

**RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (R/S)-PROPANOLOL Y (R/S)-ATENOLOL VÍA
REACCIONES DE ACETILACIÓN MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE LIPASAS
INMOVILIZADAS**

LUIS OVEIMAR BARBOSA JAIMES, Qco

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRIA EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2009**

**RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (R/S)-PROPANOLOL Y (R/S)-ATENOLOL VÍA
REACCIONES DE ACETILACIÓN MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE LIPASAS
INMOVILIZADAS**

LUIS OVEIMAR BARBOSA JAIMES

Trabajo de grado presentado para optar el título de magister en Química

DIRECTORES DEL PROYECTO DE GRADO

RODRIGO GONZALO TORRES SÁEZ, *PhD*

CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LÓPEZ, *PhD*

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN QUÍMICA

BUCARAMANGA

2009

TABLA DE CONTENIDO

	INTRODUCCIÓN	1
	OBJETIVOS	4
1.	MARCO DE REFERENCIA	5
1.1	LIPASAS	5
1.1.1	Estructura de las lipasas	6
1.1.2	Mecanismo de acción de lipasas	8
1.2	ENANTIOSELECTIVIDAD DE LIPASAS	10
1.3	ESTABILIZACIÓN Y MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES CATALÍTICAS DE LAS LIPASAS	10
1.3.1	Ingeniería del medio de reacción	11
1.3.2	Ingeniería del derivado	13
1.4	INMOVILIZACIÓN DE LIPASAS CON DISTINTAS ORIENTACIONES	15
1.4.1	Inmovilización de lipasas sobre estructuras hidrofóbicas	16
1.4.2	Inmovilización sobre soportes epóxidos (Eupergit C)	18
1.5	ENTRECRUZAMIENTO DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS (CLEA)	21

1.6	RESOLUCIÓN CINÉTICA CATALIZADA POR LIPASAS	23
1.7	LIPASAS EN SOLVENTES ORGÁNICOS	25
1.8	LIPASAS EN LA RESOLUCIÓN DE FÁRMACOS RACÉMICOS	26
1.9	PROPANOLOL Y ATENOLOL.	29
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	32
2.1	MATERIALES	32
2.2	MÉTODOS EXPERIMENTALES	32
2.2.1	Purificación del extracto crudo de lipasa de <i>Candida antártica</i> B	32
2.2.2	Preparación de soportes epóxidos (Eupergit C) multifuncionales	33
2.2.3	Inmovilización de CAL B sobre los soportes multifuncionales	34
2.2.4	Elaboración de agregados entrecruzados de CAL B	36
2.2.5	Evaluación de la enantioselectividad de lipasas inmovilizadas	37
2.3	MÉTODOS ANALÍTICOS	39
2.3.1	Determinación de la actividad lipásica utilizando <i>p</i> -NPB	39
2.3.2	Electroforesis SDS-PAGE	40
2.3.3	Análisis por HPLC	40
2.3.4	Determinación del exceso enantiomérico (ees y eep) y enantioselectividad (E)	41

3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1	PURIFICACIÓN DE CAL B POR CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN INTERFACIAL	42
3.2	PREPARACIÓN DE LOS SOPORTES EPÓXIDOS PARCIALMENTE MODIFICADOS	45
3.2.1	Soporte aminado (EDA)	45
3.2.2	Soporte iminodiacético (IDA)	47
3.2.3	Soporte iminodiacético-Cobre (IDA-Cu)	48
3.3.	EFFECTO DEL pH Y FUERZA IÓNICA SOBRE LOS DERIVADOS DE CAL B OBTENIDOS	50
3.3.1	Efecto del pH sobre el proceso de inmovilización de CAL B	50
3.3.2	Efecto de la fuerza iónica sobre el proceso de inmovilización de CAL B	52
3.3.3	Inmovilización de CAL B sobre soportes de Eupergit C bajo condiciones óptimas de fuerza iónica y pH	54
3.4	AGREGADOS ENTRECruzADOS (CLEA) DE LIPASAS DE CAL B.	55
3.5	EVALUACIÓN DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE LOS DERIVADOS DE CALB EN LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (R/S)-PROPANOLOL	59
3.5.1	Efecto de la concentración de (R/S)-propanolol sobre la reacción de esterificación	62

3.5.2	Efecto de la concentración de acetato de vinilo. Relación molar propanolol-acetato de vinilo	63
3.5.3	Efecto de la carga del biocatalizador sobre la velocidad de reacción	65
3.6	ENANTIOSELECTIVIDAD DE LOS DERIVADOS DE CAL B EN LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DEL (R/S)-ATENOLOL	71
3.6.1	Efecto de la concentración de (R/S)-Atenolol sobre la reacción de esterificación	71
3.6.2	Efecto de la concentración de acetato de vinilo. Relación molar Atenolol-Acetato de vinilo	73
3.6.3	Efecto de la carga de biocatalizador sobre la velocidad de reacción	74
4.	CONCLUSIONES	81
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
6	ANEXOS	100

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Condiciones del proceso de inmovilización de CAL B sobre soportes epóxidos parcialmente modificados.	54
Tabla 2	Condiciones experimentales en la selección de variables significativas para la optimización de los CLEA de CAL B	56
Tabla 3	Matriz de resultados para el proceso de elaboración de CLEA de CAL B.	57
Tabla 4	Datos de ANOVA para la optimización de CLEA de CAL B	58
Tabla 5	Excesos enantioméricos de (S)-propranolol y relaciones enantioméricas de los derivados de CAL B en la reacción de acetilación de (R/S)-propranolol.	68
Tabla 6	Excesos enantioméricos de (S)-atenolol y relaciones enantioméricas obtenidas de los derivados de CAL B en la reacción de acetilación de (R/S)-atenolol	78

LISTA DE FIGURAS2

Figura 1	Reacciones catalizadas por lipasas	5
Figura 2	Conformaciones estructurales de lipasa	7
Figura 3	Activación interfacial de lipasas con interfases hidrofóbicas	9
Figura 4	Equilibrio conformacional de lipasas	9
Figura 5	Efecto de las condiciones experimentales en el mecanismo de apertura y cierre de la lipasa	12
Figura 6	Modulación de las propiedades catalíticas a través de la ingeniería del derivado	13
Figura 7	Adsorción de lipasas sobre superficies hidrofóbicas	17
Figura 8	Reactividad de los grupos epóxidos dependiente del pH	18
Figura 9	Reacción de activación de soportes epóxidos	19
Figura 10	Inmovilización sobre soportes epóxidos	20
Figura 11	Elaboración de agregados entrecruzados	21
Figura 12	Resolución cinética catalizada por lipasas para un sistema reversible	23
Figura 13	Resolución de precursores para la preparación del S-Propanolol	27
Figura 14	Síntesis quimioenzimática de β -azidoalcoholes	28

Figura 15	Resolución de 2-metoxi-2-feniletanol catalizada por lipasas	28
Figura 16	Estructura del (R/S)-propanolol y del (R/S)-atenolol, agentes bloqueantes de receptores β -adrenérgicos	31
Figura 17	Procedimiento general para la elaboración de CLEA de CAL B	36
Figura 18	Resolución cinética de (R/S)-propanolol catalizada por CAL B	38
Figura 19	Resolución cinética de (R/S)-Atenolol catalizada por CAL B	38
Figura 20	Reacción de hidrólisis del p-NPB catalizada por Cal B	39
Figura 21	Electroforesis SDS-PAGE	43
Figura 22	Cinética de inmovilización de lipasa de CAL B sobre el soporte Octil-agarosa en la hidrólisis de pNPB	44
Figura 23	Efecto del grado de modificación del soporte Eupergit C-EDA en la inmovilización covalente de CAL B	46
Figura 24	Efecto del grado de modificación del soporte Eupergit C-IDA en la inmovilización covalente de CAL B.	47
Figura 25	Efecto del grado de modificación del soporte Eupergit C-IDA-Cu en la inmovilización covalente de CAL B.	49
Figura 26	Efecto del pH sobre la expresión de la actividad lipásica en los diferentes soportes empleados.	51
Figura 27	Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre: a)EC; b)EC-EDA	52
Figura 28	Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre: a)EC-IDA; b)EC-IDA.Cu	53

Figura 29	Cinética de la inmovilización de CAL B en soportes epóxidos multifuncionales.	55
Figura 30	Diagrama de Pareto en la optimización del proceso de elaboración de CLEA de CAL B	58
Figura 31	Superficie de respuesta en la optimización de CLEA de CAL B	59
Figura 32	Efecto de la concentración de propanolol sobre la velocidad de reacción.	62
Figura 33	Efecto de la concentración de acetato de vinilo sobre la velocidad de reacción.	64
Figura 34	Mecanismo de reacción de la catálisis de CAL B.	65
Figura 35	Efecto de la carga de biocatalizador sobre la velocidad de reacción.	66
Figura 36	Cinética de la reacción de esterificación del (R/S)-propanolol catalizada por derivados de CAL B	67
Figura 37	Perfiles de elución en la reacción de esterificación del (R/S)-propanolol.	70
Figura 38	Efecto de la concentración de (R/S)-atenolol sobre la velocidad de reacción.	72
Figura 39	Efecto de la concentración de acetato de vinilo sobre la velocidad de reacción del (R/S)-atenolol.	74
Figura 40	Efecto de la carga del biocatalizador sobre la velocidad de reacción del (R/S)-atenolol.	75

Figura 41 Cinética de la reacción de esterificación del (R/S)-atenolol 76
catalizada por derivados de CAL B.

RESUMEN

TITULO:

RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (R/S)-PROPANOLOL Y (R/S)-ATENOLOL VÍA REACCIONES DE ACETILACIÓN MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE LIPASAS INMOVILIZADAS*

Barbosa Oveimar, Torres Rodrigo**, Ortiz Claudia***.

Palabras claves: CAL-B, propranolol, atenolol, Resolución cinética, inmovilización de enzimas, productos farmacéuticos, biocatalizadores.

El propranolol y el atenolol son conocidos agentes bloqueantes de receptores adrenérgicos usados comúnmente para el tratamiento de hipertensión arterial (ATH) y desordenes cardiovasculares. Sin embargo, su uso en forma racémica ha mostrado la existencia de efectos secundarios tales como bronco-constricción en pacientes asmáticos y diabetes en pacientes hipertensivos. Se ha demostrado que estos efectos secundarios son ocasionados por el enantiómero R. Por tal razones, muchos autores han propuesto la obtención de compuestos de alta pureza óptica para evitar estos efectos adversos observados en las mezclas racémicas. Actualmente, tanto el propranolol como el atenolol son distribuidos comercialmente en su forma racémica sin importar que su actividad biológica reside tan solo en su enantiómero S.

Se ha bien establecido el uso de biocatalizadores como las lipasas de origen microbiano, para la síntesis de drogas quirales.

En este estudio, se investigo la enantioselectividad de derivados inmovilizados de lipasa de *Candida antarctica* B (Cal-B) en la resolución cinética del propranolol y del atenolol racémico en medio orgánico. Derivados de Cal-B inmovilizados sobre soportes de Eupergit C catalizaron la esterificación enantioselectiva de (R/S)-propranolol y (R/S)-Atenolol usando acetato de vinilo como donador acilo y tolueno como solvente orgánico. A fin de determinar las mejores condiciones de reacción, se determinaron los efectos ocasionados por la concentración de propranolol, atenolol, acetato de vinilo y carga del biocatalizador sobre la velocidad de conversión en la reacción de esterificación. La enantioselectividad de los diferentes derivados fue evaluada bajo las condiciones seleccionadas siguiendo el curso de la reacción por HPLC-quiral. Los derivados inmovilizados exhibieron diferentes relaciones enantioméricas (E) y excesos enantioméricos (eep), destacándose el derivado de Cal-B inmovilizado sobre el soporte EC con un E=57 y un eep=96 para el propranolol racémico y para el atenolol racémico con un E=65 y un eep=96.

*Proyecto de grado

**Facultad de Ciencias, Escuela de química, Director Rodrigo Torres Sáenz. Ph.D. en Química.

***Faculta de Salud, Escuela de bacteriología, directora Claudia Ortiz López. Ph.D. en Bioquímica.

ABSTRACT

TITLE:

KINETIC RESOLUTION OF (R/S)-PROPRANOLOL AND (R/S)-ATENOLOL ROUTE ACETYLATION REACTIONS USING IMMOBILIZED PREPARATIONS OF LIPASES*

Barbosa Oveimar, Torres Rodrigo**, Ortiz Claudia***.

Keywords: CAL-B, propranolol, atenolol, kinetic resolution, immobilized enzymes, pharmaceuticals, biocatalysts.

Propranolol (1-isopropilamino-3-(1-naptoxy)-2-propanol) and atenolol are known adrenergic blocking agents commonly used for the treatment of arterial hypertension (ATH) and some cardiovascular disorders (CD). However, its use in a racemic form has produced some side-effects such as bronco-constriction in asthmatic patients, and diabetes in hypertensive patients. Moreover, it has been demonstrated that these side-effects could be attributed to the (*R*) isomer. For these reasons, many authors have proposed obtaining compounds with high optical purity to avoid these observed adverse effect of racemic mixtures of (*R,S*)-propranolol and (*R/S*)-Atenolol. Currently, the commercially available preparations are racemic mixtures, in which only the *S*-enantiomer has adrenergic blocking properties.

On the other hand, the use of biocatalysts, such as microbial lipases, used for the synthesis of chiral drugs, has been well established. In this sense, the use of lipases in organic solvents has allowed to synthesize single-isomer chiral drugs by enzymatic hydrolysis, *trans*-esterification, and aminolysis reactions.

In this study, we investigated the enantioselectivity of immobilized derivatives from *Candida antarctica* B lipase in the kinetic resolution of both racemic propranolol and tenolol in organic media. Derivatives of Cal-B immobilized onto Eupergit C supports catalyzed resolution of (*R/S*)-propranolol and (*R/S*)-Atenolol by esterification using vinyl acetate as acyl donor and toluene as solvent organic. The effects of propranolol or atenolol concentration, vinyl acetate concentration and biocatalyst loading were determined on conversion rate to determine the best reaction conditions. Enantioselectivity of different immobilized derivatives were evaluated under selected conditions reaction measuring course reaction by chiral-HPLC. The immobilized derivatives showed different enantiomeric ratios (*E*) and enantiomeric excess of products (ee_p), obtaining an $E = 53$ and $ee_p = 96$ for racemic propranolol and an $E = 65$ with $ee_p = 96$ when the immobilized derivatives of Cal-B were used in a toluene solution. In all cases immobilized derivatives showed enantiopreference for *R*-enantiomer.

*Degree of Project.

** Science of Faculty, School of Chemistry, Director: Rodrigo Torres Sáez, Ph.D. in Chemistry.

*** Health of faculty, School of bacteriology, Co-Director: Claudia Ortiz, Ph.D. in Biochemistry

INTRODUCCIÓN

Las enzimas como catalizadores altamente selectivos han contribuido a enfrentar grandes desafíos en la síntesis orgánica fina. Ejemplo de ello es la regioselectividad mostrada por las enzimas en la resolución de moléculas quirales complejas sin la necesidad de protección de otros grupos funcionales de la molécula que puedan influenciar en la especificidad del producto obtenido (Gotor-fernández et al., 2006).

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, EC. 3.1.1.3) son enzimas de interés en Química orgánica porque aceptan sustratos muy diferentes con una alta especificidad, lo que contrasta en muchos casos con una elevada regioespecificidad y enantioselectividad. (Reetz et al., 2002)

Las lipasas presentan un complejo mecanismo de activación interfacial, que implica cambios conformacionales entre una forma abierta y una forma cerrada de la molécula enzimática. La complejidad de este interesante mecanismo de activación genera grandes dificultades en el entendimiento y control de la aplicación de las lipasas. Sin embargo, puede convertirse en una interesante herramienta que permita la modificación de las propiedades biocatalíticas de estas enzimas (Fernandez-Lafuente et al., 1998; Sabuquillo et al., 1998; Bastida et al., 1998).

La enantioselectividad constituye una de las propiedades catalíticas más importantes de las lipasas. Esta es la base para las múltiples aplicaciones en síntesis orgánica con especial interés en la industria farmacéutica, donde se hace necesario la obtención de compuestos enantioméricamente puros.

Diferentes compuestos usados como fármacos se encuentran en su forma racémica y pueden ocasionar efectos secundarios o efectos tóxicos, debido a que pueden interactuar con blancos diferentes o inhibir competitivamente la acción biológica del enantiómero apropiado. Por esta razón la industria farmacéutica ha realizado enormes esfuerzos para producir drogas enantiomericamente puras con el consecuente incremento de su actividad biológica (Pamies y Backvall, 2001; González et al., 2004; Puertas et al., 1996).

En este sentido, los amino-alcoholes constituyen un interesante grupo de compuestos orgánicos quirales con amplio uso en la industria farmacéutica como agentes bloqueadores de los receptores beta-adrenérgicos. Estos juegan un importante rol en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades humanas. Entre los amino-alcoholes destacan el propanolol y el atenolol como agentes antihipertensivos, administrados frecuentemente en su forma racémica. Sin embargo, se han observado efectos secundarios en pacientes que han sido tratados con estos fármacos y se ha determinado que tales efectos están asociados a uno de sus enantiómeros (Main, 1990; Kamal et al., 2008).

Las lipasas han sido utilizadas durante los procesos de obtención de enantiómeros ópticamente puros con actividad biológica a partir de propanolol y atenolol. Estos métodos biocatalíticos han resultado más efectivos que los métodos químicos convencionales (Dordick, 1991; Ávila-González et al., 2005; Gotor, 2002).

En esta investigación, se estudiaron las propiedades biocatalíticas expresadas por diferentes derivados de lipasa de *Candida antártica* B (CALB), obtenidos por diferentes métodos de inmovilización. Se utilizaron soportes epóxidos multifuncionales, los cuales se evaluaron en la resolución cinética de los sustratos quirales (R/S)-Propanolol y (R/S)-Atenolol. Se ensayaron reacciones de acetilación

en tolueno como medio orgánico y acetato de vinilo. Adicionalmente, se determinó el efecto causado por la concentración de sustrato, donador acilo y carga de biocatalizador en la reacción sobre la velocidad de reacción.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar nuevos biocatalizadores inmovilizados con enantioselectividad mejorada a partir de la lipasas de *Candida antarctica* B, que permitan la resolución cinética de fármacos quirales como el (R/S)-propranolol y el (R/S)-atenolol.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar el efecto del tipo de inmovilización (covalente, iónica, adsorción física) y biocatalizador obtenido sobre la resolución cinética de fármacos de interés farmacéutico del tipo amino-alcohol.

Evaluar el efecto de la insolubilización de las lipasas mediante su agregación y posterior entrecruzamiento mediante el uso de glutaraldehído como reactivo bifuncional.

Seleccionar el mejor biocatalizador con base en la obtención de los mejores valores de rendimiento y razón enantiomérica (E).

1. MARCO DE REFERENCIA

1.1 LIPASAS

Las lipasas (triacil glicerol acil-hidrolasas EC 3.1.1.3) son enzimas pertenecientes a la familia de las hidrolasas serínicas y se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pero solamente las de origen microbiano son comercialmente significativas (Ghanem, 2007).

En general, las lipasas presentan un gran interés en química orgánica, ya que se caracterizan por una amplia especificidad, transformando sustratos muy diferentes, lo cual contrasta, en algunos casos con una elevada regio- y enantio-selectividad (Reetz, 2002; Koeller y Wong, 2001). Debido a estas propiedades, son las enzimas con mayor uso en biotransformaciones (**Figura 1**), que incluyen la resolución de mezclas racémicas (Sobolev y col., 2002; Queiroz y Nascimento, 2002, Palomo y col., 2004).

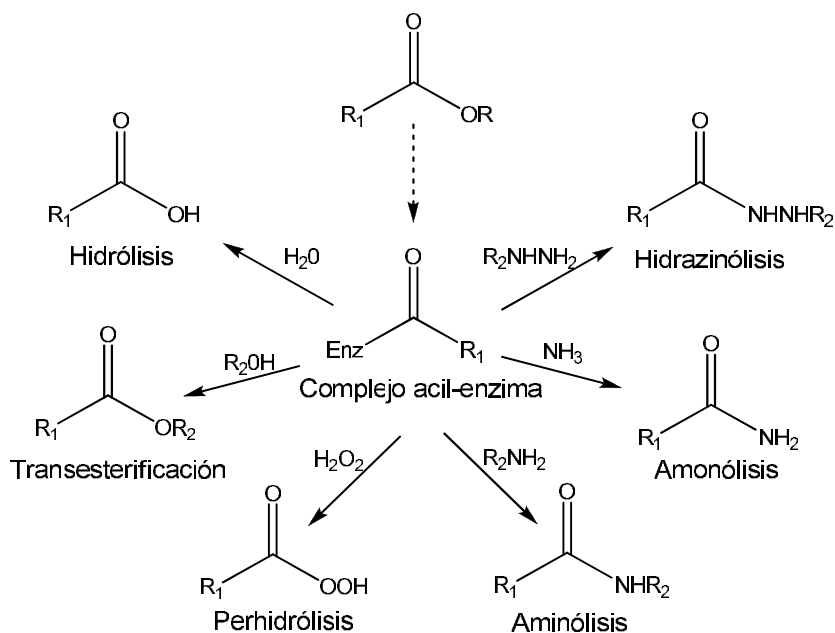


Figura 1. Reacciones catalizadas por lipasas.

1.1.1 Estructura de las lipasas

Durante la década pasada, mediante técnicas cristalográficas se determinó la estructura de lipasas de diferentes orígenes identificándose en general una estructura de tipo α/β hidrolasa (Derewnda y col., 1992a, b; Grochulsky y col., 1993; Rubin, 1994).

De igual forma, se determinó que en la mayoría de las lipasas existe un elemento móvil, el cual es conocido como "*lid*", consistente de una o dos alfa hélices cortas unidas al cuerpo de la lipasa por elementos estructuralmente flexibles. Brzozowski y col., (1991); Uppenberg y col., (1995), confirmaron y demostraron la existencia del *lid* sobre el sitio activo de las lipasas a través de complejos inhibidores.

La información acerca de las conformaciones estructurales de las lipasas permitió establecer que en presencia de medios acuosos homogéneos, la lipasa cristaliza con el centro activo totalmente aislado del medio de reacción por una cadena polipeptídica, llamada tapadera (*flat* o *lid*) haciendo inaccesible la entrada de los sustratos (conformación cerrada). Esta cadena polipeptídica presenta en su cara interna una serie de residuos hidrofóbicos que interaccionan con las zonas hidrofóbicas que rodean al sitio activo de las lipasas (Palomo et al., 2002; Bastida et al., 1998).

Por el contrario, cuando la enzima se cristaliza en presencia de interfases hidrofóbicas se obtiene una conformación totalmente distinta, en la cual la tapadera se ha desplazado, producto de la interacción de puentes salinos y puentes de Hidrógeno con otra zona de la superficie de la lipasa, dejando libre el centro activo de la enzima (conformación abierta). La **figura 2** muestra las distintas conformaciones de las lipasas.

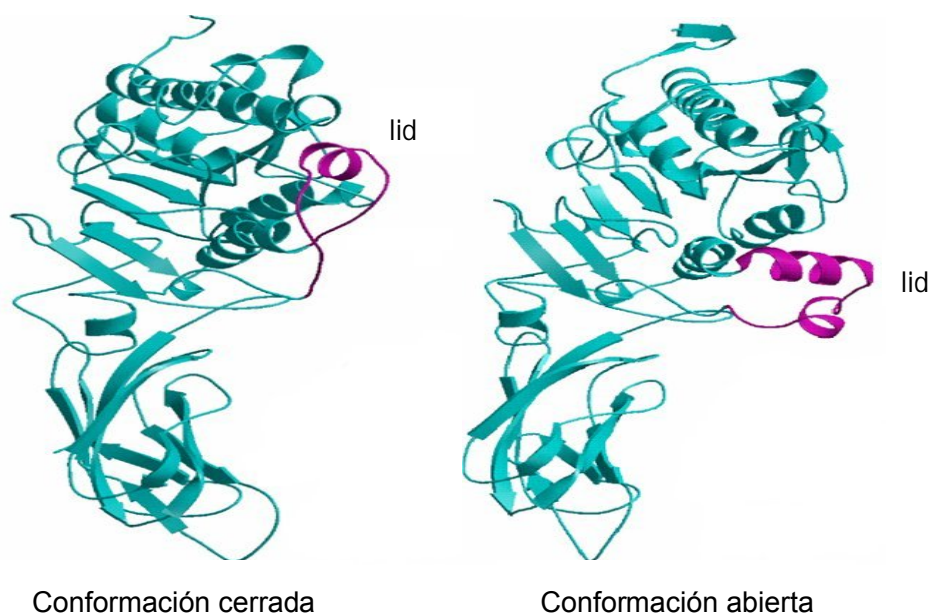


Figura 2. Conformaciones estructurales de la lipasa de *Candida antarctica B*. Tomada de Protein Data Bank, código de acceso 1TCB.

Las singulares características estructurales de las lipasas sugieren que la presencia del *lid* es un determinante estructural y funcional de la actividad y selectividad de esta enzima catalizando diferentes reacciones en química orgánica (Reetz, 2002).

En el 2006, Francesco Secundo y colaboradores, estudiaron la influencia del *lid* sobre las propiedades catalíticas de las lipasas en reacciones de transesterificación. El rol de esta región sobre la modulación de la función de las lipasas fue determinado en tres diferentes lipasas recombinantes *Candida rugosa* (CRL), *Pseudomonas fragi* (PFL) y *Bacillus subtilis* (BSLA), modificadas en la secuencia del *lid*. Los resultados mostraron que las proteínas mutadas en el *lid* presentaban menores valores de actividad y selectividad en solventes orgánicos. Estos resultados soportaron fuertemente la idea de la importancia que tiene el *lid*

en la modulación, no sólo de la actividad, sino también en la especificidad, enantio-selectividad y estabilidad de las lipasas.

De acuerdo con lo anterior, a la hora de utilizar la lipasa como catalizador de una reacción en química orgánica, es preciso considerar algunas peculiaridades de su mecanismo de acción, para lo cual resulta indispensable el estudio de su estructura molecular.

1.1.2 Mecanismo de acción de lipasas

La información de las conformaciones estructurales de las lipasas obtenidas a través de difracción de rayos X, permitió establecer que en su mecanismo catalítico ocurre un fenómeno denominado “activación interfacial de lipasas” (Desnuelle, 1972; Verger, 1980). Este término es usado para describir el gran incremento en la actividad de este tipo de enzimas al ser contactadas con interfases hidrofóbicas.

Se sabe que la principal característica de las lipasas es su actividad en presencia de interfases hidrofóbicas (micelas de sustratos, solventes orgánicos no miscibles, etc.). Esta activación que sufre la lipasa en presencia de interfases fue reportada inicialmente por Sarda y Desnuelle (1958) y ha sido confirmada por muchos autores a través de estudios cristalográficos (Brady et al., 1990; Winkler et al., 1990; Brozowski et al., 1991; Nobel et al., 1993; Ericsson et al., 2008).

De acuerdo con este mecanismo de activación, en ausencia de interfases, las lipasas muestran una cadena polipeptídica (*lid*) en su estructura secundaria, la cual cubre su sitio activo impidiendo el acceso del sustrato (conformación cerrada). Sin embargo, en presencia de interfases hidrofóbicas, se presentan importantes cambios que dan lugar a la generación de una “conformación abierta” de la enzima en la cual el *lid* es desplazado como resultado de la exposición de

superficies hidrofóbicas que ahora interactúan con la interfase. De esta manera, confieren funcionalidad a la enzima. La **figura 3**, representa el mecanismo de activación interfacial que muestran las lipasas.

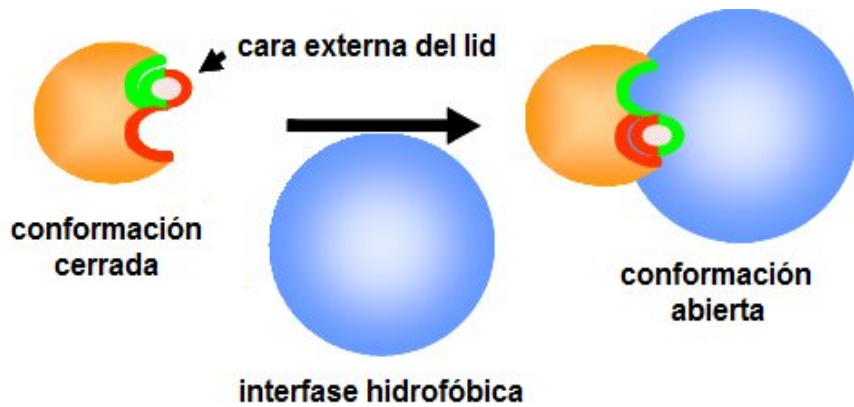


Figura 3. Activación interfacial de lipasas con interfases hidrofóbicas.

Por otro lado, es evidente que las lipasas en medios acuosos presentan actividad catalítica, en muchos casos comparables a la de esterasas no lipásicas. Esto sugiere que las lipasas en sistemas acuosos homogéneos se encontrarían en un cierto equilibrio entre la conformación cerrada y la conformación abierta que les permiten ser catalíticamente activas en ausencia de interfases (**figura 4**).

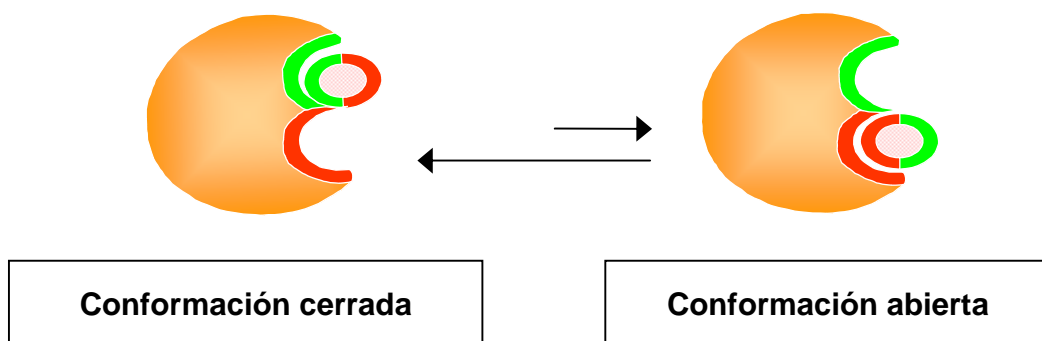


Figura 4. Equilibrio conformacional de lipasas en medios acuosos homogéneos.

1.2 ENANTIOSELECTIVIDAD DE LIPASAS

La enantioselectividad es tal vez la propiedad más importante de las lipasas y es la base de numerosas aplicaciones para la preparación de alcoholes y ésteres ópticamente puros (Léonard-Nevers et al., 2009).

Aunque el conocimiento del enantiómero que reacciona a una mayor velocidad puede ser previsto usando reglas empíricas (Kazlauskas et al., 1991), rara vez puede ser predicha la magnitud de la enantioselectividad. Las bases moleculares de reconocimiento quiral son complejas y no elucidan completamente la enantiopreferencia de las lipasas por un determinado enantiómero. Sin embargo, se han hecho grandes esfuerzos para la formulación de normas y criterios basados en resultados de estudios experimentales y de modelamientos moleculares.

Estudios previos han mostrado que factores como la estructura del sustrato (Kazlauskas, 1991; Rotticci et al., 1998; Hwang et al., 2000; Schulz et al., 2000), el efecto del solvente del medio de reacción (Ottosson et al., 2000; Ducret et al., 1998; Wehtje et al., 1997), la actividad termodinámica del agua (a_w) (Ducret et al., 1998; Persson et al., 2002; Jönsson et al., 1999) y la temperatura (Phillips, 1992; Phillips, 1996) influyen de manera significativa sobre la enantioselectividad.

1.3 ESTABILIZACIÓN Y MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES CATALÍTICAS DE LAS LIPASAS

La posibilidad de disponer de derivados enzimáticos altamente estables en las condiciones de operación es uno de los objetivos más importantes en reacciones de biotransformación. Para el caso particular de las lipasas, en las cuales se presenta un equilibrio conformacional, es interesante conocer cuál de las dos

conformaciones es más estable. Ya sea la conformación que tiene fijada la estructura abierta o la que se encuentra en un equilibrio mayoritariamente desplazado hacia la conformación cerrada. De acuerdo con lo anterior, resulta sumamente interesante la preparación de diferentes derivados de lipasas en los cuales a través de estrategias de inmovilización sea posible la modulación de sus propiedades catalíticas por la alteración del equilibrio conformacional existente (Mateo et al., 2000, Bastida et al., 1998).

Teniendo en cuenta los grandes cambios conformacionales que sufren las lipasas y el gran número de fuerzas implicadas en el mantenimiento de la estructura de las diferentes conformaciones, el centro activo de la lipasa parece ser fácilmente alterable, con lo que se podría conseguir modular las propiedades de la enzima. Para ello se puede hacer uso de dos herramientas distintas como la ingeniería del medio de reacción y la ingeniería del derivado (Palomo et al., 2004).

1.3.1 Ingeniería del medio de reacción

Se ha descrito en la literatura, que las propiedades catalíticas de las lipasas (selectividad, estereospecificidad), pueden ser fácilmente moduladas por las condiciones del medio de reacción (Wehtje y col., 1997; Persichetti y col., 1996).

La influencia de las condiciones ambientales de reacción sobre las propiedades de la enzima puede ser consecuencia del complejo mecanismo de acción (activación interfacial), que involucra cambios conformacionales significativos en la estructura de la enzima (Derewenda y col., 1992; Brzozowski y col., 1991).

De esta manera, cualquier cambio en las condiciones del medio puede alterar significativamente todo el balance de interacciones: los disolventes favoreciendo el bolsillo hidrofóbico y fortaleciendo las interacciones electrostáticas, el pH alterando

el tipo y cantidad de interacciones entre el *lid* y el resto de la superficie de la proteína, la fuerza iónica haciendo más desfavorable la presencia del bolsillo hidrofóbico y debilitando las interacciones del *lid* con el resto de la proteína, etc. Por lo tanto, las condiciones experimentales afectarán dramáticamente el equilibrio entre la conformación abierta y cerrada de la lipasa, la forma exacta del centro activo, y sus propiedades catalíticas (Palomo et al., 2002; Palomo et al., 2004).

La **figura 5**, muestra la complejidad que implica el cambio conformacional que presentan las lipasas. En relación con la conformación abierta, la estructura de las lipasas estará definida por la interacción del bolsillo hidrofóbico, bien sea con el sustrato o con el medio de reacción, mientras que el *lid* deberá acomodarse mediante un cierto número de interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, etc.

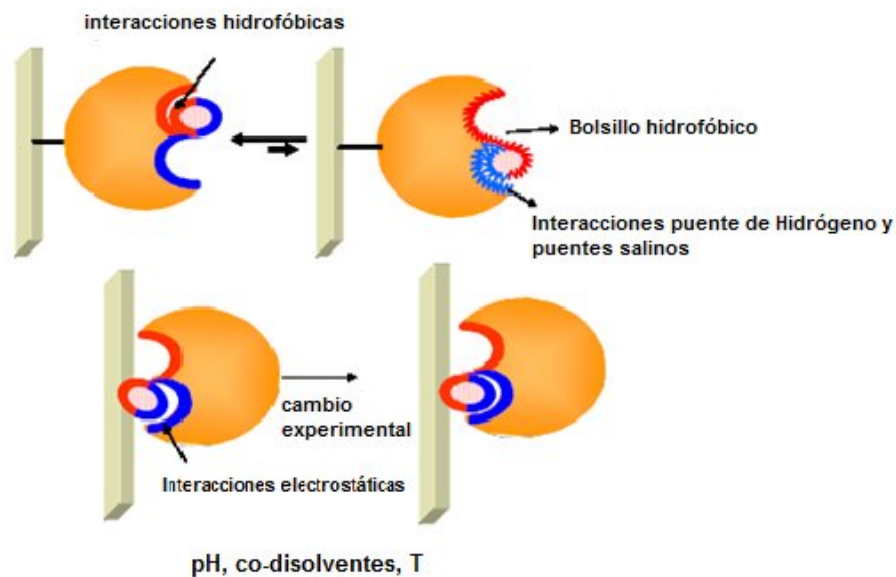


Figura 5. Efecto de las condiciones experimentales en el mecanismo de apertura y cierre de la lipasa.

La modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas a través de la modificación de las condiciones del medio que las rodea se ha denominado “ingeniería del medio de reacción”. Esta estrategia se ha empleado para modular el comportamiento de diferentes enzimas que sufren grandes cambios conformacionales durante la catálisis, como por ejemplo la penicilina G acilasa (Terreni y col., 2001; Rocchietti y col., 2001).

1.3.2 Ingeniería del derivado

El desarrollo de diversas estrategias de inmovilización sobre una gran variedad de soportes activados con diferentes grupos funcionales ha permitido el avance de metodologías que permiten inmovilizar proteínas de forma controlada y dirigida a través de diferentes zonas de su superficie (aquellas con mayor densidad de histidinas, de lisinas, etc.). El grado de activación del soporte y las condiciones de inmovilización permiten controlar el grado de unión enzima-soporte y por lo tanto la rigidez de la zona inmovilizada (**Figura 6**) (Mateo et al., 2004; Palomo et al., 2003).

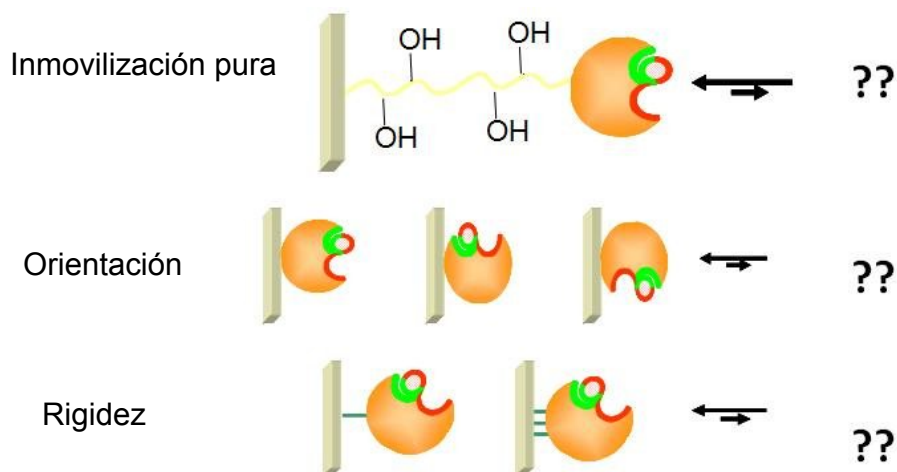


Figura 6. Modulación de las propiedades catalítica a través de la Ingeniería del derivado.

Con base en diferentes investigaciones, se ha demostrado la efectividad de la ingeniería del derivado para la modulación de las propiedades catalíticas de las enzimas, especialmente de las lipasas.

En el año 2000, Mateo y colaboradores inmovilizaron diferentes enzimas sobre soportes epóxidos multifuncionales, proponiendo este tipo de inmovilización como una herramienta útil para mejorar la inmovilización covalente de proteínas.

Posteriormente, Palomo y col (2000), modificaron las propiedades de actividad y enantioselectividad de lipasa *Candida antarctica* B (CAL-B) mediante herramientas de ingeniería conformacional. Ésta lipasa fue inmovilizada en soportes poliméricos activados con diferentes grupos funcionales para interactuar con los aminoácidos superficiales de las lipasas. Cada derivado inmovilizado presentó diferente actividad y enantioselectividad al catalizar la hidrólisis de un compuesto aquiral y dos compuestos quirales bajo diferentes condiciones de reacción. Así por ejemplo, se obtuvo el enantiómero R del ácido mandélico con una pureza del 91% utilizando CAL-B inmovilizada en soportes activados con polietilenimina (PEI), mientras que el enantiómero R del ácido 2-butiroil-2-fenilacético fue obtenido con una pureza del 99,5% utilizando el derivado enzimático de lipasa inmovilizada en soportes activados con glutaraldehído.

Ese mismo año (2002), Palomo y col., purificaron la lipasa de *Candida rugosa* y la inmovilizaron utilizando diferentes protocolos de inmovilización, tales como: adsorción interfacial sobre soportes de glioxil-agarosa, adsorción iónica en soportes rodeados con polietilenimina (PEI) e inmovilización covalente en soportes activados con glutaraldehído. El derivado adsorbido interfacialmente fue el más activo usando sustratos simples (butirato de etilo), mientras que el soporte-PEI fue

el más activo, hidrolizando sustratos iónicos (ácido 2-fenil-2-butirolacético) o mandelato de metilo.

Adicionalmente, Palomo y col. (2003), modificaron las propiedades catalíticas de la lipasa de *Mucor miehei* mediante inmovilización directa en resinas epóxido heterofuncionales. En este estudio, se produjo el enantiómero S del ácido 2-fenil-2-butirol-acético con una pureza del 90% y una enantioselectividad de 59, utilizando el derivado sobre un soporte activado con grupos carboxilos provenientes del ácido iminodiacético (IDA-Sepabeads).

En el año 2005, Fernández-Lorente y col., purificaron diferentes lipasas de *Aspergillus niger* utilizando adsorción interfacial selectiva de lipasas sobre soportes hidrofóbicos. Con estos derivados se obtuvo el enantiómero S del ácido 2-fenil-2-butirolacético con una pureza mayor del 99% y una enantioselectividad mayor de 100.

Recientemente, Siti Salhah Othman y col. (2008), lograron una producción altamente enantioselectiva de (R)-butirato de metilo utilizando lipasa de *Candida rugosa* (LCR) inmovilizada en soportes activados con grupos epóxidos. El compuesto mencionado fue obtenido con una pureza del 100% con la LCR inmovilizada en soportes epóxidos de Eupergit C.

1.4 INMOVILIZACIÓN DE LIPASAS CON DISTINTAS ORIENTACIONES

Las enzimas pueden ser inmovilizadas sobre un soporte, a través de algún tipo de interacción entre los residuos aminoacídicos de la molécula proteica y el soporte. En consecuencia, se pueden producir pérdidas considerables en la expresión de

actividad y enantioselectividad del catalizador al comprometer el sitio activo (o residuos ubicados en su vecindad) en la unión con el soporte.

De acuerdo con lo anterior se han ensayado diferentes protocolos de inmovilización que incluyen el uso de soportes multifuncionales, con los que se ha logrado adicionalmente modificar la orientación de la enzima inmovilizada, sin comprometer residuos aminoácidos cercanos al sitio activo (Palomo et al., 2002).

Para el caso particular de las lipasas, la inmovilización puede producir una fuerte distorsión sobre su sitio activo, reduciendo completamente la movilidad de los grupos funcionales de la proteína, ocasionando con ello una dramática alteración de sus propiedades catalíticas. (Fernández-Lafuente et al., 1998).

Estudios previos han demostrado que derivados de una misma lipasa inmovilizada sobre distintos soportes exhiben enantioselectividades muy diferentes. Incluso en algunos casos, se observó inversión de la enantiopreferencia de la enzima debido muy posiblemente a la manera en la que se orienta la lipasa sobre el soporte y la forma en que expone su sitio activo al acceso del sustrato (Palomo et al, 2003; Palomo et al., 2004; Palomo et al., 2005). De allí que el tipo de soporte y la activación de la superficie del mismo, sean parámetros altamente significativos sobre la enantioselectividad expresada por el biocatalizador lipásico.

1.4.1 Inmovilización de lipasas sobre estructuras hidrofóbicas.

Las singulares características estructurales de las lipasas las hace altamente afines por interfases hidrofóbicas, facilitando el desarrollo de métodos eficientes de inmovilización (Malcata et al., 1992; Bosley y Clayton, 1994).

La conformación abierta de las lipasas muestra al medio un gran bolsillo hidrofóbico que por sus características tiene una gran afinidad por cualquier tipo de superficie hidrofóbica. Se ha descrito que las lipasas se adsorben a diferentes estructuras hidrofóbicas tales como gotas de grasa y soportes hidrofóbicos (octil-agarosa, glioxil-agarosa). La adsorción en soportes hidrofóbicos se ve favorecida por una baja fuerza iónica facilitando el desplazamiento del lid y generando la conformación abierta de la enzima (**Figura 7**).

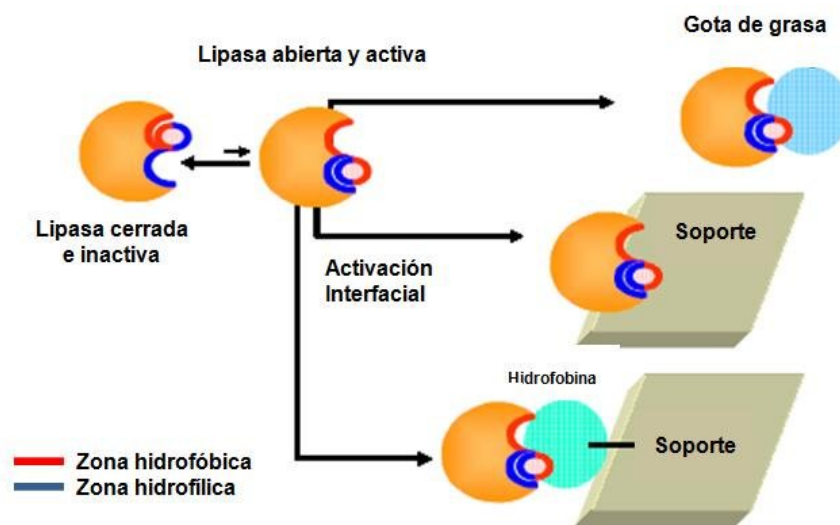


Figura 7. Adsorción de lipasas sobre superficies hidrofóbicas.

Adicionalmente, la inmovilización sobre estructuras hidrofóbicas a baja fuerza iónica ha provisto un método eficiente de purificación de lipasas ya que bajo esta condición son las únicas proteínas que se adsorben sobre este tipo de soportes.

Sabuquillo y col., (1998) purificaron a través de cromatografía de afinidad interfacial preparados comerciales de lipasas de *Rhizopus niveus* (RNL) y *Candida rugosa* (CRL) sobre soportes hidrofóbicos activados con butil, fenil y octil-agarosa, a baja fuerza iónica. Los resultados obtenidos mostraron que bajo esta condición, no se presentaba la adsorción de proteínas como las esterasas. Sin embargo, las lipasas se adsorbían rápidamente y podían ser separadas posteriormente a través de su desorción y purificación con tritón X-100.

1.4.2 Inmovilización sobre soportes epóxidos (Eupergit C)

Los soportes Eupergit/Sepabeads comerciales son soportes epoxiacrílicos, con un cierto grado de hidrofobicidad. Estos soportes presentan poros con grandes superficies recubiertas de grupos epóxido; los cuales en principio son capaces de reaccionar con varios grupos funcionales de la proteína dependiendo de las condiciones de inmovilización. Este tipo de interacción genera uniones muy estables: grupos amino (amino secundario), tioles (tio-éteres), hidroxilo (éteres). Sin embargo, los grupos epóxidos, presentan una reactividad muy baja con las enzimas solubles en condiciones suaves (pH 7, baja fuerza iónica) (Wheatley y Schmidt, 1999; Mateo et al., 2000). La **figura 8** ilustra la reactividad de los grupos epóxidos.

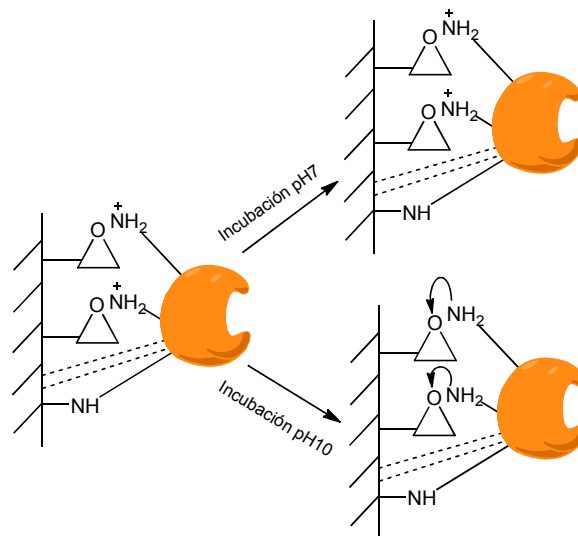


Figura 8. Reactividad de los grupos epóxidos dependiente del pH.

Como se aprecia en la **figura 8**, los soportes epóxidos como el Eupergit C son susceptibles de reaccionar a $\text{pH} \geq 10$, mediante adiciones nucleofílicas con diferentes ligandos como proteínas (Wheatley, 1991; Wheatley et al., 1993),

ácidos nucleicos (Wheatley, et al., 1996) y varias moléculas pequeñas (Bauer-Arnaz et al., 1998) a través del anillo epóxido del soporte.

La inmovilización sobre soportes epóxidos ha abierto un gran camino para la funcionalización de los mismos y su implementación en procesos de inmovilización. Ejemplo de ello, fue la activación del soporte Eupergit C (**figura 9a**) con diferentes grupos funcionales para su implementación en un proceso de inmovilización multipuntual de diferentes enzimas (Mateo y col., 2000). El mecanismo de reacción del ligando afín a la fase epóxica se muestra en la **figura 9b**.

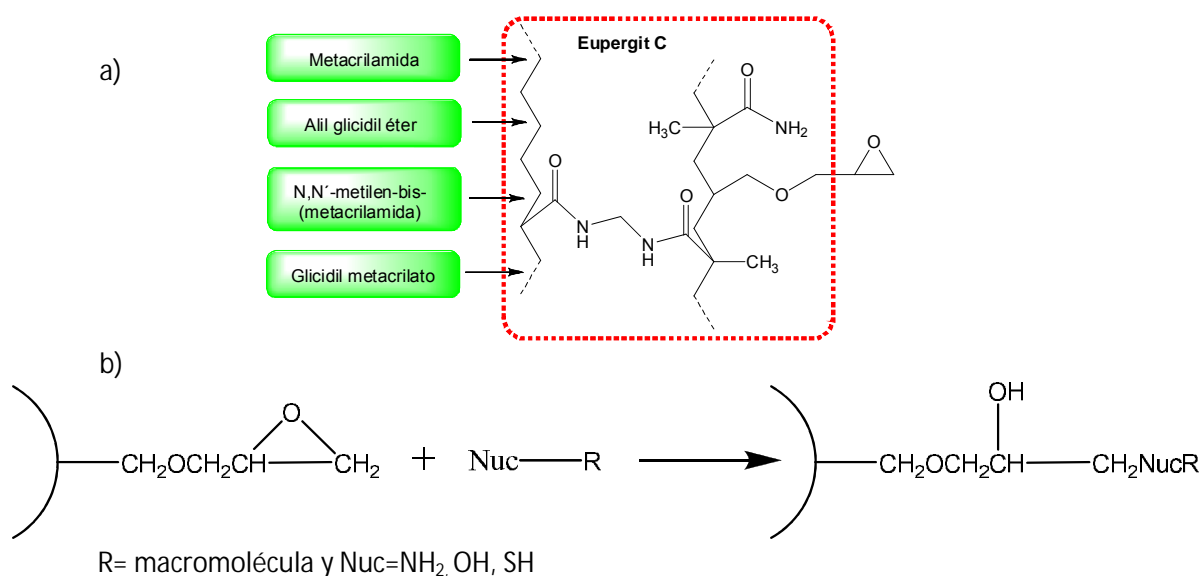


Figura 9. a) Estructura Eupergit C; b) Reacción de activación de soportes epóxidos.

Se ha propuesto que el proceso de inmovilización de enzimas a soportes con grupos epóxido (**Figura 10**) se produce siguiendo un mecanismo en dos etapas que se mencionan a continuación (Mateo et al., 2001):

1°-La adsorción física de la enzima sobre el soporte (tradicionalmente una adsorción hidrofóbica).

2°-La unión covalente entre la enzima adsorbida y los grupos epóxido del soporte.

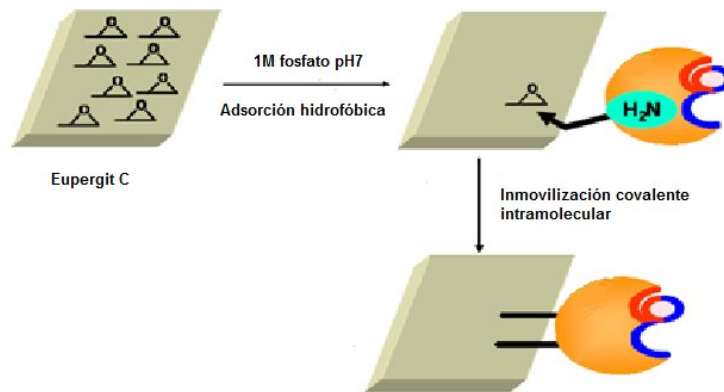


Figura 10. Inmovilización sobre soportes epóxidos.

Mateo y col., en el 2000, a través de esta estrategia de inmovilización, insolubilizaron la penicilina G acilasa de *Escherichia coli*, la lipasa de *Candida rugosa* y la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*. Los resultados obtenidos mostraron que la inmovilización de estas proteínas en los soportes activados con grupos epóxidos sucede a través de una vía rápida de adsorción física de las proteínas sobre la superficie del soporte. Estos estudios mostraron que estas tres enzimas pudieron ser inmovilizadas a través de tres estrategias diferentes de activación del soporte epóxido utilizando otros grupos funcionales. Los mejores derivados fueron estables y preservaron su actividad entre el 75 y 100% con respecto a las actividades de las enzimas solubles.

1.5 ENTRECruzamiento DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS (CLEA)

Recientemente, se desarrolló una nueva estrategia de inmovilización de enzimas, llamada entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEA). En la **figura 11** se aprecia de una forma general el proceso de elaboración de los CLEAs.

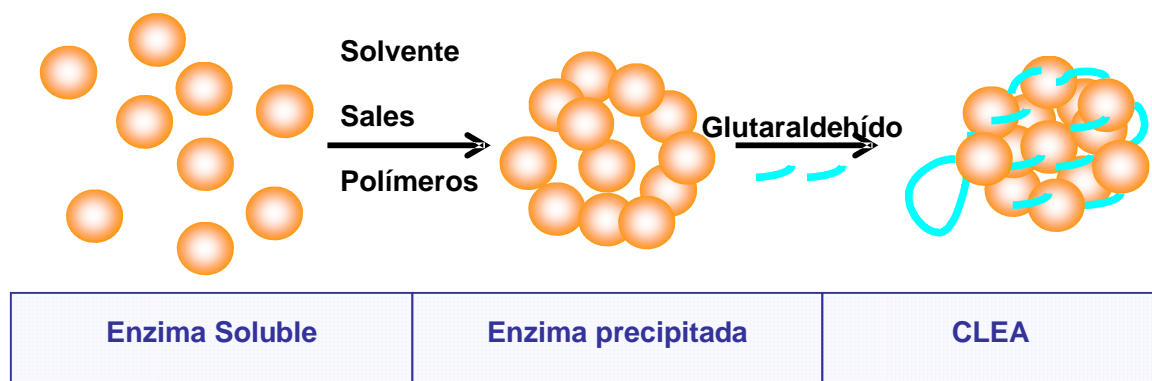


Figura 11. Elaboración de agregados entrecruzados.

Esta técnica consta de una etapa de precipitación y agregación de la enzima, la cual es inducida por la adición de sales, solventes orgánicos, polímeros no iónicos y ácidos. Esta etapa de precipitación es comúnmente utilizada como método de purificación de proteínas (Sheldon y col., 2004).

Estos agregados físicos son estructuras supramoleculares unidas por enlaces no covalentes rediseñados cuando son dispersados en agua. La formación de estos agregados físicos es posible debido a un cambio en el estado de hidratación de las moléculas de la enzima o por la alteración de la constante electrostática de la solución por la adición de un agente de agregación o precipitación apropiado (Cao y col., 2004).

Durante la etapa de agregación la solubilidad de la enzima en el medio circundante decrece. Cuando este proceso es bajo, la enzima puede desnaturalizarse por causa de una gran fuerza ejercida sobre su estructura; lo cual sugiere, que la formación del agregado insoluble de la enzima constituye una etapa esencial para la retención de la actividad enzimática durante el entrecruzamiento. De esta forma, se hace necesaria la selección adecuada del agente precipitante.

La siguiente etapa es la de entrecruzamiento del agregado físico, que consiste básicamente en la formación de enlaces covalentes entre los grupos reactivos del agente bifuncional y los residuos aminoacídicos de la enzima, principalmente lisina. En esta etapa la estructura del agregado y la actividad catalítica de la proteína individual se mantienen.

De forma interesante, el rendimiento de la actividad del agregado enzimático entrecruzado excede al de la enzima nativa. Esta hiperactivación puede ser originada por un cambio conformacional de la proteína inducido por el estado de agregación (Sheldon y col., 2004).

El glutaraldehído es el agente entrecruzante más efectivo de proteínas, debido en gran medida a las variadas estructuras que puede tomar en solución acuosa. Esto le permite bajo determinadas condiciones de pH, temperatura y concentración, reaccionar con ciertos grupos funcionales de residuos aminoacídicos de las proteínas. Tales grupos funcionales incluyen amino, tiol, fenol e imidazol debido a que el lado de la cadena más reactiva de los aminoácidos son nucleófilos.

1.6 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 de compuestos con especial interés en la industria farmacéutica.

El éxito de esta reacción biocatalítica depende de que los dos enantiómeros puedan reaccionar en distintas velocidades con una entidad quiral (Rouhi, 2003, Van-Beilen y Li, 2003).

La reacción de resolución cinética catalizada por lipasas para un sistema reversible se puede representar como se muestra en la **figura 12**. 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 mayoritariamente 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 lo que el tiempo óptimo para terminar la resolución es cuando se haya alcanzado el equilibrio del reactante rápido (Chen et al., 1987).

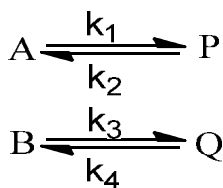


Figura 12. Resolución cinética catalizada por lipasa para un sistema reversible. La resolución ocurre cuando k_1 es diferente de k_3 , tal que entre mayor sea la diferencia una mejor resolución es obtenida. Para un sistema irreversible $k_2 = k_4 = 0$.

Puesto que las lipasas poseen la habilidad de discriminar entre dos enantiómeros a partir de una mezcla racémica, el parámetro escogido para describir la estereoselectividad o enantio-selectividad de las reacciones catalizadas por lipasas es la relación enantiomérica (E). E es un parámetro cinético, que depende del catalizador y de las condiciones del medio (pH, temperatura, etc.). El valor de E está definido como la relación de las constantes específicas de velocidad para los dos enantiómeros de la mezcla racémica, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$E = \frac{k_1}{k_3} = \frac{(k_{cat}/K_M)_R}{(k_{cat}/K_M)_S} ; \quad R \text{ es el enantiómero reactante más rápido} \quad (2)$$

Donde k es la constante de velocidad y Km es la constante de Michaelis-Menten. Rakels et al, (1993) desarrollaron esta ecuación en términos del exceso enantiomérico del producto (ee_p), el enantiómero remanente (ee_s) y la conversión (c). De tal forma que para una reacción enzimática reversible, el valor de E puede ser expresado por la siguiente ecuación:

$$E = \frac{\text{Ln}[1 - (1 + K)c(1 + ee_p)]}{\text{Ln}[1 - (1 + K)c(1 - ee_p)]} = \frac{\text{Ln}[1 - (1 + K)(c + ee_s\{1 - c\})]}{\text{Ln}[1 - (1 + K)(c - ee_s\{1 - c\})]} \quad (3)$$

Donde K es la constante de equilibrio. K es una función termodinámica que es independiente de las propiedades de la enzima, sólo depende del estado inicial y final por lo que no depende de la trayectoria de reacción. Sih et al, 1993 encontraron también que la pureza óptica de los compuestos (producto y sustrato remanente) varía de manera inversa con la constante de equilibrio, aun para sistemas con alta enantioselectividad (E > 1000).

Cuando la reacción es irreversible o la reacción reversa es insignificante (K = 0), la ecuación 3 puede ser reducida a:

$$E = \frac{\text{Ln}[1 - c(1 + ee_p)]}{\text{Ln}[1 - c(1 - ee_p)]} = \frac{\text{Ln}[(1 - c)(1 - ee_s)]}{\text{Ln}[(1 - c)(1 + ee_s)]} \quad (4)$$

Donde c está expresada por la siguiente ecuación:

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p}$$

Para calcular el valor de E, se deben medir dos de las tres variables: ee_s , ee_p y c. Una reacción no selectiva tiene un valor E de 1, mientras un valor E por encima de 20 es el mínimo para una resolución considerable.

1.7 LIPASAS EN SOLVENTES ORGÁNICOS

Uno de los mayores inconvenientes para el uso de enzimas en síntesis orgánica es la baja solubilidad de la mayoría de compuestos orgánicos con más de cuatro átomos de carbono cuando el proceso es realizado en un medio acuoso. Por otra parte, el agua es un solvente poco favorable para la mayoría de aplicaciones en la industria química debido a que su remoción del medio de reacción suele ser tediosa. En contraste, el uso de solventes orgánicos como medio de reacción presenta ventajas tales como: a) fácil recuperación del sustrato y del producto con altos rendimientos; b) posibilidad de uso de sustratos no polares; c) evita reacciones secundarias; d) en muchos casos la lipasa es termodinámicamente más activa; e) permite el desplazamiento del equilibrio termodinámico favoreciendo la síntesis sobre la hidrólisis (Carrea et al., 2000).

La biocatálisis en medios no acuosos ha sido ampliamente usada para la resolución de alcoholes, ácidos y lactonas a través de reacciones de

transesterificación usando diferentes lipasas (Klibanov, 2001). El mecanismo para este proceso es conocido como el mecanismo de serinas-hidrolasas, común para la hidrólisis de ésteres y también para procesos enzimáticos de transesterificación, aminólisis e hidrazinólisis en donde el agua que actúa como nucleófilo natural es reemplazado por un alcohol, amina, e hidracina respectivamente.

El agente acilante más apropiado para cada proceso depende del sustrato a esterificar. Por ejemplo, para la resolución de alcoholes, los agentes acilantes más utilizados son ésteres metílicos, anhídridos y especialmente ésteres vinílicos (Gotor-fernández, et al., 2006). Sin embargo, el acetato de vinilo es el agente acilante mas adecuado para esterificaciones y transesterificaciones de alcoholes secundarios por favorecer la irreversibilidad de las reacciones.

1.8 LIPASAS EN LA RESOLUCIÓN DE FÁRMACOS RACÉMICOS

Han surgido procesos interesantes usando hidrolasas como biocatalizadores para la síntesis de drogas enantioméricamente puras. Entre este gran grupo de enzimas, las lipasas han sobresalido por su gran versatilidad y enantioselectividad.

La mayoría de compuestos orgánicos quirales usados como fármacos son administrados como una mezcla racémica y en muchos casos ocasionan efectos secundarios no deseados en los pacientes, por la interacción de uno de los enantiómeros con diferentes dianas inhibiendo competitivamente la actividad biológica del enantiómero apropiado (Avila et al., 2005). Por esta razón, la industria farmacéutica ha concentrado las investigaciones para producir drogas enantioméricamente puras.

Wang y col., (1989) implementaron el uso de lipasas para la resolución cinética de halogenoalcoholes. Estos autores resolvieron diversas cianhidrinas de tipo sintético vía resolución cinética catalizada por lipasas usando ésteres enólicos como agentes acilantes. A través de este procedimiento, desarrollaron la síntesis del (R)-etil-2-Hidroxi-4-fenilbutirato y del (S)-propanolol, agentes bloqueadores de los receptores β -adrenérgicos. La estrategia general para obtención de estos precursores adrenérgicos se elucida en la **figura 13**.

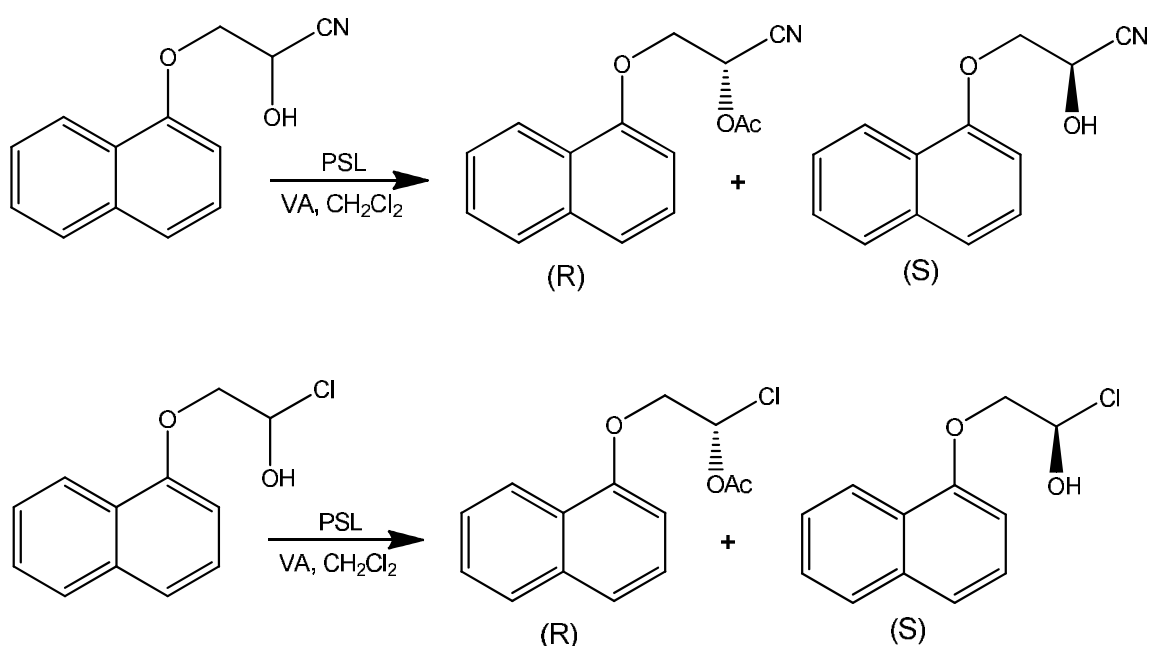
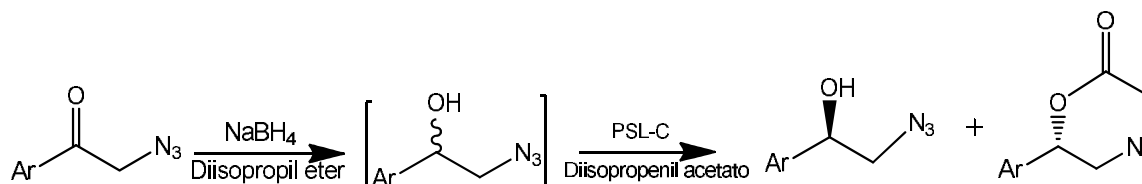


Figura 13. Resolución de precursores para la preparación del S-propranolol.

Recientemente Pámies y col., (2004) desarrollaron de manera efectiva la resolución cinética dinámica de azidoalcoholes, moléculas precursoras del (S)-Propranolol. Esta reacción se realiza mediante la reducción de las correspondientes cetoazidas con NaBH₄ en presencia de óxido de aluminio seguido por una resolución *in situ* con lipasas. Los resultados mostraron que el

biocatalizador exhibió una relación enantiomérica (E) aceptable que permitía la resolución del sustrato quiral con excesos enantioméricos cercanos al 95% (**Figura 14**).



Ar= Ph, *p*-Me-Ph, *p*-F-Ph, *p*-Cl-Ph, *p*-Br-Ph, *p*-OMePh, *m*-Cl-

Figura 14. Síntesis quimioenzimática de β -azidoalcoholes.

De igual forma, Monterde et al., (2002), reportaron la obtención enantiomérica de derivados del 2-metoxi-2-feniletanol usados como auxiliares quirales en la síntesis de derivados ópticamente puros de 1,4-dihidropiridina (**figura 15**), compuestos de gran interés como antagonistas de los canales de calcio. Su preparación y resolución constituye uno de los más importantes desafíos en la industria farmacéutica.

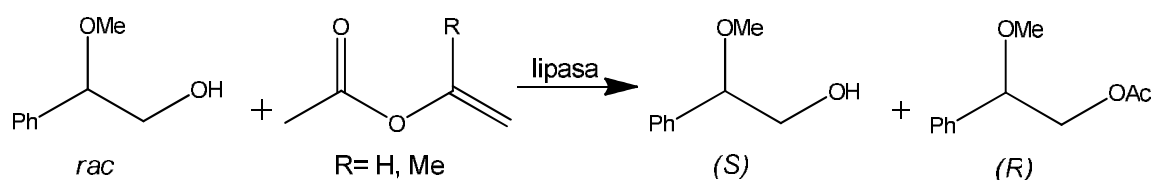


Figura 15. Resolución de 2-metoxi-2-feniletanol catalizada por lipasas.

Wielechowska y Llenkiewicz (2005), desarrollaron un método eficiente para la resolución cinética de mezclas racémicas de 3-ariltio-2-propanol-1-sustituidos, intermediarios en la preparación de diversos β -bloqueadores y de drogas antidepresivas a través de reacciones de trans-esterificación catalizadas por

lipasas. Se obtuvieron elevados valores de enantioselectividad ($E=68-100$) utilizando lipasa de *Candida antarctica* B en tolueno.

A su vez, Kamal y col., (2008), estudiaron la enantioselectividad de diferentes lipasas en la resolución del 1-cloro-3-[(4-Morfolin-4 y 1-1,2,5-tiadizol-3-il)oxi]propan-2-ol intermediarios para la obtención del (S)-Timolol, importante agente bloqueador β -adrenérgico. Se evaluaron y optimizaron el efecto de diferentes solventes en la reacción de trans-esterificación. Los resultados obtenidos mostraron la eficiencia de las lipasas como biocatalizadores para la obtención del (S)-Timolol con una elevada pureza enantiomérica cuando se realizó la reacción en solventes orgánicos hidrofóbicos como el hexano y el tolueno, alcanzándose excesos enantioméricos (ee) y relaciones enantioméricas (E), de 99% y 1060, respectivamente.

Se ha desarrollado resoluciones similares de aminoalcoholes por grupos de investigación alrededor del mundo (Shah y Gupta, 2007; Vidya y Chadha, 2009). Sin embargo, no se investigado el efecto de la implementación de estrategias de inmovilización para el mejoramiento de la enantioselectividad de las lipasas especialmente sobre soportes epóxidos parcialmente modificados sobre la resolución cinética amino-alcoholes.

1.9 PROPANOLOL Y ATENOLOL COMO ANTAGONISTAS BETA ADRENÉRGICOS.

Los amino alcoholes constituyen un interesante grupo de drogas quirales con amplio uso en la industria farmacéutica. Estos son una importante colección de compuestos orgánicos especialmente usados como antagonistas de los

receptores beta adrenérgicos, jugando un rol importante en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades humanas.

El propanolol (1-isopropilamino-3-(1-naftoxi)-2-propanol) (**Figura 16a**), es un conocido amino-alcohol usado para el tratamiento de desórdenes hipertensivos y cardiovasculares, y el cual se encuentra comercialmente disponible como una mezcla racémica. No obstante, la administración en su forma racémica ha causado efectos secundarios tales como broncoconstricción en pacientes asmáticos y diabetes en pacientes hipertensivos (Goodman y Gillman, 1985; Barret, 1985; Avila et al., 2005). Estos efectos se atribuyen al enantiómero R (Eber et al., 1990), razón por la cual muchos autores (Yost and Holtzman, 1979; Silber and Riegelman, 1980; Matsuo and Ohno, 1985; Terao et al., 1988) han propuesto diferentes estrategias o diferentes rutas químicas de síntesis para la obtención del (S)-Propanolol.

Se ha reportado la obtención del S-Propanolol a través de reacciones catalizadas por lipasas (Silver and Riegelman, 1980; Hermansson and Von Bahr, 1980; Hermansson, 1982; Thompson, et al., 1982; Avila, et al., 2005), obteniéndose el enantiómero deseado con una elevada pureza enantiomérica comparada con los métodos químicos tradicionales.

A su vez, el atenolol (**figura 16b**) es otro compuesto orgánico perteneciente al grupo de aminoalcoholes antagonistas de los beta-adreno-receptores que inhiben competitivamente los efectos de las catecolaminas (Anderson et al., 1982). Durante los últimos años, el atenolol, en su forma racémica, ha sido uno de los cinco fármacos de mayor venta en el mundo para el tratamiento de hipertensión, angina de pecho y también para el tratamiento de infartos post-miocardiales (Barclaysde, 1991; Subhas et al., 2005). Estudios previos, han permitido conocer

que la actividad farmacológica reside en el enantiómero (S) (Stoschitzky et al., 1993; Stoschitzky et al., 1995), mientras que la mezcla racémica ocasiona una dramática disminución de la actividad biológica del fármaco.

Se ha reportado la obtención del enantiómero (S)-Atenolol a través de resoluciones cinéticas a través de catalizadores químicos convencionales (Subhas y Venkat, 2005). Sin embargo, aún no ha sido reportada su obtención a través de métodos enzimáticos.

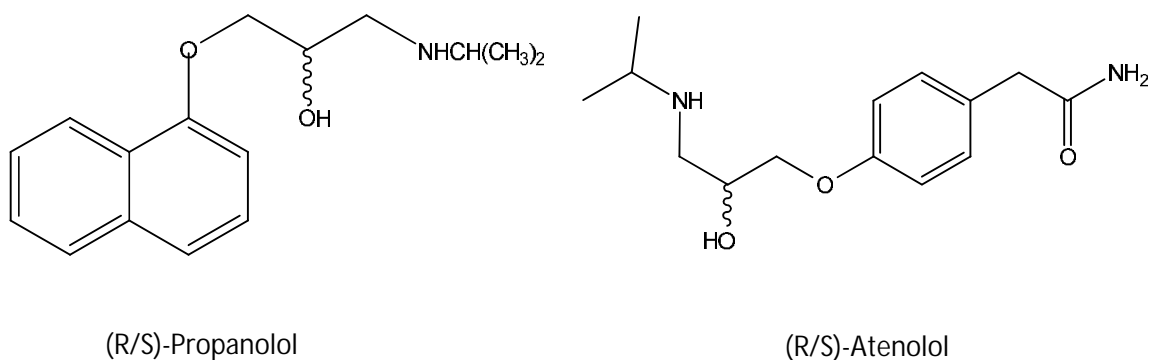


Figura 16. a) Estructura del (R/S)-Propranolol y b) (R/S)-Atenolol, moléculas antagonistas de receptores β -adrenérgicos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

La lipasa de *Candida antarctica B* (CALB) fue obtenida de Novozymes (Parana, Brasil). (R/S)-Propanolol-HCl, (R/S)-Atenolol-HCl y cada uno de los isómeros puros fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). El soporte Eupergit C fue gentilmente donado por Rohm Pharma (Darstamdt, Alemania). Los grupos epóxidos del soporte Eupergit C fueron parcialmente modificados con diferentes grupos funcionales tal como ha sido descrito por Mateo et al. (2000a). Todos los reactivos para síntesis y solventes fueron de grado analítico y suministrados por Sigma-Aldrich.

2.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES

2.2.1 Purificación del extracto crudo de lipasa de *Candida antartica B*

La lipasa de *Candida antartica B* fue purificada por cromatografía de adsorción interfacial de acuerdo con la metodología propuesta por Sabuquillo et al. (1998).

Adsorción Interfacial de CAL B en geles de Octil-Agarosa.

La purificación se realizó a diferentes fuerzas iónicas mediante el uso de un Buffer Fosfato a: 5mM, 50mM y 100mM, todos de pH 7. La adición de octil-agarosa se realizó manteniendo una relación 1:5 (v/v) de soporte y solución enzimática respectivamente. Periódicamente, se obtuvieron muestras del sobrenadante y suspensión para ser analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acuerdo con Laemmli (1970) y ensayo de actividad tal como se describe en la sección 2.3.1. Al finalizar el proceso de inmovilización, la

suspensión fue filtrada para recuperar la enzima adsorbida sobre el gel, para luego lavar los geles obtenidos por filtración con abundante agua destilada.

Desorción de la enzima del soporte Octil-Agarosa.

La CAL B adsorbida sobre el soporte Octil-agarosa fue incubada en una solución buffer fosfato a pH 7 y 4°C conteniendo el surfactante no iónico tritón X-100 al 1% (v/v). Periódicamente, se determinaron las actividades del sobrenadante y la suspensión tal como se describe en la sección 2.3.1.

2.2.2 Preparación de soportes epóxidos (Eupergit C) multifuncionales.

Inicialmente se utilizaron soportes Eupergit-C (Rohm Pharma), los cuales son soportes poliméricos de N,N'-metilen-bis-(metacrilamida), activados con grupos epóxidos. Posteriormente, se modificaron los grupos epóxidos de manera parcial de acuerdo con lo propuesto por Mateo et al., 2000.

Soporte aminado (EDA)-Eupergit C

10 g del soporte Eupergit C fueron incubados en 60 mL de etilendiamina (EDA) 0,2M, pH 8.5 durante 15 min bajo agitación suave a diferentes tiempos (de 0.5 a 24 horas). A continuación, el soporte fue lavado abundantemente con agua destilada y posteriormente almacenado a 4°C. La determinación del grado de modificación de los grupos epóxidos se llevó a cabo por titulación con NaOH 10mM de los grupos amino introducidos en el soporte.

Soporte iminodiacético (IDA)

10 g de Eupergit® C fueron incubados en 18 ml de solución 2 M de ácido iminodiacético disuelto en buffer Borato de Sodio 0,1M de pH 9 y 25°C, bajo agitación suave por un lapso de 24 horas. Posteriormente el soporte fue lavado con un exceso de agua destilada y almacenado a 4°C. La concentración de grupos carboxilo sobre el soporte se determinó indirectamente a través de la cuantificación de átomos de Cu, por la adición de CuSO₄, el cual modifica el 100% de los grupos IDA (Mateo et al., 2000b).

Soporte Cobre iminodiacético (IDA-Cu)

10 g de soporte Eupergit® C-IDA fueron incubados en 60mL de agua destilada con un contenido de 2 g de sulfato de cobre bajo agitación suave. Después de 2 h, el soporte fue lavado con un exceso de agua destilada. La cuantificación de los átomos de Cobre sobre el soporte se realizó por espectroscopia de absorción atómica luego de un tratamiento del soporte con EDTA (Mateo y col., 2000a). El equipo de absorción atómica empleado fue un Thermo Electron modelo S4. La curva de calibración para la cuantificación de los átomos de cobre se muestra en la sección de anexos (**anexo 2**).

2.2.3 Inmovilización de CAL B sobre los soportes multifuncionales

La solución de lipasa de *Candida antarctica B* previamente purificada por cromatografía de adsorción interfacial, fue utilizada para la inmovilización sobre los distintos soportes obtenidos a partir de la modificación parcial de los grupos epóxido del soporte Eupergit C.

Para la inmovilización, se adicionó 5 ml de la solución de lipasa purificada sobre 0,5 g de cada soporte (Eupergit C, Eupergit C-IDA, Eupergit C-IDA-Cu y Eupergit C-aminado). Periódicamente, se evaluó el proceso de inmovilización de CAL-B sobre los diferentes soportes midiendo la actividad del sobrenadante mediante un ensayo espectrofotométrico usando como sustrato p-nitrofenil-Butirato (pNPB), tal como se describe en la sección 2.3.1.) y por electroforesis de proteínas en SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

2.2.4 Síntesis de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de CAL-B.

Para la síntesis de los CLEA de CAL-B se utilizó *t*-butanol como agente precipitante y glutaraldehído como agente entrecruzante. El procedimiento de síntesis de los agregados enzimáticos entrecruzados fue el siguiente:

A un volumen de 0.5 ml de la enzima CAL-B purificada previamente se adicionó 3.0 ml de *t*-butanol a diferentes concentraciones (rango 50-90% (v/v)). Posteriormente, se adicionó glutaraldehído al agregado precipitado de CAL-B formado a diferentes concentraciones (rango 0,5-2 % (p/v)).

La **figura 17** describe el proceso general de síntesis de agregados entrecruzados de CAL B.

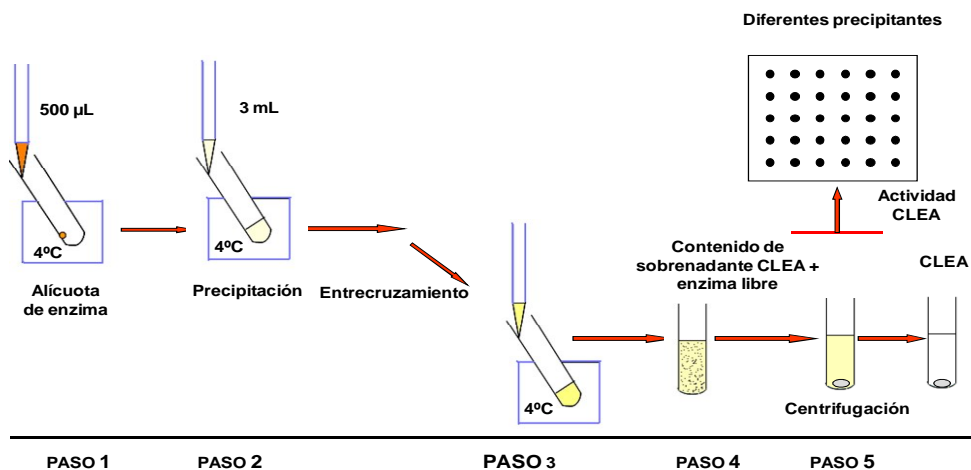


Figura 17. Procedimiento general para la síntesis de CLEAs de CAL-B

2.2.5 Evaluación de la enantioselectividad de lipasas inmovilizadas

Una vez obtenidos los diferentes derivados de CAL-B, se evaluó la enantioselectividad expresada por estos biocatalizadores en la resolución cinética de los sustratos quirales propanolol y el atenolol, los cuales son de interés farmacéutico como agentes Beta-bloqueadores del sistema nervioso central.

Se utilizaron los derivados de Eupergit C-CAL-B, Eupergit C-IDA-CAL-B, Eupergit C-EDA-CAL-B y Eupergit C-IDA-Cu-CAL-B como biocatalizadores. La resolución cinética se llevó a cabo mediante una reacción de trans-esterificación de las mezclas racémicas de los sustratos de interés (propanolol y atenolol), utilizando acetato de vinilo como donador acilo y tolueno como solvente orgánico.

Se estudió el efecto de la concentración del acetato de vinilo, carga del biocatalizador y relación molar sustrato-donor acilo sobre la velocidad de reacción y enantioselectividad de los diferentes preparados inmovilizados de lipasas de *Cándida antarctica* B. A continuación se describen los ensayos:

Evaluación del efecto concentración del acetato de vinilo, carga del biocatalizador y relación molar sustrato-donor acilo sobre la reacción de esterificación (R/S)-propanolol y (R/S)-atenolol.

El propanolol (rango 0,1-0,03 mmol) y acetato de vinilo (rango 0,1-0,3mmol) fueron disueltos en 3 ml de tolueno. La reacción fue iniciada con la adición de diferentes cantidades de biocatalizador inmovilizado de CAL B sobre octil-agarosa en un rango de 30-100 mg. La mezcla de reacción fue agitada a 200 rpm y 25°C, durante 6 horas. Periódicamente, el progreso de la reacción fue monitoreado extrayendo a diferentes tiempos alícuotas del medio de reacción y analizando los productos formados y el sustrato consumido a través de HPLC.

El atenolol (0,05-0,01 mmol) y acetato de vinilo (0,05-0,15) fueron disueltos en 3 ml de tolueno. La reacción fue iniciada y monitoreada bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para la reacción de esterificación del (R/S)-propanolol.

Reacción de esterificación (R/S)-Propanolol y (R/S)-Atenolol bajo condiciones estándares

El propanolol (0,1mmol) o atenolol racémico (0,05 mmol) y acetato de vinilo (0,3 mmol y 0,1 mmol) fueron disueltos en 3 m de tolueno. La reacción fue iniciada con la adición de 100 mg del biocatalizador inmovilizado de CAL B (Eupergit C-CAL-B, Eupergit C-IDA-CAL-B, Eupergit C-EDA-CAL-B y Eupergit C-IDA-Cu-CAL-B). La mezcla de reacción fue agitada a 200 rpm y 25°C, 6 horas (**Figura 18** y **19**). Periódicamente, el progreso de la reacción fue monitoreado extrayendo a diferentes tiempos de reacción alícuotas del medio de reacción y analizando los productos formados y el sustrato consumido por HPLC. Bajo las condiciones de

estudio la reacción de esterificación del propanolol catalizada por lipasas procede a través de O-acetilaciones y no existe evidencia alguna de una N-acetilación, debido a la basicidad del grupo -NH que retiene fuertemente su H, impidiendo la hidrólisis del complejo acil-enzima. Esto ha sido confirmado previamente por Bevinakatti y Banerji, (1991); Arroyo y Sinisterra, (1994); Avila et al., (2005), quienes estudiaron el mecanismo de reacción.

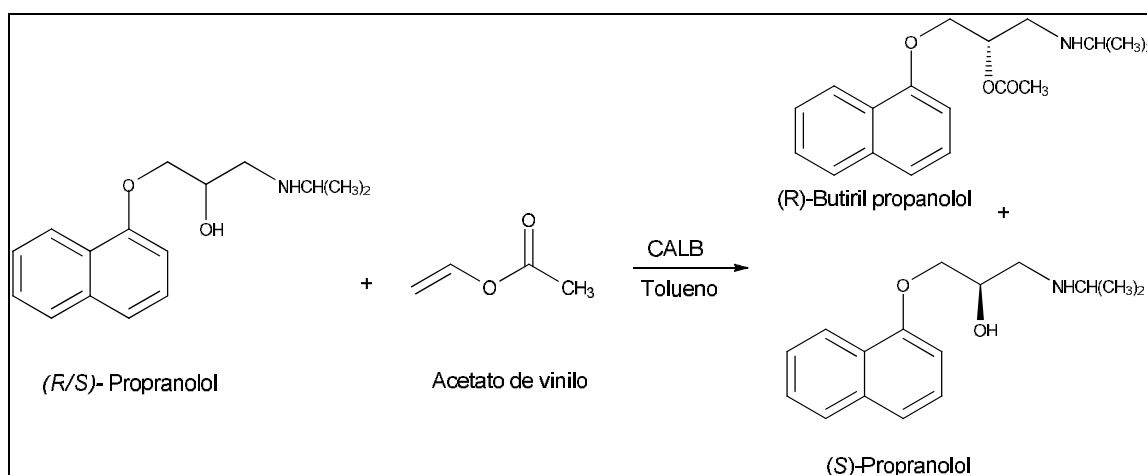


Figura 18. Resolución cinética (R/S)-Propranolol catalizada por CALB.

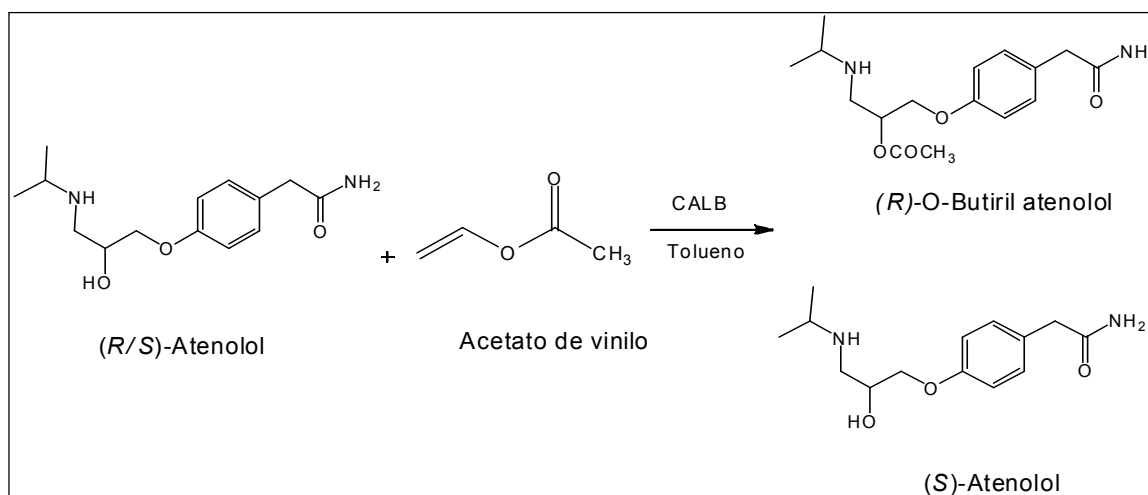


Figura 19. Resolución cinética (R/S)-Atenolol catalizada por CAL-B.

2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.3.1 Determinación de la actividad lipásica utilizando *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB)

La actividad catalítica de las lipasas se cuantificó de forma discontinua a través de la determinación del método de velocidades iniciales de reacción. El ensayo se llevó a cabo midiendo el aumento en el valor de absorbancia a 348 nm, producido por la formación del producto *p*-nitrofenol (coeficiente de extinción molar= 5150 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ a pH 7) generado por la hidrólisis de *p*-NPB 0.4 mM, disuelto en tampón fosfato sódico 25 mM, pH 7 y a 25 °C. Para iniciar la reacción, 20 μL de solución lipásica o suspensión se añadieron a 2,5 mL del sustrato. Una unidad internacional de actividad de *p*-NPB se definió como la cantidad de lipasa que es necesaria para hidrolizar 1 μmol de *p*-NPP por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente. Ver **Figura 20**.

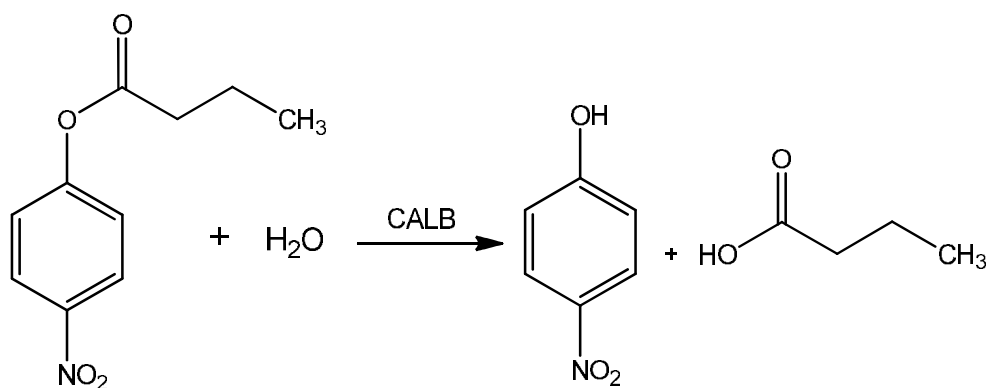


Figura 20. Reacción de hidrólisis del PNPB catalizada por CALB.

2.3.2 Electroforesis SDS-PAGE (Laemmeli, 1970)

Las enzimas adsorbidas en el soporte se confirmaron por electroforesis SDS-PAGE. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente y 150 mV de voltaje constante utilizando como electrolito Tris-HCl 25 mM-glicina 192 mM y SDS 1% (v/v).

Las muestras fueron tratadas durante 5-10 minutos a 100°C en presencia de tampón de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 – SDS 2%(v/v) -β-mercaptoetanol 5%(v/v) - glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol al 0,005%(p/v).

El revelado de las proteínas se realizó mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-250 (0,25% p/v) disuelto en metanol 50%(v/v) y ácido acético 10%(v/v). Para la determinación de las masas moleculares de las proteínas se utilizaron marcadores de bajo peso molecular: fosforilasa b (94 KD), BSA (66,2 KD), ovoalbúmina (45 KD), anhidrasa carbónica (30 KD) e inhibidor de tripsina (20,1 KD). Los geles obtenidos fueron posteriormente escaneados con un densitómetro UMAX PowerLook 2100XL y visualizados a través del software PD Quest (Biorad).

2.3.3 Análisis por HPLC

El grado de esterificación en la reacción enzimática fue determinado por cuantificación de los productos y sustratos mediante HPLC (Agilent 1100) usando una columna C-18 en fase reversa (Zorbax C-18, Agilent technologies). La fase móvil consistió de acetonitrilo-buffer fosfato pH 6 (70:30 v/v) y las muestras fueron eluidas a un flujo de 1 ml/min. La identificación se realizó utilizando un detector UV a 289 nm.

2.3.4 Determinación del exceso enantiomérico (ee_s y ee_p) y la enantioselectividad (E)

Se analizó el exceso enantiomérico (ee_s) del S-Propanolol y del éster formado (ee_p) a través de HPLC quiral, para diferentes grados de conversión (entre 20-30%) durante la reacción enzimática. La cuantificación se realizó utilizando un estándar interno.

Los valores de ee_s y ee_p fueron determinados usando una columna quiral (ES-OVM, Agilent technologies, USA). Como fase móvil se usó una mezcla isocrática de metanol/buffer fosfato pH 6 (30:70 v/v) a un flujo de 1 ml/min. La relación enantiomérica fue calculada usando la ecuación reportada por Chen et al., 1982.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 PURIFICACIÓN DE CAL-B POR CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN INTERFACIAL

La enzima CALB se purificó a partir de extractos crudos disponibles en forma comercial. En estos extractos enzimáticos existen en algunas ocasiones esterasas contaminantes, así como estructuras macromoleculares (dímeros u oligómeros) de las lipasas, todo lo cual podría afectar la enantioselectividad y actividad de las lipasas. Inicialmente, se llevó a cabo la purificación de la lipasa de *Candida antarctica* B para su posterior inmovilización sobre diferentes soportes epóxidos multifuncionales (Ghosh et al. 1995; Pernas et al., 2001). La purificación se realizó a través de la adsorción de la CAL-B sobre geles de octil-agarosa a baja fuerza iónica, obteniéndose una inmovilización cuantitativa y rápida, tal como se ha descrito en la literatura (Bastida et al., 1998).

En la **figura 21** se muestra el perfil electroforético obtenido por SDS-PAGE del extracto crudo de CAL-B y de la CAL-B purificada por cromatografía de adsorción interfacial en geles de octil-agarosa. En ella se puede observar que la lipasa se adsorbió de forma específica sobre el soporte, presentándose una banda de 38 kDa, la cual corresponde al PM de la CAL-B en su forma monomérica. (Ver **Figura 21**, carril 2). Además, se evidenció la existencia de dos bandas que muy posiblemente corresponden a la presencia en el extracto crudo de CAL-B de una proteína esterásica (22 kDa) y a la existencia de agregados bimoleculares de la lipasa con un peso molecular de aproximadamente el doble de su valor. La existencia de estos agregados bimoleculares ha sido reportada previamente por Pernas et al. (1995). Por otro lado, fue evidente la efectividad de la cromatografía

de adsorción interfacial como método de purificación de lipasas, tal como ha sido reportado por Sabuquillo et. al. (1998).

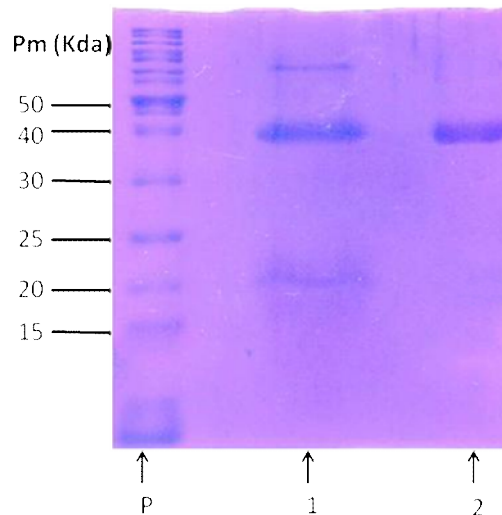


Figura 21. Electroforesis SDS-PAGE del preparado crudo y purificado de CAL-B.

Carril 1: Extracto crudo de CAL-B; Carril 2: CAL-B adsorbida sobre el soporte octil-agarosa; Carril P: Marcadores de peso molecular.

La inmovilización de enzima CAL-B sobre soportes octil-agarosa transcurrió de forma rápida (1 hora). En las condiciones experimentales usadas durante la inmovilización se adsorbió el 99% de la enzima sobre el soporte (**Figura 22**). El 1% restante de actividad puede atribuirse esterases o lipasas presentes en el extracto de CAL-B que no pueden ser adsorbidas por el soporte octil agarosa. Además, en estos derivados se obtuvo una carga enzimática de aproximadamente 4 mg CAL-B pura/g octil-agarosa. En la **figura 22**, se muestra la cinética de inmovilización de la Calb sobre el soporte hidrofóbico de octil-agarosa.

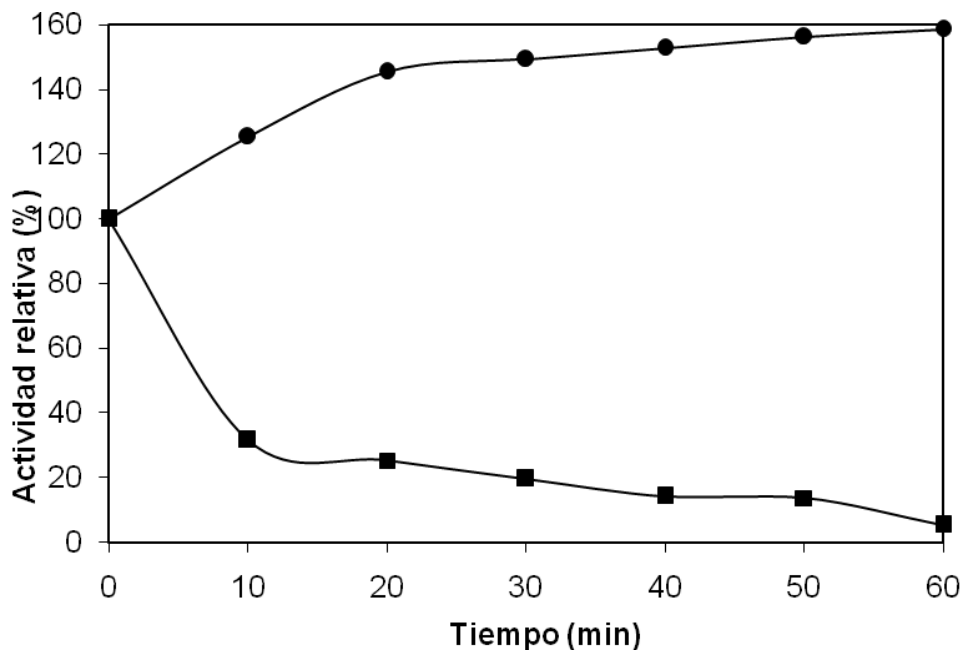


Figura 22. Cinética de inmovilización de lipasa de *Candida antarctica B* sobre el soporte octil-agarosa en la hidrólisis de p-NPB. (■): Actividad enzimática en el sobrenadante; (●): Actividad enzimática en la suspensión.

A partir de la **figura 22** se determinó que durante el proceso de inmovilización se presentaba un aumento de la actividad enzimática en la hidrólisis de p-NPB por un factor hasta de 1,7 aproximadamente. Este efecto de hiperactivación se ha observado cuando las lipasas son activadas interfacialmente sobre soportes hidrofóbicos, y se explica por el hecho de que la lipasa se encontraría mayoritariamente en su conformación abierta (Bastida et al., 1998). Una vez inmovilizada sobre el soporte, la CAL-B se desorbió completamente del derivado mediante la adición de tritón X-100 al 1%(v/v) (Sabuquillo et al., 1998).

3.2 PREPARACIÓN DE LOS SOPORTES EPÓXIDOS PARCIALMENTE MODIFICADOS

Inicialmente se utilizó el soporte epóxido comercial Eupergit® C (EC) el cual presenta un diámetro de poro entre 100 a 250 μm y una carga de grupos epóxidos de 100 $\mu\text{mol/g}$ aproximadamente. Gracias a su estructura, el Eupergit® C es bastante estable y resistente, en un rango de pH de 0 a 14. Esta característica permitió la modificación parcial o completa de los grupos epóxido con otros grupos funcionales.

El grado de modificación del soporte es un factor significativo sobre el proceso de inmovilización de la CAL-B reflejado en actividad y enantioselectividad del derivado enzimático. En este sentido, se estudió el efecto del grado de modificación de los grupos epóxidos del soporte comercial Eupergit® C utilizando diferentes grupos funcionales. El estudio se hizo con el fin de determinar la mejor condición de modificación para la inmovilización de la CAL-B.

3.2.1 Soporte activado con grupos amino (EDA)

En la **figura 23** se muestra el efecto de la modificación del soporte epóxido Eupergit® C con etilendiamina (EDA) sobre la inmovilización de la CAL-B. De la gráfica se desprende que una modificación parcial de los grupos epóxidos del soporte comercial (cerca al 21,5%), permite alcanzar la máxima actividad catalítica expresada por el derivado de lipasa.

El incremento del número de grupos amino en la superficie del soporte, permitiría aumentar las interacciones electrostáticas enzima-soporte en las condiciones de

inmovilización utilizadas, generando un aumento de las moléculas de enzima inmovilizadas sobre el soporte (Montes y col., 2006). Sin embargo, la actividad catalítica expresada por los derivados enzimáticos sugiere que una elevada carga de enzima sobre el soporte estaría ocasionando posiblemente efectos estéricos o de restricción difusional que impediría una mayor expresión de la actividad enzimática inmovilizada sobre el soporte. Este efecto se puede deber a la cercanía de moléculas de lipasa entre sí, lo cual disminuiría la accesibilidad del sustrato, en este caso el p-NPB, al sitio activo de cada molécula enzimática (Guisan, 2006).

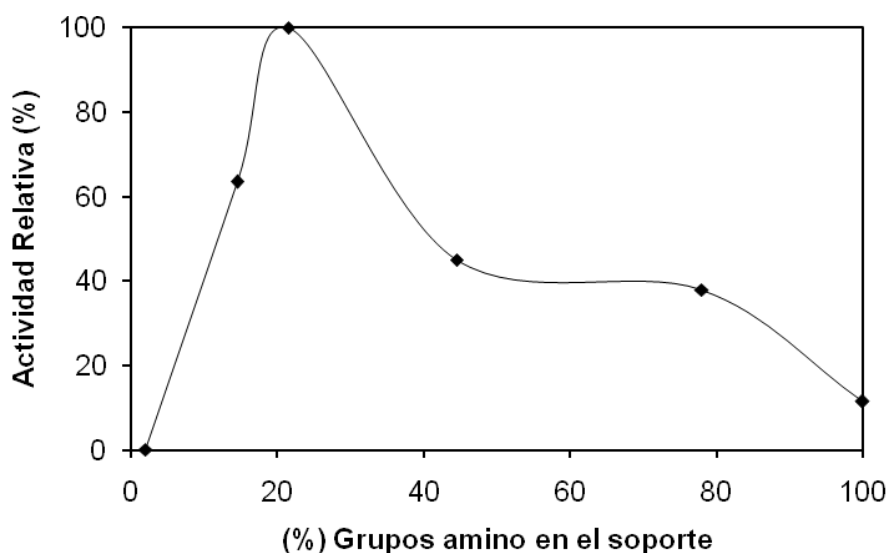


Figura 23. Efecto del grado de modificación del soporte en la inmovilización covalente de la CAL B. 100 $\mu\text{mol/g}$ de soporte corresponde al 100% de modificación. Actividad específica= 46,2 U/g soporte corresponde al 100% de actividad.

Posteriormente, el derivado EC-EDA-CAL B, que presentó la máxima actividad enzimática, fue expuesto a condiciones de desorción, incubando el derivado con la lipasa inmovilizada en una solución de NaCl 500mM, de manera de desorber las moléculas de lipasas inmovilizadas por interacciones iónicas. Bajo estas condiciones, el derivado desorbió un 4% de la actividad inmovilizada, lo cual está

demostrando que el soporte eupergit C-EDA con un 21,5% de modificación con etilendiamina (EDA), inmovilizó un 96% de la enzima de forma covalente en los grupos epóxidos remanentes (Mateo et al., 2000).

3.2.2 Soporte activado con grupos iminodiacético (IDA)

La preparación del soporte Eupergit C activado con grupos carboxilo se realizó a través de la modificación de los grupos epóxidos con ácido iminodiacético (IDA). El grado de modificación de los grupos epóxidos del soporte se evaluó mediante la valoración de los grupos carboxilos presentes en el soporte. La **figura 24** representa el proceso de inmovilización de la CAL B sobre la matriz del soporte EC-IDA de acuerdo con el grado de modificación de los grupos epóxidos del soporte.

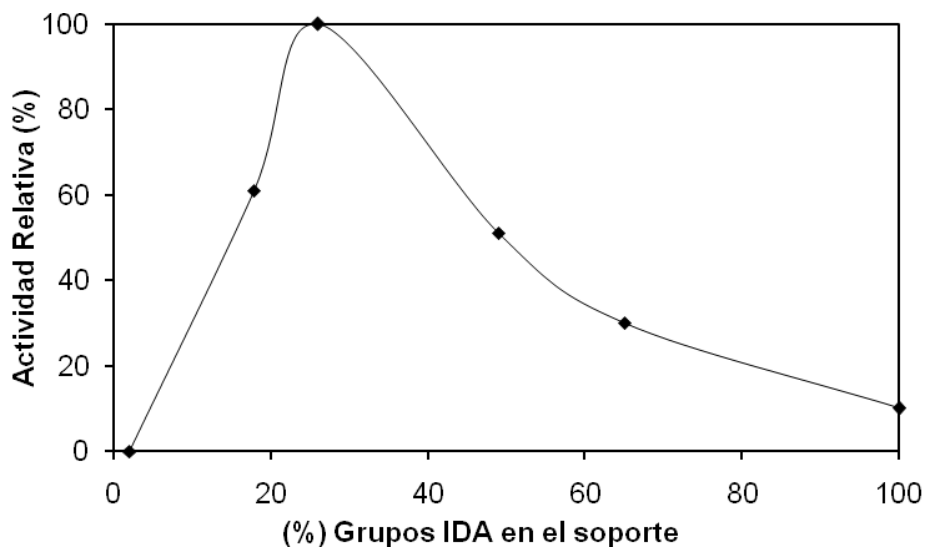


Figura 24. Efecto del grado de modificación del soporte EC-IDA sobre la inmovilización covalente de la CAL B sobre EC-IDA. Actividad específica= 14,1 U/g soporte corresponde al 100% de actividad de lipasa. 100 μ mmol/g de soporte corresponde al 100% de modificación.

De acuerdo con los resultados, se observó que una modificación parcial con grupos carboxilos de los grupos epóxidos del soporte Eupergit® C (cerca al 18%), la cual permite expresar la máxima actividad de la CAL-B en el derivado inmovilizado de forma covalente. No obstante, un aumento del grado de modificación con IDA (por sobre el 18% de modificación), permitió aumentar la inmovilización enzimática de CAL-B sobre el soporte. Sin embargo, mayores cantidades de la enzima inmovilizada afectaron la expresión de la actividad enzimática de los derivados de CAL-B. Esta disminución de la actividad expresada por CAL-B sobre los soportes EC-IDA se estaría debiendo a efectos estéricos producto de una mayor carga enzimática sobre el soporte que afectan la cantidad de sustrato disponible (restricciones difusionales) que puede ser contactada con la enzima (Illanes, 1994; Turkova, 1999; Bolivar et al., 2009).

La inmovilización de la lipasa sobre el soporte Eupergit C-IDA bajo las condiciones experimentales óptimas se realiza a través de interacciones de puente salino o por carga no-covalentes entre los grupos carboxilos del brazo espaciador y los grupos amino de lisinas presentes en la superficie de la enzima (Uppenberg et al., 1994; Ario et al., 2004). A su vez, en la condición óptima de inmovilización, se determinó que el 76% de la enzima cargada era inmovilizada covalentemente sobre el soporte.

3.2.3 Soporte iminodiacético-Cobre (IDA-Cu)

Para la obtención del soporte Eupergit C-IDA-Cu, se utilizó como soporte de partida el Eupergit C-IDA. Posteriormente, éste se modificó con Cobre mediante la adición al soporte de una solución de CuSO_4 como agente quelante a diferentes concentraciones. En la **figura 25** se muestra el efecto ocasionado por el grado de

modificación del soporte Eupergit C-IDA por grupos quelatos Cu^{2+} , sobre la actividad catalítica expresada por el derivado inmovilizado de CAL B.

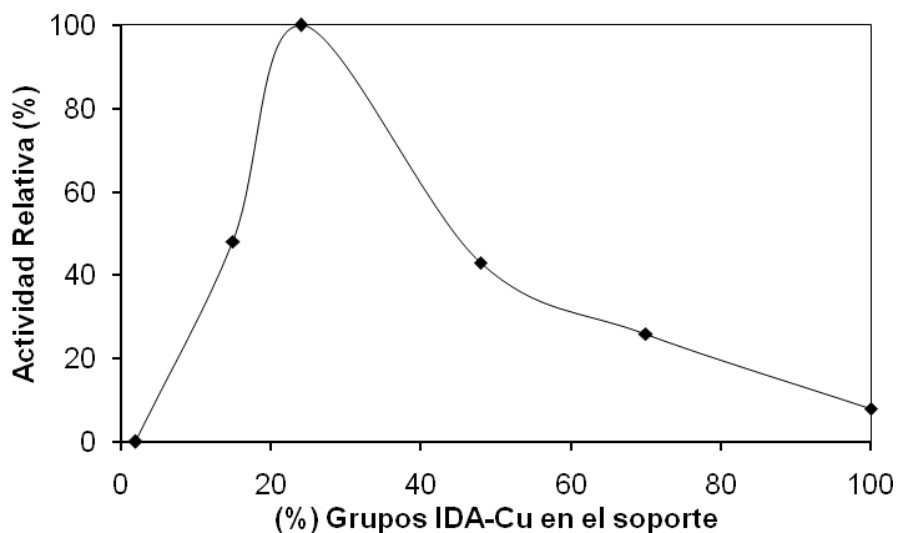


Figura 25. Efecto del grado de modificación del soporte en la inmovilización covalente de CAL-B sobre EC-IDA-Cu. Actividad específica= 34,2 U/g soporte corresponde al 100% de actividad de lipasa. 100 $\mu\text{mol/g}$ de soporte corresponde al 100% de modificación.

En la **figura 25** se muestra que para una modificación de los grupos Eupergit C-IDA con una modificación con cobre cercana al 24%, se obtiene la máxima actividad catalítica del derivado CAL-B.

Para todos los soportes Eupergit® C modificados, la adsorción de las proteínas se incrementó a medida que aumentó la cantidad de grupos epóxidos modificados en el soporte. Sin embargo, la unión covalente se vio favorecida cuando el soporte epóxido se modificó en un rango entre 15 y 25%. Este resultado indica que la inmovilización covalente de las proteínas necesita solo una modificación mínima de los grupos epóxido del soporte comercial, debido a que la reactividad química de estos grupos es necesaria para que se lleve a cabo una inmovilización covalente posterior, que permita una mayor rigidificación de la CALB, lo cual

favorecería las propiedades bioquímicas de selectividad y especificidad de la lipasa (Mateo et al., 2000b; Mateo et al., 2007; Palomo, 2003; Wheatley, 1999).

3.3 EFECTO DEL pH Y FUERZA IÓNICA SOBRE LOS DERIVADOS DE CAL-B OBTENIDOS

3.3.1 Efecto del pH sobre el proceso de inmovilización

En estos estudios, se evaluó el efecto del pH en el proceso de inmovilización de CAL-B en los soportes epóxidos parcialmente modificados.

En la **figura 26** se muestra un resumen de los resultados obtenidos en el proceso de inmovilización de CAL-B a diferentes valores de pH. Se observa que a valores de pH neutros se logran los mejores resultados de inmovilización para todos los soportes epóxidos modificados, alcanzando una mayor expresión de actividad de la CAL-B.

Los resultados obtenidos sugieren que el proceso de inmovilización sobre soportes epóxidos es altamente dependiente del pH del medio de reacción. La baja reactividad de los grupos epóxidos a valores de pH neutros y la presencia de grupos EDA, IDA o IDA-Cu sobre el soporte favorecen que el proceso de inmovilización de la CALB se dé en dos etapas. En la primera etapa, la enzima es adsorbida físicamente de manera rápida sobre el soporte, para luego en una segunda etapa, más lenta, generar la formación de los enlaces covalentes con los grupos epóxidos remanentes (mateo et al., 2000b).

Por otro lado, la inmovilización de la CAL B a pH alcalino (pH 10), ocasiona que todos los residuos lisínicos se encuentren desprotonados y pueden en este caso actuar como nucleófilos favoreciendo la inmovilización covalente por el incremento en el número de enlaces enzima-soporte en un largo periodo de tiempo. Sin embargo, la baja actividad mostrada por los derivados inmovilizados de CAL-B se debe posiblemente a la inestabilidad del derivado ocasionado probablemente por factores tales como la inactivación de la enzima producto del prolongado tiempo de inmovilización a este valor de pH; la orientación desfavorable de los grupos de la enzima sobre el soporte o a la inmovilización de algunas moléculas de enzima por el sitio activo (Bolivar et al., 2009; Polizzi et al., 2007; Mateo et al., 2000b).

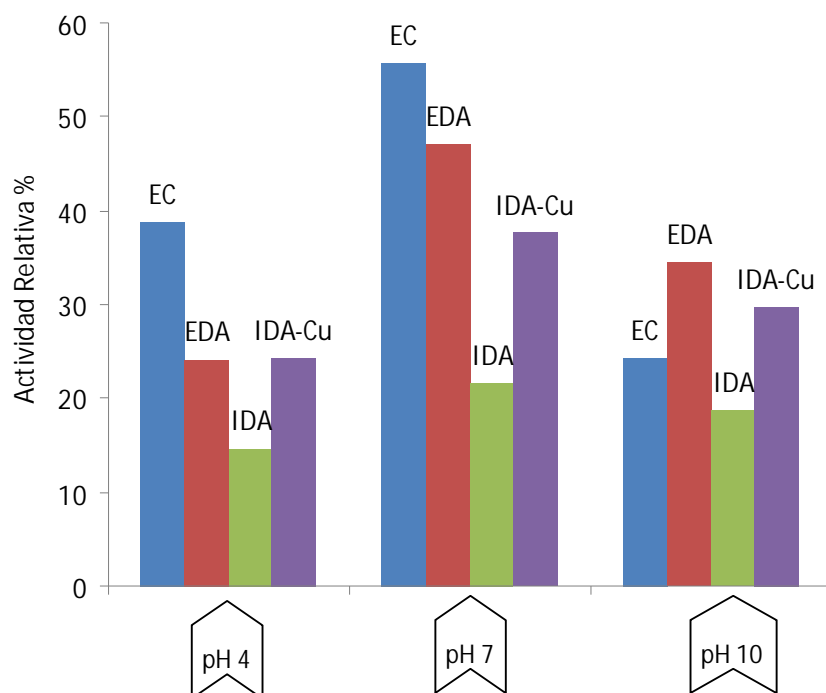


Figura 26. Efecto del pH sobre la actividad lipásica retenida en los diferentes soportes empleados. Actividad = 320 U/g soporte, corresponde al 100% actividad relativa.

3.3.2 Efecto de la fuerza iónica sobre el proceso de inmovilización de CAL-B

Se evaluó el efecto de la fuerza iónica en el proceso de inmovilización y en la expresión de la actividad catalítica de los derivados inmovilizados de CALB, con el fin de determinar la concentración de iones en el medio, que favorezca la adsorción entre las proteínas y el soporte (Torres et al., 2003).

La variación de la fuerza iónica del medio se realizó en un rango de concentración de 5mM a 1000mM usando un buffer fosfato de pH 7 en el cual la enzima nativa expresó su máxima actividad.

De manera general, valores bajos de fuerza iónica favorecieron la inmovilización de la enzima CAL B. En la **figura 27** y **figura 28** se muestra la cinética de inmovilización de la CAL B en cada soporte multifuncional.

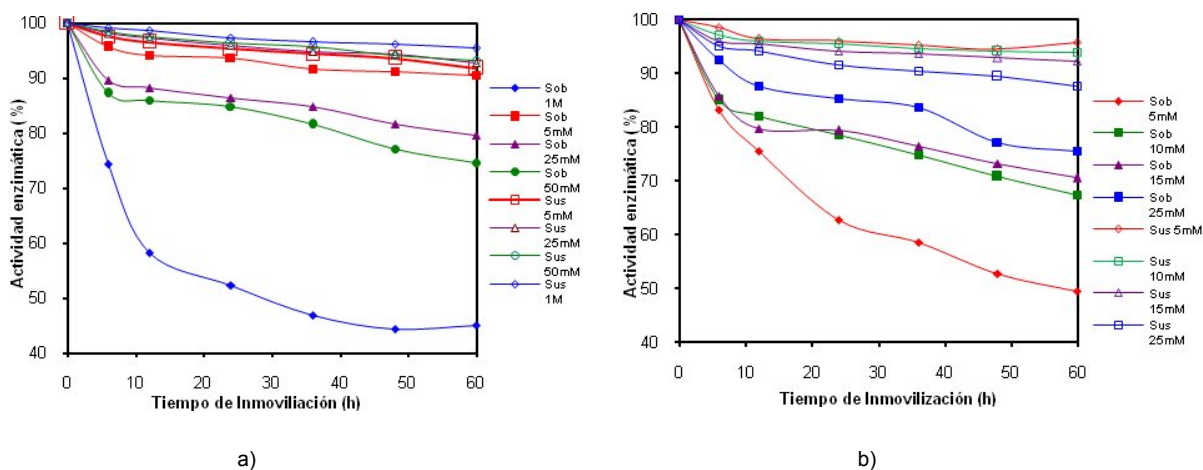


Figura 27. Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre: a)EC; b)EC-EDA. Efecto de la fuerza iónica en el proceso de inmovilización buffer fosfato a diferentes concentraciones y pH 7. (Sob: sobrenadante; sus: suspensión).

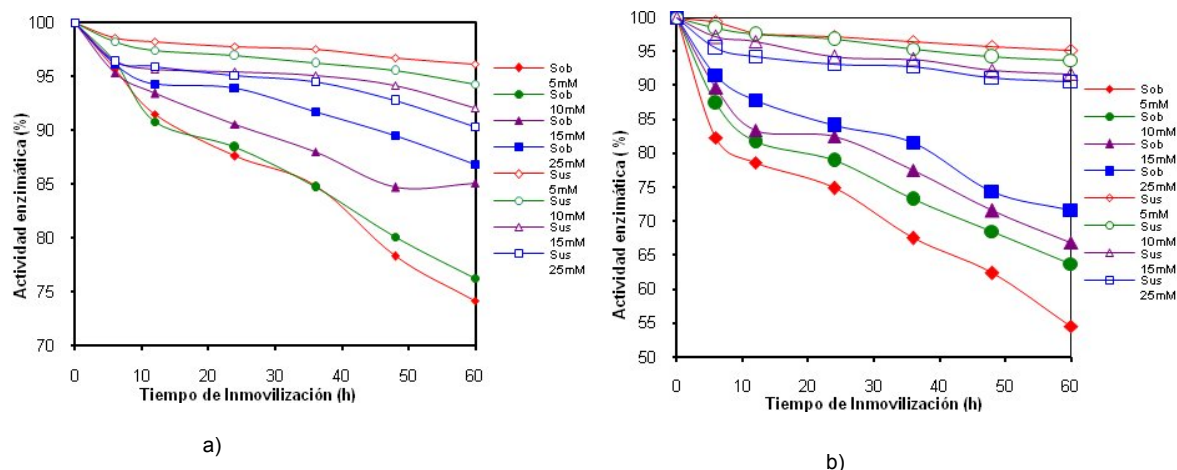


Figura 28. Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre: a)EC-IDA b)EC-IDA-Cu. Efecto de la fuerza iónica en el proceso de inmovilización buffer fosfato a diferentes concentraciones y pH 7. (Sob: sobrenadante; sus: suspensión).

La cinética de inmovilización de la CAL-B sobre los soportes Eupergit C-EDA, Eupergit C-IDA y Eupergit C-IDA-Cu, fue más efectiva a una concentración de fosfato 5 mM. Esto sugiere que la concentración de iones en el medio ejerce una influencia significativa sobre el proceso de inmovilización posiblemente ocasionada por la competencia de los iones en el medio con la proteína por los puntos de interacción con el soporte (Bolívar et al., 2009).

Por el contrario, la inmovilización de CAL B sobre el soporte Eupergit® C (Ver **Figura 27a**) demostró que a alta fuerza iónica se favorece el proceso de inmovilización de la enzima sobre el soporte. La inmovilización a baja fuerza iónica fue despreciable en este tipo de soporte. Esto sugiere una limitación para los soportes de tipo epóxido ya que es necesaria una elevada fuerza iónica para la inmovilización de proteínas (Katchalski-Katsir, 1993). Sin embargo, no todas las proteínas pueden ser sometidas a estas condiciones, ya que es posible que en algunos casos se afecten negativamente las propiedades catalíticas de actividad y

estabilidad (Mateo y col., 2000a). Esto se debería a la baja hidrofobicidad presentada por este tipo de material polimérico (Mateo y col., 2002).

3.3.3 Inmovilización de CAL-B sobre soportes de Eupergit C bajo condiciones óptimas de fuerza iónica y pH.

La CAL-B fue inmovilizada en las condiciones de pH, fuerza iónica y grado de modificación del soporte resumidas en la **tabla 1**. En estas condiciones los soportes Eupergit C y Eupergit C-Cu, presentaron los mayores porcentajes de expresión de actividad enzimática: 50% y 58%, respectivamente. Por el contrario, los soportes Eupergit C-IDA y Eupergit C-EDA presentaron disminuciones drásticas de actividad enzimática expresada, con 35 y 12%, respectivamente. La **figura 29** muestra la cinética de inmovilización para cada uno de los derivados.

Tabla 1. Condiciones del proceso Inmovilización CAL B sobre soportes epóxidos parcialmente modificados.

Soporte	Grado de modificación grupos epóxidos (%)	Fuerza iónica del medio (mM)	pH del medio
Eupergit C	0	1000	7
Eupergit C-EDA	21,5	5	7
Eupergit C-IDA	18,3	5	7
Eupergit C-IDA-Cu	24,3	5	7

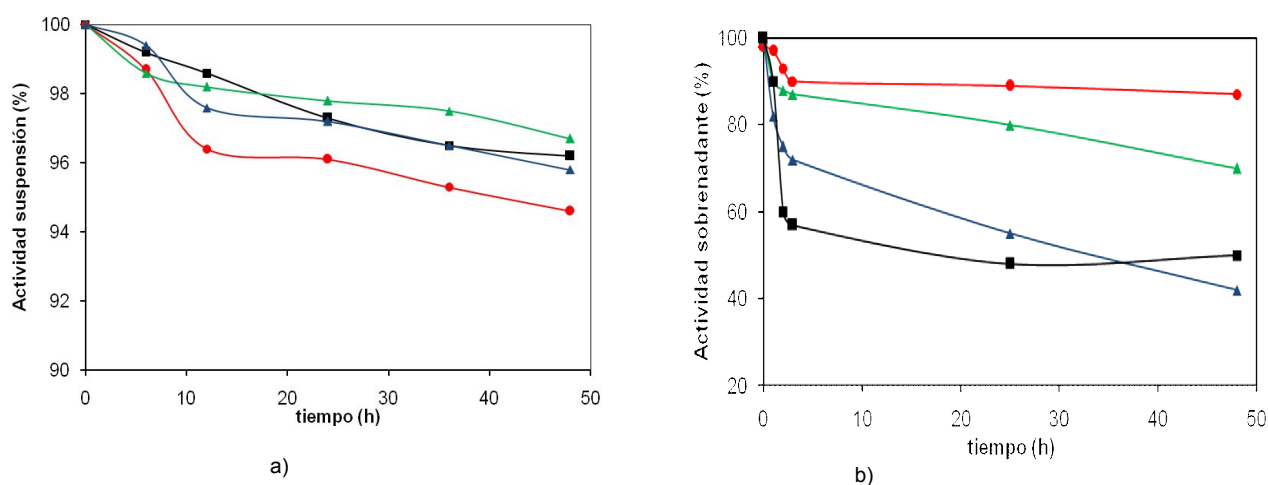


Figura 29. Cinética de la inmovilización de CAL-B en soportes epóxidos multifuncionales. a) suspensión; b) sobrenadante. (▲)EC-IDA-CAL-B; (●)EC-EDA-CAL-B, (■)EC-CAL-B; (▲)EC-IDA-Cu-CAL-B. Los experimentos se desarrollaron como se indica en la parte experimental.

Bajo las condiciones utilizadas, no fue posible inmovilizar el 100% de la actividad enzimática, lo cual puede deberse a la baja disponibilidad de grupos funcionales en la estructura 3D de la enzima debido al alto grado de glicosilación de la lipasa de CAL-B que impide la reactividad de estos frente a los soportes Eupergit C y Eupergit C funcionalizados (Ericsson et al., 2008; McCabe et al., 2004; Uppenberg et al., 1994).

3.4 AGREGADOS ENZIMÁTICOS ENTRECruzADOS (CLEAs) DE LIPASAS DE CAL-B.

En el proceso de obtención de CLEAs, tanto la agregación de la enzima a través de la precipitación por un solvente orgánico, como la concentración del agente entrecruzante influyen de manera significativa sobre la actividad y enantioselectividad que exhibe el CLEA obtenido (Cao et al., 2004). Por esta razón, es importante una selección adecuada del tipo de solvente a utilizar y su

concentración, así como la determinación de la concentración de agente entrecruzante que no ocasione una desnaturalización de la enzima.

Para la elaboración de los CLEAs de CAL-B se realizó un “*screening*” con sulfato de amonio, acetona y *t*-butanol, como agentes precipitantes. Los resultados obtenidos señalaron que el *t*-butanol no ocasionó un efecto desnaturalizante sobre la CALB como si lo ocasionaban la acetona y el sulfato de amonio. Por esta razón se seleccionó el *t*-butanol como agente precipitante para la optimización de la síntesis de los CLEAs. Como agente entrecruzante se seleccionó el glutaraldehído. La optimización de la concentración del *t*-butanol y del glutaraldehído se realizó a través de un diseño factorial multinivel 3³ donde además se evaluó la influencia de la concentración del preparado enzimático, sobre la actividad catalítica mostrada por el CLEA en la hidrólisis de pNPB. La **tabla 2** resume las condiciones experimentales del diseño experimental.

Tabla 2. Condiciones experimentales en la selección de variables significativas para la optimización de los CLEAs.

Factor	Nivel bajo (-1)	Nivel intermedio (0)	Nivel alto (1)
Concentración <i>t</i> -butanol (% v/v)	50	70	90
Concentración glutaraldehído (% p/v)	0,5	1,0	1,5
Concentración de proteína (mg/ml)	3	5	7

Los resultados obtenidos mostraron que para las condiciones de estudio la actividad de los CLEAs formados era altamente variable, lo que sugiere que cada

uno de los factores influye en el proceso de elaboración de los CLEAs. La **tabla 3** resume los resultados de actividad obtenidos para cada uno de los ensayos.

Tabla 3. Matriz de resultados para el proceso de elaboración de agregados entrecruzados de CAL B.

Experiencia No	Proteína (mg/ml)	t-butanol (% v/v)	Glutaraldehído (% p/v)	Actividad relativa (%)
1	1	-1	1	79
2	0	-1	0	79
3	1	-1	-1	20
4	-1	1	1	69
5	1	-1	0	100
6	0	1	1	141
7	-1	0	0	50
8	-1	0	-1	445
9	-1	1	-1	278
10	0	-1	1	8
11	-1	1	0	96
12	0	1	-1	443
13	1	1	-1	115
14	-1	-1	0	50
15	-1	0	1	168
16	-1	-1	1	98
17	0	0	0	21
18	1	1	0	870
19	0	-1	-1	164
20	0	0	-1	57
21	0	0	1	86
22	1	1	1	209
23	1	0	1	103
24	0	1	0	7
25	-1	-1	-1	1037
26	1	0	0	100
27	1	0	-1	15

El gráfico de Pareto relacionado a estos ensayos experimentales permitió establecer claramente que las concentraciones de proteína, t-butanol y glutaraldehído, ejercen una influencia significativa sobre la actividad específica de los agregados entrecruzados de CAL-B (**Figura 30**).

Por su parte, el análisis de varianza (ANOVA) de los resultados mostrados en la **Tabla 3** a través del programa STATGRAPHICS plus 5.1, permitió determinar el grado de significancia de cada uno de los efectos de las variables sobre la actividad relativa de los agregados entrecruzados de CAL-B. El valor estadístico P para cada uno de los efectos indica niveles de confiabilidad del 95%. La **Tabla 4** resume el análisis de ANOVA.

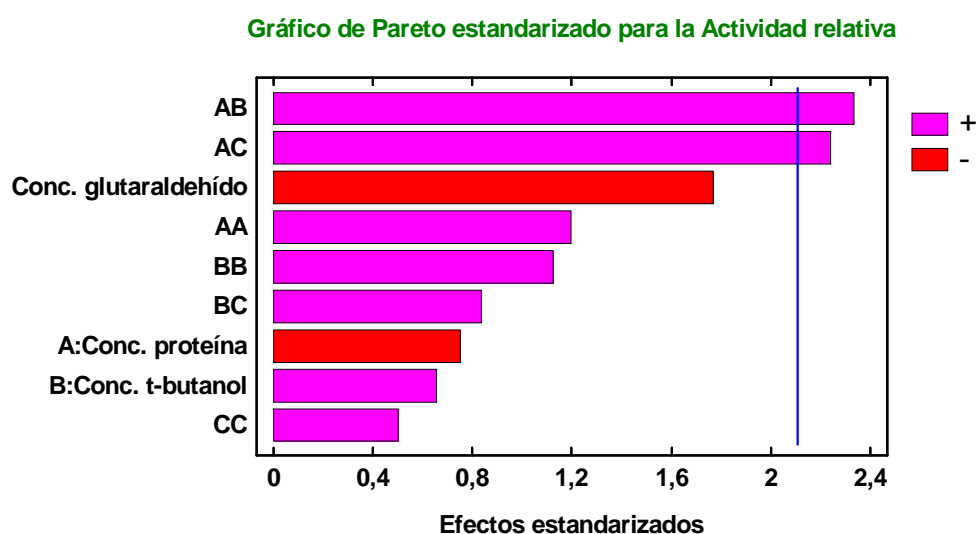


Figura 30. Diagrama de pareto para los factores estudiados en la síntesis de CLEAs de CALB.

Tabla 4. Datos de ANOVA para la optimización del CLEA en ausencia de albumina.

VARIABLE	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	P-VALOR
AB	4,49E+04	1	0,0189
AC	3,22E+04	1	0,0436
Error total	1,70E+05	24	
Total (corr.)	2,47E+05	26	

De la **Tabla 4**, se determinó que las interacciones entre la concentración de proteína con t-butanol (AB) y de proteína con el glutaraldehído (AC) ejercen un

efecto estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$) sobre la síntesis de los CLEAs de CAL-B. Dicho efecto, se vio reflejado en la disminución o aumento de la actividad lipásica (variable de respuesta) de los CLEAs sintetizados bajo las condiciones del diseño experimental.

El gráfico de superficie de respuesta (**Figura 31**) de la matriz de resultados mostrados en la tabla 7 permitió estimar las condiciones para la maximización de la actividad específica de los agregados entrecruzados. Del gráfico se determinó que una concentración de proteína de 3 mg/mL, t-butanol al 50% (v/v) y glutaraldehído 0.5% (p/v), los CLEA de CAL B expresan la máxima actividad catalítica.

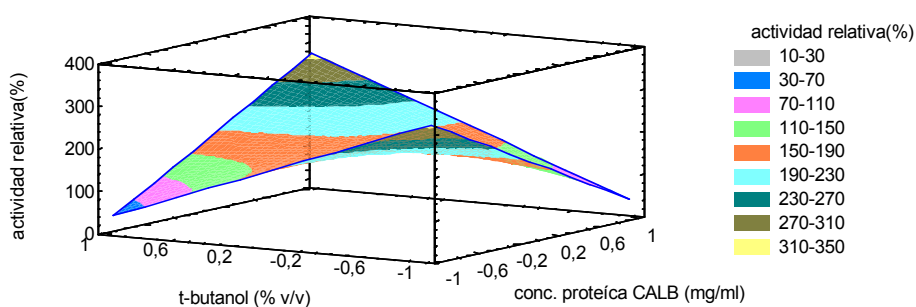


Figura 31. Superficie de respuesta en la optimización de los agregados entrecruzados de CAL-B.

3.5 EVALUACIÓN DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE LOS DERIVADOS DE CAL B EN LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DEL (R/S)-PROPANOLOL

La enantioselectividad es tal vez la propiedad más importante de las lipasas por lo que son ampliamente utilizadas como catalizadores en reacciones para síntesis de ésteres y alcoholes ópticamente puros.

En este estudio, se analizó el efecto de la inmovilización sobre la enantioselectividad de la lipasa de *C. antarctica* B en la reacción de esterificación del (R/S)-propanolol. Este sustrato tipo aminoalcohol es ampliamente usado en la industria farmacéutica como agente antihipertensivo por su efecto bloqueador (antagonista) de los receptores beta-adrenérgicos (Goodman and Gillman, 1985; Barret, 1985; Avila et al., 2005).

Aunque la esterificación catalizada por lipasas en solventes orgánicos provee nuevas rutas de síntesis orgánica, deben resolverse diversos problemas como la pérdida de actividad enzimática en medio orgánico y las dificultades asociadas con la reversibilidad de las reacciones de esterificación ocasionadas por el agente acilante (Reetz, 2002; Klibanov, 2001).

Para llevar a cabo la reacción de esterificación se seleccionó como medio de reacción el tolueno. De forma preliminar se ensayaron como solventes del medio el etanol y el hexano por sus diferencias de hidrofobicidad. Los resultados obtenidos señalaron que la velocidad de conversión en la reacción de esterificación procedía de manera muy lenta y casi nula, lo que dificultaba alcanzar grados de conversión aceptables para una resolución cinética (datos no mostrados). El solvente orgánico juega un papel determinante en la resolución cinética catalizada por lipasas de alcoholes del tipo del propanolol, debido a que este puede generar desventajas como el decrecimiento de la actividad catalítica debido primordialmente a la existencia de sistemas catalíticos heterogéneos (Jurcek et al., 2008). En este sentido, diferentes autores han demostrado que la actividad y enantioselectividad de las lipasas son favorecidas cuando en el medio de reacción hay presencia de solventes orgánicos con una elevada hidrofobicidad (Ghanem, 2007).

Pchełka et al. (2000), Carrea et al. (1995); Klibanov, (2001); Persson et al., (2002) entre otros, han reportado que solventes como el tolueno y el hexano permiten una mayor expresión en las reacciones de transesterificación catalizada por la lipasa de *Candida antarctica B*. Esta mayor actividad se debe principalmente a la elevada hidrofobicidad ($\text{Log } P > 2,5$) que genera un ambiente adecuado para la expresión de la actividad y enantioselectividad de la CAL-B (Wielechowska y Plenkiewicz, 2005).

La selección del agente acilante es otro factor altamente importante, debido a que incide directamente en la reversibilidad de la reacción de esterificación ocasionando una disminución de la actividad catalítica de la CAL-B (Klibanov, A., 2001). Para resolver este problema, el acetato de vinilo ha sido ampliamente utilizado como agente acilante en las reacciones debido al carácter irreversible que le confiere a las reacciones por la formación de acetaldehído vía tautomerización ceto-enol (Koeller y Wong, 2001). Sin embargo, el acetaldehído es conocido por inactivar algunas lipasas, desventaja que ha sido superada a través de estrategias de inmovilización.

Las reacciones enzimáticas suelen ser dependientes de la concentración de sustrato y producto. Por esta razón, se estudió el efecto ocasionado por la concentración de propanolol, relación molar propanolol-acetato de vinilo y carga de biocatalizador en la reacción de acetilación del (R/S)-Propanolol en tolueno.

Posteriormente, se seleccionaron las mejores condiciones bajo las cuales se realizaron las reacciones de esterificación que permitieron la determinación efectiva de la enantioselectividad de los derivados.

3.5.1 Efecto de la concentración de (R/S)-propanolol sobre la reacción de esterificación

El efecto de la concentración de (R/S)-propanolol fue estudiado para el derivado octil-agarosa-CAL-B en el rango de 0,1-0,03 mmol. La **figura 32**, muestra el efecto de la concentración del propanolol sobre la velocidad de conversión en la reacción de esterificación. Se observó que la velocidad de esterificación aumentó con el incremento de la concentración del (R/S)-propanolol sin evidenciarse efecto de saturación alguno en el rango de concentración evaluado. Esto sugiere que la lipasa inmovilizada cataliza la conversión de altas concentraciones de sustrato, lo cual es importante para su aplicación industrial (Bai y col., 2005; Ema, T., 2004).

Es importante resaltar que a pesar del gran tamaño y del aumento de la concentración de moléculas de propanolol en el medio de reacción, no se presentó un efecto marcado de inhibición por sustrato sobre el derivado.

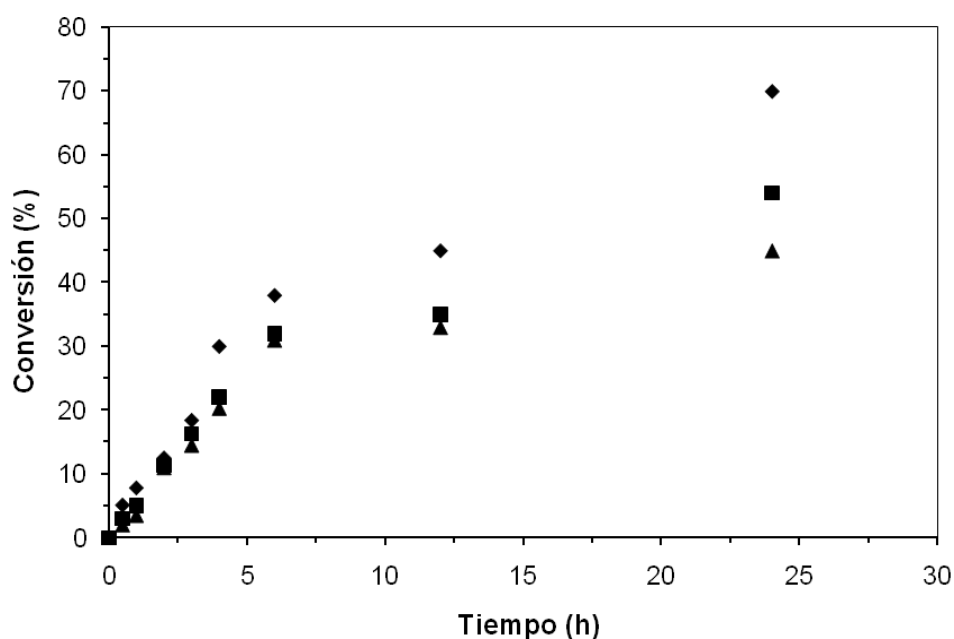


Figura 32. Efecto de la concentración de propanolol sobre la velocidad de reacción. Condiciones de reacción: (▲) 0,03 mmol, (■) 0,05 mmol, y (◆) 0,1 mmol, acetato de vinilo (0,3mmol), derivado (50U) y tolueno (completar un volumen de 3 ml). La reacción no fue seguida a conversiones

mayores debido a que la enantioselectividad de los biocatalizadores se evaluó en el rango del 20% al 30% de conversión, en donde el equilibrio entre el R-propanolol y su ester no se ha alcanzado.

5.2 Efecto de la concentración de acetato de vinilo. Relación molar propanolol-acetato de vinilo.

La concentración del agente acilante y su relación molar con el sustrato, en este caso con el propanolol, es uno de los parámetros más importantes en las esterificaciones enzimáticas (Habulin y Knez, 2009).

Se evaluó el efecto ocasionado por diferentes concentraciones de acetato de vinilo sobre la velocidad de reacción de esterificación del propanolol racémico. De esta manera, se seleccionó la relación molar propanolol-acetato que permite una resolución cinética efectiva.

La concentración de acetato de vinilo fue evaluada en el rango de 0,1-0,3 mmol, manteniendo constante la concentración de propanolol (0,1mmol). La ausencia de agua en la reacción fue de vital importancia para evitar la hidrólisis del acetato de vinilo. Los resultados obtenidos (**figura 33**) mostraron que el aumento en la concentración del agente acilante no ocasionó una inactivación del derivado. Además, la velocidad de conversión aumentó proporcionalmente con el aumento de la concentración del acetato de vinilo.

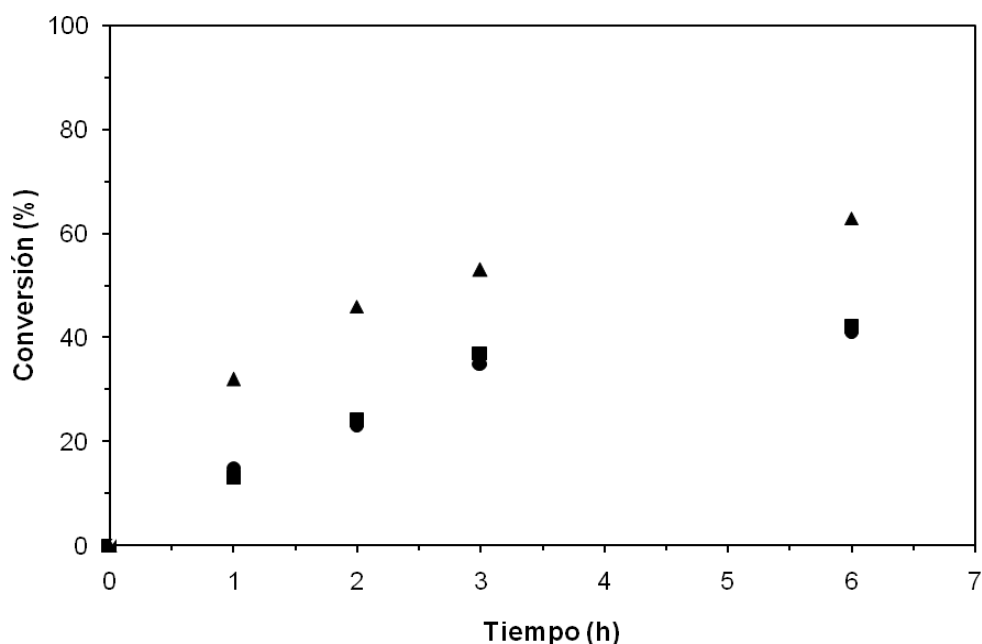


Figura 33. Efecto de la concentración de acetato de vinilo sobre la velocidad de reacción. Condiciones de reacción: (R/S)-Propanolol (0,1mmol); acetato de vinilo: (●) 0,1mmol; (■) 0,2 mmol y (▲) 0,3 mmol; derivado de CAL-B sobre octil-agarosa (50U) y tolueno (hasta completar un volumen total de 3 ml)

Los resultados mostrados en la **figura 33**, señalan que una relación molar 3:1 de acetato de vinilo-propanolol permitió una conversión del 65% en tiempo de 6 horas. Esto sugiere que, a pesar de tener un exceso de moléculas de acetato de vinilo presentes en el medio de reacción, no se produciría un efecto de inhibición por interacción con el sitio activo de la CAL-B (a nivel del grupo OH del residuo de serina de la triada catalítica). Ver **Figura 34**. Esta acetilación genera el intermediario acilado acil-enzima, el cual posteriormente reacciona con el propanolol para generar el correspondiente éster (Van Rantwijk y Sheldon, 2004)

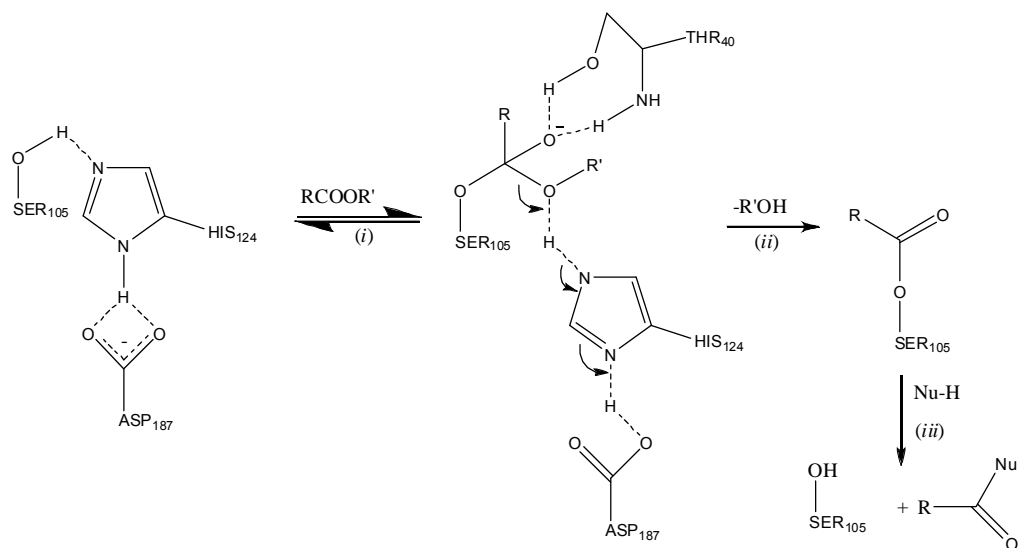


Figura 34. Mecanismo de reacción de la catálisis de CAL-B. Enlaces de Hidrógeno (- - -).

3.5.3 Efecto de la carga de biocatalizador sobre la velocidad de reacción

La carga enzimática es un factor crucial para incrementar la eficiencia de una reacción catalizada por enzimas (Bai y col., 2005). En este estudio, se evaluó el efecto de la carga del derivado, es decir, de la cantidad de CAL-B inmovilizado sobre octil-agarosa (en un rango de 10-50 U en un volumen de 3 ml de reacción) agregada a la mezcla de reacción durante la esterificación del propanolol racémico. En la **figura 35**, se muestran los resultados obtenidos.

Los resultados indican que la velocidad de esterificación se incrementó con el aumento de la carga de catalizador, y la conversión de propanolol también fue incrementada de un 20 a un 45%. La conversión máxima del 85% se obtuvo cuando se adicionó a la reacción 50U de catalizador. Además, se obtuvo una relación lineal cuando se graficaron las velocidades iniciales en función de la

carga del biocatalizador, lo que sugiere que la reacción es cinéticamente controlada (Habulin et al., 2009).

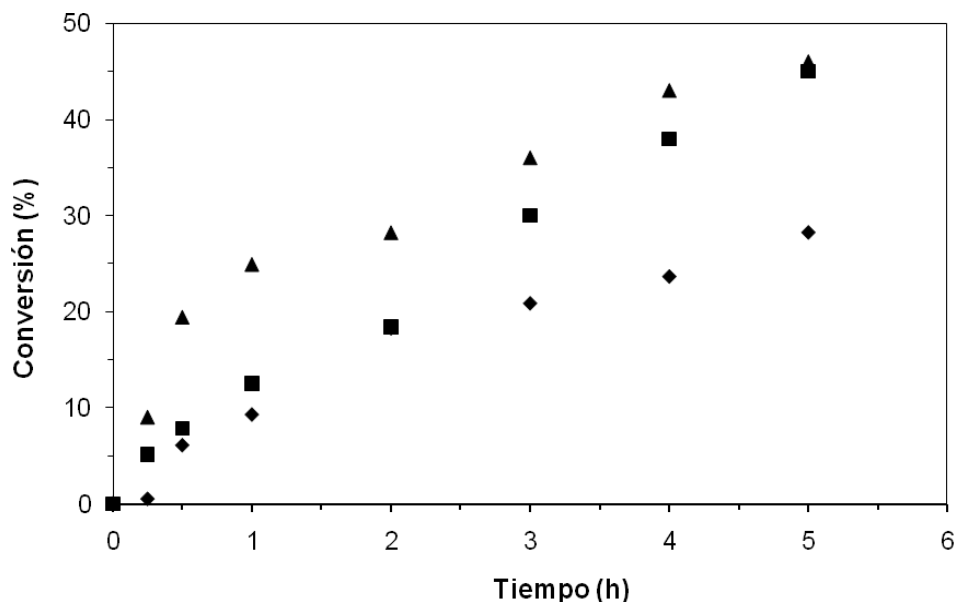


Figura 35. Efecto de la carga del biocatalizador sobre la velocidad de reacción. Condiciones de reacción: (R/S)-Propanolol (0,1mmol); acetato de vinilo (0,3mmol); derivado de CAL-B sobre octil-agarosa: (◆) 10 U de biocatalizador, (■): 30 U de biocatalizador, (▲): 50 U de biocatalizador; y Tolueno (hasta completar un volumen de 3 ml)

Con los resultados previamente obtenidos, se seleccionaron las siguientes condiciones estándar: (R/S)-Propanolol (0,1mmol), acetato de vinilo (0,3mmol), derivado (50U) y tolueno (hasta completar un volumen de 3 ml). Bajo estas condiciones se obtuvieron conversiones de la esterificación del propanolol racémico entre un 20 y un 30% en un tiempo de reacción enzimática de 3 h aproximadamente.

La **figura 36**, muestra la cinética de reacción de esterificación del (R/S)-Propanolol catalizada por CLEAs y por los derivados de CAL-B sobre los soportes de Eupergit

C parcialmente modificados. La enantioselectividad de cada derivado de CAL-B (CLEA-CAL-B, EC-CAL-B, EC-IDA-CAL B, EC-EDA-CAL-B, EC-IDA-Cu-CAL-B y Octil-CAL-B) fue evaluada en la reacción de esterificación del propanolol racémico en un rango comprendido entre el 20 y 30 % de conversión y analizada por HPLC-quiral.

Los resultados obtenidos (**tabla 5**) mostraron que los derivados de CAL-B exhibieron relaciones enantioméricas (E) diferentes, lo cual concuerda con reportes previos que señalan que una misma lipasa puede exhibir enantioselectividades muy diferentes al ser inmovilizada sobre distintos soportes (Palomo et al., 2004; Palomo et al., 2005; Palomo et. al., 2002).

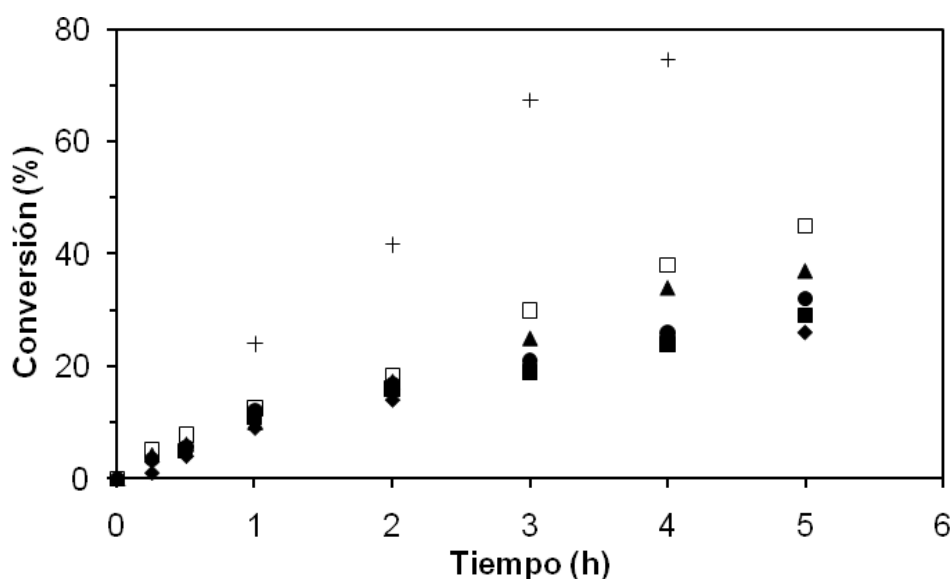


Figura 36. Cinética de la reacción de esterificación del (R/S)-Propanolol catalizada por derivados de CAL B. condiciones de reacción: (R/S)-propranolol (0,1mmol), acetato de vinilo (0,3mmol), derivado (100mg) y tolueno (hasta completar un volumen de 3 ml). En esta reacción fueron utilizados los siguientes derivados: (+): CLEA-CAL-B, (□): Octil-CAL-B, (■): EC-CAL-B, (▲): EC-Amino-CAL-B, (◆) EC-IDA-CAL-B, and (●):EC-IDA-Cu-CAL-B.

Tabla 5. Excesos enantioméricos del producto (ee_p) y relaciones enantioméricas (E) obtenidas de los derivados de CAL-B en la reacción de acetilación de (R/S)-Propanolol.

Derivado	enantioselectividad	Conversión (%)	t (h)	Ee_p (%)	E
Octil-agarosa-CAL-B	R	27,5	3	37	23
EC-CAL-B	R	30	5	96	57
EC-EDA-CAL-B	R	24,3	3	92	25
EC-IDA-CAL-B	R	30	6	75	18
EC-Cu-CAL-B	R	23	4	49	11
CLEA-CAL-B	R	24	1	89	24

Conversión y ee_s (%) fue estimado por HPLC. Condiciones de reacción: propranolol (0,1mmol), acetato de vinilo (0,3mmol), derivado (100mg) y tolueno (hasta completar un volumen total de 3 ml).

Como se observa en la **tabla 5**, los CLEAs de CAL-B y el derivado octil-CAL-B mostraron elevados valores de actividad y conversión en la reacción de acetilación del propanolol racémico. Sin embargo, esta alta actividad contrastó con una relación enantiomérica (E=23 y E=24, respectivamente) aceptable comparada con las preparaciones de CAL B sobre el soporte de Eupergit C (E=57).

Esta clara diferencia entre actividad y enantioselectividad mostrada por el derivado Octil-CAL-B se debió muy posiblemente a la notable hidrofobicidad del soporte, que favoreció el desplazamiento total del *lid* de la CAL B permitiendo el acceso de

más moléculas de propanolol al sitio activo de la enzima (Schrag et al., 1997; Gutierrez et al., 2007; Rotticci et al., 2001).

Para el caso de los agregados entrecruzados de CAL-B (CLEA-CALB), la elevada actividad mostrada en la esterificación del propanolol, se debe muy posiblemente a la disminución de limitaciones difusionales internas y externas por la ausencia de un soporte como tal. Sin embargo, esto depende en gran medida de la morfología del CLEA obtenido (Cao et al., 2003; Blanco, 2005; Wilson et al., 2009). Además, en este tipo de estrategia de insolubilización de enzimas por entrecruzamiento de proteína pura, no es necesario la purificación del extracto enzimático con lo que se evita pérdidas de actividad, que si pueden presentarse para el caso de las preparaciones de lipasas inmovilizadas en el soporte Eupergit C puro y modificado (Sheldon et al., 2004, Cao et al., 2003).

A pesar de la actividad mostrada por el CLEA-CAL-B, la enantioselectividad que exhibe es apenas aceptable ($E=24$), si se compara con el derivado EC-CAL-B ($E=57$). Esto se debe posiblemente a que los CLEAs no confieren una rigidez suficiente para evitar la distorsión del sitio activo de la enzima en el momento de la catálisis generando tal vez una conformación que no impide estéricamente al enantiómero R-propanolol.

Los derivados Eupergit C-IDA-CAL-B y Eupergit C-IDA-Cu-CAL-B mostraron una relación enantiomérica baja ($E= 18$ y $E= 11$, respectivamente). Esto sugiere que los grupos carboxilo del soporte IDA y los quelatos del IDA-Cu generaron una orientación desfavorable de las moléculas de CAL-B sobre el soporte, ocasionando de esta manera la pérdida de la enantioselectividad frente al propanolol racémico (Ema, 2004).

El derivado Eupergit C-CAL-B exhibió la mayor enantioselectividad en comparación con los demás derivados de CAL-B en la resolución enantiomérica del propanolol. Esto puede explicarse, en términos de la rigidez conferida por los enlaces covalentes entre los grupos epóxidos del soporte y los residuos lisínicos de la superficie de la lipasa (81 residuos de lisina por molécula de CAL-B) además de las posibles interacciones hidrofóbicas de otros aminoácidos con la matriz polimérica del Eupergit C. Esta interacción pudo haber generado una orientación enzima-sustrato muy favorable que permitió una adecuada entrada al sitio activo del enantiómero R, que es esterificado a una constante de velocidad mayor que el enantiómero S (Mateo et al., 2000).

La **figura 37** muestra el cromatograma obtenido para una conversión del 30% en la reacción de esterificación del propanolol catalizada por el derivado EC-CAL B.

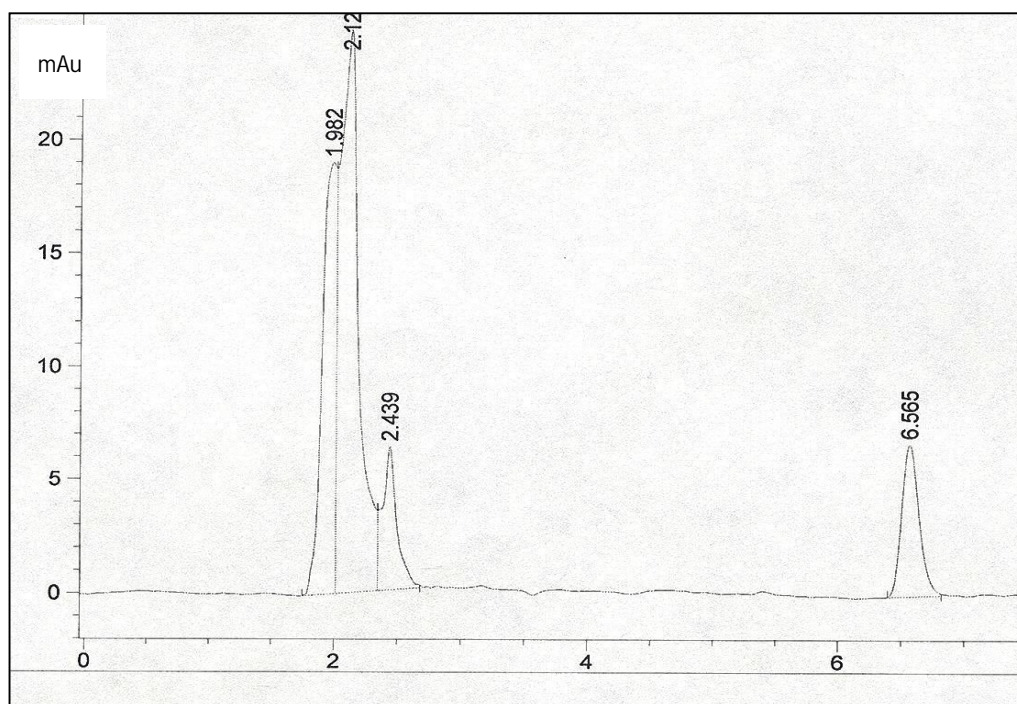


Figura 37. Perfiles de elución en la reacción de esterificación del (R/S)-Propranolol para una conversión del 30% catalizada por el derivado EC-CAL-B. El orden de elución fue: (R)-Propranolol (1,982 min); (S)-Propranolol (2,123 min); R-butiril-propranolol (2,439); tolueno (6,565).

3.6 EVALUACIÓN DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE LOS DERIVADOS DE CAL B EN LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DEL (R/S)-ATENOLOL

El atenolol es un compuesto que al igual que el propanolol pertenece al grupo de aminoalcoholes que actúa como antagonista de los receptores beta-adrenérgicos (bloqueador β -adrenérgico), razón por la cual es utilizado en la industria farmacéutica como agente anti-hipertensivo.

De manera similar al propanolol, se evaluó los efectos causados por la concentración de sustrato, concentración de acetato de vinilo como agente acilante y carga del biocatalizador en la reacción de esterificación del (R/S)-Atenolol, en tolueno como disolvente orgánico.

Posteriormente, se seleccionaron las mejores condiciones bajo las cuales se realizaron las reacciones de esterificación del (R/S)-Propanolol que permitió la determinación efectiva de la enantioselectividad de los derivados de CAL-B.

3.6.1 Efecto de la concentración de (R/S)-atenolol sobre la reacción de esterificación

El atenolol es un compuesto prácticamente insoluble en agua y moderadamente soluble en solventes polares (solubilidad en etanol de 3,4 mg/ml). Esta baja solubilidad limitó el rango de estudio de la concentración del mismo en la reacción de esterificación.

El efecto de la concentración de (R/S)-Atenolol fue estudiado para el derivado Octil-agarosa-CAL-B en el rango de 0,05-0,01 mmol. Se observó que la velocidad

de esterificación aumentó con el incremento de la concentración del (R/S)-atenolol sin evidenciarse efecto de saturación alguno en el rango de concentración evaluado (**figura 38**). Además, es evidente que para las condiciones de estudio, las velocidades de reacción no disminuyeron, lo que estaría indicando una alta afinidad de la enzima por el atenolol.

La **figura 38**, muestra el efecto de la concentración del atenolol sobre la velocidad de conversión en la reacción de esterificación.

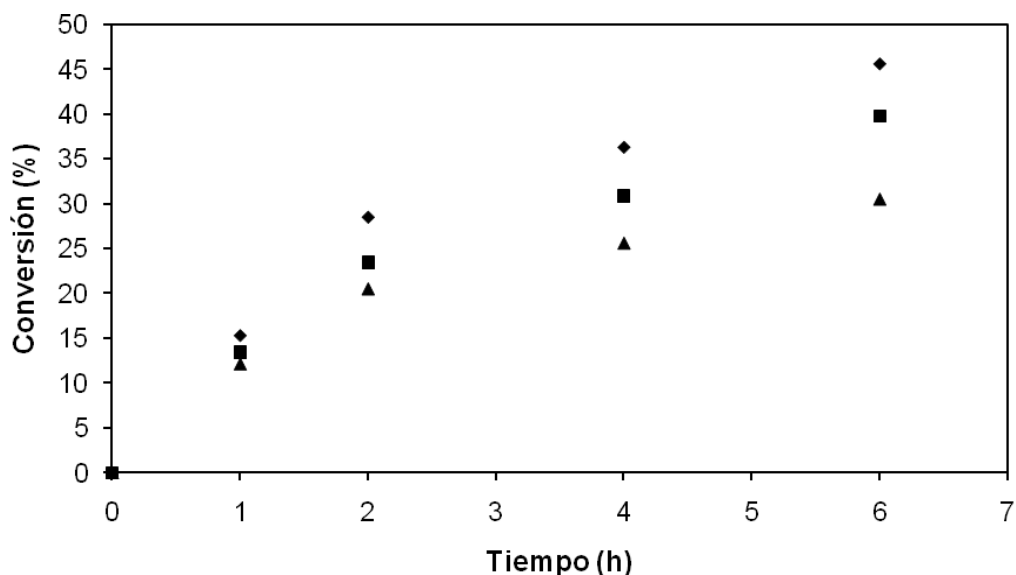


Figura 38. Efecto de la concentración de (R/S)-Atenolol sobre la velocidad de reacción. Condiciones de reacción: (▲) 0,01 mmol, (■) 0,03 mmol, y (◆) 0,05 mmol, acetato de vinilo (0,1mmol), derivado (100mg) y tolueno (hasta completar un volumen de 3 ml).

3.6.2 Efecto de la concentración de acetato de vinilo. Relación molar Atenolol-acetato de vinilo.

Como se había mencionado anteriormente, la concentración del agente acilante es uno de los factores más importantes en reacciones de esterificación catalizadas por lipasas. Su importancia radica en que al ser el promotor de la formación del intermediario acil-enzima, su concentración es determinante en la velocidad de conversión de la reacción de esterificación (Bai et al., 2005; Habulin y Knez, 2009).

El efecto de la concentración del acetato de vinilo fue evaluado en el rango de 0,05-0,15 mmol (**figura 39**) manteniendo constante la concentración de atenolol (0,05mmol). Los resultados obtenidos mostraron que cuando se aumentó la concentración del agente acilante a 0,1 mmol, la velocidad de la reacción aumentó reflejándose en una mayor conversión de sustrato a producto. Sin embargo, un aumento de la concentración de acetato a 0,15 mmol, conllevó a una disminución en la velocidad de conversión debido muy probablemente a efectos estéricos ocasionados por la formación de una gran cantidad de moléculas del intermediario acil-enzima que impiden el acceso a un mayor número de moléculas del atenolol (Lozano et al., 2003; Habulin y Knez, 2009).

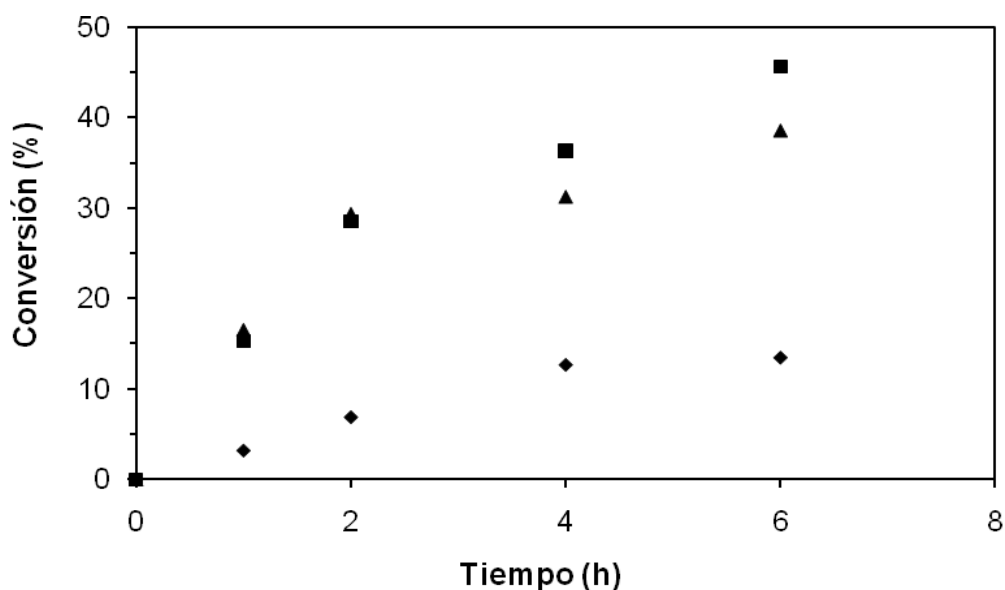


Figura 39. Efecto de la concentración de acetato de vinilo sobre la velocidad de reacción. Condiciones de reacción: (R/S)-Atenolol (0,05mmol); acetato de vinilo: (◆) 0,05mmol; (■) 0,1 mmol y (▲) 0,15 mmol; derivado de CAL-B sobre octil-agarosa (100mg) y tolueno (hasta completar un volumen total de 3 ml).

3.6.3 Efecto de la carga de biocatalizador sobre la velocidad de reacción

La cantidad de biocatalizador en la reacción de esterificación del (R/S)-Atenolol fue evaluada en un rango de 30-100 mg. Se determinó que para el rango de estudio la velocidad de conversión del atenolol aumentó proporcionalmente con el incremento en la cantidad de biocatalizador.

Como se puede observar en la **figura 40**, se obtuvo una conversión máxima del 50% en la esterificación del atenolol, al utilizar una cantidad de 100 mg de biocatalizador. Sin embargo, el uso de cantidades mayores podría generar limitaciones en la velocidad de conversión; producto de fenómenos difusionales externos e internos que limitan el curso de la reacción, debido a la alteración de la expresión catalítica del derivado de CAL-B (Erbeldinger y Mesiano, 2000).

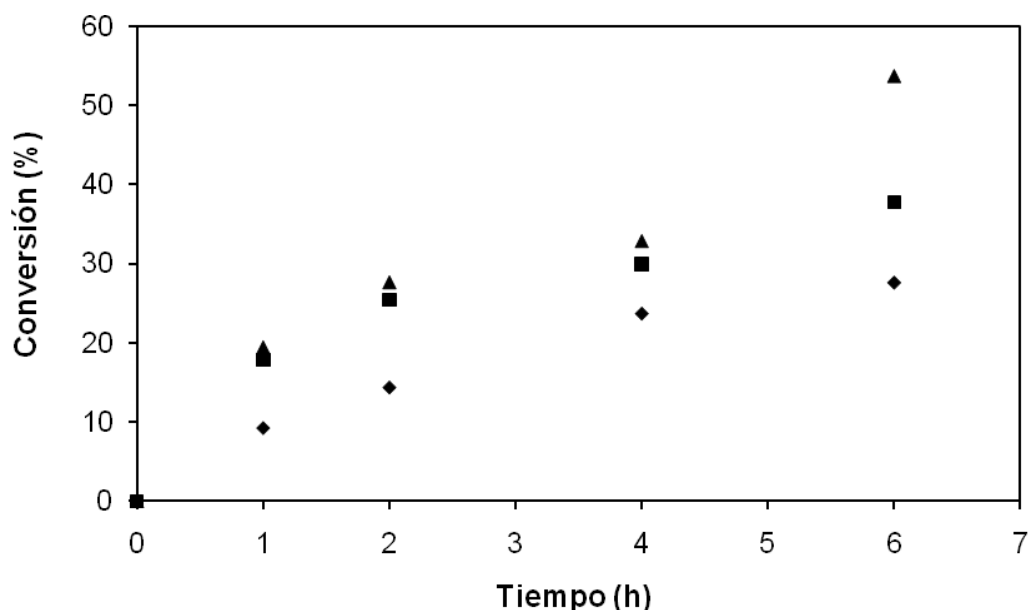


Figura 40. Efecto de la carga del biocatalizador sobre la velocidad de reacción. Condiciones de reacción: (R/S)-Atenolol (0,05mmol); acetato de vinilo (0,1mmol); derivado de CAL-B sobre octil-agarosa: (◆) 30 mg of biocatalizador, (■): 50 mg of biocatalizador, (▲): 100 mg de biocatalizador; y Tolueno (hasta completar un volumen de 3 ml).

Los resultados obtenidos mostraron que el estudio de la enantioselectividad de cada uno de los derivados puede ser llevado a cabo utilizando una cantidad de 50 mg de biocatalizador. Esta carga de biocatalizador permite una conversión entre el 20 y 30% en tan solo 2 horas.

Con los resultados previamente obtenidos, se seleccionaron las siguientes condiciones estándar para la evaluación de la enantioselectividad de los derivados de CAL-B sobre los soportes parcialmente modificados: (R/S)-Atenolol (0,05mmol), acetato de vinilo (0,1mmol), derivado (50 mg) y tolueno (hasta completar un volumen de 3 ml).

La **figura 41**, muestra la cinética de la reacción de esterificación del (R/S)-Atenolol catalizada por los derivados de CAL-B sobre los soportes de Eupergit C parcialmente modificados.

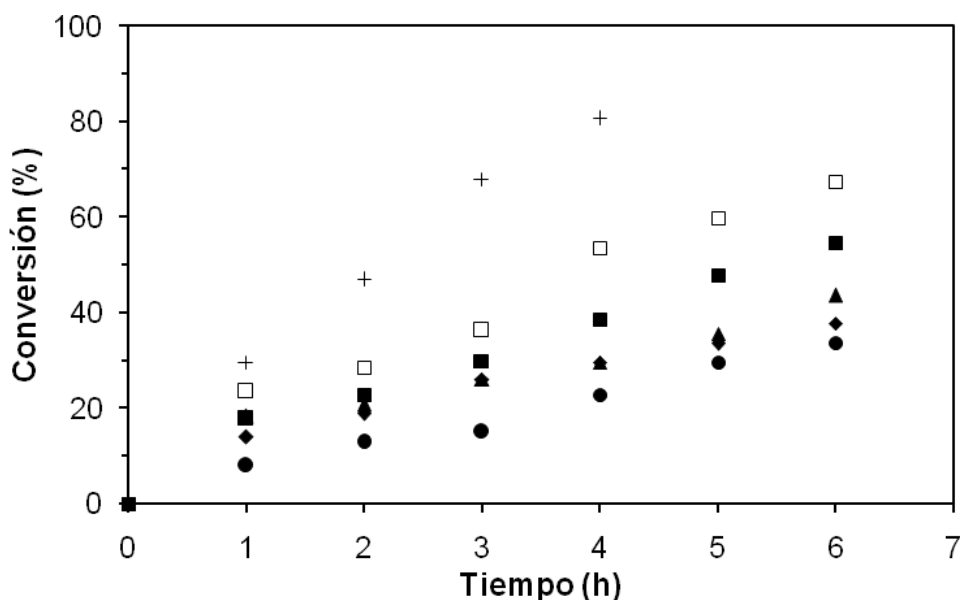


Figura 41. Cinética de la reacción de esterificación del (R/S)-Atenolol catalizada por derivados de CAL-B. condiciones de reacción: (R/S)-Atenolol (0,05mmol), acetato de vinilo (0,1mmol), derivado (50mg) y tolueno (hasta completar un volumen de 3 ml). En esta reacción fueron utilizados los siguientes derivados: (□): Octil-CAL-B, (■): EC-CAL-B, (▲): EC-Amino-CAL-B, (◆) EC-IDA-CAL-B, (●):EC-IDA-Cu-CAL-B y (+): CLEA-CAL-B.

Como se puede observar en la **figura 41**, el CLEA de CALB mostró la actividad más elevada en la esterificación del (R/S)-Atenolol, logrando conversiones del 80% en un periodo de tiempo de tan solo 4 horas.

Por otra parte, de manera similar a los resultados obtenidos con el propanolol, el derivado Octil-CALB exhibió nuevamente una mayor actividad frente a los demás derivados en la esterificación en este caso del atenolol racémico, alcanzando una conversión alrededor del 70% en un periodo inferior a 7 horas. Esta alta actividad del derivado es posible debido al efecto de hiperactivación que sufre la enzima al

ser inmovilizada sobre un soporte altamente hidrofóbico como el octil-agarosa, que al parecer ocasiona el completo desplazamiento del *lid* exponiendo de esta manera el sitio activo de la enzima al medio de reacción (Sabuquillo et al., 2008; Mateo et al., 2006).

Los derivados EC-EDA-CAL-B, EC-IDA-CAL-B, EC-IDA-Cu-CAL-B, mostraron diferentes actividades en la esterificación del atenolol, sobresaliendo el derivado EC-CAL-B que a pesar que mostró una actividad inferior en comparación con el derivado octil-CAL-B frente al atenolol, catalizó porcentajes de conversión del 50% en un intervalo de tiempo de 6 horas. En contraste, el derivado EC-IDA-Cu mostró la actividad más baja, demostrando que la orientación de la enzima sobre este soporte es desfavorable para la catálisis de la CAL-B.

La enantioselectividad de cada uno de los derivados de CAL-B (EC-CAL-B, EC-IDA-CAL-B, EC-EDA-CAL-B, EC-IDA-Cu-CAL-B, Octil-CAL-B y CLEA-CAL-B) fue evaluada en la reacción de esterificación del (R/S)-Atenolol en un rango comprendido entre el 20 y 30 % de conversión aproximadamente, y analizada por HPLC-quiral.

Los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis de partida, demostrando que a través de la inmovilización de la CAL-B sobre soportes activados con diferentes grupos funcionales, se logró conferir probablemente distintas orientaciones y rigidez a la enzima sobre los soportes, logrando con ello la modulación de las propiedades catalíticas de la lipasa de *Candida antártica B*, y en especial su enantioselectividad. La **tabla 6**, resume la enantiopreferencia y relaciones enantioméricas exhibidas por los derivados en la resolución cinética del atenolol racémico.

Tabla 6. Excesos enantioméricos del producto (ee_p) y relaciones enantioméricas (E) obtenidas de los derivados de CAL B en la reacción de acetilación de (R/S)-Atenolol

Derivado	Enantioselectividad	Conversión (%)	T (h)	ee_s (%)	E
Octil-agarosa-CAL-B	R	28,5	2	34	21
EC-CAL-B	R	22,5	2	96	65
EC-EDA-CAL-B	R	26,1	3	85	29
EC-IDA-CAL-B	R	29,6	4	74	19
EC-Cu-CAL-B	R	29,6	5	24	13
CLEA-CAL-B	R	29	1	92	26

Conversión y ee_s (%) 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).

Los resultados mostrados en la **tabla 6** muestran la elevada enantioselectividad (E=65) exhibida por el derivado EC-CAL B en la resolución cinética del (R/S)-Atenolol, obteniendo para una conversión del 22%, un exceso enantiomérico de S-atenolol del 96%. Estos resultados sugieren que la inmovilización de la lipasa sobre el soporte Eupergit producto de la interacción entre los grupos epóxidos con los residuos lisínicos de la CAL-B origina una mayor rigidificación o deformación del sitio activo de la enzima favorable para el acceso del enantiómero R. En contraste, el acceso del enantiómero S al sitio acil enlazante del bolsillo hidrofóbico puede posiblemente ser impedido por efectos estéricos, producto de la posición espacial que origina el centro quiral del atenolol (Léonard-Nevers et al., 2009).

Los derivados Octil-CAL B y EC-EDA-CALB, mostraron relaciones enantioméricas aceptables ($E=21$ y $E=29$, respectivamente). Para el caso del derivado Octil-CAL-B a pesar de ser el derivado más activo, la enantioselectividad que muestra es inferior en comparación con los derivados EC-EDA-CAL-B y EC-CAL-B. Esto sugiere que la interacción hidrofóbica que se da entre el soporte Octil-agarosa con la enzima no es lo suficientemente fuerte para evitar un cambio conformacional en el sitio activo de la enzima con la entrada del atenolol. 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).

Para el caso del CLEA-CAL-B, la alta actividad mostrada frente al atenolol contrastó con una enantioselectividad moderada ($E=28$) en comparación con el derivado de EC-CALB ($E=65$) quien expresó la máxima enantioselectividad. Esto se debe muy posiblemente al elevado nivel de entrecruzamiento entre los residuos lisínicos de la CALB y el glutaraldehído, que están generando una conformación desfavorable de la enzima. Se han reportado resultados por otros autores (Wilson et al., 2009; Majumder et al., 2008).

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.

Para el caso particular de la molécula de atenolol, su estructura solo contiene un anillo bencénico y una cadena carbonada en donde se encuentra el centro quiral. Posiblemente la existencia de esta cadena, es la que permite una interacción favorable del enantiómero R con el intermediario acil-enzima formado en la triada

catalítica de la lipasa. Por el contrario, la posición espacial que adquiere el enantiómero S-Atenolol le impide el acceso al sitio activo (Berglund et al., 1998).

Por su parte, la estructura de la molécula del propanolol contiene dos anillos de benceno que incrementan el tamaño de molécula por lo que el acceso al sitio activo de la enzima es más difícil. Investigaciones previas afianzan esta idea en el sentido que la incorporación de un anillo bencénico en el sustrato conlleva a un decrecimiento en la enantioselectividad de la acetilación (Wielechowska y Pleniewicz, 2005).

4. CONCLUSIONES

- Se desarrollaron biocatalizadores de lipasa de *Candida antarctica B* inmovilizados sobre soportes epóxidos parcialmente modificados, exhibiendo diferentes enantioselectividades en la resolución cinética del propanolol y atenolol racémico, sugiriendo que fue posible la modulación de sus propiedades catalíticas.
- Se determinaron las condiciones de reacción más favorables para la esterificación del (R/S)-propanolol (0,1 mmol de propanolol, 0,3mmol de acetato de vinilo y 100 mg de derivado de CAL-B) y del (R/S)-atenolol (0,05 mmol de atenolol, 0,1mmol de acetato de vinilo y 50 mg de derivado de CAL-B) catalizadas por preparaciones inmovilizadas de CAL-B.
- Se identificó que los agregados entrecruzados de lipasa de CAL-B fueron más activos que los derivados EC-CAL-B, EC-EDA-CAL-B, EC-IDA-CAL-B, EC-IDA-Cu-CAL-B, en la reacción de esterificación del atenolol y del propanolol, bajo las condiciones óptimas de síntesis de los CLEAs (concentración de proteína CAL-B (3 mg/ml), t-butanol al 50% (v/v) y glutaraldehído 0.5% (p/v)).
- Se determinó que la inmovilización covalente de la CAL B sobre soportes de Eupegit C aumenta la enantioselectividad de la enzima en la resolución cinética de los sustratos propanolol y atenolol, en comparación con la inmovilización por adsorción física y por entrecruzamiento de proteína pura.
- Se demostró que las reacciones catalizadas por el derivado mostraron los mejores valores de enantioselectividad (E=57) en comparación con los derivados EC-EDA-CAL B (E=25), EC-IDA-CAL B (E=18), EC-IDA-Cu-CAL B

(E=11) y Octil-CAL B (E=23) y CLEA-CALB (E=24) en la reacción de esterificación del propanolol racémico.

- Se determinó que las reacciones de esterificación catalizadas por el derivado de EC-CAL-B exhibieron la mayor relación enantiomérica (E=65) en la resolución cinética del (R/S)-Atenolol, obteniéndose un exceso enantiomérico del S-Atenolol del 96% en un periodo de tiempo de 2 horas.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, W., Gorczynski, R. (1982). Ultra-short-acting beta-adrenergic receptor blocking agents. 2. (Aryloxy) propanolamines containing esters on the aryl function. *J Med Chem.* 12, 1408-1412.
- Ario, B., Bakar, A., Pleiss, J. (2004). Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: the role of organic solvent. *J. Mol Model.* 10, 358–366.
- Avila, R., Ruiz, R., Amaro-Gonzales, D., Díaz, O., González, J. and Nuñez, A. (2005) Increased racemate resolution of propranolol esters by lipase immobilized catalysis. *Latin Am. Appl. Res.* 35, 307-311.
- Bai, S., Guo, Z., Liu, W. and Sun, Y. (2005) Resolution of (±)-menthol by immobilized *Candida rugosa* lipase on superparamagnetic nanoparticles. *Food Chem.* 96, 1-7.
- Barclaysde, Z. W. (1991). Research report. *Perform. Chem.* 6, 22-28.
- Basri, M.; Ampon, K.; Yunus, W.M.Z.; Razak, C.N.A.; Salleh, A.B. (1995). Enzymatic synthesis of fatty esters by hydrophobic lipase derivatives immobilized on organic polymer beads. *J. Am .Oil Chem. Soc.* 72, 407-411.
- Barret, A.M. (1985) Cardio beta-adrenoceptor blockade: the quest for selectivity. *JF Pharm.* 2, 95-108.

- Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisén, P., Fernández-Lafuente, R., Huguet, J. and Guisan, J.M. (1998) A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 486-493.
- Bauer-Arnaz, K., Napolitano, E., Roberts, D., Montali, J., Hughes, B., Schmidt, D. (1998). Salt-induced immobilization of small affinity ligands on an epoxide activated affinity support. *Journal of Chromatography A.* 803, 73–82.
- Berglund, P., Holmquist, M. and Hult, K. (1998) Reversed enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase supports different modes of binding enantiomers of a chiral acyl donor. *J. Mol. Catal. B: Enz.* 5, 283–287.
- Bes, T., Gomez–Moreno, C., Guisan, JM., Fernandez–Lafuente, R. (1995). Selective enzymatic oxidations: stabilization by multipoint covalent attachment of ferredoxin NAD-reductase: an interesting cofactor recycling enzyme. *J. Mol. Catal.* 98, 161–169.
- Bevinakatti, H.S., Banerji, A.A. (1991). Practical chemoenzymic synthesis of both enantiomers of propranolol. *J. Org. Chem.* 56, 5372–5375.
- Blanco, R., Calvete, J., Guisan, JM. (1988). Immobilization-stabilization of enzymes. Variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multi-point covalent attachment. *Enzyme Microb Technol.* 11, 353–359.
- Bolivar, J., Mateo, C., Godoy, C., Pessela, B., Rodrigues, D., Giordano, R., Fernández-Lafuente, R., Guisan, J.M. (2009). The Co-operative Effect of

Physical and Covalent Protein Adsorption on Heterofunctional Supports. *Process Biochem.* 44, 757-763.

- Bosley, S.H., Clayton, J.C. (1994). Blueprint for a lipase support: use of hydrophobic controlled-pore glasses as model systems. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 934-938.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72, 248-254.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E. and Dodson, G. (1990). A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. *Nature.* 343, 767-770.
- Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Derewenda, U., Dodson, G. and Lawson, D.M. (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature.* 351, 491-494.
- Cao, L., Van Langen, L., Sheldon, R. (2004). Immobilised enzymes: carrier bound or carrier free? *Curr opin Biotechnol.* 4, 387-394.
- Cao L. (2005). Immobilised enzymes: science or art?. *Curr opin Biotechnol.* 9, 217-26.
- Carrea, G., Ottolina, G., Riva, S. (1995). Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *TIBTECH.* 13, 63-70.

- Carrea, G., Riva, S. (2000). Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. *Angewandte Chemie International Edition*. 39, 2226-2254.
- Chen, C.S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G. and Sih, C. (1982). General Aspects and Optimization of Enantioselective Biocatalysis. in *Organic Solvents: The Use of Lipases*. *Journal of the American Chemical Society*. 104, 7294–7299.
- Córdova, A.; Janda, K. D. (2001). A Highly Chemo and Stereoselective Synthesis of B-Keto Esters via a Polymer-Supported Lipase Catalyzed Transesterification. *Journal of Organic Chemistry*. 66, 1906–1909.
- Derewenda, U., Brzozowski, A., Lawson, D. and Derewenda, Z.S. (1992a). Catalysis at the interface: the anatomy of conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry*. 31, 1532-1541.
- Desmukth, SS., Duta, M., Choudohury, S., Shanker, V. (1993). Preparation and properties of glucose isomerase immobilized on indon 48-R. *Appl Biochem Biotechnol*. 42, 95–104.
- Desnuelle, P.: *The Enzymes*. 3rd Ed. Vol. 7, P. Boyer, Academic Press, NY, 575, 1972.
- Dordick, J. Parida, S. (1991). Substrate Structure and Solvent Hydrophobicity Control Lipase Catalysis in Organic Media. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 2253-2259.

- Ducret, A., Trani, M. and Lortie, R. (1998). Lipase-catalysed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity. *Enzyme and Microbial Technology*. 22, 212–216.
- Eber, O., Buchinger, W., Lindner, V., Lind, P., Rath, M., Klima, G., Langsteger, V., Költringer, K. (1990). Additional Features of Beta-Blockers. *Clinical Endocrinology*. 32, 363-370.
- Ema, T. (2004) Rational strategies for highly enantioselective lipase-catalyzed kinetic resolutions of very bulky chiral compounds: substrate design and high-temperature biocatalysis. *Tetrahedron: Asymmetry*. 15, 2765–2770.
- Ema, T., Jittania, M., Sakaia, T. and Utaka, M. (1998). Lipase-catalyzed kinetic resolution of large secondary alcohols having tetraphenylporphyrin. *Tetrahedron Letters*. 39, 6311-6314.
- Erbedinger, M., Mesiano, A. Russell, J. (2000). Enzymatic Catalysis of Formation of Z-Aspartame in Ionic Liquid - An Alternative to Enzymatic Catalysis in Organic Solvents. *Biotechnol. Prog.* 16, 1129–1131.
- Ericsson, J., Kasrayan, A., Johansson, P., Bergfors, T., Mowbray, L. (2008). X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation. *Journal of Molecular Biology*. 376, 109-119.
- Fernández-Lafuente, R. Armisen, P., Sabuquillo, P., Fernández-Lorente, G. and Guisán, J.M. (1998) Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and Physics of Lipids*. 93, 185-197.

- Fernandez–Lafuente, R., Rodriguez, V., Guisan, JM. (1998). The coimmobilization of D-amino acid oxidase and catalase enables the quantitative transformation of D-amino acids (D-phenylalanine) into keto acids (phenyl pyruvic acid). *Enzyme Microb. Technol.* 23, 28–33.
- Gatterman, L. (1961). *Practices of Organic Chemistry*, 2da Edition. 159-162.
- Ghanem, Ashraf. (2007). Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron.* 63, 1721–1754.
- Ghosh, D.; Wawrzak, Z.; Pletnev, V.Z., Li, N.; Kaiser, R., Pangborn, W., Jornvall, H.; Erman, M.; Duax, .L. (1995). The effect of sequence evolution on protein structural divergence. *Structure.* 3, 279-288.
- Gianfreda, L., Scarfi, MR. (1991). Enzyme stabilization: state of the art. *Molecular Cell Biochem.* 109, 97–128.
- González-Sabin, J.; Gotor, V.; Rebolledo, F. (2004). CAL-B-catalyzed resolution of some pharmacologically interesting-substituted isopropylamines. *Tetrahedron: Asymmetry.* 13, 1315–1320.
- Goodman, L., Gillman, A. *The Pharmacological basis of therapeutics*, Fourth edition, MacMillan Company, New York. (1985).
- Gotor-Fernández, V., Brieva, R., Gotor, V. (2006). Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 40, 111–120.

- Grochulski, P., Li, Y., Schragm, J.D., Boutthilier, F., Smith, P., Harrinson, D., Rubin, B. and Cyler, M. (1993). Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* 268, 12843–12847.
- Guisan, JM. Bastida, A., Cuesta, C., Fernandez–Lafuente, R., Rosell, CM. (1991). Immobilization-stabilization of chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde agarose gels. *Biotechnol Bioeng.* 39, 75– 84.
- Guisan, JM. Alvaro, G., Fernandez–Lafuente, R. (1993). Stabilization of a heterodimeric enzyme by multi-point covalent immobilization: penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. *Biotechnol Bioeng.* 42, 455– 464.
- Guisan, J.M. Immobilization of enzymes and cells. *Methods and Biotechnology*, second edition, (2006).
- Gutierrez-Ayesta, C., Carelli, A., Ferreira, M. (2007). Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids. *Enzyme and Microbial Technology.* 41, 35–43.
- Habulin, M., Knez, Z. (2009). Optimization of (R,S)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 58, 24–28.
- Hermansson, J. Separation and quantification of (R)- and (S)-Propranolol as their diastereomeric derivatives in human plasma by reversed-phase ion-pair chromatography. *Acta pharmaceutica Suecica.* 19, 11-24.
- Hermansson, J., Von Bahr, C. (1980). Simultaneous determination of d- and l-Propranolol in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography.* 221, 109-117.

- Huerta, F., Santos, R., Backvall, J. Dynamic Kinetic Resolution of R-Hydroxy Acid Esters. (2000). *Organic letters*. 8, 1037-1040.
- Hwang, B.H. Scheib, J. Pleiss, B.G. Kim, R.D. Schmid. (2000). Computer-aided molecular modeling of the enantioselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward γ - and δ -lactones. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 10, 223–231.
- Illanes Andrés. *Biotecnología de enzimas*. Ediciones universitarias de la Universidad Católica de Valparaíso. Chile, (1994), 225-249.
- Jacobsen, E., Andresen, L., Anthonsen, T. (2005). Immobilization does not influence the enantioselectivity of CAL-B catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry*. 16, 847–850.
- Jönsson, A., Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1999). Thermodynamic and kinetic aspects on water vs. organic solvent as reaction media in the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*. 1430, 313–322.
- Jurcek, O., Wimmerova, M., Wimmer, Z. (2008). Selected chiral alcohols: Enzymic resolution and reduction of convenient substrates. *Coordination Chemistry Reviews*. 252, 767–781.
- Kamal, A., Krishnaji, T., Naseer, M., Khan, A. (2008). Lipase-catalyzed resolution of 1-chloro-3-[(4-morpholin-4-yl-1,2,5-thiadiazole-3-yl)oxy]propan-2-ol. Synthesis of (R)- and (S)-timolol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 54, 55–59.
- Katchalski-Katzir, E. (1993). Immobilized enzymes-learning from past successes and failures. *TIBTECH*. 11, 471-478.

- Kazlauskas, R., Weissfloch, A., Rappaport, A., Cuccia, A. (1991). A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions. *J.Org. Chem.* 56, 2656–2665.
- Klibanov, A.M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature.* 409, 241–246.
- Koeller, K.M., Wong, C.H. (2001). Enzymes for chemical synthesis. *Nature.* 409, 232-240.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Léonard-Neversa, V., Martona, Z., Lamarea, S., Hultb, K. (2009). Understanding water effect on *Candida antarctica* lipase B activity and enantioselectivity towards secondary alcohols. *Journal molecular catalysis B: Enzymatic.* 59, 90-95.
- Lozano, P., Daz, M., Diego, T., Iborra, J. (2003). Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide *Biotechnol. Bioeng.* 82, 352–358.
- Main, B. (1990). *Problems and Wonders of chiral Molecules*, Academia, Kiado, Budapest. 329–348.
- Majumder, AB., Mondal, K., Singh, TP., Gupta, MN. Designing cross-linked lipase aggregates for optimum performance as biocatalysts. *Biocatal Biotransform.* 26, 235-242.

- Malcata, F., Garcia, H., Hill, C., Hill, S., Amundson, C. (1992). Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow fiber reactor: part I. Lipase adsorption studies. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 647-657.
- Margolin, A.L. (1993). Enzymes in the synthesis of chiral drugs. *Enzyme and Microbial Technology.* 15, 266–280.
- Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lafuente, R. and Guisán, J.M. (2000a). Reversible enzyme immobilization via a very strong and non-distorting adsorption on support-polyethyleneimine composites. *Biotechnology and Bioengineering.* 68, 98-105.
- Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Abian, O., Fernández-Lafuente, R. and Guisán, J.M. (2000b) 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.* 1, 739-745.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M. and Fernandez-Lafuente. R. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1451–1463.
- McCabe, R., Taylor, A. (2004). An investigation of the acyl-binding site of *Candida antarctica* lipase B. *Enzyme and Microbial Technology.* 35, 393–398.
- Matsuo, N., Ohno, H. (1985). Preparation of optically active 1-acetoxy-2-arylpropionitriles and its application to a facile synthesis of (S)-(-)-(+)-Propranolol. *Tetrahedron letters.* 26, 5533-5534.

- Monterde, M., Brieva, R., Gotor, V. (2002). Enzymatic resolution of the chiral inductor 2-methoxy-2-phenylethanol. *Tetrahedron: Asymmetry*. 13, 1091–1096.
- Mozhaev, V., Klibanov, A., Goldmacher, V., Berezin, I. (1990). Operational stability of copolymerized enzymes at elevated temperatures. *Biotechnol Bioeng*. 25, 1937–1945.
- Nanalov, R.J., Kamboure, M.S. (1993). Immobilization and properties of *Bacillus stearothermophilus* pulanase. *Biotechnology Appl. Biochem*. 18, 409–16.
- Nobel, M., Cleasby, A., Johcnson, L., Egmond, M., Frenken, G. (1993). The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett*. 331, 1265–1269.
- Ottosson, J., Fransson, L., Hult, K. (2002). Substrate entropy in enzyme enantioselectivity: An experimental and molecular modeling study of a lipase. *Protein Sci*. 11, 1462–1471.
- Palomo, J.M., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fuentes, M., Fernández-Lafuente, R. and Guisan, J.M. (2002). Modulation of the enantioselectivity of *Candida antarctica* B lipase via conformational engineering: kinetic resolution of (±)-hydroxy-phenylacetic acid derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry*. 13, 1337–1345.
- Palomo, J.M. (2003). Lipases Enantioselectivity Alteration by Immobilization Techniques. *Current Bioactive Compounds*. 4, 126-138.

- Palomo, J.M., Segura, R.L., Fernández-Lorente, G., Guisan, J.M. and Fernández Lafuente, R. (2004). Enzymatic resolution of (\pm)-glycidyl butyrate in aqueous media. Strong modulation of the properties of the lipase from *Rhizopus oryzae* via immobilization techniques. *Tetrahedron: Asymmetry*. 15, 1157–1161.
- Palomo, J.M., Segura, R.L., Mateo, C., Terreni, M., Guisan, J.M. and Fernández Lafuente, R. (2005). Synthesis of enantiomerically pure glycidol via a fully enantioselective lipase-catalyzed resolution. *Tetrahedron: Asymmetry*. 16, 869–874.
- Palomo, JM, Fernández-Lorente, G., Guisán, JM., Fernández-Lafuente, R. (2007). Modulation of immobilized lipase enantioselectivity via chemical amination. *Advanced Synthesis and Catalysis*. 349, 1119–27.
- Pámies, O., Backvall, J. (2004). Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution. *Trends in Biotechnology*. 22, 130-135.
- Pchelka, B. Loupy, A., Plenkiewicz, L., Blanco, L. (2000). Resolution of racemic 1-azido-3-aryloxy-2-propanols by lipase-catalyzed enantioselective acetylation. *Tetrahedron Asymmetry*. 11, 2719–2732.
- Pernas, M.A.; López, C.; Rúa, M.I.; Hermoso, J. (2001). Influence of the conformational flexibility on the kinetics and dimerisation process of two *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *FEBS. Lett.* 501, 87-91.
- Persichetti, R., Lalonde, J., Govardhan, C., Khalaf, N., Margolin, A. (1996). *Candida rugosa* lipase: enantioselective enhancements in organic solvents. *Tetrahedron Lett.* 37, 6507-6510.

- Persson, M., Costes, D., Wehtje, E., Adlercreutz, P. (2002). Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. *Enzyme and Microbial Technology*. 30, 916-923.
- Phillips, R. (1992). Temperature effects on stereochemistry of enzymatic reactions. *Enzyme and microbial technology*. 55, 417-419.
- Phillips, R. (1996). Temperature modulation of the stereochemistry of enzymatic catalysis: prospects for exploitation. *Trends Biotechnol.* 14, 13–16.
- Polizzi, K., Bommaris, A., Broering, J., Chaparro-Riggers, J. (2007). Stability of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*. 11, 220–225.
- Puertas, S., Rebolledo, F. Gotor, V. (1996). Enantioselective Enzymatic Aminolysis and Ammonolysis of Dimethyl 3-Hydroxyglutarate. Synthesis of (R)-4-Amino-3-hydroxybutanoic Acid. *J. Org. Chem.* 61, 6024– 6027.
- Queiroz, N. and Nascimento, M. (2002). *Pseudomonas sp.* Lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (R,S)-methyl mandelate. *Tetrahedron letters*. 43, 5225-5227.
- Rakels, J., Straathof, A., Heijnen, A. (1993). A simple method to determine the enantiomeric ratio in enantioselective biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology*. 15, 1051-1056.
- Reetz, T. (2002) Lipases as practical biocatalysts. *Biocatalysis and biotransformation*. 6, 145-150.

- Rocchietti, S., Urrutia, A., Pregnolato, M., Tagliani, A., Guisán, J., Fernández-Lafuente, R., Terreni, M. (2002). Influence of the derivative preparation and substrate structure on the enantioselectivity of *penicillin G* acylase. *Enzyme Microb Technol.* 31, 88-93.
- Rody, LG., Shanke, VA. (1983). Immobilized nucleases. *Crit Rev Biotechnol.* 13, 255–273.
- Rotticci, D., Hæffner, F., Orrenius, C., Norin, T., Hult, K. (1998). Molecular recognition of sec-alcohol enantiomers by *Candida antarctica* lipase B. *Journal molecular catalysis B: Enzymatic.* 5, 1-4.
- Rotticci, D., Rotticci, J.C., Denman, S. and Norin, T. (2001). Improved Enantioselectivity of a Lipase by Rational Protein Engineering.. *Chembiochem.* 2, 766-770.
- Sabuquillo, P., Reina, J., Fernández-Lorente, G., Guisán, J.M. and Fernández-Lafuente, R. (1998). Interfacial affinity chromatography of lipases: separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1388, 337-348.
- Schulz, T., Pleiss, J., Schmid, R. (2000). Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols: A quantitative model. *Protein Sci.* 9, 1053–1062.
- Schrag, J., Li, Y., Cygler, M. (1997). The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure.* 5, 187-202.

- Sheldon, R., Van Rantwijk, F., Schoevaart, R. (2004). Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnology and Bioengineering*. 6, 754-762.
- Silber, B., Riegelman, S. (1980). Stereospecific assay for (-) and (+)-propranolol in human and dog plasma. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 215, 643-648.
- Sobolev, A., Franssen, M., Poikans, J., Duburs, G., and Groot, A. (2002). Enantioselective lipase-catalysed kinetic resolution of acyloxymethyl and ethoxycarbonylmethyl esters of 1,4-dihydroisonicotinic acid derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry*. 13, 2389-2397.
- Subhas, D. Venkat, A. (2005). An efficient asymmetric synthesis of (S)-atenolol: using hydrolytic kinetic resolution. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13, 627–630.
- Terao, Y., Murata, M., Achiwa, K., Nishino, T., Akamatsu, M., Kamimura, M. (1988). Highly efficient lipase-catalyzed asymmetric synthesis of chiral glycerol derivatives leading to practical synthesis of S-propranolol. *Tetrahedron letters*. 29, 5173-5176.
- Thompson, J.A., Holtzman, J., Tsuru, M. Lerman, C. (1982). Procedure for the chiral derivatization and chromatographic resolution of R-(+)- and S-(-)-Propranolol. *Journal of Chromatography*. 238, 470-475.
- Torres R, Ortiz C, Pessela B., Palomo, JM., Mateo C, Guisán JM, et al. (2006). Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under

different experimental conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. 39, 167–71.

- Turkova J. (1999). Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. *J Chromat B Biomed Sci Appl*. 722, 11–31.
- Uppenberg, J., Hansen, M., Patkar, S., Jones, A. (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*. 2, 34–40.
- Van Rantwijk, F. and Sheldon, R.A. (2004). Enantioselective acylation of chiral amines catalysed by serine hydrolases. *Tetrahedron*. 60, 501–519.
- Wang, L., Nag, A., Lee, G. and Shaw, J. (2002). Factors affecting the resolution of dl-menthol by immobilized lipase catalyzed esterification in organic solvent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 262–265.
- Wehtje, E., Costes, D., Adlercreutz, P. (1997). Enantioselectivity of lipases: effects of water activity. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 3, 221–230.
- Wheatley, B., Donald, E., Schmidt, J. (1999). Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide activated Supports. *Journal of Chromatography A*, 849, 1–12.
- Wielechowska, M. and Plenkiewicz, J. (2005). Lipase-catalyzed separation of the enantiomers of 1-substituted-3-arylthio-2-propanols. *Tetrahedron: Asymmetry*. 16, 1199–1205.

- Wilson, L., Illanes, A., Soler, L., Henríquez, J. (2008). Effect of the degree of cross-linking on the properties of different CLEAs of penicillin acylase. *Process Biochemistry*. 44, 322-326.
- Wu, H.Y., Xu J.H. and Liu, Y.Y. (2001). A practical enzymatic method for preparation of (S)-ketoprofen with a crude *Candida rugosa* lipase. *Synthetic Communications*. 31, 3491–3496.
- Yost, Y., Holtzman, J.L., (1979). Resolution of (±)-Propranolol. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 16, 1181-1182.

ANEXO 1

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

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

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

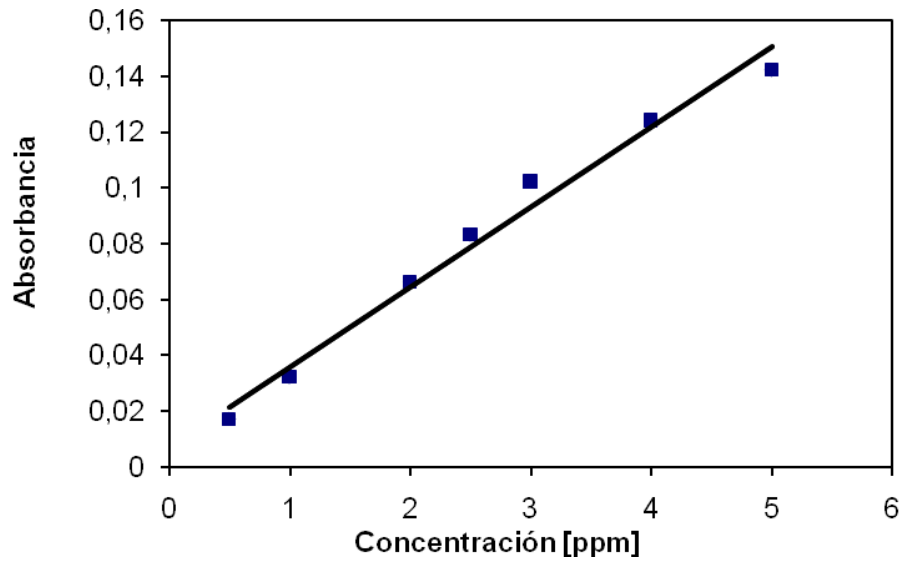
FD = Factor de dilución enzimático

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

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

ANEXO 2

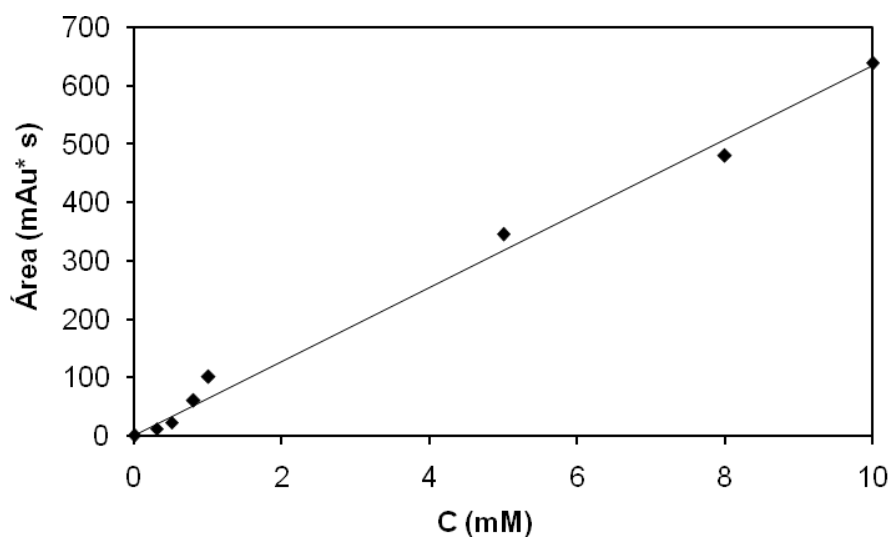
Curva de calibración para la cuantificación de átomos de Cobre por espectroscopía de absorción atómica



$$y = 0,0287x + 0,0071$$

ANEXO3

Curva de calibración (S)-Propanolol y (R)-propanolol

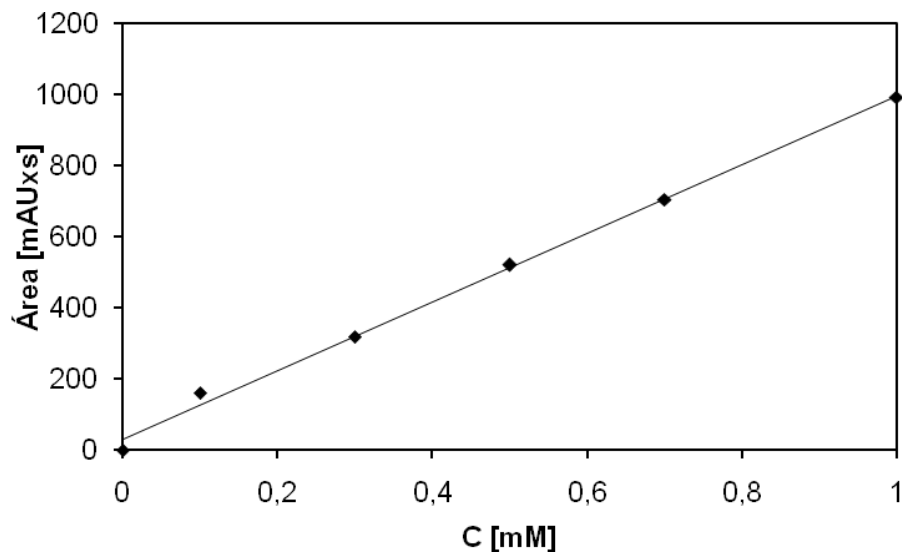


$$C = 62,47 \cdot 10^{-1} A - 7,44$$

C es la concentración de [(R)- y (S)-] propanolol en mM y A es el área del pico correspondiente para el propanolol en mAU*s.

ANEXO 4

Curva de calibración [(S)- y (R)-] Atenolol

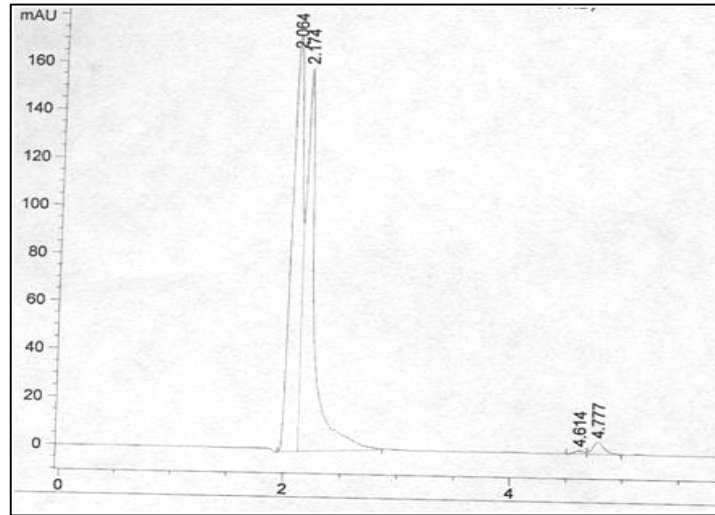


$$C = 965,2 \cdot 10^{-1} A - 31,5$$

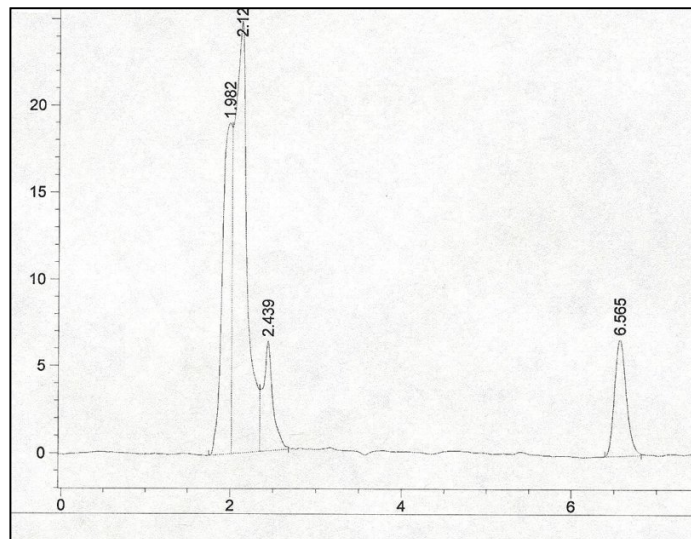
C es la concentración de [(R)- y (S)-] Atenolol en mM y A es el área del pico correspondiente para el atenolol en mAU*s.

ANEXO 5

Resolución cinética (R/S)-Propanolol



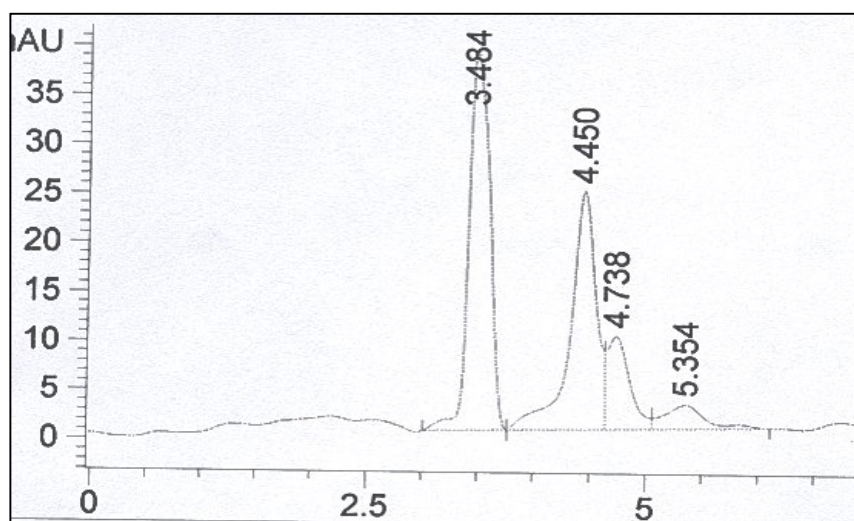
a) (R/S)-Propranolol en ausencia de biocatalizador. Grado de conversión (0%).



b) (R/S)-Propranolol para una conversión del 30% catalizada por el derivado EC-CAL-B. El orden de elución fue: (R)-Propranolol (1,982 min); (S)-Propranolol (2,123 min); R-O-butirilpropranolol (2,439); tolueno (6,565).

ANEXO 6

Resolución cinética (R/S)-Atenolol



(R/S)-Atenolol para una conversión del 20% catalizada por el derivado EC-CAL B. El orden de elución fue: (R)-Atenolol (4,450 min); (S)-Atenolol (4,738min); R-O-butiril-atenolol (5,354 min).