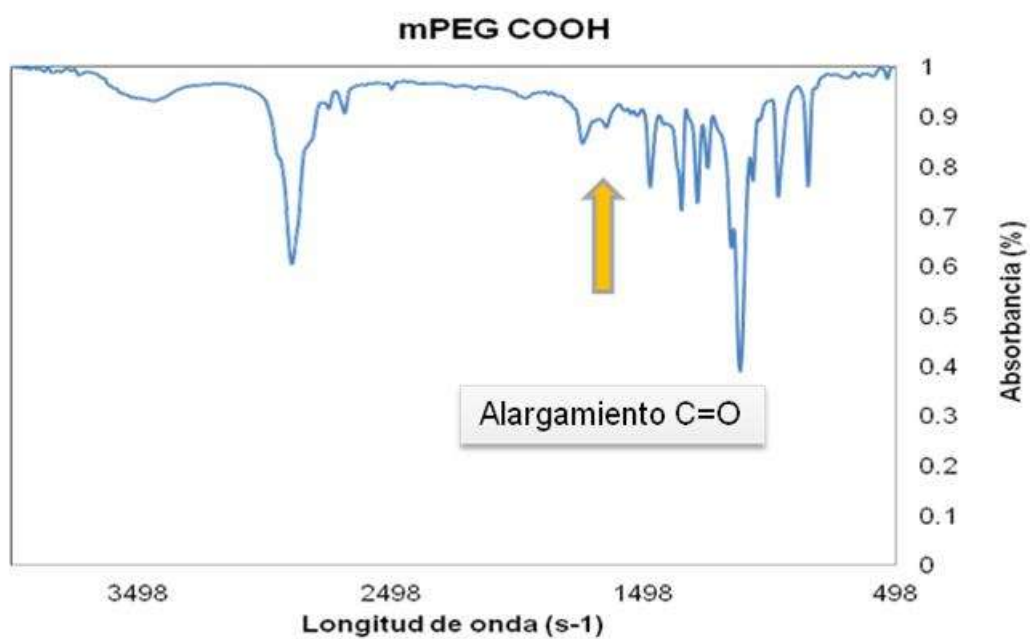
- Zhou H, Chen J, Ye L, Lin L, Yuan Y. "Enhanced performance of lipase-catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols in monoether-functionalized ionic liquids" *Bioresource Technology*, (2011); 10 (10)5562-5566.
- Modulación de la actividad de lipasas. Available from: <http://www.icp.csic.es/biocatalisis/web3/Palomoweb/uusframe/interes3.html>. Consultado en Marzo 2012.

ANEXOS

Anexo 1



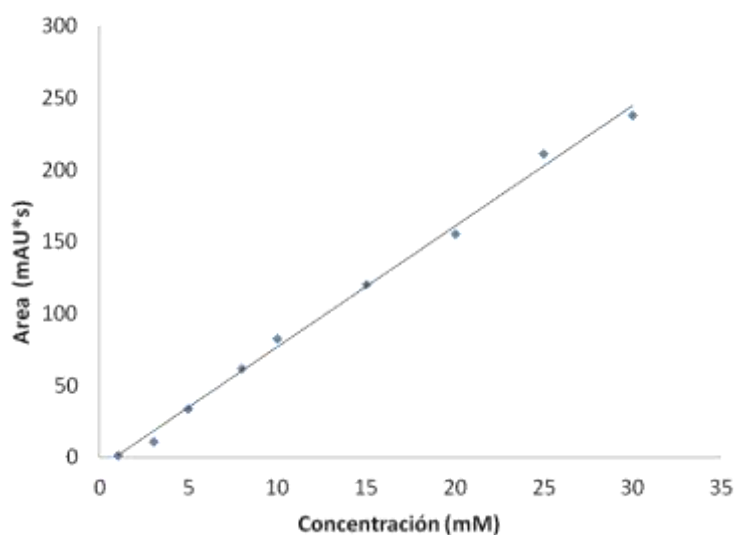
Datos seleccionados para mPEG COOH: IR: ν 3462 (OH), 1753 (vibración del C=O del ácido carboxílico y del ester), 1464 y 1348 (banda del CH₂) 1132 (banda del ester C-O)



Anexo 2

Curva calibración R/S-propranolol

Ecuación de la recta $Y = 2838.6 x - 1916.7$

Curva calibración R/S-atenolol

Ecuación de la recta $Y = 167.95 x - 144.8$

Anexo 3

La actividad específica de la CAL B se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Actividad específica (U/g)} = m \frac{10^6}{\varepsilon} * \frac{V_t}{V_m} * \frac{FD}{C_{prot}}$$

Donde

m = pendiente (mol/L.min)

ε = coeficiente de extinción molar del PNPB ($3100 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

V_t = Volumen total de la reacción

V_m = Volumen de la solución enzimática

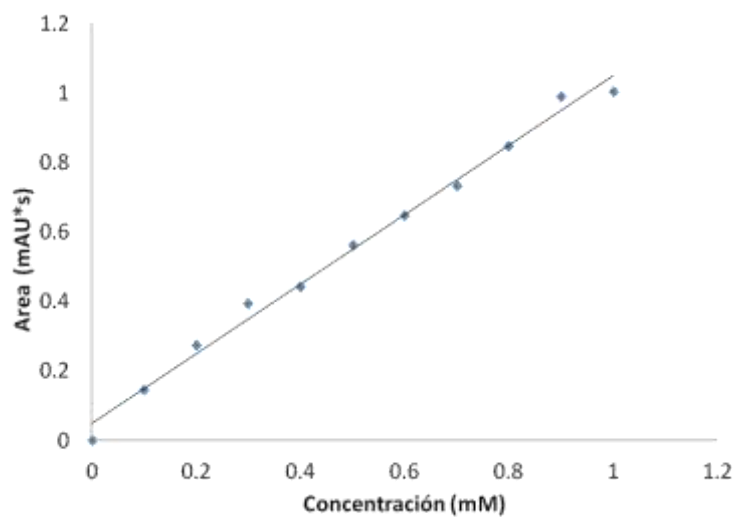
FD = Factor de dilución enzimático

C_{prot} = concentración de proteína en la solución enzimática

U = cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un mol de pNPB a 25°C

Anexo 4

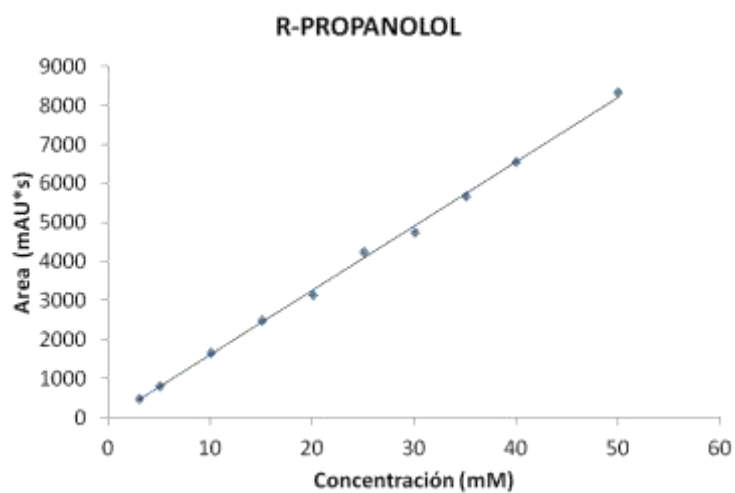
Curva calibración para la determinación de proteína mediante el método del BRADFORD



$$Y = 0.9995 x + 0.0497$$

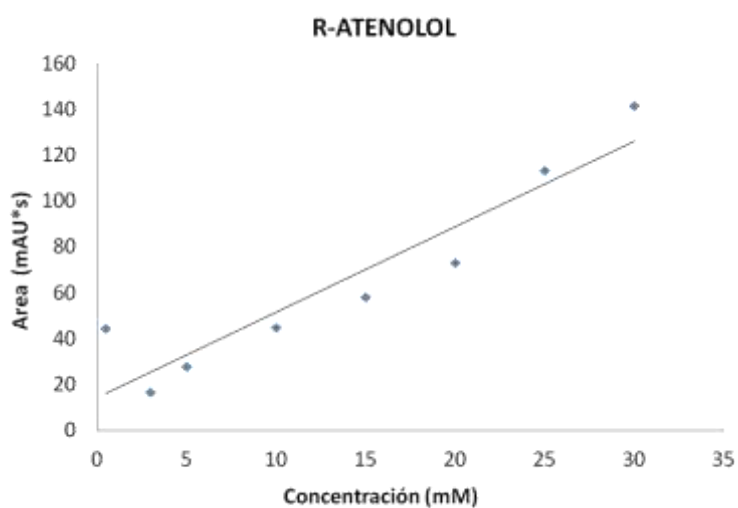
Anexo 5

Curva calibración de los aminoalcoholes



Ecuación de la recta R-propranolol

$$Y = 1649.5 x - 310.37$$

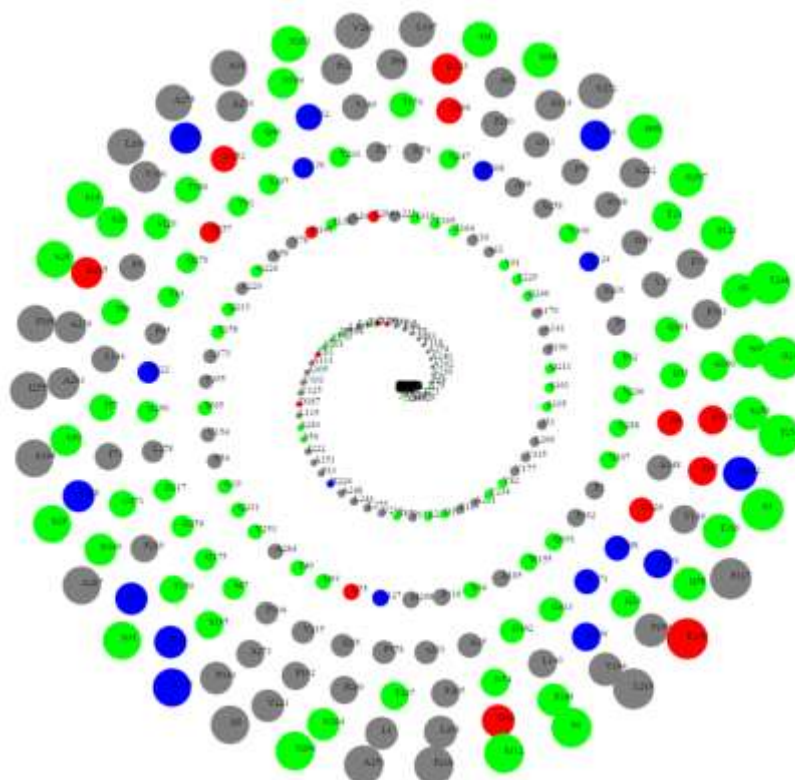


Ecuación de la recta R-atenolol

$$Y = 43.667 x - 6.773$$

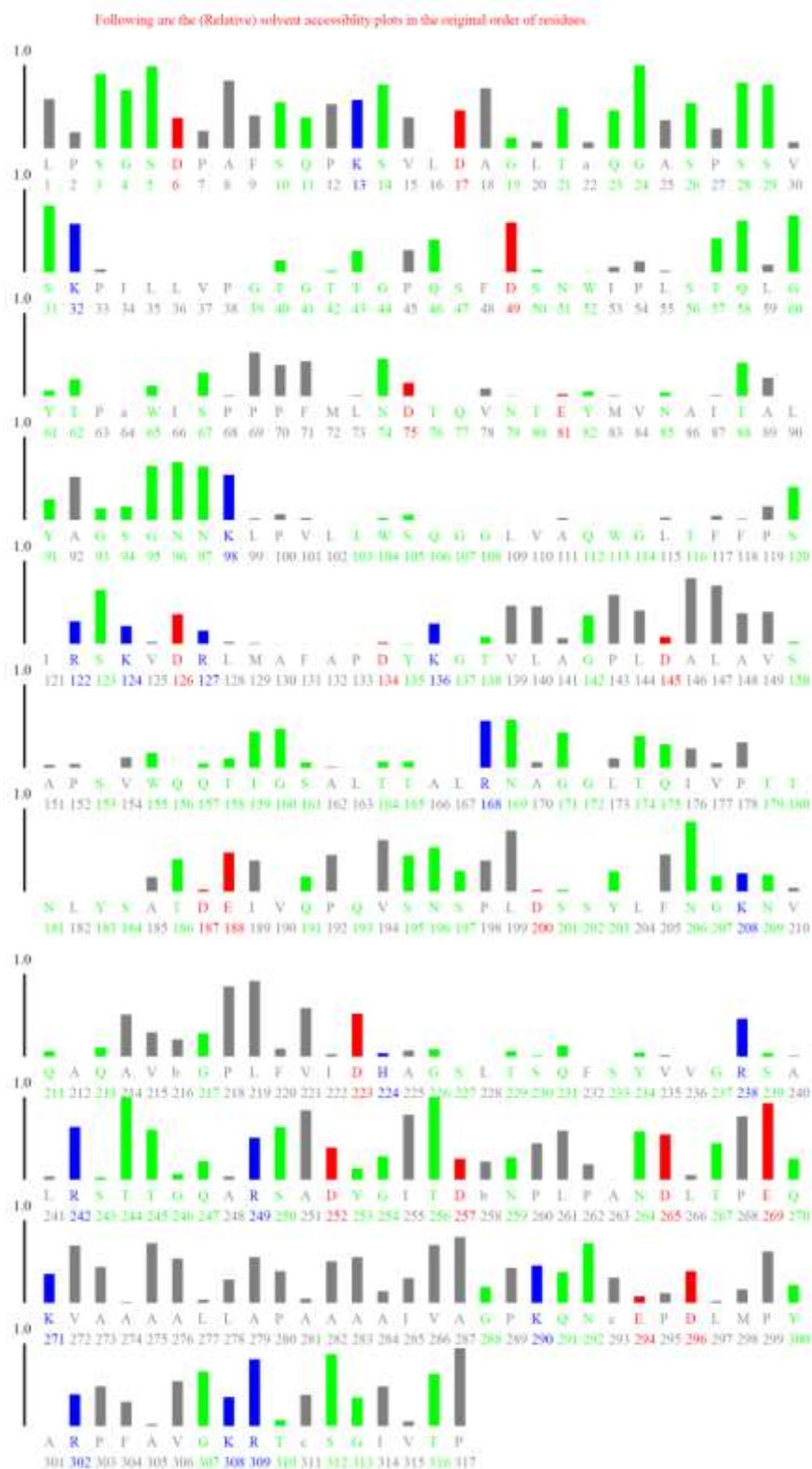
Anexo 6

Accesibilidad del agente modificante a los aminoácidos en la superficie enzimática



Código de colores utilizados:

En azul : residuos cargados positivamente (R,K,H); En rojo: residuos cargados negativamente (D,E); en verde: residuos polares sin carga (G,N,Y,Q,S,T,W); en amarillo: residuos hidrofóbicos (todos los demás)



Anexo 7

Tiempo de vida media de los derivados de octil-CALB modificada por succinilación, aminación y pegilación

Efecto de las modificación química en el tiempo de vida media de los derivados de CALB inmovilizada en octil-agarosa frente al p-NPB 0.4mM. Modificaciones realizadas:

a) Succinilación. B) Aminación. C) Pegilación. Pruebas realizadas a pH 7

A)

CALB Succinilada	Condiciones de inactivación	
	70°C	50% THF y 40°C
Octil-CALB	5.5	3.1
Octil-CALB-S 10%	3.9	2.9
Octil-CALB-S 50%	8.1	2.1
Octil-CALB-S 100%	8.6	1,3

B)

CALB aminada	Condiciones de inactivación			
	Derivados no hidroxilaminados		Derivados hidroxilaminados	
	70°C	50% THF 40°C	70°C	50% THF 40°C
Octil-CALB	2.9	1.5	-	-
Octil-CALB-A 10%	2.5	1.3	1.6	3.2
Octil-CALB-A 50%	0.7	0.4	2.2	0.3
Octil-CALB-A 100%	0.3	0.4	1.6	0.7

C)

CALB PEGilada	Condiciones de inactivación	
	70°C	50% THF y 25°C
Octil-CALB	1.0	0.9
Octil-CALB-PEG 10%	0.6	0.7
Octil-CALB-PEG 50%	0.5	0.5
Octil-CALB-PEG 100%	0.8	1.0

DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Participación en Congresos y Simposios

- ④ 43RD IUPAC WORLD CHEMISTRY CONGRESS, San Juan de Puerto Rico Junio 2011

Poster: “Modulation of biocatalytic properties by chemical amination of immobilized preparations of lipase B from *Candida antarctica*”

Ruiz M, Ortiz C, Torres R, Fernandez-Lafuente R

- ④ CONGRESO IBEROAMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIODIVERSIDAD, Manizales Colombia septiembre 2011

Ponencia: “Efecto de la modificación química de la lipasa B de *Candida antarctica* en fase sólida sobre sus propiedades catalíticas”

Ruiz M, Ortiz C, Torres R, Fernandez-Lafuente R

Publicación en revistas especializadas

- ④ MODULATION OF THE PROPERTIES OF IMMOBILIZED CALB BY CHEMICAL MODIFICATION WITH 2,3,4-TRINITROBENZENESULFONATE OR ETHYLENDIAMINE. ADVANTAGES OF USING ADSORBED LIPASES ON HYDROPHOBIC SUPPORTS

Barbosa O, **Ruiz M**, Fernández M, Ortiz C, Torres R, Fernández-Lafuente R
Process Biochemistry ,(47) 867-876 , (Publicado (2012)).

- ④ SOLID-PHASE AMINATION OF LIPASE B FROM *Candida antarctica* FOR THE PREPARATION OF CROSSLINKED ENZYME AGGREGATES: AN EFFICIENT SOLUTION FOR THE CROSSLINKING STEP

Galvis M, **Ruiz M**, Ortiz C, Cruz J, Barbosa O, Torres R, Fernández-Lafuente R
Process Biochemistry, (Aceptado (2012)).

© SOLID-PHASE MODIFICATION WITH SUCCINIC POLYETHYLENGLYCOL OF AMINATED LIPASE B FROM *Candida antarctica*: Effect of the immobilization protocol on enzyme catalytic properties

Ruiz M, Galvis M, Barbosa O, Ortiz C, Torres R, Fernández-Lafuente R
Journal of Molecular Catalysis B, (en evaluación (2012)).