

**RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (R,S)-MANDELATO DE METILO UTILIZANDO  
PREPARACIONES INMOVILIZADAS DE LIPASA  
DE *CANDIDA ANTARCTICA B***

**ANDRÉS MAURICIO ESCORCIA CABRERA**

**Universidad Industrial de Santander  
Facultad de ciencias  
Escuela de Química  
Bucaramanga  
2008**

**RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (R,S)-MANDELATO DE METILO UTILIZANDO  
PREPARACIONES INMOVILIZADAS DE LIPASA  
DE *CANDIDA ANTARCTICA B***

**ANDRÉS MAURICIO ESCORCIA CABRERA**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Químico.**

**RODRIGO TORRES SÁEZ –DIRECTOR-  
CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LÓPEZ –CODIRECTOR-**

**Universidad Industrial de Santander  
Facultad de ciencias  
Escuela de Química  
Bucaramanga  
2008**

***AI SEÑOR JESUCRISTO POR DARME VIDA EN ABUNDANCIA.***

***A MIS PADRES POR SU AMOR, PACIENCIA Y DIRECCIÓN.***

***A JENNIFFER POR CONTAGIAR MI VIDA DE SU ALEGRÍA.***

***A MIS HERMANOS POR SU COMPAÑÍA.***

***A MI PERRA LIPA.***

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi padre por instruirme en ciencia.

A mi madre por su sabiduría.

Al Dr. Rodrigo Torres Sáez por su paciencia y orientación en el desarrollo de éste trabajo.

A la Dra. Claudia Cristina Ortiz López por sus contribuciones para la realización de éste trabajo.

A la profesora María Helena por su colaboración en la técnica instrumental HPLC.

A Jennifer Cruz Laiton por su amor y estar conmigo a cada momento.

A Luis Oveimar Barbosa por su colaboración y sus consejos.

A Oscar Lozada por sus contribuciones técnicas y su amistad

A mis verdaderos amigos.



<b>2. METODOLOGÍA</b>	<b>39</b>
2.1 Materiales	39
2.2 Hidrólisis de p-nitrofenilbutirato (pNPB)	39
2.3 Determinación de la concentración de proteína	40
2.4 Purificación de las lipasas	40
2.5 Modificación parcial del soporte Eupergit C	41
2.5.1 Soporte aminado	41
2.5.2 Soporte Iminodiacético	41
2.5.3 Soporte IDA-Cu	41
2.6 Inmovilización de CAL-B sobre soportes epóxido multifuncionales	41
2.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE	42
2.8 Inactivación térmica	43
2.9 Hidrólisis enantioselectiva de mandelato de metilo	43
2.9.1 Análisis en HPLC	43
2.10 Determinación del exceso enantiomérico	44
<b>3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>45</b>
3.1 Hidrólisis de p-NPB catalizada por las lipasas de <i>C. rugosa</i> (CRL), <i>C. antarctica B</i> (CAL-B), <i>Lipolyse R</i> (LRL) y <i>Alcalignes sp.</i> (QL).	45
3.1.1 Efecto del pH sobre la actividad de las lipasas	45
3.1.2 Especificidad de las lipasas	46
3.1.3 Estabilidad al pH	46
3.2 Purificación de las lipasas	47
3.2.1 Inmovilización de CAL-B	48
3.2.2 Inmovilización de CRL	49
3.2.3 Inmovilización de QL	50
3.2.4 Inmovilización de LRL	51
3.3 Comparación de la actividad de la enzima soluble con la enzima inmovilizada en octil-agarosa en la hidrólisis de pNPB	52
3.4 Efecto del Tritón X-100 sobre la actividad de CAL-B y CRL en la hidrólisis	

de pNPB	53
3.5 Hidrólisis enantioselectiva de mandelato de metilo	55
3.5.1 Efecto de la concentración de (RS)-mandelato de metilo	55
3.5.2 Efecto de la cantidad de biocatalizador	56
3.5.3 Inmovilización de CAL-B en soportes epóxidos multifuncionales	57
3.5.4 Estabilidad térmica de los derivados inmovilizados de CAL-B	59
3.5.5 Especificidad de los distintos derivados inmovilizados de CAL-B	62
3.5.5.1 Efecto del pH sobre la actividad de los derivados inmovilizados frente al (R)-mandelato de metilo	63
3.5.6 Enantioselectividad de los distintos derivados inmovilizados de CAL-B catalizando la hidrólisis de mandelato de metilo	64
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>69</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>70</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>74</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distintas conformaciones de lipasas	21
<b>Figura 2.</b> Porcentaje de actividad relativa de CRL, CAL-B, QL y LRL catalizando la hidrólisis de p-NPB a 25 °C y diferentes condiciones de pH	47
<b>Figura 3.</b> Electroforesis SDS-PAGE de las preparaciones de la lipasa de <i>Candida rugosa</i> y <i>Candida antarctica B</i>	48
<b>Figura 4.</b> Cinética de la inmovilización de CAL-B en octil-agarosa	49
<b>Figura 5.</b> Cinética de la inmovilización de CRL en octil-agarosa	50
<b>Figura 6.</b> Cinética de la inmovilización de QL en octil-agarosa	51
<b>Figura 7.</b> Cinética de la inmovilización de LRL en octil-agarosa	52
<b>Figura 8.</b> Efecto del Tritón X-100 en la actividad CRL y CAL-B	54
<b>Figura 9.</b> Efecto de la concentración de (RS)-mandelato de metilo en su conversión.	55
<b>Figura 10.</b> Efecto de la cantidad de biocatalizador en la conversión de (RS)-mandelato de metilo	56

<b>Figura 11.</b> Electroforesis SDS-PAGE de los derivados inmovilizados de lipasa de <i>Candida antarctica</i> B	57
<b>Figura 12.</b> Cinética de la inmovilización de CAL-B en soportes epóxidos multifuncionales	58
<b>Figura 13.</b> Estabilidad de los derivados de CAL-B a diferentes temperaturas y pH 7	61

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Activación interfacial de lipasas con interfases hidrofóbicas	22
<b>Esquema 2.</b> Equilibrio conformacional de las lipasas en medios acuosos homogéneos	23
<b>Esquema 3.</b> Adsorción de lipasas sobre distintas estructuras hidrofóbicas	24
<b>Esquema 4.</b> Mecanismo propuesto para la formación de agregados bimoleculares de lipasas	25
<b>Esquema 5.</b> Efecto de las condiciones experimentales en el mecanismo de apertura y cierre de lipasas	27
<b>Esquema 6.</b> Diferentes metodologías de inmovilización	28
<b>Esquema 7.</b> Adsorción interfacial de lipasas sobre soportes hidrofóbicos	29
<b>Esquema 8.</b> Inmovilización sobre soportes epóxido	30
<b>Esquema 9.</b> Inmovilización de lipasas en distintas orientaciones	31
<b>Esquema 10.</b> Resolución cinética catalizada por lipasa para un sistema reversible	32

<b>Esquema 11.</b> Ruta retrosintética de Pemolina	36
<b>Esquema 12.</b> Ruta retrosintética de S-oxibutinina	37
<b>Esquema 13.</b> Ruta retrosintética de (+)-Goniodiol	38

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Actividad específica de las lipasas CRL, CAL-B, QL y LRL catalizando la hidrólisis de p-NPB a 25°C. 45
- Tabla 2.** Actividad específica y relativa de los derivados inmovilizados octil-agarosa de CRL, CAL-B, QL y LRL con p-NPB. 53
- Tabla 3.** Constantes de inactivación térmica de los diferentes derivados inmovilizados de CAL-B. 59
- Tabla 4.** Actividad específica de los diferentes derivados inmovilizados de CAL-B catalizando la hidrólisis de pNPB y (R)-mandelato de metilo a 25°C. 62
- Tabla 5.** Enantioselectividad de los derivados inmovilizados de CAL-B en la hidrólisis de ( $\pm$ )-mandelato de metilo a 25°C y diferentes condiciones de pH. 64

## RESUMEN

TITULO:

**RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (R,S)-MANDELATO DE METILO UTILIZANDO PREPARACIONES INMOVILIZADAS DE LIPASA DE *CANDIDA ANTARCTICA B*.**\*

AUTOR: ESCORCIA CABRERA, Andrés Mauricio.\*\*

Palabras claves: ingeniería conformacional; activación interfacial; lipasa CAL-B, inmovilización covalente; (R,S)-mandelato de metilo.

El desarrollo de métodos para la obtención de compuestos quirales constituye uno de los grandes desafíos de la química actual. En este contexto, la resolución cinética enzimática representa una excelente alternativa para obtener moléculas quirales. Entre las enzimas que pueden llevar a cabo estas reacciones enantioselectivas se encuentran las lipasas. En medios homogéneos, estas enzimas presentan un equilibrio conformacional entre dos estructuras proteicas (abierta y cerrada), el cual es posible desplazar hacia la conformación abierta (forma activa) en presencia de soportes hidrofóbicos. En este trabajo, Lipasa de *Candida antarctica B* (CAL-B) fue purificada e inmovilizada covalentemente en soportes epóxido Eupergit C, en soportes Eupergit C activados con diferentes grupos funcionales (EC-amino-CAL-B, EC-IDA-CAL-B y EC-Cu-CAL-B) y adsorbida mediante activación interfacial en soporte octil-agarosa. Estas preparaciones de enzima inmovilizada fueron utilizadas bajo diferentes condiciones de pH (6, 7 y 8) en la resolución del (R,S)-mandelato de metilo. Cada uno de estos derivados inmovilizados presentó diferentes propiedades catalíticas (actividad, especificidad y enantioselectividad) en las condiciones experimentales utilizadas. Los resultados obtenidos mostraron que el derivado octil-agarosa-CAL-B fue el más activo, sin embargo, este derivado fue el menos enantioselectivo en comparación con otros derivados. Se destaca el derivado EC-amino-CAL-B, el cual, fue altamente enantioselectivo a pH 8 ( $E=52$ ), permitiendo obtener el enantiómero R del ácido mandélico con un ee del 96%.

---

\* Proyecto de grado.

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. TORRES SÁEZ, Rodrigo. ORTIZ LOPEZ, Claudia.

## ABSTRACT

TITULO:

**KINETIC RESOLUTION OF (R,S)-METHYL MANDELATE USING IMMOBILIZED PREPARATIONS OF *CANDIDA ANTARCTICA B* LIPASE.\***

AUTHOR: ESCORCIA CABRERA, Andrés Mauricio.\*\*

Keywords: Conformational engineering; interfacial activation; CAL-B lipase, covalent immobilization; (R,S)-methyl mandelate.

The development of methods to obtain chiral compounds constitutes one of the great challenges of current chemistry. In this context, enzymatic kinetic resolution represents an excellent alternative to obtain chiral molecules. Between enzymes which can carry out these enantioselective reactions are found lipases. In homogeneous mediums, these enzymes present a conformational equilibrium between two proteic structures (open and closed) which is possible to displace forward the open conformation (active form) in presence of hydrophobic supports. In this work, Lipase from *Candida antarctica B* (CAL-B) was purified and covalently immobilized on Eupergit C epoxy supports; Eupergit C activated with different functional groups (EC-amine-CAL-B, EC-IDA-CAL-B and EC-Cu-CAL-B), and adsorbed through interfacial activation on octyl agarose support. These immobilized enzyme preparations were utilized under different pH conditions (6, 7 and 8) on (R,S) methyl mandelate resolution. Each one of these immobilized derivatives presented different catalytical properties (activity, selectivity and enantioselectivity) on the used experimental conditions. The obtained results showed that octyl-agarose-CAL-B was the most active; however, this derivative was less enantioselective in comparison to other immobilized preparations. In this study, EC-amino-CAL-B was highly enantioselective at pH 8 ( $E=52$ ), allowing to obtaining the R enantiomer of mandelic acid with an enantiomeric excess (ee) of 96%.

---

\* Graduation Project.

\*\* Science Faculty. Chemistry School. TORRES SÁEZ, Rodrigo. ORTIZ LÓPEZ, Claudia.

## INTRODUCCIÓN

Las lipasas presentan un complejo mecanismo catalítico de reacción. De acuerdo con este mecanismo, en medios acuosos homogéneos éstas se encuentran en un cierto equilibrio entre dos conformaciones estructurales, una lipasa con el sitio activo abierto y una cerrada, con el equilibrio desplazado mayoritariamente hacia la conformación cerrada. Sin embargo, las lipasas en presencia de una interfase hidrofóbica sufren lo que se conoce como fenómeno de activación interfacial, proceso mediante el cual se desplaza el equilibrio conformacional dando lugar a la fijación de la conformación abierta de la lipasa sobre dicha interfase.

Una molécula de lipasa en su conformación abierta expone una gran superficie hidrofóbica, la cual puede actuar como una interfase para otra molécula de lipasa cercana a ella en su conformación cerrada, produciéndose la activación interfacial de esta segunda, generándose así una estructura dimérica de dos moléculas de lipasa. Esta tendencia de las lipasas a auto-asociarse debe tenerse en cuenta a la hora de diseñar protocolos de inmovilización, de tal forma que cuando se desea estudiar las propiedades catalíticas de los monómeros de una determinada lipasa, es necesario llevar a cabo la inmovilización en presencia de Tritón X-100, el cual puede generar la ruptura de los dímeros que estén presentes en solución y generar un aumento de la actividad enzimática.

El complejo mecanismo catalítico presente en las lipasas hace posible pensar que la alteración de este mecanismo de apertura y cierre o de la forma exacta de la conformación abierta de la lipasa, podría dar lugar a una modificación en las propiedades catalíticas de la misma. De esta forma, la posibilidad de controlar y modular este equilibrio se constituye en una poderosa herramienta de mejora de las propiedades de las lipasas como enzimas de interés industrial.

La alteración del equilibrio conformacional existente en las lipasas puede llevarse a cabo mediante el empleo de diferentes técnicas de inmovilización en las cuales se involucren distintas áreas de la enzima, en donde sea posible controlar: i) la orientación de la lipasa sobre el soporte, ii) la rigidez de las lipasas inmovilizadas, y iii) los micro-ambientes que rodean las moléculas de lipasas inmovilizadas. Todo esto podría provocar una modificación en el mecanismo de apertura y cierre de la lipasa, dando lugar a una alteración en la forma exacta de la conformación abierta (activa) final, viéndose esto reflejado en una modificación de sus propiedades de actividad y especificidad (enantio o regioselectividad).

Además, un cambio en las condiciones de reacción podría llegar a tener un gran efecto en las propiedades catalíticas de las lipasas, debido quizás a la modificación que se produciría sobre las interacciones globales de las conformaciones presentes en el equilibrio (abierta y cerrada), alterándose, de nuevo, la forma exacta de la conformación abierta de la enzima.

Esta modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas es lo que se denomina "Ingeniería Conformacional", la cual ha sido empleada para modular el comportamiento de diferentes enzimas que sufren grandes cambios conformacionales durante la catálisis.

## 1. MARCO DE REFERENCIA

### 1.1 Marco de antecedentes

En años recientes, se ha investigado con gran intensidad lo que se ha denominado “ingeniería conformacional de lipasas”, la cual ha sido desarrollada con el objeto de mejorar las propiedades catalíticas de las lipasas, tales como; actividad, estabilidad, especificidad y enantioselectividad. Por otro lado, a través de diferentes técnicas de inmovilización, se han obtenido diferentes derivados inmovilizados de una misma lipasa, los cuales han presentado diferentes propiedades catalíticas sobre sustratos de interés farmacológico. Además, se han modificado los biocatalizadores generados mediante cambio en su microambiente, lo cual ha generado cambios dramáticos en sus propiedades catalíticas de actividad y selectividad.

En el año 2000, Mateo y colaboradores<sup>1</sup> 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 (2002)<sup>2</sup>, 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

---

<sup>1</sup> Mateo, C.; Fernández-Lorente, G.; Abian, A.; et al. *Biomacromolecules*. **2000**, 1, 739-745.

<sup>2</sup> Palomo, J.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; et al. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2002**, 13, 1337-1345.

dos compuestos quirales bajo diferentes condiciones de reacción. Así por ejemplo, se obtuvo el enantiómero R del ácido mandélico con una pureza del 91% con CAL-B inmovilizada en soportes activados con polietilenimina (PEI), mientras que el enantiómero R del ácido 2-butirol-2-fenilacético fue obtenido con una pureza del 99,5% con el derivado enzimático de lipasa inmovilizada en soportes activados con glutaraldehído.

Ese mismo año (2002), Palomo y col.<sup>3</sup> purificaron la lipasa de *Candida rugosa* y la inmovilizaron utilizando diferentes protocolos de inmovilización, tales como: adsorción interfacial, adsorción iónica en soportes rodeados con 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. Con estos derivados, se obtuvo el enantiómero R del ácido 2-fenil-2-butirolacético con una pureza del 100% con el derivado de glutaraldehído. Adicionalmente, Palomo y col. (2003)<sup>4</sup>, 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-butirolacético con una pureza del 90% y una enantioselectividad de 59 utilizando el derivado inmovilizado de IDA-Sepabeads.

En el año 2005, Fernández-Lorente y col.<sup>5</sup>, 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.

---

<sup>3</sup> Palomo, J.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; et al. *Enzyme and Microbial Technology*. **2002**, 31, 775-783.

<sup>4</sup> Palomo, J.; Muñoz G.; Fernández-Lorente, G.; et al. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*. **2003**, 21, 201-210.

<sup>5</sup> Fernández Lorente, G.; Ortiz, C.; Segura, R.; et al. *Wiley Periodicals, Inc*. **2005**, 773-779.

Posteriormente, Fernández-Lorente y col. (2007)<sup>6</sup>, lograron aumentar la especificidad de las lipasas *Alcaligenes sp.* (QL) y *Candida rugosa* hacia sustratos hidrofóbicos por medio de inmovilización en soportes hidrofóbicos.

Recientemente, Siti Salhah Othman y col. (2008)<sup>7</sup>, lograron una producción altamente enantioselectiva de (-)-butirato de metilo utilizando lipasa de *Candida rugosa* (CRL) inmovilizada en soportes activados con grupos epóxidos. El compuesto mencionado fue obtenido con una pureza del 100% con la CRL inmovilizada en soportes epóxidos de Eupergit C.

## 1.2 Marco Teórico

### 1.2.1 Lipasas

Las lipasas son enzimas hidrolíticas (triacilglicerol hidrolasas, EC 3.1.1.3) que actúan sobre triglicéridos insolubles y otros ésteres insolubles de ácidos grasos de cadena larga<sup>8</sup>. Puesto que la reacción de hidrólisis es reversible, estos biocatalizadores pueden también catalizar la formación de ésteres a partir de donadores acilo y alcoholes en sistemas no acuosos<sup>9</sup>.

Estas enzimas son las más populares en biocatálisis, quizás debido a que presentan una amplia especificidad por sustratos no naturales, lo cual contrasta en algunos casos con su elevada regioselectividad y enantioselectividad. De ahí que las lipasas sean utilizadas para llevar a cabo diferentes tipos de reacciones en síntesis orgánica (Ej. Resolución de mezclas racémicas)<sup>10</sup>. Sin embargo, a la hora

---

<sup>6</sup> Fernández-Lorente, G.; Palomo, J.; Cabrera, Z.; et al. *Enzyme and Microbial Technology*. **2007**, 41, 565-569.

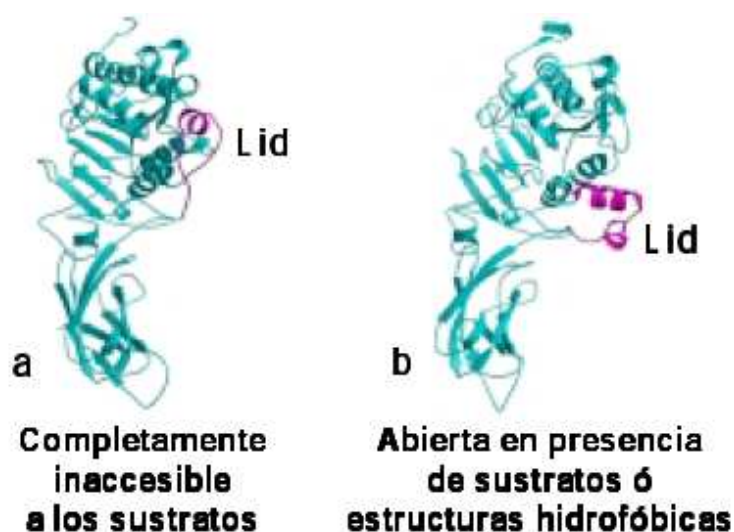
<sup>7</sup> Othman, S.; Basri, M.; Hussein, M.; et al. *Food Chemistry*. **2008**, 106, 437-443.

<sup>8</sup> Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1998**, 93, 67-80.

<sup>9</sup> Chen, C.-S.; Wu, S.-H.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2812-2817.

<sup>10</sup> Ghanem, Ashraf; Hassan, Y.; Enein, Aboul. *Tetrahedron Asymmetry*. **2004**, 78, 3331-3351.

de utilizar las lipasas como catalizadores, es necesario considerar algunas peculiaridades de su mecanismo de acción. En este contexto, mediante técnicas cristalográficas, se han obtenido dos conformaciones diferentes de lipasas, las cuales son dependientes de las condiciones medioambientales en que se encuentra la lipasa.



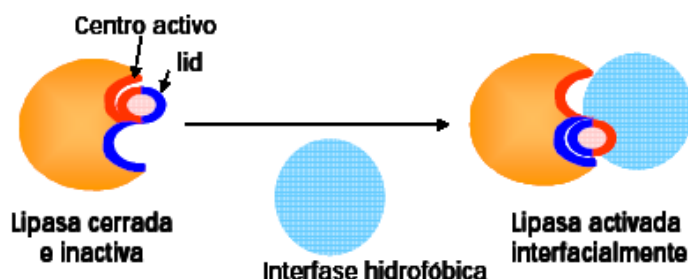
**Figura 1.** Distintas conformaciones de lipasas.

Así, en medios acuosos homogéneos, la lipasa cristaliza con el centro activo cubierto por una cadena polipeptídica, llamada tapadera<sup>11</sup> (flat o lid) (Figura 1a), lo cual hace que la enzima sea inaccesible a los sustratos (conformación cerrada). Esta cadena polipeptídica presenta en su cara interna residuos hidrofóbicos que interaccionan con las zonas hidrofóbicas que rodean el sitio activo de las lipasas. Sin embargo, cuando la enzima es cristalizada en presencia de sustratos o estructuras hidrofóbicas, se obtiene la conformación abierta de la lipasa (forma activa), en la cual la tapadera se encuentra desplazada del sitio activo, interaccionando por medio de puentes salinos, puentes de hidrógeno, etc. con otra

<sup>11</sup> Segundo, F.; Carrea, G.; Tarabiono, C.; et al. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*. **2006**, 39, 166-170.

zona de la superficie de lipasa, dejando de esta manera el sitio activo libre y accesible al medio de reacción (figura 1b).

No obstante, las lipasas presentan un mecanismo catalítico complejo, denominado mecanismo de activación interfacial<sup>12</sup>. Según este mecanismo, en sistemas homogéneos, las lipasas se encuentran con el sitio activo bloqueado al medio de reacción (conformación cerrada). Sin embargo, cuando las lipasas son contactadas sobre interfases hidrofóbicas (por ej, gota de grasa o aceite, superficies hidrofóbicas, etc.) es posible cambiar el equilibrio de la lipasa hacia una conformación abierta y activa<sup>13</sup> (Esquema 1). Esta actividad catalítica de las lipasas mediante activación interfacial es indispensable para la función biológica de las lipasas sobre sus sustratos naturales.



**Esquema 1.** Activación interfacial de lipasas con interfases hidrofóbicas.

Sin embargo, curiosamente las lipasas presentan actividad catalítica en medios acuosos. Esto se debe a que las lipasas en sistemas acuosos homogéneos se encuentran en un cierto equilibrio entre la conformación cerrada y una/s conformación/es abierta/s que permiten que las lipasas presenten actividad catalítica en ausencia de interfases (Esquema 2), con dicho equilibrio desplazado mayoritariamente hacia la conformación cerrada de las lipasas. No obstante, este

<sup>12</sup> Grochulski, P.; Li, Y.; Schrag, J.D.; et al. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 12843-12847.

<sup>13</sup> Ampón, K.; Basri, M.; Salleh, A.B.; et al. *Biocatalysis.* **1994**, 10, 341-351.

equilibrio puede ser modificado mediante diferentes tipo de manipulaciones ambientales, o variando las condiciones de reacción de las lipasas.



*Esquema 2. Equilibrio conformacional de las lipasas en medios acuosos homogéneos.*

### 1.2.2 Adsorción de las lipasas sobre estructuras hidrofóbicas

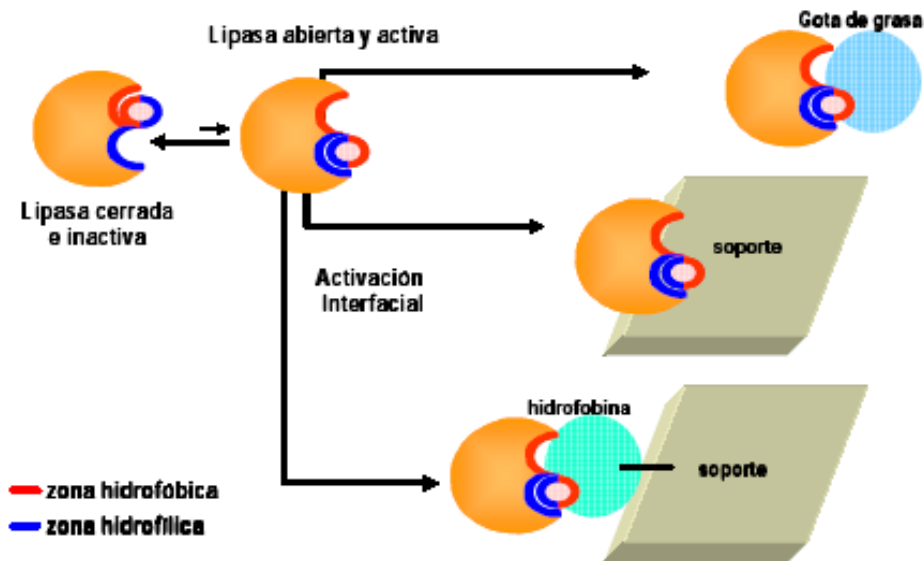
Como hemos dicho anteriormente, la conformación abierta de las lipasas muestra al medio un gran bolsillo hidrofóbico, constituido por: **a)** la cara interna del lid y **b)** toda la zona hidrofóbica que rodea al centro activo, que muestra una gran afinidad por la superficie hidrofóbica del sustrato natural, las gotas de aceite y grasas emulsionadas.

Sin embargo, este gran bolsillo hidrofóbico hace que la conformación abierta de las lipasas tenga una gran afinidad por cualquier tipo de superficie hidrofóbica. De hecho, se ha descrito que las lipasas se adsorben a multitud de estructuras hidrofóbicas: gotas de grasa<sup>14</sup>, soportes hidrofóbicos<sup>15</sup>, otras proteínas hidrofóbicas<sup>16</sup>, etc (Esquema 3).

<sup>14</sup> Basri, M.; Ampon, K.; Yunus, W. M. Z.; et al. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, 72, 407-411.

<sup>15</sup> (a) Bastida, A.; Sabuquillo, P.; Armisen, P.; et al. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, 58, 486-493. (b) Al-Duri, B.; Robinson, E.; McNerlan, S.; Bailie, P. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, 72, 1351-1359. (c) Sugiura, M.; Isobe, M. *Chem. Phar. Bull.* **1976**, 24, 72-78.

<sup>16</sup> Taipa, M. A.; Liebeton, K.; Costa, J. V. *Biochim. Biophys. Acta.* **1995**, 1256, 396-402.



**Esquema 3.** Adsorción de lipasas sobre distintas estructuras hidrofóbicas.

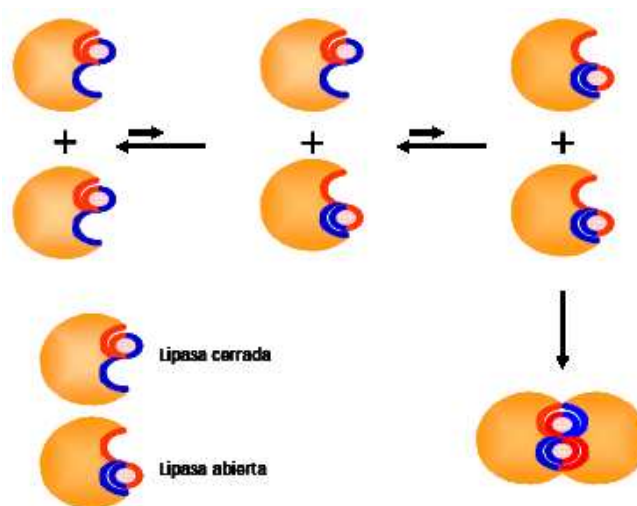
### 1.2.3 Interacción Lipasa-Lipasa

Teniendo en cuenta que tras la apertura del lid se genera una gran superficie hidrofóbica en una lipasa, exponiéndose las áreas hidrofóbicas de alrededor del sitio catalítico además de la parte hidrofóbica del lid, es posible pensar que toda esta superficie puede actuar como una interfase para otra molécula de lipasa cercana en su conformación cerrada, produciéndose la activación interfacial de esta segunda, generándose así agregados bimoleculares de lipasa (Esquema 4).

De hecho, estructuras diméricas de varias lipasas han sido identificadas mediante estudios de rayos-X, demostrándose que éstas pueden cristalizar como dímeros en sus conformaciones activas<sup>17</sup>. Además, varios autores han publicado la existencia de estructuras oligoméricas de algunas lipasas, aunque esto era

<sup>17</sup> (a) Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; et al. *Structure*. **1994**, 2, 293-308. (b) Uppenberg, J.; Ohmer, N.; et al. *Biochemistry*. **1995**, 34, 16838. (c) Pernas, M. A.; López, C.; et al. *FEBS. Lett.* **2001**, 501, 87-91.

debido a las drásticas condiciones experimentales empleadas (Ej. muy alta fuerza iónica)<sup>18</sup>.



**Esquema 4.** Mecanismo propuesto para la formación de agregados bimoleculares de lipasas.

La tendencia de las lipasas a auto asociarse (en forma de dímeros generalmente) da origen a estructuras con propiedades catalíticas diferentes: estabilidad, actividad o enantioselectividad (el dímero podría estar formado por ejemplo por dos estructuras abiertas de lipasas, presentando un centro activo de lipasa accesible, aunque parcialmente bloqueado por la presencia de otro) (Esquema 4).

#### 1.2.4 Modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas

Debido a los grandes cambios conformacionales que sufren las lipasas y el gran número de fuerzas que se implican en el mantenimiento de la estructura de las diferentes conformaciones, el sitio activo de la lipasa puede ser alterado, modificando así las propiedades catalíticas de las lipasas.

<sup>18</sup> (a) Liou, Y-C.; Marangoni, A.; Yada, R. Y. *Food Res. Int.* **1998**, 31, 243-248. (b) Rua, M. L.; Schmidt-Dannert, C.; et al. *J. Biotechnol.* **1997**, 56, 89-102.

En la actualidad, la “Ingeniería conformacional” se ha establecido como una herramienta versátil para modificar las propiedades de las lipasas. Ésta se puede abarcar desde dos conceptos: Ingeniería del derivado e Ingeniería del medio.

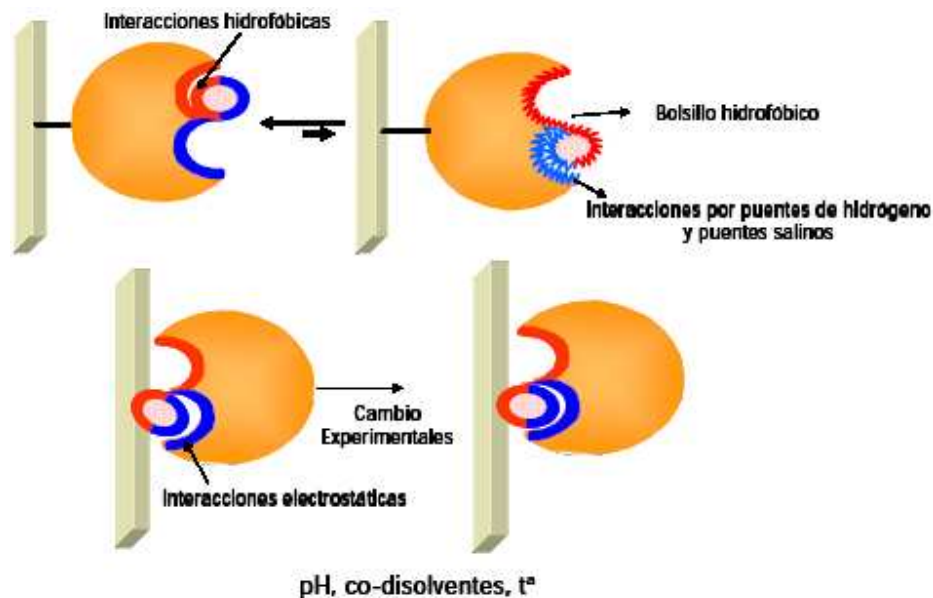
#### **1.2.4.1 Ingeniería del medio**

En el esquema 5 se muestra la complejidad que implica el cambio conformacional que sufren las lipasas. Centrándonos en la conformación abierta, la estructura de ésta lipasa estará definida por la interacción del bolsillo hidrofóbico, bien con el sustrato o bien con el medio de reacción, mientras el lid deberá acomodarse mediante un cierto número de interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, etc.

Cualquier cambio en las condiciones del medio puede alterar entonces 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. De esta forma, las condiciones experimentales afectan de forma dramática no sólo al equilibrio entre la conformación abierta y cerrada de la lipasa, sino también a la forma exacta del centro activo, y por tanto, a sus propiedades catalíticas<sup>19</sup>.

---

<sup>19</sup> Referencia 2 y 4.



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

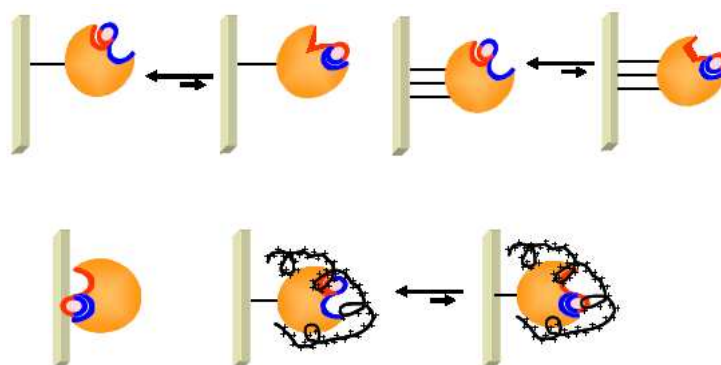
#### 1.2.4.2 Ingeniería del derivado

En el último tiempo se han desarrollado metodologías que permiten inmovilizar proteínas de forma controlada y dirigida a través de diferentes zonas de su superficie (aquellas con mayor densidad de cargas positivas o negativas, las zonas más hidrofóbicas, con mayor densidad de histidinas, de lisinas, etc). Además, controlando el grado de activación del soporte y las condiciones de inmovilización, es posible controlar el grado de unión enzima-soporte y por lo tanto la rigidez de la zona inmovilizada<sup>20</sup>. Finalmente, mediante el uso de polímeros policatiónicos se puede generar un ambiente altamente hidrofílico alrededor de la lipasa, lo cual puede dar lugar a una alteración en sus propiedades.

Teniendo en cuenta los grandes cambios conformacionales que implican la apertura y cierre de las lipasas, preparar derivados inmovilizados de lipasas,

<sup>20</sup> Referencia 1 y 4.

implicando zonas más o menos alejadas del centro activo, confiriendo más o menos rigidez o alterando el microambiente, podría también alterar en gran medida sus propiedades catalíticas (Esquema 6). De esta forma, diferentes derivados de una misma lipasa tendrían propiedades catalíticas (especificidad, selectividad, enantioselectividad, etc) muy diferentes.



**Esquema 6.** Diferentes metodologías de inmovilización.

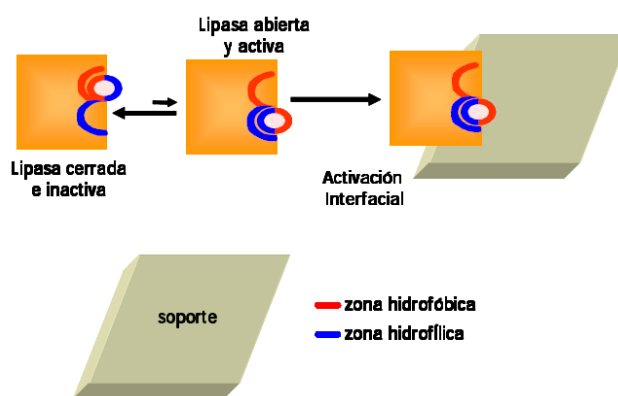
## 1.2.5 Inmovilización de lipasas con distintas orientaciones

### 1.2.5.1 Adsorción interfacial sobre soportes hidrofóbicos.

La tendencia de las lipasas a adsorberse a superficies hidrofóbicas (activación interfacial) se ha empleado para desarrollar un protocolo de inmovilización específico para lipasas, que consiste en la adsorción interfacial de las lipasas sobre soportes hidrofóbicos (por ejemplo soportes octil-agarosa<sup>21</sup>) a baja fuerza iónica. En estas condiciones, las lipasas “confunden” la superficie del soporte con la superficie hidrofóbica de las gotas de su sustrato natural, de forma que se adsorben muy fuertemente a estos soportes, a través del lid y del gran bolsillo hidrofóbico que rodea el sitio activo, fijándose así la conformación abierta.

<sup>21</sup> Referencia 15 (a).

Así, este tipo de inmovilización permite en un único paso la purificación, inmovilización e hiperactivación interfacial de las lipasas (Esquema 7).



**Esquema 7.** Adsorción interfacial de lipasas sobre soportes hidrofóbicos.

### **1.2.5.2 Inmovilización sobre soportes heterofuncionales: Adsorción física + unión covalente**

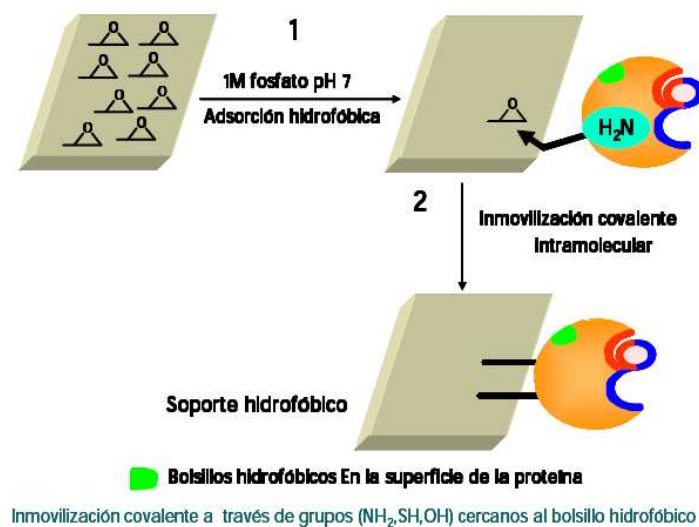
Los soportes Eupergit/Sepabeads comerciales son soportes epoxiacrílicos, con una mayor o menor hidrofobicidad. Estos presentan poros con grandes superficies recubiertas de grupos epóxido, los cuales, en principio, son capaces de reaccionar con varios grupos de la proteína dependiendo de las condiciones, dando directamente uniones muy estables: grupos amino (amino secundario), tioles (tio-éteres), hidróxilo (éteres). Sin embargo, los grupos epóxidos, en condiciones suaves (pH 7, baja fuerza iónica) presentan una reactividad muy baja con las enzimas solubles.

De esta manera, se ha propuesto que el proceso de inmovilización de enzimas a soportes con grupos epóxido se produce siguiendo un mecanismo en dos etapas<sup>22</sup> (Esquema 8):

<sup>22</sup> Mateo, C.; Fernández-Lorente, G.; Cortes, E.; et al. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 76, 269-277.

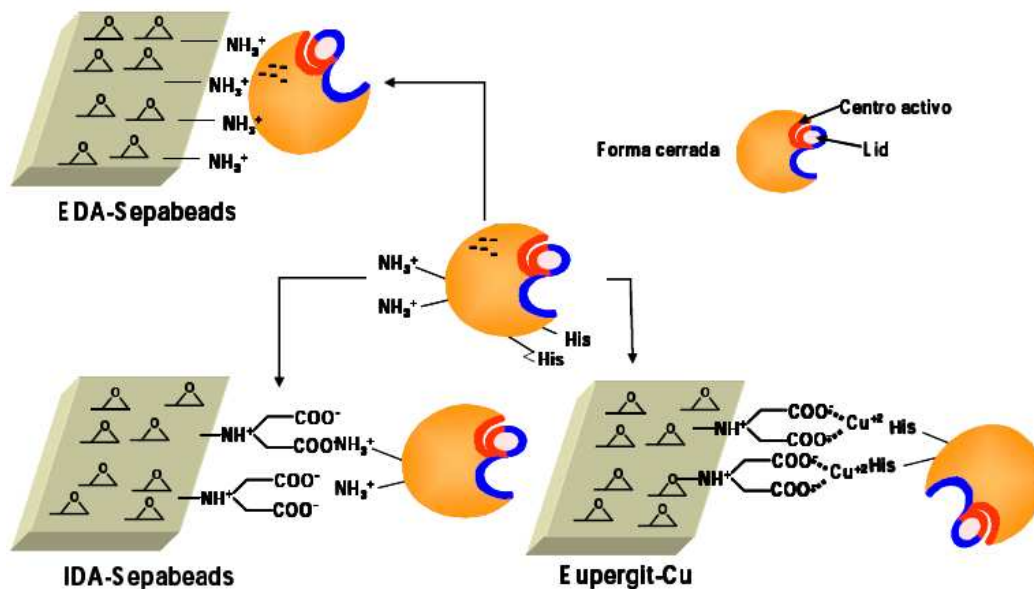
1º-La adsorción física de la enzima sobre el soporte, lo cual permite acercamiento de la enzima al soporte (tradicionalmente una adsorción hidrofóbica).

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



**Esquema 8.** Inmovilización sobre soportes epóxido.

No obstante, esta adsorción física de las proteínas sobre el soporte no tiene por qué ser exclusivamente hidrofóbica; así, la modificación de un pequeño porcentaje de grupos epóxido del soporte con distintos compuestos (iminodiacético (IDA), etilendiamina (EDA), quelato de cobre (IDA-Cu) puede provocar diferente tipo de adsorción de las moléculas de proteína sobre el soporte (Esquema 9).



**Esquema 9.** Inmovilización de lipasas con distintas orientaciones.

Este tipo de soportes heterofuncionales adsorberán las proteínas a través de diferentes zonas dependiendo del compuesto introducido en el soporte, lo cual marcará la orientación final de la enzima inmovilizada:

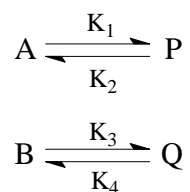
- Soporte epóxido-etilendiamina: la proteína se adsorberá sobre este soporte a través de las zonas de su superficie más ricas en cargas negativas.
- Soporte epóxido-iminodiacético: la adsorción de la proteína se producirá a través de las zonas de la superficie con mayor número de cargas positivas.
- Soporte epóxido-iminodiacético-Cu: la adsorción de la proteína se realizará a través de la zona con un mayor número de residuos de histidinas.

Tras la adsorción de la enzima, esta se une covalentemente al soporte por reacción de grupos amino, tiol, o hidróxilo de la enzima.

## 1.2.6 Resolución cinética catalizada por lipasas

El éxito de este método depende del hecho de que los dos enantiómeros reaccionen a diferentes velocidades con una entidad quiral. La entidad quiral debe presentarse en cantidades catalíticas; debe ser un biocatalizador (enzimas o un microorganismo) o un catalizador químico. La resolución cinética es la transformación más común catalizada por lipasas, en la cual la enzima es capaz de discriminar entre dos enantiómeros de una mezcla racémica, de tal manera que un enantiómero es transformado en el correspondiente producto más rápido que el otro<sup>23</sup>.

La resolución cinética enzimática para un sistema reversible puede visualizarse como sigue: en el estado inicial de la reacción la enzima ataca preferencialmente el enantiómero reactante **A** (reactante más rápido) y lo transforma en su respectivo producto **P**, mientras la concentración del enantiómero **B** (reactante lento) está en su mayor parte sin cambiar. Cuando se establece el equilibrio de dicho enantiómero, la concentración del sustrato lento comienza a cambiar, disminuyendo la pureza óptica del sustrato remanente lento (**B**) y del producto **P**. Por lo que el tiempo óptimo para terminar la resolución es cuando se haya alcanzado el equilibrio del reactante rápido<sup>24</sup> (Esquema 10).



**Esquema 10.** 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  $K_2 = K_4 = 0$ .

---

<sup>23</sup> Referencia 10.

<sup>24</sup> Referencia 9.

### 1.2.7 Enantioselectividad de las lipasas

Hay dos conceptos muy importantes a tener en cuenta en las reacciones catalizadas por enzimas, el exceso enantiomérico (ee) y la relación enantiomérica E.

La pureza óptica o enantiomérica de un compuesto puede ser expresada en términos de su exceso enantiomérico (ee) definido como:

$$\% ee_R = \frac{R - S}{S + R} \times 100 \quad ; \quad R > S \quad (1)$$

Donde R es la concentración del (R)-enantiómero y S es la concentración del (S)-enantiómero. De tal forma que para un compuesto racémico el valor de ee es cero, y para un compuesto enantioméricamente puro el valor de ee es 1 (o 100%).

Puesto que las lipasas poseen la habilidad de discriminar entre dos enantiómeros de una mezcla racémica, el parámetro escogido para describir la estereoselectividad o enantioselectividad de las reacciones catalizadas por lipasa es la enantioselectividad, también llamada relación enantiomérica E. E es un parámetro cinético, el cual depende del catalizador, además de ser sensible a los cambios del medio (pH, T, etc.). El valor de E está definido como la relación de las constantes específicas de velocidad para los dos enantiómeros de la mezcla racémica:

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

Donde  $k_{cat}$  es la constante de velocidad y  $K_M$  es la constante de Michaelis-Menten. Sih et al<sup>25</sup>, desarrollaron esta ecuación en términos del exceso enantiomérico del producto ( $ee_p$ ), el enantiómero remanente ( $ee_s$ ) y la conversión ( $c$ ). Tal 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 del camino de reacción. Sih et al, encontraron también, que la pureza óptica de los compuestos (producto y sustrato remanente) varía de manera inversa con la constante de equilibrio aún 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:

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

---

<sup>25</sup> Referencia 9.

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

### **1.2.7.1 Métodos para la determinación del exceso enantiomérico<sup>26</sup>**

Entre los métodos existentes para la determinación del exceso enantiomérico los más convenientes y sensibles son la cromatografía gaseosa (GC) y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). La cromatografía gaseosa es un método rápido, fácil de realizar, no es afectado por la presencia de impurezas en la muestra analizada, por lo tanto, no es necesario que la muestra sea aislada y purificada. Además, no se requiere gran cantidad de muestra, por lo que las reacciones pueden ser llevadas a cabo a pequeña escala. Este método se basa en el hecho que la asociación molecular puede llevar a un reconocimiento quiral eficiente, logrando una separación enantiomérica cuando una fase quiral estacionaria (ciclodextrinas) es usada en GC. El gas (fase móvil: hidrógeno, helio, nitrógeno) transporta el analito quiral a través de la fase estacionaria. Los enantiómeros a ser analizados experimentan rápidas y reversibles interacciones diastereoméricas con la fase quiral estacionaria, de donde pueden ser eluidos en diferentes tiempos. Una de las limitaciones asociadas con este método es que la muestra debe ser lo suficientemente volátil, térmicamente estable y soluble en la fase quiral estacionaria usada. La medida del exceso enantiomérico con GC contiene un alto grado de precisión ( $\pm 0,05\%$ ), por lo que pueden ser obtenidos datos confiables. Es decir, que excesos enantioméricos altos (>99%) pueden ser detectados.

La cromatografía líquida se basa en los mismos principios y tiene las mismas ventajas que la cromatografía gaseosa. La mayor diferencia es que compuestos más polares y no volátiles pueden ser analizados.

---

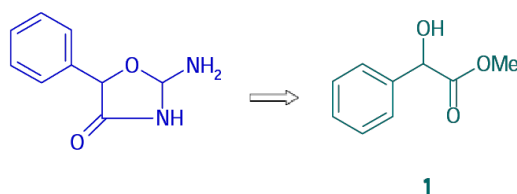
<sup>26</sup> Referencia 10.

Otros métodos disponibles para la determinación del exceso enantiomérico son los métodos polarimétricos y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

### 1.2.8 Derivados del ácido 2-hidroxi-fenilacético (ácido mandélico)

Los isómeros puros del ácido mandélico (**3**) y sus correspondientes ésteres son muy utilizados en síntesis orgánica.

Los ésteres del isómero R son empleados en la síntesis enzimática del antibiótico cefamandol<sup>27</sup> y el ácido ópticamente puro puede ser utilizado para la resolución de racematos<sup>28</sup>. Además, algunos derivados O-acilados del ácido mandélico se han empleado como desplazantes en fase estacionaria quiral<sup>29</sup>. Por su parte, el éster metílico del ácido mandélico (**1**) es empleado como intermediario en la síntesis de Pemolina (Cylert®) (2-Amino-5-fenil-4-(5*H*) oxazolona), el cual es un estimulante del sistema nervioso central. (Esquema 11).



**Esquema 11.** Ruta retrosintética de Pemolina.

La resolución óptica del ácido mandélico se ha llevado a cabo mediante métodos diastereoméricos empleando como agentes alcaloides o aminas ópticamente activas (por ejemplo L-fenilalanina o L-metionina), aunque presentan el inconveniente de un alto costo, lo cual no es viable para la producción del ácido

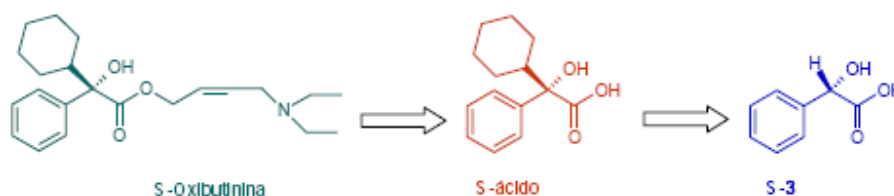
<sup>27</sup> Savidge, T. A. (Vandame, E. J. Ed) Marcel Decker. New York, 1984. 177-224.

<sup>28</sup> Wilen, S. H. *Topics in Stereochemistry*. Eliel eds. Vol 6. 1979.

<sup>29</sup> Quintero, G.; Vo, M.; et al. *J. Chromatogr. A*. **1995**, 693, 1-5.

a escala industrial. Además, los enantiómeros del ácido mandélico presentan gran interés, ya que son precursores en la síntesis de varios fármacos.

La Oxibutinina (Esquema 12), es un fármaco de gran interés en la industria farmacéutica, el cual está indicado para el tratamiento de la incontinencia urinaria. Sin embargo, efectos secundarios no deseados (sequedad de mucosas, visión borrosa, náuseas, desvelo y palpitaciones cardiovasculares) limitan su utilidad clínica. Teniendo en cuenta que el isómero S presenta toda la actividad farmacológica, debía buscarse una estrategia de síntesis para la obtención del fármaco enantioméricamente puro. Durante el desarrollo de la síntesis asimétrica del (S)-ácido (Esquema 12), precursor quiral del S-oxibutinina, químicos de Sepracor desarrollaron un nuevo y práctico proceso empezando por el ácido S-mandélico (**S-3**) y ciclohexanona<sup>30</sup>. Para la economía del proceso sintético, es necesario optimizar la etapa anterior donde se lleva a cabo la resolución enantioselectiva del ácido mandélico de forma enzimática<sup>31</sup>.



**Esquema 12.** Ruta retrosintética de S-oxibutinina.

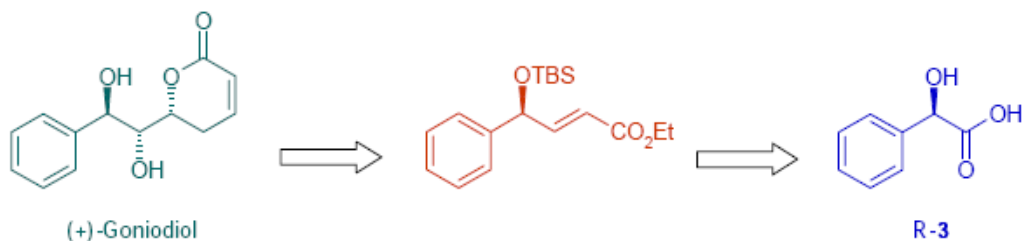
Otro ejemplo es el (+)-Goniodiol, [(1'R,2'S,5R)-5-(1',2'-dihidroxi-2-feniletil)-pent-2-eno-5-lactona] (Esquema 13), una estiril-lactona que exhibe una potente y selectiva citotoxicidad frente al carcinoma de pulmón humano<sup>32</sup>. Debido a sus características estructurales y a su potente actividad biológica, varios grupos se plantearon la síntesis de esta estiril-lactona a partir del isómero R del ácido

<sup>30</sup> Grover, P. T.; Bhongle, N. N.; et al. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 6283-6287.

<sup>31</sup> Kazuhiko, T.; Kazuo, O.; et al. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, 40, 1415-1423.

<sup>32</sup> Fang, X. P.; Anderson, S. E.; et al. *J. Nat. Prod.* **1991**, 54, 1034-1043.

mandélico<sup>33</sup>, empleando el 2,3-O-isopropiliden-D-gliceraldehído<sup>34</sup> como bloque estructural, o basándose en reacciones asimétricas de formación estereoselectiva de enlace carbono-carbono con complejos de cromo tricarbonil ( $\eta^6$ -areno)<sup>35</sup> o bien mediante reacciones de dihidroxilación y epoxidación asimétrica de Sharpless<sup>36</sup>.



**Esquema 13.** Ruta retrosintética de (+)-Goniodiol.

<sup>33</sup> (a) Tsubuki, M.; Kanai, K.; Honda, T. *J. Chem. Soc.* **1992**, 1640-1641. (b) Yang, Z. C.; Zhou, W. S. *Heterocycles*. **1997**, 45, 367-383.

<sup>34</sup> Mukai, C.; Hirai, S.; Hanaoka, M. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6619-6626.

<sup>35</sup> Tsubuki, M.; Kanai, K.; Honda, T. *Synlett*. **1993**, 653-655.

<sup>36</sup> Xu, D.; Sharpless, K. B. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 4685-4688.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Materiales

Las lipasas de *Candida antarctica B* (Novozym 525 L) (CAL-B), *Candida rugosa* (CRL), *Lipolyse R* y *Alcaligenes sp.* fueron obtenidas de Sigma Chemical Co. Octil-agarosa y los marcadores de peso molecular fueron de Fermentax. Eupergit C fue donado por Röhm Pharma. Los soportes obtenidos a partir de Eupergit C fueron preparados como está descrito en la sección 2.5. Tritón X-100, p-nitrofenilbutirato, (RS)-mandelato de metilo, (R)-mandelato de metilo y (S)-mandelato de metilo se obtuvieron de Sigma.

Las soluciones de los extractos comerciales de las lipasas fueron preparadas en una solución de fosfato de potasio 5mM y pH 7.

### 2.2 Hidrólisis de p-nitrofenilbutirato (pNPB).

El ensayo se llevó a cabo midiendo el aumento en el valor de absorbancia a 348 nm producido por la formación de p-nitrofenol en la hidrólisis de 0,4mM de pNPB disuelto en buffer fosfato de potasio 25 mM, a pH 7 y 25 °C. Para iniciar la reacción, 0,02 mL de solución lipásica o suspensión se añadió a 2,5 mL del sustrato. Una unidad internacional de actividad de pNPB se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1  $\mu\text{mol}$  de pNPB por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente. El coeficiente extinción molar usado para el producto de reacción fue de  $3100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 2.3 Determinación de la concentración de proteína.

La concentración proteica de la preparación comercial de las diferentes lipasas se determinó utilizando el método de Bradford<sup>37</sup>. La curva de calibración se obtuvo con seroalbúmina bovina (BSA) para determinar las concentraciones de proteína en un rango comprendido entre 0,1 y 1 mg/mL (Ver anexo). Así CAL-B presentó 1 mg/mL, CRL contenía 0,5 mg/mL, *Lipolyse R* presentó 0,694 mg/mL y *Alcaligenes sp.* 0,5 mg/mL.

### 2.4 Purificación de las lipasas

La metodología general empleada para purificar lipasas de otras posibles proteínas presentes en el extracto (por ejemplo esterasas) fue la cromatografía por adsorción interfacial sobre geles octil-agarosa<sup>38</sup> a muy baja fuerza iónica (5 mM) y pH 7 (10 mL de solución de lipasa fueron incubados con 2 g de octil-agarosa) promoviendo así la inmovilización sobre el gel únicamente de la lipasa de interés. Periódicamente, muestras de sobrenadante y suspensión fueron recogidas y analizadas por ensayo de actividad pNPB de acuerdo con lo expuesto en la sección 2.2. Siguiendo este protocolo se obtuvo una inmovilización cuantitativa de la lipasa.

En el caso de la CAL-B, esta fue desorbida del soporte octil-agarosa con una solución de Tritón X-100 (1% v/v) disuelta en buffer fosfato de potasio 5 mM y pH 7. La mezcla enzima/detergente fue directamente utilizada para la inmovilización de CAL-B sobre soportes epóxido modificados parcialmente.

---

<sup>37</sup> Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.

<sup>38</sup> Referencia 15 (a).

## **2.5 Modificación parcial del soporte Eupergit C.<sup>39</sup>**

Los grupos epóxido del soporte Eupergit C fueron parcialmente modificados con diferentes compuestos.

### **2.5.1 Soporte aminado**

Una porción de 10 g de Eupergit C fue incubada en 60 mL de etilendiamina al 2% v/v a pH 8.5 durante 15 min bajo una agitación suave. A continuación, el soporte fue lavado con un exceso de agua destilada y almacenado a 4°C.

### **2.5.2 Soporte Iminodiacético**

10 g de Eupergit C fueron incubados en 18 mL de una solución de 2M ácido iminodiacético a pH 9 y 25°C durante 15 min bajo una agitación suave. El soporte fue entonces lavado con un exceso de agua destilada y almacenado a 4°C.

### **2.5.3 Soporte 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. Tal tratamiento debería modificar en un 100% los grupos IDA del soporte.

## **2.6 Inmovilización de CAL-B sobre soportes epóxido multifuncionales.**

La solución lipasa/detergente obtenida de la purificación de CAL-B, fue utilizada para la inmovilización sobre los distintos soportes obtenidos a partir de la modificación parcial de los grupos epóxido del soporte Eupergit C.

---

<sup>39</sup> Referencia 1.

5 mL de la solución lipasa/detergente fueron incubados con 0,5 g de cada soporte (Eupergit C, Eupergit C-IDA, Eupergit C-IDA-Cu y Eupergit C-aminado), siguiendo el proceso de inmovilización de CAL-B en los diferentes soportes midiendo periódicamente la actividad del sobrenadante en el ensayo de pNPB. Además, dicho proceso se verificó por electroforesis SDS-PAGE.

En este caso no fue posible determinar periódicamente la concentración del sobrenadante debido a la presencia de Tritón X-100, el cual, reacciona con el reactivo de Bradford conllevando a datos erróneos en la cuantificación de proteínas.

## **2.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS PAGE**

El análisis de la enzima adsorbida en el derivado fue confirmado por electroforesis SDS-PAGE mostrando una única banda con peso molecular correspondiente a la lipasa nativa.

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% -β-mercaptoetanol 5% - glicerol 10% y azul de bromofenol al 0,005%).

La electroforesis se realizó a temperatura ambiente y 150 mV de corriente constante utilizando como electrolito Tris-HCl 25 mM-glicina 192 mM y SDS 1%.

La visualización de las proteínas se realizó mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-25072. 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).

## **2.8 Inactivación térmica.**

Para estudiar la estabilidad de los diferentes derivados inmovilizados de CAL-B, una suspensión de 10 mg/mL (en buffer fosfato de potasio 25mM y pH 7) de cada uno de los derivados fue incubada a diferentes temperaturas (60°C, 70°C y 80°C) y pH 7. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas de suspensión de la lipasa y se determinó su actividad remanente mediante el ensayo de pNPB.

## **2.9 Hidrólisis enantioselectiva de mandelato de metilo.**

El mandelato de metilo [(±),(-),(+)-1] fue preparado de la concentración de interés en una solución buffer fosfato de potasio 25 mM a distintas condiciones de pH (6, 7 y 8) y 25°C. Para llevar a cabo la reacción, se añadieron 10 mg (en el caso de los enantiómeros puros –determinación de actividad y enantioselectividad-) o 0,2g (en el caso de la mezcla racémica –efecto de la concentración de sustrato y cantidad de biocatalizador) de biocatalizador a 10 mL de la solución de sustrato.

### **2.9.1 Análisis en HPLC**

El grado de hidrólisis se analizó por HPLC en fase reversa, utilizando como columna una Zorbax XDB-C<sub>18</sub> (4,6 mm x 250 mm) suministrada por Agilent Technologies. Cada ensayo se realizó por triplicado. La fase móvil fue una mezcla isocrática de acetonitrilo y buffer fosfato de amonio 10 mM en proporción 35:65 v/v. El flujo utilizado fue 1 mL/min y la detección UV fue desarrollada a 225 nm. Los tiempos de retención fueron los siguientes: ácido mandélico (3,300 min) y mandelato de metilo (5,646 min).

Para la cuantificación del grado de hidrólisis del mandelato de metilo se realizó previamente una curva de calibración para determinar concentraciones en un rango comprendido entre 0,1 mM y 0,5 mM (Ver anexo B).

La actividad específica (AE) se definió como  $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizado por minuto y por miligramo de lipasa pura, y fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$AE = \frac{[S].c.V}{m.t}$$

Donde,

[S] = concentración del sustrato

m = mg de lipasa

c = conversión (tanto por uno)

t = tiempo de reacción (min)

V = volumen de reacción

## 2.10 Determinación del exceso enantiomérico y la enantioselectividad.

A diferentes grados de conversión (entre 10-20% conversión) se analizó el exceso enantiomérico (ee) del ácido formado a través de HPLC en fase reversa como se describe en la sección 2.8.1.

La enantioselectividad fue calculada como la relación de la velocidad inicial de hidrólisis de ambos isómeros puros (hidrólisis alrededor del 10-20% del éster).

Para determinar las variables anteriores, la resolución cinética del mandelato de metilo fue estudiada llevando a cabo la hidrólisis con cada uno de los enantiómeros puros (R y S) bajo las mismas condiciones de reacción y al mismo tiempo, monitoreando periódicamente la concentración del sustrato y del producto formado durante la reacción (ácido mandélico) al mismo tiempo en ambas reacciones.

### 3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 3.1 Hidrólisis de p-NPB catalizada por las lipasas de *C. rugosa* (CRL), *C. antarctica B* (CAL-B), *Lipolyse R* (LRL) y *Alcalignes sp.* (QL).

##### 3.1.1 Efecto del pH sobre la actividad de las lipasas

El cambio de pH provocó cambios en la actividad catalítica de las lipasas. Cada una de las lipasas se caracterizó por expresar su mayor actividad a pH 7, destacándose las lipasas CAL-B y CRL como las más activas (Tabla 1). Éste cambio en la actividad de las lipasas, se atribuye a cambios en la conformación proteica y por tanto en la forma del sitio activo de las lipasas debido a ionizaciones de ciertos restos de aminoácidos, facilitando o no, la entrada del sustrato al sitio activo.

**Tabla 1. Actividad específica de las lipasas CRL, CAL-B, QL y LRL catalizando la hidrólisis de p-NPB a 25°C.** La actividad se definió como: ( $\mu\text{mol}/\text{min.mg}\text{lipasa}$ ). El error relativo se estimó por debajo del 1 %.

LIPASA	ACTIVIDAD ESPECÍFICA					
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
<i>C. rugosa</i>	273,8	331,6	480,5	515,6	462,6	298
<i>C. antarctica B</i>	9,8	12,9	24,07	28,6	19,7	11,2
<i>Alcalignes sp.</i>	1,5	6,4	10,9	13	10,8	4,2
<i>Lipolyse R</i>	0,7	8,9	9,8	12,8	10,7	3,9

### 3.1.2 Especificidad de las lipasas

La marcada diferencia de actividad entre las diferentes lipasas, deja una clara evidencia de una de las principales propiedades catalíticas de las enzimas, su especificidad. Esta propiedad depende de la geometría del sitio activo de las lipasas; aunque éstas presentan el mismo mecanismo catalítico y generalmente el mismo sitio activo, la geometría de este último varía entre una y otra<sup>40</sup>. En este contexto, CRL se caracterizó por ser la más específica para la hidrólisis de p-NPB, con una actividad específica de 515,6 U/mg lipasa a pH 7 (Tabla 1).

La geometría del sitio activo de las lipasas puede ser modificada por el pH, mejorando o no la afinidad de éstas por un sustrato determinado. Ejemplo claro es el observado al comparar QL con LR. Bajo todas las condiciones de pH estudiadas, QL presentó una mayor actividad específica, excepto a pH 5 donde LRL presentó una actividad de 8,9 U/mg lipasa y QL una actividad de 6,4 U/mg lipasa.

### 3.1.3 Estabilidad al pH

Por ser proteínas, las enzimas son muy sensibles al pH. De hecho, la mayoría de las enzimas solo es activa dentro de un estrecho rango de pH. Tomando como 100% la actividad de cada una de las lipasas a pH 7, se comparó cada una de las lipasas estudiadas en términos de estabilidad frente al pH (Figura 2).

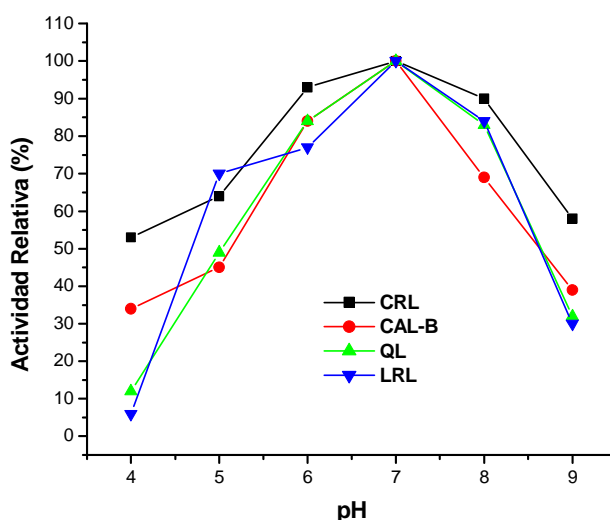
CRL resultó ser la más estable al cambio de pH, conservando más del 50% de actividad aún bajo las condiciones más extremas de pH a que fueron sometidas las lipasas. LRL conservó más del 50% de actividad en un rango de pH entre 5 y

---

<sup>40</sup> Referencia 8.

8. Finalmente, CAL-B y QL, conservaron más del 50% de actividad en un rango de pH entre 6 y 8.

Si tenemos en cuenta sólo las condiciones extremas de pH, en orden decreciente, la CRL fue la más estable, seguida de la CAL-B, la QL y la LRL. Además, la CAL-B resultó ser muy sensible al cambiar de pH 7 a un pH básico.



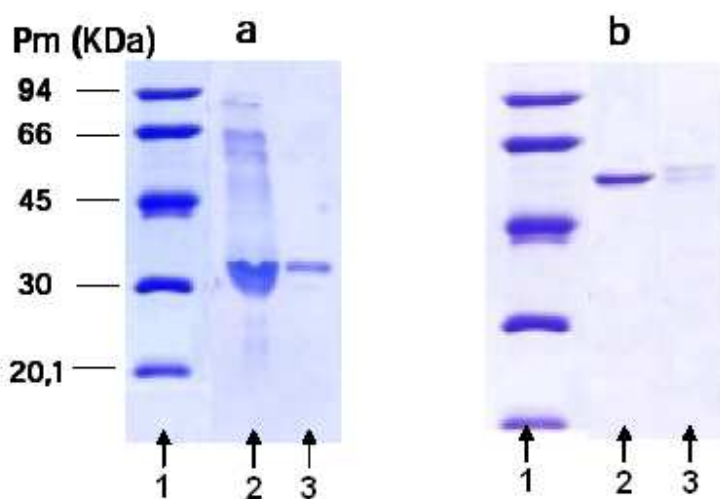
**Figura 2. Porcentaje de actividad relativa de CRL, CAL-B, QL y LRL catalizando la hidrólisis de p-NPB a 25°C y diferentes condiciones de pH.**

Es claro, con base en lo anterior, que la estabilidad al pH es propia de cada biocatalizador, y aún cuando una lipasa resultó ser más estable que otra, en general, hay una pérdida razonable de actividad en las lipasas por efecto del cambio de pH.

### 3.2 Purificación de las Lipasas

Para estudiar la existencia de estructuras macromoleculares de las lipasas y su influencia en las propiedades funcionales de la misma, es necesario trabajar con lipasas puras. La purificación de las diferentes lipasas se realizó a través de la adsorción interfacial sobre geles octil-agarosa a baja fuerza iónica y pH 7 (pH al

que cada una de las lipasas estudiadas presentó mayor actividad), obteniéndose una inmovilización cuantitativa y rápida como está descrito en la literatura<sup>41</sup>, confirmándose por electroforesis en condiciones desnaturalizantes la adsorción únicamente de la lipasa sobre el soporte (Figura 3). El seguimiento del proceso se llevó a cabo mediante el ensayo de hidrólisis de p-NPB, monitoreando la actividad de la suspensión y el sobrenadante, además de la concentración de proteína en el sobrenadante, durante la inmovilización.



**Figura 3.** Electroforesis SDS-PAGE de las preparaciones de la lipasa de *Candida rugosa* y *Candida antarctica B*: **a)** Carril 1. Marcadores de bajo peso molecular. Carril 2. Preparación comercial de CAL-B. Carril 3. CAL-B adsorbida sobre octil agarosa. **b)** Carril 1. Marcadores de bajo peso molecular. Carril 2. Preparación comercial de CRL. Carril 3. CRL adsorbida sobre octil agarosa. La electroforesis de las otras dos lipasas no fue realizada debido a que sólo la CAL-B y la CRL fueron utilizadas para llevar a cabo la resolución del mandelato de metilo (compuesto de interés).

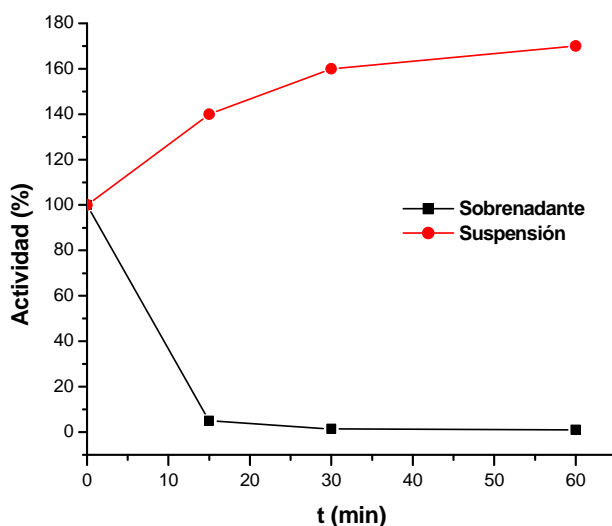
### 3.2.1 Inmovilización de CAL-B

La inmovilización de CAL-B sobre octil-agarosa transcurrió de forma rápida (1 hora). El 99% de la actividad fue adsorbido por el soporte (Figura 4); el 1% restante de actividad se atribuye a esterases o lipasas presentes en el extracto de

<sup>41</sup> Referencia 15 (a).

CAL-B que no pueden ser adsorbidas por el soporte octil agarosa. La carga enzimática del derivado obtenido fue 4,082 mg CAL-B/g octil-agarosa.

Durante el proceso de inmovilización se observó un aumento de la actividad enzimática por un factor hasta de 1,7 aproximadamente. Éste efecto se ha observado cuando las lipasas son activadas interfacialmente contra soportes hidrofóbicos, y se explica por el hecho de que la lipasa se encuentra ahora en su forma abierta y forma disociada<sup>42</sup>.



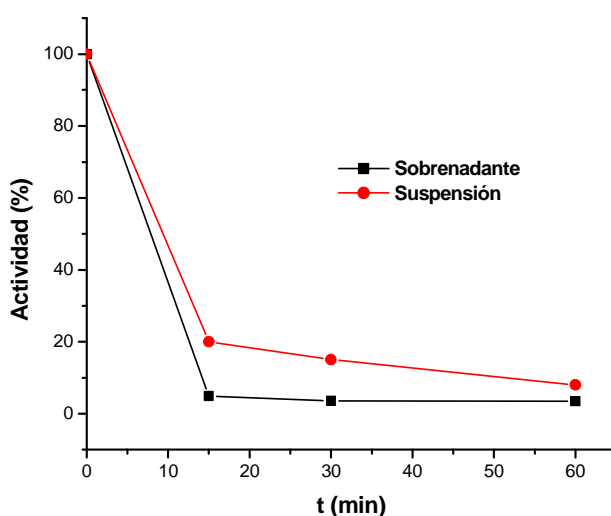
**Figura 4. Cinética de la inmovilización de CAL-B en octil-agarosa.** Los experimentos se desarrollaron como se describe en la parte experimental.

### 3.2.2 Inmovilización de CRL

Al igual que la CAL-B, la inmovilización de CRL sobre octil-agarosa ocurrió en 1 hora. El 97% de la actividad fue adsorbido por el soporte (Figura 5); el 3% restante se atribuye a esterasas o lipasas presentes en el extracto de CRL que no pueden ser adsorbidas por el soporte octil-agarosa. La carga enzimática del derivado obtenido fue 2,202 mg CRL/g octil-agarosa.

<sup>42</sup> Referencia 5.

Durante el proceso de adsorción, no se observó el efecto de hiperactivación de la actividad enzimática, sin embargo, al comparar la actividad del sobrenadante con la de la suspensión, ésta última siempre presentó una mayor actividad durante el proceso de inmovilización. Debido a que no hubo una pérdida total de la actividad enzimática, esto se atribuye a restricciones difusionales, que ya sean externas o internas, pueden ser superadas por aumentar la concentración del sustrato o disminuir la concentración de enzima a ser inmovilizada<sup>43</sup>.



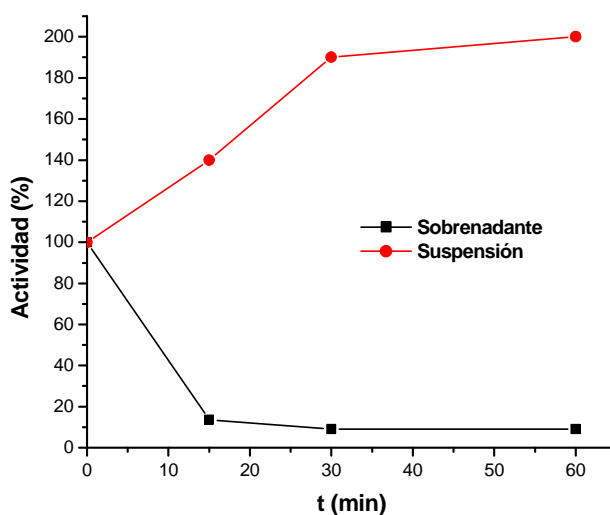
**Figura 5. Cinética de la inmovilización de CRL en octil-agarosa.** Los experimentos se desarrollaron como se describe en la parte experimental.

### 3.2.3 Inmovilización de QL

La inmovilización de QL también transcurrió en 1 hora, lográndose la adsorción del 91% de la actividad (Figura 6), el 9% restante se atribuye a esterasas o lipasas presentes en el extracto de QL que no pueden ser adsorbidas por el soporte octil-agarosa. La carga enzimática del derivado obtenido fue 1,275 mg QL/g octil-agarosa.

<sup>43</sup> Goldstein, L. *Methods Enzymol.* **1976**, 44, 397-443.

Durante la adsorción de QL sobre el soporte octil-agarosa se obtuvo un incremento de la actividad enzimática hasta por un factor de 2.

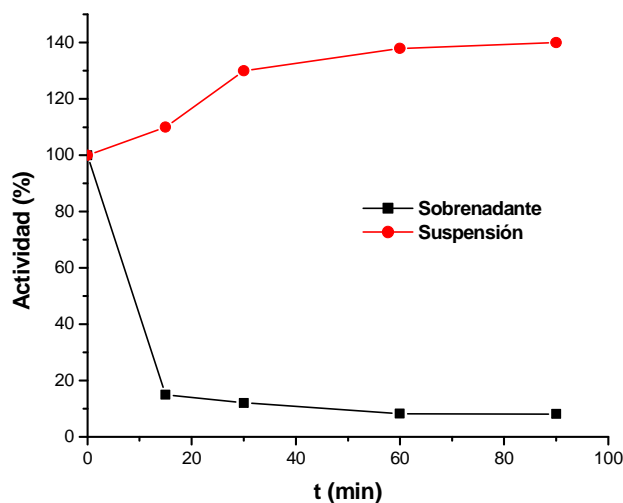


**Figura 6. Cinética de la inmovilización de QL en octil-agarosa.** Los experimentos se desarrollaron como se describe en la parte experimental.

### 3.2.4 Inmovilización de LRL

La inmovilización de LRL transcurrió de una forma rápida aunque en un mayor tiempo comparada con las otras lipasas (90 min). El soporte octil-agarosa adsorbió el 95% de la actividad disponible (Figura 7), el 5% de actividad restante en el sobrenadante se debe a esterasas o lipasas no disponibles para ser adsorbidas por el soporte. La carga enzimática del derivado obtenido fue 1,368 mg LRL/g octil-agarosa.

La inmovilización de LRL permitió ver un incremento de la actividad enzimática hasta por un factor de 1,4.



**Figura 7. Cinética de la inmovilización de LRL en octil-agarosa.** Los experimentos se desarrollaron como se describe en la parte experimental.

### 3.3 Comparación de la actividad de la enzima soluble con la enzima inmovilizada en octil-agarosa en la hidrólisis de p-NPB.

Durante el proceso de inmovilización de la mayoría de las lipasas se observó el efecto de hiperactivación enzimática que se obtiene al activar interfacialmente las lipasas contra soportes hidrofóbicos.

Cada derivado octil-agarosa de las diferentes lipasas fue probado en la hidrólisis de p-NPB a pH 7, observándose un incremento de la actividad en los derivados inmovilizados octil-agarosa de CAL-B, QL y LRL (Tabla 2). El derivado inmovilizado octil-agarosa de CRL, por el contrario, presentó una pérdida de actividad, la cual se debe a restricciones difusionales y no a una inactivación de la enzima<sup>44</sup>.

<sup>44</sup> Referencia 42.

**Tabla 2. Actividad específica y relativa de los derivados inmovilizados octil-agarosa de CRL, CAL-B, QL y LRL con p-NPB.** La actividad específica se define como: ( $\mu\text{mol}/\text{min.mg lipasa}$ ). Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato 25mM pH 7.

DERIVADO INMOVILIZADO	ACTIVIDAD ESPECÍFICA	ACTIVIDAD RELATIVA
soluble CRL	515,6	1
octil-agarosa-CRL	122,3	0,24
soluble CAL-B	28,6	1
octil-agarosa-CAL-B	48,01	1,7
soluble QL	13	1
octil-agarosa-QL	35,8	2,8
soluble LRL	12,8	1
octil-agarosa-LRL	25,4	2

El aumento de actividad en los derivados inmovilizados octil-agarosa de las lipasas, se debe a que ahora la enzima está en su forma abierta, pues ha sido activada interfacialmente por la interacción con el soporte octil-agarosa, el cual se caracteriza por ser altamente hidrofóbico<sup>45</sup>.

Las lipasas que presentaron mayor actividad tanto en forma soluble como inmovilizada fueron la CRL y la CAL-B, por tanto, estas dos lipasas fueron escogidas para realizar los posteriores ensayos experimentales.

### 3.4 Efecto del Tritón X-100 sobre la actividad de CAL-B y CRL en la hidrólisis de p-NPB.

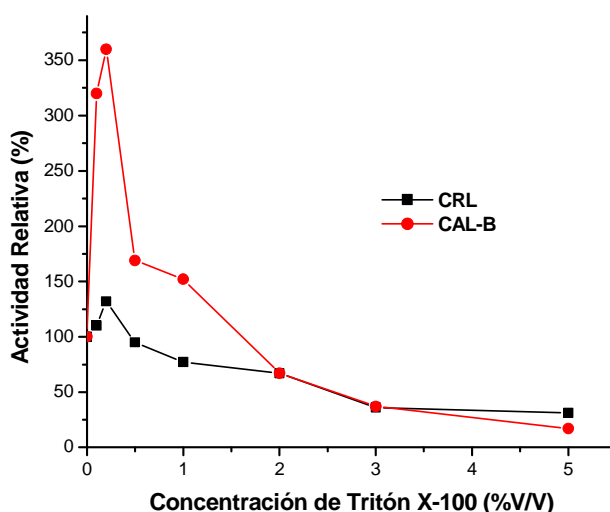
El efecto que causa el Tritón X-100 en la actividad de la CAL-B y la CRL se presenta en la Figura 8. Bajas concentraciones de detergente provocaron un incremento en la actividad de la CAL-B por más del 300% de la actividad inicial y alrededor del 130% en la actividad de la CRL. Sin embargo, tanto para la CAL-B como para la CRL hubo una concentración de detergente después de la cual se

<sup>45</sup> Referencia 5.

observó una disminución de la actividad: 2% para la CAL-B y 0,5% para la CRL. El mismo efecto ha sido reportado con lipasas como la *Alcaligenes sp*<sup>46</sup>.

El hecho de que la lipasa CAL-B presente mayor activación que la CRL a concentraciones bajas de Tritón X-100, indica una mayor presencia de agregados bimoleculares en dicha lipasa. Ante la carencia de una verdadera tapadera (lid) en la CAL-B, la formación de dímeros es menos probable en esta lipasa que en la CRL, sin embargo, la formación de tales agregados bimoleculares depende también de la concentración de enzima. Esto se verifica en los resultados obtenidos, pues la CRL se utilizó en una concentración menor que la CAL-B.

Por otra parte, a concentraciones altas de detergente (5%) la lipasa de CRL resultó ser más estable, esto puede deberse a que los monómeros de CRL son estabilizados por una mayor cantidad de interacciones hidrofóbicas respecto a la CAL-B.



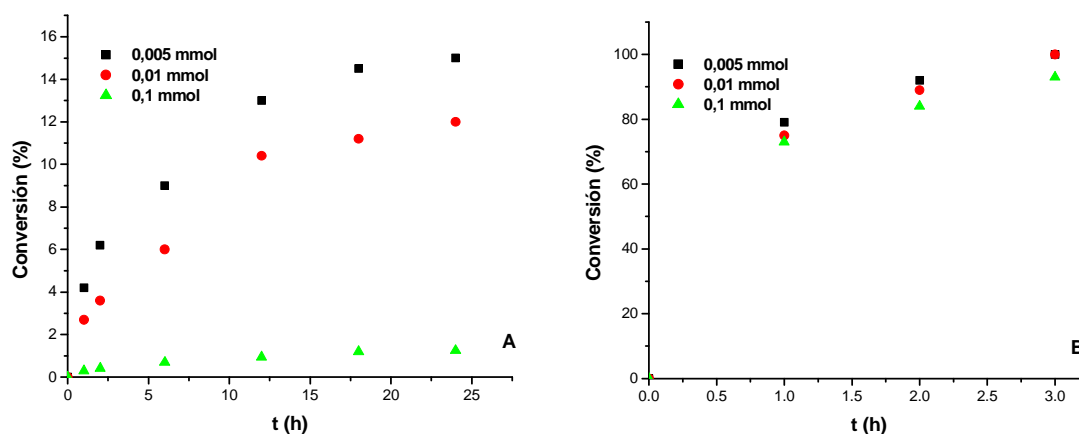
**Figura 8. Efecto del Tritón X-100 en la actividad CRL y CAL-B.** Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato 25mM pH 7.

<sup>46</sup> Wilson, L.; Palomo, J.; Fernández-Lorente, G.; et al. *Enzyme and Microbial Technology*. **2006**, 39, 259-264.

### 3.5 Hidrólisis enantioselectiva de mandelato de metilo.

#### 3.5.1 Efecto de la concentración de (RS)-mandelato de metilo.

El efecto de la concentración de (RS)-mandelato de metilo fue estudiado tanto para el derivado inmovilizado octil-agarosa-CAL-B como para el derivado octil-agarosa-CRL en el rango de 0,005-0,1 mmol bajo las mismas condiciones (Figura 9). Con ambos derivados se observó que la velocidad de reacción decrece al aumentar la cantidad de mandelato de metilo, lo cual puede deberse a la inhibición de la enzima por el ácido mandélico y metanol formado durante la reacción. Tipos de inhibición similares han sido reportados con otras lipasas con ácido mandélico y metanol<sup>47</sup>.



**Figura 9. Efecto de la concentración de (RS)-mandelato de metilo sobre la conversión alcanzada en reacciones catalizadas por octil-agarosa-CRL (A) y octil-agarosa-CAL-B (B). Las reacciones fueron llevadas a cabo a 25°C en buffer fosfato de potasio 25mM pH 7 y 0,2 g de derivado inmovilizado.**

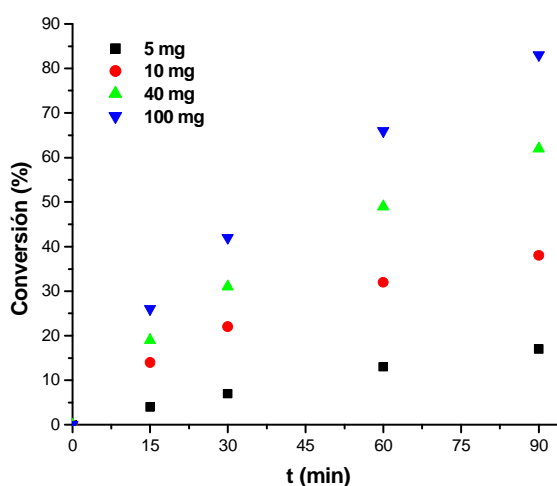
Puesto que el derivado inmovilizado octil-agarosa-CAL-B resultó ser el más activo y menos susceptible a la concentración de sustrato en la hidrólisis de (RS)-mandelato de metilo comparado con el derivado octil-agarosa-CRL bajo las

<sup>47</sup> Heinsman, N.; Valente, H.; Smienk, A.; et al. *Biotechnology and Bioengineering*. **2001**, 76, 194.

mismas condiciones, la CAL-B fue escogida para realizar los posteriores ensayos experimentales.

### 3.5.2 Efecto de la cantidad de biocatalizador.

El efecto de la cantidad de catalizador fue estudiado en el rango de 5-50 mg del derivado inmovilizado octil-agarosa-CAL-B. Al aumentar la cantidad de catalizador incrementó la velocidad de reacción. Una conversión máxima de 17, 38, 62 y 83% de (RS)-mandelato de metilo fue obtenida en 90 min en la presencia de 5, 10, 40 y 100 mg de catalizador respectivamente. El aumento de la velocidad de reacción con la cantidad de catalizador indica que la reacción está cinéticamente controlada.



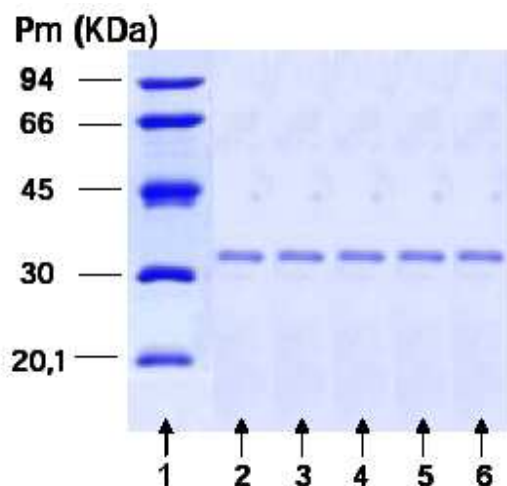
**Figura 10. Efecto de la cantidad de biocatalizador en la conversión de (RS)-mandelato de metilo.** Las reacciones se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato de potasio 25mM pH 7 y 0,01 mmol de mandelato de metilo.

La figura 10 muestra que aumentar la cantidad de biocatalizador de 5-10 mg incrementa la conversión por 21% al igual que lo hace variar la cantidad de catalizador de 40-100 mg, sin embargo, este último es un aumento más significativo. De igual forma, variar la cantidad de catalizador de 10-40mg promovió un aumento de la conversión por sólo un 24%. Este resultado indicaría

que se estarían produciendo limitaciones de transferencia de masa, las cuales serían impuestas al utilizar una cantidad de catalizador mayor de 10 mg.

### 3.5.3 Inmovilización de CAL-B en soportes epóxidos multifuncionales.

La CAL-B fue inmovilizada sobre soportes epóxidos multifuncionales en presencia de 1% de Tritón X-100 luego de la desorción del soporte octil-agarosa, previniendo así la inmovilización de agregados bimoleculares de la lipasa, los cuales pueden tener propiedades diferentes respecto de los monómeros<sup>48</sup>. El seguimiento del proceso se hizo mediante el ensayo de hidrólisis de p-NPB y se verificó por electroforesis SDS-PAGE (Figura 11).

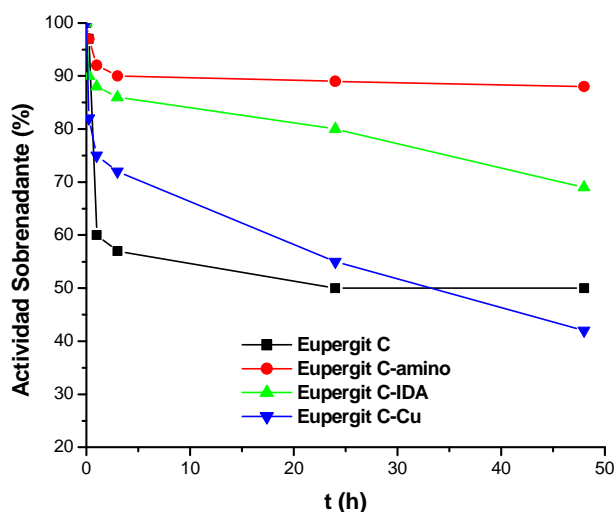


**Figura 11.** Electroforesis SDS-PAGE de los derivados inmovilizados de lipasa de *Candida antarctica B*: Carril 1. Marcadores de bajo peso molecular. Carril 2. CAL-B desorbida del soporte octil agarosa. Carril 3. CAL-B inmovilizada sobre Eupergit C. Carril 4. CAL-B inmovilizada sobre Eupergit C-amino. Carril 5. CAL-B inmovilizada sobre Eupergit C-IDA. Carril 6. CAL-B inmovilizada sobre Eupergit C-IDA-Cu.

El porcentaje de actividad enzimática inmovilizada en los diferentes soportes se muestra en la figura 12. Los soportes que inmovilizaron una mayor actividad fueron el Eupergit C y el Eupergit C-Cu, 50% y 58% respectivamente. El Eupergit

<sup>48</sup> Referencia 6.

C-IDA inmovilizó un 31% de la actividad enzimática disponible y el Eupergit C-amino inmovilizó sólo un 12%.



**Figura 12. Cinética de la inmovilización de CAL-B en soportes epóxidos multifuncionales.** Los experimentos se desarrollaron como se indica en la parte experimental.

Bajo las condiciones de inmovilización utilizadas, no fue posible inmovilizar con ninguno de los soportes toda la actividad enzimática presente, sin embargo, se pudo obtener diferentes derivados inmovilizados de CAL-B. De esta forma, se ha logrado conferir a la CAL-B distintas orientaciones de acuerdo a los grupos funcionales de cada soporte, cambiando así la geometría del sitio activo de dicha lipasa.

El hecho de que la enzima haya sido inmovilizada en presencia de Tritón X-100 en el soporte Eupergit C, podría deberse principalmente a que la concentración de detergente utilizada no es suficiente para impedir la adsorción hidrofóbica de la CAL-B a dicho soporte.

El bajo porcentaje de actividad enzimática inmovilizada en el soporte EC-amino, puede atribuirse a que la CAL-B presenta poca carga negativa bajo las condiciones utilizadas o a una cantidad insuficiente de grupos epóxidos

modificados del soporte EC. Cuando se usaron estos soportes multifuncionales, la adsorción física de la enzima fue el primer paso de la inmovilización. Por ejemplo, el EC-IDA inmovilizó un 31% de la actividad enzimática disponible, pero este mismo soporte con cobre adsorbido en los grupos IDA inmovilizó un 58%. En general, la optimización del proceso de inmovilización depende no sólo de las condiciones del proceso, sino de la modificación parcial de los grupos epóxidos del soporte EC.

### 3.5.4 Estabilidad térmica de los derivados inmovilizados de CAL-B.

Las constantes de inactivación térmica de los diferentes derivados inmovilizados de CAL-B se muestran en la tabla 3. Cada uno de los derivados inmovilizados presenta una constante de inactivación diferente a una temperatura determinada. El derivado de Eupergit C presentó una menor constante de inactivación para todas las temperaturas estudiadas [0,003 (60 °C), 0,012 (70°C) y 0,018 (80°C)]. Por su parte, el derivado de Eupergit t C-IDA-Cu, presentó siempre una mayor constante de inactivación.

**Tabla 3. Constantes de inactivación térmica de los diferentes derivados inmovilizados de CAL-B.** Los experimentos fueron realizados como se indica en la parte experimental.

DERIVADO INMOVILIZADO	$K_{\text{inactivación}} \text{ (min}^{-1}\text{)}$		
	60°C	70°C	80°C
soluble CAL-B	0,118	0,131	0,215
EC-CAL-B	0,003	0,012	0,018
EC-IDA-CAL-B	0,005	0,016	0,023
EC-Cu-CAL-B	0,016	0,033	0,046
EC-amino-CAL-B	0,011	0,023	0,032

Cabe resaltar que los derivados inmovilizados conservaron siempre un mismo orden de estabilidad para cada una de las temperaturas analizadas, siendo todos más estables que la enzima soluble. Así por ejemplo, EC-IDA-CAL-B fue a 60 °C casi 40 veces más estable que la preparación soluble de CAL-B y el EC-

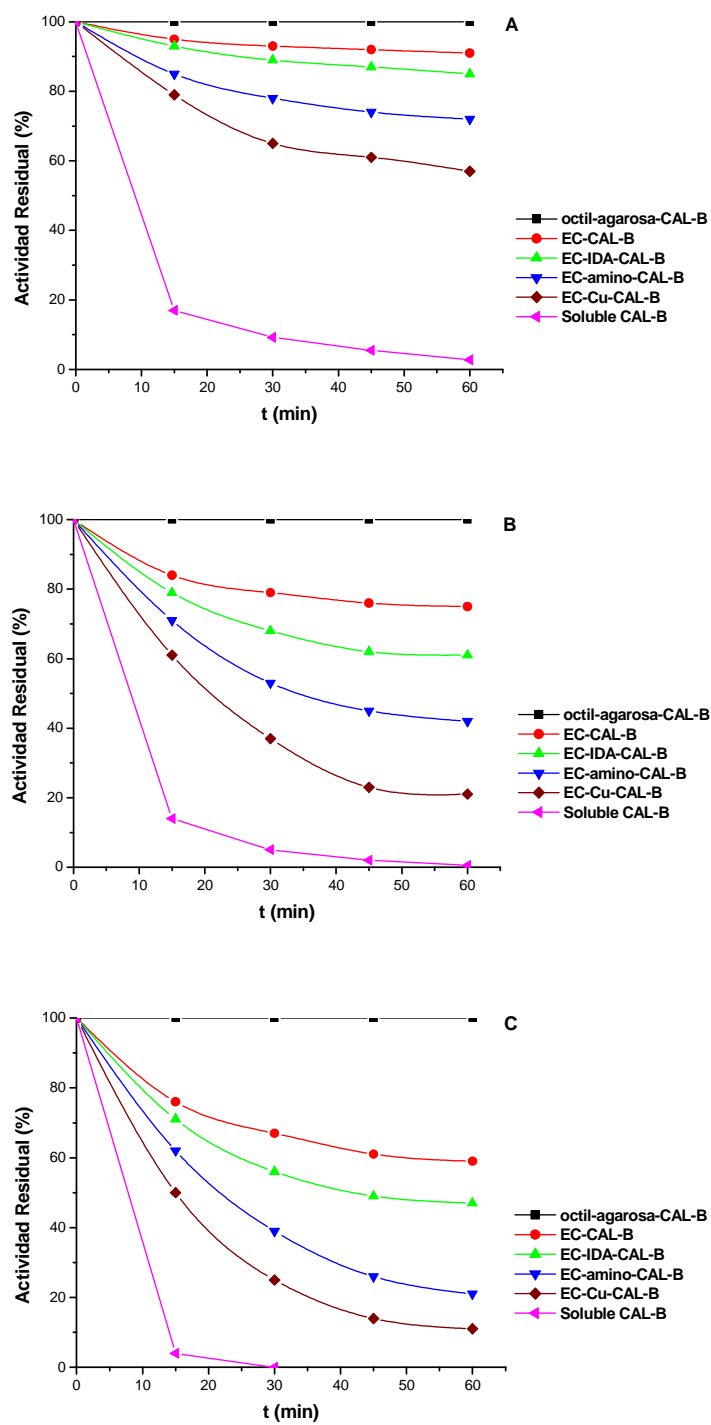
CAL-B fue 12 veces más estable que la enzima soluble a 80°C, lo cual demuestra la efectividad de la inmovilización como técnica de estabilización de las enzimas.

La figura 13 muestra la cinética de inactivación de los diferentes derivados inmovilizados. Aquí se puede apreciar que la enzima soluble pierde casi toda su actividad a 70°C y que la pérdida de actividad es total a 80°C, mientras los diferentes derivados inmovilizados siguen conservando parte de su actividad, destacándose el derivado de Eupergit C, que conserva más del 60% de su actividad aún a la temperatura más crítica a que fueron sometidos los diferentes derivados inmovilizados, y el derivado de octil-agarosa el cual conservó siempre el 100% de su actividad.

El hecho que el derivado inmovilizado de octil-agarosa no se haya inactivado, puede atribuirse a que la enzima se adsorbería a este soporte generalmente por el sitio activo, así este último no sería afectado de igual manera que en los otros soportes, en los cuales el sitio activo se encuentra más expuesto. A pesar de que la inmovilización en los soportes epóxidos heterofuncionales fue llevada a cabo en presencia de una concentración relativamente alta de detergente, se pudieron obtener derivados inmovilizados de CAL-B con una mayor estabilidad térmica respecto a la enzima nativa. Si quisiéramos obtener derivados inmovilizados (a partir de soportes epóxidos) de CAL-B aún más estables térmicamente, se podría pensar en llevar a cabo una inmovilización a baja concentración de detergente o una inmovilización directa de la enzima nativa, es decir, sin previa purificación mediante la utilización del soporte octil-agarosa. De esta forma, no sólo se inmovilizarían los monómeros presentes en la enzima nativa sino los dímeros que puedan estar allí, los cuales, tienden a ser más estables térmicamente que los respectivos monómeros, como en el caso de la lipasa de *Alcaligenes sp.*<sup>49</sup>.

---

<sup>49</sup> Referencia 44.



**Figura 13. Estabilidad de los derivados de CAL-B a diferentes temperaturas y pH 7: T=60°C (A), T=70°C (B) y T=80°C (C). Los experimentos se desarrollaron como se indica en la parte experimental.**

### 3.5.5 Especificidad de los distintos derivados inmovilizados de CAL-B.

La primera propiedad catalítica analizada para los distintos derivados inmovilizados de CAL-B fue la actividad específica en la reacción de hidrólisis de mandelato de metilo.

En primer lugar, la reacción de hidrólisis se realizó a pH 7, con el objetivo de estudiar dos efectos sobre la actividad catalítica de esta lipasa: i) la inmovilización sobre distintos soportes y ii) la naturaleza del sustrato.

Utilizando como sustrato el pNPB o el (R)-mandelato de metilo, el derivado octil-agarosa-CAL-B presentó la actividad específica más alta respecto a la de los demás derivados inmovilizados de CAL-B, seguido del derivado EC-amino-CAL-B. Sin embargo, en orden decreciente de actividad, el derivado EC-IDA-CAL-B presentó una mayor actividad que el derivado EC-Cu-CAL-B en la hidrólisis del (R)-mandelato de metilo, ocurriendo lo contrario en la hidrólisis de pNPB, ya que el derivado EC-Cu-CAL-B fue más activo que el derivado EC-IDA-CAL-B en este caso. Por su parte, el derivado EC-CAL-B fue el derivado inmovilizado con menor actividad en ambos casos.

**Tabla 4. Actividad específica de los diferentes derivados inmovilizados de CAL-B catalizando la hidrólisis de pNPB y (R)-mandelato de metilo a 25°C.** La actividad se definió como: ( $\mu\text{mol}/\text{min.mgbiocatalizador}$ ). El error relativo se estimó en  $\pm 3\%$ .

DERIVADO INMOVILIZADO	p-NPB	(R)-MANDELATO DE METILO		
	pH 7	pH 6	pH 7	pH 8
octil-agarosa-CAL-B	48,01	142	478	136,2
EC-CAL-B	5,6	28	45	26
EC-amino-CAL-B	13,8	120,4	214,3	117
EC-IDA-CAL-B	6,42	41	84	53,3
EC-Cu-CAL-B	8,64	32	50,4	27,2

Cuando se utilizó el isómero R del mandelato de metilo, se observó un aumento significativo en el valor de actividad para todos los derivados inmovilizados respecto a los valores obtenidos para el pNPB, destacándose el derivado EC-amino-CAL-B que presentó una actividad 16 veces mayor (Tabla 4). De tal forma que la inmovilización promovió una afinidad de la enzima por sustratos menos hidrofóbicos en relación al pNPB.

#### ***3.5.5.1 Efecto del pH sobre la actividad de los derivados inmovilizados frente al (R)-mandelato de metilo.***

En este caso, se analizó el efecto de la disminución y aumento del pH (de 7 a 5 y de 7 a 8) sobre la actividad catalítica de los diferentes derivados inmovilizados de CAL-B (Tabla 4).

Tanto el aumento como la disminución del pH conllevaron a una pérdida de la actividad catalítica de los diferentes derivados inmovilizados. Todos los derivados exceptuando el derivado EC-IDA-CAL-B presentaron relativamente mayor actividad a pH 6 que a pH 8. Sin embargo, la actividad a pH 7 y pH 8 para cada uno de los derivados fue muy similar, lo que permite concluir, que la estabilidad de la enzima al pH ha cambiado por efecto de la inmovilización, ya que la enzima nativa presentó una mayor pérdida de actividad al aumentar el pH de 7 a 8.

El efecto anterior se atribuiría a que a pH 8 o pH 6, el bolsillo hidrofóbico de la lipasa no es favorecido, dificultando la entrada del sustrato al sitio activo de la lipasa. Es decir, tales pHs debilitan las interacciones del lid con la superficie de proteína<sup>50</sup>.

---

<sup>50</sup> Referencia 4.

### 3.5.6 Enantioselectividad de los distintos derivados inmovilizados de CAL-B catalizando la hidrólisis de mandelato de metilo

La propiedad catalítica más interesante de las lipasas es la enantioselectividad frente a sustratos quirales. En este caso, analizamos el efecto de la inmovilización sobre la enantioselectividad de la lipasa de *C. antarctica B* en la hidrólisis de (±)-mandelato de metilo.

En las condiciones de pH 7 y 25°C (Tabla 5), todos los derivados inmovilizados presentaron una preferencia estereoquímica similar, hidrolizando el isómero R. El derivado EC-IDA-CAL-B fue el más enantioselectivo (E=27) seguido del derivado EC-CAL-B (E=23), mientras el valor de E más bajo se obtuvo con el derivado octil-agarosa-CAL-B (E=16). Las enantioselectividades encontradas para los demás derivados inmovilizados fueron muy similares (E=19-20).

**Tabla 5. Enantioselectividad de los derivados inmovilizados de CAL-B en la hidrólisis de (±)-mandelato de metilo a 25°C y diferentes condiciones de pH.** ee= exceso enantiomérico del producto alrededor del 10-20% de conversión; E= enantioselectividad.

DERIVADO INMOVILIZADO	Enantiómero preferido	pH 6		pH 7		pH 8	
		ee	E	ee	E	ee	E
octil-agarosa-CAL-B	R	84	13	86	16	88	20
EC-CAL-B	R	89	20	90	23	96	52
EC-amino-CAL-B	R	86	17	88	19	92	26
EC-IDA-CAL-B	R	91	23	91	27	89	20
EC-Cu-CAL-B	R	89	19	88	20	83	12

Aumentar el pH de 7 a 8, promovió un aumento de la enantioselectividad para los derivados octil-agarosa-CAL-B (de 16 a 20), EC-CAL-B (de 23 a 52) y EC-amino-CAL-B (de 19 a 26). Por el contrario, la enantioselectividad se vio afectada dramáticamente para los derivados EC-IDA-CAL-B y EC-Cu-CAL-B, aunque el derivado EC-IDA-CAL-B presentó una enantioselectividad plausible a pH 8.

Por otro lado, un descenso de pH (7 a 6), conllevó a una disminución de la enantioselectividad de todos los derivados de CAL-B, aunque los derivados EC-IDA-CAL-B y EC-CAL-B, permanecieron con una enantioselectividad aceptable.

A pesar que los derivados inmovilizados fueron sometidos a diferentes condiciones experimentales para llevar a cabo la hidrólisis del mandelato de metilo, la enantiopreferencia de éstos no fue afectada.

En general, la inmovilización de CAL-B en los diferentes soportes utilizados, permitió la obtención de derivados con una enantioselectividad mayor de la aceptable para una resolución cinética, destacándose el derivado EC-CAL-B con una enantioselectividad de 52 y un exceso enantiomérico del producto de 96% a pH 8.

Además, cabe resaltar que mediante la metodología de inmovilización utilizada para la inmovilización de CAL-B sobre soportes epóxidos multifuncionales, no sólo se obtuvieron derivados altamente enantioselectivos comparado con otros derivados inmovilizados catalizando la hidrólisis del mandelato de metilo bajo las mismas condiciones de reacción<sup>51</sup>, sino también con una actividad considerablemente alta hacia el mandelato de metilo comparada con derivados inmovilizados de CAL-B (con una actividad entre 1 y 60 U/mg de lipasa) reportados en la literatura<sup>52</sup>, y derivados inmovilizados de otras lipasas<sup>53</sup>.

---

<sup>51</sup> Referencia 5 y 4.

<sup>52</sup> Referencia 2.

<sup>53</sup> Referencia 3 y 4.

#### 4. CONCLUSIONES

- El cambio de pH afectó dramáticamente la actividad de las lipasas solubles CAL-B, CRL, LRL y QL catalizando la hidrólisis de pNPB, y aunque al comparar la actividad de las lipasas una pudo ser más estable al pH que otra, en general se produjo una razonable pérdida de actividad enzimática en cada una de las lipasas por efecto del pH (más del 50% en algunos casos). El efecto anterior se atribuye principalmente a cambios conformacionales en la estructura proteica de las lipasas. Las lipasas solubles más activas catalizando la hidrólisis de p-NPB fueron la CRL (515,6 U/mg de lipasa) y la CAL-B (28,6 U/mg de lipasa)
- Durante la adsorción sobre octil-agarosa de las lipasas utilizadas se pudo observar el efecto de hiperactivación interfacial en las lipasas de *Candida antarctica B*, *Lipolyse R* y *Alcaligenes sp.*, con un aumento de la actividad hasta por un factor de 1,7, 2, y 2,8 respectivamente. Además, esta metodología permitió la purificación e inmovilización en un solo paso, verificándose por electroforesis SDS-PAGE la adsorción de únicamente las lipasas sobre el soporte, aunque la electroforesis sólo se realizó para las enzimas utilizadas en la hidrólisis del mandelato de metilo (CAL-B y CRL).
- El efecto de diferentes concentraciones de Tritón X-100 sobre CAL-B y CRL conllevó a una hiperactivación de la actividad enzimática 3 y 1,3 veces, respectivamente. Esto permitió concluir que incluso a moderadas concentraciones de proteína, las lipasas en solución presentan

fuerte tendencia a auto asociarse (la CRL se utilizó en una concentración menor comparado con la CAL-B), dando una mezcla de estructuras diméricas y monoméricas que pueden complicar la caracterización de las propiedades intrínsecas de la molécula de la lipasa soluble.

Teniendo en cuenta que al parecer las interacciones que estabilizan tales dímeros son de naturaleza hidrofóbica (Esquema 4), la presencia de Tritón X-100 puede dar lugar a la ruptura del dímero, por lo que es completamente necesario la presencia de este detergente para asegurar la estructura monomérica de la lipasa.

- Al evaluar el efecto de la concentración de (R,S)-mandelato de metilo sobre su conversión catalizada por los derivados inmovilizados octil-agarosa-CAL-B y octil-agarosa-CRL, se observó con ambos derivados que la velocidad de reacción disminuye al aumentar la concentración de mandelato de metilo. Este hecho se atribuye a una inhibición de la enzima por parte del ácido mandélico y metanol formado durante la reacción. Tipos de inhibición similares han sido reportados con otras lipasas con ácido mandélico y metanol<sup>54</sup>.
- La inmovilización de CAL-B en soportes epóxidos multifuncionales y en octil agarosa permitió la obtención de diferentes derivados inmovilizados de la misma lipasa. Cada uno de ellos presentó diferentes propiedades catalíticas al ser evaluados en la hidrólisis de distintos sustratos.
- Los derivados inmovilizados de CAL-B fueron mucho más estables térmicamente que la lipasa soluble, la cual pierde casi toda su actividad a 70°C y es completamente inactivada a 80°C, mientras los diferentes derivados inmovilizados siguen conservando parte de su actividad. Por ejemplo, el derivado de Eupergit C fue 12 veces más estable que la enzima soluble a

---

<sup>54</sup> Referencia 46.

80°C, EC-IDA-CAL-B fue a 60 °C casi 40 veces más estable que la preparación soluble de CAL-B, y el derivado de octil-agarosa conservó siempre el 100% de su actividad. Esto demuestra la efectividad de la inmovilización como técnica de estabilización de las enzimas.

- Por otro lado, la metodología de inmovilización utilizada conllevó a obtener derivados no sólo altamente activos comparados con otros derivados de CAL-B y de otras lipasas catalizando la hidrólisis de mandelato de metilo, sino con una enantioselectividad aún mayor de la aceptada para una resolución cinética. El derivado EC-amino-CAL-B resultó ser el más enantioselectivo ( $E=52$ ), obteniéndose el (R)-ácido mandélico con una pureza del 96%.

Esto sugiere que las propiedades de una misma lipasa pueden ser fuertemente moduladas mediante lo que denominamos “ingeniería conformacional”: inmovilización dirigida (alterando la rigidez, la orientación y el microambiente) e ingeniería del medio.

- El hecho de haber obtenido derivados inmovilizados de CAL-B más activos hacia el mandelato de metilo comparado con derivados de esta misma lipasa reportados en la literatura, puede atribuirse principalmente a la presencia de Tritón X-100 durante la inmovilización de esta lipasa en los soportes epóxidos multifuncionales, pues como se dijo previamente, en presencia de Tritón X-100 la lipasa CAL-B sufrió una hiperactivación de la actividad enzimática alrededor de un 300% respecto a la actividad en ausencia del detergente.

## RECOMENDACIONES

La ingeniería conformacional permite el diseño y control de biocatalizadores. En este contexto, es de gran interés seguir investigando acerca de las lipasas, ya que, las propiedades catalíticas de estas pueden ser moduladas mediante el concepto mencionado en principio. Dos sugerencias principales surgen a raíz de este proyecto:

- Inmovilizar la lipasa de *Candida antarctica B* en soportes epóxidos multifuncionales ya sea a bajas concentraciones de detergente o en ausencia de éste, de tal forma que se obtengan derivados inmovilizados con diferentes propiedades catalíticas de los obtenidos en éste trabajo, ya que, mediante esta metodología no sólo se inmovilizarían los monómeros de la lipasa sino sus respectivos agregados bimoleculares.
- Llevar a cabo la inmovilización de la lipasa de *Candida antarctica B* libre de soporte, obteniendo así agregados entrecruzados de dicha enzima (CLEAs de CAL-B), los cuales pueden tener diferentes propiedades respecto a la enzima inmovilizada en los soportes epóxidos heterofuncionales. Evaluando la enantioselectividad de estos agregados en sustratos quirales de interés bajo diferentes condiciones de reacción, sugiriendo la presencia de líquidos iónicos en el medio de reacción.

## REFERENCIAS

Al-Duri, B.; Robinson, E.; McNerlan, S.; Bailie, P. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, *72*, 1351-1359.

Ampon, K.; Basri, M.; Salleh, A.B.; et al. *Biocatalysis*. **1994**, *10*, 341-351.

Basri, M.; Ampon, K.; Yunus, W. M. Z.; et al. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, *72*, 407-411.

Bastida, A.; Sabuquillo, P.; Armisen, P.; et al. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *58*, 486-493.

Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.

Chen, C.-S.; Wu, S.-H.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2812-2817.

Fang, X. P.; Anderson, S. E.; et al. *J. Nad. Prod.* **1991**, *54*, 1034-1043.

Fernández Lorente, G.; Ortiz, C.; Segura, R.; et al. *Wiley Periodicals, Inc.* **2005**, 773-779.

Fernández-Lorente, G.; Palomo, J.; Cabrera, Z.; et al. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 565-569.

Ghanem, Ashraf; Hassan, Y.; Enein, Aboul. *Tetrahedron Asymmetry*. **2004**, 78, 3331-3351.

Goldstein, L. *Methods Enzymol*. **1976**, 44, 397-443.

Grochulski, P.; Li, Y.; Schrag, J.D.; et al. *J. Biol. Chem*. **1993**, 268, 12843-12847.

Grover, P. T.; Bhongle, N. N.; et al. *J. Org. Chem*. **2000**, 65, 6283-6287.

Heinsman, N.; Valente, H.; Smienk, A.; et al. *Biotechnol. Bioeng*. **2001**, 76, 194.

Kazuhiko, T.; Kazuo, O.; et al. *Chem. Pharm. Bull*. **1992**, 40, 1415-1423.

Liou, Y-C.; Marangoni, A.; Yada, R. Y. *Food Res. Int*. **1998**, 31, 243-248.

Mateo, C.; Fernández-Lorente, G.; Abian, A.; et al. *Biomacromolecules*. **2000**, 1, 739-745.

Mateo, C.; Fernández-Lorente, G.; Cortes, E.; et al. *Biotechnol. Bioeng*. **2001**, 76, 269-277.

Mukai, C.; Hirai, S.; Hanaoka, M. *J. Org. Chem*. **1997**, 62, 6619-6626.

Othman, S.; Basri, M.; Hussein, M.; et al. *Food Chem*. **2008**, 106, 437-443.

Palomo, J.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C; et al. *Enzyme and Microbial Technology*. **2002**, 31, 775-783.

Palomo, J.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; et al. *Tetrahedron: Asymm..* **2002**, 13, 1337-1345.

Palomo, J.; Muñoz G.; Fernández-Lorente, G.; et al. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2003**, 21, 201-210.

Pernas, M. A.; López, C.; et al. *FEBS. Lett.* **2001**, 501, 87-91.

Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. *Chemistry and Physics of Lipids.* **1998**, 93, 67-80.

Quintero, G.; Vo, M.; et al. *J. Chromatogr. A.* **1995**, 693, 1-5.

Rua, M. L.; Schmidt-Dannert, C.; et al. *J. Biotechnol.* **1997**, 56, 89-102.

Savidge, T. A. (Vandame, E. J. Ed) Marcel Decker. New York, 1984. 177-224.

Segundo, F.; Carrea, G.; Tarabiono, C.; et al. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* **2006**, 39, 166-170.

Sugiura, M.; Isobe, M. *Chem. Phar. Bull.* **1976**, 24, 72-78.

Taipa, M. A.; Liebeton, K.; Costa, J. V. *Biochim. Biophys. Acta.* **1995**, 1256, 396-402.

Tsubuki, M.; Kanai, K.; Honda, T. *J. Chem. Soc.* **1992**, 1640-1641.

Tsubuki, M.; Kanai, K.; Honda, T. *Synlett.* **1993**, 653-655.

Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; et al. *Structure.* **1994**, 2, 293-308.

Uppenberg, J.; Ohrner, N.; et al. *Biochemistry.* **1995**, 34, 16838.

Wilen, S. H. *Topics in Stereochemistry*. Eliel eds. Vol 6. 1979.

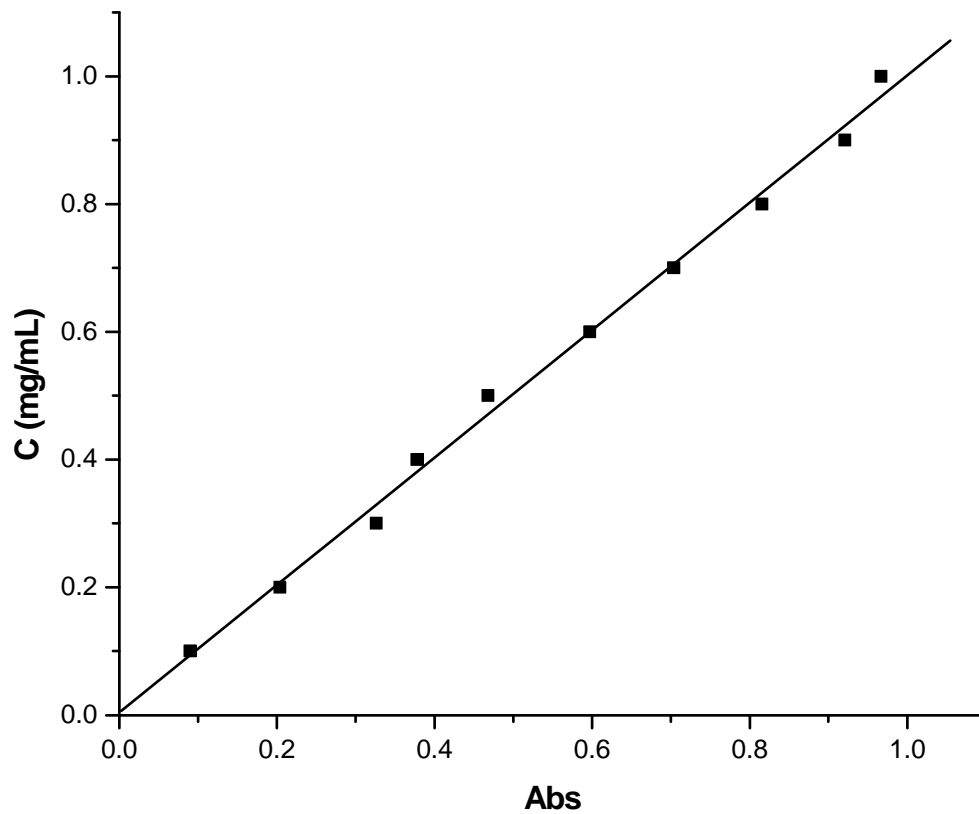
Wilson, L.; Palomo, J.; Fernández-Lorente, G.; et al. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, 39, 259-264.

Xu, D.; Sharpless, K. B. *Tetrahedron lett.* **1994**, 35, 4685-4688.

Yang, Z. C.; Zhou, W. S. *Heterocycles*. **1997**, 45, 367-383.

## ANEXO A

Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford.

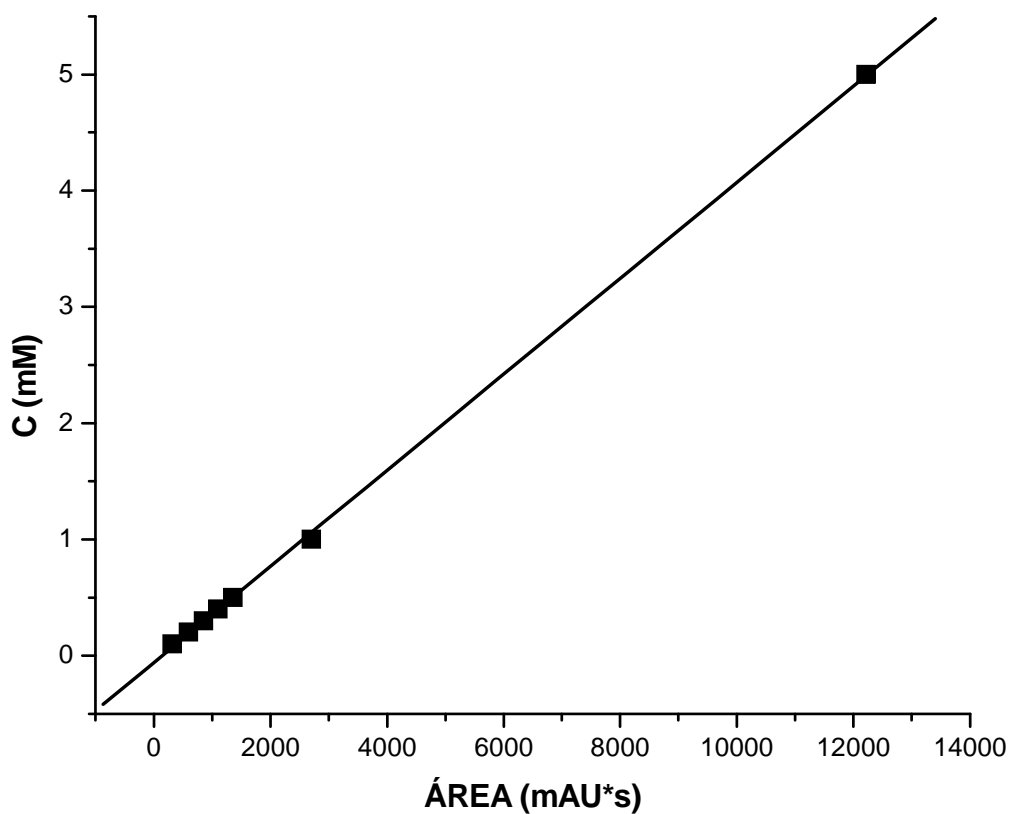


$$C = 0,997 \cdot A + 0,004$$

Donde C es la concentración de proteína en mg/mL y A es la absorbancia a 595 nm.

## ANEXO B

Curva de calibración para la cuantificación del grado de hidrólisis del mandelato de metilo.



$$C = 4,132 \cdot 10^{-04} \cdot A - 0,059$$

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

## DIVULGACIÓN DEL TRABAJO

### Congresos y simposios

- *Poster. “Transformación biocatalítica de ( $\pm$ ) mandelato de metilo utilizando lipasas inmovilizadas”. Escorcía, A., Ortiz, C. y Torres, R. Abstracts del XXVIII Congreso Latinoamericano de Química. San Juan, Puerto Rico. Simposio Bioquímica. Poster BQ-12.*
- *Ponencia Oral. “Resolución cinética de ( $\pm$ ) propranolol y ( $\pm$ ) atenolol via reacciones de acetilación mediante la utilización de lipasas inmovilizadas”. Barbosa, O., Escorcía, A., Ortiz, C. and Torres, R. Simposio de Bioquímica. Oral BQ-01.*

### Papers en Revistas Especializadas en el campo

- “Kinetic resolution of amine-alcohols and esters by insolubilized microbial lipases” Escorcía, A., Ortiz-López, C., Barbosa, O. and Torres, R. Journal of Biotechnology (2008). (in press).