

**DESARROLLO DE NUEVOS SOPORTES EPÓXIDO MULTIFUNCIONALES  
PARA LA INMOVILIZACIÓN DE *CANDIDA ANTARCTICA B.*  
RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (±) PROPRANOLOL**

**CÉSAR ARIZA VILLAMIL**

**Universidad Industrial de Santander  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Química  
Bucaramanga  
2009**

**DESARROLLO DE NUEVOS SOPORTES EPÓXIDO MULTIFUNCIONALES  
PARA LA INMOVILIZACIÓN DE *CANDIDA ANTARCTICA B.*  
RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (±) PROPRANOLOL**

**CÉSAR ARIZA VILLAMIL**

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de  
Químico**

**RODRIGO TORRES SÁEZ -DIRECTOR-  
CLAUDIA ORTIZ LÓPEZ – CO-DIRECTORA-**

**Universidad Industrial de Santander  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Química  
Bucaramanga**

**2009**

## **Dedicatoria**

A Dios por la vida y las bendiciones

A mi familia por su infinito apoyo en especial a mis padres quienes han dado su vida para que yo pudiese realizar este sueño

A mis amigos con quienes compartí esta hermosa etapa de mi vida

Al ángel que el Señor me ha dado para que me cubriera bajo sus alas y me acompañara en este mundo, brindándome su amor en todo momento

## **Agradecimientos**

A Dios, por darme una vida colmada de bendiciones

A mis padres, que han dado cada día de su vida por su hijo

A mis hermanos, en quienes siempre encontré un apoyo incondicional

A mis demás familiares, quienes me han apoyado sin esperar nada a cambio

A Jenny, por su amor, su comprensión, su paciencia y su alegría

Al profe Rodrigo, por darme la oportunidad

Al GIBIP y a todos los que hacen parte de el, por su colaboración y amistad

A mis amigos con quienes compartí momentos duros y felices

A la Universidad Industrial de Santander y en general a la educación pública

## Contenido

	Pág.
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>3. MARCO DE REFERENCIA</b>	<b>4</b>
<b>3.1. ENZIMAS COMO BIOCATALIZADORES</b>	<b>4</b>
<b>3.2. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN</b>	<b>4</b>
<b>3.2.1. Métodos reversibles de inmovilización de Proteínas</b>	<b>7</b>
<b>3.2.1.1. Quelación o enlazamiento metálico.</b>	<b>8</b>
<b>3.2.1.2. Inmovilización de enzimas por medio de soportes epóxidos modificados con quelatos metálicos</b>	<b>9</b>
<b>3.2.2. Inmovilización Irreversible de Proteínas</b>	<b>10</b>
<b>3.2.2.1. Inmovilización de enzimas por unión covalente</b>	<b>11</b>
<b>3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA UNIÓN COVALENTE ENZIMA-SOPORTE</b>	<b>13</b>
<b>3.4. INMOVILIZACIÓN COVALENTE EN SOPORTES ACTIVADOS CON GRUPOS EPÓXIDOS</b>	<b>14</b>
<b>3.5. INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN SOPORTES EPÓXIDO MULTIFUNCIONALES</b>	<b>16</b>
<b>3.6. LIPASAS MICROBIANAS COMO BIOCATALIZADORES INDUSTRIALES</b>	<b>19</b>
<b>3.7. LIPASA DE <i>Candida antarctica</i> B (CAL-B)</b>	<b>24</b>
<b>3.8. ADSORCIÓN DE LAS LIPASAS SOBRE ESTRUCTURAS HIDROFÓBICAS</b>	<b>25</b>
<b>3.9. MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES CATALÍTICAS DE LAS LIPASAS</b>	<b>27</b>
<b>3.10. SOPORTE EPÓXIDO COMERCIAL EUPERGIT® C CON POTENCIAL APLICACIÓN PARA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS</b>	<b>30</b>

<b>3.11. RESOLUCIÓN CINÉTICA CATALIZADA POR LIPASAS</b>	<b>31</b>
3.11.1. Enantioselectividad de lipasas	32
3.11.2. Métodos para la determinación del exceso enantiomérico	34
3.12. Bloqueadores $\beta$ -adrenérgicos	35
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>37</b>
<b>4.1. MATERIALES</b>	<b>37</b>
<b>4.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.</b>	<b>37</b>
<b>4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA</b>	<b>38</b>
<b>4.4. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA</b>	<b>39</b>
4.4.1. Adsorción Interfacial de CAL B en geles de Octil-Agarosa	39
4.4.2. Desorción de la enzima de Octil-Agarosa	39
<b>4.5. MODIFICACIÓN PARCIAL DE LOS SOPORTES EPÓXIDO</b>	<b>40</b>
4.5.1. Soporte aminado (EDA)	40
4.5.2. Soporte iminodiacético (IDA)	41
4.5.3. Soporte Cobre iminodiacético (IDA-Cu)	42
<b>4.6. INMOVILIZACIÓN DE LAS ENZIMAS SOBRE LOS SOPORTES EPÓXIDOS MULTIFUNCIONALES</b>	<b>42</b>
<b>4.7. DESORCIÓN DE LAS PROTEÍNAS UNIDAS NO COVALENTEMENTE AL SOPORTE</b>	<b>43</b>
<b>4.8. PUNTO FINAL DE LA REACCIÓN ENZIMA-SOPORTE</b>	<b>43</b>
<b>4.9. CARACTERIZACIÓN DE LOS SOPORTES MULTIFUNCIONALES</b>	<b>44</b>
4.9.1. Soporte EC-EDA	44
4.9.2. Soporte EC-IDA y EC-IDA-Cu	44
<b>4.10. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA ESTERIFICACIÓN ENANTIOSELECTIVA DE (R/S)-PROPRANOLOL.</b>	<b>45</b>
<b>4.11. ANÁLISIS POR HPLC</b>	<b>46</b>
<b>5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</b>	<b>47</b>

<b>5.1. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA</b>	<b>47</b>
5.1.1. Adsorción Interfacial de CAL B en geles de octil-agarosa	47
5.1.2. Desorción de la enzima del Octil-Agarosa	52
<b>5.2. DESORCIÓN DE LAS PROTEÍNAS UNIDAS NO COVALENTEMENTE AL SOPORTE</b>	<b>53</b>
<b>5.3. EFECTO DEL GRADO DE MODIFICACIÓN DEL SOPORTE</b>	<b>54</b>
5.3.1. Soporte aminado (EDA)	54
5.3.2. Soporte iminodiacético (IDA)	56
5.3.3. Soporte iminodiacético Cobre (IDA-Cu)	58
<b>5.4. EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA EN EL PROCESO DE INMOVILIZACIÓN</b>	<b>62</b>
5.4.1. Soporte Eupergit® C	62
5.4.2. Soporte aminado (EDA)	63
5.4.3. Soporte iminodiacético (IDA)	64
5.4.4. Soporte iminodiacético cobre (IDA-Cu)	65
<b>5.5. EFECTO DEL PH EN EL PROCESO DE INMOVILIZACIÓN</b>	<b>66</b>
5.5.1. Soporte Eupergit® C	67
5.5.2. Soporte Aminado (EDA)	68
5.5.3. Soporte iminodiacético (IDA)	69
5.5.4. Soporte iminodiacético cobre (IDA-Cu)	70
<b>5.6. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS SOPORTES EPÓXIDO</b>	<b>71</b>
5.6.1. Efecto del pH	71
5.6.2. Efecto de la fuerza iónica	73
<b>5.7. RESOLUCIÓN ENANTIOMERICA DEL R/S PROPRANOLOL</b>	<b>75</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>79</b>
<b>7. RECOMENDACIONES</b>	<b>81</b>
<b>8. REFERENCIAS</b>	<b>82</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1</b> Diferentes reacciones catalizadas por lipasas	<b>20</b>
<b>Tabla 2</b> Agentes de desorción correspondientes a cada uno de los soportes epóxido modificados	<b>43</b>
<b>Tabla 3</b> Desorción de las enzimas unidas no covalentemente a los soportes epóxidos multifuncionales	<b>53</b>
<b>Tabla 4</b> Condiciones de modificación con grupos EDA del soporte epóxido comercial. Efecto en la adsorción e Inmovilización covalente de la CAL B	<b>55</b>
<b>Tabla 5</b> Condiciones de modificación con grupos IDA del soporte epóxido comercial. Efecto en la adsorción e inmovilización covalente de la CAL B	<b>57</b>
<b>Tabla 6</b> Condiciones de modificación con grupos IDA-Cu del soporte epóxido comercial. Efecto en la adsorción e inmovilización covalente de la CAL B	<b>59</b>
<b>Tabla 7</b> Porcentajes de actividad residual retenida por los diferentes soportes empleados a diferentes valores de fuerza iónica	<b>73</b>
<b>Tabla 8</b> Conversiones, valores de exceso enantiomérico y valores de E obtenidos para la reacción de acetilación con acetato de vinilo del (R/S)-Propranolol catalizada por los derivados inmovilizados de CAL B	<b>76</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1</b> Métodos de insolubilización de proteínas por inmovilización reversible	<b>8</b>
<b>Figura 2</b> Inmovilización reversible por medio de complejos soporte-metal	<b>9</b>
<b>Figura 3</b> Técnicas de inmovilización enzimática irreversible	<b>11</b>
<b>Figura 4</b> Procesos de inmovilización a pH 10	<b>13</b>
<b>Figura 5</b> Mecanismo de inmovilización de los soportes epóxidos	<b>15</b>
<b>Figura 6</b> Inmovilización covalente de enzimas en soportes Amino-Epóxido obtenidos por modificación de una pequeña fracción de los grupos epóxidos contenidos en el soporte	<b>17</b>
<b>Figura 7</b> Conversión del triacilglicerol en glicerol y un ácido graso catalizada por lipasas	<b>19</b>
<b>Figura 8</b> Equilibrio entre la conformación abierta y cerrada de la lipasa	<b>21</b>
<b>Figura 9</b> Activación interfacial de lipasas con interfases hidrofóbicas	<b>22</b>
<b>Figura 10</b> Equilibrio entre las distintas conformaciones de lipasas en medios acuosos homogéneos	<b>23</b>
<b>Figura 11</b> CAL B en la cual se observa un sustrato en el sitio activo de la enzima	<b>24</b>
<b>Figura 12</b> Adsorción de lipasas sobre distintas estructuras hidrofóbicas	<b>25</b>
<b>Figura 13</b> Modulación de las propiedades catalíticas por ingeniería del medio de reacción	<b>28</b>
<b>Figura 14</b> Estructura del Eupergit® C e inmovilización covalente de	

	una enzima	30
<b>Figura 15</b>	Estructuras del Atenolol y Propranolol, dos de los bloqueadores $\beta$ -adrenérgicos más empleados en el mercado	36
<b>Figura 16</b>	Reacción de hidrólisis del PNPB	38
<b>Figura 17</b>	(A)Micela de Tritón x-100 formada con proteínas hidrofílicas. (B)La estructura molecular del Tritón X-100	40
<b>Figura 18</b>	Síntesis del soporte epóxido parcialmente modificado con Etilendiamina, Eupergit <sup>®</sup> C-EDA	41
<b>Figura 19</b>	Síntesis del soporte epóxido parcialmente modificado con Ácido Iminodiacético, Eupergit <sup>®</sup> C-IDA.	41
<b>Figura 20</b>	Síntesis del soporte epóxido parcialmente modificado con Ácido Iminodiacético, Eupergit <sup>®</sup> C-IDA-Cu	42
<b>Figura 21</b>	Reacción de acetilación del (R/S)-propranolol catalizado por CAL B	45
<b>Figura 22</b>	Adsorción interfacial de la CAL B sobre Octil-agarosa.	47
<b>Figura 23</b>	Cinética de la inmovilización de extractos crudos de CAL B sobre octil-agarosa	48
<b>Figura 24</b>	Electroforesis SDS-PAGE de la CAL B	49
<b>Figura 25</b>	Mecanismo propuesto de la formación de especies diméricas de CAL B	50
<b>Figura 26</b>	Inmovilización de la CAL B en Octil Agarosa. Efecto de la fuerza iónica en el proceso de adsorción	51
<b>Figura 27</b>	Efecto de la concentración del tensoactivo Tritón X-100 en la desorción de la lipasa CAL B	52
<b>Figura 28</b>	Efecto del grado de modificación del soporte EC-EDA en la inmovilización covalente de la CAL B	55
<b>Figura 29</b>	Efecto del grado de modificación del soporte EC-EDA en	

	la adsorción de la CAL B sobre EC-EDA	56
<b>Figura 30</b>	Efecto del grado de modificación del soporte en la inmovilización covalente de CAL B sobre EC-IDA	57
<b>Figura 31</b>	Efecto del grado de modificación del soporte en la adsorción de CAL B sobre EC-IDA	58
<b>Figura 32</b>	Efecto del grado de modificación del soporte sobre la inmovilización covalente de CAL B sobre EC-IDA-Cu	60
<b>Figura 33</b>	Efecto del grado de modificación del soporte sobre la adsorción de CAL B sobre EC-IDA-Cu	60
<b>Figura 34</b>	Efecto del grado de modificación en los soportes epóxidos parcialmente modificados	61
<b>Figura 35</b>	Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre EC. Efecto de la fuerza iónica en el proceso de inmovilización	62
<b>Figura 36</b>	Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre EC-EDA. Efecto de la fuerza iónica en el proceso de inmovilización	63
<b>Figura 37</b>	Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre EC-IDA. Efecto de la fuerza iónica en el proceso de inmovilización.	65
<b>Figura 38</b>	Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre EC-IDA-Cu. Efecto de la fuerza iónica en el proceso de inmovilización	65
<b>Figura 39</b>	Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre EC. Efecto del pH en proceso de inmovilización.	67
<b>Figura 40</b>	Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre EC-EDA. Efecto del pH en el proceso de inmovilización.	68
<b>Figura 41</b>	Porcentaje de Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre EC-IDA. Efecto del pH	69
<b>Figura 42</b>	Porcentaje de Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre EC-IDA-Cu. Efecto del pH	70
<b>Figura 43</b>	Efecto del pH sobre la expresión de actividad lipasa en	

	los diferentes soportes	<b>72</b>
<b>Figura 44</b>	Porcentaje de inmovilización de los soportes. Efecto fuerza iónica	<b>73</b>
<b>Figura 45</b>	Actividad expresada Soportes condiciones mejoradas	<b>74</b>

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
<b>Anexo 1</b> Curva de calibración para la determinación de la cantidad de proteína por el método del Bradford	<b>102</b>
<b>Anexo 2</b> Curva de Calibración para cuantificación de de Cobre por Absorción Atómica	<b>102</b>
<b>Anexo 3</b> Calculo de la actividad específica de la CAL B	<b>103</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **CAL-B**: Lipasa de *Candida Antarctica* B
- **CRL**: Lipasa de *Candida Rugosa*
- **EC**: Eupergit® C
- **EDA**: Etilendiamina
- **IDA**: Ácido Iminodiacético
- **IDA-Cu**: Quelato de Ácido Iminodiacético-Cobre
- **CLE**: Enzimas unidas por entrecruzamiento
- **CLECs**: Cristales de enzimas unidas por entrecruzamiento
- **CLEAs**: Agregados de enzimas unidas por entrecruzamiento
- **SDS-PAGE**: electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sódio
- **pNPB**: p-Nitrofenilbutirato
- **E**: Relación enantiomérica
- **ee<sub>s</sub>**: exceso enantiomérico del sustrato

## RESUMEN

**TITULO: DESARROLLO DE NUEVOS SOPORTES EPÓXIDO MULTIFUNCIONALES PARA LA INMOVILIZACIÓN DE *Candida Antarctica B*. RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (±) PROPRANOLOL**

Ariza Villamil, César.

Palabras Clave: Lipasa CAL-B, inmovilización enzimática. soportes epóxidos, resolución cinética, (R/S) Propranolol

Los soportes activados con grupos epóxido son capaces de reaccionar químicamente con los grupos nucleófilos que se encuentran en la superficie de las proteínas: lisina, histidina, cisteína, tirosina, etc. Además, los grupos epóxidos son elevadamente estables a diferentes valores de pH. Estas propiedades permiten obtener una unión covalente intensa entre la proteína y el soporte. La preparación de diferentes soportes epóxidos modificados parcialmente se llevó a cabo en esta investigación con el fin de inmovilizar la enzima lipásica de origen bacteriano. *Candida antarctica B* purificada en octil-agarosa. Esta enzima fue inmovilizada covalentemente en los diferentes soportes epóxido (soporte epóxido comercial, soporte comercial epóxido-etilendiamina, soporte epóxido comercial-iminodiacético, soporte epóxido comercial-iminodiacético-quelato de Cobre). Estos derivados inmovilizados fueron utilizados bajo diferentes condiciones (valores de pH entre 4 y 10 y fuerza iónica entre 5 y 1000mM) en la resolución cinética del éster del (R,S)- Propranolol; ya que la síntesis de este compuesto enantioméricamente puro es de interés industrial ya que es uno de los fármacos más utilizados a nivel mundial para enfermedades de tipo cardiovascular. Se comprobó que las diferentes propiedades catalíticas del derivado inmovilizado (actividad, especificidad y enantioselectividad), dependen particularmente del tipo de soporte utilizado en la inmovilización. Por ejemplo, el soporte epóxido comercial fue el más estable en el preparado a pH 4 y 7; mientras a pH 10, el más estable fue el epóxido-etilendiamino. Aun mas interesante es el hecho de que la enantioselectividad (E) y el exceso enantiomérico (ee), también dependían fuertemente del derivado inmovilizado y las condiciones empleadas. Todos los derivados inmovilizados preparados fueron R selectivos para la resolución cinética del (R/S)- Propranolol y la inmovilización con soportes epóxido multifuncionales permitió encontrar el catalizador con mayor enantioselectividad ( $E=$  y  $ee_s=96$ )

---

\* Proyecto de Grado

\*\*Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Rodrigo Torres Sáez. Codirector: Claudia Ortiz

## ABSTRACT

### **TITLE: DEVELOPMENT OF NEW MULTIFUNCTIONAL EPOXI SUPPORTS FOR THE IMMOBILIZATION OF *Candida Antarctica* B. KINETIC RESOLUTION OF ( $\pm$ ) PROPRANOLOL**

Ariza Villamil, César.

Keywords: CAL-B Lipase, enzymatic immobilization, epoxy supports, Kinetic resolution, (R/S)-Propranolol

Epoxy activated supports are able to chemically react with the nucleophilic groups present in the protein surface: lysine, histidine, cysteine, tyrosine, etc. Moreover, the epoxy groups are highly stable at different pH values. These properties allow an intensive covalent binding between the protein and support. The preparation of various epoxy supports partially modified was carried out in this investigation in order to immobilize the enzyme lipase of bacterial origin. *Candida antarctica* B purified on octyl-agarose. This enzyme was covalently immobilized on different epoxy supports (epoxy commercial support, epoxy ethylenediamine, epoxy iminodiacetic, epoxy-chelate iminodiacetic-Copper). These immobilized derivatives were used under different conditions (pH values between 4 and 10 and ionic strength between 5 and 1000 mM) in the kinetic resolution of (R, S)-propranolol ester, because the enantiomeric pure synthesis of this compound is of industrial interest because this is one of the most worldwide used drugs for cardiovascular diseases. It was found that the different catalytic properties of immobilized derivative (activity, specificity and enantioselective), are particularly dependent on the type of support used in the immobilization. For example, the commercial epoxy support was the most stable in the preparation at pH 4 and 7, while at pH 10, was the most stable epoxide-ethylene diamine. Even more interesting is the fact that the enantioselectivity (E) and enantiomeric excess (ee), also relied heavily on fixed assets and derivative conditions employed. All immobilized derivatives prepared were R selective kinetic resolution of (R/S)-Propranolol and immobilization with multifunctional epoxy supports allowing to find the catalyst more enantioselective (E = 57 and ee<sub>s</sub> = 96).

---

\* Undergraduate Thesis

\*\*Science Faculty. Chemistry Department. Director: Rodrigo Torres Sáez. Codirector: Claudia Ortiz.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las enzimas son proteínas que pueden catalizar una gran variedad de reacciones de transformación de sustratos orgánicos naturales y sintéticos. Poseen una elevada especificidad, regio- y enantio-selectividad, lo cual las convierte en catalizadores ideales para llevar a cabo reacciones en biosíntesis orgánica. Sin embargo, las enzimas poseen una gran cantidad de limitaciones, tales como inestabilidad en condiciones drásticas de pH, presión y temperatura, inhibición por diferentes sustratos y productos de reacción, y pérdida de propiedades catalíticas al ser empleadas en medios de reacción diferentes a los naturales, todo lo cual les impide su implementación a nivel industrial.

Por esta razón, la ingeniería enzimática ha desarrollado a lo largo de los últimos años, nuevas técnicas de estabilización de enzimas, por ej. por técnicas de inmovilización sobre soportes, que permitan hacer factible el uso de enzimas a escala industrial. La importancia de dichos procesos de inmovilización enzimática está validada en las diferentes aplicaciones industriales por medio de las cuales este tipo de técnicas aportan un amplio desarrollo en áreas vitales para la economía como son la industria alimentaria, cosmética, energética (ej. biocombustibles) y especialmente en la industria farmacéutica. Esta última se destaca gracias a que genera ganancias de cerca de 160 billones de dólares anuales. De los diversos protocolos de inmovilización de proteínas existentes, algunos demuestran cierta utilidad para la realización de técnicas de insolubilización a escala de laboratorio. Sin embargo, muchos de estos poseen desventajas importantes en relación a la posibilidad de estabilizar la proteína o en la capacidad del soporte de inmovilizar gran cantidad de proteínas sobre su superficie.

Es por ello que es necesario diseñar y construir nuevos soportes que permitan no solo la inmovilización de cantidades considerables de proteína, sino que permitan la modificación de sus propiedades como la estabilidad, actividad y selectividad.

En general, se han realizado una gran cantidad de trabajos con diferentes tipos de soportes para la inmovilización-estabilización de enzimas de interés industrial. Entre estos soportes de inmovilización, destacan los soportes poliméricos activados con grupos epóxido, principalmente porque son bastante estables a pH neutro, y pueden almacenarse por prolongados periodos de tiempo.

Pero tal vez, la característica más importante que exhiben los grupos epóxido, es su capacidad de reaccionar con diversos grupos funcionales de los aminoácidos presentes en la proteína previamente inmovilizada. Estos grupos funcionales permiten una reacción más eficiente con los residuos superficiales de las proteínas, debido a la formación de enlaces bastante fuertes (rigidificación) que favorecen la “unión covalente multipuntual” del sistema soporte-proteína. Dicho mecanismo de interacción se lleva a cabo en dos pasos (inmovilización-rigidificación) y puede aumentar la estabilidad de la proteína inmovilizada dependiendo de la efectividad de la formación de los enlaces covalentes.

Teniendo en cuenta el mecanismo de enlazamiento de los soportes epóxidos es que son propuestos los soportes activados de segunda generación por medio de modificación parcial de los grupos epóxido, los cuales son útiles en la inmovilización de enzimas, anticuerpos y otra serie de proteínas bajo condiciones moderadas. El uso de estos soportes multifuncionales proporciona ventajas en la construcción de nuevos biocatalizadores debido a

la estabilidad promovida por las interacciones covalentes creadas entre la enzima y el soporte. Dicho aumento en la estabilidad indica que los biocatalizadores construidos pueden ser utilizados para reaccionar con grandes cantidades de enzima, incluso a nivel industrial sin tener que realizar otro tipo de activación adicional.

La aplicación de estos sistemas inmovilizados puede proyectarse a aplicaciones específicas de acuerdo con la enzima que se desea inmovilizar. Así por ejemplo, las lipasas se han convertido en las enzimas empleadas mayoritariamente en química orgánica gracias a su elevada regio- y enantioselectividad. Entre éstas, se destaca la lipasa de *Candida antarctica B* por sus propiedades catalíticas en la resolución de moléculas quirales. Dichas propiedades combinadas con las mejoras introducidas a través de las técnicas de insolubilización enzimática permitirán obtener moléculas enantioméricamente puras, las cuales son de un gran interés en la industria farmacológica con aplicaciones terapéuticas. La importancia de dichas moléculas radica en la propiedad que poseen las mezclas racémicas de compuestos en las cuales uno de los isómeros posee una actividad de interés mientras que el otro no presenta actividad alguna, es despreciable, es diferente o incluso puede llegar a ser antagonista de la molécula de interés. Por estos motivos, la generación de sistemas de lipasas inmovilizadas con propiedades biocatalíticas mejoradas aplicadas a la resolución enantiomérica de compuestos de interés farmacéutico es un área de desarrollo tecnológico actual que permitirá mejorar los procesos de producción farmacológica y poder acceder a fármacos y formulaciones medicinales más efectivas.

### **3. MARCO DE REFERENCIA**

#### **3.1. ENZIMAS COMO BIOCATALIZADORES**

Las enzimas se caracterizan por tener una versatilidad de propiedades catalíticas debido a su estructura proteica, la cual les confiere la capacidad de catalizar una gran variedad de sustratos de reacción. Dichas transformaciones químicas llevadas a cabo por las enzimas poseen un sinnúmero de ventajas como son su alta especificidad (pueden reconocer un sustrato específico de una mezcla de compuestos) y su elevada actividad en condiciones de reacción ambientalmente suaves (ideales para la química verde). Otras ventajas demostradas por las enzimas son su enantioselectividad y regioselectividad, propiedades que le permiten a las enzimas catalizar la conversión de un único enantiómero dentro de una mezcla racémica, y realizar alguna modificación química en la estructura de un compuesto determinado en una posición específica a pesar de tener grupos funcionales similares dentro de su estructura molecular (Guisan, 2002).

#### **3.2. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN**

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. Posteriormente, se ha ampliado esta definición a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de las enzimas, orgánulos, células, etc. por medio de su unión a un soporte (Dinelli y col., 1976). Se pueden destacar como ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas:

- El aumento de la estabilidad de la enzima.
- La posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costos del proceso.
- La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada. Estos reactores con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Además, estos sistemas pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza.

En general, los métodos de inmovilización de enzimas se clasifican en dos grandes categorías como lo son la inmovilización por enlace químico y la inmovilización por confinamiento. Los métodos de inmovilización por enlace químico pueden ser divididos a su vez en dos tipos:

- 1) Enlazado o unión a un soporte
- 2) Entrecruzamiento de proteína pura.

El primer método, también denominado unión covalente, se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. Entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida, la metionina, el triptófano, arginina y el ácido aspártico.

El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica y no pueden intervenir en la unión covalente. La principal desventaja de este método es la dilución de la actividad catalítica - resultado de la introducción de una gran proporción de masa no catalítica - lo que ocasiona bajos rendimientos volumétricos y de productividad (Dinelli y col., 1976). El segundo método es una técnica de uso frecuente en la inmovilización de enzimas, en la cual se lleva a cabo el entrecruzamiento molecular mediante el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de proteína. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear di-aldehídos, di-iminoésteres, di-isocianatos, sales de bisdiazonio e incluso, diaminas si están activadas con carbodimidina. El resultado del entrecruzamiento enzimático genera biocatalizadores robustos de enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles, y que son capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

La técnica de entrecruzamiento de proteínas por medio de la reacción de glutaraldehído con residuos amino reactivos sobre la superficie de la proteína fue inicialmente desarrollada en 1960 por Dossier y Richards. Sin embargo, este método de entrecruzamiento, en el cual se adicionaba directamente el glutaraldehído a la enzima, presentó severos inconvenientes, tales como una baja retención de la actividad catalítica, pobre reproducibilidad, baja estabilidad y dificultad en el manejo (Gupta y Mattiasson, 1992).

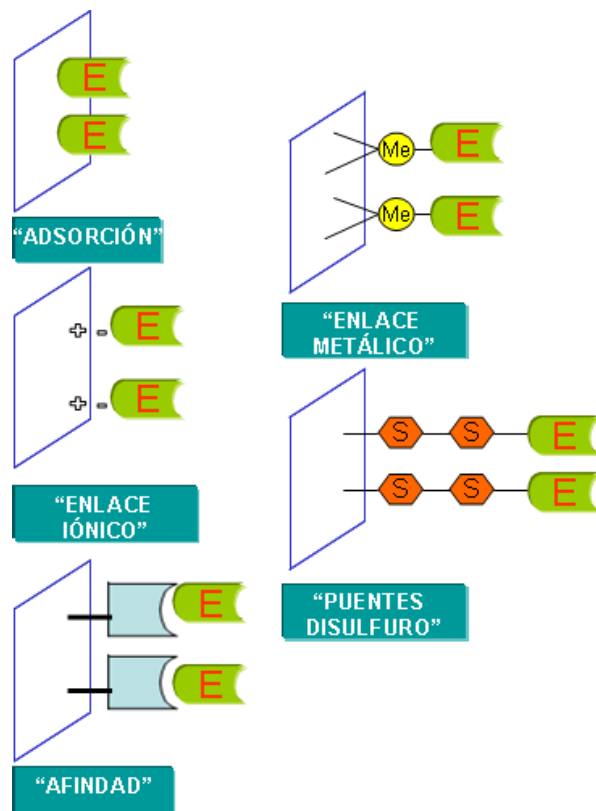
Posteriormente, surgió el entrecruzamiento de enzimas cristalinas, el cual fue primero aplicado para estabilizar cristales de enzima para estudios de difracción de rayos-X, presentando una desventaja inherente como lo es la necesidad de cristalizar la enzima, lo que es a menudo un procedimiento difícil.

### 3.2.1. Métodos reversibles de inmovilización de Proteínas

Los métodos de inmovilización reversible son aquellos en los cuales la enzima puede ser desorbida del soporte de inmovilización bajo condiciones ambientales suaves o fuertes. Una de las principales ventajas presentada por estos métodos de inmovilización y una de las razones por las cuales son industrialmente viables es de tipo económico, ya que puede reciclarse el soporte. Este factor es de vital importancia en procesos donde el costo del soporte representa un gran porcentaje en el valor total del proceso (Katchalski-Katzir, 1993; Gupta, 2006; Hartmeier, 1985).

Por lo tanto, en el futuro esta metodología de inmovilización tendrá un rol muy importante a la hora de desarrollar procesos industriales de biotransformación, ya que permitirán reemplazar a las enzimas solubles en aquellos procesos industriales en que se requiera trabajar por ejemplo con mayor estabilidad operacional (Klibanov, 1983; Hartmeier, 1985; van Beilen y Li, 2002).

La inmovilización reversible de enzimas es particularmente importante en la inmovilización de enzimas lábiles y para aplicaciones en sistemas bioanalíticos (Gupta y Mattiasson, 1992). En la **figura 1** se citan los diversos métodos de inmovilización reversible de proteínas. En la figura se muestran los diferentes métodos de inmovilización reversible de enzimas:



*Figura 1. Métodos de insolubilización de proteínas por inmovilización reversible.*

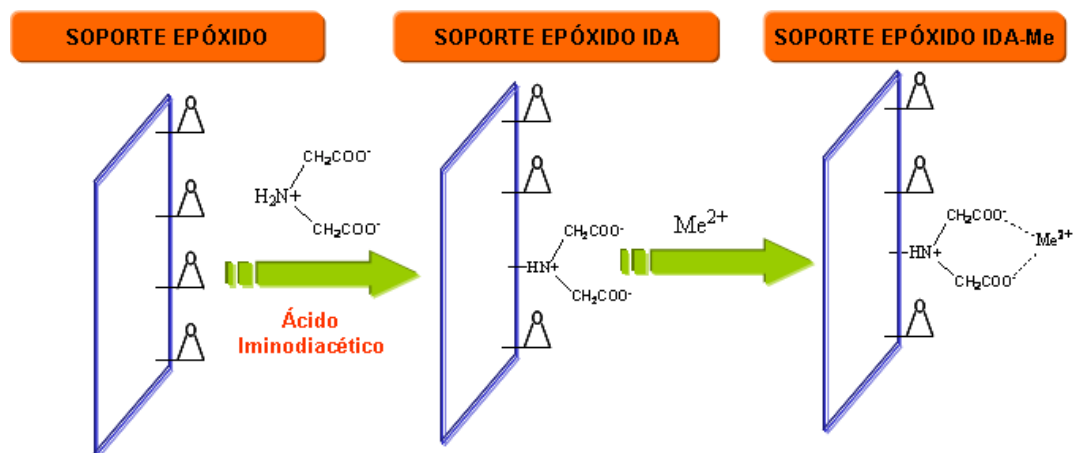
### **3.2.1.1. Quelación o enlazamiento metálico.**

Las sales de metales de transición o hidróxidos depositados en la superficie de fases orgánicas se unen por coordinación con grupos nucleófilos en la matriz. La sal del metal de transición o el hidróxido, es precipitado en el soporte por calentamiento o neutralización. Debido a factores estéricos, es imposible para la matriz ocupar todas las posiciones de coordinación del metal; por lo tanto, algunas de estas posiciones permanecen libres para coordinar con grupos de las enzimas. (Mateo y col., 2000; Armisen y col., 1999). Los complejos metálicos estables que se forman son utilizados para retener las proteínas.

La elución de las proteínas enlazadas puede ser llevada a cabo fácilmente por competencia con ligandos solubles o disminuyendo el pH. Por tanto, el soporte puede ser subsecuentemente rehabilitado cuando se desee por medio de un lavado con un agente quelante fuerte como EDTA. Estos soportes metal-quelato han sido denominados adsorbentes de inmovilización por afinidad ión-metal (IMA) y son utilizados en cromatografía de proteínas (Kågedal, 1998).

### 3.2.1.2. Inmovilización de enzimas por medio de soportes epóxidos modificados con quelatos metálicos

Gracias a la variedad de reacciones que permiten los grupos epóxidos, puede desarrollarse una herramienta muy útil y de manera sencilla para la inmovilización de enzimas por técnicas de insolubilización en soportes sólidos. Esta técnica consiste en modificar los grupos epóxidos del soporte con ácido iminodiacético (IDA), el cual a su vez puede formar muy fácilmente un complejo de coordinación con iones metálicos de transición  $M^{2+}$ . En la **figura 2** se ilustra la técnica de insolubilización reversible de enzimas con quelatos metálicos



**Figura 2.** Inmovilización reversible por medio de complejos soporte-metal.

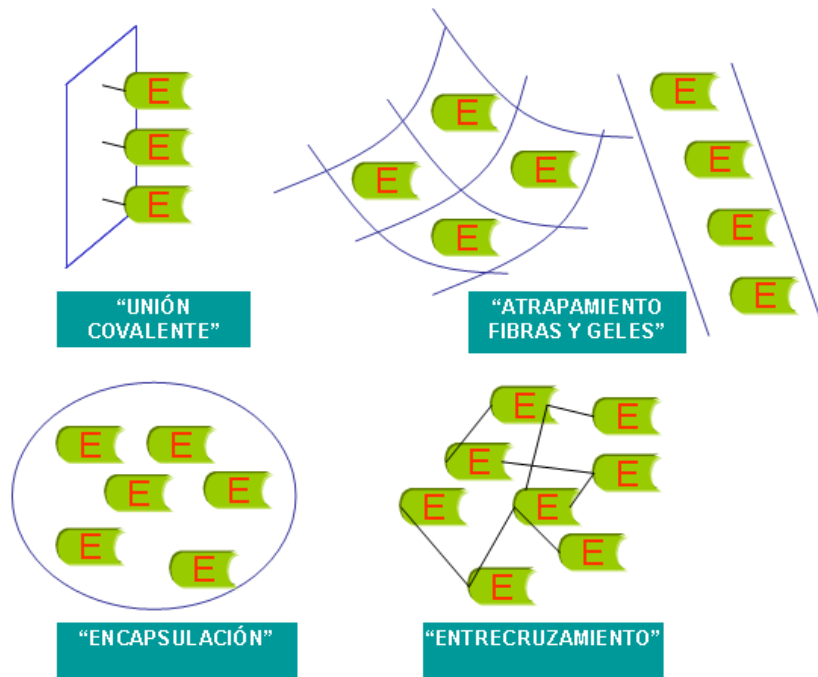
Este tipo de soportes conservan las sobresalientes propiedades de los grupos epóxidos para inmovilizar y estabilizar enzimas además de las enormes posibilidades de la cromatografía IMAC (Torres y col., 2006).

En un estudio realizado por Hidalgo y col. (2004), se empleó esta técnica cromatográfica y fue posible purificar la enzima *Thermus thermophilus*. Adicionalmente, se estudió el efecto del soporte y se concluyó que la geometría de los mismos era de gran importancia, ya que los que ofrecen una mayor superficie de inmovilización originan mejores resultados. Debido a que la enzima utilizada en este estudio necesita de una inmovilización multipuntual, los soportes epóxidos fue la opción mas viable para realizar la inmovilización.

Novedosos estudios han utilizado esta técnica de inmovilización con enzimas extraídas de bacterias hipertermófilas en las cuales se han logrado hasta un 76,3% de proteína inmovilizada a través del uso de soportes epóxido modificados con átomos metálicos de níquel (Li y col., 2007).

### **3.2.2. Inmovilización Irreversible de Proteínas**

La inmovilización irreversible de enzimas es un método establecido y ampliamente desarrollado en la ingeniería enzimática. El concepto general que lo describe o caracteriza es que una vez el biocatalizador se encuentre unido al soporte, éstos no podrán separarse sin ocasionar daños en la actividad de la enzima. Las técnicas más comunes de inmovilización irreversible son la unión covalente, atrapamiento en fibras poliméricas, microencapsulación y los agregados y cristales de entrecruzados de enzimas (CLEAs y CLECs). Dichas técnicas se ilustran en la **figura 3**:



**Figura 3.** Técnicas de inmovilización enzimática irreversible.

### 3.2.2.1. Inmovilización de enzimas por unión covalente

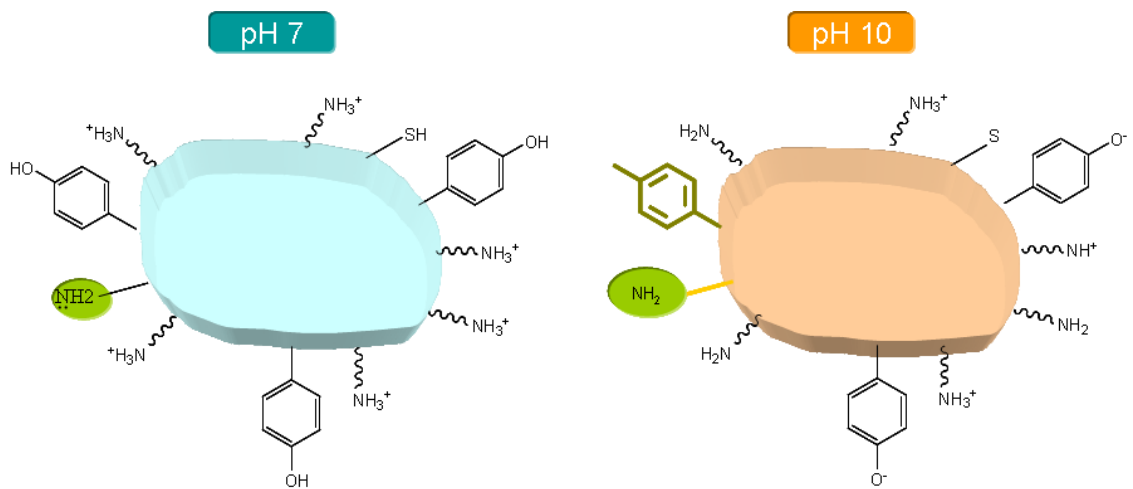
El incremento en la estabilidad de las enzimas inmovilizadas es la ventaja principal del método de inmovilización enzimática por formación de enlaces covalentes. Además, no permite la liberación de las enzimas al medio de reacción gracias a la naturaleza de los enlaces formados. Esta ventaja se complementa con el hecho de que los residuos aminoacídicos esenciales para la actividad catalítica de la enzima no se ven comprometidos en la formación de los enlaces covalentes con el soporte. Un procedimiento simple que puede implementarse con el fin de mejorar la actividad es llevar a cabo la reacción de acoplamiento en presencia de análogos del sustrato (Mattiasson y Kaul 1991). Por esta razón, es que la técnica de inmovilización por uniones covalentes es la más comúnmente utilizada en la búsqueda de biocatalizadores estables y activos, y puede ser aplicada cuando no se

quiere la presencia de la enzima en el producto de reacción. Sin embargo, con el fin de lograr un elevado nivel de carga enzimática sin involucrar los aminoácidos esenciales del sitio activo en enlaces con la matriz, se han venido desarrollando nuevas estrategias de inmovilización covalente con el fin de evitar las dificultades que este fenómeno pueda presentar (Mateo y col., 2002; Wilchek y Miron, 2003; Luk y col., 2004). Pueden llevarse a cabo una gran variedad de reacciones de inmovilización enzimática dependiendo de los grupos funcionales que estén disponibles en la matriz (Scouten, 1997). Todos los métodos existentes pueden compilarse en dos grandes grupos: (1) activación de la matriz por adición de una función reactiva al polímero y, (2) modificación de la estructura del polímero para producir un grupo activado. Los procedimientos de activación son generalmente diseñados para generar grupos electrofílicos en el soporte, los cuales reaccionan con los grupos fuertemente nucleófilos presentes en las proteínas. Los principios básicos que controlan el curso de la unión covalente a las matrices son análogos a los usados para la modificación química de proteínas. Las reacciones comúnmente usadas involucran las cadenas laterales de los siguientes aminoácidos: lisina ( $\epsilon$ -amino), cisteína (tiol), y los ácidos aspártico y glutámico (grupo carboxílico).

Estas reacciones permiten la generación de distintos tipos de enlaces entre la enzima y el soporte, por ej., amida, éter, tio-éter o enlaces carbamatos. Como consecuencia de la inmovilización enzimática irreversible se mejoran notablemente las propiedades fisicoquímicas de la molécula enzimática con respecto a la enzima soluble, como son su eficiencia catalítica (mayor  $k_{cat}/K_m$ ) y estabilidad térmica (menor  $k_d$ ) (Katchalski-Katzir, 1993; Tischer y Kasche, 1999; Royer, 1980).

### 3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA UNIÓN COVALENTE ENZIMA-SOPORTE

Se ha establecido que la estabilidad del sistema enzima-soporte es directamente proporcional a la cantidad de enlaces covalentes formados durante el proceso de inmovilización. Teniendo en cuenta lo anterior, los grupos nucleófilos presentes en la superficie de las proteínas se convierten en una herramienta útil para incrementar los enlaces covalentes. Además, 9 de los 20 aminoácidos comunes poseen cadenas laterales reactivas, es por esto que es conveniente realizar inmovilizaciones enzimáticas a valores de pH alcalinos para los cuales las cadenas laterales son más reactivas, como se muestra en la **figura 4**. A su vez, este tipo de inmovilizaciones requieren largos tiempos de reacción que permitan una correcta alineación de los grupos nucleófilos con los grupos epóxido (Brena y col., 2006)



**Figura 4.** Procesos de inmovilización a pH 10

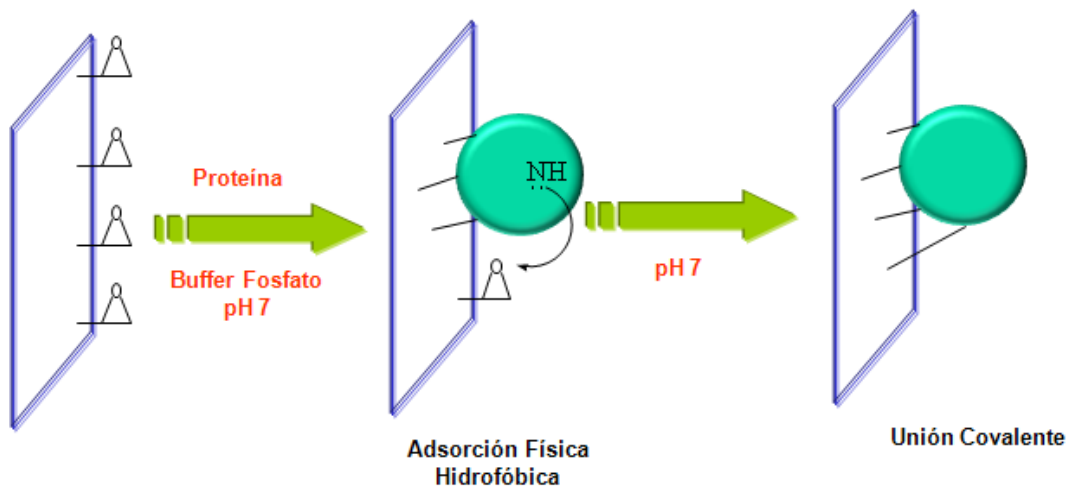
### **3.4. INMOVILIZACIÓN COVALENTE EN SOPORTES ACTIVADOS CON GRUPOS EPÓXIDOS**

Uno de los desafíos más grandes de las técnicas de insolubilización es lograr una inmovilización cuantitativa de grandes cantidades de proteína por mililitro de soporte activado. Por esta razón, se han desarrollado una gran variedad de soportes con una reactividad química muy variada, diseñados con el fin de conservar la actividad del biocatalizador empleado (Mateo y col., 2007b; Mateo y col., 2000a; Knezevic y col., 2006; Hall y col., 2008). En este punto es donde los protocolos de inmovilización existentes carecen de efectividad y por lo tanto se dificulta su aplicación a nivel industrial en procesos que requieren condiciones suaves tanto de pH como de temperatura, con el fin de no afectar las propiedades catalíticas de los biocatalizadores.

Como respuesta a esta problemática, se ha propuesto en la última década la implementación de soportes polifuncionales para la inmovilización covalente de enzimas que actúen por medio de grupos epóxidos (Bickerstaff, 1997; Wheatley y Schmidt, 1999). Estos últimos, gracias a sus características inherentes (estable a pH neutro, almacenamiento por prolongados periodos de tiempo) generan ventajas a la hora de su aplicación en diferentes procedimientos de insolubilización de enzimas, por ejemplo, pudiendo ser preparados lejos del sitio donde se realizará la inmovilización enzimática (Katchalski-Katzir, 1993; Katchalski-Katzir y Kraemer, 2000).

Es importante resaltar la importancia de una fuerza iónica elevada que asegure el mecanismo de inmovilización-rigidificación por el cual actúan los soportes epóxidos.

La primera etapa de este mecanismo de inmovilización, es una reacción intermolecular que procede de forma lenta, mientras que la rigidificación es la formación de enlaces intramoleculares del sistema enzima-soporte y ocurre de forma rápida (Mateo y col., 2003) tal como se observa en la **figura 5**.



**Figura 5.** Mecanismo de inmovilización de los soportes epóxidos.

Gracias a la reactividad de los soportes epóxidos es posible modificarlos con variados grupos funcionales, los cuales permiten una mayor interacción entre la enzima y el soporte por vinculación de un mayor número de residuos aminoacídicos reactivos.

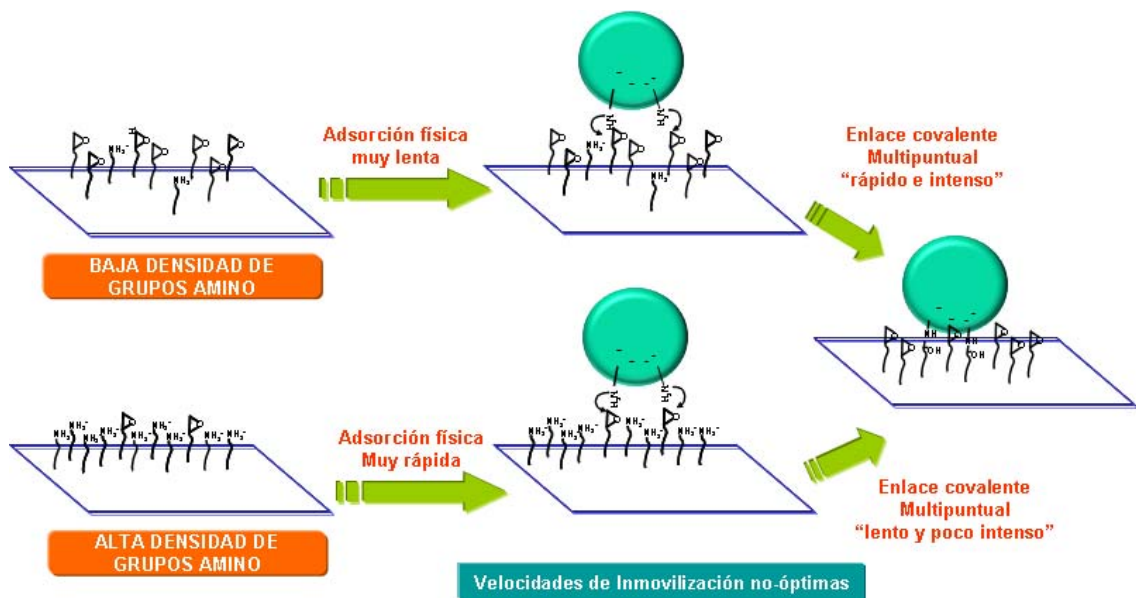
Estas interacciones tienen como resultado una disminución de las distancias de los enlaces covalentemente formados en la matriz. El aprovechamiento de estas características permite a los nuevos soportes epóxidos multifuncionales interactuar por medio de enlaces covalentes como también por enlaces iónicos, como lo es el caso de las modificaciones hechas con metales de coordinación (Mateo y col., 2003).

### **3.5. INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN SOPORTES EPÓXIDO MULTIFUNCIONALES**

De acuerdo con las condiciones del mecanismo de inmovilización de soportes epóxidos en dos etapas y teniendo siempre en consideración el diseño de procesos de inmovilización covalente que puedan llevarse a cabo bajo condiciones ambientales suaves, se han desarrollado recientemente el diseño de soportes epóxido multifuncionales que cumplan con este objetivo (Grazú y *col.*, 2003; Mateo y *col.*, 2000 b).

Se ha propuesto que en general, los soportes epóxido multifuncionales deben contener dos tipos de grupos funcionales: (i) los primeros deben ser grupos que promuevan la adsorción física de las proteínas (adsorción sobre quelatos metálicos inmovilizados, intercambio iónico, etc.), y (ii) otros grupos que logren inmovilizar covalentemente la enzima (grupos epóxido).

De esta forma, las enzimas se adsorben primero físicamente sobre el soporte y posteriormente se obtendrá la formación de enlaces covalentes entre los grupos nucleofílicos de la proteína (-NH<sub>2</sub>, -SH, -OH) y los grupos epóxido de la superficie del soporte (Mateo y *col.*, 2000c). **La figura 6** muestra el esquema de inmovilización covalente de enzimas en soportes epóxidos activados con grupos amino.



**Figura 6.** Inmovilización covalente de enzimas en soportes Amino-Epóxido obtenidos por modificación de una pequeña fracción de los grupos epóxidos contenidos en el soporte.

En una investigación realizada por Mateo y col., (2000a) se pudo constatar que los soportes epóxidos que se encuentran en el mercado pueden modificarse de manera sencilla en un cierto porcentaje (del 10 al 20%) generando una mayor estabilidad para la enzima inmovilizada en dichos soportes. La modificación realizada en la superficie del soporte aumenta las posibilidades de encontrar otra serie de grupos funcionales que permitan una interacción más eficiente entre la proteína y el soporte, además de ofrecer variabilidad en la disposición espacial de las enzimas inmovilizadas.

En un ejemplo de esta aplicación los mismos investigadores (Mateo y col., 2003), llevaron a cabo la inmovilización de la *penicilina G acilasa* de *Escherichia coli*, la lipasa de *Candida rugosa* y la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* obteniendo una gran estabilidad del sistema y conservando una actividad entre el 75 y 100% con respecto a las actividades encontradas en las enzimas solubles.

Estos resultados se lograron a través de tres estrategias de inmovilización diferentes, distinguibles cada una de ellas de acuerdo con la modificación realizada sobre los grupos epóxido presentes en la superficie del soporte utilizado.

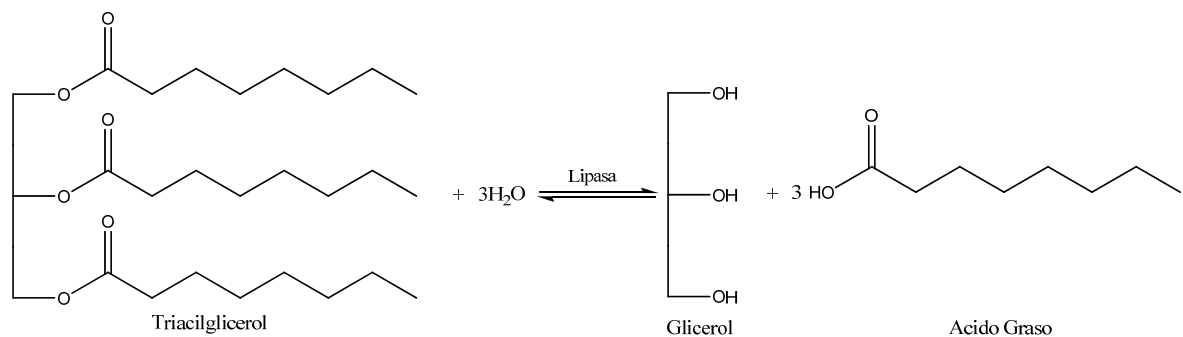
La modificación parcial de los soportes epóxido proporciona ventajas que se ven reflejadas en el incremento de la actividad y estabilidad de las enzimas inmovilizadas sobre dichos sistemas. En 2003 Torres y *col.* pusieron a prueba las propiedades de un nuevo soporte epóxido modificado con grupos amino comercialmente disponible. Los resultados obtenidos mostraban que el mecanismo de inmovilización era completamente diferente al observado para los soportes convencionales (adsorción iónica en lugar de adsorción hidrofóbica), además podía llevarse a cabo a baja fuerza iónica. Finalmente, la inmovilización no requiere el uso de soportes cuya superficie presente cierta naturaleza hidrofóbica para inmovilizar la enzima (este puede conllevar a algunas interacciones indeseadas que pueden causar la desestabilización de la enzima inmovilizada) (Mateo y *col.* 2002).

La presencia de un grupo adicional al epóxido, por ejemplo tiol, abre la posibilidad de una inmovilización completa y directa hacia algún sitio de las proteínas por medio de la química de los grupos epóxidos acoplado al uso de estos soportes bifuncionales con las técnicas en ingeniería de proteínas y los grupos Cys en la superficie de la enzima (Grazú y *col.* 2003). Los estudios más recientes en el campo de la síntesis asimétrica demuestran que el uso de soportes epóxido utilizando como biocatalizador una lipasa (CRL) para la obtención de compuestos con una alta enantioselectividad como el (-) metil butirato son una de las opciones más favorable hablando en términos de estabilidad, selectividad y recuperación de biocatalizador (Othman y *col.*, 2008).

### 3.6. LIPASAS MICROBIANAS COMO BIOCATALIZADORES INDUSTRIALES

Un biocatalizador puede ser una enzima, una hormona o incluso una vitamina, que ocasiona una disminución en la energía de activación de una reacción biológica modificando el tiempo de transcurso de la misma. Estas proteínas son esenciales en todas las reacciones químicas de los seres vivos, desde organismos unicelulares hasta los más complejos pluricelulares. Entre el gran número de enzimas existentes, las lipasas son las enzimas con el mayor potencial para su implementación en reacciones de gran relevancia industrial.

La importancia de estas enzimas se ve reflejada en la cantidad de artículos publicados cada año a causa del desarrollo científico en torno a ellas (alrededor de 1000 por año) (Reetz, 2002; Jaeger y col., 2002). Las lipasas (triacil glicerol acilhidrolasas EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la reacción de hidrólisis de los triglicéridos a ácidos grasos de cadena larga y glicerol como se aprecia en la **figura 7**.



**Figura 7.** Conversión del triacilglicerol en glicerol y un ácido graso catalizada por lipasas.

A pesar de encontrarse ampliamente distribuidas en la naturaleza, son las de origen microbiano aquellas que presentan un interés industrial y en química orgánica, ya que sus características primordiales son una alta especificidad y elevada regio y enantioselectividad, excelentes cualidades por las cuales se aplican en gran variedad de reacciones como se reporta en la **tabla 1** (Reetz, 2002; Koeller y Wong, 2001). Además, las lipasas han demostrado ser biocatalizadores de gran potencial en los procesos de biotransformación catalizada por enzimas para la resolución de mezclas racémicas de interés farmacéutico (Nascimento y Queiroz, 2002, Sobolev y col., 2002; Palomo y col., 2004).

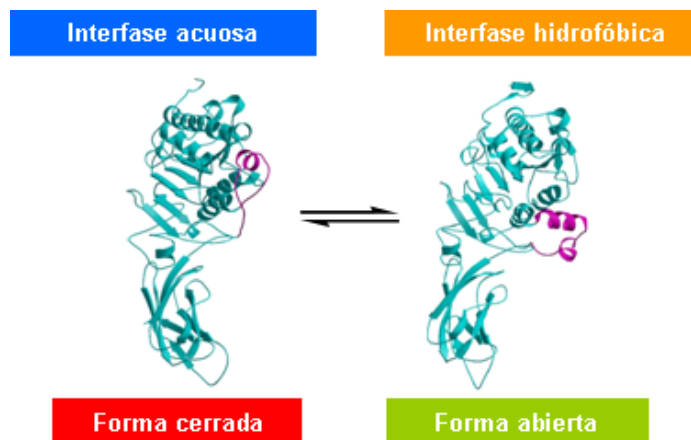
Sustratos		Reacción	Productos	
$R_1COOR_2$	$H_2O$	Hidrólisis	$R_1COOH$	$R_2OH$
$R_1COOH$	$R_2OH$	Esterificación	$R_1COOR_2$	$H_2O$
$R_1COOR_2$	$R_3COOR_4$	Transterificación	$R_3COOR_2$	$R_1COOR_4$
$R_1COOR_2$	$R_3COOH$	Acidólisis	$R_3COOR_2$	$R_1COOH$
$R_1COOR_2$	$R_3OH$	Alcoholisis	$R_1COOR_3$	$R_2OH$
$R_1COOR_2$	$R_3NH_2$	Aminólisis	$R_1CONHR_3$	$R_2OH$

**Tabla 1.** Diferentes reacciones catalizadas por lipasas

A través de diversos estudios cristalográficos se ha determinado que las lipasas están conformadas por una estructura de tipo  $\alpha/\beta$  hidrolasa (Derewnda y col., 1992; Grochulsky y col., 1993; Rubin, 1994.). Estas características estructurales son de vital importancia cuando se desean implementar estas enzimas en un proceso de catálisis o síntesis, ya que intervienen en el desempeño de su mecanismo de acción.

Estudios adicionales y modelamiento molecular han determinado que las lipasas presentan un equilibrio conformacional que controla su mecanismo catalítico denominado “activación interfacial de lipasas” (Verger, 1997; Brzozowski y col., 1991; Mingarro y col., 1995; Brady y col., 1990; Miled y col., 2001; Derewenda y Derewenda, 1992; Grochulski y col., 1993; Ampon y col., 1994; Kerzel y Mersmann, 1992; Derewenda y col., 1992), el cual se debe a las características propias de este tipo de enzimas (Reetz, 2002).

A través de técnicas como electroforesis en condiciones nativas y denaturantes y de difracción de rayos X, han podido distinguirse dos configuraciones para las lipasas como se ve en la **figura 8** (Miled y col. 2005).

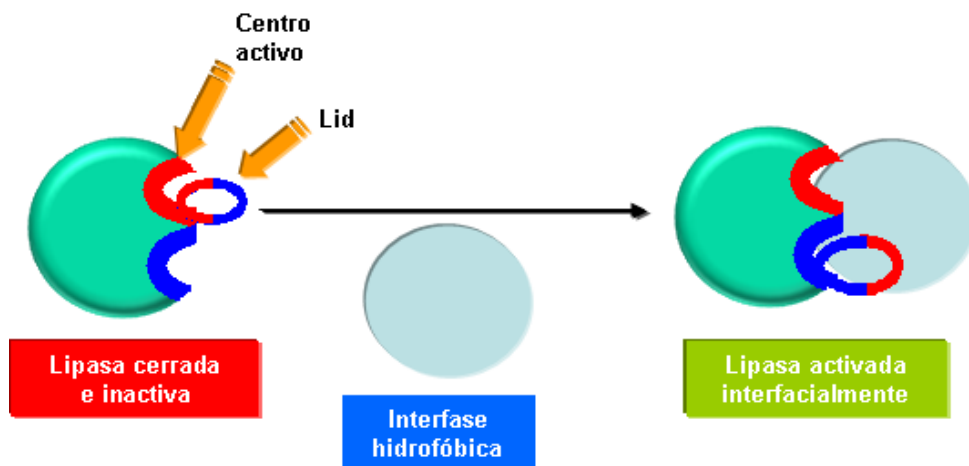


**Figura 8.** Equilibrio entre la conformación abierta y cerrada de la lipasa.

Dicho equilibrio conformacional depende directamente de una cadena polipeptídica llamada tapadera (“flat lid”) que consiste en una o dos cortas  $\alpha$ -hélices las cuales se encuentran compuestas por aminoácidos de tipo hidrofóbico y aminoácidos polares, que a su vez se encuentran enlazados a la estructura mayor de la enzima por diversos elementos de su estructura tridimensional (Brzozowski y col. 1991).

Así, en medios acuosos homogéneos, la lipasa presenta una estructura con el centro activo totalmente aislado del medio de reacción impidiendo la entrada de los sustratos y originando la forma inactiva de la enzima o conformación cerrada. De este modo, utilizando inhibidores de las lipasas, pudo confirmarse la existencia del lid al bloquearse el sitio activo de las mismas (Uppenberg y col., en 1994).

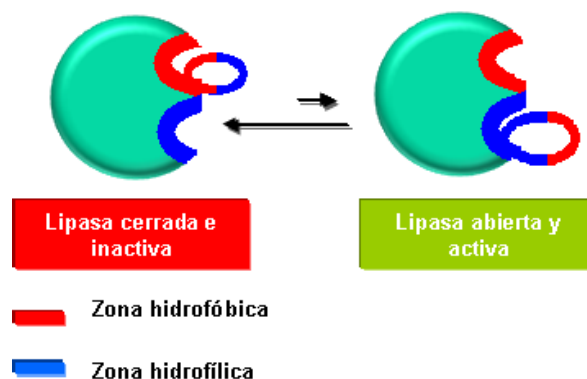
Cuando la lipasa se encuentra en un medio hidrofóbico, su configuración se denomina abierta, ya que su sitio activo se encuentra completamente disponible para reaccionar con cualquier sustrato exponiendo un gran bolsillo hidrofóbico compuesto por la cara interna del lid y la zona hidrofóbica que rodea al sitio activo. Esto concuerda con el hecho de que el sustrato natural de las lipasas son las grasas y aceites, esta actividad en la interfase es un requerimiento indispensable para la función biológica de estas enzimas como se expone en la **figura 9**.



**Figura 9.** Activación interfacial de lipasas con interfases hidrofóbicas

El papel del lid es determinante en la estructura y funcionalidad de la lipasa al estar directamente relacionado con la actividad y selectividad de la enzima. Fue posible llegar a esta conclusión a través del uso de tres lipasas *Candida rugosa* (CRL), *Pseudomonas fragi* (PFL) y *Bacillus subtilis* (BSLA) como catalizadores en reacciones de transterificación (Kaieda y col. 2004) para la síntesis de biodiesel, en donde se destaca el papel que juega esta región de la enzima sobre la modulación de la función de las lipasas. Sin embargo, como hemos mencionado anteriormente, es evidente el hecho de que las lipasas en medios acuosos presentan actividad catalítica, en muchos casos comparable a las de esterasas no lipásicas.

Esto sugiere que las lipasas en general y la CAL-B en particular, se encuentran en sistemas acuosos homogéneos en un cierto equilibrio entre distintas estructuras conformacionales de su centro activo. La posible existencia de ese equilibrio conformacional abre nuevas alternativas en el diseño y control de las biotransformaciones catalizadas por lipasas. La **figura 10** muestra el posible equilibrio conformacional existente en las lipasas en medio acuosos.



**Figura 10.** Equilibrio entre las distintas conformaciones de lipasas en medios acuosos homogéneos.

Consecuentemente, se ha podido constatar que las propiedades catalíticas de las lipasas (selectividad, estereoespecificidad), son fácilmente moduladas a través de la variación de las condiciones del medio de reacción (Wehtje y col., 1993; Persichetti y col., 1996).

### 3.7. LIPASA DE *Candida antarctica* B (CAL-B)

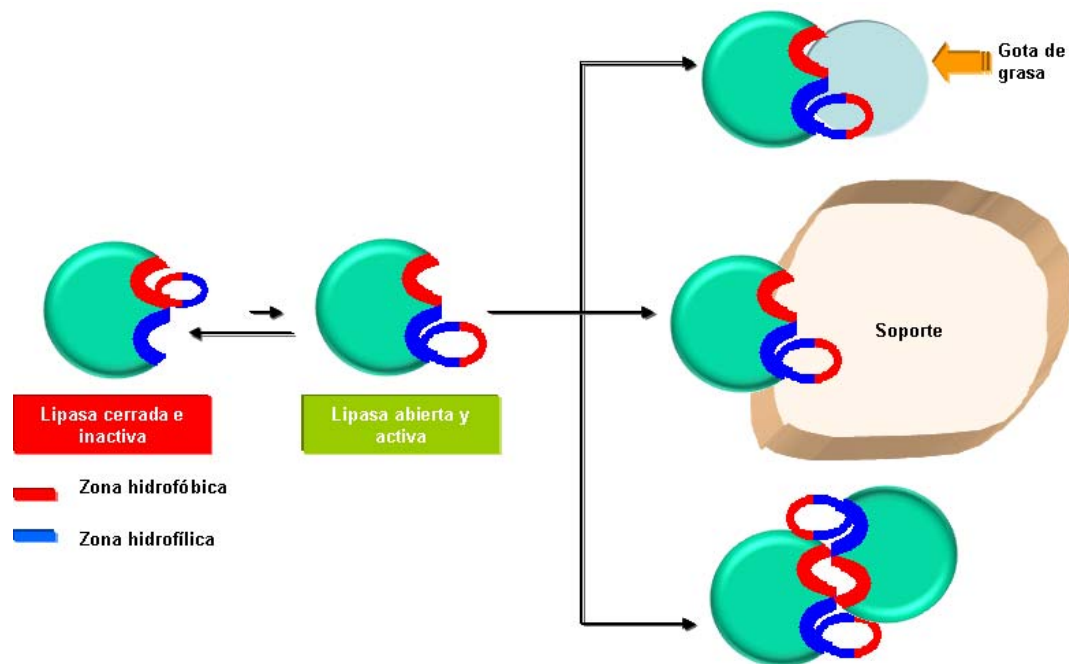


**Figura 11.** CAL B en la cual se observa un sustrato en el sitio activo de la enzima.

Esta es una enzima con un pequeño bolsillo hidrofóbico entorno al centro activo como se puede apreciar en la figura en la presencia de un sustrato; y aunque se considera carente de lid, Uppenberg y col. (1995) determinaron la existencia de una pequeña cadena polipeptídica en alfa-hélice, la cual podría ser considerada como un “lid” potencial como se logra apreciar en la **figura 11**. La enzima presenta un peso molecular en torno a 33 kD y un punto isoeléctrico (pI) de 6 (Martinelle y col., 1996; Andersson y col., 1998).

### 3.8. ADSORCIÓN DE LAS LIPASAS SOBRE ESTRUCTURAS HIDROFÓBICAS

La existencia del bolsillo hidrofóbico promueve en las lipasas una gran afinidad por otras superficies de la misma naturaleza, tales como gotas de grasa (Basri y *col.*, 1995), soportes hidrofóbicos (Bastida y *col.*, 1998; Fernández-Lafuente y *col.*, 1998; Al-Duri y *col.*, 1995; Sabuquillo y *col.*, 1998; Sugiura y Isobe, 1975b; Sugiura y Isobe, 1976; Reetz, 1997), burbujas de aire (Sugiura y Isobe, 1975a), otras proteínas hidrofóbicas (Taipa y *col.*, 1995), e incluso, otras moléculas de lipasa (Palomo y *col.*, 2004a), entre otros como puede apreciarse en la **figura 12**. Este comportamiento de las lipasas se convierte entonces en una herramienta útil en la mejora de sus propiedades y aprovechamiento de las mismas.



**Figura 12.** Adsorción de lipasas sobre distintas estructuras hidrofóbicas.

La adsorción de lipasas a soportes hidrofóbicos ha demostrado ser un método sencillo y eficaz para la purificación, inmovilización e hiperactivación de lipasas en una sola etapa a baja fuerza iónica (Bastida y col., 1998; Fernández-Lafuente y col., 1998; Sabuquillo y col., 1998) gracias a la adsorción que toma lugar alrededor del sitio activo, la cual a su vez genera un desplazamiento de la cara interna de la tapadera y la consecuente activación interfacial de la conformación abierta de la enzima. (Brady y col., 1990).

El uso de baja fuerza iónica, permite que las proteínas que sean solubles en medios acuosos no sean adsorbidas a estos soportes, mientras que las lipasas sí puedan ser adsorbidas específicamente en este tipo de superficies. Esta técnica permite purificar lipasas de extractos crudos con presencia de otras hidrolasas contaminantes (esterasas) y fraccionar lipasas por su diferente afinidad hacia superficies hidrofóbicas como octadecil-sepabeads (Palomo y col., 2002d, Bastida y col., 1998).

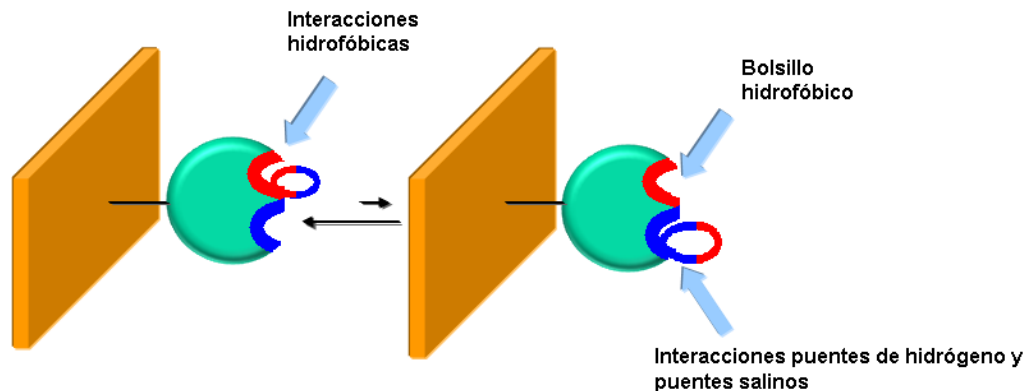
De igual manera, Sabuquillo y col., en 1998, realizaron inmovilizaciones a baja fuerza iónica de lipasas de *Rhizopus niveus* (RNL) y *Candida rugosa* (CRL) sobre soportes hidrofóbicos de octil-agarosa. Las enzimas inmovilizadas en este estudio mostraron un aumento en su estabilidad y actividad en comparación del extracto soluble lo cual indica que la activación interfacial se dio en el soporte incluso cuando este se encontraba activado con diferentes grupos hidrofóbicos (butil, fenil y octil-agarosa).

Por otro lado, la inmovilización sobre interfases hidrofóbicas constituye una de las áreas que aporta mayor número de posibilidades en la aplicación de biocatalizadores a nivel industrial.

Como aporte en este campo Fernández-Lorente y col., en el (2007) realizaron la hidrólisis del éster butil del ácido ftálico y del éster dietil fenilmalonato con dos enzimas diferentes (*Candida rugosa* (CRL) y *Alcaligenes* sp, (QL)) utilizando un soporte hidrofóbico de octil-agarosa o de CNBr-agarosa. En este estudio los resultados obtenidos mostraban conversiones de hasta un 99% y con preferencias hacia un isómero en particular demostrando así la inmensa aplicabilidad y efectividad del uso de soportes hidrofóbicos.

### **3.9. MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES CATALÍTICAS DE LAS LIPASAS**

Diversos estudios han dedicado sus esfuerzos a demostrar que la activación interfacial de la enzima es responsable de la modificación de sus propiedades catalíticas (Derewenda y col., 1992; Brzozowski y col., 1991). Es por ello que los cambios químicos que se realicen en la superficie de la lipasa también pueden alterar en una gran proporción las propiedades catalíticas de dicha enzima (Bianchi y col., 1998; Cammenberg y col., 2006), lo cual sugiere que las lipasas tienen una elevada susceptibilidad a toda alteración ya sea que se presente en su superficie o el medio de reacción (pH, fuerza iónica, y el solvente utilizado, lo que puede afectar la forma del sitio activo). Esta modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas se denomina “ingeniería conformacional”, la cual ha sido empleada para modular el comportamiento de diferentes enzimas que sufren grandes cambios conformacionales durante la catálisis como por ejemplo la penicilina G acilasa (Terreni y col., 2001). La **figura 13** elucida la modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas a través de la ingeniería del medio de reacción



**Figura 13.** *Modulación de las propiedades catalíticas por ingeniería del medio de reacción.*

Aunque las enzimas poseen excelentes propiedades catalíticas, en algunas ocasiones pueden presentar falencias en su actividad cuando son utilizadas en medios de reacciones diferentes a los biológicos, lo cual conlleva a un decaimiento de su estabilidad generando una baja actividad, regio y enantioselectividad. Es por esta razón que uno de los principales propósitos de la ingeniería de proteínas es utilizar las diferentes técnicas de inmovilización como herramienta moduladora de la actividad y estabilidad de los biocatalizadores como lo son las lipasas bacterianas.

A través de los años, el desarrollo de la investigación de las lipasas bacterianas en reacciones de síntesis orgánica ha demostrado que estas enzimas poseen una gran versatilidad biotecnológica gracias a su potencialidad como catalizador en reacciones de hidrólisis y síntesis de ésteres, capacidad que ha sido reconocida por cerca de 80 años (Van Der Walle, 1927). A pesar de esto, se ha constatado que el diseño de procedimientos de inmovilización de enzimas en procesos de biotransformación constituye una de las áreas en las cuales apenas se ha comenzado a realizar avances, y se espera un aumento investigativo fuerte que permita llegar a la optimización de los procesos industriales que son

prediseñados a escala de laboratorio (Fernandez-Lafuente y col., 1998a). Estos procesos han sido ampliamente utilizados en química orgánica a escala laboratorio, usando la enzima soluble para biotransformaciones en medio acuoso o insolubilizando la enzima.

Esta afirmación puede verificarse a través de estudios como el realizado por Palomo y col., en el 2003, en el cual se inmovilizaron diferentes preparaciones de lipasas de *Candida rugosa* (CRL) y de *Alcaligenes sp* (QL), sobre soportes activados de octil-agarosa. Los biocatalizadores inmovilizados fueron ensayados en la hidrólisis del éster del ácido dibutil ftálico y del éster dietil-fenilmalonato. Los resultados expuestos sugirieron que las lipasas inmovilizadas sobre octil-agarosa mostraban conversiones superiores al 99% y excesos enantioméricos del 85% favoreciendo la formación del isómero (+).

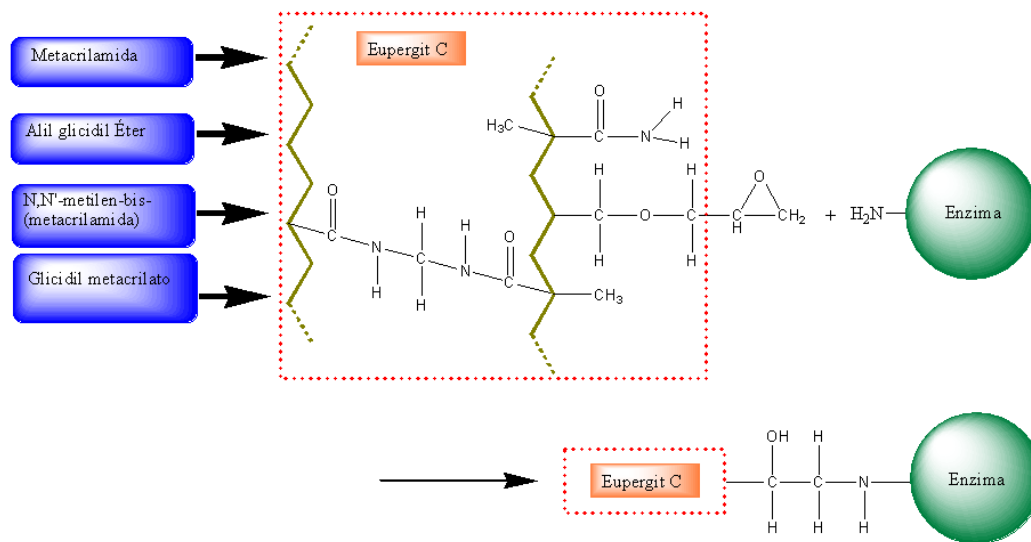
De acuerdo con el número y naturaleza de las interacciones que se presenten entre la lipasa y el ambiente que la rodee, pueden modificarse las propiedades de esta, ya que de dichas interacciones depende el mantenimiento de la estructura de la enzima y por lo tanto la conformación y disposición del sitio activo.

La modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas se denomina "Ingeniería conformacional", y se emplea en la mejora de las propiedades de las enzimas durante el proceso de catálisis. Una de estas técnicas es el cambio en las condiciones del medio de reacción, ya que puede alterar de forma significativa todo el balance de interacciones entre la lipasa y sus alrededores: los disolventes favorecen la correcta disposición del bolsillo hidrofóbico al fortalecer las interacciones electrostáticas; el pH, altera el tipo y cantidad de interacciones entre el "lid" y la superficie de la proteína; la fuerza iónica, desfavorece la presencia del bolsillo hidrofóbico y debilita las

interacciones del “lid” con el resto de la proteína. (Terreni y col., 2001; Rocchietti y col., 2002; Fernández-Lorente y col., 2001a,b; Liese y col., 2002; Palomo y col., 2004b; Palomo y col., 2002b,c; Palomo y col. 2003a,b).

### 3.10. SOPORTE EPÓXIDO COMERCIAL EUPERGIT® C CON POTENCIAL APLICACIÓN PARA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

El Eupergit® C consiste en un soporte macroporoso de 100-250 µm de diámetro de poro, producto de una copolimerización de metacrilamida, N,N'-metilen-bis-(metacrilamida), Alil glicidil éter y Glicidil metacrilato como se muestra en la **figura 14**. Gracias a su estructura el Eupergit® C es estable tanto químicamente como mecánicamente, en un rango de pH de 0 a 14. El soporte posee alrededor de 100µmol/g soporte húmedo de grupos epóxidos muy reactivos y estables.



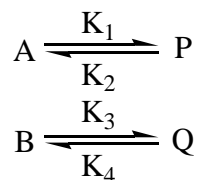
**Figura 14.** Estructura del Eupergit® C e inmovilización covalente de una enzima

Dichas propiedades ampliamente descritas (Katchalski-Katzir y col., 2000) lo convierten en un excelente soporte para inmovilización de enzimas de interés industrial.

### 3.11. 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.

La resolución cinética enzimática para un sistema reversible puede visualizarse como sigue: al inicio de la reacción, la enzima ataca preferencialmente el enantiómero **A** (reactante más rápido) y lo transforma en su respectivo producto **P**, mientras que el enantiómero **B** (reactante lento) está en su mayor parte sin transformar. Cuando se establece el equilibrio de dicho enantiómero, la concentración del sustrato lento comienza a cambiar, disminuyendo la pureza óptica del producto **P**. Por esta razón, el tiempo óptimo para finalizar la resolución cinética es cuando se haya alcanzado el equilibrio del reactante rápido (Esquema 1).



**Esquema 1.** 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 se obtendrá una mejor resolución. Para un sistema irreversible  $K_2 = K_4 = 0$

### 3.11.1. Enantioselectividad de lipasas

Gracias a las propiedades de las lipasas, éstas poseen la habilidad de discriminar entre dos enantiómeros de una mezcla racémica, por lo tanto, es necesario evaluar la efectividad del biocatalizador en la resolución enantioselectiva de compuestos quirales. Con este objetivo, los dos parámetros principales que se tienen en cuenta en las reacciones catalizadas por enzimas son: 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:

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

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%). La enantioselectividad es generalmente medida o expresada a través de la relación o razón enantiomérica ( $E$ ). Este parámetro cinético depende del catalizador, además de ser sensible a cambios en el medio (pH, temperatura, etc.).  $E$  se puede definir como la relación entre las constantes específicas de velocidad para los dos enantiómeros:

$$E = \frac{k_1}{k_3} = \frac{(k_{cat}/K_M)_R}{(k_{cat}/K_M)_S} \quad ; \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde  $R$  es el enantiómero reactante más rápido,  $k_{cat}$  es la constante de velocidad de la reacción y  $K_M$  es la constante de Michaelis-Menten. Sih y col,

(1987) desarrollaron esta ecuación en términos de exceso enantiomérico del producto ( $ee_p$ ), el enantiómero remanente ( $ee_s$ ) y la conversión ( $c$ ). Para una reacción enzimática reversible, el valor de  $E$  puede ser expresado por la siguiente ecuación:

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

Donde  $K$  es la constante de equilibrio.  $K$  es una función termodinámica que es independiente de las propiedades de la enzima. Como función de estado,  $K$  sólo depende del estado inicial y final más no de la trayectoria de reacción. Sih y col (1987), determinaron 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:

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

Donde  $c$  está expresada por la siguiente ecuación:

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad \text{Ec (5)}$$

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.

Recientemente se han desarrollado síntesis enantioselectivas de ésteres empleando lipasas inmovilizadas en soportes epóxidos comerciales encontrándose un alto exceso enantiomérico (100%) y favoreciéndose la estabilidad de la lipasa inmovilizada (Yuanhong y col, 2009, Siti Salhah Othman y col, 2007).

### **3.11.2. Métodos para la determinación del exceso enantiomérico**

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 interacciones diastereoméricas rápidas y reversibles 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, por lo que pueden ser obtenidos datos confiables. Es decir, que pueden ser detectados excesos enantioméricos altos (>99%).

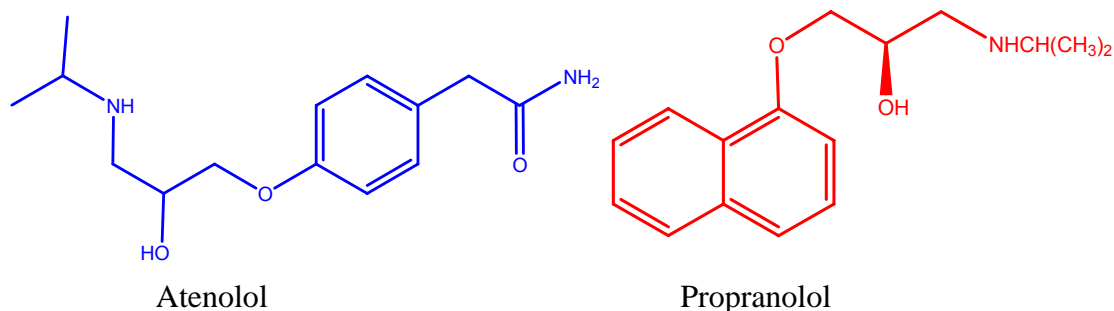
La cromatografía líquida se basa en los mismos principios y tiene las mismas ventajas que la cromatografía gaseosa. La mayor diferencia es que compuestos más polares y no volátiles pueden ser analizados. Otros métodos disponibles para la determinación del exceso enantiomérico son los métodos polarimétricos y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

### 3.12. Bloqueadores $\beta$ -adrenérgicos

Los bloqueadores o antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos son un grupo de compuestos que inhiben competitivamente los efectos de las catecolaminas en los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Este tipo de agentes son ampliamente usados en medicina en drogas clínicamente importantes para el tratamiento de diferentes patologías. Como antagonistas  $\beta$ -adrenoreceptores ( $\beta$ -bloqueadores) tienen un diversificado y amplio rango de aplicaciones clínicas.

En particular, tienen un gran interés en enfermedades cardiovasculares y en el tratamiento del glaucoma. Debido a que la actividad de estos compuestos generalmente depende de un enantiómero, la resolución cinética de este tipo de compuestos es de vital importancia medicinal e industrial. El atenolol es uno de los fármacos más vendidos en este momento en el mundo en el tratamiento de la hipertensión, angina de pecho y arritmias postmiocárdicas (Shanks, 1984; Carlberg y col.; 2004).

Son utilizados en el deporte por su capacidad para regular la presión sanguínea y disminuir los temblores, razón por la cual son prohibidos por el comité olímpico internacional. Las estructuras de los bloqueadores se muestran a continuación en la **figura 15**:



**Figura 15.** Estructuras del Atenolol y Propranolol, dos  $\beta$  bloqueadores más empleados en el mercado.

Cada isómero presenta un efecto farmacológico distinto; en una mezcla racémica el isómero (S)-propranolol es 98 veces más potente como antiarrítmico y antihipertensivo que el (R)-propranolol. Por esta razón es que la resolución cinética de compuestos empleados como fármacos es una de las áreas científicas con mayor desarrollo actualmente. Para el caso específico del Atenolol se ha logrado determinar que la actividad del isómero (S) es hasta dos veces mayor que la de la mezcla racémica (Mehvar y col, 2001).

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1. MATERIALES**

La lipasa de *Candida antarctica* B (Novozym 525 L, CAL-B) fue obtenida de Sigma Chemical Co. Octil-agarosa y los marcadores de peso molecular fueron de Fermentas. Eupergit C fue donado por Röhm Pharma. Los soportes obtenidos a partir de Eupergit C fueron preparados como está descrito en la metodología.

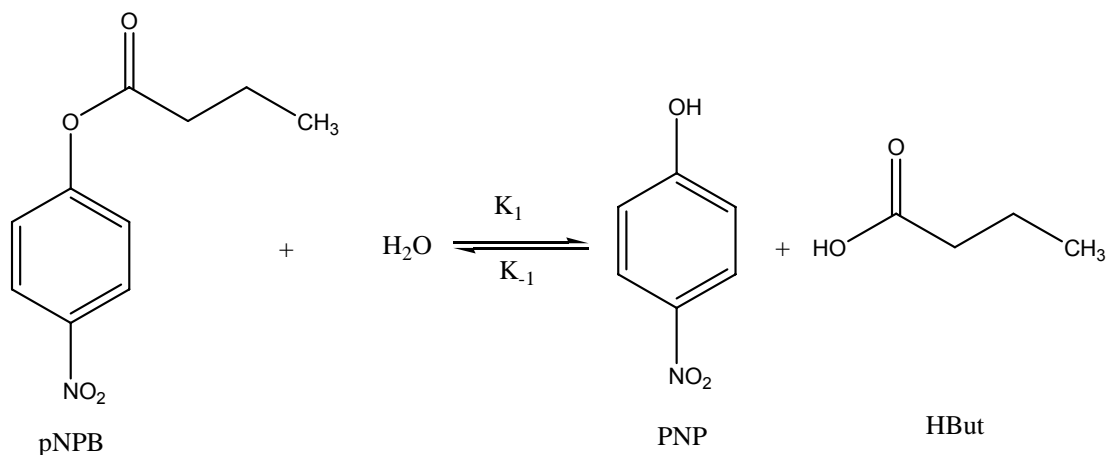
Tritón X-100, p-nitrofenilbutirato, (RS)-propranolol, (R)-propranolol, y (S)-propranolol, se obtuvieron de Sigma. Las soluciones de los extractos comerciales de las lipasas fueron preparadas en una solución de fosfato de potasio a diferentes valores de pH y fuerza iónica.

### **4.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.**

La concentración proteica de la preparación comercial de las diferentes lipasas se determinó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). 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. La concentración máxima de proteína para la CAL B inmovilizada fue de 1mg/mL.

### 4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA

El ensayo se llevó a cabo midiendo el aumento en el valor de absorbancia a 348 nm producido por la formación de p-nitrofenol (PNP) en la hidrólisis de 0,4mM de p-nitrofenilbutirato (PNPB) disuelto en buffer fosfato de potasio 25mM, a pH 7 y 25 °C. La reacción de hidrólisis de pNPB se muestra en la **figura 16** y la ecuación se muestra en los anexos (anexo 3). Para iniciar la reacción, 20  $\mu$ L 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  $\mu$ mol de pNPB por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente. El coeficiente extinción molar usado para el producto de reacción fue de 3100  $M^{-1}cm^{-1}$ .



**Figura 16.** Reacción de hidrólisis del PNPB

Las mediciones de actividad realizadas comprendían la realización de ensayos tanto para las suspensiones como los sobrenadantes de inmovilización.

#### **4.4. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA**

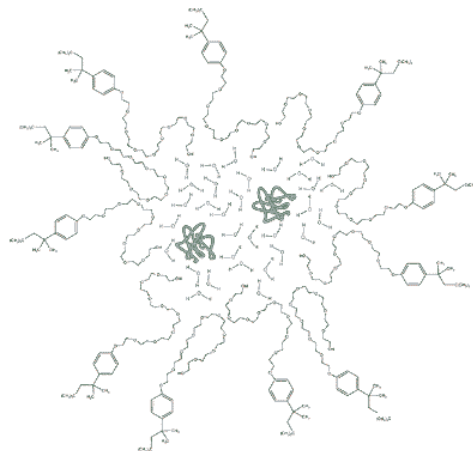
##### **4.4.1. Adsorción Interfacial de CAL B en geles de Octil-Agarosa**

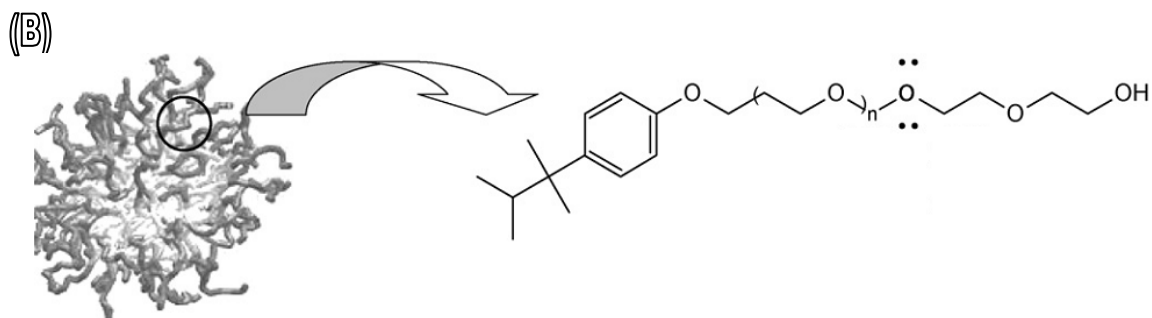
Por medio de esta técnica pudo discriminarse la proteína de interés (CAL B) de otro tipo de proteínas presentes en el extracto (p.e; esterases). Esta purificación se realizó a baja fuerza iónica (Buffer Fosfato 5mM, 50mM y 100mM) y a pH 7 con el fin lograr una purificación máxima. La adición de octil-agarosa se realizó manteniendo una relación 1:5 de soporte y solución enzimática teniendo en cuenta que la densidad del octil-agarosa es de 0,8 g/mL. Previamente se realizó un lavado del Octil-Agarosa con exceso de agua destilada con el propósito de eliminar el etanol presente en dicha matriz polimérica como agente de conservación.

##### **4.4.2. Desorción de la enzima de Octil-Agarosa**

La desorción de la CAL B del Octil-agarosa se realizó por medio del agente surfactante Tritón X-100 disuelto en buffer fosfato de potasio y pH 7. Se llevaron a cabo preparaciones de diferente concentración con el fin de encontrar las condiciones óptimas de desorción enzimática. La **figura 17** muestra la estructura micelar y molecular del Tritón X-100.

(A)





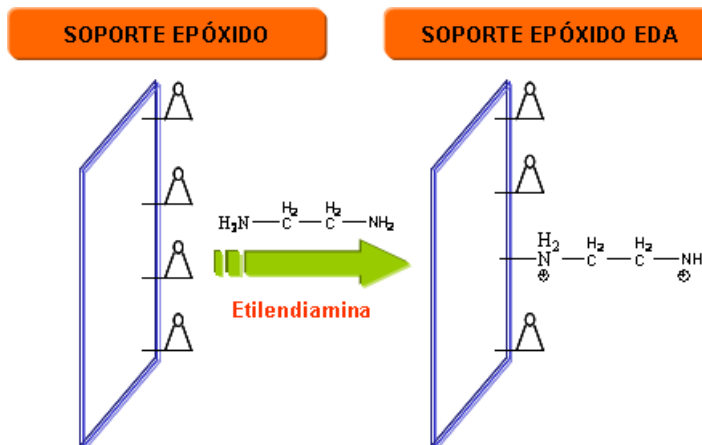
**Figura 17.** (A) Micela de Tritón x-100 formada con proteínas hidrofílicas. (B) La estructura molecular del Tritón X-100 permite la obtención de un núcleo hidrofílico y una zona externa hidrofóbica.

#### **4.5. MODIFICACIÓN PARCIAL DE LOS SOPORTES EPÓXIDO**

Los grupos epóxidos del Eupergit® C han sido modificados parcialmente (en diferentes porcentajes) con diferentes grupos funcionales para contar con mayores posibilidades de reactividad que a su vez permiten estudiar las variables de inmovilización, como la unión covalente (cantidad o actividad de enzimas que permanecen unidas al soporte en condiciones de desorción). Estos soportes bifuncionales permitirán encontrar condiciones que permitan incrementar la estabilidad y reactividad catalítica de la CAL B de acuerdo a la optimización llevada a cabo según el grado de adsorción de las proteínas.

##### **4.5.1. Soporte aminado (EDA)**

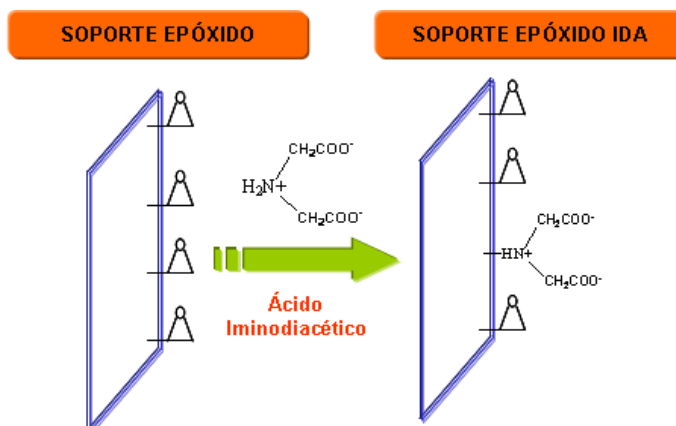
10 g de Eupergit® C fueron incubados en 60 mL de etilendiamina al 2% v/v a pH 8.5 durante 15 min bajo una agitación suave a diferentes tiempos (de 0.5 a 24 horas). A continuación, el soporte fue lavado con un exceso de agua destilada y almacenado a 4°C. La modificación parcial del soporte epóxido comercial se esquematiza en la **figura 18**. El grado de modificación se evaluó por titulación de los grupos amino introducidos en el soporte.



**Figura 18.** Síntesis del soporte epóxido parcialmente modificado con Etilendiamina, *Eupergit*<sup>®</sup> C-EDA.

#### 4.5.2. Soporte iminodiacético (IDA)

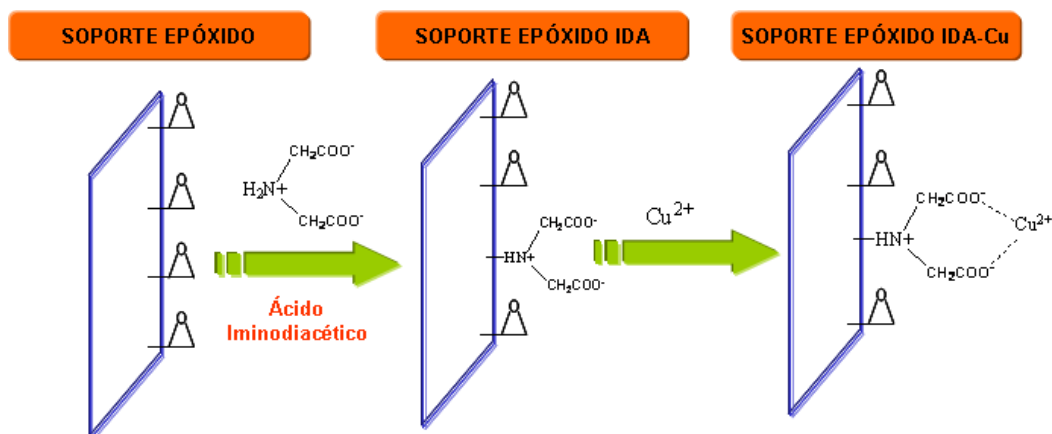
10 g de *Eupergit*<sup>®</sup> C fueron incubados en 18 mL de una solución de 2M ácido iminodiacético / 0.1 M de Borato de Sodio a pH 9 y 25°C durante diferentes tiempos (de 1 a 24 horas) bajo agitación suave. Posteriormente el soporte fue lavado con un exceso de agua destilada y almacenado a 4°C. La inclusión de los grupos IDA en el *Eupergit*<sup>®</sup> se muestra en la **figura 19**. El cálculo del grado de modificación se explica en la sección 4.9.2.



**Figura 19.** Síntesis del soporte epóxido parcialmente modificado con Ácido Iminodiacético, *Eupergit*<sup>®</sup> C-IDA.

### 4.5.3. Soporte Cobre iminodiacético (IDA-Cu)

10 g de soporte Eupergit® C-IDA fueron incubados en 60mL de agua destilada con 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 modifica en un 100% los grupos IDA del soporte. El procedimiento de modificación parcial del soporte epóxido con grupos reactivos IDA-Cu se resume en la **figura 20**. El grado de modificación se cuantificó utilizando espectroscopía de absorción atómica.



*Figura 20. Síntesis del soporte epóxido parcialmente modificado con Ácido Iminodiacético y posterior quelación con  $\text{Cu}^{2+}$ , Eupergit® C-IDA-Cu.*

### 4.6. INMOVILIZACIÓN DE LAS ENZIMAS SOBRE LOS SOPORTES EPÓXIDOS MULTIFUNCIONALES

La inmovilización de las enzimas en los soportes epóxido modificados se ha llevado a cabo manteniendo una relación 1:10. La carga máxima de enzima empleada fue de 1mg/ml. La agitación se llevo a cabo en un Roller-Shaker el cual aseguraba la correcta interacción de la enzima con los poros del soporte a través de la dispersión mas adecuada del mismo.

#### 4.7. DESORCIÓN DE LAS PROTEÍNAS UNIDAS NO COVALENTEMENTE AL SOPORTE

Las enzimas que no se encuentran unidas covalentemente al soporte pueden generar interacciones contraproducentes en los procesos biocatalíticos (Mateo y col., 2000a). Para evitar tal efecto se sometieron las enzimas inmovilizadas en condiciones de desorción como indica la **tabla 2**:

SopORTE	Agente Desorbente
<b>Eupergit<sup>®</sup>C</b>	<b>Buffer Fosfato 25mM pH 7</b>
<b>Eupergit<sup>®</sup> C-EDA</b>	<b>Cloruro de Sodio 500mM pH 7</b>
<b>Eupergit<sup>®</sup> C-IDA</b>	<b>Cloruro de sodio 500Mm pH 7</b>
<b>Eupergit<sup>®</sup> C-IDA-Cu</b>	<b>Imidazol 100mM pH 7</b>

**Tabla 2.** Agentes de desorción correspondientes a cada uno de los soportes epóxido modificados.

#### 4.8. PUNTO FINAL DE LA REACCIÓN ENZIMA-SOPORTE

Con el fin de bloquear completamente los grupos epóxidos remanentes en el soporte, el sistema enzima soporte fue incubado en buffer fosfato pH 7,7 de concentración 50 mM conteniendo un 5 % de mercaptoetanol durante 16 horas a 25°C. Posteriormente, los derivados fueron lavados con un exceso de agua destilada.

El bloqueo de los grupos epóxido remanentes cumple con un doble objetivo: (1) eliminar la reactividad del soporte y (2) alterar las propiedades físicas del soporte (de gran importancia si se considera su naturaleza hidrofóbica). Un bloqueo apropiado permitirá la hidrofilización de la superficie del soporte y evitará las interacciones hidrofóbicas que pueden generar alteraciones y consecuente desestabilización de la misma (Mateo y col., 2006).

## **4.9. CARACTERIZACIÓN DE LOS SOPORTES MULTIFUNCIONALES**

Para la cuantificación de los soportes epóxidos parcialmente modificados se emplearon diversas técnicas instrumentales y analíticas.

### **4.9.1. Soporte EC-EDA**

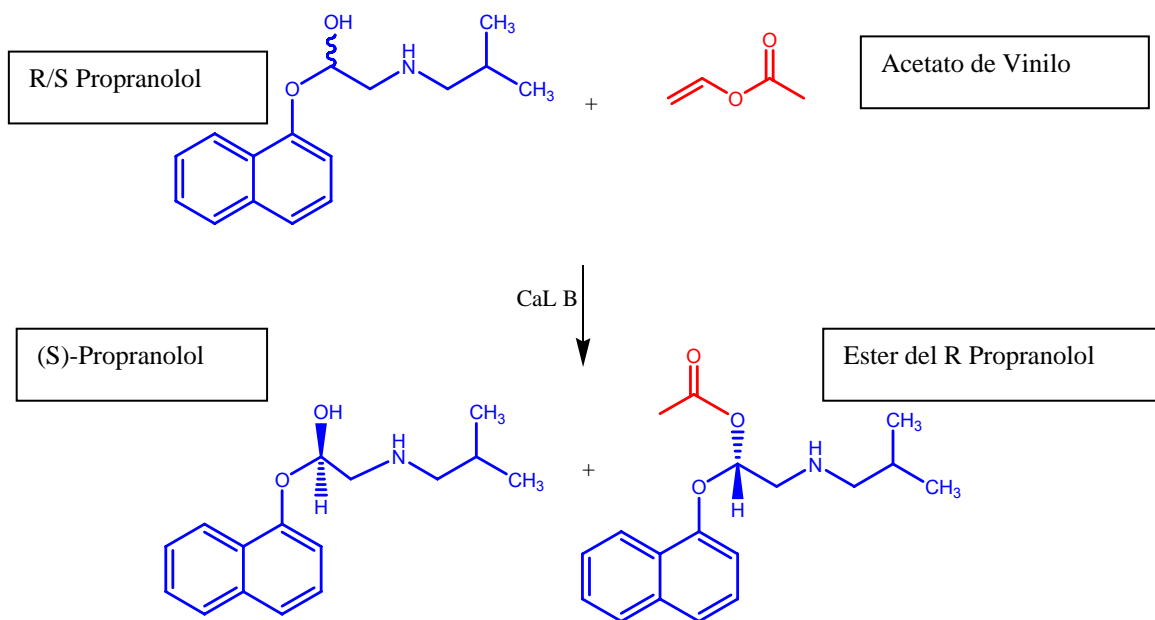
En esta etapa la cuantificación de los grupos EDA introducidos dentro del soporte epóxido comercial se llevo a cabo por titulación de los grupos amino (Mateo y col., 2007; Fernandez-Lafuente y col., 1993). Considerando que el  $pK_a$  de estos grupos es de alrededor de 7 para las aminas primarias y de 10 para las secundarias se utilizó NaOH 10 mM con el cual se pudo determinar la concentración de este primer grupo en un rango de pH entre 4,8 y 8,8 realizando la respectiva curva de titulación de pH para finalmente determinar los puntos de equivalencia.

### **4.9.2. Soporte EC-IDA y EC-IDA-Cu**

El tratamiento con sulfato de Cobre modifica 100% los grupos IDA presentes en el soporte. Así, realizando la cuantificación de los átomos de cobre presentes en el soporte IDA-Cu a su vez, se determina el grado de modificación del soporte IDA. Dicha cuantificación del cobre se llevo a cabo en un equipo de absorción atómica luego de un tratamiento del soporte con EDTA (Mateo y col., 2000a). El equipo de absorción atómica empleado fue un Thermo Electron modelo S4. La curva de calibración para la cuantificación de los átomos de cobre se muestra en la sección de anexos (anexo tal).

#### 4.10. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA ESTERIFICACIÓN ENANTIOSELECTIVA DE (R/S)-PROPRANOLOL

La acetilación del (R/S)-propranolol catalizada por los derivados inmovilizados de CAL B se realizó con acetato de vinilo como agente acilante, como se muestra en la **figura 21**. En cada caso, El propranolol racémico (0,1 mmol-0,08 mmol-0,05 mmol 0,01 mmol) y acetato de vinilo en relación 1:3, fueron adicionados en 3 mL de tolueno.



**Figura 21.** Reacción de acetilación del (R/S)-Propranolol catalizado por CAL B.

La reacción se inició con la adición de CAL B (100 mg, 50 mg y 20 mg). La mezcla de reacción fue agitada a 150 rpm a 25 °C. Periódicamente, se extrajeron muestras de la reacción en proceso y el grado de esterificación para cada una de ellas fue determinado por HPLC-RP, utilizando un Agilent 1100, equipado con una columna Zorbax XDB-C18 (4,6 mm x 250 mm) suministrada por Agilent Technologies. La fase móvil consistió de una mezcla isocrática de ACN (70%) y  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7 (30%).

#### **4.11. ANÁLISIS POR HPLC**

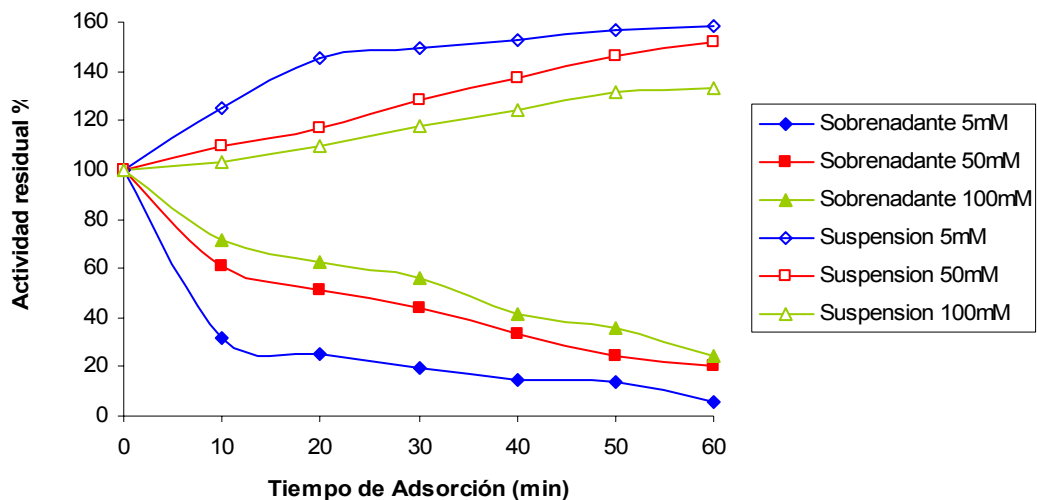
La enantioselectividad de los derivados inmovilizados de CAL B sobre las reacciones de acetilación del propranolol racémico, fueron monitoreadas a través de análisis de HPLC sobre una columna quiral ES-OVM (4.6mm id-250mm; Agilent technologies). Una mezcla de metanol-buffer fosfato pH 6 (30/70 %v/v) fue usada como fase móvil a temperatura ambiente a un flujo de 1 mL/min. El cromatógrafo líquido empleado fue un Agilent 1100 con un detector UV-vis de arreglo de diodos. Los valores de exceso enantiomérico (ee) del alcohol que no reaccionó y del producto formado, así como la relación enantiomérica y la conversión fue calculada según lo descrito por Chen y col. (1982).

## 5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.1. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA

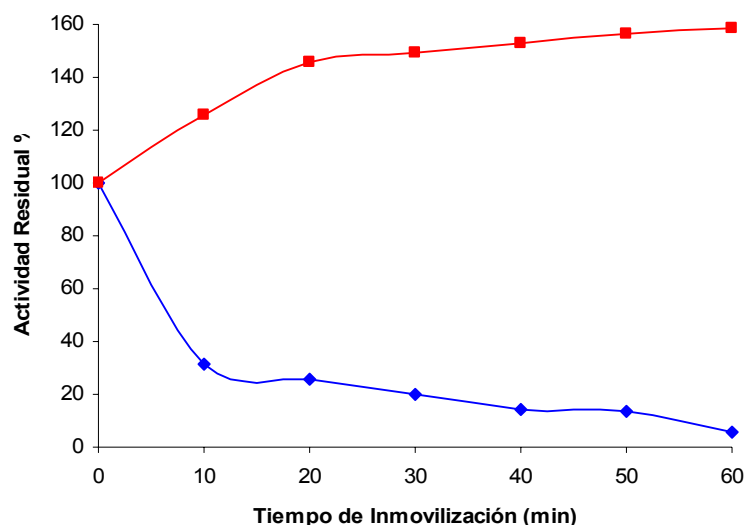
#### 5.1.1. Adsorción Interfacial de CAL B en geles de octil-agarosa

La enzima CAL B fue purificada a través del método de cromatografía de adsorción interfacial de lipasas en geles de Octil-Agarosa de acuerdo con lo propuesto Sabuquillo y col. (1998). Por medio de esta técnica complementada con análisis de electroforesis SDS-PAGE, pudo discriminarse la proteína de interés (CAL B) de otro tipo de proteínas contaminantes presentes en el extracto enzimático (p.e; esterasas). En dicho proceso se evaluó el efecto de la fuerza iónica del medio, determinándose que la adsorción era inversamente proporcional a esta variable. La **figura 22** muestra la cinética de inmovilización en dicho experimento



**Figura 22.** Adsorción interfacial de la CAL B sobre Octil-agarosa ilustrando el efecto de la fuerza iónica del medio. Inmovilizaciones realizadas a pH 7.

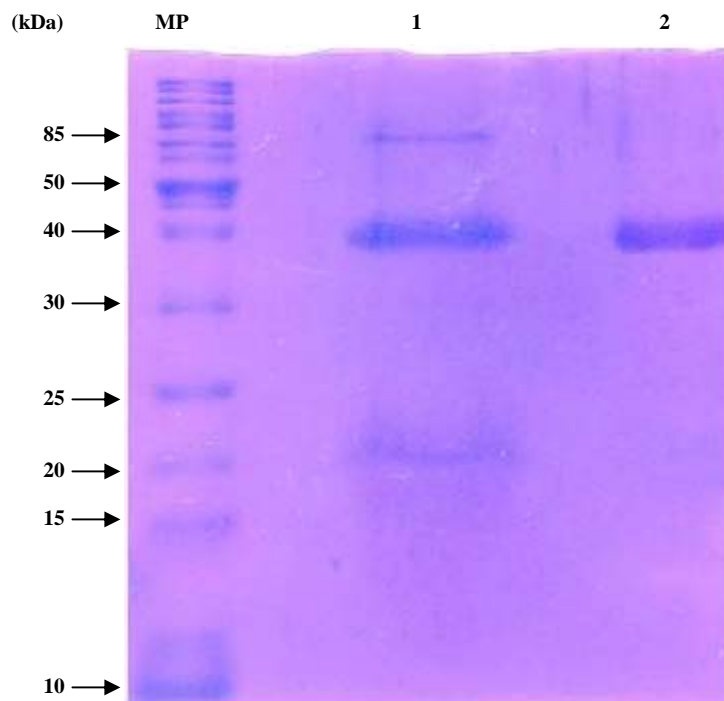
De acuerdo con estos resultados, el proceso de purificación a través de activación interfacial de la CAL B, puede realizarse en condiciones suaves (pH neutro, baja fuerza iónica, temperatura ambiente) que no afectan las propiedades de la enzima, hecho que favorece el proceso de inmovilización (Sabuquillo y col., 1998). Igualmente, a través del seguimiento cinético del proceso de inmovilización se determinó que la enzima se adsorbía totalmente (reteniéndose el 100% de la actividad en el derivado inmovilizado) en el octil-agarosa luego de 60 minutos, resultados similares a los obtenidos por Fernández-Lafuente y col., (1998a). La **figura 23** muestra la cinética del proceso de inmovilización enzimática de la CAL B en Octil-Agarosa



**Figura 23.** Cinética de la inmovilización de extractos crudos de CAL B sobre octil-agarosa. (◆) Sobrenadante. (■) Suspensiones.

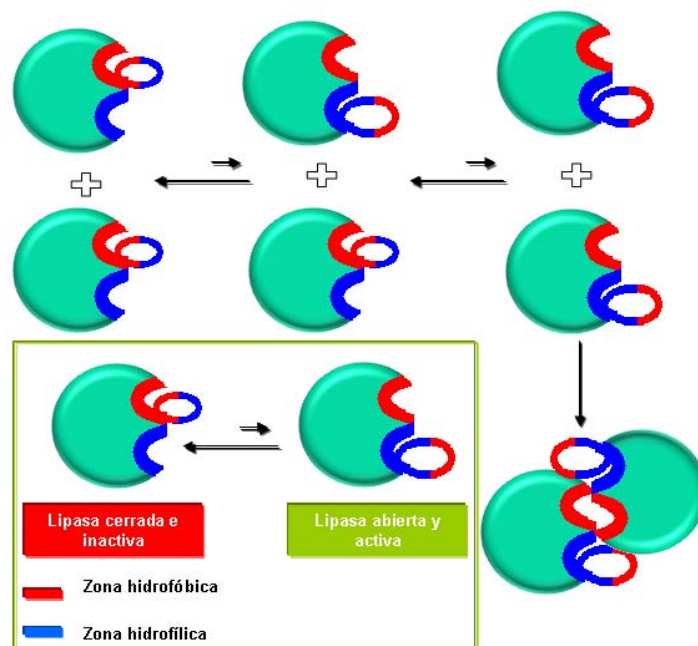
En la figura puede observarse el efecto de hiperactivación enzimática producto del fenómeno conocido como activación interfacial, donde por efecto de la adsorción sobre la superficie hidrofóbica del soporte interfacial en un superficie hidrofóbica se encuentra la proteína se encuentra en su forma abierta.

Este efecto se debe posiblemente a la morfología interna del soporte; el cual se encuentra formado por pedazos gruesos de polímero de agarosa (200 $\mu$ m de diámetro) altamente hidrofóbicos, los cuales reducen la congruencia geométrica entre el centro activo de la enzima y el soporte, de tal manera que el bloqueo del sitio activo post-inmovilización es despreciable, a pesar de que dicha proteína se encuentra unida con el soporte cerca del sitio activo(Fernandez-Lorente y col, 2008). Como se mencionó anteriormente, un análisis posterior a través de la técnica de SDS-PAGE permitió observar que el preparado enzimático proveniente del extracto crudo de CAL B contenía impurezas de proteínas o péptidos de un peso molecular menor al de la enzima de interés. **La figura 24** muestra el análisis de electroforesis de la CAL B soluble y purificada a través del método de cromatografía de adsorción interfacial de lipasas



**Figura 24.** Electroforesis SDS-PAGE de la CAL B. Línea 1: Extracto crudo de CAL B. Línea 2: Proteínas purificadas en Octil-Agarosa. MP: Marcadores de peso moleculares

Incluso se pudo constatar que la CAL B también estaba presente en formas diméricas a pesar de utilizar una dilución elevada para este ensayo (Factor de Dilución = 50). Este comportamiento de la enzima podría explicarse por las propiedades conferidas por la estructura terciaria de la enzima, en la cual las interacciones entre los segmentos hidrofóbicos del sitio activo permiten la formación de dichas estructuras diméricas como se demuestra en el esquema propuesto de la **figura 25** (Palomo y col., 2005).

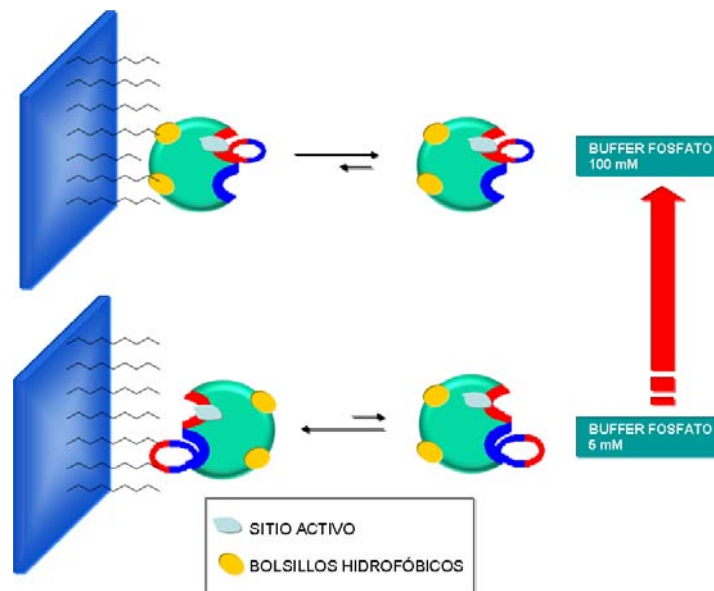


**Figura 25.** Mecanismo propuesto de la formación de especies diméricas de CAL B

La presencia de dichas especies que no son de interés, justifica en gran manera la purificación de la enzima para su posterior empleo en reacciones biocatalizadas. Una observación de gran relevancia que debe notarse en el análisis de SDS-PAGE es el peso elevado de la CAL B (39.1KDa). Este resultado se debe a que esta enzima posee numerosos puntos de glicosilación, razón por la cual exhibe una masa molecular superior a la esperada (Anderson y col, 1998, Larsen y col., 2008).

Teniendo en cuenta los resultados discutidos previamente, además de las referencias bibliográficas en esta área, puede proponerse el siguiente mecanismo para la adsorción de las lipasas en el octil-agarosa:

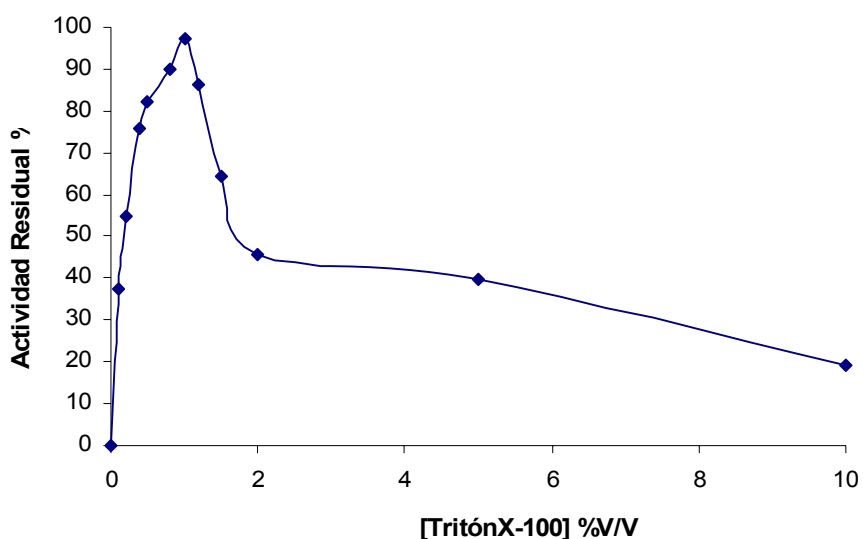
- (i) El equilibrio en el que se encuentra la CAL B entre su forma abierta y cerrada es desplazado hacia la disposición activa a baja fuerza iónica donde la adsorción se presenta en mayor proporción.
- (ii) El bolsillo hidrofóbico ubicado en el sitio activo en la enzima de la estructura abierta de la enzima es fuertemente adsorbido por el octil-agarosa a baja fuerza iónica, condiciones en las cuales la mayoría de las proteínas no se unen a este tipo de soportes.
- (iii) La adsorción asociada a la fuerte hiperactivación de la enzima debe involucrar únicamente las partes más externas de la zona hidrofóbica del lid de tal forma que no existe una interacción directa del sitio activo de la enzima. Esto debe ser una consecuencia directa de la morfología del gel de octil-agarosa como se representa en la **figura 26**.



**Figura 26.** Inmovilización de la CAL B en Octil Agarosa. Efecto de la fuerza iónica en el proceso de adsorción.

### 5.1.2. Desorción de la enzima del Octil-Agarosa

Se realizó un estudio sobre el efecto de la concentración de Tritón X-100 en el proceso de desorción de la CAL-B del soporte Octil-Agarosa. Los resultados de dicho ensayo pueden observarse en la **figura 27**, encontrándose que:



**Figura 27.** Efecto de la concentración del tensoactivo Tritón X-100 en la desorción de la lipasa CAL B.

Una concentración de 1%(v/v) de Tritón X-100 en buffer fosfato 5 mM permitía una desorción máxima de la enzima. Este reactivo se preparó a diferentes valores de pH y fuerza iónica con el fin de evaluar el efecto de estas variables en el proceso de inmovilización enzimática, es decir, la enzima desorbida de los soportes con alto grado de pureza se utilizó directamente en las inmovilizaciones realizadas.

## **5.2. DESORCIÓN DE LAS PROTEÍNAS UNIDAS NO COVALENTEMENTE AL SOPORTE**

Con el fin de asegurar que las enzimas que permanecían en el soporte se encontraban unidas a través de enlaces covalentes, los derivados inmovilizados se sometieron a condiciones que permitieron la desorción de las moléculas proteicas adsorbidas de forma física no-covalente. Para tal fin, se realizó un ensayo con los soportes modificados un 100% los cuales poseían grupos reactivos que promovían la adsorción física de las enzimas y así determinar si los agentes de desorción empleados eran eficientes.

Evaluando la actividad catalítica del pNPB de las enzimas liberadas de dichos soportes epóxidos, se logró determinar que cantidad de proteína permanecía unida al soporte a través de interacciones no covalentes. En la **tabla 3** se citan los agentes utilizados para la desorción de las enzimas adsorbidas sobre los soportes con los grupos epóxido totalmente modificados:

<b>Soporte</b>	<b>Grado de Modificación %</b>	<b>Agente Desorbente</b>	<b>Proteínas Liberadas %</b>
<b><i>Eupergit<sup>®</sup> C</i></b>	<b>100</b>	<b>Buffer Fosfato 25mM pH 7</b>	<b>93</b>
<b>Eupergit<sup>®</sup> C-EDA</b>	<b>100</b>	<b>Cloruro de Sodio 500mM pH 7</b>	<b>96</b>
<b>Eupergit<sup>®</sup> C-IDA</b>	<b>100</b>	<b>Cloruro de Sodio 500mM pH 7</b>	<b>91</b>
<b>Eupergit<sup>®</sup> C-IDA-Cu</b>	<b>100</b>	<b>Imidazol 100mM pH 7</b>	<b>95</b>

**Tabla 3.** Desorción de las enzimas unidas no covalentemente a los soportes epóxidos multifuncionales. Se implementaron aquellos soportes modificados un 100%.

De la tabla 3 se concluye que las condiciones de desorción empleadas para cada uno de los derivados son efectivas en todos los casos. Así, se asegura que cuando se empleen los soportes modificados parcialmente, la enzima no será liberada en el medio de reacción, ya que se encuentra ligada al soporte a través de enlaces covalentes, los cuales no sufren ningún tipo de debilitamiento en las condiciones de desorción que fueron empleadas.

### **5.3. EFECTO DEL GRADO DE MODIFICACIÓN DEL SOPORTE**

Para verificar la unión covalente de la CAL-B a los soportes, 2,5 mL de suspensión de diferentes derivados inmovilizados de enzima en los respectivos soportes (EDA, IDA, IDA-Cu) fueron lavadas con buffer fosfato 500 mM y filtradas al vacío con el fin de eliminar interferencias producidas por enzimas que no se encuentren unidas al soporte.

El soporte filtrado fue resuspendido en 2.5 mL de los respectivos agentes desorbentes y dejado en agitación muy suave durante 30 minutos. Posteriormente, se procedió a realizar mediciones de actividad de los sobrenadantes y las suspensiones; si no hay liberación de proteínas se considera que hubo inmovilización covalente (Mateo y col., 2006).

#### **5.3.1. Soporte aminado (EDA)**

Los datos de las concentraciones para los diferentes grados de modificación del soporte epóxido comercial con los grupos EDA se observan en la **tabla 4**:

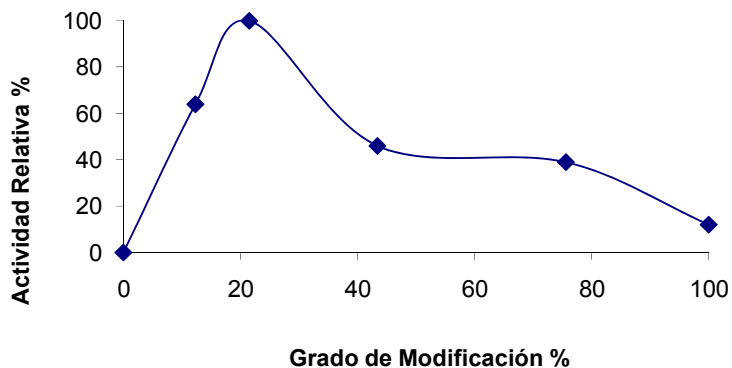
Condiciones Experimentales de modificación del soporte epóxido	Grado de Modificación de grupos epóxidos (%)	Inmovilización covalente <sup>b</sup> (%)	Adsorción Enzimática <sup>a</sup> (%)
	0	0	0
pH 8 , 0,5h	12,3	64	13
pH 8,5 , 1h	21,5	100	34
pH 9 , 6h	43,4	46	70
pH 9,5 , 10 h	75,6	39	78
pH 10, 24 h	100	12	100

a. Cantidad de enzima adsorbida en el soporte. Se cargó una cantidad de enzima= 141,4 U/g soporte.

b. Cantidad de enzima inmovilizada de forma covalente del total de enzima adsorbida.

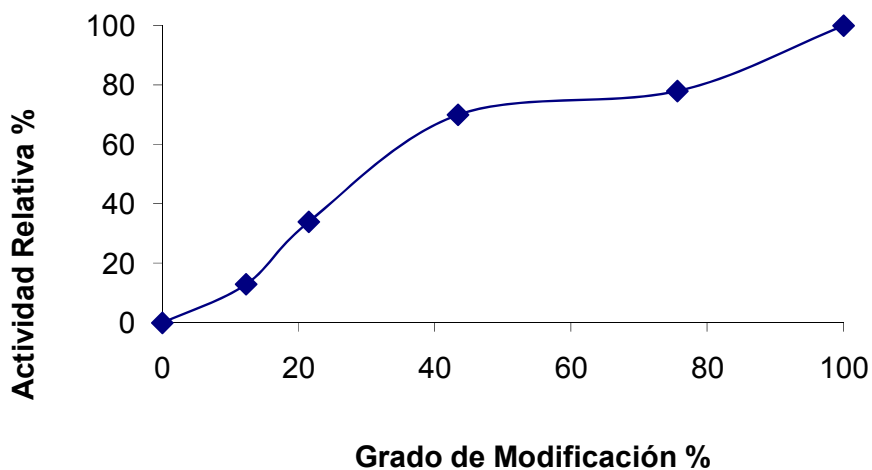
**Tabla 4.** Condiciones de modificación con grupos EDA del soporte epóxido comercial. Efecto en la adsorción e Inmovilización covalente de la CAL B.

En la **figura 28** se muestran los resultados del efecto de modificación del soporte sobre la actividad expresada de CAL-B inmovilizada. Con estos resultados, se demuestra que una modificación parcial de alrededor de un 21,5% de los grupos epóxidos del soporte comercial se alcanzaba el máximo de actividad catalítica de lipasa inmovilizada.



**Figura 28.** Efecto del grado de modificación del soporte en la inmovilización covalente de la CAL B. El 100% de actividad relativa corresponde a una actividad específica de 46,2 U/g soporte.

De igual forma, en la **figura 29** se muestra el efecto de la modificación del soporte epóxido con etilendiamina (EC-EDA) sobre la inmovilización de la CAL-B al soporte EC-EDA. Se observa, que el incremento del número de grupos EDA (grupos amino) en la superficie del soporte, aumenta las interacciones electrostáticas enzima-soporte, favoreciendo el número de moléculas de enzima inmovilizadas sobre el soporte (Montes y col., 2006). Así, al modificar completamente los grupos epóxidos (100%) del soporte comercial Eupergit® C con grupos amino, la actividad expresada por el derivado inmovilizado EC-EDA-CAL B es retenida un 96%.



**Figura 29.** Efecto del grado de modificación del soporte en la adsorción de la CAL B sobre EC-EDA. El 100% de actividad relativa corresponde a una actividad específica de 135,8 U/g soporte.

### 5.3.2. Soporte iminodiacético (IDA)

La **tabla 5** muestra los resultados del efecto del grado de modificación del soporte epóxido con IDA sobre la adsorción e inmovilización covalente de lipasa sobre los soportes epóxidos EC-DA

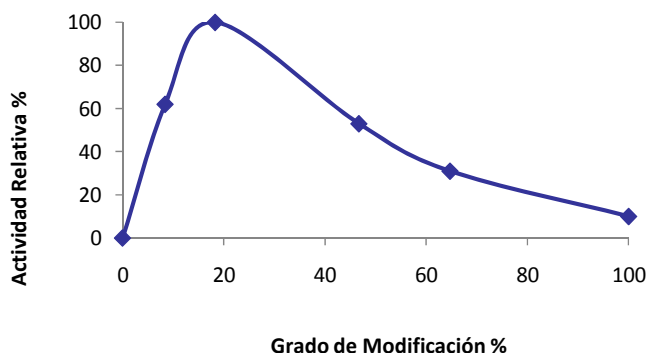
Condiciones Experimentales de modificación	Grado de Modificación de grupos epóxido (%)	Inmovilización Covalente <sup>b</sup> (%)	Adsorción enzimática <sup>a</sup> (%)
	0	0	0
pH 8 1h	8.4	62	12
pH 9 2h	18.3	100	24
pH 10 5h	46.7	53	31
pH 11 12 h	64.7	31	46
pH 12 24 h	100	10	100

a. Cantidad de enzima adsorbida en el soporte. Se cargó una cantidad enzima= 64,7 U/g soporte

b. Cantidad de enzima inmovilizada de forma covalente del total de enzima adsorbida.

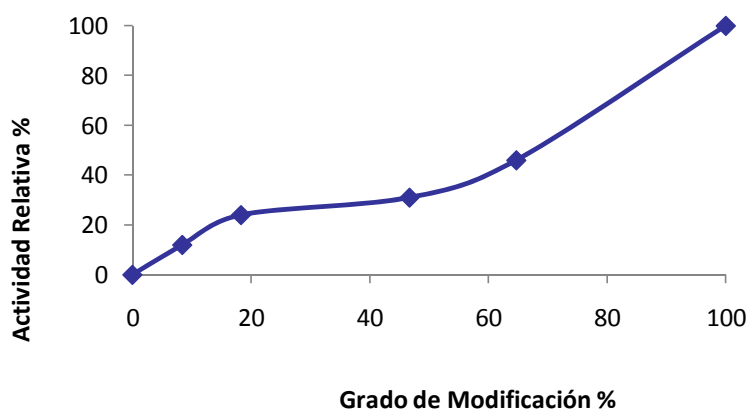
**Tabla 5.** Condiciones de modificación con grupos IDA del soporte epóxido comercial. Efecto en la adsorción e inmovilización covalente de la CAL B.

En la **Figura 30** se muestran los resultados del efecto del grado de modificación de los grupos epóxidos con IDA. En ella se observa que una modificación parcial del soporte epóxido Eupergit<sup>®</sup> C del 18,3%, se alcanza un mayor grado de expresión de actividad enzimática. Este grado de modificación permitió que tanto la adsorción de la enzima como la posterior formación de los enlaces covalentes entre la enzima y el soporte se llevara a cabo de forma efectiva.



**Figura 30.** Efecto del grado de modificación del soporte EC-IDA sobre la inmovilización covalente de la CAL B sobre EC-IDA. El 100% de actividad relativa corresponde a una actividad específica de 14,1 U/g soporte.

La **figura 31** ilustra el fenómeno de adsorción enzimática de la CAL B sobre la matriz del soporte EC-IDA de acuerdo con el grado de modificación de los grupos epóxidos del soporte. Vale la pena resaltar el hecho de que un aumento en la concentración de los grupos iminodiacético introducidos en la superficie del soporte posiblemente incrementan el número de interacciones con los residuos cargados de forma positiva de los aminoácidos presentes en la superficie de la CAL B, lo cual se ve reflejado en los resultados obtenidos en esta etapa.



**Figura 31.** Efecto del grado de modificación del soporte en la adsorción de CAL B sobre EC-IDA. El 100% de actividad relativa corresponde a una actividad específica de 58,9 U/g soporte.

### 5.3.3. Soporte iminodiacético Cobre (IDA-Cu)

La **tabla 6** muestra los resultados obtenidos en la determinación de la adsorción e inmovilización covalente de la CAL B

Condiciones Experimentales de modificación del soporte	Grado de Modificación (%)	Adsorción (%)	Inmovilización Covalente (%)
	0	0	0
pH 8 1h	10.7	46	19
pH 9 2h	24.3	100	32
pH 10 5h	43.4	32	48
pH 11 12 h	69.1	22	54
pH 12 24 h	100	5	100

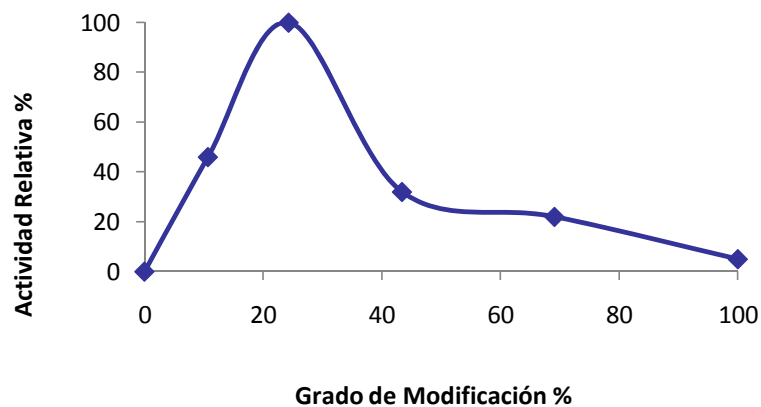
a. Cantidad de enzima adsorbida en el soporte. Se cargó una cantidad enzima= 112,6 U/g soporte

b. Cantidad de enzima inmovilizada de forma covalente del total de enzima adsorbida

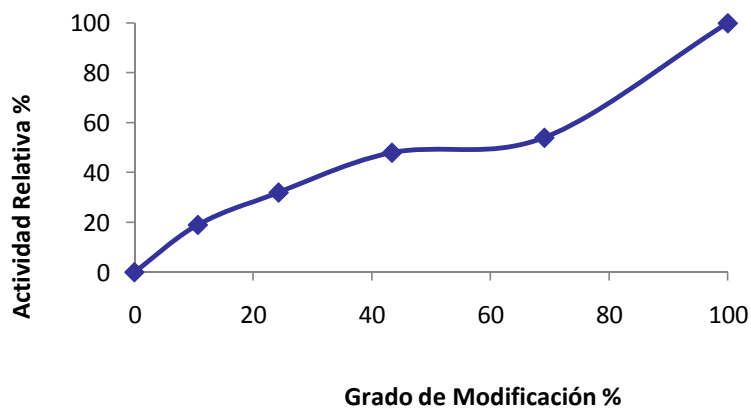
**Tabla 6.** Condiciones de modificación con grupos IDA-Cu del soporte epóxido comercial. Efecto en la adsorción e inmovilización covalente de la CAL B.

Las **figuras 32 y 33** muestran el efecto de la modificación del soporte epóxido con quelatos de cobre sobre la inmovilización covalente y adsorción de la lipasa de *Candida antarctica B*. En el primer caso, se aprecia que cuando se modificó en un 24.3% los grupos epóxidos del Eupergit® C se alcanzó la máxima expresión de actividad de la enzima inmovilizada.

Para el caso de la adsorción, consecuente con lo resultados previos, el aumento de los grupos IDA-Cu en el soporte produce una elevación de la cantidad de enzima adsorbida como consecuencia de las múltiples interacciones electrostáticas promovidas por dichos grupos.



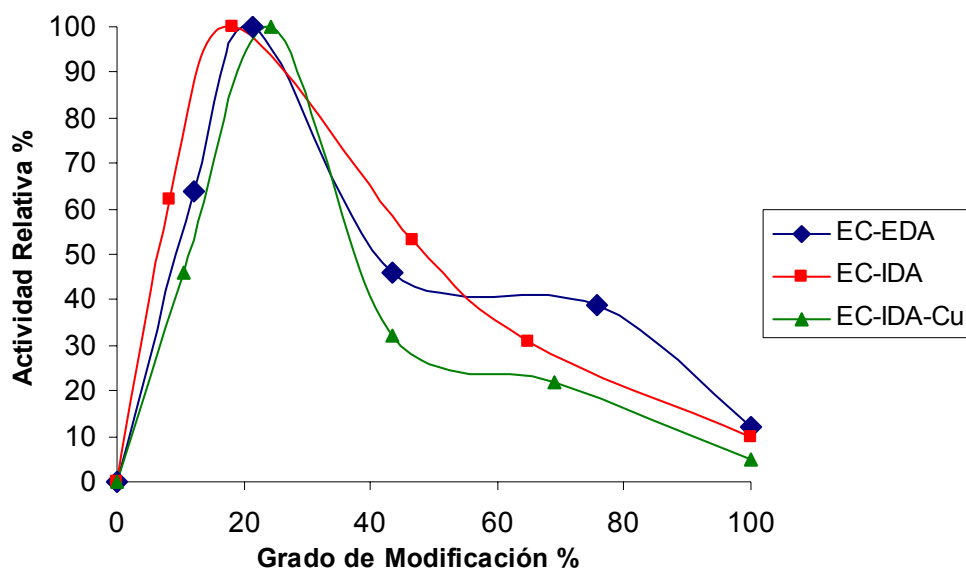
**Figura 32.** Efecto del grado de modificación del soporte en la inmovilización covalente de CAL B sobre EC-IDA-Cu. El 100% de actividad relativa corresponde a una actividad específica de 34,2 U/g.



**Figura 33.** Efecto del grado de modificación del soporte en la adsorción de CAL B sobre EC-IDA-Cu. El 100% de actividad relativa corresponde a una actividad específica de 107 U/g soporte.

Los resultados demuestran que la adsorción de las proteínas se incrementa a medida que aumenta la cantidad de grupos epóxidos modificados en el soporte. Sin embargo, en el caso de la unión covalente ésta aumenta únicamente hasta alcanzar un 15-25% de modificación del soporte epóxido para posteriormente decaer.

Esto demuestra que la inmovilización covalente de las proteínas necesita solo una modificación mínima de los grupos epóxido del soporte comercial debido a que la reactividad química de estos grupos es necesaria para que el proceso de rigidificación se lleve a cabo. De acuerdo con esto, los soportes elevadamente modificados adsorben rápidamente la enzima. Sin embargo, la unión covalente en estos soportes es muy lenta. De esta manera, puede concluirse que la mayor inmovilización covalente se obtiene con una modificación moderada de los grupos epóxidos (alrededor de 20%) presentes inicialmente en el soporte comercial (Ver **figura 34**).



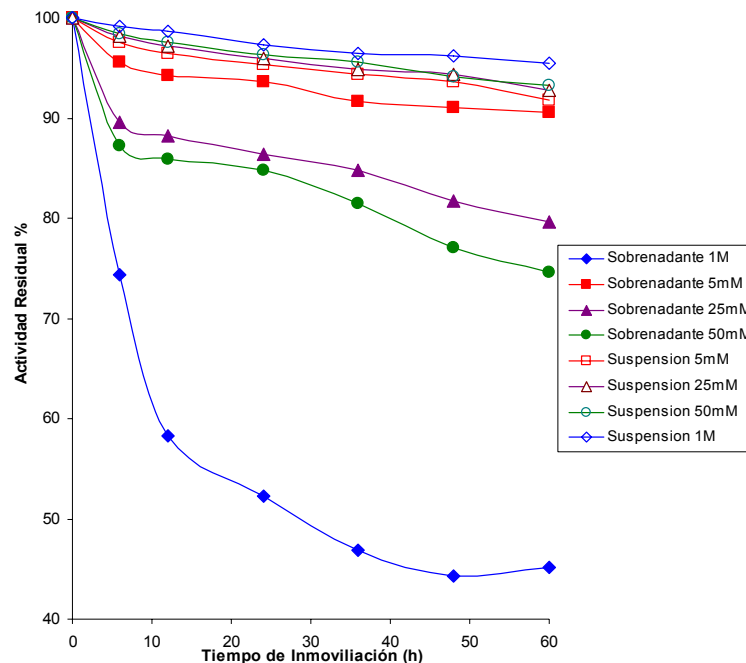
**Figura 34.** Efecto del grado de modificación en los soportes epóxidos parcialmente modificados. La inmovilización covalente de la CAL B es mayor en un porcentaje de inmovilización entre el 15 y 25% para todos los casos. Actividad específica EC-EDA = 46,2 U/g soporte corresponde al 100% de actividad relativa. Actividad específica EC-IDA = 14,1 U/g soporte corresponde al 100% de actividad relativa. Actividad específica EC-IDA-Cu = 34,2 U/g soporte corresponde al 100% de actividad relativa.

## 5.4. EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA EN EL PROCESO DE INMOVILIZACIÓN

Los estudios de efecto de la fuerza iónica en el proceso de inmovilización se llevaron a cabo a pH 7, ya que la enzima CAL B nativa poseía una actividad óptima en dicho valor de pH. La variación de la fuerza iónica del medio se realizó usando un buffer fosfato en un rango de 5mM hasta 1000mM

### 5.4.1. Soporte Eupergit® C

Se determinó el efecto de la fuerza iónica en el proceso de inmovilización de la CAL B sobre el soporte epóxido comercial Eupergit® C (Ver **figura 35**). Estos estudios demostraron que alta fuerza iónica favorece el proceso de inmovilización de la enzima sobre el soporte.

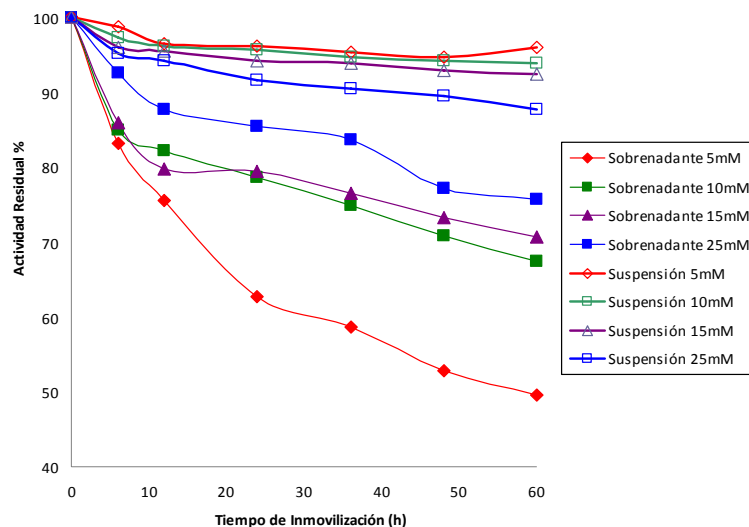


**Figura 35.** Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre EC. Efecto de la fuerza iónica en el proceso de inmovilización empleando buffer fosfato a diferentes concentraciones y pH 7.

En la figura 35 se observa que los valores de actividad para el sobrenadante disminuyen durante el transcurso de la inmovilización, lo cual significa que la actividad catalítica de la CAL-B está siendo retenida por el soporte, lo cual contrasta con la actividad expresada por la suspensión, en la cual se encuentra, la enzima inmovilizada y no inmovilizada. La inmovilización a baja fuerza iónica fue despreciable. Esto sugiere una limitación para los soportes de tipo epóxido, ya que es necesaria una elevada fuerza iónica y no todas las proteínas pueden ser sometidas a estas condiciones sin que se afecte su actividad y estabilidad (Mateo y col., 2000a). Esto se debe posiblemente a la baja hidrofobicidad presentada por este tipo de material polimérico (Mateo y col., 2002).

#### 5.4.2. Soporte aminado (EDA)

El proceso de inmovilización en el soporte epóxido parcialmente modificado con grupos amino EDA, presentó una mejoría al disminuir la fuerza iónica del medio como se demuestra en la **figura 36**.



**Figura 36.** Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre EC-EDA. Efecto de la fuerza iónica en el proceso de inmovilización empleando buffer fosfato a diferentes concentraciones y pH 7

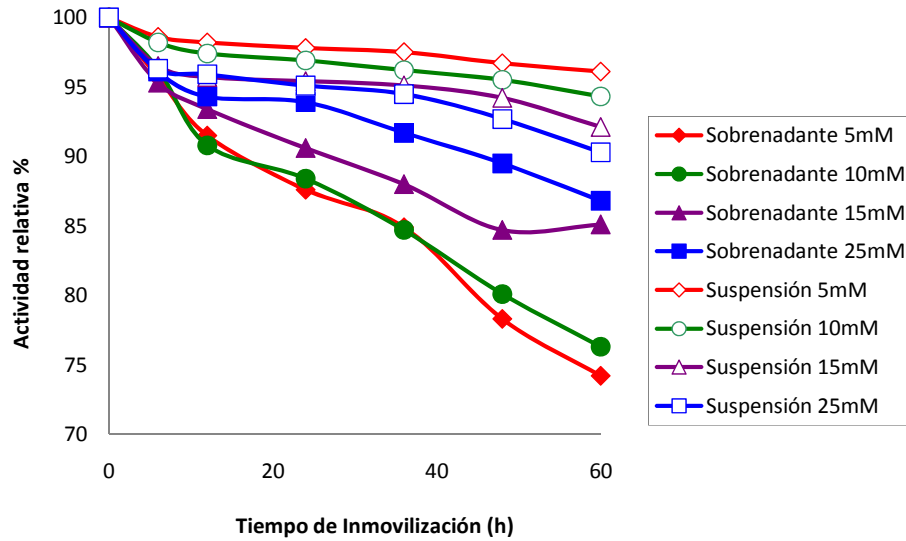
Este resultado sugiere que el mecanismo por medio del cual actúa este soporte EDA es completamente diferente al del soporte epóxido comercial. En este caso, la adsorción de tipo iónico entre los grupos modificados del soporte con grupos amino fue más eficiente a baja fuerza iónica.

Estos resultados estarían indicando que el mecanismo de adsorción de las enzimas sobre el soporte ocurre primero por medio de interacciones iónicas para una vez adsorbida la proteína comenzar a formarse los enlaces covalentes, proceso que es más lento de llevar a cabo en los soportes epóxidos.

#### **5.4.3. Soporte iminodiacético (IDA)**

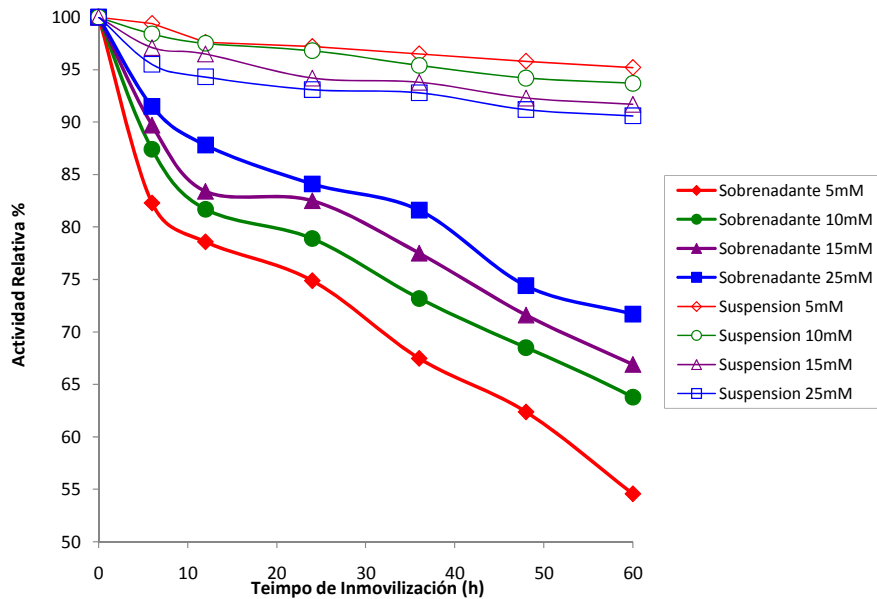
En la **figura 37** se muestra el efecto de la concentración de sales o fuerza iónica en el proceso de inmovilización de la CAL B en el soporte IDA. En este caso aumentó la inmovilización de la enzima a baja fuerza iónica. Esto se debería a que a mayor fuerza iónica se produce una competencia entre los iones y las proteínas por los sitios aniónicos del soporte generado por la modificación con IDA.

Las interacciones electrostáticas que debieran darse inicialmente entre los grupos ácidos introducidos en el soporte y los residuos reactivos de los aminoácidos presentes en la superficie de la enzima se ven afectadas o perturbadas por la presencia de las sales. (Mateo y col., 2000a)



**Figura 37.** Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre EC-IDA. Efecto de la fuerza iónica en el proceso de inmovilización empleando buffer fosfato a diferentes concentraciones y pH 7.

#### 5.4.4. Soporte iminodiacético cobre (IDA-Cu)



**Figura 38.** Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre EC-IDA-Cu. Efecto de la fuerza iónica en el proceso de inmovilización buffer fosfato a diferentes concentraciones y pH 7.

Los resultados de inmovilización de la lipasa sobre soportes EC-IDA-Cu se observan en la **figura 38**. En ella se puede observar que el efecto de la fuerza iónica es el mismo para el soporte IDA-Cu que para los obtenidos en los casos de los soportes EC-IDA y EC-EDA.

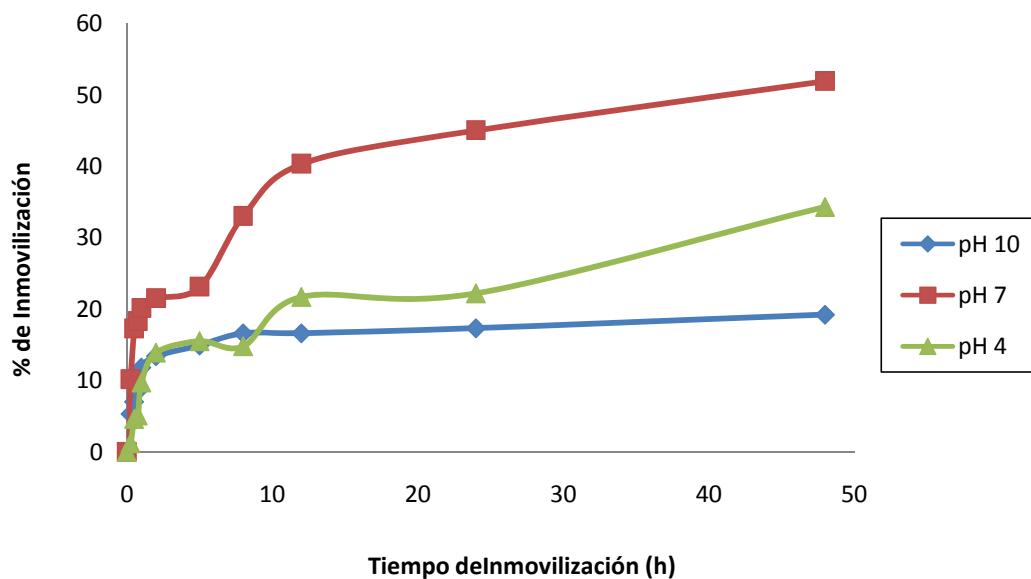
Las interacciones que pueden presentarse entre los iones de las sales del buffer empleado, con los grupos reactivos presentes en la superficie de la CAL B aumentan al incrementarse la concentración de dicha solución salina. Esto conlleva a un posterior impedimento de interacción entre los quelatos de Cobre introducidos parcialmente en la superficie del soporte epóxido y los residuos aminoacídicos reactivos que se encuentran bloqueados con las altas concentraciones de sal. Por esta razón, la adsorción de tipo electrostático que debe presentarse para que el mecanismo de adsorción-rigidificación funcione de una manera positiva se ve obstruida a una elevada fuerza iónica (Torres y col., 2003).

## **5.5. EFECTO DEL PH EN EL PROCESO DE INMOVILIZACIÓN**

En este caso se evaluó el efecto del pH en el proceso de inmovilización de CAL B en los diferentes soportes epóxidos parcialmente modificados. Los datos a continuación solo reflejan el porcentaje de inmovilización respectivo a cada pH, ya que la actividad específica inicial de la enzima CAL B difiere con respecto a los valores de pH. Es decir, que a pesar de que se quiere demostrar que el proceso de inmovilización puede mejorar según las condiciones de pH, este se halla altamente influenciado por la actividad enzimática intrínseca y puede variar dependiendo de la enzima que desee utilizarse. Además, se ha demostrado que los soportes epóxido son muy estables en todo el rango de pH (Mateo y col., 2007b).

Las inmobilizaciones realizadas con el fin de encontrar el pH óptimo se llevaron a cabo según los valores de fuerza iónica para los cuales se encontraron los mejores resultados. La variación del pH se realizó en la preparación de lipasa desorbida con tritón X-100 de los soportes octil-agarosa.

### 5.5.1. Soporte Eupergit® C

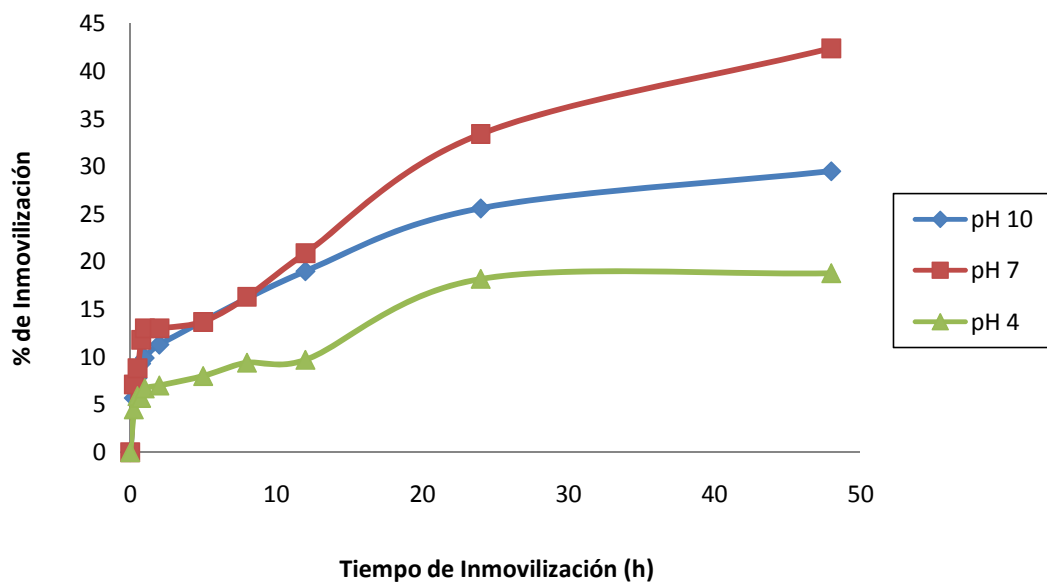


**Figura 39.** Porcentaje de Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre EC (act. suspensión-act. sobrenadante). Efecto del pH en proceso de inmobilización. Buffer fosfato 1M a pH 4, 7 y 10. En esta parte de la investigación se encontró que a valores de pH neutro la enzima mostraba una actividad superior que a valores más ácidos y más básicos como puede observarse en la **figura 39**. Este resultado puede ser atribuido al hecho de que la CAL B presenta una actividad óptima a pH 7 y es más estable a pH neutro que a pHs ácidos y básicos, tal como se demostró en la investigación realizada por Escorcía (2008).

Una razón que apoya esta conclusión es el hecho de que el soporte epóxido comercial Eupergit® C presenta estabilidad en todo el rango de pH (Mateo y col, 2007a).

### 5.5.2. Soporte Aminado (EDA)

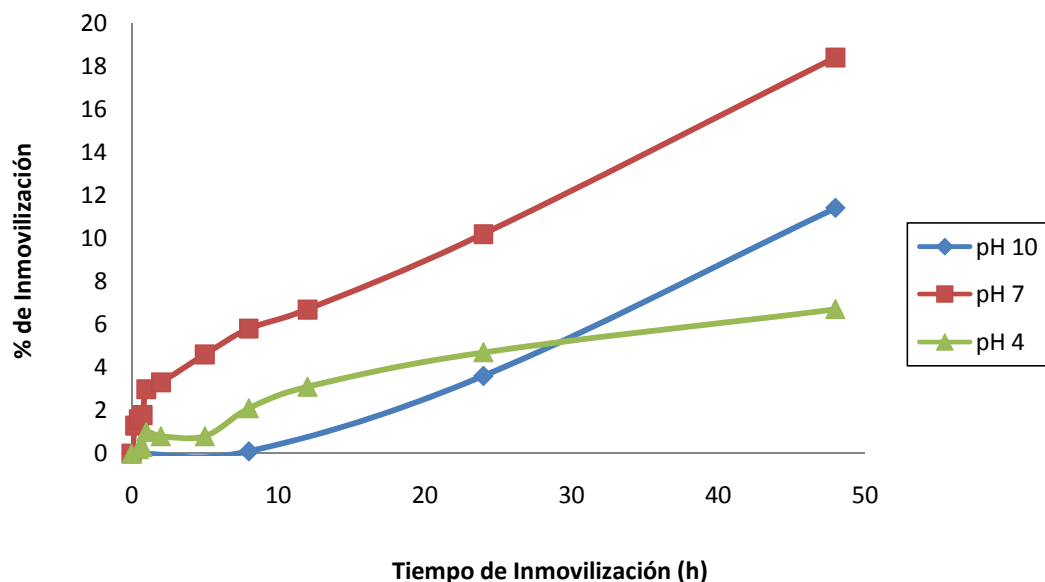
La **figura 40** representa los resultados obtenidos en la determinación del efecto del pH en el proceso de inmovilización en el soporte EC-EDA. A pH 10 el preparado inmovilizado demostró tener una actividad superior a la obtenida en con los derivados EC, EC-IDA y EC-IDA-Cu. Esto puede explicarse gracias a que a este valor de pH la enzima posee carga negativa, lo cual le permite una interacción más efectiva gracias a los grupos amino presentes en el soporte, llevándose acabo la adsorción inicial de la CAL-B.



**Figura 40.** Porcentaje de Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre EC-EDA (act. suspensión-act. sobrenadante). Efecto del pH en proceso de inmovilización. Buffer fosfato 5mM a pH 4, 7 y 10

De igual forma, los grupos lisínicos presentes en la enzima se encuentran desprotonados a este pH, lo que les permite efectuar un ataque nucleofílico a un centro electrodeficiente como lo es el carbono del grupo epóxido formándose así los enlaces covalentes entre el soporte y la enzima. Gracias a este resultado, puede asegurarse con gran certeza, que el uso del soporte activado con grupos amino en la inmovilización y posterior catálisis en fase heterogénea con enzimas de punto isoelectrico (pI) relativamente bajo será elevadamente efectiva, de acuerdo a lo propuesto por Torres y col. (2003).

### 5.5.3. Soporte iminodiacético (IDA)



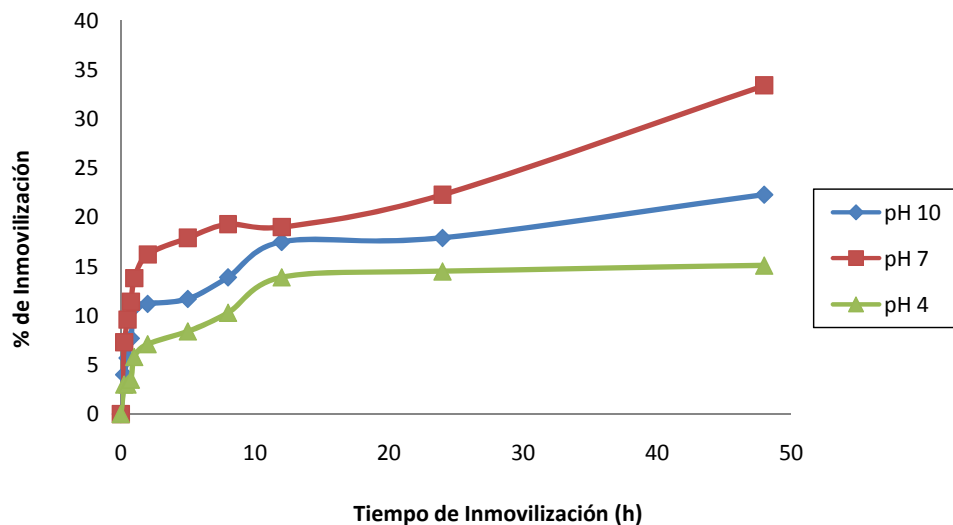
**Figura 41.** Porcentaje de Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre EC-IDA (act. suspensión-act. sobrenadante). Efecto del pH en proceso de inmovilización. Buffer fosfato 5mM a pH 4, 7 y 10

En la **figura 41** se observan los resultados de inmovilización sobre soporte epóxido EC-IDA.

Los mejores resultados se obtuvieron a pH 4. Esto se debe a que la lipasa CAL B posee carga positiva a este pH llevándose a cabo una adsorción inicial de la enzima hacia los grupos electroexcedentes introducidos en el soporte con el ácido iminodiacético. Por el contrario, a valores de pH neutros la carga negativa presente en la enzima ocasiona una repulsión con los grupos del ácido iminodiacético los cuales poseen una alta densidad electrónica. Finalmente, se observa que la retención de actividad fue superior a pH 7 al finalizar las 48 horas de inmovilización. Posiblemente, este hecho puede atribuirse a que la actividad y estabilidad enzimática de la CAL B es superior en dicho valor de pH (Escorcia, 2008).

#### 5.5.4. Soporte iminodiacético cobre (IDA-Cu)

No se observaron grandes diferencias en la actividad de la enzima inmovilizada a los diferentes valores de pHs (ver **figura 42**).



**Figura 42.** Porcentaje de Inmovilización de la Lipasa CAL B sobre EC-IDA-Cu (act. suspensión-act. sobrenadante). Efecto del pH en proceso de inmovilización. Buffer fosfato 5mM a pH 4, 7 y 10

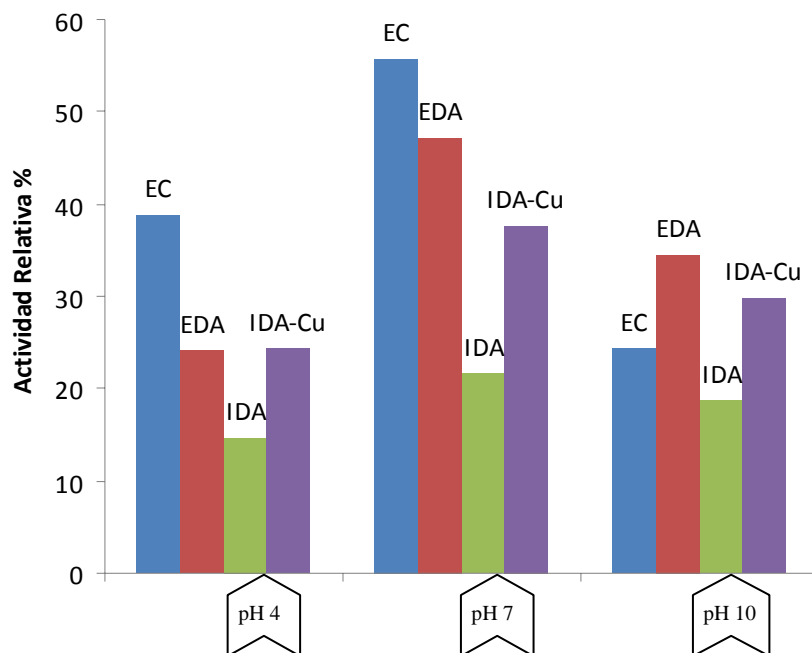
Gracias a las características presentadas por este soporte se puede concluir que es muy útil cuando se desee inmovilizar la enzima CAL B a diferentes valores de pH. Debe tenerse en cuenta que este soporte es de carácter reversible lo cual proporciona una ventaja como técnica de aplicación industrial, ya que permitiría el reciclamiento del soporte como lo proponen Armisen y col. (1999).

## **5.6. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS SOPORTES EPÓXIDO PARCIALMENTE MODIFICADOS**

### **5.6.1. Efecto del pH**

En la **figura 43** se muestra los resultados obtenidos en el proceso de inmovilización de CAL B a diferentes valores de pH. En ella se observa que a valores de pH neutros se logran los mejores resultados de inmovilización para todos los soportes epóxidos modificados, alcanzando una mayor expresión de actividad lipásica. Para pH 4 y 7, la actividad expresada por el derivado inmovilizado de EC-CAL B fue superior a la de los demás derivados.

Sin embargo, a pH 10 se observó que el derivado EDA-CAL B demostró una actividad catalítica mayor. Es importante resaltar que todos derivados mostraron una actividad catalítica superior en la reacción de hidrólisis del pNPB en comparación con la enzima nativa



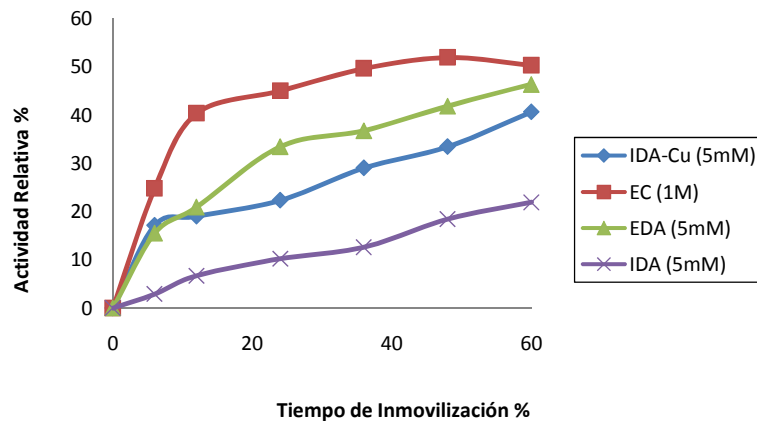
**Figura 43.** Efecto del pH sobre la expresión de actividad lipasa en los diferentes soportes empleados en esta investigación. Actividad = 320 U/g soporte , corresponde al 100% actividad relativa.

Estos resultados demostraron que es posible inmovilizar la lipasa de *Candida antarctica* B en un amplio rango de pHs sobre diferentes tipos de soportes epóxidos activados con diferentes tipos de grupos, lo cual que permite diferentes interacciones intermoleculares y posiblemente orientaciones de las moléculas de proteína sobre la superficie del soporte (Palomo y col, 2003a).

Estos resultados demuestran que es conveniente utilizar la CAL-B a pH neutro, en el cual todos los derivados inmovilizados exhiben una actividad catalítica mayor.

### 5.6.2. Efecto de la fuerza iónica

En la **figura 44** se muestran los valores de actividad retenida por los diferentes soportes en las condiciones de fuerza iónica para las cuales la CAL B expresó una mayor actividad



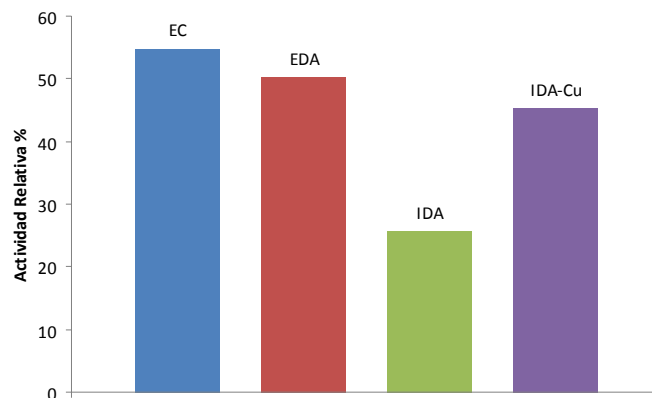
**Figura 44.** Porcentaje de inmovilización (act. suspensión – act. sobrenadante) para cada uno de los soportes en las condiciones de mejor expresión de actividad respecto a la fuerza iónica. Actividad = 320 U/g soporte, corresponde al 100% de actividad relativa.

En la **tabla 7** se muestran los resultados obtenidos en los casos para los cuales se obtuvo una respuesta positiva de los valores de fuerza iónica evaluados.

Soporte de inmovilización	Enzima Inmovilizada (U/g soporte)	Actividad Expresada (%)
EC-IDA-Cu	120,4	37,6
EC-IDA	69,5	21,7
EC-EDA	151,2	47,2
EC	178,4	55,7

**Tabla 7.** Porcentajes de actividad residual retenida por los diferentes soportes empleados a diferentes valores de fuerza iónica. Actividad = 320 U/g soporte, corresponde al 100% de proteína cargada en los diferentes soportes.

Como se mencionó anteriormente para el caso de los soportes parcialmente modificados EDA, IDA e IDA-Cu, un valor de fuerza iónica muy bajo proporciona las condiciones más apropiadas para llevarse a cabo el proceso de inmovilización como pudo verificarse en los ensayos realizados. Finalmente, y de acuerdo con los resultados obtenidos, la lipasa de *Candida antarctica B* inmovilizada en el soporte epóxido Eupergit® C expresó mayor actividad enzimática en las condiciones estudiadas, tal como puede verificarse en la **figura 45**, donde se comparan todos los soportes empleados en las mejores condiciones de inmovilización de la enzima. Sólo la CAL B inmovilizada en el soporte IDA alcanzó la mitad de la actividad enzimática expresada por la lipasa inmovilizada en el soporte EC.



**Figura 45.** Actividad expresada por CAL B inmovilizada en los diferentes tipos de soportes empleados. Los resultados expuestos corresponden a las mejores condiciones de inmovilización de la CAL B. Actividad = 320 U/g soporte, corresponde al 100% de proteína cargada en los diferentes soportes.

Los resultados sugieren que la CAL B puede unirse a los diferentes soportes epóxidos modificados en proporciones aceptables luego de 48 horas destacándose el derivado inmovilizado sobre el soporte Eupergit® C con 55,7% de actividad expresada. De acuerdo con esto, se ha observado una reactividad diferente respecto a los diferentes soportes para el caso de la

CAL B, dependiendo de las condiciones del proceso de inmovilización. Cuando se han utilizado estos soportes multifuncionales, la adsorción física de las proteínas ha sido el paso inicial de la reacción de acoplamiento enzima-soporte gracias a los grupos reactivos que se han introducido en el soporte epóxido.

Luego de darse este fenómeno, las reacciones químicas que se llevan a cabo entre los grupos reactivos de la enzima y los grupos epóxidos remanentes del soporte tienen como resultado la formación de enlaces covalentes, lo suficientemente estables como para resistir condiciones de desorción enzimáticas y permitir a la enzima permanecer ligada al soporte (Mateo y col, 2001).

### **5.7. RESOLUCIÓN ENANTIOMERICA DEL R/S PROPRANOLOL**

La enantioselectividad es la propiedad más importante de las lipasas, ya que permite llevar a cabo reacciones útiles en síntesis asimétrica. En este sentido, se evaluó la enantioselectividad de los diferentes derivados inmovilizados de CAL-B sobre la reacción de esterificación del (R/S)-Propranolol, un compuesto muy reconocido como agente antihipertensivo.

Los resultados obtenidos mostraron que los derivados inmovilizados de CAL-B sobre los soportes multifuncionales desarrollados en este trabajo tenían una elevada preferencia enantiomérica hacia el enantiómero R. Estos resultados están de acuerdo con los estudios realizados previamente por Kazlauskas y col.,(1991), quienes encontraron resultados similares trabajando con lipasas, y quienes postularon que la lipasa de *Candida antarctica B* es R selectiva.

En la **tabla 8** son expuestos los resultados obtenidos con los diferentes derivados inmovilizados en la reacción de esterificación del propranolol racémico bajo las mismas condiciones experimentales

Derivado Inmovilizado	Enantio-selectividad	Conversión (%)	t(h)	ee <sub>s</sub>	E
Octil-agarosa-CAL-B	R	27,5	3	37	23
EC-CAL-B	R	30	5	96	57
EC-EDA -CAL-B	R	24,3	3	92	25
EC-IDA-CAL-B	R	30	6	75	18
EC-IDA-Cu-CAL-B	R	23	4	49	11

**Tabla 8.** Conversiones, y valores de exceso enantiomérico y E obtenidos para la reacción de acetilación con acetato de vinilo del (R/S)-Propranolol catalizada por los derivados inmovilizados de CAL B.

Los diferentes valores obtenidos para los derivados de lipasas inmovilizadas, pueden atribuirse a que los soportes utilizados estarían generando diferentes orientaciones de la enzimas sobre ellos y/o cambios conformacionales en la lipasa, lo cual cambiaría la forma del centro activo y alteraría las propiedades de selectividad de la enzima en su forma inmovilizada (Fernández-Lafuente y col., 1998; Mateo y col., 2007).

La estrategia de inmovilización de la lipasa CAL B sobre los soportes epóxidos parcialmente modificados con diferentes grupos reactivos llevada a cabo en este trabajo ha permitido la modulación de las propiedades enantioméricas, considerando, que derivados como el EC-CAL B (E=57), EC-

EDA-CAL B (E=25) y Octil-Agarosa-CAL B (E=23), muestran relaciones enantioméricas aceptables (E>20) de acuerdo a lo sugerido por Ghanem y col, (2004). Estos son acordes a lo descrito por otros investigadores que usaron lipasas para la resolución cinética de hidroxí-ácidos quirales (Palomo y col., 2005; Cao, 2005). Estos valores de enantioselectividad permiten la implementación de estos derivados inmovilizados como biocatalizadores enantioselectivos en reacciones de gran relevancia a nivel farmacéutico como la esterificación el (R/S)-Propranolol.

Además, los resultados exhibieron valores diferentes de exceso enantiomérico para cada uno de los derivados inmovilizados concluyéndose que se han modulado las propiedades enantioselectivas de la CAL B por efecto de la inmovilización (Palomo y col., 2004; Palomo y col., 2005; Palomo y col., 2002). Asimismo, el derivado inmovilizado en octil-agarosa demostró una alta velocidad de conversión al correspondiente producto (27,5%) en tan solo 3 horas de transcurso de la reacción de acetilación del (R/S)-propranolol. Sin embargo, esta elevada conversión contrasta con los bajos valores obtenidos para la razón enantiomérica (E=23), el cual fue significativamente menor a los obtenidos para el derivado inmovilizado de CAL B en Eupergit C (E=57).

Por otro lado, los derivados inmovilizados EC-IDA y EC-IDA-Cu mostraron razones enantioméricas bajas (E= 18 and E=11, respectivamente), lo cual puede ser explicado en términos de las diferentes orientaciones que tomaría la enzima sobre la superficie de los soportes (Mateo y col., 2007b). Dichas orientaciones distorsionan la enzima llevándola a una conformación desfavorable, debido probablemente a severos efectos estéricos entre el anillo difenílico del propranolol y la proteína inmovilizada, lo que impediría el acceso del sustrato al intermediario tetrahedral acilado de la enzima (Ema,

2004). De acuerdo a esto, los derivados EC-IDA y EC-IDA-Cu difícilmente pueden implementarse como catalizadores enantioselectivos, ya que no permiten la adecuada resolución de la mezcla racémica del (R/S)-Propranolol.

## 6. CONCLUSIONES

- La inmovilización de la *Candida Antarctica* B sobre soporte epóxidos parcialmente modificados (EC-EDA, EC-IDA, EC-IDA-Cu) permitieron una modulación de las propiedades bioquímicas de la enzima. Esto se confirmó mediante el uso de los derivados inmovilizados en la resolución cinética del Propranolol racémico
- La adsorción de la CAL B, a baja fuerza iónica, en soportes altamente hidrofóbicos como el octil-agarosa, demostró ser una herramienta fácil y rápida para la inmovilización y purificación de dichas proteínas.
- El uso de los soportes epóxidos homofuncionales hacen necesario el uso de una alta fuerza iónica con el fin de lograr inmovilizar las proteínas. La CAL-B demostró tener unas propiedades catalíticas apropiadas bajo estas condiciones de inmovilización reteniendo hasta un 60 % de la actividad catalítica de la enzima purificada e hiperactivada, lo que permitiría su implementación a nivel industrial.
- Los resultados obtenidos en este trabajo han demostrado la fuerte influencia del tipo de derivado inmovilizado y de la naturaleza del sustrato en la resolución cinética del (R/S)-propranolol para el cual se encontraron diferentes conversiones (EC=30% (5h); EDA=24.3% (3h); IDA=30% (6h); IDA-Cu=23% (4h)), excesos enantioméricos ( $ee_s$ ) para el enantiómero no reaccionante (EC=96; EDA=92; IDA=75; IDA-Cu=49) y relaciones enantioméricas (E) (EC=57; EDA=25; IDA=18; IDA-Cu=11) para cada uno de los casos.

- Los diferentes derivados inmovilizados preparados en esta investigación: *Eupergit*<sup>®</sup> C, EC-EDA, EC-IDA y EC-IDA-Cu, conservaron su enantioselectividad y demostraron ser R selectivos en la reacción de esterificación del (R/S)-Propranolol, obteniéndose entonces el enantiómero (S) (no esterificado) con elevada pureza enantiomérica
- El derivado inmovilizado *Eupergit*<sup>®</sup> C - CAL-B fue el más eficiente entre todos los estudiados, presentando alta actividad y estabilidad en la reacción de hidrólisis del pNPB y la mayor enantioselectividad ( $E > 57$ ) en la reacción de esterificación del (R/S) Propranolol.

## **7. Recomendaciones**

Gracias a la reactividad variable ofrecida por los diferentes soportes epóxidos parcialmente modificados, es de gran importancia realizar diferentes ensayos de inmovilización con un grupo amplio de enzimas. Dichos ensayos permitirán ampliar el campo de aplicación de los soportes en otras áreas de los procesos industriales en los cuales existe una gran diversidad de enzimas con potencial de aplicación en catálisis en fase heterogénea.

Se recomienda evaluar la respuesta biocatalítica que pueda tener la puesta a prueba de diferentes metales unidos coordinadamente al soporte IDA, o incluso la generación de nuevas especies complejas que no dependan del uso del ácido iminodiacético como ligando.

Una de las ventajas de realizar biocatálisis con enzimas inmovilizadas es la posible reutilización del soporte, por lo cual se hace necesaria la evaluación de dicha variable en posteriores investigaciones para las cuales se logre determinar la influencia de la reutilización del soporte en la actividad catalítica de las enzimas inmovilizadas.

## 8. REFERENCIAS

- Al-Duri, B., Robinson, E., McNerlan, S. Bailie, P. "Hydrolysis of edible oils by lipases immobilized on hydrophobic supports: effects of internal support structure". *Journal of the American Oil Chemical Society*: **1995**, 72, 11, 1351-1359.
- Ampon, K., Basri, M., Salleh, A.B., Wan-Yunus, W.M.Z. Razak, C.N.A "Immobilization by adsorption of hydrophobic lipase derivatives to porous polymer beads for use in ester synthesis". *Biocatalysis*: **1994**, 10, 341-351.
- Anderson, E.M., Larsson, K.M., Kirk, O. "One Biocatalyst - Many Applications: The Use of *Candida antarctica* B-lipase in Organic Synthesis". *Biocatalysis and Biotransformation*: **1998**, 16, 181-204.
- Armisen, P., Mateo, C., Cortes, E., Barredo, J. L., Salto, F., Diez, B., Rodes, L., Garcia, J. L., Fernandez-Lafuente, R. Guisan, J. M. "Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acylase on tailormade metal chelate supports". *Journal of Chromatography A*: **1999**, 848, 61-70.
- Arroyo, M. "Immobilized enzymes: theory, methods of study and applications". *Ars pharmaceutica*: **1999**, 39, 2, 23-39.
- Basri, M., Ampon, K., Yunus, W.M.Z., Razak, C.N.A. Salleh, A.B. "Enzymatic synthesis of fatty esters by hydrophobic lipase derivatives immobilized on organic polymer beads". *Journal of the American Oil Chemical Society*: **1995**, 72, 4, 407-411.

- Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernández-Lafuente, R., Huguet J. Guisán J.M. "A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports". *Biotechnology and Bioengineering*: **1998**, 58, 5, 486-493.
- Bernfeld, P. Wan, J. "Antigens and enzymes made insoluble by entrapping them into lattices of synthetic polymers". *Science*: **1963**, 142, 3593, 678-679.
- Berti, F., Forzato, C., Nitti, P., Pitacco, G. Valentin, E. "A study of the enantioselectivity of lipase PS (*Pseudomonas cepacia*) towards diastereomeric dihydro-5-alkyl-4-hydroxymethyl-2(3H)-furanones". *Tetrahedron: Asymmetry*: **2005**, 16, 6, 1091-1102.
- Bianchi, D. "Anhydrides as Acylating Agents in Lipase-Catalyzed Stereoselective Esterification of Racemic Alcohol", *Journal of Organic Chemistry*: **1988**, 53, 23, 5531-5534.
- Bickerstaff, G. F. "Immobilization of enzymes and cells". In: *Methods in Biotechnology*, (Bickerstaff, G. F., ed.), Humana Press, Totowa, **1997**.
- Blanco, R., M. Calvete, J. J. Guisán, J. M. "Immobilization-stabilization of enzymes. Variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose-(aldehyde) –multipoint attachment". *Enzyme Microb. Technol*: **1989**, 11, 353–359.
- Bornscheuer, U.T. Kaslaukas, R.J. "Hydrolases in organic synthesis: *regio and stereoselective biotransformations*". **1999** Wiley-VCH ed., Weinheim.

- Bradford, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*: **1976**, 76, 248.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E. Dodson, G. "A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase". *Nature*: **1990**, 343, 767-770.
- Brena, B. Batista-Viera, F. "Immobilization of Enzymes. A Literature Survey". In: *Immobilization of Enzymes and Cells*: **2006**, 2 (ed. Totowa), Humana Press, pp. 15-30.
- Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S. Derewenda, U., Dodson, G. Lawson, D.M. "A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex". *Nature*: **1991**, 351, 491-494.
- Cammenberg, M., Hult, K. Park, S. "Molecular basis for the enhanced lipase-catalyzed *N*-acylation of 1-phenylethylamine with methoxyacetate". *Chemical Biology and Chemistry*: **2006**, 7, 11, 1745-1749.
- Cao, L., Van Langen, L. Sheldon, R. "Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier free?". *Current Opinion in Biotechnology*: **2004**, 14, 4, 387-394.
- Carlsson, J., Batista-Viera, F. Rydén, L. "Covalent Chromatography". In: *Protein purification: principles, high-resolution methods, and*

*applications*: **1998** (Janson, J. C. and Rydén, L., eds.), Wiley-VCH, NY, pp. 343–373.

- Chibata, I. “Immobilized Biocatalysts”. Kodansha, Tokyo. **1986**.
- Costa, L., Brissos, V., Lemos, F., Ribeiro, F.R. Cabral, J.M. “Comparing the effect of immobilization methods on the activity of lipase biocatalysts in ester hydrolysis”. *Bioprocess and Biosystems engineering*: **2008**, 31, 4, 323-327.
- Derewenda Z.S., Derewenda, U. Dodson G.G. “The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution”. *Journal of molecular Biology*: **1992**, 227, 3, 818-39.
- Derewenda, U., Brzozowski, A., Lawson, D. Derewenda, Z.S. “Catalysis at the interface: the anatomy of conformational change in a triglyceride lipase”. *Biochemistry*: **1992**, 31, 5, 1532-1541.
- Dinelli, D., Marconi, W. Morisi, F. “Fiber-entrapped enzymes”. *Methods in Enzymology*: **1976**; XLIV, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, NY, pp. 227–243.
- Doscher, M. S. Richards, F.M. “The activity of an enzyme in the crystalline state: Ribonuclease”. *Journal of Biological Chemistry*: **1963**, 238, 7, 2399-2406.
- Ema, T. “Rational strategies for highly enantioselective lipase-catalyzed kinetic resolutions of very bulky chiral compounds: substrate design and high-temperature biocatalysis”. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2004**, 15, 2765–2770.

- Escorcia, A., Torres, R. Ortiz, C. “Resolución cinética del (R/S)-Mandelato de Metilo Utilizando Preparaciones Inmovilizadas de Lipasa de *Candida antarctica* B”. **2008**. Tesis de Pregrado. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias.
- Fernández-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Fernández-Lorente, G. Guisán, J. “Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports”. *Chemical Physics of Lipids*: **1998a**, 93, 1-2, 185-197.
- Fernández-Lafuente, R., Rodríguez, V. Guisán, J. “The coimmobilization of D-amino acid oxidase and cabalase enables the quantitative transformation of D-amino acids (D-phenylalanine) into  $\alpha$ -keto acids (phenypyruvic acid)”. *Enzyme and Microbial Technology*: **1998b**, 23, 1-2, 28-33.
- Fernandez-Lafuente, R., Rosell. C. M., Rodriguez, V., Santana, C., Soler, G., Bastida, A. Guisan, J. M. “Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilisation via the carboxyl coupling method”. *Enzyme and Microbial Technology*: **1993**, 15, 546-550.
- Fernandez-Lorente, G., Cabrera, Z., Godoy, G., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J.M. Guisan, J.M. “Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties”. *Process Biochemistry*: **2008**, 43, 10, 1061-1067.

- Fernández-Lorente, G., Palomo, J.M., Cabrera, Z., Guisán, J.M. Fernández-Lafuente, R. “Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports” *Enzyme and Microbial Technology*: **2007**, 41, 5, 565–569.
- Fuentes, M., Jorgete, V.M., Benevides, P., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., Mateo, C. Guisán, J. M. “New Cationic Exchanger Support for Reversible Immobilization of Proteins” *Biotechnology Progress*: **2004**, 20, 1, 284-288.
- Ghanem, A; Aboul-Enein, H. “Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents”. *Tetrahedron: Asymmetry*: **2004**,15, 78, 3331–3351
- Grazú, V., Ovsejevi, K., Cuadra, K., Betancor, L., Manta, C. Batista-Viera, F. “Solid phase reducing agents as alternative for reducing disulfide bonds in proteins”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*: **2003**; 110, 1, 23-32.
- Grochulsky, P., Li, Y., Schrng, J.D., Bouthillier, F., Smith, P. Harrinson, D. “Insights into interfacial activation from an open structure of *candida rugosa* lipase”. *Journal of Biological Chemistry*: **1993**, 268, 17, 12843-12847.
- Gupta, M. Mattiasson, B. “Unique applications of immobilized proteins in bioanalytical systems”. In: *Methods of Biochemical Analysis*: **1992**; 36, (Suelter, C.H., ed.), Wiley, New York, NY, pp. 1–34.

- Gupta, N., Shewta, S. Sharma, A. “Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder”. *Analytical Biochemistry*: **2006**, 351, 2, 207-213.
- Hartmeier, W. “Immobilized biocatalysts-from simple to complex systems”. *TIBTECH* : **1985**, 3,149–153
- Hidalgo, A., Betancor, L., Mateo, C., Lopez-Gallego, F., Moreno, R., Berenguer, J., Guisán, J.M. Fernández-Lafuente, R. “Purification of a Catalase from *thermus thermophilus* via IMAC Chromatography: Effect of the Support”. *Biotechnology Progress*: **2004**, 20, 5, 1578-1582.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B., Colson, C., van Heuvel, M. Misset, O. “Bacterial lipases”. *FEMS Microbiology Reviews*: **1994**, 15, 29-63.
- Jaeger K., Schneidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra, B.W., Schimossek, K., Zonta, A. Reetz, M.T. “Bacterial lipases for biotechnological applications”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*: **1997** 3, 3-12.
- Jaeger, K; Eggert, T. “Lipases for biotechnology”. *Current Opinion in Biotechnology*: **2002**, 13, 14, 390-397
- Jarvest, R., Erskine, S.G., Forrest, A.K., Fosberry, A.P. Worby, A. “Discovery and optimization of potent, selective, ethanolamine inhibitors of bacterial phenylalanyl tRNA synthetase”. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*: **2005**, 15, 9, 2305-2309.

- Jin, J., Lee, S.H. Lee, S.B. "Enzymatic production of enantiopure ketoprofen in a solvent-free two –phase system". *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*: **2003**, 26, 3-6, 209-216.
- Kågedal, L. "Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography". *Protein Purification*: **1998**; (Janson, J. C. y Rydén, L., eds.), Wiley-VCH, NY, pp. 311–342.
- Kaieda, M., Nagayoshi, M., Hama, S., Kondo, A. Fukuda, H. "Enantioselective Transesterification using Immobilized *Aspergillus Oryzae* Overexpressing Lipase". *Applied Microbiology and Biotechnology*: **2004**, 65, 3, 301-305.
- Kamal, A., Sandbhor, M. Ramana, K. "One-pot lipase-catalyzed synthesis of enantiopure secondary alcohols from carbonyl compounds: a new protocol for lipase-mediated resolution". *Tetrahedron: Asymmetry*: **2002**, 13, 8, 815-820.
- Katchalski-Katzir, E. "Immobilized enzymes: learning from past successes and failures". *Trends in Biotechnology*: **1993**, 11, 471-478.
- Katchalski-katzir, E. Kraemer, D. "Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*: **2000**, 10, 157-176.
- Kazlauskas, R.J., Weissfloch, A.N., Rappaport, A.T. Cuccia, L.A. "A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*". *Journal of Organic Chemistry*: **1991**, 56, 2656-2665.

- Kerzel, P. Mersmann, A. “Adsorption behavior of lipase from *staphylococcus carnosus* on a hydrophobic adsorbent”. *Journal of Chromatography*: **1992**, 584, 109-113.
- Kirk, O Christensen, M.W. “Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin”. *Organic Process Research and Development*: **2002**, 6, 4, 446–451
- Klibanov, A. M. “Immobilized enzymes and cells as practical catalysts”. *Science*: **1983**, 219, 722–727
- Koch-Schmidt, A. Mosbach, K. “Studies on conformation of soluble and immobilized enzymes using differential scanning calorimetry. 1. Thermal stability of nicotinamide adenine dinucleotide dependent dehydrogenases”. *Biochemistry*: **1977**, 16, 2101–2105.
- Koeller, K. Wong, C. “Enzymes for chemical synthesis”. *Nature*: **2001**, 409, 232-240.
- Larsen, M., Bornscheuer, U. Hu, K. “Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems”. *Protein Expression and Purification*, **2008**, 62, 1, 90-97
- Knezevic, Z; Milosavic, N; Bezbradica, D; Jakovljevic, Z; Prodanovic. R. “Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment”. *Biochemical Engineering*: **2006**, 30, 269–278

- Li, L., Zhu, Y., Huangb, Z., Jiang, Z. Chen, W. “Immobilization of the recombinant xylanase B (XynB) from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* on metal-chelate Eupergit® C 250L”. *Enzyme and Microbial Technology*: **2007**, 41, 278–285.
- Luk, Y.Y., Tingey, M., Dickson, K., Raines, R. Abott, N. “Imaging the binding ability of proteins immobilized on surfaces with different orientations by using liquid crystals”. *Journal of the American Chemical Society*: **2004**, 126, 29, 9024-9032
- Mancheño, J.M., Pernas, M.A., Martínez, M.J., Ochoa, B., Rúa, M.L. Hermoso, J.A. “Structural Insights into the Lipase/esterase Behavior in the *Candida rugosa* Lipases Family: Crystal Structure of the Lipase 2 Isoenzyme at 1.97 Å Resolution”. *Journal of Molecular Biology*: **2003**, 332, 1059-1069.
- Martinelle, M., Holmquist, M., Clausen, I.G., Patkar, S., Svendsen, A. Hult, K. “The role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase”. *Protein Engineering*: **1996**, 9, 519-524.
- Mateo, C., Fernández-Lorente, G. Abian, O. Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M. “Multifunctional epoxy-supports. A new tool to improve the covalent immobilization of proteins: the promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules*: **2000a**, 1, 739-745.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R. Guisán, J.M. “Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated

supports by favoring additional multipoint covalent attachment". *Enzyme and Microbial Technology*: **2000b**, 26, 509-515.

- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R. Guisan, J.M. "Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites". *Biotechnology and Bioengineering*: **2000c**, 68, 98-105.
- Mateo, C.; Fernández-Lorente, G.; Cortés, E.; Garcia, J.L.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, J.M. "One-Step Purification, Covalent Immobilization, and Additional Stabilization of Poly-His-Tagged Proteins Using Novel Heterofunctional Chelate-Epoxy Supports". *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*: **2001**, 76, 3, 269-276
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lorente, G., Pedroche, J., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Tam, A. Daminati, M. Epoxy Sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnology Progress*: **2002**, 18, 629-634.
- Mateo, C., Torres, R., Fernández-Lorente, G., Ortiz, C., Fuentes, M., Hidalgo, A., López-Gallego, F., Abian, O., Palomo, J., Betancor, L., Pessela, B. C., Guisan, J. Fernández-Lafuente, R. "Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method". *Biomacromolecules* **2003**, 4, 772-777.
- Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lorente, G., Pessela, B.C.C., Grazu, V., Guisan, J.M. Roberto Fernandez-Lafuente, R. "Immobilization–Stabilization of Enzymes by Multipoint Covalent Attachment on

Supports Activated With Epoxy Groups”. Immobilization of Enzymes and Cells **2006**; 2 edición (ed.Totowa) Humana Press, pp. 31-45.

- Mateo, C., Grazu, V., Palomo, J.M., Lopez-Gallego, F., Fernandez-Lafuente, R. Guisan, J.M. “Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports”. *Nature protocols*: **2007a**, 2,1022-1033.
- Mateo, C., Grazu, V., Pessela, B.C.C., Montes, T., Palomo, J.M., Torres, R., López-Gallego, F., Fernández-Lafuente, R. Guisan, J.M. “Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization–stabilization”. *Biochemical Society Transactions*: **2007b**, 35, 6, 1593-1601.
- Mattiasson, B. Kaul, R. “Determination of coupling yields and handling of labile proteins in immobilization technology”. *Protein immobilization. Fundamentals and Applications* (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, (1991); New York, NY, pp. 161–179.
- Mehvar, R. Brocks, D.R. “Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans”. *Journal of Pharmaceutical Sciences*.: **2001**, 4, 185-200.
- Messing, R. A. “Adsorption and inorganic bridge formations”. *Methods in Enzymology*, **1976**; vol. XLIV, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, New York, NY, pp. 148–169.

- Miled, N., Beisson, F., de Caro, J., de Caro, A., Arondel, V. Verger, R. “Interfacial catalysis by lipases”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*: **2001**, 11, 279-286.
- Miled, N., Riviere, M., Cavalier, J.F., Buono, G., Berti, L. Verger, R. “Discrimination between closed and open forms of lipases using electrophoretic techniques”. *Analytical Biochemistry*: **2005**, 338, 171–178.
- Mingarro, I., Abad, C. Braco, L. “Interfacial activation-based molecular bioimprinting of lipolytic enzymes”. *Proceedings of The National Academy of Sciences U S A*: **1995**, 92, 3308–3312.
- Montes, T., López-Gallego, F., Fuentes, M., Mateo, C., Grazu, V., Betancor, L., Guisan, J.M. Fernandez-Lafuente, R. “Improved Stabilization of Chemically Aminated Enzymes Via Multipoint Covalent Attachment on Glyoxyl Supports”. *Immobilization of Enzymes and Cells* **2006**; 2 edición (ed.Totowa) Humana Press, 163-173.
- Nascimento, M.G. Queiroz, N. “Pseudomonas sp. lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (R,S)-methyl mandelate”. *Tetrahedron Letters*: **2002**, 43, 5225-5227.
- O’ Driscoll, K. F. “Techniques of enzyme entrapment in gels”. *Methods in Enzymology*, **1976**; vol. XLIV, (ed. Mosbach K), Academic Press, New York, NY, pp. 169–183.

- Othman, S., Basri, M., Hussein, M.Z., Abdul Rahman, M., Abd. Rahman, R., Salleh, R. Jasmani, H. “Production of highly enantioselective (-)-menthyl butyrate using *Candida rugosa* lipase immobilized on epoxy-activated supports”. *Food Chemistry*: **2008**, 106, 437–443.
- Ottoson, J., Fransson, L. Hult, K. “Substrate entropy in enzyme enantioselectivity: An experimental and molecular modeling study of a lipase”. *Protein Science*: **2002**, 11, 1462–1471.
- Palomo, J.M., Fernández-Lafuente, R., Mateo, C., Fuentes, M., Fernández-Lorente, G. Guisán, J. “Modulation of the enantioselectivity of *candida antarctica* B lipase via conformational engineering: kinetic resolution of ( $\pm$ )- $\alpha$ -hydroxy-phenylacetic acid derivatives”. *Tetrahedron: asymmetry*: **2002**, 13, 1337-1345.
- Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Rua, M. L., Guisán, J. M., Fernandez-Lafuente, R. “Evaluation of the lipase from *Bacillus thermocatenulatus* as an enantioselective biocatalyst”. *Tetrahedron: Asymmetry*: **2003a**, 14, 3679-3687.
- Palomo, J.M.; Muñoz, G.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Guisan, J.M.; Fernández-Lafuente, R. “Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins Hydrolytic resolution of (R,S)-2-butyryl-2-phenylacetic acid”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2003b**, 21, 201–210

- Palomo, J.M., Ortiz, C., Fernández-Lorente, G., Fuentes, M., Guisán, J.M. Fernández-Lafuente, R. "Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties". *Enzyme and Microbial Technology*: **2005**, 36, 447–454
- Palomo, J.M., Segura, R., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J."Improving the activity of lipases from thermophilic organisms at mesophilic temperatures for biotechnology applications. *Biomacromolecules*: **2004b**, 5, 249-254.
- Palomo, J.M., Segura, R., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. "Enzymatic resolution of (±)-glycidyl butyrate in aqueous media. Strong modulation of the properties of the lipase from *Rhizopus oryzae* via immobilization techniques". *Tetrahedron: Asymmetry*: **2004a**, 15, 1157-1161.
- Pandey, A., Benjamin, S. Soccol, C. "The realm of microbial lipases in biotechnology". *Biotechnology and Applied Biochemistry*: **1999**, 29, 119-131.
- Persichetti. "Candida rugosa Lipase: Enantioselectivity Enhancements in Organic Solvents". *Tetrahedron Letters*: **1996**, 37, 6507-6510.
- Porath, J. "Salting Out adsorption techniques for protein purification". *Biopolymer*: **1987**, 26, 193–204.
- Pregnolato, M., Terreni, M., de Fuentes, I.E., Alcántara Lón, A.R., Sabuquillo, P., Fernández-Lafuente, R. Guisán, J.M. "Enantioselective enzymatic hydrolysis of racemic glycidyl esters by using immobilized

porcine pancreas lipase with improved catalytic properties". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2001**: 11, 757-763.

- Queiroz, N. Nascimento, M. "Pseudomonas sp. Lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (R,S)-methyl mandelate". *Tetrahedron letters*: **2002**, 43, 5225-5227.
- Reetz, M.T. "Lipases as practical biocatalysts". *Current Opinion in Chemical Biology*. **2002**: 6, 145–150.
- Rosevear, A. "Immobilized biocatalysts-a critical review". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*: **1984**, 34B, 127–150.
- Royer, G. P. "Immobilized enzymes as catalyst". *Catalysis Reviews*. **1980**, 22, 29–73.
- Rubin, B. "Grease pit chemistry exposed". *Structure Biology*: **1994**, 1, 568–572
- Sabuquillo, P., Reina, J., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. Fernández-Lafuente, R. "Interfacial affinity chromatography of lipases: separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups". *Biochimica et Biophysica Acta*: **1998**, 1388, 337-348.
- Scouten, W. H. "A Survey of Enzyme Coupling Techniques". *Methods in Enzymology*, **1987**; 135, (ed. Mosbach, K.), Academic Press, Londres, pp. 30–65.

- Sheldon, R., Schoevaart, R. van Langen, L. “Cross-Linked Enzyme Aggregates”. Immobilization of Enzymes and Cells **2006**; 2 edición (ed.Totowa) Humana Press, pp. 31-45.
- Sheldon, R., Van Rantwijk, F. Schoevaart, R. “Preparation, Optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)”. *Biotechnology and Bioengineering*: **2004**, 87, 754-762.
- Sobolev, A, Franssen, M., Poikans, J., Duburs, G. de Groot, A. “Enantioselective lipase-catalysed kinetic resolution of acyloxymethyl and ethoxycarbonylmethyl esters of 1,4-dihydroisonicotinic acid derivatives”. *Tetrahedron: Asymmetry*: **2002**, 13, 2389-2397.
- Solomon, B., Hollaander, Z., Koppel, R. Katchalski-Kazir, E. “Use of monoclonal antibodies for the preparation of highly active immobilized enzymes”. *Methods in Enzymology*, **1987**; vol. 135, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, Londres, pp. 160–170.
- Sugiura, M. Isobe, M. “Comparative Studies on the adsorption of lipase and various proteins at the air-water interface”. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1975**, 397, 412-417.
- Tischer, W. Kasche, V. “Immobilized enzymes: crystals or carriers?”. *Trends in biotechnology*: **1999**, 17, 8, 326-35.
- Torres, R. Mateo, C. Grazú, V. Guisan, J.M., Fernandez Lafuente, R. Lopez, F. “One-Step Purification, Immobilization and Stabilization of Poly-Histidine Tagged Enzymes by Using Metal Chelate-Epoxy

Supports". Immobilization of Enzymes and Cells **2006**; 2 edición (ed.Totowa) Humana Press, pp. 117-128.

- Torres, R., Mateo, C., Fuentes, M., Palomo, J., Ortiz, C., Fernández-Lafuente, R. Guisan, J.M. "A novel heterofunctional epoxy-amino Sepabeads for a new enzyme immobilization protocol: Immobilization–Stabilization of Beta-Galactosidase from *Aspergillus oryzae*". *Biotechnology Progress*: **2003**, 19, 1056-1060.
- Tosa, T., Mori, T., Fuse, N. Chibata, I. "Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water-insoluble aminoacylase". *Enzymologia*: **1966**, 31, 214–224.
- Trevan, M. "Effect of Immobilization on Enzyme Activity". *Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology*: **1980**; (Trevan, M. ed.), Wiley, Chichester-New York, pp. 11–56.
- Uppenberg, J., Hansen, M.T.; Patkar, S. Jones, T.A. "The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida Antarctica*". *Structure*: **1994**, 15, 293–308.
- Uppenberg, J., Oehrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T. Jones, T.A. "Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols". *Biochemistry*: **1995**, 34, 16838–16851
- Van Beilen, J. Li, Z. "Enzyme technology: an overview". *Current Opinion in Biotechnology*: **2002**, 13, 338-344.

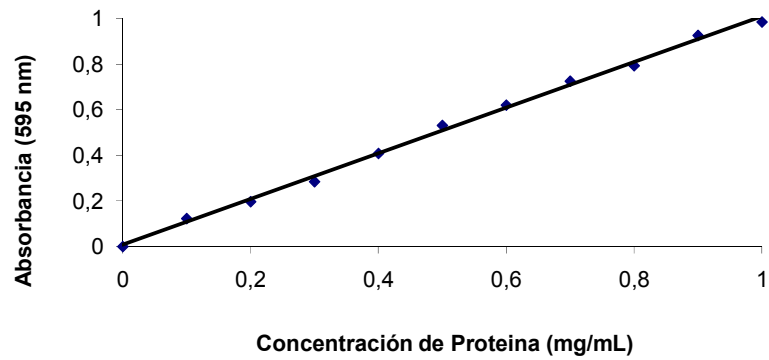
- Van Der Walle, N. "Über synthetische Wirkung bakterieller Lipasen. Cbl. Bakt". *Parasitenk. Infektionskr.* **1927**, 70, 369-373.
- Verger, R. "Interfacial Activation of Lipases. Facts and Artifacts". *Trends in Biotechnology*: **1997**, 15, 1, 32-38.
- Wang, Y., Wang, R., Li, Q., Zhang, Z. Feng, Y. "Kinetic resolution of *rac*-alkyl alcohols via lipase-catalyzed enantioselective acylation using succinic anhydride as acylating agent". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*: **2009**, 56, 142-145 .
- Wehtje, E., Adlercreutz, P. Mattiasson, B. "Improved activity retention of enzymes deposited on solid supports". *Biotechnology and Bioengineering*: **1993**, 41, 171-178.
- Wheatley, J. B. Schmidt, D. E. "Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide activated supports". *Journal of Chromatography. A*: **1999**, 849, 1–12.
- Wilchek, M. Miron T. "Oriented versus random protein immobilization". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*: **2003**, 55, 67-70.
- Wilson, L., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Illanes, A. Guisan, J. "CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties". *Enzyme and Microbial Technology*: **2006**, 39, 750-755.

- XI, W. XU, J. "Preparation of enantiopure (S)-ketoprofen by immobilized *candida rugosa* lipase in packed bed reactor". *Proc. Biochem*: **2005**, 40, 2161-2166.

## Anexos

### Anexo 1

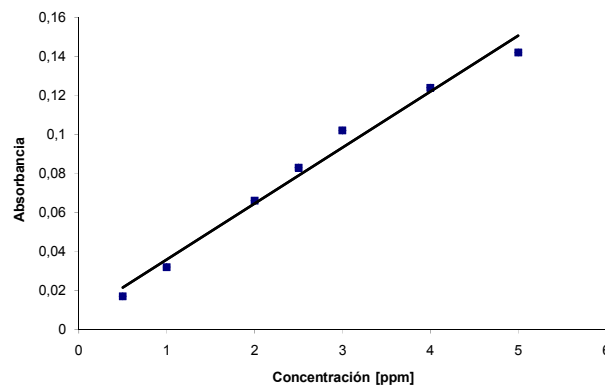
#### Curva de calibración para la determinación de la cantidad de proteína por el método del Bradford



**Figura A.** Curva de calibración de cantidad de proteína. Determinación realizada a través del reactivo de Bradford. Ecuación de la correspondiente recta de linealización.  $y = 1,0028x + 0,0077$ .

### Anexo 2

#### Curva de Calibración para átomos de Cobre de Absorción Atómica



**Figura B.** Curva de calibración para los átomos de Cobre llevada a cabo en absorción atómica. Ecuación de la correspondiente recta de linealización:  $y = 0,0287x + 0,0071$ .

### Anexo 3

#### Calculo de la actividad específica de la CAL B.

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

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

Donde

m = pendiente (mol/L.min)

$\varepsilon$  = coeficiente de extinción molar del PNPB (3100 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)

V<sub>t</sub> = Volumen total de la reacción

V<sub>m</sub> = Volumen de la solución enzimática

FD = Factor de dilución enzimático

C<sub>prot</sub> = concentración de proteína en la solución enzimática

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