

**DESARROLLO DE UN MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA
DETERMINAR LA HIDRÓLISIS ENANTIOSELECTIVA DEL MANDELATO
DE METILO UTILIZANDO DERIVADOS DE LIPASA DE *Candida rugosa* (CRL)**

JOHAN ERNESTO GALLO GUALDRÓN

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2012**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA
DETERMINAR LA HIDRÓLISIS ENANTIOSELECTIVA DEL MANDELATO
DE METILO UTILIZANDO DERIVADOS DE LIPASA DE *Candida rugosa* (CRL)**

JOHAN ERNESTO GALLO GUALDRÓN

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
QUÍMICO**

Director

RODRIGO GONZALO TORRES SÁEZ, PhD

Escuela de Química

Codirectora

CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LOPEZ, PhD

Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2012

DEDICATORIA

Al padre Jehová por ser el motor de mi vida

Al señor Jesucristo por ser mi orientación

A mi madre por su apoyo y amor incondicional

A mi hermano por su amistad y comprensión

A mi perro cokie

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre por su sabiduría.

A mi hermano por todo su apoyo en cada momento de flaqueza.

A toda mi familia por la enseñanza de aquellos valores que quedan para toda la vida.

Al Dr. Rodrigo Torres Sáez por su orientación en el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Claudia Cristina Ortiz López por sus contribuciones y paciencia en la escritura de este trabajo.

A Magaly Galvis por su colaboración y estar conmigo en todo momento.

A Oveimar Barbosa por todos sus consejos.

A Andrés Escorcía por todas sus ayudas y explicaciones.

A Cesar Ariza por toda la información compartida.

A todos mis compañeros del grupo de investigación por su amistad.

A mis compañeros del equipo de fútbol de química por la alegrías brindadas.

A mis verdaderos amigos.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	20
OBJETIVOS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
1. MARCO DE REFERENCIA	25
1.1 LIPASAS	25
1.2 CONFORMACIONES ESTRUCTURALES DE LAS LIPASAS	26
1.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS LIPASAS	27
1.4 MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS	30
1.4.1 Ingeniería del medio	30
1.4.2 Ingeniería del derivado	31
1.5 ADSORCIÓN INTERFACIAL DE LIPASAS SOBRE SOPORTES HIDROFÓBICOS	35
1.6 INMOVILIZACIÓN DE LIPASAS MEDIANTE UNIÓN COVALENTE MULTIPUNTUAL	37
1.6.1 Inmovilización Sobre el Soporte Comercial Eupergit® C	37
1.6.2 Inmovilización en Soportes Epóxido Heterofuncionales	40
1.7 LIPASA DE <i>Candida rugosa</i> (CRL)	43
1.8 RESOLUCIÓN CINÉTICA CATALIZADA POR LIPASAS	44
1.8.1 Enantioselectividad	46
1.8.2 Métodos para la determinación del exceso enantiomérico	48
1.9 LIPASAS EN LA RESOLUCIÓN DE FÁRMACOS RACÉMICOS	51
2. MATERIALES Y MÉTODOS	53
2.1 MATERIALES	53
2.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES	53
2.2.1 Purificación del extracto crudo de lipasas de <i>Candida rugosa</i> (CRL) y <i>Alcaligenes sp</i> (QL)	53

2.2.2 Preparación de soportes epóxidos (Eupergit C) multifuncionales	54
2.2.3 Inmovilización de CRL sobre los soportes multifuncionales	56
2.2.4 Evaluación de la enantioselectividad de lipasas inmovilizadas	57
2.3 METODOS ANALÍTICOS	58
2.3.1 Desarrollo de una técnica colorimétrica para la determinación de la enantioselectividad de lipasas inmovilizadas	58
2.3.2 Evaluación de la enantioselectividad de los derivados de CRL utilizando la metodología colorimétrica	60
2.3.3 Determinación de la actividad lipásica utilizando p-nitrofenilbutirato (p-NPB)	61
2.3.4 Determinación de la concentración de proteína	62
2.3.5 Electroforesis SDS-PAGE	62
2.3.6 Determinación del exceso enantiomérico (ee_p) y la enantioselectividad (E)	63
3. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	65
3.1 PURIFICACION DE LA CRL	65
3.2 PURIFICACIÓN DE LA QL	69
3.3 INMOVILIZACIÓN DE CRL EN SOPORTES EPÓXIDOS MULTIFUNCIONALES	75
3.4 DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA COLORIMETRICA PARA EVALUAR LA HIDRÓLISIS ENANTIOSELECTIVA DEL MANDELATO DE METILO	79
3.4.1 Determinación de la máxima longitud de onda de absorción de los indicadores de pH Azul de Bromotimol (ABT) y Rojo de Fenol (RF).	80
3.4.2 Efecto de la concentración de indicador	84
3.4.3 Efecto de la cantidad de indicador	86
3.4.4 Selección de las longitudes de onda de máxima absorción	88
3.5 EVALUACIÓN DE LA HIDROLISIS ENANTIOSELECTIVA DEL MANDELATO DE METILO UTILIZANDO LA METODOLOGÍA COLORIMÉTRICA	92

3.5.1 Efecto de la carga de biocatalizador sobre la velocidad de reacción	92
3.5.2 Enantioselectividad de los derivados inmovilizados de CRL catalizando la hidrólisis de los enantiómeros R y S del Mandelato de metilo	95
4. CONCLUSIONES	99
5. RECOMENDACIONES	101
BIBLIOGRAFIA	102
ANEXOS	121

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Hidrólisis de un Triacilglicerol catalizado por lipasas	25
Figura 2. Conformaciones estructurales de las lipasas	26
Figura 3. Mecanismo de activación interfacial de las lipasas	28
Figura 4. Equilibrio entre las distintas conformaciones de lipasas en medios acuosos homogéneos	29
Figura 5. Adsorción de lipasas sobre distintas estructuras hidrofóbicas	29
Figura 6. Efecto de las condiciones experimentales en el mecanismo de apertura y Cierre de la Lipasa	31
Figura 7. Ingeniería conformacional de lipasas utilizando la ingeniería del derivado	32
Figura 8. Diferentes metodologías de inmovilización	33
Figura 9. Adsorción interfacial de lipasas sobre superficies hidrofóbicas	36
Figura 10. a) Estructura Eupergit C; b) Reacción de activación de soportes epóxidos	38
Figura 11. Adsorción física e inmovilización covalente sobre soportes epóxido	39
Figura 12. Adsorción e inmovilización de lipasas con diferentes orientaciones en soportes epóxido heterofuncionales	41
Figura 13. Representación de la lipasa de <i>Candida rugosa</i> (CRL)	43
Figura 14. Triada catalítica lipasa de <i>Candida rugosa</i> (CRL),	44
Figura 15. Resolución cinética catalizada por lipasa para un sistema reversible	46
Figura 16. Proceso biotecnológico de obtención de antiinflamatorios no esteroídicos ópticamente puros mediante el empleo de lipasas inmovilizadas.	52
Figura 17. Síntesis del soporte epóxido parcialmente modificado con etilendiamina, EUPERGIT [®] C-EDA	55
Figura 18. Síntesis del Soporte Epóxido Parcialmente Modificado con Ácido Iminodiacético, EUPERGIT [®] C-IDA	55

Figura 19. Síntesis del soporte epóxido parcialmente modificado con ácido iminodiacético y posterior quelación con Cu^{2+} , EUPERGIT® C-IDA-Cu	56
Figura 20. Reacción de hidrólisis del (R/S)-Mandelato de metilo catalizada por CRL utilizando indicadores de pH	58
Figura 21. Reacción de Hidrólisis del pNPB Catalizada por CRL	62
Figura 22. Cinética de inmovilización de la lipasa de <i>Candida rugosa</i> sobre el soporte octil-agarosa en la hidrólisis de p-NPB	66
Figura 23. Efecto de la Concentración de Tritón x-100 en el proceso de desorción de la CRL	68
Figura 24. Cinética de desorción de la CRL del soporte octil-agarosa en la hidrólisis de p-NPB	68
Figura 25. Electroforesis SDS-PAGE de la preparación de la lipasa de CRL	69
Figura 26. Cinética de inmovilización de la lipasa de <i>Alcaligenes sp</i> (QL) sobre el soporte octil-agarosa en la hidrólisis de p-NPB	70
Figura 27. Efecto de la Concentración de Tritón x-100 en el proceso de Desorción de la QL	71
Figura 28. Cinética de desorción de la QL del soporte octil-agarosa en la hidrólisis de p-NPB	72
Figura 29. Electroforesis SDS-PAGE de la preparación de la lipasa de QL	73
Figura 30. Mecanismo Propuesto para la Formación de Dímeros de QL	74
Figura 31. Electroforesis SDS-PAGE de los derivados inmovilizados de la CRL	75
Figura 32. Cinéticas de inmovilización de la CRL sobre el soporte comercial Eupergit C y los soportes epóxido heterofuncionales	76
Figura 33. Espectros de Absorción de los indicadores de pH	80
Figura 34. Espectros de absorción del Azul de Bromotimol	81
Figura 35. Espectros de absorción del Rojo de Fenol	83
Figura 36. Espectros de absorción del Azul de Bromotimol a diferente concentración de indicador	85
Figura 37. Espectros de absorción del Rojo de Fenol a diferente concentración de indicador	86

Figura 38. Espectros de absorción del ABT a diferentes volúmenes de indicador contenidos en el medio de reacción utilizando ABT al 0.1% p/v.	87
Figura 39. Espectros de absorción del RF a diferentes volúmenes de indicador contenidos en el medio de reacción utilizando RF al 0.1% p/v	88
Figura 40 Efecto de la cantidad de biocatalizador en la conversión de (RS)-mandelato de metilo utilizando Azul de Bromotimol (ABT) y Rojo de Fenol (RF)	94

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Reacciones catalizadas por lipasas	25
Tabla 2. Actividad específica y relativa del derivado inmovilizado octil-agarosa de CRL con p-NPB	66
Tabla 3. Actividad específica y relativa del derivado inmovilizado octil-agarosa de QL con p-NPB	71
Tabla 4. Rendimiento de inmovilización de los derivados inmovilizados de CRL en los soportes epóxido multifuncionales	77
Tabla 5. Actividad expresada por los derivados inmovilizados en los soportes epóxido multifuncionales con p-NPB	78
Tabla 6. Identificación de los complejos y longitudes de onda de máxima absorción para el ABT	82
Tabla 7. Identificación de los complejos y longitudes de onda de máxima absorción para el RF	83
Tabla 8. Efecto de la concentración de ácido mandélico en λ_{MAX} utilizando ABT	90
Tabla 9. Efecto de la concentración de ácido mandélico en λ_{MAX} utilizando RF	91
Tabla 10. Conversión del (RS)-Mandelato de Metilo utilizando los derivados de CRL con los indicadores de pH ABT y RF	93
Tabla 11. Enantioselectividad de los derivados inmovilizados de CRL en la hidrólisis de los enantiómeros R y S del mandelato de metilo a 25°C utilizando ABT	96
Tabla 12. Enantioselectividad de los derivados inmovilizados de CRL en la hidrólisis de los enantiómeros R y S del mandelato de metilo a 25°C utilizando RF	96

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. ENSAYOS CUALITATIVOS PARA DETERMINAR LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE LA CRL SOLUBLE UTILIZANDO LOS INDICADORES DE PH ABT Y RF	122
ANEXO 2. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DEL BRADFORD	125
ANEXO 3. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO MANDÉLICO UTILIZANDO AZUL DE BROMOTIMOL (ABT).	126
ANEXO 4. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO MANDÉLICO UTILIZANDO ROJO DE FENOL (RF)	127
ANEXO 5. DETERMINACIÓN DE LAS LONGITUDES DE ONDA DE MÁXIMA ABSORCIÓN PARA EL AZUL DE BROMOTIMOL EVALUADO EN DIFERENTES VALORES DE PH.	128
ANEXO 6. DETERMINACIÓN DE LAS LONGITUDES DE ONDA DE MÁXIMA ABSORCIÓN PARA EL ROJO DE FENOL EVALUADO A DIFERENTES VALORES DE PH.	130
ANEXO 7. CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA PARA LAS LIPASAS CRL Y QL	132
ANEXO 8. CÁLCULO DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD PARA LOS DERIVADOS DE CRL	134

LISTA DE ABREVIATURAS

CRL: Lipasa de *Candida Rugosa*

QL: Lipasa de *Alcaligenes sp*

CAL-B: Lipasa de *Candida Antártica B*

ABT: Azul de Bromotimol

RF: Rojo de Fenol

EC: Eupergit® C

EDA: Etilendiamina

IDA: Ácido Iminodiacético

IDA-Cu: Quelato de Ácido Iminodiacético-Cobre

SDS-PAGE: electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio

pNPB: p-Nitrofenilbutirato

E: Relación enantiomérica

ee_s: Exceso enantiomérico del sustrato

ee_p: Exceso enantiomérico del producto

HTS: High-throughput screening

λ_{max} : Longitud de onda de máxima absorción

RESUMEN

TÍTULO: DESARROLLO DE UN MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA DETERMINAR LA HIDRÓLISIS ENANTIOSELECTIVA DEL MANDELATO DE METILO UTILIZANDO DERIVADOS DE LIPASA DE *Candida rugosa* (CRL)*

AUTOR: TORRES RODRIGO Gallo Johan.**

PALABRAS CLAVES: CRL, mandelato de metilo, resolución cinética, inmovilización de enzimas, azul de bromotimol (ABT), rojo de fenol (RF).

DESCRIPCION

Las lipasas son enzimas que se caracterizan por su amplia especificidad para diferentes sustratos y una elevada regioselectividad y enantioselectividad. Por esta razón, estas enzimas han sido estudiadas en química fina para diferentes reacciones de biotransformación, tales como la resolución cinética de las mezclas racémicas. En este trabajo, se evaluó el efecto de inmovilización covalente de la lipasa de *Candida rugosa* (CRL) en soportes epóxido puro (EC) y epóxido-modificado con etilendiamina (EDA), ácido iminodiacético (IDA) y quelatos de cobre (IDA-Cu). Los derivados de la enzima fueron probados en la resolución cinética del éster metílico del ácido (R/S)-2-fenil-2-hidroxiacético (mandelato de metilo). La hidrólisis enantioselectiva de este sustrato se determinó por medidas colorimétricas para llevar a cabo un screening de diferentes derivados en una metodología de alto rendimiento. Para este fin, se utilizaron los indicadores de pH azul de bromotimol (ABT) y rojo fenol (RF) para la determinación de la actividad y enantioselectividad de los diferentes derivados de lipasas sobre los enantiómeros (R y S) del mandelato de metilo, utilizando espectrofotetría UV-Visible. Mediante esta técnica, se demostró que todos los biocatalizadores fueron selectivos para el enantiómero S de mandelato de metilo. La mejor relación enantiomérica ($E = 16$) y el exceso enantiomérico ($ee = 74,4\%$) se obtuvo para la CRL inmovilizada en EC-IDA. Los resultados obtenidos en esta tesis confirmaron que el uso de diferentes protocolos de inmovilización constituye una poderosa herramienta para modular las propiedades biocatalíticas de lipasas microbianas.

* Proyecto de Grado

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: Rodrigo Torres Sáez Ph.D en Bioquímica. Co-Directora: Claudia Cristina Ortiz. Ph.D. en Biología Molecular.

ABSTRACT

TÍTULO: DEVELOPMENT OF A COLORIMETRIC METHOD FOR DETERMINATION ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF METHYL MANDELATE BY DIFFERENT IMMOBILIZED LIPASE PREPARATIONS FROM *Candida rugosa* (CRL)*

AUTHOR: TORRES RODRIGO Gallo Johan**

KEYWORDS: CRL, methyl mandelate, kinetic resolution, immobilized enzymes, Bromothymol blue (BTB), phenol red (PR).

DESCRIPTION

Lipases are enzymes characterized by its broad specificity for different substrates and high regioselectivity and enantioselectivity. For this reason, these enzymes have been studied in fine chemistry for different biotransformation reactions, such as kinetic resolution of racemic mixtures. In this work, the effect of covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase (CRL) on pure epoxy supports (EC) and epoxy modified with ethylenediamine (EDA), iminodiacetic acid (IDA) and copper chelates (IDA-Cu). Enzyme derivatives were tested on the kinetic resolution of the methyl ester of (R/S)-2-phenyl-2-hydroxyacetic acid (methyl mandelate). Enantioselective hydrolysis of this substrate was determined by colorimetric measurements for carrying out a high-throughput screening of different derivatives. For this aim, pH indicators blue bromothymol (BTB) and phenol red (PR) were used for termination of activity and enantioselectivity of different lipase derivatives on enantiomers (R and S) of methyl mandelate, using UV-Visible spectrophotometry. By means of this technique, it was demonstrated that all biocatalysts were selective for S enantiomer of methyl mandelate. The best enantiomeric ratio ($E = 16$) and enantiomeric excess ($ee = 74\%$) were obtained for CRL immobilized on EC-IDA. The results obtained in this thesis confirmed that used of different immobilization protocols constitutes a powerful tool to modulate biocatalytical properties of microbial lipases.

* Project Grade

** Universidad Industrial de Santander. Science of Faculty, School of Chemistry, Director: Rodrigo Torres Sáez, Ph.D. in Biochemistry. Health of Faculty, School of Bacteriology, Co-Director: Claudia Cristina Ortiz, Ph.D. in Molecular Biology.

DIVULGACIÓN DEL TRABAJO

CONGRESOS Y SIMPOSIOS

*Poster. "HIGH THROUGHPUT SCREENING OF ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF METHYL MANDELATE BY DIFFERENT IMMOBILIZED PREPARATIONS OF LIPASE FROM Candida rugose (CRL)", **Johan Gallo**, Rodrigo Torres y Claudia Ortiz. IUPAC World Chemistry Congress. San Juan (Puerto Rico), 30 de julio al 8 de agosto de 2011.*

*Ponencia Oral. "Desarrollo de un método colorimétrico para la evaluación de la hidrólisis enantioselectiva del mandelato de metilo por diferentes derivados inmovilizados de la lipasa de Candida rugosa (CRL)". **Johan Gallo**, Rodrigo Torres y Claudia Ortiz. II congreso iberoamericano de biotecnología y biodiversidad. Manizales (Colombia), 21-24 de septiembre de 2011.*

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores biológicos permitiendo que las reacciones químicas del metabolismo celular ocurran a una velocidad significativa en condiciones ambientales extremadamente suaves y compatibles con la viabilidad celular. Además, poseen excelentes propiedades biocatalíticas que incluyen alta eficiencia en la conversión sustrato-producto, especificidad y selectividad (Illanes, 1994).

Entre las enzimas con potencial aplicación se destacan las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, EC. 3.1.1.3), las cuales son enzimas que tienen como función biológica la hidrólisis de triglicéridos y son ampliamente utilizadas por su gran versatilidad en la industria química, de alimentos y cosméticos, entre otros (Kazlauskas *et al* 1991; Kazlauskas, 1994; Jaeger *et al*, 1997; Arroyo, 1999). Sin embargo, en los últimos años se ha enfocado su estudio a la química farmacéutica, ya que estas enzimas presentan amplia especificidad por sustratos muy diferentes, lo cual contrasta en algunos casos, con una elevada regio y enantioselectividad (Palomo *et al*, 2002; Queiroz y Nascimento, 2002; Reetz *et al*, 2002; Sobolev *et al*, 2002;). Estas propiedades han convertido a las lipasas en las enzimas con mayor uso en biotransformaciones, por ejemplo, la resolución de mezclas racémicas (Lundell *et al*, 1998; Salgin *et al*, 2007; Won *et al*, 2007; Barbosa *et al*, 2010).

Las lipasas poseen un complejo mecanismo de acción el cual ha sido estudiado a través de cristalografía y difracción de rayos X. De esta manera, se ha demostrado que las lipasas pueden coexistir en dos conformaciones estructurales. La primera conformación estructural adoptada por la enzima fue estudiada en sistemas acuosos homogéneos y se conoce como conformación inactiva o cerrada, presentando el sitio activo de la enzima aislada por una cadena oligopeptídica denominada tapadera o *lid*. La segunda conformación estructural, estudiada en

presencia de interfaces hidrofóbicas con sustratos de gran tamaño o inhibidores, es conocida como conformación activa o abierta. En este caso, el lid está desplazado permitiendo la entrada de los sustratos al sitio activo de la enzima (Brady *et al*, 1990; Derewenda *et al*, 1992a; Derewenda *et al*, 1992b; Grochulski *et al*, 1993; Cygler *et al*, 1994; Arroyo, 1995).

La información acerca de las conformaciones moleculares de las lipasas ha permitido establecer que en su mecanismo catalítico ocurre lo que se denomina “activación interfacial de lipasas” (Brzozowski *et al*, 1991; Norin *et al*, 1994; Miled *et al*, 2001; Miled *et al*, 2005). De acuerdo con este mecanismo, las lipasas se encuentran en sistemas homogéneos en una conformación cerrada, es decir, con el centro activo bloqueado por la tapadera. Sin embargo, en presencia de interfaces hidrofóbicas, las lipasas se adsorben a dichas interfaces, desplazando la “tapadera” y originando la conformación abierta. Este mecanismo de acción permite a las lipasas actuar en las interfaces o superficies hidrofóbicas. Dado que el sustrato natural de las lipasas son las grasas y aceites, esta actividad en la interface es un requerimiento indispensable para la función biológica de estas enzimas (Basri *et al*, 1995).

La alteración del equilibrio conformacional existente en las lipasas puede llevarse a cabo mediante el empleo de diferentes técnicas de inmovilización en las cuales se involucren distintas áreas de la enzima, en donde sea posible controlar: i) la orientación de la lipasa sobre el soporte, ii) la rigidez de las lipasas inmovilizadas, y iii) los micro-ambientes que rodean las moléculas de lipasas inmovilizadas (Fernández-Lafuente *et al*, 1998; Sabuquillo *et al*, 1998; Mateo *et al*, 2000a; Mateo *et al*, 2000b; Mateo *et al*, 2000c; Palomo *et al*, 2003a; Torres *et al*, 2005; Barbosa *et al*, 2010). Los cambios ocasionados a través de esta estrategia podrían provocar una modificación en el mecanismo de apertura y cierre de la lipasa, dando lugar a una alteración en la forma exacta de la conformación abierta (activa) final, viéndose esto reflejado en una modificación de sus propiedades de actividad

y especificidad (enantio o regioselectividad) (Palomo et al, 2003b; Palomo et al, 2004a; Palomo et al, 2005; Torres et al, 2006).

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

El biocatalizador por sí mismo y las condiciones de reacción pueden influir en la medida de la enantioselectividad. Por otro lado, el efecto de los solventes utilizados, así como las condiciones del medio de reacción (pH, T, etc.) pueden afectar la actividad y selectividad (enantio, regio, estéreo) de la enzima (Terreni et al, 2001; Rocchietti et al, 2002; Palomo et al, 2004b; Torres et al, 2006). Así por ejemplo, una de las formas más comunes para medir la enantioselectividad de las lipasas es a través de la resolución cinética de compuestos racémicos, en la que la enzima discrimina entre los dos enantiómeros de la mezcla racémica, de manera que uno de los enantiómeros es transformado más fácilmente en un producto de reacción que el otro. El éxito de este método depende del hecho que los dos enantiómeros reaccionan a diferentes velocidades con una entidad quiral (Laval et al, 1999; Ujang et al, 2003; Ghanem y Aboul-Enein, 2004; Yadav et al, 2007).

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

En este sentido, sustrato como el ácido mandélico y sus derivados constituyen un interesante grupo de compuestos orgánicos quirales con aplicación en la industria farmacéutica. Estos fármacos juegan un rol importante en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades humanas. Entre los compuestos se destacan la Oxibutinina y el Gonioliol como agentes administrados frecuentemente en su forma racémica. Sin embargo, se han observado efectos secundarios en pacientes que han sido tratados con estos fármacos y se ha determinado que tales efectos están asociados a uno de sus enantiómeros (Tian *et al*, 2006; Sommer *et al*, 2005).

Debido a las limitaciones presentadas por la administración de este tipo de fármacos, se hace necesario la generación de biocatalizadores que puedan ser utilizados en la resolución cinética de mezclas racémicas para la obtención del enantiómero que presenta el principio activo permitiendo su utilización en la síntesis de fármacos con aplicación en la industria de la química farmacéutica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Implementar un método colorimétrico para evaluar la actividad y enantioselectividad de diferentes derivados inmovilizados de la lipasa de *Candida rugosa* (CRL) sobre soportes heterofuncionales en la resolución cinética del mandelato de metilo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

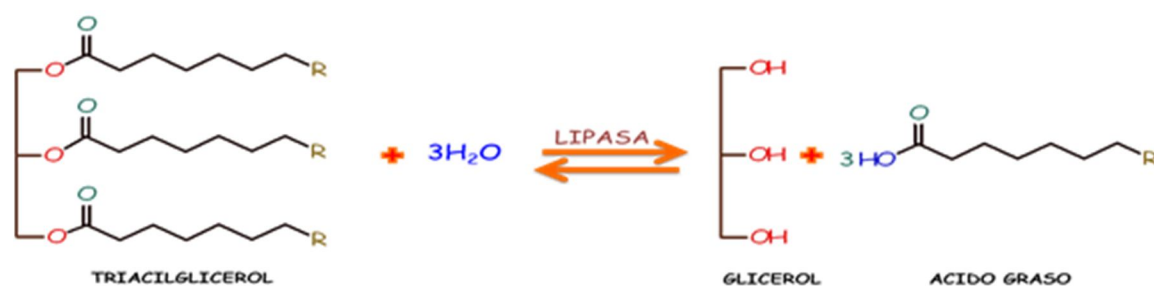
- Preparar derivados enzimáticos de *Candida rugosa* (CRL), utilizando diferentes soportes de Eupergit C.
- Desarrollar una metodología colorimétrica utilizando Azul de Bromotimol, que permita determinar la hidrólisis enantioselectiva del mandelato de metilo mediante lipasa de *Candida rugosa* (CRL) inmovilizada en diferentes soportes.
- Desarrollar una metodología colorimétrica utilizando Rojo de Metilo, que permita determinar la hidrólisis enantioselectiva del mandelato de metilo mediante lipasa de *Candida rugosa* (CRL) inmovilizada en diferentes soportes.
- Evaluar la actividad catalítica de los derivados inmovilizados de lipasa de *Candida rugosa* (CRL), en la hidrólisis del mandelato de metilo.

1. MARCO DE REFERENCIA

1.1 LIPASAS

Las lipasas (triacil glicerol acilhidrolasas E.C 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la reacción de hidrólisis de los triglicéridos a ácidos grasos de cadena larga y glicerol (**Figura 1**).

Figura 1. Hidrólisis de un Triacilglicerol catalizado por lipasas



A pesar de encontrarse ampliamente distribuidas en la naturaleza, son las de origen microbiano aquellas que presentan mayor interés en la industria química farmacéutica, debido a que presentan alta especificidad y elevada regio y enantioselectividad como se muestra en la **Tabla 1** (Reetz, 2002; Koeller y Wong, 2001).

Tabla 1. Reacciones catalizadas por lipasas

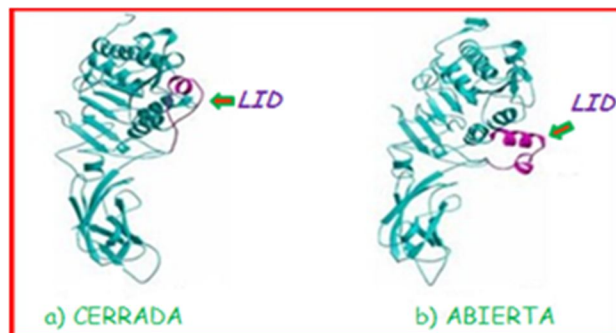
SUSTRATOS		REACCIÓN	PRODUCTOS	
R_1COOR_2	H_2O	HIDRÓLISIS	R_1COOH	R_2OH
R_1COOH	R_2OH	ESTERIFICACIÓN	R_1COOR_2	H_2O
R_1COOR_2	R_3COOR_4	TRANSESTERIFICACIÓN	R_3COOR_2	R_1COOR_4
R_1COOR_2	R_3COOH	ACIDOLISIS	R_3COOR_2	R_1COOH
R_1COOR_2	R_3OH	ALCOHOLISIS	R_1COOR_3	R_2OH
R_1COOR_2	R_3NH_2	AMINOLISIS	R_1CONHR_3	R_2OH

Las lipasas microbianas han recibido una atención especial debido a sus aplicaciones industriales, médicas y a su gran accesibilidad ya que se pueden encontrar en bacterias, levaduras y hongos. La mayoría son lipasas exocelulares, es decir, atraviesan la membrana celular una vez sintetizadas y pasan al medio externo (Arroyo, 1995). En general son glicoproteínas que contienen entre 3 y 15% de glúcidos en su estructura, preferentemente manosa. También es frecuente que un mismo microorganismo produzca varias isoenzimas. Estas isoenzimas actúan en algunas ocasiones sobre sustratos diferentes y en la mayoría de los casos presentan diferencias en sus parámetros cinéticos y condiciones óptimas de reacción (Domínguez *et al*, 2006).

1.2 CONFORMACIONES ESTRUCTURALES DE LAS LIPASAS

A través de diversos estudios cristalográficos se ha determinado que las lipasas están conformadas por una estructura de tipo α/β hidrolasa en el que es característico un núcleo de láminas β rodeadas por α hélices. Este plegamiento incluye la triada catalítica típica de las lipasas (serina, histidina y ácido aspártico o glutámico), así como un hueco donde encaja un oxianión (Derewenda *et al*, 1992a; Grochulski *et al*, 1993; Cygler *et al*, 1994; Arroyo, 1995). Además se ha podido demostrar que la enzima puede coexistir en dos conformaciones estructurales diferentes, una abierta y activa, y una cerrada e inactiva (**Figura 2**).

Figura 2. Conformaciones estructurales de las lipasas



En medios acuosos homogéneos, la enzima cristaliza en una conformación en la cual el centro activo está separado del medio de reacción por una cadena oligopeptídica denominada *lid* o tapadera (figura 2a) haciendo inaccesible la entrada del sustrato al centro activo de la enzima (conformación cerrada). El lid o tapadera presenta en su cara interna una serie de residuos hidrofóbicos que interactúan por zonas hidrofóbicas que rodean al centro activo de la lipasa.

Por otro lado cuando la enzima cristaliza en presencia de sustratos de gran tamaño o de inhibidores, adquiere otro tipo de conformación (figura 2b) en donde la tapadera se encuentra desplazada interactuando por medio de puentes salinos, permitiendo el acceso del sustrato al centro activo de la enzima (conformación abierta).

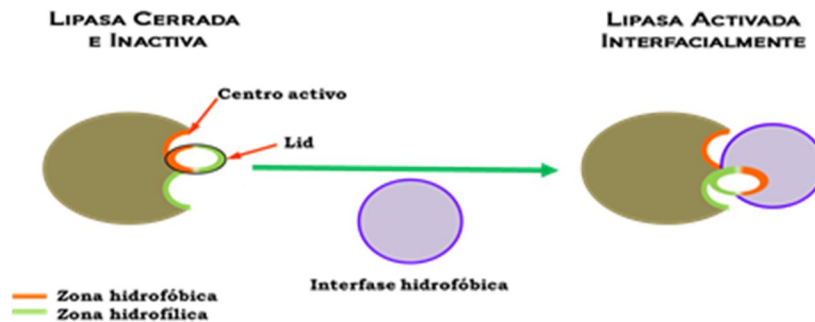
Francesco Secundo *et al* (2006), estudiaron cómo la tapa o lid de la lipasa era un determinante estructural y funcional de la actividad y selectividad de las lipasas catalizando reacciones de transesterificación. El rol de esta región sobre la modulación de la función de las lipasas fue determinado en tres diferentes lipasas recombinantes *Candida rugosa* (CRL), *Pseudomonas fragi* (PFL) y *Bacillus subtilis* (BSLA), estando todas ellas modificadas en la secuencia aminoacídica del lid. Los resultados mostraron que las proteínas mutadas en el lid presentaban disminución en su actividad y selectividad en medios de reacción con solventes orgánicos. Estos resultados apoyaron fuertemente el concepto que el lid juega un rol muy importante en la modulación no solo de la actividad, sino también en la especificidad, enantioselectividad y estabilidad de las lipasas.

1.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS LIPASAS

Gracias a la información obtenida en los estudios cristalográficos se ha podido elucidar un complejo mecanismo catalítico de las lipasas denominado activación interfacial de lipasas (Brzozowski *et al*, 1991; Norin *et al*, 1994; Miled *et al*, 2001).

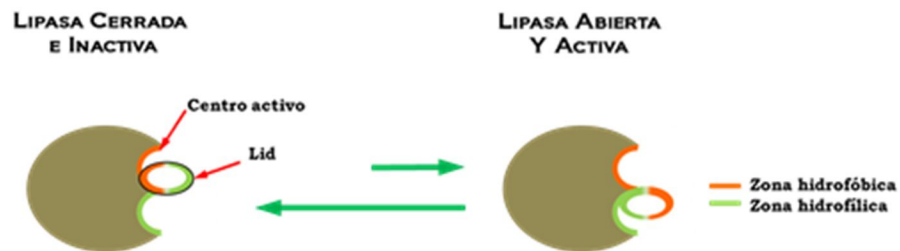
Según este mecanismo, la enzima en sistemas acuosos se encuentra en una conformación cerrada (sitio activo bloqueado), la cual, en presencia de interfaces hidrofóbicas cambia el equilibrio conformacional, permitiendo el desplazamiento de la tapadera para adquirir la lipasa una conformación abierta y activa. En las lipasas pequeñas como la de *Mucor miehei* la tapadera está formada por una única α -hélice, mientras que en las lipasas de gran tamaño como la de *Candida rugosa* el lid está formado por dos α -hélices (Arroyo, 1995; Domínguez *et al*, 2006). Estos hechos constatan que las lipasas son principalmente activas en interfaces hidrofóbicas tales como sus sustratos naturales, las grasas y aceites. (**Figura 3**).

Figura 3. Mecanismo de activación interfacial de las lipasas.



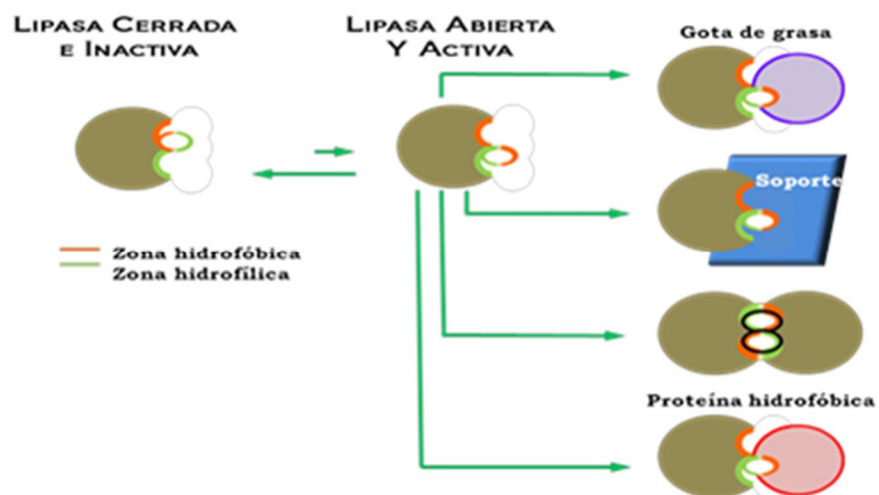
Sin embargo, las lipasas en medios acuosos homogéneos presentan cierto tipo de actividad comparable a esterasas no lipásicas, lo cual sugiere que las lipasas en este tipo de sistemas se encuentran en un equilibrio conformacional entre su conformación abierta y cerrada, desplazando este equilibrio mayoritariamente hacia su conformación cerrada, permitiendo que las lipasas sean catalíticamente activas en ausencia de interfaces (**Figura 4**).

Figura 4. Equilibrio entre las distintas conformaciones de lipasas en medios acuosos homogéneos.



La posible existencia de este equilibrio abre posibilidades en el diseño y control de las biotransformaciones catalizadas por lipasas (Palomo, 2003a) las cuales han sido estudiadas través de cristalografía y modelamiento molecular (Vasel *et al*, 1993; Norin *et al*, 1994) comprobando que la conformación abierta de las lipasas muestran al medio de reacción un gran bolsillo hidrofóbico que las hace afines con un gran número de interfaces hidrofóbicas similares a sus sustratos naturales como lo son las burbujas de aire (Sugiura e Isobe, 1975), gotas de grasa (Basri *et al*, 1995) soportes hidrofóbicos (Bastida *et al*, 1998; Fernández-la fuente *et al*, 1998; Sabuquillo *et al*, 1998), (**Figura 5**).

Figura 5. Adsorción de lipasas sobre distintas estructuras hidrofóbicas.



1.4 MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS

El complejo mecanismo catalítico presente en las lipasas hace posible que la alteración de este mecanismo de apertura y cierre o de la forma exacta de la conformación abierta de la lipasa, podría dar lugar a una modificación en las propiedades catalíticas de la misma. De esta forma, la posibilidad de controlar y modular este equilibrio es una herramienta poderosa de mejora de las propiedades de la lipasa, viéndose esto reflejado es una modificación de sus propiedades de actividad y especificidad (enatio o regioselectividad) (Palomo *et al*, 2003b).

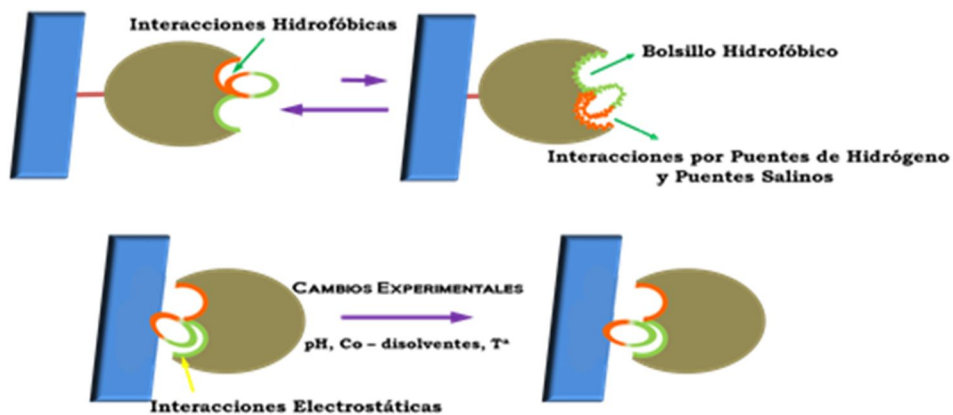
Se ha establecido la ingeniería conformacional a través de diferentes técnicas disponibles en bioquímica, como una herramienta versátil que permite modular las propiedades biocatalíticas de las lipasas. Entre éstas se encuentran: Ingeniería de proteínas, modificación química, modificación genética, Ingeniería del medio de reacción e ingeniería del derivado entre otras (Fernández-la fuente *et al*, 1998; Sabuquillo *et al*, 1998; Torres *et al*, 2005; Barbosa *et al*, 2010). En el presente estudio se utilizará las dos últimas.

1.4.1 Ingeniería del medio. La modulación de las propiedades biocatalíticas (actividad y selectividad) de las lipasas se puede llevar a cabo aprovechando el complejo mecanismo catalítico de estas enzimas cuando interactúan con interfaces hidrofóbicas y a diferentes condiciones del medio de reacción (Terreni *et al*, 2001; Rocchietti *et al*, 2002).

Las condiciones ambientales constituyen un factor que influye significativamente en la modulación de las propiedades de la enzima de forma significativa ya que pueden alterar el balance de las interacciones intermoleculares (**Figura 6**) de la siguiente manera: Los disolventes favoreciendo el bolsillo hidrofóbico y fortaleciendo las interacciones electrostáticas, el pH alterando el tipo y cantidad de

interacciones entre el lid y el resto de la superficie de la proteína, la fuerza iónica haciendo más desfavorable la presencia del bolsillo hidrofóbico y debilitando las interacciones del lid con el resto de la proteína. De esta forma las condiciones experimentales afectan de forma dramática no solo el equilibrio entre la conformación abierta y cerrada de la lipasa sino también la forma exacta del sitio activo y por lo tanto las propiedades biocatalíticas (Palomo, 2003a).

Figura 6. Efecto de las condiciones experimentales en el mecanismo de apertura y Cierre de la Lipasa

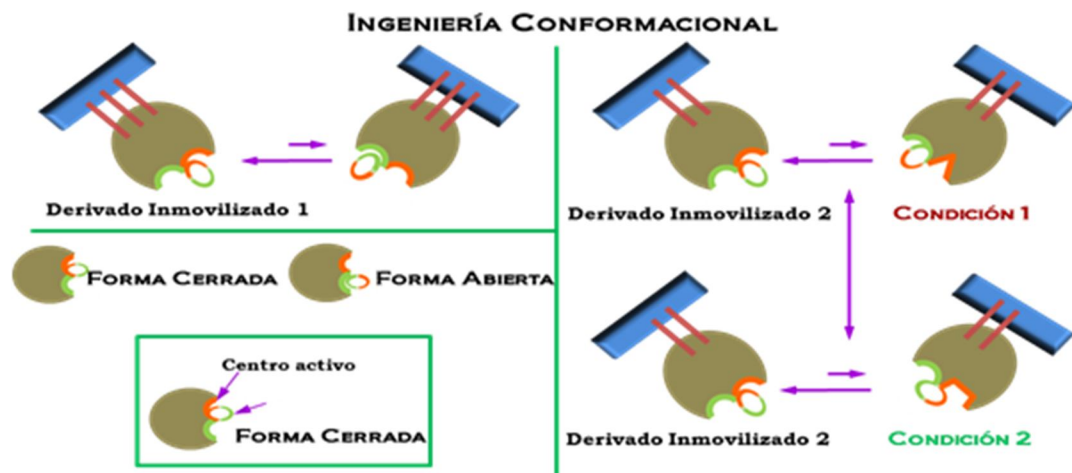


Torres y colaboradores (2006), inmovilizaron la lipasa B de *Candida antártica* (CAL-B) sobre soportes de agarosa activados con polietilenimina (agarosa-PEI) utilizando diferentes condiciones experimentales (temperaturas entre 4 y 25 °C y rangos de pH entre 5 y 9). Los derivados obtenidos fueron probados en la hidrólisis enantioselectiva del (R/S)-mandelato de metilo, obteniendo como resultado interesante una variación en la enantioselectividad para la CAL-B. Con esta estrategia se obtuvieron valores de E de 25 y 3.2 manteniendo constante el pH de la reacción (pH 5) y temperatura de 4 y 25 °C, respectivamente.

1.4.2 Ingeniería del derivado. Teniendo en cuenta los grandes cambios conformacionales que sufren las lipasas y el gran número de fuerzas de interacción que se implican en el mantenimiento de la estructura de las diferentes

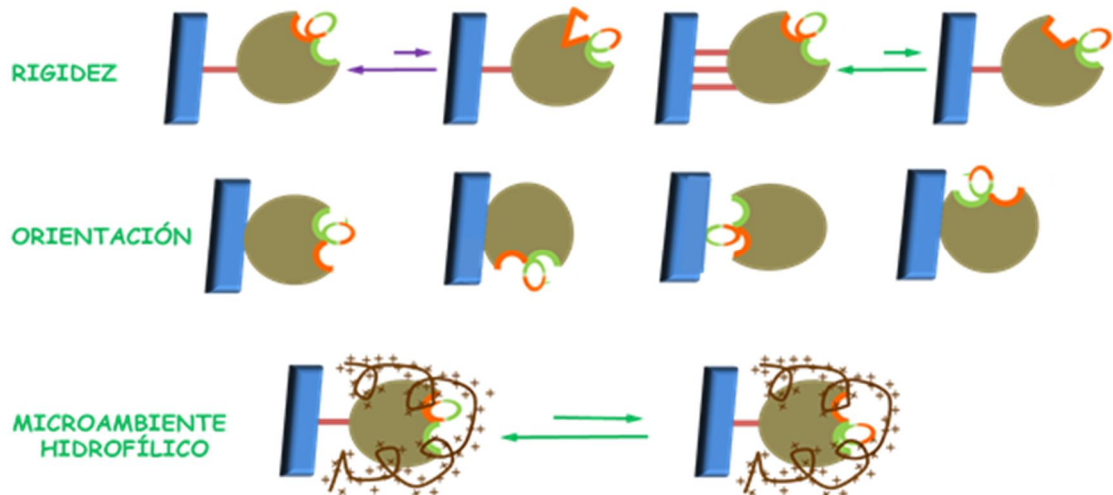
conformaciones, el hecho de preparar derivados inmovilizados de lipasas implicando zonas más o menos alejadas del centro activo de la proteína, confiriendo mayor o menor rigidez, o alterando el microambiente, se podría también alterar en gran medida sus propiedades catalíticas e incluso su interacción con el medio de reacción (**Figura 7**). De esta forma, diferentes derivados de una misma lipasa puede tener propiedades catalíticas (especificidad, selectividad, etc) muy diferentes (Mateo, 2003; Palomo *et al*, 2003b; Palomo *et al*, 2004a; Palomo *et al*, 2005).

Figura 7. Ingeniería conformacional de lipasas utilizando la ingeniería del derivado.



Durante los últimos años se han desarrollado diferentes estrategias de inmovilización con soportes activados que involucran diferentes grupos reactivos de la superficie de la proteína (lisina, histidina, etc.) permitiendo obtener diferentes derivados con propiedades biocatalíticas diferentes (**figura 8**). El grado de activación del soporte y las condiciones de inmovilización permiten controlar el grado de unión enzima-soporte y por lo tanto la rigidez de la zona inmovilizada (Mateo *et al*, 2000a; Mateo *et al*, 2000b; Mateo *et al*, 2000c).

Figura 8. Diferentes metodologías de inmovilización.



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

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

Haciendo uso de los polímeros iónicos posteriormente a la inmovilización de las enzimas en una matriz polimérica (Eupergit C, Resinas C18, Octil-Agarosa, etc) se han encontrado variaciones en la actividad y enantioselectividad de los derivados inmovilizados. Estos cambios en las propiedades biocatalíticas son atribuidos a la

variación del microambiente hidrofílico por efecto de la carga del polímero, el cual favorece o no la accesibilidad del sustrato al centro activo de la enzima (Guisan et al, 2001; Guisan, 2006; Torres et al, 2006; Mateo et al, 2007a; Mateo et al, 2007b; Mateo et al, 2007c; Cabrera et al, 2010).

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

Palomo y colaboradores (2002a) modificaron las propiedades de actividad y enantioselectividad de la lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B) mediante herramientas de ingeniería conformacional. Ésta lipasa fue inmovilizada en soportes poliméricos activados con diferentes grupos funcionales para interactuar con los aminoácidos superficiales de las lipasas. Cada derivado inmovilizado presentó diferente actividad y enantioselectividad al catalizar la hidrólisis de un compuesto aquiral y dos compuestos quirales bajo diferentes condiciones de reacción. Así por ejemplo, se obtuvo el enantiómero R del ácido mandélico con una pureza del 91% utilizando CAL-B inmovilizada en soportes activados con polietilenimina (PEI), mientras que el enantiómero R del ácido 2-butiroil-2-fenilacético fue obtenido con una pureza del 99,5% utilizando el derivado enzimático de lipasa inmovilizada en soportes activados con glutaraldehído.

Ese mismo año Palomo y colaboradores (2002b), purificaron la lipasa de *Candida rugosa* (CRL) y la inmovilizaron utilizando diferentes protocolos tales como: adsorción interfacial sobre soportes de glioxil-agarosa, adsorción iónica en soportes rodeados con polietilenimina (PEI) e inmovilización covalente en soportes activados con glutaraldehído. El derivado adsorbido interfacialmente fue el más activo usando sustratos simples (butirato de etilo), mientras que el soporte-PEI fue el más activo hidrolizando sustratos iónicos (ácido 2-fenil-2-butiroilacético) o mandelato de metilo.

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

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

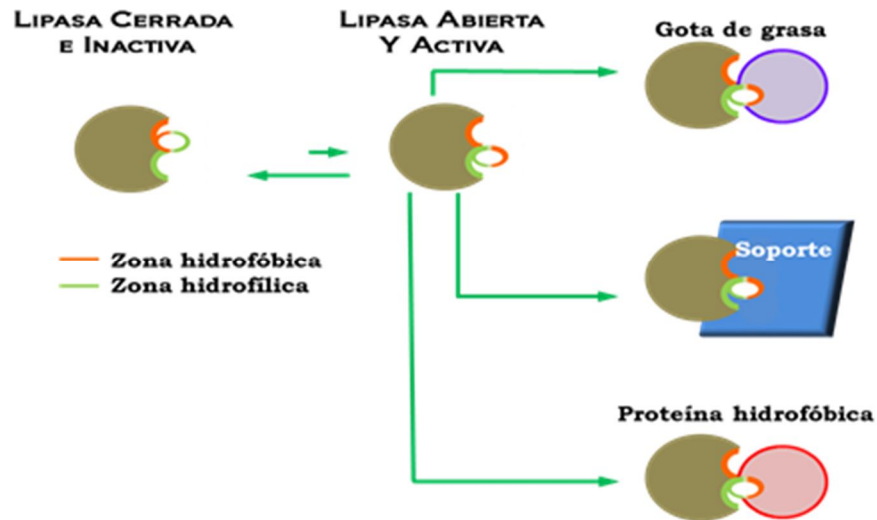
1.5 ADSORCIÓN INTERFACIAL DE LIPASAS SOBRE SOPORTES HIDROFÓBICOS

El mecanismo de interacción entre las proteínas y este tipo de soportes tiene lugar por el tipo de interacciones que se establecen a través de zonas de la superficie de la enzima ricas en aminoácidos hidrofóbicos. Es la metodología más usada para inmovilizar lipasas (Sabuquillo et al, 1998; Fernandez-Lafuente *et al*, 1998; Mateo *et al*, 2000a; Palomo *et al*, 2002a; Palomo *et al*, 2003b; Wilson *et al*, 2006a; Fernandez-Lorente *et al*, 2007; Cabrera *et al*, 2009) dada la peculiaridad de esta familia de enzimas de presentar zonas altamente hidrofóbicas.

La tendencia que tienen las lipasas a adsorberse sobre superficies hidrofóbicas (**Figura 9**) a través del mecanismo de adsorción interfacial generado por el desplazamiento hacia la conformación más activa, han hecho de los soportes de octil-agarosa (Bastida *et al*, 1998), octadecil-sepabeads (Palomo *et al*, 2002a), glioxil-agarosa (Palomo *et al*, 2003a) ideales para la inmovilización de lipasas a baja fuerza iónica. En estas condiciones la lipasa se une fuertemente al soporte a

través del lid y del gran bolsillo hidrofóbico que rodea al centro activo fijando de esta forma la conformación abierta y activa de la lipasa.

Figura 9. Adsorción interfacial de lipasas sobre superficies hidrofóbicas.



Fernandez-Lorente y colaboradores (2007), inmovilizaron diferentes preparaciones de lipasas de *Candida rugosa* (CRL) y de *Alcaligenes spp* (QL), sobre soportes activados con 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 (+).

La ventaja que tiene este tipo de soportes en la inmovilización radica en permitir la purificación, inmovilización e hiperactivación interfacial de las lipasas en un único paso (Bastida *et al*, 1998; Fernandez-Lafuente *et al*, 1998; Sabuquillo *et al*, 1998; Mateo *et al*, 2000c; Palomo *et al*, 2002a).

1.6 INMOVILIZACIÓN DE LIPASAS MEDIANTE UNIÓN COVALENTE MULTIPUNTUAL

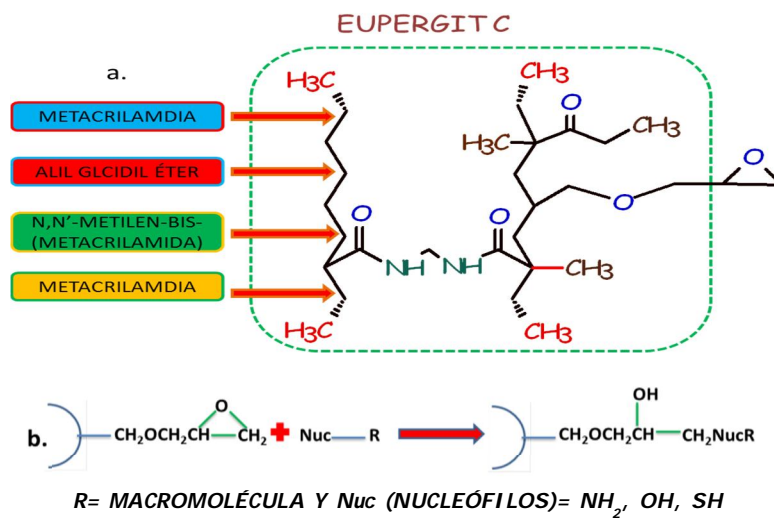
La metodología de la unión covalente se basa en el tipo de enlace químico (covalente multipuntual) que se establece entre ciertos grupos de la enzimas y ciertos grupos del soporte (Palomo *et al*, 2002b; Mateo *et al*, 2002; Torres *et al*, 2006; Fernandez-Lorente *et al*, 2007). Entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con la matriz son principalmente lisina, cisteína, tirosina e histidina, y en menor medida metionina, triptófano, arginina y el ácido aspártico y glutámico (Arroyo y Sinisterra, 1994; Arroyo *et al*, 1998). 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 (Hartmeier, 1985; Martinek y Mozhaev, 1987; Taylor, 1991; Arroyo *et al*, 1998).

Las enzimas se pueden inmovilizar sobre diferentes matrices (Eupergit C, Glioxil-agarosa, Quitosano, etc) dependiendo del grado de activación del soporte y de la disposición espacial de los residuos aminoacídicos frente a estos grupos reactivos, promoviendo una interacción eficiente enzima-soporte y en algunos casos bajo determinadas condiciones de reacción llegar a formar uno o varios enlaces de tipo covalente que le confieran a la proteína una mayor estabilidad (Mateo *et al*, 2000a; Montes *et al*, 2006; Mateo *et al*, 2006; Mateo, 2007c; Rodrigues *et al*, 2008).

1.6.1 Inmovilización Sobre el Soporte Comercial Eupergit® C. El Eupergit C es un soporte comercial epoxiacrílico 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 tal como se muestra en la **Figura 10**. Gracias a su estructura el Eupergit® C es estable tanto químicamente como mecánicamente, en un rango de pH de 0 a 14. Posee alrededor de 100 $\mu\text{mol/g}$ soporte húmedo de grupos epóxidos muy reactivos y estables, los

cuales, en principio, son capaces de reaccionar con varios grupos de la proteína dependiendo de las condiciones ambientales y generando uniones muy estables: grupos amino (amino secundario), tioles (tio-éteres), hidroxilo (ésteres) (Mateo *et al*, 2000a; Mateo *et al*, 2000b; Mateo *et al*, 2001; Mateo *et al*, 2003; Torres *et al*, 2003; Mateo *et al*, 2006; Torres *et al*, 2006; Mateo *et al*, 2007a).

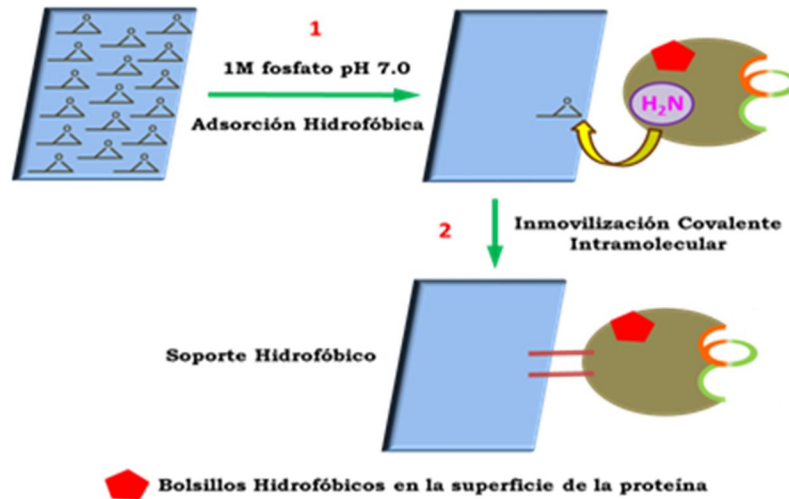
Figura 10. a) Estructura Eupergit C; b) Reacción de activación de soportes epóxidos.



De esta manera se ha propuesto que el proceso de la inmovilización de enzimas a soportes con grupo epóxido se produce siguiendo un mecanismo en dos etapas (Mateo *et al*, 2000a; Terreni *et al*, 2001) (**Figura11**):

1. Adsorción física de la enzima sobre el soporte, la cual permite acercamiento de la enzima al soporte.
2. La unión covalente entre la enzima adsorbida y los grupos epóxido de soporte.

Figura 11. Adsorción física e inmovilización covalente sobre soportes epóxido.



La inmovilización mediante esta metodología presenta una gran ventaja en comparación con la adsorción interfacial, ya que le confiere a la enzima una mayor estabilidad debido a la formación de enlaces covalentes enzima-soporte (rigidificación) (Martinek *et al*, 1977; Klibanov, 1983; Gianfreda y Scarfi, 1991; Gupta, 1991). Sin embargo, presentan una serie de inconvenientes que limitan su uso como son (Mateo *et al*, 2000a; Palomo *et al*, 2003a):

1. Baja reactividad de los grupos epóxidos, en condiciones suaves (pH 7, baja fuerza iónica) (Hartmeier, 1988; Bauer-Arnaz *et al*, 1998; Wheatley *et al*, 1999) donde la mayoría de las lipasas exhiben su mayor actividad catalítica.
2. Fuerte distorsión de su sitio activo, reduciendo completamente la movilidad de los grupos funcionales de la proteína, ocasionando con ello una dramática alteración de sus propiedades catalíticas (Palomo *et al*, 2003b; Palomo *et al*, 2004a; Palomo *et al*, 2005; Torres *et al*, 2006).

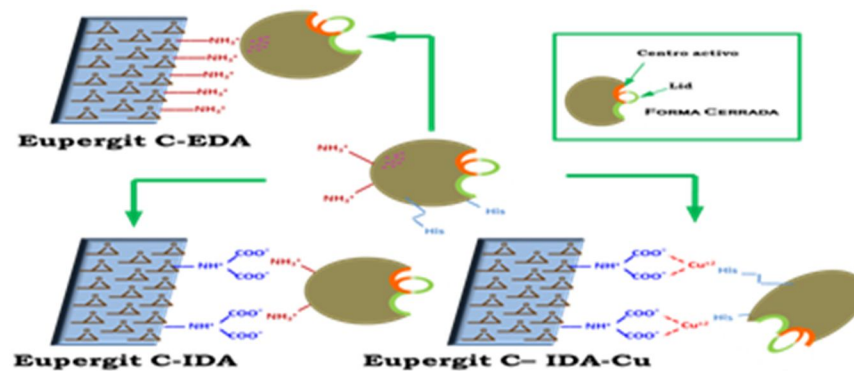
Para solucionar estos inconvenientes se han desarrollado varios protocolos de inmovilización que incluyen el uso de soportes heterofuncionales, permitiendo

lograr una orientación en la que no se comprometan aquellos residuos aminoacídicos involucrados en la cercanía del centro activo que son necesarios para la actividad catalítica de la enzima (Palomo *et al*, 2002a).

1.6.2 Inmovilización en Soportes Epóxido Heterofuncionales. Los soportes heterofuncionales son la evolución de los soportes epoxi-acrílicos clásicos. Consisten en matrices con dos o más grupos reactivos diferentes, de ahí su naturaleza heterofuncional. Estos soportes fueron diseñados principalmente para poder inmovilizar proteínas en soportes epoxi-acrílicos sin necesidad de usar alta fuerza iónica. De acuerdo con el mecanismo en dos etapas para la inmovilización sobre soportes epoxi-acrílicos, se diseñaron nuevos soportes donde los grupos epóxidos han sido parcialmente modificados con diferentes grupos funcionales como aminos primarios, grupos carboxílicos, quelatos metálicos entre otros (Armisen, 1999; Mateo *et al*, 2000a; Mateo *et al*, 2003; Torres *et al*, 2005). De esta manera, la modificación de un porcentaje de grupos epóxido del soporte con distintos compuestos (iminodiacético (IDA), etilendiamina (EDA), quelato de cobre (IDA-Cu)) puede provocar diferente tipo de adsorción de las moléculas de proteína del soporte (**Figura 12**). Los soportes heterofuncionales adsorberán las proteínas a través de diferentes zonas dependiendo del compuesto introducido en el soporte, lo cual marcará la orientación final de la enzima inmovilizada (Palomo *et al*, 2003b):

- Soporte epóxido-etilendiamina (EC-EDA): la adsorción de la proteína se realizará a través de las zonas en su superficie más ricas en cargas negativas.
- Soporte epóxido-iminodiacético (EC-IDA): la adsorción de la proteína se producirá a través de las zonas en su superficie más ricas en cargas positivas.
- Soporte epóxido-iminodiacético-Cu (EC-IDA-Cu): la adsorción de la proteína se realizará a través de la zona con un mayor número de residuos histidina.

Figura 12. Adsorción e inmovilización de lipasas con diferentes orientaciones en soportes epóxido heterofuncionales.



Utilizando los soportes heterofuncionales se consigue cambiar el mecanismo de inmovilización, puesto que ahora la primera etapa la adsorción física de la enzima al soporte será llevada a cabo por otro tipo de interacciones que no requieran la presencia de altas concentraciones de sal (p.e iónicas si el soporte tiene grupos cargados, tipo coordinación si el soporte tiene grupos quelatos metálicos, incluso a través de zonas glicosiladas si el soporte tiene grupos boronatos). Aunque la segunda etapa sigue siendo igual que en el caso de los soportes epoxi-acrílicos tradicionales, puesto que los grupos reactivos del enzima y del soporte están muy cercanos (Fernandez-Lafuente *et al*, 1993; Palomo *et al*, 2003a; Benevides *et al*, 2007; Barbosa *et al*, 2011).

La principal ventaja de estos soportes reside en la primera etapa del proceso, ya que no se requiere el uso de altas concentraciones de sal en la inmovilización que podría ser letal para la enzima soluble, además de permitir una orientación parcialmente dirigida. Las enzimas se orientarán por las zonas que tengan mayor número de residuos a través de los cuales la enzima se adsorbe al soporte en la primera etapa. Haciendo uso de este tipo de estrategias se han conseguido estabilizar muchas enzimas de interés industrial (Mateo *et al*, 2003b; Grazú *et al*, 2003; Palomo *et al*, 2005; Torres *et al*, 2005; Benevides *et al*, 2007).

En una investigación realizada por Mateo y colaboradores (2002) 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.

Estudios 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 *et al*, 2008).

Barbosa y colaboradores (2010), inmovilizaron la lipasa B de *Candida antártica* sobre soportes epóxido (Eupergit C) y soportes de Eupergit C (EC) parcialmente modificados. Los derivados obtenidos fueron evaluados en la resolución cinética del (R/S)-propanolol obteniendo como resultado relevante diferentes valores de selectividad y enantioselectividad para cada uno de los derivados destacándose el derivado de Eupergit C (EC-CAL-B) como el más enantioselectivo (E=57).

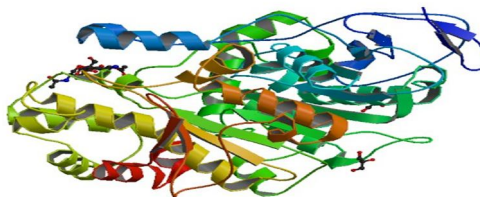
Finalmente cabe resaltar que para condiciones fijas, la misma lipasa inmovilizada sobre diferentes soportes tiene diferente rigidez y microambiente presentando diferentes propiedades catalíticas: diferente actividad y diferentes valores de enantioselectividad. Estos fuertes cambios conformacionales pueden obtenerse por el uso simple de alguna otra técnica, de forma que la lipasa inmovilizada sobre diferentes soportes puede comportarse como lipasas diferentes, por tanto, una misma variable no tiene el mismo efecto sobre diferentes derivados (Palomo *et al*, 2002a).

1.7 LIPASA DE *Candida rugosa* (CRL)

Candida rugosa es una levadura no formadora de esporas aislada por primera vez en suelos naturales en 1962 (Veeraragavan, K. y Gibbs, 1989). Tomizuca y colaboradores purificaron en 1966 una preparación comercial de la lipasa que sintetizaba esta levadura, para determinar su composición en aminoácidos y peso molecular. La enzima posee residuos hidrofóbicos (leucina e isoleucina principalmente) y contiene también xilosa y manosa, por lo que se trata de una glicoproteína. Desde entonces y hasta 1989, a pesar que esta enzima era utilizada en diversos propósitos, poco se conocía de su estructura conformacional. En 1992 se descubrió que la CRL produce cinco formas isoenzimáticas de la lipasa, cuando en un principio se pensaba que producía exclusivamente dos isoenzimas.

Todas las isoformas de la CRL presentan una gran similitud con la lipasa de *Geotrichum candidum*, en las que el 45% de la secuencia aminoacídica coinciden (Jensen *et al*, 1990; Ario *et al*, 2004). A partir de este hecho y basándose en la estructura conocida por rayos X de la lipasa de *G. candidum* se ha propuesto un modelo estructural de la lipasa de *Candida rugosa* representado en la **Figura 13**.

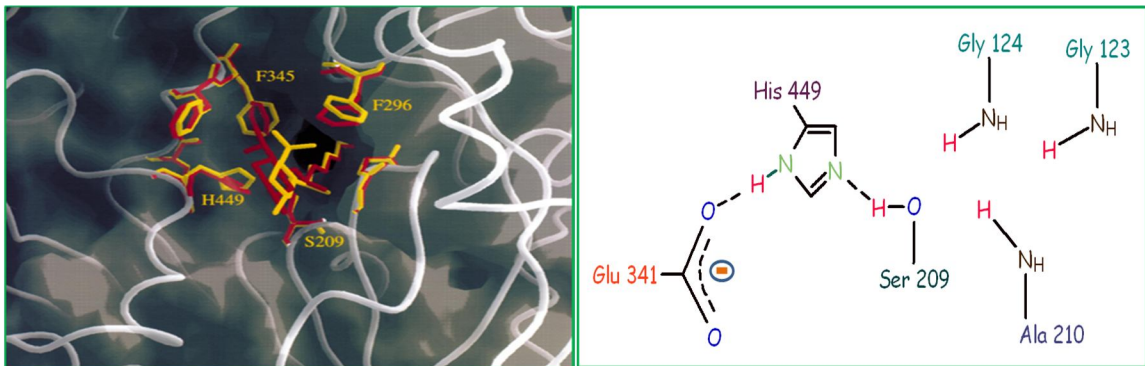
Figura 13. Representación de la lipasa de *Candida rugosa* (CRL)



Fuente. Tomado de la RSCB PDB 1GZ7.

Las regiones que comprenden los residuos 62-91 y 283-297 constituyen la “tapadera” que cubre el centro activo de la lipasa donde se sitúa la triada catalítica Ser-209, Glu 341 y His 449 (**Figura 14**). En su conformación abierta la lipasa *Candida rugosa* muestra su tapadera prácticamente perpendicular a la superficie de la proteína, descubriendo una profunda depresión donde se aloja el centro activo. La serina 209 se sitúa en el fondo de la depresión con su O_γ expuesto al medio (Arroyo, 1995).

Figura 14. Triada catalítica lipasa de *Candida rugosa* (CRL),



Fuente: Tomado de Cygler y Schrag, 1999.

La enzima presenta un peso molecular en torno a 63 KD aproximadamente y un punto isoeléctrico (pI) de 4.8 (Cygler y Schrag, 1999).

1.8 RESOLUCIÓN CINÉTICA CATALIZADA POR LIPASAS

Gracias a sus propiedades catalíticas las lipasas se han convertido en los biocatalizadores más importantes en el área de la biotransformaciones, como por ejemplo, la resolución de mezclas racémicas (Sobolev *et al*, 2002; Queiroz y nascimento 2002; Palomo *et al*, 2004a).

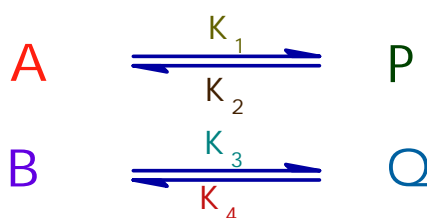
La resolución cinética vía enzimática constituye uno de los métodos empleados en la obtención de compuestos óptimamente puros, muy útiles en los procesos de

síntesis química (Laval *et al*, 1999; Ujang *et al*, 2003; Yadav *et al*, 2007) y en la obtención de precursores de fármacos quirales (Ducret *et al*, 1998; Park *et al*, 1999; Lee *et al*, 2001; Wei Xi y Xu, 2005; Takaç y Bakkal, 2007; Barbosa *et al*, 2010). Las lipasas debido a sus peculiares características han encontrado una aplicación importante en este campo.

El éxito del método depende de la reacción de los enantiómeros a diferentes razones con una entidad quiral la cual debe estar presente en cantidades catalíticas. La resolución cinética de compuestos racémicos es una de las transformaciones más comunes catalizada por lipasas, ya que la enzima es capaz de discriminar entre los dos enantiómeros de una mezcla racémica, de tal forma que uno de los enantiómeros es fácilmente transformado en su respectivo producto más rápido que el otro (Ghanem y Aboul-Enein 2004).

La reacción de resolución cinética catalizada por lipasas para un sistema reversible se puede representar como se muestra en la **Figura 15**. En el estado inicial de la reacción la enzima reacciona preferiblemente sobre el enantiómero A (reactante más rápido) y lo transforma en su respectivo producto P, mientras la concentración del enantiómero B (reactante lento) se mantiene mayoritariamente intacta. Cuando se establece el equilibrio entre el enantiómero A y el producto P la concentración del enantiómero B comienza a cambiar, disminuyendo la pureza óptica del enantiómero A remanente y del producto P. Por lo que el tiempo óptimo para terminar la resolución es cuando se haya alcanzado el equilibrio del reactante rápido (Chen *et al*, 1982).

Figura 15. Resolución cinética catalizada por lipasa para un sistema reversible.



Nota. Para un sistema irreversible $k_2 = k_4 = 0$). La resolución ocurre cuando k_1 es diferente de k_3 , tal que entre mayor sea la diferencia una mejor resolución es obtenida.

1.8.1 Enantioselectividad. Hay dos conceptos muy importantes a tener en cuenta en las reacciones catalizadas por enzimas, el exceso enantiomérico (**ee**) y la relación enantiomérica **E**. La pureza óptica o enantiomérica de un compuesto puede ser expresada en términos de su exceso enantiomérico (**ee**) definido como:

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

Donde R es la concentración del (R)-enantiómero y S es la concentración del (S)-enantiómero. De tal forma que para un compuesto racémico el valor de ee es cero (o 0%), y para un compuesto enantioméricamente puro el valor de ee es 1 (o 100%).

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

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

Donde k_{cat} es la constante de velocidad y K_M es la constante de Michaelis-Menten. Chen *et al* (1982), desarrollaron esta ecuación en términos del exceso enantiomérico del producto (ee_p), el enantiómero remanente (ee_s) y la conversión (c). Para ello, consideraron que para una reacción enzimática reversible, el valor de E puede ser expresado por la siguiente ecuación:

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

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

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

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

Donde c está expresada por la siguiente ecuación:

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

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

1.8.2 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 (por ej. ciclodextrinas) es usada en GC. El gas (fase móvil: hidrógeno, helio, nitrógeno) transporta el analito quiral a través de la fase estacionaria. Los enantiómeros a ser analizados experimentan rápidas y reversibles interacciones diastereoméricas con la fase quiral estacionaria, de donde pueden ser eluidos en diferentes tiempos. Una de las limitaciones asociadas con este método es que la muestra debe ser lo suficientemente volátil, térmicamente estable y soluble en la fase quiral estacionaria usada. La medida del exceso enantiomérico con GC contiene un alto grado de precisión ($\pm 0.05\%$) por lo que pueden ser obtenidos datos confiables. Es decir, que excesos enantioméricos altos (>99%) pueden ser detectados.

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

La importancia de los compuestos enantioméricamente puros se debe a su gran aplicación en la industria química y farmacéutica. Debido a que cada día se incrementa la demanda de estos compuestos, se requiere de nuevos métodos eficientes para su síntesis.

Las técnicas antes mencionadas han sido ampliamente utilizadas debido a las ventajas que ofrecen cada una de ellas. Sin embargo, el costo en la instrumentación y el tiempo necesario para realizar los análisis correspondientes limitan su uso. Para superar estas limitaciones durante los últimos años se han implementado las técnicas denominadas “high-throughput” las cuales en su mayoría se basan en métodos colorimétricos los cuales permiten determinar las propiedades de las enzimas con exactitud y reproducibilidad altas, además de emplearse como medida cualitativa o cuantitativa del curso de la reacción.

Estas metodologías (High-throughput) posibilitan el descubrimiento de procesos catalíticos para nuevas reacciones asimétricas. Cada reacción es única, y los diferentes métodos fueron desarrollados para explicar las propiedades de varios productos de reacción y sus subproductos como indicadores de enantioselectividad. (Traverse John F, Snapper Marc L, 2002).

Muchos de los ensayos enzimáticos son espectroscópicos y envuelven moléculas reactivas que pueden cambiar de color o llegan a ser fluorescentes en respuesta a una actividad enzimática. La fascinación con el cambio de color y la fluorescencia juega un papel muy importante en la decisión para comenzar a desarrollar ensayos de “*high-throughput screening*” (HTS) para la visualización de las actividades catalíticas (Grognum *et al*, 2004).

En la actualidad se utilizan una diversidad de métodos colorimétricos para medir la actividad enzimática como lo son: cromogenia (nitrofenil), fluorogenia (4-metillumberferona) o indigogenia (indoxil), que permiten que las enzimas

hidrolíticas puedan ser detectadas rápidamente produciendo productos coloreados sobre la hidrólisis. La mayor limitación de estos ensayos es la presencia latente de la funcionalidad calorimétrica entre el sustrato y el producto obtenido. (Wahler y Reymond, 2001).

Por otra parte, un método screening calorimétrico, simple, y con respuesta a variaciones de pH es de gran ventaja, ya que éste se basa en el descenso del pH que ayuda a que la reacción proceda, y el ácido carboxílico sea revelado. Este descenso puede ser monitoreado por el cambio del color de un pH indicador, proporcionando un perfil de color en el rango de actividad enzimática. La mayor aplicación de este método es que permite observar y comparar la reactividad de pares de enantiómeros correspondientes a una mezcla racémica y estimar su enantioselectividad. Sin embargo, existe una desventaja al momento de elegir el indicador ya que éste debe tratar de tener un pKa igual o muy parecido al buffer utilizado para poder observar el cambio de color y favorecer las condiciones suaves de la reacción (Morís-Varas *et al*, 1999).

Los métodos de screening de alta medida (High-throughput Screening) para catálisis tienen un rol muy importante para la búsqueda de nuevas enzimas en biocatálisis ya que requieren pequeñas cantidades de muestra y pueden realizarse ensayos por cambios monitoreados en parámetros físico-químicos como función del progreso de la reacción. Las reacciones de lipasas y esterasas sobre sustratos tipo ésteres liberan los respectivos ácidos carboxílicos los cuales ocasionan un descenso del pH del medio de reacción.

Ensayos convenientes de HTS pueden permitir una determinación rápida y fiable de las propiedades de las enzimas con alta precisión y reproducibilidad, especialmente si 10^3 - 10^4 muestras tienen que ser probadas (a menudo por día). En el caso ideal los resultados de los ensayos del HTS proporcionan información verdadera acerca de la cinética enzimática, actividad y (enantio-) selectividad y

pueden ser directamente transferidos a una resolución cinética de un compuesto de interés. En realidad, los ensayos HTS permiten reducir considerablemente el número de enzimas variantes que son investigadas con metodologías comunes (GC/HPLC) y además ahorra tiempo (Schmidt *et al*, 2004).

1.9 LIPASAS EN LA RESOLUCIÓN DE FÁRMACOS RACÉMICOS

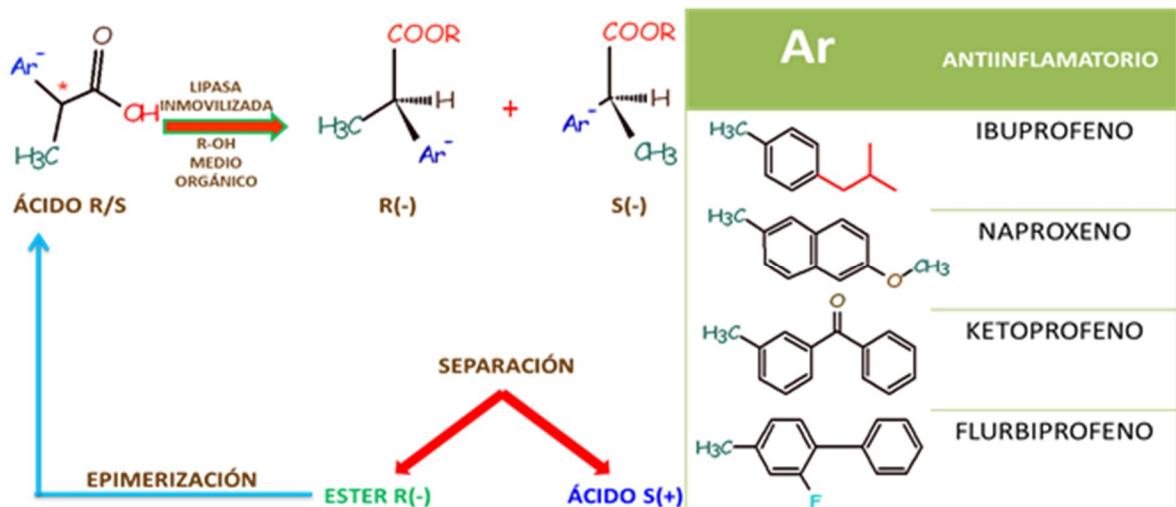
La resolución cinética (RC) es un proceso bien reconocido como método práctico para aislar enantiómeros únicos de una mezcla racémica por conversión de un isómero del racemato en productos quirales más preferentes que su imagen especular. Los compuestos quirales producidos son aplicables principalmente a la síntesis de productos farmacéuticos y a la química final (Zaks, 2001; Won *et al*, 2007).

La actividad biológica, la toxicidad, la distribución y el metabolismo de un fármaco dependen en gran medida de su estereoquímica, y pueden ser muy diferentes para cada enantiómero (Testa, 1986). Hay muchos ejemplos que muestran cómo un enantiómero presenta actividad, mientras que el otro no tiene efecto farmacológico; uno es tóxico frente al otro que demuestra ser seguro y activo; e incluso hay casos en los que uno es agonista frente al otro que se comporta como antagonista (Ariens, 1988).

En 1982, los fármacos racémicos y aquellos compuestos por un solo enantiómero puro se vendían en una proporción de 7 a 1. En 1985, este porcentaje no varió prácticamente. Actualmente la situación es bien distinta tras las indicaciones propuestas por la FDA (Administración Americana de Alimentos y Medicamentos) en 1992, las cuales regulan la fabricación de fármacos quirales como racémicos o como isómeros “puros” (Borman, 1992).

Aunque se cuenta con una normativa para regular la administración de los medicamentos, la mayoría de estos fármacos se han vendido como mezclas racémicas hasta hace poco al no existir una normativa clara al respecto, ni métodos económicos para realizar la separación de enantiómeros. La Industria farmacéutica ha empezado a superar este último problema introduciendo métodos enzimáticos en la obtención de fármacos ópticamente puros (Kato *et al*, 1999; Cai *et al*, 2006; Purchartová *et al*, 2011). Un ejemplo es el empleo de lipasas microbianas inmovilizadas (Ducret *et al*, 1998; Kim *et al*, 2000 Takaç y Bakkal, 2007) en la obtención de antiinflamatorios no esteroídicos (**Figura 16**). El isómero S de estos ácidos (ibuprofeno, naproxeno o ketoprofeno) es el que posee actividad terapéutica, y también se ha obtenido con una gran pureza óptica empleando cristales reticulados de lipasa de *Cándida rugosa* (CLEC-CR®) (Margolin, 1993).

Figura 16. Proceso biotecnológico de obtención de antiinflamatorios no esteroídicos ópticamente puros mediante el empleo de lipasas inmovilizadas.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

Las lipasas de *Candida rugosa* (CRL) y *Alcaligenes sp* (QL), el (RS)- Ácido mandélico, (RS)-mandelato de metilo y los isómeros puros fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El Azul de Bromotimol (ABT) y el Rojo de Fenol (RF) se obtuvieron de Merck. El soporte Eupergit C fue gentilmente donado por Rohm Pharma (Darstamdt, Alemania). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico y suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

2.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES

2.2.1 Purificación del extracto crudo de lipasas de *Candida rugosa* (CRL) y *Alcalígenes sp* (QL). La CRL y QL fueron purificadas por cromatografía de adsorción interfacial de acuerdo con la metodología propuesta por Sabuquillo et al., 1998, utilizando geles de octil agarosa.

El soporte de Octil-agarosa fue lavado previamente con exceso de agua destilada con el propósito de eliminar el etanol presente en dicha matriz polimérica el cual es utilizado como agente conservante.

La inmovilización o la adsorción de las lipasas sobre octil agarosa se realizó manteniendo una relación en volumen de 1:10 de soporte y solución enzimática teniendo en cuenta que la densidad del octil-agarosa es de 0,8 g/mL.

Periódicamente, se obtuvieron muestras del sobrenadante y suspensión para ser analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acuerdo con Laemmli (1970) y ensayo de actividad tal como se describe en la sección 2.3.3. Al finalizar el proceso de inmovilización, la suspensión fue

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

Desorción de las lipasas *CRL* y *QL* del soporte *Octil-Agarosa*.

La *CRL* Y *QL* adsorbidas sobre el soporte *Octil-agarosa* fueron incubadas en una solución buffer fosfato 25 mM a pH 7 y 4°C conteniendo el surfactante no iónico tritón X-100. Se prepararon soluciones de Tritón X-100 en un rango de concentraciones entre 0.1 y 2 % v/v con el fin de encontrar las condiciones óptimas de desorción enzimática. Periódicamente, se determinaron las actividades del sobrenadante y la suspensión tal como se describe en la sección 2.3.3.

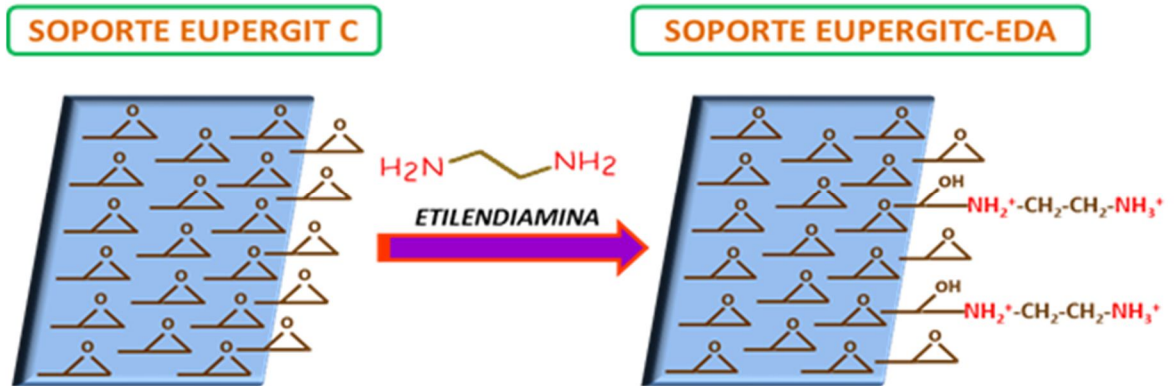
2.2.2 Preparación de soportes epóxidos (*Eupergit C*) multifuncionales.

Inicialmente se utilizaron soportes *Eupergit-C* (Rohm Pharma), los cuales son poliméricos de N,N'-metilen-bis-(metacrilamida) y activados con grupos epóxidos. Posteriormente, se modificaron los grupos epóxidos de manera parcial con diferentes grupos funcionales (*EDA*, *IDA* y *Cu*) obteniendo una modificación de 21.5% para el soporte *EDA*, 18.3% para el *IDA* y 24.3% para el *IDA-Cu* (Mateo et al., 2000a; Ariza, 2009; Barbosa et al, 2010). Estas modificaciones se hicieron con el objetivo aumentar la posibilidad de modulación de las propiedades biocatalíticas.

Soporte aminado (*EDA*)-*Eupergit C*

10 g de *Eupergit*[®] *C* fueron incubados en 60 mL de etilendiamina al 2% v/v a pH 8.5 durante 1 hora bajo una agitación suave. 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 17**.

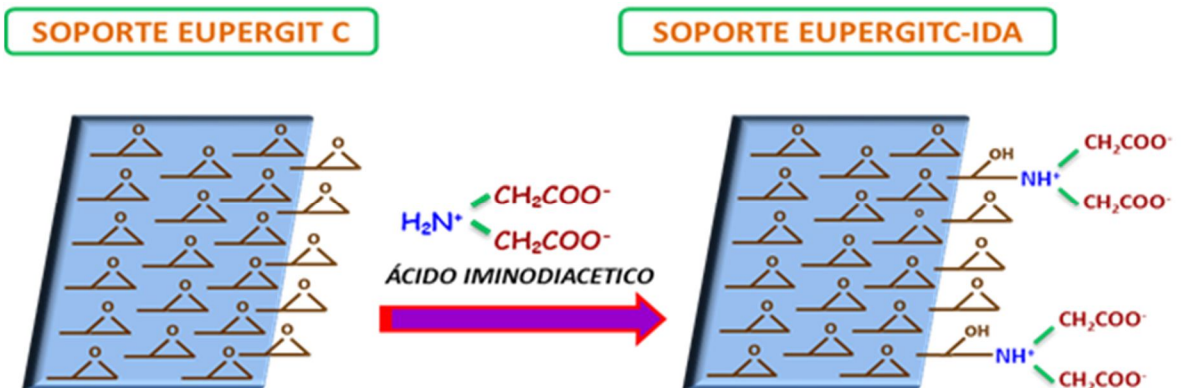
Figura 17. Síntesis del soporte epóxido parcialmente modificado con etilendiamina, EUPERGIT®C-EDA.



Soporte iminodiacético (IDA)

10 g de *Eupergit*® C fueron incubados en 18 mL de una solución 2M ácido iminodiacético / 0.1 M de Borato de Sodio a pH 9 y 25°C durante 2 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*® C se muestra en la **Figura 18**.

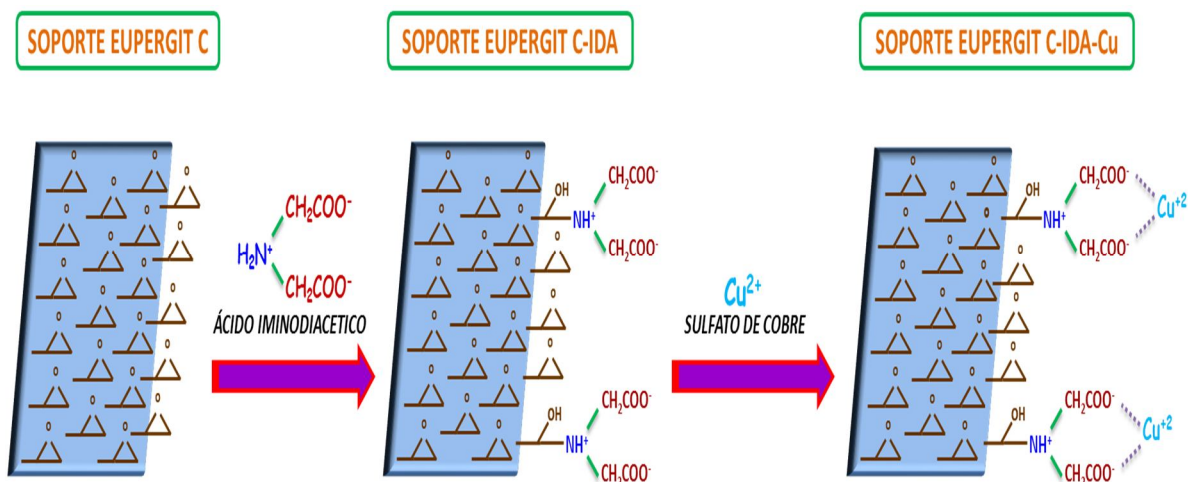
Figura 18. Síntesis del Soporte Epóxido Parcialmente Modificado con Ácido Iminodiacético, EUPERGIT®C-IDA.



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. La cuantificación de los átomos de Cobre sobre el soporte se realizó por espectroscopia de absorción atómica luego de un tratamiento del soporte con EDTA (Mateo *et al*, 2000). El equipo de absorción atómica empleado fue un Thermo Electron modelo S4. El procedimiento de modificación parcial del soporte epóxido con grupos reactivos IDA-Cu se resume en la **Figura 19**.

Figura 19. Síntesis del soporte epóxido parcialmente modificado con ácido iminodiacético y posterior quelación con Cu^{2+} , EUPERGIT® C-IDA-Cu.



2.2.3 Inmovilización de CRL sobre los soportes multifuncionales. La solución de CRL previamente purificada por cromatografía de adsorción interfacial, fue utilizada para la inmovilización sobre los distintos soportes obtenidos a partir de la modificación parcial de los grupos epóxido del soporte Eupergit C.

Para la inmovilización, se adicionaron 10 ml de la solución de lipasa purificada sobre 1g de cada soporte (Eupergit C, Eupergit C-EDA, Eupergit C-IDA y Eupergit C-IDA-Cu) según lo propuesto por Barbosa, 2009. La carga máxima de enzima empleada fue de 0.5 mg/ml. La agitación se llevó cabo en un agitador de rodillos el cual aseguraba la correcta interacción de la enzima con los poros del soporte. Periódicamente, se evaluó el proceso de inmovilización de CRL sobre los diferentes soportes midiendo la actividad del sobrenadante y de la suspensión mediante un ensayo espectrofotométrico usando como sustrato p-nitrofenil-Butirato (pNPB), tal como se describe en la sección 2.3.3.

2.2.4 Evaluación de la enantioselectividad de lipasas inmovilizadas

Evaluación de la carga del biocatalizador en la reacción de hidrolisis del (R/S)-Mandelato de metilo

Se evaluó la hidrolisis del (R/S) mandelato de metilo, utilizando los derivados inmovilizados de CRL previamente preparados (Eupergit C-CRL, Eupergit C-EDA-CRL, Eupergit C-IDA-CRL y Eupergit C-IDA-Cu-CRL).

Para las reacciones se trabajó con 50 μ L de indicador al 0,1% p/v, 600 μ L de una solución de (R/S)-Mandelato de metilo 50 mM y buffer fosfato 25 mM pH 7, para completar un volumen de reacción de 3 ml. La reacción fue iniciada con la adición de diferentes cantidades de biocatalizador inmovilizado de CRL en un rango de 10-40 mg. La mezcla de reacción fue agitada a 200 rpm en un agitador de rodillos y 25°C, durante 4 horas. Periódicamente, el progreso de la reacción fue monitoreado extrayendo a diferentes tiempos alícuotas del medio de reacción y analizando la desaparición del complejo formado como medida directa del grado de hidrolisis del sustrato a través de la técnica colorimétrica implementada en la sección 2.3.1.

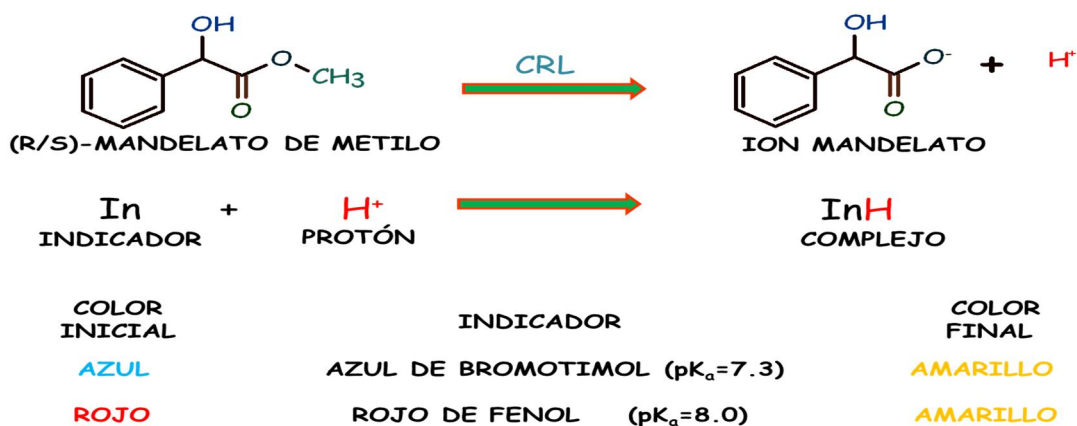
Evaluación de la Enantioselectividad de los derivados inmovilizados de CRL utilizando los enantiómeros puros R y S-Mandelato de metilo

Se evaluó la resolución cinética de los sustratos R y S-Mandelato de metilo, utilizando los derivados de CRL previamente preparados (Eupergit C-CRL, Eupergit C-EDA-CRL, Eupergit C-IDA-CRL y Eupergit C-IDA-Cu-CRL) utilizando la metodología colorimétrica que se describirá en la sección 2.3.1.

2.3 METODOS ANALÍTICOS

2.3.1 Desarrollo de una técnica colorimétrica para la determinación de la enantioselectividad de lipasas inmovilizadas. El fundamento de esta técnica se basa en la reacción de hidrólisis catalizada por la lipasa CRL la cual generará como uno de los productos de reacción el ácido mandélico (**Figura 20**). Este ácido débil al no estar totalmente disociado en la disolución aportará iones H^+ al medio, los cuales reaccionarán con el indicador presente (ABT o RF), generando como producto de la reacción un complejo coloreado el cual servirá como guía del curso de la reacción enzimática.

Figura 20. Reacción de hidrólisis del (R/S)-Mandelato de metilo catalizada por CRL utilizando indicadores de pH.



Para el desarrollo de la metodología colorimétrica se emplearon los indicadores de pH azul de bromotimol (ABT) y rojo de fenol (RF). Se evaluaron los siguientes parámetros; longitud de onda de máxima absorción, concentración y cantidad de indicador. A continuación se describen los ensayos:

Determinación de la longitud de onda de máxima absorción

Se prepararon dos soluciones de ABT de 10 mg/ml, utilizando acetato de sodio (NaOOCCH_3) 25 mM y fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) 25 mM. De igual manera se prepararon dos soluciones con el indicador RF. Las cuatro soluciones de colorante fueron ajustadas a diferentes valores de pH usando HCl 0,1 M para pH ácidos (3, 4, 5 y 6) y pH neutro (7); y NaOH 0,1M para pH básicos (8, 9, 10,11 y 12). Las veinte (20) soluciones de cada colorante fueron utilizadas para realizar el espectro de absorción y así determinar el pico de máxima absorción.

Efecto de la concentración del indicador en la sensibilidad del método

Se prepararon soluciones para cada indicador (ABT y RF) de 0.01, 0.1 y 1% p/v en buffer fosfato 25 mM pH=7. Se adicionaron 100 μL de indicador, 600 μL de una solución de ácido mandélico 50 mM y buffer fosfato 25 mM pH 7, para completar un volumen de reacción de 3 ml, utilizando un tubo de ensayo. Cada solución fue utilizada para realizar un barrido entre 300 y 700 nm utilizando un UV-1800 marca SHIMADZU. Cada uno de los ensayos fue realizado por triplicado.

Efecto de la cantidad de indicador en la sensibilidad del método

Se preparó una solución al 0.1% p/v de cada uno de los indicadores (ABT y RF) en buffer fosfato 25 mM pH=7. Se adicionaron a tubos de ensayo volúmenes de indicador comprendidos desde 100 a 200 μL a los cuales se agregaron 600 μL de una solución 50 mM de ácido mandélico y buffer fosfato 25 mM pH 7 hasta

completar un volumen de 3 ml (soluciones preparadas de forma independiente para cada indicador). Cada solución fue utilizada para realizar un barrido entre 300 y 700 nm utilizando un UV-1800 marca SHIMADZU. Cada uno de los ensayos fue realizado por triplicado.

Selección de la longitud de onda máxima para cada indicador utilizado en el desarrollo de la metodología.

Se preparó una solución madre de ácido mandélico 10 mM en buffer fosfato 25 mM pH 7. Se prepararon 10 patrones de concentración comprendida entre 0.1-1mM de ácido mandélico. Posteriormente, a cada una de las soluciones se adicionaron 50 μ L de indicador al 0,1% p/v (ABT y RF) y buffer fosfato 25 mM pH 7 hasta completar un volumen de 3 ml. Cada una de estas soluciones fue utilizada para realizar un barrido entre 300 y 700 nm utilizando un UV-1800 marca SHIMADZU. Cada uno de los ensayos fue realizado por triplicado.

Seleccionada la longitud de onda de trabajo para cada indicador, se procedió a realizar la curva de calibración del ácido mandélico para cada indicador (Ver **Anexos 2 y 3**). Para este procedimiento se prepararon los patrones en buffer fosfato 25 mM pH 7 de concentraciones comprendidas entre 0,01 y 10 mM. Cada uno de los patrones fue utilizado para medir el cambio en la absorbancia debido a la formación del complejo coloreado en las longitudes de ondas establecidas para cada colorante, utilizando un UV-1800 marca SHIMADZU. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

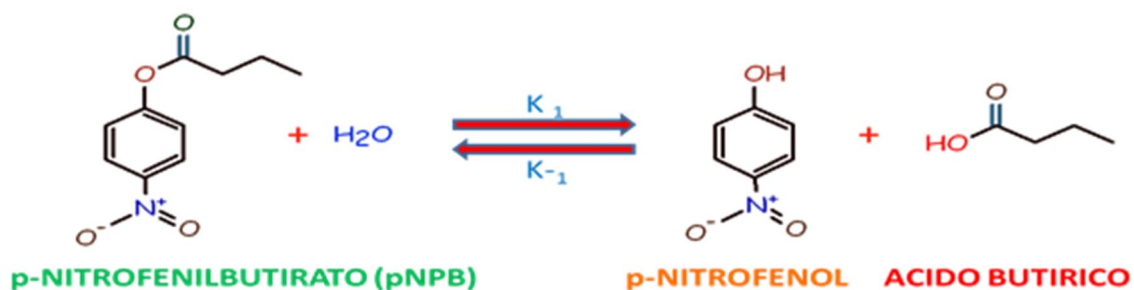
2.3.2 Evaluación de la enantioselectividad de los derivados de CRL utilizando la metodología colorimétrica. Se añadieron 50 μ L de indicador al 0,1% p/v, 600 μ L de una solución de Mandelato de metilo (R o S enantiómero) 50 mM, 20 mg de derivado inmovilizado y buffer fosfato 25 mM pH 7, para completar un volumen de reacción de 3 ml, a un frasco tapa rosca de plástico con capacidad de 10 ml. La

mezcla de reacción se mantuvo a 200 rpm en un agitador de rodillos a 25°C, durante 48 horas. El progreso de la reacción fue monitoreado periódicamente mediante la extracción de alícuotas de medio de reacción a diferentes tiempos. Se analizó la desaparición de los complejos estudiando la desaparición de los complejos (especies aniónicas) formados para cada uno de los indicadores como medida del grado de hidrólisis del sustrato utilizando un UV-1800 marca SHIMADZU.

El grado de conversión fue determinado, interpolando los valores de absorbancia obtenidos en la curva de calibración realizada para cada uno de los indicadores, (ver Anexos 2 y 3).

2.3.3 Determinación de la actividad lipásica utilizando p-nitrofenilbutirato (p-NPB). La actividad catalítica de las lipasas se cuantificó de forma discontinua a través de la determinación del método de velocidades iniciales de reacción. El ensayo se llevó a cabo midiendo el aumento en el valor de absorbancia a 348 nm, producido por la formación del producto p-nitrofenol (coeficiente de extinción molar= $5150 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ a pH 7) generado por la hidrólisis de p-NPB 0.4 mM, disuelto en tampón fosfato sódico 25 mM, pH 7 y a 25 °C (**Figura 21**). Para iniciar la reacción, 20 μL de solución lipásica o suspensión se añadieron a 2,5 mL del sustrato. Una unidad internacional de actividad de p-NPB se definió como la cantidad de lipasa que es necesaria para hidrolizar 1 μmol de p-NPP por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente, Ver ejemplo de cálculo **Anexo 7**).

Figura 21. Reacción de Hidrólisis del pNPB Catalizada por CRL.



2.3.4 Determinación de la concentración de proteína. La concentración proteica 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 (**Anexo 2**) midiendo la absorbancia a 595 nm.

2.3.5 Electroforesis SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Las enzimas adsorbidas en el soporte se confirmaron por electroforesis SDS-PAGE. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente y 150 mv de voltaje constante utilizando como electrolito Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 1% (v/v).

Las muestras fueron tratadas durante 5-10 minutos a 100°C en presencia de tampón de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 – SDS 2% (v/v) - β -mercaptoetanol 5% (v/v) - glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol al 0,005% (p/v). El revelado de las proteínas se realizó mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-250 (0,25% p/v) disuelto en metanol 50% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). Para la determinación de las masas moleculares de las proteínas se utilizaron marcadores de un amplio rango de peso molecular el cual contenía una mezcla de 14 proteínas recombinantes altamente purificadas y diseñadas para el tamaño preciso de las proteínas analizadas por SDS-PAGE. Los geles obtenidos fueron posteriormente escaneados con un densitómetro UMAX PowerLook 2100XL y visualizados a través del software PD Quest (Biorad).

2.3.6 Determinación del exceso enantiomérico (ee_p) y la enantioselectividad

(E). La resolución cinética del mandelato de metilo fue estudiada llevando a cabo la hidrólisis con cada uno de los enantiómeros puros (R y S) bajo las mismas condiciones de reacción, monitoreando los cambios en la concentración del sustrato y del producto formado (ácido mandélico) mediante los espectros de absorción obtenidos para cada indicador durante la reacción al mismo tiempo en ambas reacciones.

Se analizó el exceso enantiomérico (Ver ejemplo de cálculo en el **Anexo 8**) del ácido mandélico (ee_p) a diferentes grados de conversión (entre 20 y 30%) a través de la metodología colorimétrica desarrollada como se describe en la sección 2.3.2. La relación enantiomérica E fue calculada como la relación entre las velocidades iniciales de hidrólisis de ambos isómeros puros (hidrólisis alrededor del 20-30% del éster) usando la ecuación reportada por Straathof y Jonjean (1997) mediante la siguiente ecuación (Ver ejemplo de cálculo en el **Anexo 8**):

$$si\ c_{s_0}^S = c_{s_0}^R = c_{s_0}$$

$$E = \frac{r_0^S}{r_0^R} = \frac{V_{max}^S \frac{c_{s_0}^S}{K_m^S + c_{s_0}^S}}{V_{max}^R \frac{c_{s_0}^R}{K_m^R + c_{s_0}^R}} = \frac{V_{max}^S / K_m^S + c_{s_0}}{V_{max}^R / K_m^R + c_{s_0}}$$

$c_{s_0}^S$ = Concentración inicial del enantiómero S

$c_{s_0}^R$ = Concentración inicial del enantiómero R

c_{s_0} = Concentración inicial de los enantiómeros R o S

r_0^S = velocidad inicial del enantiómero S

$r_0^R = \text{velocida inicial del enantiómero R}$

$V_{max}^S = \text{velocidad máxima del enantiómero S}$

$V_{max}^R = \text{velocidad máxima del enantiómero R}$

$K_m^S = \text{Constante de Michaelis – Menten para el enantiómero S}$

$K_m^R = \text{Constante de Michaelis – Menten para el enantiómero R}$

3. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

PURIFICACIÓN DE LAS LIPASAS

Para estudiar la estructura y propiedades específicas de las lipasas, es necesario purificarlas con el fin de separar las impurezas del extracto enzimático y poder garantizar que es la enzima la que cataliza la reacción y no los contaminantes (p.e esterasas).

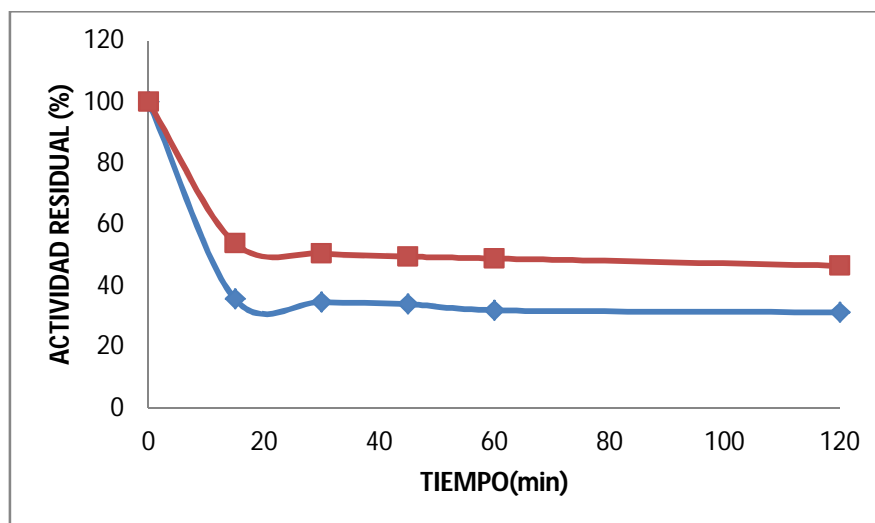
La purificación de las diferentes lipasas se realizó a través del método de cromatografía de adsorción interfacial de lipasas en geles de octil-agarosa de acuerdo con lo propuesto por Sabuquillo y colaboradores (1998). Las enzimas fueron adsorbidas sobre la matriz de octil-agarosa a baja fuerza iónica (5 mM) y pH 7, condiciones en las cuales la CRL y QL expresan mayor actividad (Escorcía, 2008).

3.1 PURIFICACION DE LA CRL

Adsorción interfacial de CRL en geles de octil-agarosa

El proceso de inmovilización se llevó a cabo en aproximadamente 1 hora ya que después de este periodo de tiempo no se observan grandes cambios en la actividad en la suspensión y el sobrenadante. El 97% de la actividad fue adsorbida en el soporte. El 3% restante se atribuye a esterasas o contaminantes presentes en el extracto comercial, que no pueden ser adsorbidos bajo las condiciones antes mencionadas en el soporte de octil-agarosa. La carga enzimática del derivado obtenido fue de 2,48 mg de CRL/g octil-agarosa. En la **Figura 22**, se muestra la cinética de inmovilización de la CRL sobre el soporte hidrofóbico de octil-agarosa.

Figura 22. Cinética de inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* sobre el soporte octil-agarosa en la hidrólisis de p-NPB.



Nota. (◆): Actividad enzimática en el sobrenadante; (■): Actividad enzimática en la suspensión.

En La **Tabla 2** se muestran los valores de actividad obtenidos para la enzima soluble y el derivado de octil durante el proceso de adsorción a soporte de octil-agarosa, destacando un decrecimiento en la actividad del derivado inmovilizado en comparación con la enzima libre.

Tabla 2. Actividad específica y relativa del derivado inmovilizado octil-agarosa de CRL con p-NPB.

DERIVADO INMOVILIZADO	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/g)	ACTIVIDAD RELATIVA (%)
SOLUBLE-CRL	5106.2	1
OCTIL-AGAROSA-CRL	976.7	0.2

Nota. La actividad específica se define como: ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$ de octil-agarosa). Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato 25 mM pH 7.

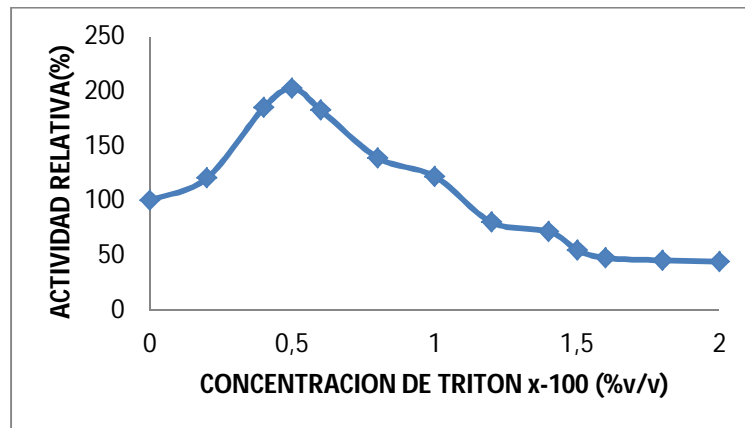
Durante el proceso de adsorción de la CRL no se observa el fenómeno de hiperactivación que es una característica propia de las lipasas en interfaces hidrofóbicas (Fernandez-Lafuente *et al*, 1998; Sabuquillo *et al*, 1998; Palomo *et al*, 2002a; Wilson *et al*, 2006b; Fernandez-Lorente *et al*, 2007). Sin embargo, la actividad de la suspensión fue mayor que la del sobrenadante durante todo el proceso de inmovilización. La falta de hiperactivación presentada por esta lipasa es atribuida posiblemente a restricciones difusionales internas o externas (Katchalski *et al*, 1971; Berezin *et al*, 1975; Goldstein, 1976; Arroyo, 1998) ya que no se observa una pérdida total de la actividad enzimática. Estas restricciones podrían disminuirse, adicionando una menor cantidad de enzima al momento de realizar la inmovilización o aumentando la cantidad de sustrato a reaccionar.

Desorción de CRL del soporte de octil-agarosa

En la **Figura 23** se presenta el efecto de la concentración de Tritón X-100 durante la desorción de la CRL. Se observa que para una concentración de 0,5% (v/v) de tritón, se logra la máxima recuperación de la enzima a partir del octil-agarosa. A esta concentración se obtuvo una máxima actividad residual de la lipasa indicando el mayor grado de desorción de la enzima desde el soporte.

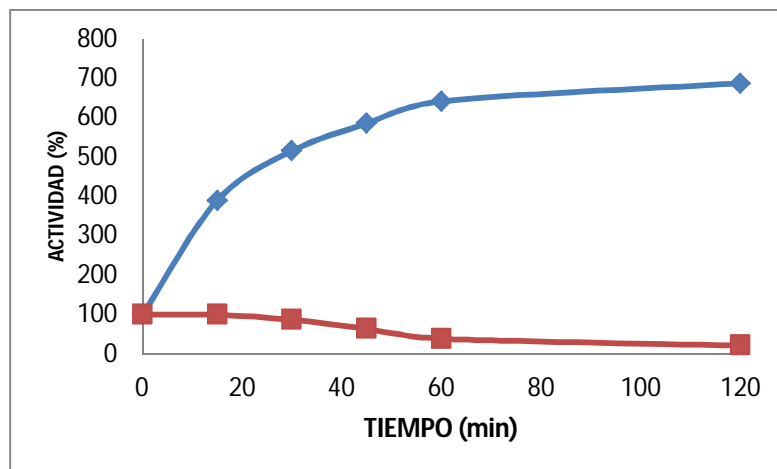
A partir de concentraciones mayores a 0,5% (v/v) de tritón x-100 se puede llegar a desorber la enzima reteniendo el 100% de su actividad (hasta el 1%). Sin embargo, no es recomendable la utilización de altas concentraciones de tritón ya que en el paso posterior donde se inmovilizará la enzima en el soporte epóxido se requiere de una adsorción física previa al soporte de las moléculas de lipasa, la cual puede ser afectada por el tritón, que favorece su partición hacia la fase líquida en lugar de ser adsorbida al soporte sólido epóxido (Mateo *et al* 2000; Gallego, 2006; Ariza, 2009). Por otro lado, la enzima puede desnaturalizarse y perder su actividad debido al tiempo de exposición a mayores concentraciones de detergente (Helistö y Korpela, 1998).

Figura 23. Efecto de la Concentración de Tritón x-100 en el proceso de desorción de la CRL.



Una vez seleccionada la concentración de tritón (0,5% v/v) necesaria para la desorber la CRL del soporte de octil-agarosa, se realizó la cinética de desorción (**Figura 24**) con el propósito de completar el proceso de purificación. La enzima expresa el fenómeno de hiperactivación en un factor de 7 veces en relación al derivado inmovilizado en octil-agarosa.

Figura 24. Cinética de desorción de la CRL del soporte octil-agarosa en la hidrólisis de p-NPB .

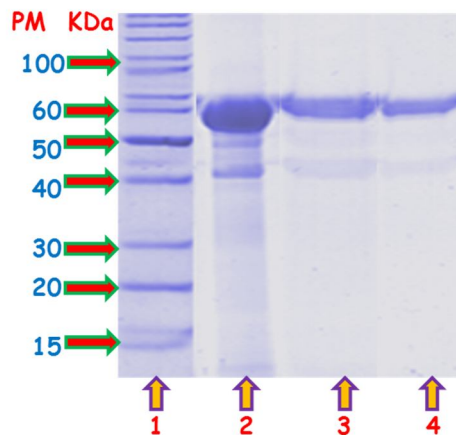


Nota. (◆): Actividad enzimática en el sobrenadante; (■): Actividad enzimática en la suspensión. Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato 25 mM pH 7.

Electroforesis SDS-PAGE de la CRL

En la **Figura 25** se muestra el perfil electroforético de proteínas obtenido por SDS-PAGE de la CRL purificada por cromatografía de adsorción interfacial en geles de octil-agarosa. Se puede observar que la CRL se adsorbió de manera específica sobre el soporte, presentándose una banda característica de 63 KDa (Ortiz, 2004).

Figura 25. Electroforesis SDS-PAGE de la preparación de la lipasa de CRL.



Nota. Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2. Preparación enzimática de CRL Carril 3. CRL adsorbida sobre octil-agarosa. Carril 4. CRL desorbida de octil-agarosa con Tritón x-100.

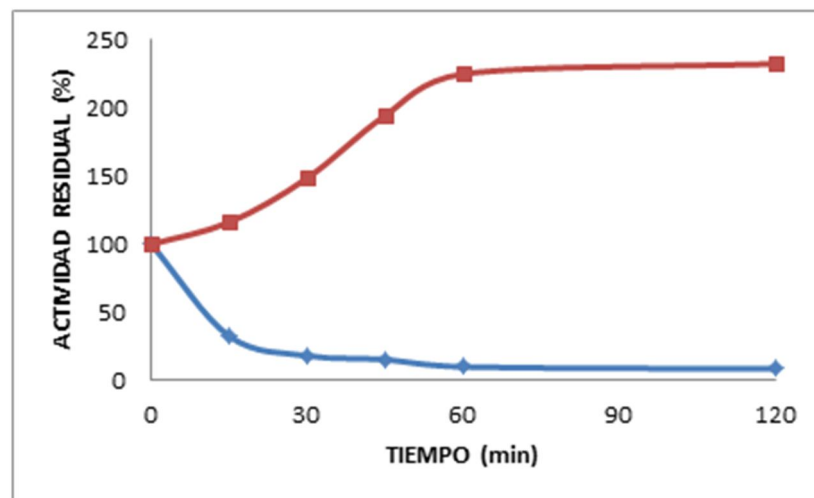
El carril 2 del perfil electroforético permitió verificar que el extracto enzimático de CRL contenía impurezas correspondientes a proteínas o péptidos de peso molecular menor al de la enzima de interés. Por otro lado los carriles 3 y 4 permiten verificar la obtención de la enzima pura ya que no se observan bandas diferentes a la CRL.

3.2 PURIFICACIÓN DE LA QL

La inmovilización de la QL al igual que la CRL transcurrió en aproximadamente 1 hora, lográndose una adsorción del 98% de la actividad. El 2% restante se atribuye a esterazas o contaminantes presentes en el extracto comercial que no

pueden ser adsorbidos bajo las condiciones antes mencionadas en el soporte de octil-agarosa. La carga enzimática del derivado obtenido fue de 2,19 mg de QL/g octil-agarosa. En la **Figura 26**, se muestra la cinética de inmovilización de la QL sobre el soporte hidrofóbico de octil-agarosa.

Figura 26. Cinética de inmovilización de la lipasa de *Alcaligenes sp* (QL) sobre el soporte octil-agarosa en la hidrólisis de p-NPB.



Nota. (◆): Actividad enzimática en el sobrenadante; (■): Actividad enzimática en la suspensión. Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato 25 mM pH 7.

En la **Tabla 3** se muestran los valores de actividad obtenidos para la enzima soluble y el derivado de octil-agarosa durante el proceso de adsorción al soporte. Se observó el fenómeno de hiperactivación con un incremento en la actividad enzimática en un factor de 2 veces en comparación al extracto soluble (Bastida *et al*, 1998; Sabuquillo *et al*, 1998). Este efecto se debe posiblemente a la morfología interna del soporte, el cual se encuentra formado por agarosa altamente hidrofóbica de gran tamaño de partícula (200 μm de diámetro). Estas características 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 *et al*, 2008).

Tabla 3. Actividad específica y relativa del derivado inmovilizado octil-agarosa de QL con p-NPB.

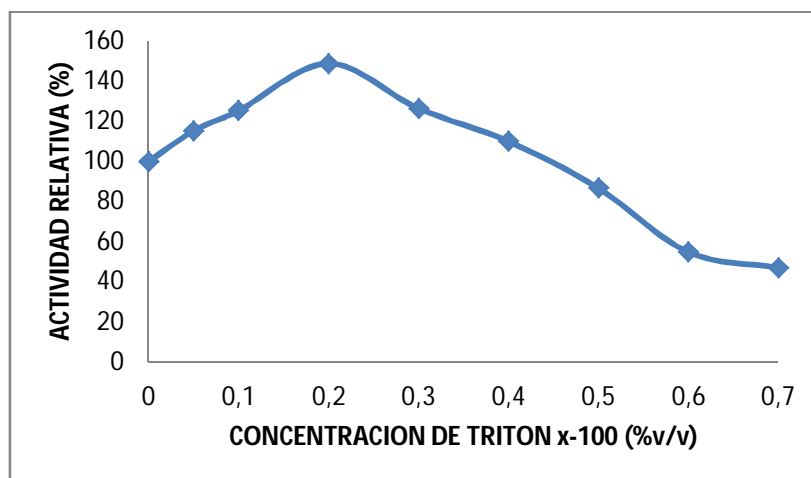
DERIVADO INMOVILIZADO	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/g)	ACTIVIDAD RELATIVA (%)
SOLUBLE-QL	174	1
OCTIL-AGAROSA-QL	350	2.01

Nota. La actividad específica se define como: ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$ de octil-agarosa). Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato 25 mM pH 7.

Desorción de QL del soporte de octil-agarosa

De acuerdo con los resultados presentados en la **Figura 27** se seleccionó una concentración de 0,2% v/v de tritón X-100 en buffer fosfato 25 mM pH 7. A esta concentración se obtuvo una máxima actividad residual de la lipasa indicando el mayor grado de desorción.

Figura 27. Efecto de la Concentración de Tritón x-100 en el proceso de Desorción de la QL.

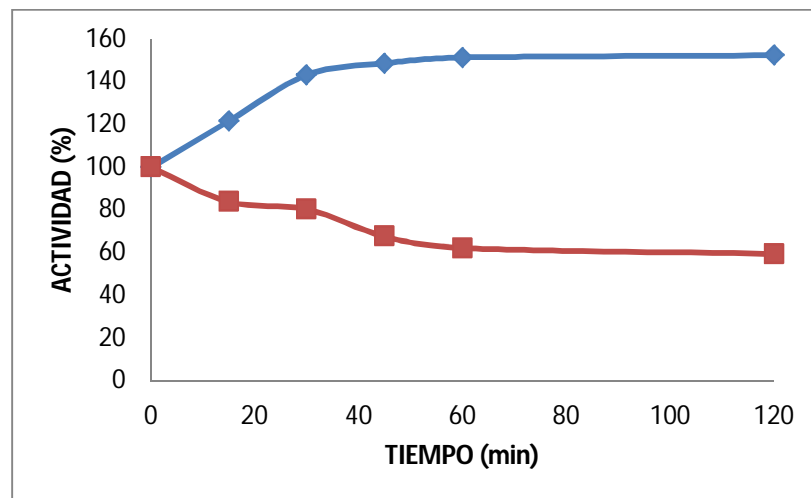


Cuando la enzima es incubada a concentraciones mayores a la establecida se observa una rápida pérdida de actividad la cual es atribuida a la disociación de los agregados diméricos debido al efecto de la concentración de detergente, lo que sugiere que estos agregados son más activos que su forma monomérica (Wilson *et al*, 2006a).

Seleccionada la concentración de Tritón (0,2% v/v) necesaria para la desorber la QL del soporte de octil-agarosa, se realizó la cinética de desorción con el propósito de completar el proceso de purificación.

La QL en presencia de tritón expresó mayor actividad en comparación al derivado inmovilizado, sin embargo, no fue posible desorber la enzima completamente del octil ya que se retuvo el 60% de la actividad expresada por el derivado durante el curso de la desorción (**Figura 28**).

Figura 28. Cinética de desorción de la QL del soporte octil-agarosa en la hidrólisis de p-NPB.



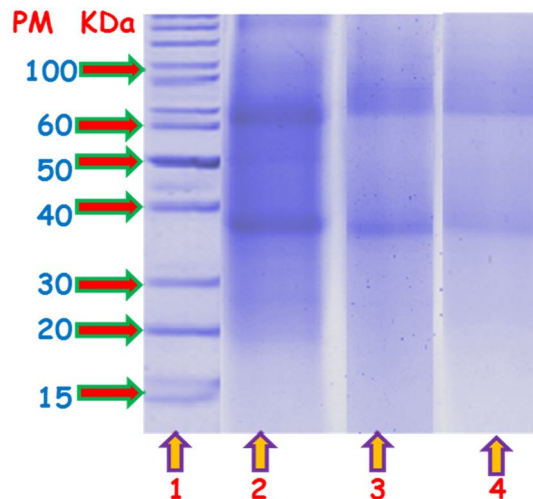
Nota. (◆): Actividad enzimática en el sobrenadante; (■): Actividad enzimática en la suspensión. Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato 25 mM pH 7.

Estos resultados indican que la QL se encuentra adsorbida fuertemente a la matriz de octil debido a las interacciones hidrofóbicas por los residuos cercanos al centro activo de la lipasa. Lo que sugiere que el lid de la lipasa QL es más grande en comparación con el de la CRL y por tanto presenta una adsorción más fuerte hacia la matriz (Wilson *et al*, 2006a). Debido a la afinidad de la QL al soporte de octil-agarosa, no fue posible purificar esta enzima por cromatografía de adsorción interfacial, lo cual se demostró posteriormente con la electroforesis.

Electroforesis SDS-PAGE de la QL

En la **Figura 29** se muestra el perfil electroforético de proteínas obtenido por SDS-PAGE de la QL purificada por cromatografía de adsorción interfacial en geles de octil-agarosa. Se puede observar que la QL se adsorbió de manera específica sobre el soporte, presentándose 2 bandas características de 36 y 70 KDa para los monómeros y dímeros de la QL respectivamente (Wilson *et al*, 2006a).

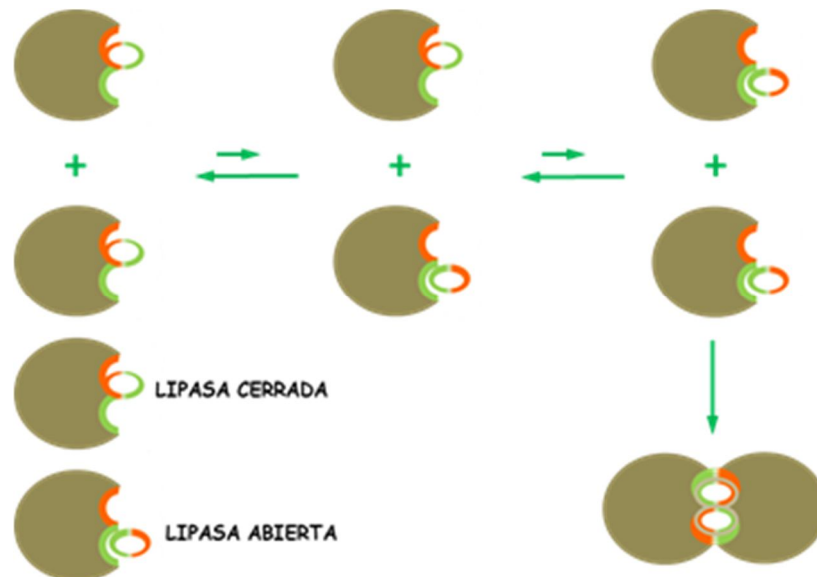
Figura 29. Electroforesis SDS-PAGE de la preparación de la lipasa de QL.



Nota: Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2. Preparación enzimática de QL. Carril 3. QL adsorbida sobre octil-agarosa. Carril 4. QL desorbida de octil-agarosa con Tritón x-100.

Los monómeros de QL exhibieron pesos moleculares mayores (36 y 70 KDa) a los que han sido encontrados en la literatura (31 KDa). Este resultado se debería a que esta enzima posee numerosos puntos de glicosilación, razón por la cual exhibe una masa molecular superior a la esperada (Anderson *et al*, 1998, Larsen *et al*, 2008). Además, se puede observar que la QL puede existir en forma dímica a pesar que fue diluida hasta 50 veces. Este comportamiento es explicado debido a la propiedades de las lipasas de autoensamblarse (**Figura 30**) a través de los residuos hidrofóbicos presentes en la cercanía del centro activo de la misma y conferido por su estructura terciaria (Palomo *et al*, 2005).

Figura 30. Mecanismo Propuesto para la Formación de Dímeros de QL

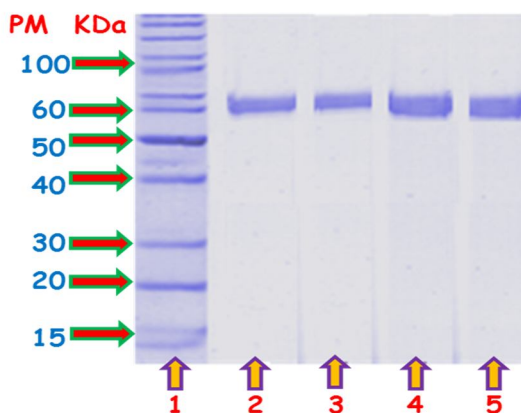


Debido a que la lipasa de *Candida rugosa* presentó una mayor actividad durante el proceso de desorción y fue purificada completamente a través de la metodología propuesta en comparación con la lipasa de *Alcaligenes sp*, la CRL fue la enzima seleccionada para realizar los posteriores ensayos experimentales.

3.3 INMOVILIZACIÓN DE CRL EN SOPORTES EPÓXIDOS MULTIFUNCIONALES

La CRL previamente purificada por cromatografía de adsorción interfacial fue inmovilizada sobre el soporte comercial Eupergit C, y los soportes heterofuncionales Eupergit C-EDA, Eupergit C-IDA y Eupergit C-IDA-Cu. Previo a la inmovilización se realizó una SDS-PAGE (**Figura 31**) para comprobar que sólo la lipasa fuera inmovilizada sobre cada uno de los soportes y garantizar que la función catalítica a analizar sería expresada por el biocatalizador.

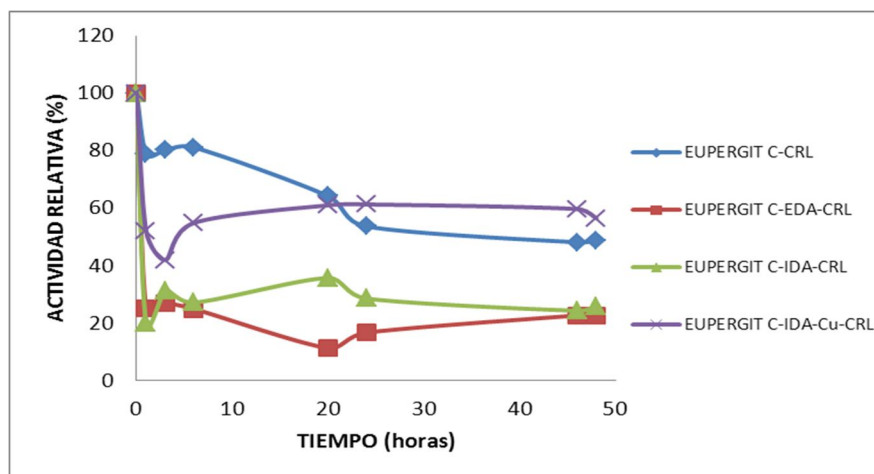
Figura 31. Electroforesis SDS-PAGE de los derivados inmovilizados de la CRL



Nota: Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2. CRL inmovilizada sobre Eupergit C. Carril 3. CRL inmovilizada sobre Eupergit C-EDA. Carril 4. CRL inmovilizada sobre Eupergit C-IDA. Carril 5. CRL inmovilizada sobre Eupergit C-IDA-Cu.

La **Figura 32** muestra los rendimientos de inmovilización de la CRL en los soportes de Eupergit C y sus modificaciones. Estos fueron obtenidos mediante el ensayo de la hidrólisis del p-NPB monitoreando la actividad de la suspensión y el sobrenadante.

Figura 32. Cinéticas de inmovilización de la CRL sobre el soporte comercial Eupergit C y los soportes epóxido heterofuncionales.



La **Tabla 4** muestra los rendimientos de inmovilización obtenidos durante el proceso de unión de la CRL a cada uno de los soportes. Cada derivado expresó diferentes valores de actividad relativa (EC= 143.8 U/ml, EC-EDA= 233.5 U/ml, EC-IDA= 221.2 U/ml y EC-IDA-Cu= 430.1 U/ml) diferente frente al p-NPB. Estos cambios son atribuidos posiblemente a la forma adoptada por la enzima durante el proceso de inmovilización o al tipo de unión ejercida cuando la lipasa interactúa con cada uno de los brazos espaciadores del soporte modificado (EDA, IDA e IDA-Cu) (Mateo *et al*, 2000a; Mateo *et al*, 2000b; Mateo *et al*, 2007b; Bolivar *et al* 2009; Barbosa *et al* 2011).

El mayor rendimiento de inmovilización se logró con el soporte de quelato de cobre el cual reacciona con los 5 residuos histidínicos de la superficie de la CRL. Debido a que la cantidad de estos residuos son pocos la inmovilización procede de forma más rápida y específica ya que ningún otro residuo aminoacídico competirá con las histidinas para la formación del enlace covalente coordinado (Mateo *et al.*, 2003b; Grazú *et al.*, 2003; Palomo *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2005). La inmovilización sobre el soporte Eupergit C exhibió buenos rendimientos de inmovilización ya que la adsorción a través de estos soportes no presenta

impedimentos estéricos por la adición de algún brazo espaciador al soporte y por tanto la inmovilización covalente se realiza de forma más efectiva con los grupos lisínicos de la superficie de la proteína. Por otra parte, la inmovilización sobre los soportes Eupergit C-EDA y Eupergit C-IDA presentaron bajos rendimiento de inmovilización debido probablemente a impedimentos estéricos y/o la repulsión de cargas ocasionados por la gran cantidad de residuos aminoacídicos (52 ácidos Aspártico y Glutámico de la enzima para el soporte EDA y 20 Lisinas de la enzima para el soporte IDA) involucrados en la formación del enlace covalente con cada uno de los soportes (Mateo *et al.*, 2000c, Mateo *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2005).

Tabla 4. Rendimiento de inmovilización de los derivados inmovilizados de CRL en los soportes epóxido multifuncionales

DERIVADO	RENDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN (%)
EUPERGIT C-CRL	48.8
EUPERGITC-EDA-CRL	22.6
EUPERGIT C-IDA-CRL	25.7
EUPERGIT C-IDA-Cu-CRL	56.5

El bajo porcentaje de actividad enzimática inmovilizada en el soporte EC-EDA, puede atribuirse a que la CRL presenta poca carga negativa bajo las condiciones utilizadas o una cantidad insuficiente de grupos epóxidos modificados del soporte Eupergit C. Cuando se usaron estos soportes multifuncionales, mediante la utilización de EC-IDA se logró la inmovilización del 25.7% de la CRL en tanto que este mismo soporte con cobre adsorbido en los grupos IDA inmovilizó un 56% de la proteína. Por tanto el primer paso (adsorción) en el proceso de inmovilización fue más efectivo cuando se usa el soporte de quelato de cobre en comparación del EC-IDA. En general, la optimización del proceso de inmovilización depende no sólo de las condiciones del proceso (los cuales fueron estudiadas en nuestro

grupo de investigación, Ariza, 2009) sino de la modificación parcial de los grupos epóxidos del soporte Eupergit C (Mateo *et al*, 2000a; Mateo *et al*, 2000b; Mateo *et al*; 2007a).

La **Tabla 5** muestra los resultados de actividad expresada por cada uno de los derivados inmovilizados los cuales fueron determinados a través de las cinéticas de inmovilización, midiendo la actividad enzimática de la suspensión y sobrenadante durante todo el proceso para cada uno de los derivados.

Tabla 5. Actividad expresada por los derivados inmovilizados en los soportes epóxido multifuncionales con p-NPB.

DERIVADO	ENZIMA INMOVILIZADA (U/g DE SOPORTE)	ACTIVIDAD EXPRESADA (%)
EUPERGIT C-CRL	109.1	42.7
EUPERGITC-EDA-CRL	75.1	8.7
EUPERGIT C-IDA-CRL	87.9	12.3
EUPERGIT C-IDA-Cu-CRL	258.1	41.9

Nota: La actividad expresada se define como: ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ biocatalizador). Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato 25 mM pH 7.

De acuerdo con los resultados presentados en la **Tabla 5**, el derivado Eupergit C-CRL expresó mayor actividad enzimática en las condiciones estudiadas en comparación con los otros derivados debido posiblemente a la conformación adoptada por la enzima sobre este tipo de soporte la cual le permite orientarse de forma que el sustrato tenga un fácil acceso al centro activo de la lipasa (Palomo *et al*, 2004b; Palomo *et al*, 2005).

Los resultados mostrados en las **Tablas 4 y 5** sugieren que la CRL puede unirse a los diferentes soportes epóxidos modificados con rendimientos de inmovilización aceptables (entre 30-50% de rendimiento, Eupergit[®] C y Eupergit[®] C-IDA-Cu)

luego de 48 horas, destacándose el derivado inmovilizado sobre el soporte Eupergit[®] C con 42,69% de actividad expresada. Con base en los resultados antes mencionados, se ha observado una reactividad diferente de la CRL al unirse a los diferentes brazos espaciadores presentes en cada uno de los soportes epóxido (EDA, IDA e IDA-Cu) durante el proceso de inmovilización. 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, los cuales son suficientemente estables como para resistir condiciones de desorción enzimáticas y permitir a la enzima permanecer ligada al soporte (Mateo *et al*, 2001; Mateo *et al.*, 2007c).

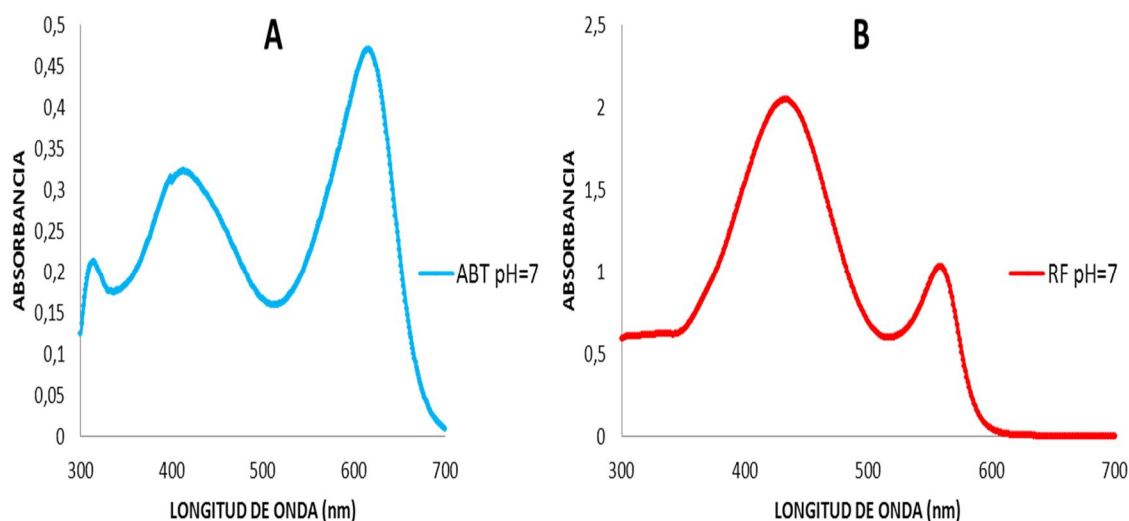
3.4 DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA COLORIMETRICA PARA EVALUAR LA HIDRÓLISIS ENANTIOSELECTIVA DEL MANDELATO DE METILO

Se desarrolló una metodología que permitió determinar la enantioselectividad del mandelato de metilo utilizando los indicadores de pH Azul de bromotimol (ABT) y Rojo de fenol (RF) como guías del curso de la reacción como una alternativa a la técnica HPLC la cual ha sido ampliamente estudiada. La metodología desarrollada tiene su aplicación en reacciones de hidrólisis ya que el ácido formado reaccionará con el indicador en el medio de reacción originando un cambio en la coloración. Para ello fue necesario identificar y seleccionar la longitud de onda de máxima absorción para cada indicador, la concentración y la cantidad de indicador sensible a los cambios de pH. Esta técnica permitió cuantificar el grado de hidrólisis del mandelato de metilo producido por los derivados inmovilizados (EC-CRL, EC-EDA-CRL, EC-IDA-CRL y EC-IDA-Cu-CRL) como medida directa del cambio en la absorbancia del complejo formado en las longitudes de onda establecidas para cada indicador. A continuación se describen los resultados obtenidos:

3.4.1 Determinación de la máxima longitud de onda de absorción de los indicadores de pH Azul de Bromotimol (ABT) y Rojo de Fenol (RF). Los indicadores de pH Azul de Bromotimol (ABT) y Rojo de Fenol (RF) absorben a longitudes de onda características en la región del ultravioleta visible y presentan picos de absorción específicos para cada una de las especies (aniónica y protonada).

La **Figura 33** muestra los espectros de absorción correspondiente a cada uno de los indicadores evaluados a pH neutro (pH=7), donde se puede observar la presencia de dos picos característicos en cada espectro. Con este ensayo preliminar se confirmó la presencia de los complejos. Sin embargo, no se puede tener certeza de cual longitud de máxima de absorción (λ_{max}) es la correspondiente a cada especie (aniónica o protonada), por lo que se hace necesario realizar ensayos específicos que permitan identificar de forma concreta la presencia de cada uno de los complejos formados.

Figura 33. Espectros de Absorción de los indicadores de pH.



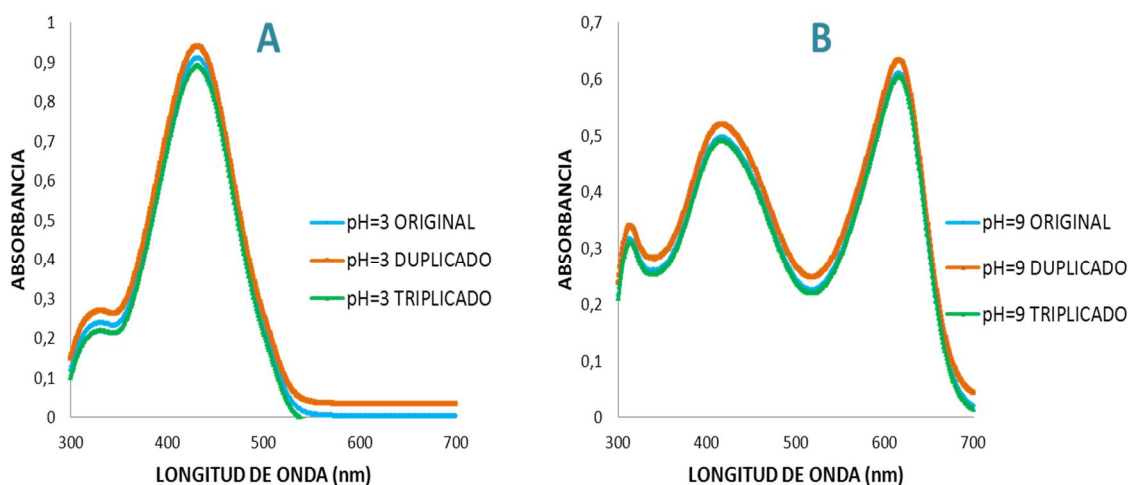
Nota: A) Azul de Bromotimol. B) Rojo de Fenol. Cada uno de los indicadores fue disuelto en buffer fosfato 25 mM pH 7.

- **Azul de Bromotimol**

Se realizaron espectros de absorción para diferentes valores de pH ácidos y básicos con el propósito de identificar los complejos formados y las λ_{\max} a las cuales absorben cada una de las especies.

La **Figura 34** muestra los espectros obtenidos para valores de pH 3 y 9, donde se observa la presencia de solo una banda característica cuando se trabajó a pH ácido la cual corresponde a la especie protonada. La formación de esta especie se ve favorecida por la influencia de la concentración de los iones hidronio los cuales desplazan el equilibrio existente entre los complejos a pH neutro hacia la formación de una única banda. Por el contrario, cuando se analizan los espectros obtenidos a condiciones básicas, se observa la absorción de 2 complejos debido a la formación de pequeñas cantidades de la especie protonada, presentando mayor absorción la banda correspondiente al complejo aniónico debido a la presencia de grupos hidroxilo en el medio de reacción (Ver en el **Anexo 5** los espectros obtenidos a los demás valores de pH estudiados).

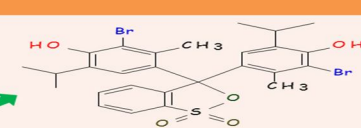
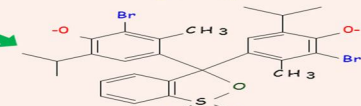
Figura 34. Espectros de absorción del Azul de Bromotimol



Nota: A) Evaluado a pH 3. B) Evaluado a pH 9.

La **Tabla 6** muestra la estructura y las longitudes de onda de máxima absorción para el ABT de los complejos formados cuando el indicador es preparado a valores de pH ácidos (433 nm) y básicos (616 nm). Como se puede observar en las figuras de la tabla, la principal diferencia entre los complejos formados se debe a la presencia de los protones que acompañan los grupos fenólicos los cuales se encuentran en posición *orto* respecto del bromo.

Tabla 6. Identificación de los complejos y longitudes de onda de máxima absorción para el ABT.

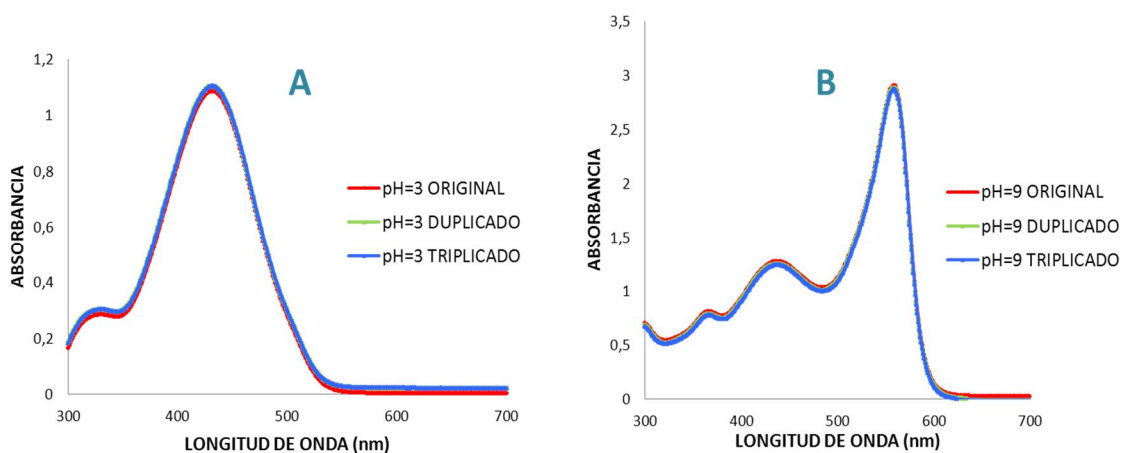
INDICADOR	COMPLEJO	λ_{MAX}	ABSORCIÓN (nm)
AZUL DE BROMOTIMOL (ABT)			433
			616

- **Rojo de Fenol**

Al igual que con el ABT, se realizaron espectros de absorción para diferentes valores de pH ácidos y básicos con el propósito de identificar los complejos formados y las λ_{max} a las cuales absorben cada una de las especies.

La **Figura 35** muestra los espectros obtenidos a valores de pH 3 y 9, donde se observa la presencia de una única banda en condiciones ácidas y de 2 bandas principales en medios básicos las cuales son formadas por la interacción del colorante con los grupos hidronio y/o hidroxilo presentes, según el pH del medio de reacción en el que se encuentre el indicador (Ver en el **Anexo 6** los espectros obtenidos a los demás valores de pH estudiados).

Figura 35. Espectros de absorción del Rojo de Fenol.



Nota: A) Evaluado a pH 3. B) Evaluado a pH 9.

La **Tabla 7** muestra la estructura y las longitudes de onda de máxima absorción para el RF de los complejos formados cuando el indicador es preparado a valores de pH ácidos (432 nm) y básicos (558 nm). Como se puede observar en las estructuras de la tabla, la principal diferencia entre los complejos formados se debe presencia de los protones que acompañan los grupos fenólicos.

Tabla 7. Identificación de los complejos y longitudes de onda de máxima absorción para el RF.

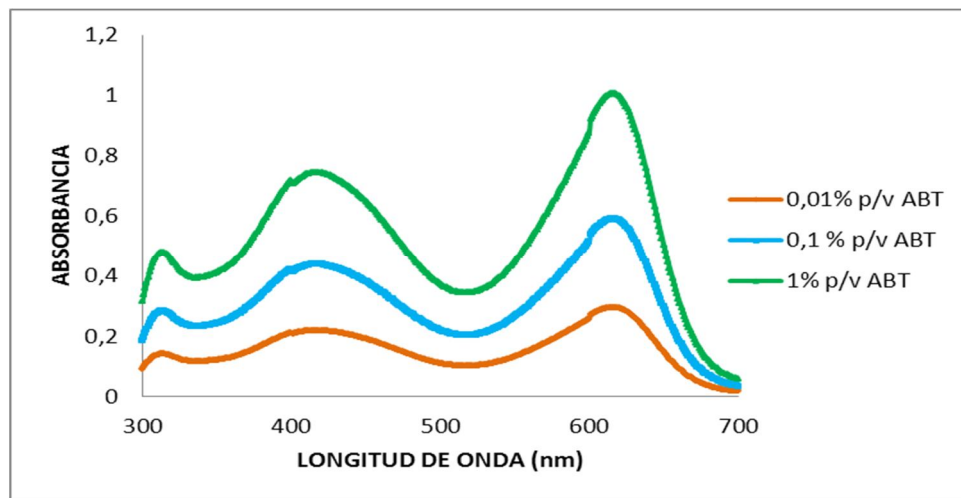
INDICADOR	COMPLEJO	λ_{MAX}	ABSORCIÓN (nm)
ROJO DE FENOL (RF)			432
			558

3.4.2 Efecto de la concentración de indicador. Se evaluó este efecto en cada colorante con el propósito de seleccionar una concentración que permitió ser sensible a los cambios producidos por la adición de ácido mandélico al medio de la reacción.

- **Azul de Bromotimol**

La **Figura 36** muestra los espectros de absorción del ABT evaluado a diferentes concentraciones de indicador. Como puede observarse en la figura las λ_{\max} correspondientes a las concentraciones de 1 y 0,1% p/v no se ven afectadas (corrimientos de sus longitudes de onda) por el incremento en la concentración. Sin embargo, a concentraciones tan bajas como 0,01% p/v se distingue un ensanchamiento de las bandas lo que ocasiona cambios en las λ_{\max} lo cual es desfavorable cuando se requieren realizar medidas cuantitativas. La concentración de 1% p/v de indicador aunque exhibe buena definición en cada una de los picos, presenta como limitación los grandes valores de absorbancia los cuales no son confiables en términos de linealidad (Ley de Beer-Lambert). Por tanto, la concentración escogida para los análisis posteriores fue la correspondiente a 0,1% p/v ya que cumple con los criterios de linealidad y detección necesarios para poder realizar las medidas.

Figura 36. Espectros de absorción del Azul de Bromotimol a diferente concentración de indicador.

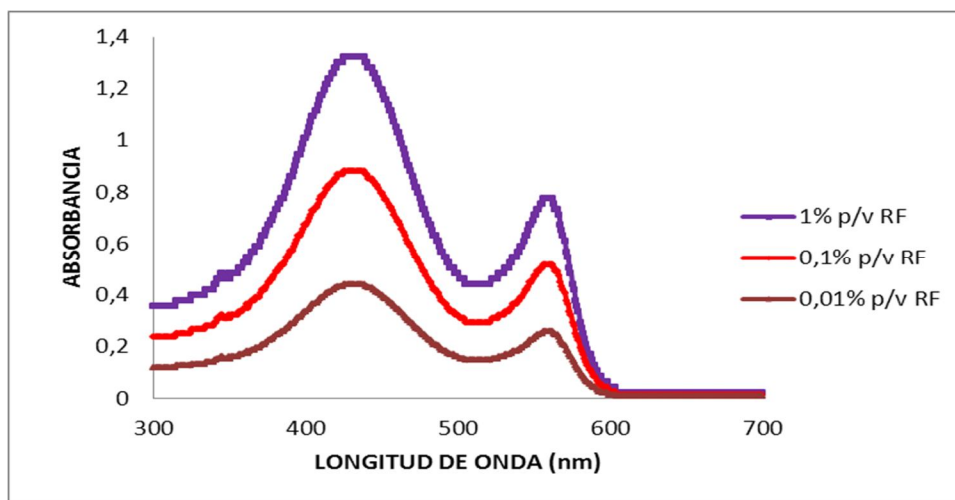


Nota: Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato 25 mM pH 7.

- **Rojo de Fenol**

La **Figura 37** muestra los espectros de absorción del RF evaluados a diferentes concentraciones de indicador (0,01%, 0,1% y 1 % p/v). Al igual que en ABT, se presenta un ensanchamiento de los picos de absorción cuando se trabaja a la menor concentración. Por tanto el criterio de selección para el RF fue similar al utilizado para el ABT. La concentración escogida para los análisis posteriores fue la correspondiente a 0,1% p/v ya que cumple con los criterios establecidos.

Figura 37. Espectros de absorción del Rojo de Fenol a diferente concentración de indicador.



Nota: Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato 25 mM pH 7.

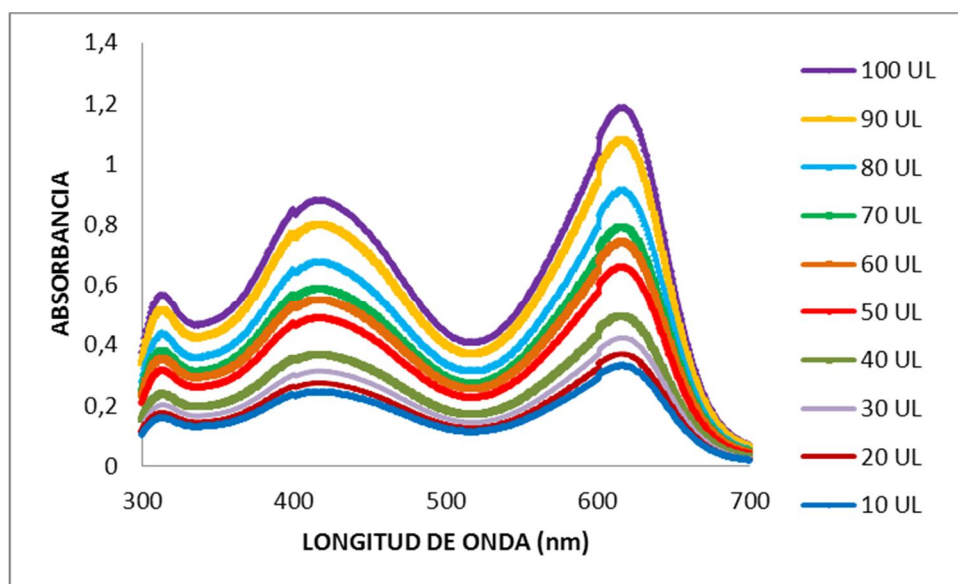
3.4.3 Efecto de la cantidad de indicador. Seleccionada la concentración de indicador, se procedió a evaluar la cantidad de indicador que se debe adicionar al medio de reacción de tal forma que permitiera monitorear de manera correcta la reacción de hidrólisis utilizando cada uno de los indicadores de pH.

- **Azul de Bromotimol**

La **Figura 38** muestra los espectros de absorción obtenidos por adición de cantidades de indicador comprendidas entre 10 y 100 μL de concentración 0,1% v/v al medio de reacción. Con cantidades comprendidas entre 50 y 100 μL se obtuvieron espectros con buena definición de cada uno de los picos correspondiente a los complejos formados, sin embargo, con cantidades mayores a 70 μL los valores de absorbancia sobrepasan los valores de linealidad establecidos (Absorbancia ≥ 0.7). Por lo tanto, sólo cantidades de indicador comprendidas entre 50 y 70 μL (0.05 a 0.07 mg de ABT) son las que se pueden emplear para realizar las medidas.

Se escogió 50 μL de indicador (0.05 mg de ABT) como la cantidad para llevar a cabo las medidas posteriores ya que con ella se pueden realizar medidas confiables, con buena resolución de los picos de absorción y manteniendo el rango de linealidad.

Figura 38. Espectros de absorción del ABT a diferentes volúmenes de indicador contenidos en el medio de reacción utilizando ABT al 0.1% p/v.



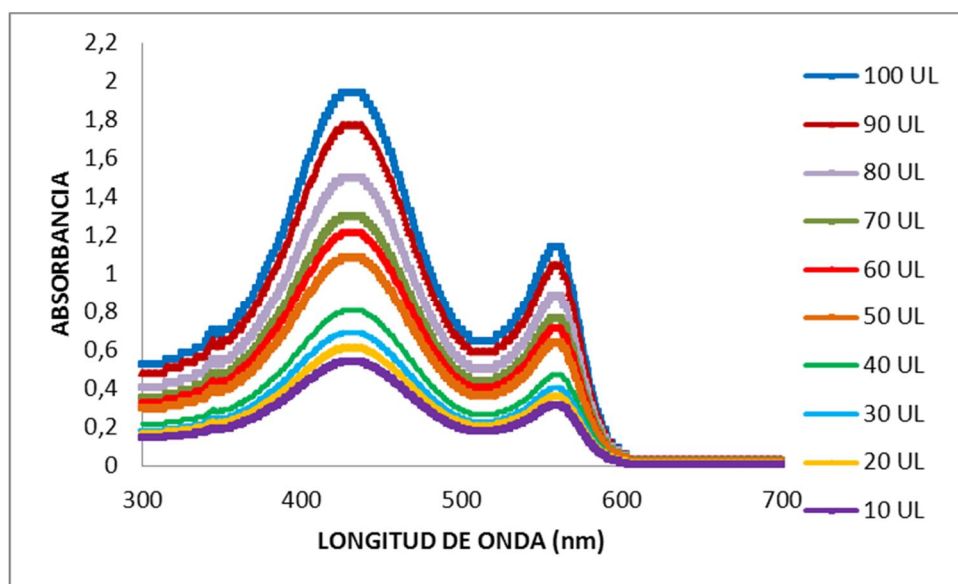
Nota: Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato 25 mM pH 7.

- **Rojo de Fenol**

La **Figura 39** muestra los espectros de absorción obtenidos por adición de cantidades de indicador comprendidas entre 10 y 100 μL de concentración 0,1% v/v al medio de reacción. A diferencia del ABT, con pequeñas cantidades del RF (10-30 μL) se obtuvieron espectros con buena definición de los 2 picos de absorción correspondiente a cada uno de los complejos formados. Sin embargo solo con cantidades comprendidas entre 10-60 μL (0.01 a 0.06 mg de ABT) son las que se pueden emplear para realizar las medidas correspondientes debido a los criterios de linealidad establecidos (Absorbancia ≥ 0.7).

Al igual que en el caso del ABT, se escogió 50 μL de indicador (0.05 mg de RF) como la cantidad para llevar a cabo las medidas posteriores ya que se con ella se pueden realizar medidas confiables, con buena resolución de los picos de absorción y manteniendo el rango de linealidad permitida en valores de absorbancia.

Figura 39. Espectros de absorción del RF a diferentes volúmenes de indicador contenidos en el medio de reacción utilizando RF al 0.1% p/v.



Nota: Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato 25 mM pH 7

3.4.4 Selección de las longitudes de onda de máxima absorción. Establecidas la concentración y cantidad de indicador a utilizar en el medio de reacción, el paso a seguir es establecer la longitud de onda a la cual se van a llevar a cabo las medidas correspondientes a la hidrólisis del mandelato de metilo.

Como se ha podido observar en los numerales anteriores, cada uno de los indicadores presenta dos λ_{max} con las cuales se podrían realizar las medidas. Con la especie protonada, (433 nm para el ABT y 433 nm para el RF) se realizaría la medida monitoreando en el tiempo el aumento en la absorbancia debido a la

formación del ácido mandélico a medida que transcurre la reacción de hidrólisis. Por otro lado, tomando como referencia la especie aniónica (616 nm para el ABT y 558 para el RF) se realizaría el seguimiento de la reacción monitoreando en el tiempo el decrecimiento en la absorbancia debido a la desaparición del mandelato de metilo en la reacción.

Cuando se requieren análisis cuantitativos del curso de la reacción es necesario medir en la longitud de máxima absorción correspondiente a la formación del producto. Esta longitud de onda debe mantenerse constante a través del tiempo para garantizar que siempre se esté analizando la formación del mismo complejo coloreado.

Teniendo presente el comentario anterior, se estudió el efecto de variar la concentración de ácido mandélico en el medio de reacción en la permanencia de las λ_{\max} del ABT y RF.

- **Azul de Bromotimol**

La **Tabla 8** muestra los valores de absorbancia obtenidos en las longitudes de máxima absorción determinadas mediante el espectro de absorción utilizando concentraciones de ácido mandélico entre 0,1 y 1 mM. El color azul corresponde al λ_{\max} para la especie protonada y el color negro λ_{\max} para la especie aniónica.

Como se puede observar en la **Tabla 8**, a medida que aumenta la concentración de ácido mandélico se produce un desplazamiento del λ_{\max} correspondiente a la especie protonada, en tanto que λ_{\max} correspondiente a la especie aniónica permanece invariante en cada una de las medidas realizadas. Debido a que en el desarrollo de esta metodología se requiere realizar medidas cuantitativas para evaluar el grado de hidrólisis de la reacción de interés, es necesario que la longitud de onda a la cual se realice la medida permanezca constante. Por tanto

se seleccionó la λ_{\max} de 616 nm para el ABT para realizar los ensayos posteriores debido a la estabilidad de esta longitud de onda en los ensayos realizados.

Tabla 8. Efecto de la concentración de ácido mandélico en λ_{\max} utilizando ABT.

ÁCIDO MANDÉLICO [mM]	λ_{\max}	ABSORCIÓN [nm]	ABSORBANCIA
0.1	616	616	0.120
		411	0.436
0.2	616	616	0.129
		412	0.432
0.3	616	616	0.135
		415	0.426
0.4	616	616	0.142
		416	0.419
0.5	616	616	0.151
		419	0.412
0.6	616	616	0.158
		420	0.406
0.7	616	616	0.167
		421	0.399
0.8	616	616	0.175
		421	0.393
0.9	616	616	0.181
		423	0.382
1	616	616	0.189
		423	0.376

Nota. Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato 25 mM pH 7.

- **Rojo de Fenol**

La **Tabla 9** muestra los valores de absorbancia obtenidos en las longitudes de máxima absorción determinadas mediante el espectro de absorción utilizando concentraciones de ácido mandélico entre 0,1 y 1 mM. El color rojo corresponde al λ_{\max} para la especie protonada y el color negro λ_{\max} para la especie aniónica.

Como se puede observar en la tabla, a medida que aumenta la concentración de ácido mandélico se produce un desplazamiento del λ_{\max} correspondiente a la especie protonada hasta concentraciones de 0,8 mM donde finalmente se estabiliza a la longitud onda, en tanto que λ_{\max} correspondiente a la especie aniónica permanece invariante en cada una de las medidas realizadas. Debido a los resultados obtenidos y a que se requiere realizar medidas cuantitativas para evaluar el grado de hidrolisis de la reacción de interés, se seleccionó la λ_{\max} de 558 nm para el RF para realizar los ensayos posteriores debido a la estabilidad de esta longitud de onda en los ensayos realizados.

Tabla 9. Efecto de la concentración de ácido mandélico en λ_{\max} utilizando RF.

ÁCIDO MANDÉLICO [mM]	λ_{\max}	ABSORCIÓN [nm]	ABSORBANCIA
0.1	558	0.486	
	424	0.147	
0.2	558	0.480	
	426	0.156	
0.3	558	0.476	
	428	0.163	
0.4	558	0.469	
	430	0.169	
0.5	558	0.464	
	431	0.176	
0.6	558	0.452	
	432	0.184	
0.7	558	0.443	
	432	0.195	
0.8	558	0.437	
	432	0.203	
0.9	558	0.429	
	433	0.213	
1	558	0.422	
	433	0.220	

Nota: Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato 25 mM pH 7.

Se escogieron las λ_{\max} de 616 nm para el ABT y 558 nm para el RF correspondientes a la absorción de cada una de las especies aniónicas para cada indicador (ABT y RF), como guías del curso de las reacciones que se llevaron a cabo en los ensayos posteriores.

La cuantificación del grado de hidrólisis de los enantiómeros puros del mandelato de metilo catalizada por los derivados inmovilizados de CRL, fueron evaluados como el descenso en la absorbancia medido a las λ_{\max} establecidas ocasionado por la formación de ácido mandélico (o la desaparición del mandelato de metilo) en la reacción.

3.5 EVALUACIÓN DE LA HIDROLISIS ENANTIOSELECTIVA DEL MANDELATO DE METILO UTILIZANDO LA METODOLOGÍA COLORIMÉTRICA

3.5.1 Efecto de la carga de biocatalizador sobre la velocidad de reacción. El efecto de la cantidad de catalizador fue estudiado en el rango de 10-40 mg de los derivados inmovilizados en los soportes de Eupergit y sus modificaciones (EC-CRL, EDA-CRL, EC-IDA-CRL y EC-IDA-Cu-CRL) utilizando como sustrato modelo (R/S)-Mandelato de Metilo. La importancia de este estudio radica en la influencia de la carga enzimática ya que es un factor crucial para incrementar la eficiencia de una reacción catalizada por enzimas (Bai *et al.*, 2005).

Los ensayos fueron realizados utilizando cada uno de los indicadores de pH a continuación se muestran los resultados obtenidos.

En la **Tabla 10** se muestran las conversiones obtenidas con cada uno de los derivados de CRL utilizando diferentes cantidades de biocatalizador (10, 20 y 40 mg) trabajando a un tiempo fijo de 4 horas. El derivado con el que se alcanzó menores conversiones (7.6% y 7.9% utilizando ABT y RF respectivamente) fue el Eupergit C-IDA-Cu-CRL (10 mg de biocatalizador) en tanto que el derivado con el

que se alcanzó la mayor conversión (44.2% y 45.3 utilizando ABT y RF respectivamente) fue el Eupergit C-EDA-CRL (40 mg de biocatalizador).

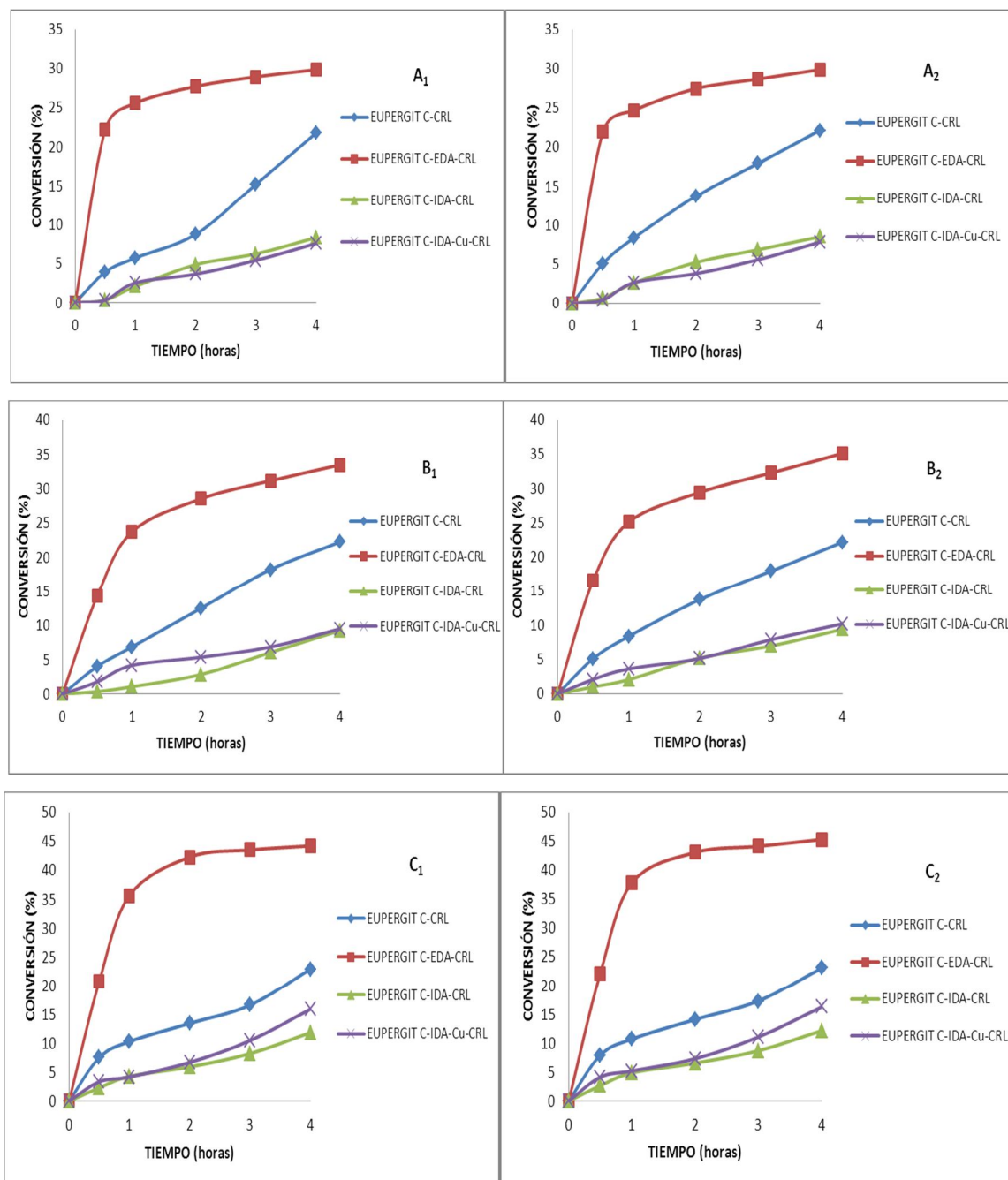
Tabla 10. Conversión del (RS)-Mandelato de Metilo utilizando los derivados de CRL con los indicadores de pH ABT y RF.

DERIVADO	CANTIDAD DE BIOCATALIZADOR (mg)	ABT	RF
		CONVERSIÓN (%)	CONVERSIÓN (%)
EUPERGIT C-CRL	10	21.8	22.2
	20	22.2	22.2
	40	23.2	23.1
EUPERGIT C-EDA-CRL	10	29.8	29.9
	20	33.5	35.2
	40	44.2	45.3
EUPERGIT C-IDA-CRL	10	8.4	8.6
	20	9.3	9.4
	40	11.9	12.2
EUPERGIT C-IDA-Cu-CRL	10	7.6	7.9
	20	9.5	10.2
	40	15.9	16.3

Nota: Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato 25 mM pH 7 durante 4 horas de reacción.

Como se observa en la **Tabla 10**, se obtuvieron valores de conversión del (R/S)-mandelato de metilo muy similares utilizando los dos indicadores. El derivado EC-IDA-CRL fue el más selectivo debido posiblemente a la competencia entre cada enantiómero por ingresar al centro activo de la enzima (Uwe *et al*, 2005). En tanto que el derivado EC-EDA-CRL fue el menos selectivo debido a la gran velocidad a la que convierte los sustratos en productos. (Fernandez-Lorente *et al*, 2001).

Figura 40 Efecto de la cantidad de biocatalizador en la conversión de (RS)-mandelato de metilo utilizando Azul de Bromotimol (ABT) y Rojo de Fenol (RF).



Nota: A₁) 10 mg de biocatalizador con ABT. A₂) 10 mg de biocatalizador con RF B₁). 20 mg de biocatalizador con ABT. B₂). 20 mg de biocatalizador con RF C₁) 40 mg de biocatalizador con ABT. C₂) 40 mg de biocatalizador con RF. Las reacciones se llevaron a cabo a 25°C en buffer fosfato de potasio 25mM pH 7 y 0,03 mmol de mandelato de metilo.

La **Figura 40** demuestra que al aumentar la cantidad de catalizador incrementó la velocidad de reacción obteniendo una conversión máxima de 12, 16, 23 y 44% de (R/S)-Mandelato de Metilo a 4 horas de reacción utilizando 40 mg de EC-IDA-CRL, EC-IDA-Cu-CRL EC-CRL, y EC-EDA-CRL respectivamente, utilizando ABT y RF. El aumento de la velocidad de reacción con la cantidad de catalizador indica que la reacción está cinéticamente controlada (Illanes y Fajardo, 2001).

Utilizando cantidades de biocatalizador de 20-40 mg se promueve un aumento en la conversión de solo un 10%. El resultado indica que se estarían produciendo limitaciones de transferencia de masa, las cuales serían ocasionadas al utilizar una cantidad de catalizador mayor de 20 mg.

Los resultados obtenidos determinaron la cantidad de biocatalizador (20 mg) a utilizar para la evaluación enantioselectiva del (R/S)-Mandelato de Metilo utilizando los enantiómeros puros (R y S) mediante el desarrollo de la técnica colorimétrica implementada utilizando los indicadores de pH.

3.5.2 Enantioselectividad de los derivados inmovilizados de CRL catalizando la hidrólisis de los enantiómeros R y S del Mandelato de metilo. La enantioselectividad es la propiedad catalítica más importante de las lipasas en síntesis asimétrica. En este sentido, se evaluó la enantioselectividad de los diferentes derivados inmovilizados de CRL sobre la reacción de hidrólisis de los enantiómeros puros del mandelato de metilo mediante la utilización de la metodología colorimétrica.

Las **Tablas 11 y 12** muestran los resultados de enantioselectividad obtenidos con los derivados inmovilizados utilizando los indicadores de pH ABT y RF. Se determinaron las velocidades iniciales de cada uno de los enantiómeros a través de las curvas de concentración vs absorbancia para calcular la relación

enantiomérica (E) a través de la ecuación propuesta por Straathof y Jonjean en 1997.

Tabla 11. Enantioselectividad de los derivados inmovilizados de CRL en la hidrólisis de los enantiómeros R y S del mandelato de metilo a 25°C utilizando ABT.

DERIVADO	ENANTIOPREFERENCIA (EP)	CONVERSIÓN (%)	TIEMPO (h)	ee _p (%)	E	V _{TRANSFORMACIÓN} (μmol/min)
EUPERGIT C-CRL	S	20.7	7	46	7	0.015
EUPERGIT C-EDA-CRL	S	30.7	6	51	4	0.025
EUPERGIT C-IDA-CRL	S	22.5	4	74	16	0.028
EUPERGIT C-IDA-Cu-CRL	S	21.2	8	83	12	0.013

Nota: ee_p= exceso enantiomérico del producto alrededor del 20-30% de conversión; E= enantioselectividad.

Tabla 12. Enantioselectividad de los derivados inmovilizados de CRL en la hidrólisis de los enantiómeros R y S del mandelato de metilo a 25°C utilizando RF.

DERIVADO	ENANTIOPREFERENCIA (EP)	CONVERSIÓN (%)	TIEMPO (h)	ee _p (%)	E	V _{TRANSFORMACIÓN} (μmol/min)
EUPERGIT C-CRL	S	22.2	7	46	7	0.016
EUPERGIT C-EDA-CRL	S	32.3	6	51	4	0.027
EUPERGIT C-IDA-CRL	S	23.2	4	74	16	0.029
EUPERGIT C-IDA-Cu-CRL	S	22.3	8	83	12	0.014

Nota: ee_p= exceso enantiomérico del producto alrededor del 20-30% de conversión; E= enantioselectividad.

Los resultados en las **Tablas 11 y 12** muestran pequeñas diferencias en el grado de conversión obtenido con cada indicador, utilizando un mismo derivado inmovilizado de CRL. Estos cambios son atribuidos posiblemente a la velocidad de formación de cada uno de los complejos en el medio de reacción, ya que cada indicador posee un valor de pK_a diferente (7.2 y 8 para el ABT y RF respectivamente) lo que origina que usando RF estas variaciones sean más marcadas debido que presenta velocidad de formación de la especie protonada más lenta en comparación con el ABT.

Por otro lado, los valores de enantioselectividad (E) son los mismos utilizando los dos indicadores, respectivamente para cada derivado. Debido a que E es una relación entre las velocidades iniciales de cada uno de los enantiómeros, los cambios en las conversiones se mantienen en proporciones similares que permiten obtener el mismo valor para cada uno de los casos.

Los resultados obtenidos mostraron que los derivados inmovilizados de CRL sobre los soportes multifuncionales de Eupergit C tenían una elevada preferencia enantiomérica hacia el enantiómero S en las condiciones de pH 7 y 25°C. El derivado Eupergit C-IDA-CRL fue el más enantioselectivo (E=16) seguido del derivado Eupergit C-IDA-Cu-CRL (E=12), mientras el valor de E más bajo se obtuvo con el derivado Eupergit C-EDA-CRL (E=4).

El derivado inmovilizado en Eupergit C-EDA expresó una alta velocidad de conversión al correspondiente producto en comparación a los demás derivados (30.7% y 32.3% para ABT y RF respectivamente) en tan solo 4 horas de transcurso de la reacción de hidrólisis del Mandelato de metilo. Sin embargo, esta elevada conversión contrasta con los bajos valores obtenidos para la razón enantiomérica (E=4), el cual fue significativamente menor a los obtenidos para el derivado inmovilizado de CRL en Eupergit C-IDA (E=16).

Los diferentes valores obtenidos de E 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 *et al.*, 1998; Palomo *et al*, 2002a; Palomo *et al*, 2005; Mateo *et al.*, 2007c).

Finalmente, todos los derivados inmovilizados Eupergit C, Eupergit C-EDA Eupergit C-IDA y EC-IDA-Cu mostraron razones enantioméricas bajas lo cual puede ser explicado en términos de las diferentes orientaciones que tomaría la enzima sobre la superficie de los soportes o debido a la enantioselectividad limitada de la CRL sobre el sustrato estudiado (Mateo *et al*, 2007b). Dichas orientaciones distorsionan la enzima llevándola a una conformación desfavorable, debido probablemente a severos efectos estéricos entre el anillo fenílico del mandelato de metilo y la proteína inmovilizada, lo que impediría el acceso del sustrato al intermediario tetrahedral acilado de la enzima (Ema, 2004).

4. CONCLUSIONES

La cromatografía de adsorción interfacial es una técnica eficiente para la purificación de la CRL en un solo paso, tal como ha sido demostrado para otras lipasas. Sin embargo en el caso de la QL no es posible la desorción de la enzima a partir del soporte de octil-agarosa.

El efecto de diferentes concentraciones de Tritón X-100 sobre CRL conllevó a una hiperactivación de la actividad enzimática de 7 veces. Esto permitió concluir que incluso a moderadas concentraciones de proteína, las lipasas en solución presentan fuerte tendencia a auto asociarse, dando una mezcla de estructuras diméricas y monoméricas que pueden complicar la caracterización de las propiedades intrínsecas de la molécula de la lipasa soluble.

La inmovilización de la CRL en diferentes soportes epóxidos multifuncionales permitió obtener diferentes grados de hidrólisis frente al p-NPB y el Mandelato de metilo, demostrando una vez más la posibilidad de modulación de las propiedades catalíticas de la enzima mediante la ingeniería del derivado.

La técnica colorimétrica basada en el uso de los indicadores de pH ABT y RF es una metodología que permite evaluar la enantioselectividad de los derivados inmovilizados.

Los resultados obtenidos en este trabajo han demostrado la fuerte influencia del tipo de derivado inmovilizado en la resolución cinética del Mandelato de metilo para el cual se encontraron relaciones enantioméricas (E) diferentes (EC-CRL=7; EC-EDA-CRL=4, EC-IDA-CRL=16 y EC-IDA-Cu-CRL=12) para cada uno de los derivados inmovilizados.

El derivado inmovilizado Eupergit[®] C –IDA-CRL fue el más eficiente entre todos los estudiados, presentando alta actividad y estabilidad en la reacción de hidrólisis del pNPB y la mayor enantioselectividad ($E > 16$) en la reacción de hidrólisis del Mandelato de metilo.

5. RECOMENDACIONES

Se recomienda la implementación de una metodología que permita la purificación total de la QL para poder inmovilizar la enzima a través de diferentes estrategias, que le confieran a la enzima mayor estabilidad además de propiedades biocatalíticas diferentes que le permita ser implementada como un biocatalizador de uso industrial.

Se recomienda realizar un estudio de las mejores condiciones de inmovilización (pH, fuerza iónica, grado de modificación del soporte entre otros) para la lipasa de *Candida Rugosa* (CRL) utilizando cada uno de los soportes modificados, con el propósito de mejorar el rendimiento de inmovilización y promover un aumento en las propiedades biocatalíticas de interés como lo son la actividad y enantioselectividad

Se recomienda realizar un estudio comparativo de los resultados obtenidos mediante la técnica colorimétrica desarrollada y una técnica analítica de alta eficiencia, con el propósito de validar la metodología establecida para el desarrollo de este trabajo.

Se recomienda encontrar las condiciones óptimas de trabajo de la técnica colorimétrica investigada para su implementación general en las reacciones de hidrólisis catalizada por lipasas.

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.

BIBLIOGRAFIA

Anderson, E.M., Larsson, K.M., Kirk, O. (1998). One Biocatalyst - Many Applications: The Use of *Candida antarctica* B-lipase in Organic Synthesis. *Biocatal. Biotransfor.* 16, 181-204.

Ariza, C., Torres, R. and Ortiz, C. (2009). Desarrollo de nuevos soportes epóxido multifuncionales para la inmovilización de *Candida antarctica* B. resolución cinética de (±) propranolol. Tesis de Pregrado. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias.

Ariens, E.J. (1988). Promiscuity in pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 9, 235.

Ario, E.J. B., Bakar. A., and Pleiss, J. (2004). Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: the role of organic solvent. *J. Mol Model.* 10, 358–366.

Armisen, P., Mateo, C., Cortes, E., Barredo, J. L., Salto, F., Diez, B., Rodes, L., Garcia, J. L., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J. M. (1999). Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acylase on tailormade metal chelate supports. *J. Chromatogr. A.* 848, 61-70.

Arroyo, M., Sinisterra, J. V. (1994). High Enantioselective Esterification of 2-Arylpropionic Acids Catalyzed by Immobilized Lipase from *Candida antarctica*: A Mechanistic Approach. *J. Org. Chem.* 59, 4410–4417.

Arroyo, M., Sinisterra, J. (1995). Síntesis de ácidos 2-aril-propiónicos homoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas. Tesis Doctoral. Madrid. Universidad Complutense. Facultad de Farmacia.

Arroyo, M., Sánchez-Montero, J.M., Sinisterra J.V. (1998). Stabilization of lipase B from *Candida antarctica* by immobilization on different supports. *Progr. Biotechnol.* 15, 565-570

Arroyo, M. (1999). Immobilized enzymes: theory, methods of study and applications. *Ars pharmaceutica.* 39, 2, 23-39.

Bai, S., Guo, Z., Liu, W. and Sun, Y. (2005). Resolution of (\pm)-menthol by immobilized *Candida rugosa* lipase on superparamagnetic nanoparticles. *Food Chem.* 96, 1-7.

Basri, M., Ampon. K., Yunus, W.M.Z., Razak, C.N.A. and Salleh, A.B. (1995). Enzymatic synthesis of fatty esters by hydrophobic lipase derivatives immobilized on organic polymer beads. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 72, 4, 407-411.

Barbosa, O., Torres, R. and Ortiz, C. (2009). Resolución cinética de (R/S)-Propranolol y (R/S)-Atenolol vía reacciones de acetilación mediante la utilización de lipasas inmovilizadas. Tesis de Maestría. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias.

Barbosa, O., Ariza, C., Ortiz, C., and Torres, R. (2010). Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphtoxy)-2-propranolol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B). *New. Biotechnol.* 27,844-850.

Barbosa, O., Ortiz, C., Torres, R., and Fernandez-Lafuente, R. (2011). Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* in organic media: Enantiospecific production of atenolol acetate. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 71, 124-132.

Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen. P., Fernández-Lafuente, R., Huguet. J, and Guisán. J.M. (1998). A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 5, 486-493.

Basri, M.; Ampon, K.; Yunus, W.M.Z.; Razak, C.N.A.; Salleh, A.B. (1995). Enzymatic synthesis of fatty esters by hydrophobic lipase derivatives immobilized on organic polymer beads. *J Am. Oil. Chem. Soc.*, 72, 407-411.

Bauer-Arnaz, K., Napolitano, E., Roberts, D., Montali, J., Hughes, B., Schmidt, D. (1998). Salt-induced immobilization of small affinity ligands on an epoxide activated affinity support. *J Chromatogr A.* 803, 73–82.

Benevides, P., Dellamora-Ortiz, G., Betancor, L., Fuentes, M., Guisán, J. M., Fernandez-Lafuente, R. (2007). Modulation of the catalytic properties of multimeric β -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 310-315.

Berezin, I.V.; Klibanov, A.M.; Martinek, K. (1975). Kinetic-thermodynamic aspects of catalysis by immobilized enzymes. *Russ. Chem. Rev.* 44, 17-47.

Bolivar, J., Mateo, C., Godoy, C., Pessela, B., Rodrigues, D., Giordano, R., Fernández-Lafuente, R., Guisan, J.M. (2009). The Co-operative Effect of Physical and Covalent Protein Adsorption on Heterofunctional Supports. *Process Biochem.* 44, 757-763.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Anal Biochem.* 76, 248.

Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E. Dodson, G. (1990). A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. *Nature*. 343, 767-770.

Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S. Derewenda, U., Dodson, G. Lawson, D.M. (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*. 351, 491-494.

Cabrera, Z., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J. M., Guisan, J. M. (2009). Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *J. Mol. Catal. B-Enzym*. 57, 171-176.

Cabrera, Z., Gutarra, M., Guisan, J. M., Palomo, J. M. (2010). Highly enantioselective biocatalysts by coating immobilized lipases with polyethyleneimine. *Catal. Commun*. 11, 964-967.

Cai, X., Wang, N., Lin, X. (2006). The preparation of polymerizable, optically active non-steroidal anti-inflammatory drugs derivatives by irreversible enzymatic methods. *J. Mol. Catal. B-Enzym*. 40, 51-57

Cao, L., Van Langen, L. Sheldon, R. (2004). Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier free? *Curr. Opin. Biotech*. 14, 387-394.

Chen, C.S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G. And Sih, C. (1982). General Aspects and Optimization of Enantioselective Biocatalysis. In *Organic Solvents: The Use of Lipases*. *J Am. Chem. Soc*. 104, 7294–7299.

Cygler, M., Grochulski, P., Kazlauskas, R., Schrag, J., Bouthillier, F., Rubin, B., Serreqi, A., Gupta, A. (1994). A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases. *J Am. Chem. Soc.* 116, 3180-3186.

Cygler, M., Schrag, J.D. (1999). Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. *BBA-Mol. Cell. Biol. L.* 1441, 205-214.

Derewenda Z.S., Derewenda, U. Dodson G.G. (1992a). The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 227, 818-839.

Derewenda, U., Brzozowski, A., Lawson, D. Derewenda, and Z.S. (1992b). Catalysis at the interface: the anatomy of conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry-U.S.* 31, 1532-1541.

Domínguez de María, P., Sánchez-Montero, J. M., Sinisterra, J. V., Alcántara, A. R. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnol. Adv.* 24, 180-196.

Ducret, A., Trani, M. and Lortie, R. (1998). Lipase-catalysed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity. *Enzyme Microb. Tech.* 22, 212–216.

Ema, T. (2004). Rational strategies for highly enantioselective lipase-catalyzed kinetic resolutions of very bulky chiral compounds: substrate design and high-temperature biocatalysis. *Tetrahedron-Asymmetr.* 15, 2765–2770.

Escorcía, 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.

Fernandez-Lafuente, R., Rosell. C. M., Rodriguez, V., Santana, C., Soler, G., Bastida, A. Guisan, J. M. **(1993)**. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilisation via the carboxyl coupling method. *Enzyme Microb. Tech.* 15, 546-550.

Fernández-Lafuente, R., Rodríguez, V. Guisán, J. **(1998)**. The coimmobilization of D-amino acid oxidase and cabalase enables the quantitative transformation of D-amino acids (D-phenylalanine) into α -keto acids (phenypyruvic acid). *Enzyme Microb. Tech.* 23, 28-33.

Fernandez-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Mateo, C., Bastida, A., Coca, A., Haramboure, T., Hernández-Justiz, O., Terreni, M., Guisán, J.M. **(2001)**. Biocatalyst engineering exerts a dramatic effect on selectivity of hydrolysis catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium. *J Mol. Catal. B-Enzym.* 11, 649-656.

Fernández-Lorente, G., Ortiz, C., Segura, R. L., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M., Palomo, J. M. **(2005)**. Purification of different lipases from *Aspergillus niger* by using a highly selective adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol. Bioeng.* 92, 773–779.

Fernández-Lorente, G., Palomo, J.M., Cabrera, Z., Guisán, J.M. Fernández-Lafuente, R. **(2007)**. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. *Enzyme Microb. Tech.* 41, 565–569.

Fernandez-Lorente, G., Cabrera, Z., Godoy, G., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J.M. Guisan, and J.M. (2008). Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. *Process. Biochem.* 43, 1061-1067.

Gianfreda, L., Scarfi, M. R. (1991). Enzyme stabilization: state of the art. *Mol Cell Biochem.* 100. 97-128.

Ghanem, A., Hassan, and., Aboul-Enein. (2004). Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron-Asymmetr.* 15, 3331-3351.

Goldstein, L. (1976). Kinetic behaviour of immobilized enzyme systems. *Methods Enzymol.* 44: 397-443.

González-Sabin, J.; Gotor, V.; Rebolledo, F. (2004). CAL-B-catalyzed resolution of some pharmacologically interesting-substituted isopropylamines. *Tetrahedron-Asymmetr.* 13, 1315–1320.

Grazú, V., Ovsejevi, K., Cuadra, K., Betancor, L., Manta, C. Batista-Viera, F. (2003). Solid phase reducing agents as alternative for reducing disulfide bonds in proteins. *Appl. Biochem. Biotech.* 110, 23-32.

Grochulsky, P., Li, Y., Schrng, J.D., Bouthillier, F., Smith, P. Harrinson, D. (1993). Insights into interfacial activation from an open structure of *candida rugosa* lipase. *J Biol. Chem.* 268, 12843-12847.

Grognux, J., Wahler, D., Nyfeler, E., Reymond, J. (2004). Universal chromogenic substrates for lipases and esterases. *Tetrahedron-Asymmetr.* Volume 15, 2981-2989.

Guisan, J.M., Sabuquillo, P., Fernandez-Lafuente, R., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Halling, P.J., Kennedy, D., Miyata, E., Re, D. (2001). Preparation of new lipases derivatives with high activity–stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 11, 817-824.

Guisan, J.M. (2006). Immobilization of enzymes and cells. *Methods and Biotechnology*, second edition.

Gupta, M. N. (1991). Thermostabilization of proteins. *Biotechnol Appl. Biochem.* 14, 1-11.

Hartmeier, W. (1985). Immobilized biocatalysts: from simple to complex systems. *Trends Biotechnol.* 3, 149-153.

Hartmeier, W. (1988). Immobilized biocatalyst. An introduction. Springer-Verlag., New York. 22-48 y 82-115.

Helistö, P., and Korpela, T. (1998). Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. *Enzyme. Microb. Tech.* 23, 113-117.

Illanes, A. *Biología de Enzimas. Serie de monografías científicas.* Organización de los Estados Americanos. Washington D. C. Ediciones Universitarias de Valparaíso. Valparaíso. 8-12 pp.

Illanes, A., Fajardo, A. (2001). Kinetically controlled synthesis of ampicillin with immobilized penicillin acylase in the presence of organic cosolvents. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 11, 587-595.

Jaeger, K., Schneidinger B, Rosenau F, Werner M, Lang D, Dijkstra B, Schimossek K, Zonta A, Reetz M. (1997). Bacterial lipases for biotechnological applications. J. Mol. Catal. B-Enzym., 3, 3-12.

Jensen, R. G., Galluzzo, D. R., Bush, V. J. (1990). Selectivity is an Important Characteristic of Lipases (Acylglycerol Hydrolases). Biocatal. Biotransfor. 3, 307-316.

Katchalski, E., Silman, I.; Goldman, R. (1971). Effect of the microenvironment on the mode of action of immobilized enzymes. Adv. Enzymol. 34: 445-536.

Kato, Y., Fujiwara, I., Asano, Y. (1999). A novel method for preparation of optically active α -monobenzoyl glycerol via lipase-catalyzed asymmetric transesterification of glycerol. Bioorg. Med. Chem. Lett. 9, 3207-3210.

Kazlauskas, R.J., Weissfloch, A.N., Rappaport, A.T. Cuccia, L.A. (1991). 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*. J Org. Chem. 56, 2656-2665.

Kazlauskas, J. (1994). Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: Prospects for predicting and engineering catalytic properties. Trends Biotechnol. 12, 464-472.

Kim, M.G., Lee, E.G., Chung, B.H. (2000). Improved enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase towards ketoprofen ethyl ester by a simple two-step treatment. Process. Biochem. 35, 977-982.

Klibanov, A. M. A. M. (1983). Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. Science. 219, 722-727.

Koeller, K.M., Wong, C.H. (2001). Enzymes for chemical synthesis. *Nature*. 409, 232-240.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.

Larsen, M., Bornscheuer, U. Hu, K. (2008). Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems". *Protein. Expres. Purif.* 62, 90-97.

Laval, G., Audran, A., Sanchez, S., Monti, H. (1999). Enantiospecific total synthesis of both enantiomers of laurene by a chemical diastereoselection/lipase-catalyzed kinetic resolution sequence. *Tetrahedron-Asymmetr.* 10, 1927-1933.

Lee, E.G., Won, H.S., Chung, B.H. (2001). Enantioselective hydrolysis of racemic naproxen methyl ester by two-step acetone-treated *Candida rugosa* lipase. *Process. Biochem.* Volume 37, 293-298.

Lundell, K., Raijola, T., Kanerva, L. (1998). Enantioselectivity of *Pseudomonas cepacia* and *Candida rugosa* lipases for the resolution of secondary alcohols: The effect of *Candida rugosa* isoenzymes. *Enzyme. Microb. Tech.* 22, 86-93.

Margolin, A.L. (1993). Enzymes in the synthesis of chiral drugs. *Enzyme. Microb. Tech.* 15, 266–280.

Martinek, K.; Mozhaev, V.V. (1987). Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry. *Adv. Enzymol.* 57, 179-249.

Martinek, K., Klibanov, A. M., Goldmacher, V. S., Berezin, I. V. (1977). The principles of enzyme stabilization. I. Increase in thermostability of enzymes

covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multipoint fashion. *Biochim Biophys Acta*. 485, 1-12

Mateo, C., Fernández-Lorente, G. Abian, O. Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M. **(2000a)**. Multifunctional epoxy-supports. A new tool to improve the covalent immobilization of proteins: the promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules*. 1, 739-745.

Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R. Guisán, J.M. **(2000b)**. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme. Microb. Tech.* 26, 509-515.

Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R. Guisan, and J.M. **(2000c)**. Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnol. Bioeng.* 68, 98-105.

Mateo, C.; Fernández-Lorente, G.; Cortés, E.; Garcia, J.L.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, J .M. **(2001)**. One-Step Purification, Covalent Immobilization, and Additional Stabilization of Poly-His-Tagged Proteins Using Novel Heterofunctional Chelate-Epoxy Supports. *Biotechnol. Bioeng.* 76, 3, 269-276

Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lorente, G., Pedroche, J., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Tam, A. Daminati, M. **(2002)**. Epoxy Sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnol. Progr.* 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. (2003). Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method. *Biomacromolecules*, 4, 772-777.

Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lorente, G., Pessela, B.C.C., Grazu, V., Guisan, J.M. Roberto Fernandez-Lafuente, R. (2006). Immobilization–Stabilization of Enzymes by Multipoint Covalent Attachment on Supports Activated With Epoxy Groups. *Immobilization of Enzymes and Cells; 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. (2007a). Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nat. Protoc.* 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. (2007b). Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization–stabilization. *Biochem. Soc. T.* 35, 1593-1601.

Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente, R. (2007c). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme. Microb. Tech.* 40,1451-1463

Miled, N., Beisson, F., de Caro, J., de Caro, A., Arondel, V. Verger, R. (2001). Interfacial catalysis by lipases. *J. B-Enzym.* 11, 279-286.

Miled, N., Riviere, M., Cavalier, J.F., Buono, G., Berti, L. Verger, R. (2005). Discrimination between closed and open forms of lipases using electrophoretic techniques. *Anal. Biochem.* 338, 171–178.

Montes, T., Grazu, V., López-Gallego, F., Hermoso, J. A., Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R. (2006). Chemical Modification of Protein Surfaces To Improve Their Reversible Enzyme Immobilization on Ionic Exchangers. *Biomacromolecules*. 7, 3052–3058.

Morís-Varas, F., Shah, A., Aikens, J., Nadkarni, N.P., Rozzell, D., Demirjian, D.C. (1999). Visualization of enzyme-catalyzed reactions using pH indicators: rapid screening of hydrolase libraries and estimation of the enantioselectivity. *Bioorgan. Med. Chem.* 7, 2183-2188.

Nascimento, M.G. Queiroz, N. (2002). *Pseudomonas sp.* lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (R, S)-methyl mandelate. *Tetrahedron Lett.* 43, 5225-5227.

Norin, M.; Haeffner, F.; Achour, A.; Norin, T.; Hult, K. (1994). Computer modeling of substrate binding to lipases from *Rhizomucor Miehei*, *Humicola Lanuginosa* and *Candida rugosa*. *Protein Sci.* 3, 1493-1503.

Othman, S., Basri, M., Hussein, M.Z., Abdul Rahman, M., Abd. Rahman, R., Salleh, R. Jasmani, H. (2008). Production of highly enantioselective (-)-menthyl butyrate using *Candida rugosa* lipase immobilized on epoxy-activated supports. *Food Chem.* 106, 437–443.

Palomo, J.M., Fernández-Lafuente, R., Mateo, C., Fuentes, M., Fernández-Lorente, G. Guisán, J. (2002a). Modulation of the enantioselectivity of *candida antarctica* B lipase via conformational engineering: kinetic resolution of (\pm)- α -hydroxy-phenylacetic acid derivatives. *Tetrahedron-Asymmetr.* 13, 1337-1345.

Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Ortiz, C. Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. (2002b) Modulation of the enantioselectivity of lipases via

controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters. *Enzyme Microb. Tech.* 31, 775-783

Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Rua, M. L., Guisán, J. M., Fernandez-Lafuente, R. (2003a). Evaluation of the lipase from *Bacillus thermocatenulatus* as an enantioselective biocatalyst. *Tetrahedron-Asymmetr.* 14, 3679-3687.

Palomo, J.M.; Muñoz, G.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Guisan, J.M.; Fernández-Lafuente, R. (2003b). Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins Hydrolytic resolution of (R, S)-2-butyroyl-2-phenylacetic acid. *J. B-Enzym.* 21, 201–210

Palomo, J.M., Segura, R., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. (2004a). Enzymatic resolution of (±)-glycidyl butyrate in aqueous media. Strong modulation of the properties of the lipase from *Rhizopus oryzae* via immobilization techniques. *Tetrahedron-Asymmetr.* 15, 1157-1161.

Palomo, J.M., Segura, R., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. (2004b). Improving the activity of lipases from thermophilic organisms at mesophilic temperatures for biotechnology applications. *Biomacromolecules.* 5, 249-254.

Palomo, J.M., Ortiz, C., Fernández-Lorente, G., Fuentes, M., Guisán, J.M. Fernández-Lafuente, R. (2005). Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. *Enzyme Microb. Tech.* 36, 447–454.

Pámies, O., Backvall, J. (2004). Chemoenzymatic dynamic kinetic Resolution. *Trends Biotechnol* 22, 130-135.

Park, H.J., Choi, W.J., Huh, E.C., Lee, E.Y., Choi, C.Y. (1999). Production of optically active ketoprofen by direct enzymatic esterification. *J Biosci. Bioeng.* 87, 545-547.

Puertas, S., Rebolledo, F. Gotor, V. (1996). Enantioselective Enzymatic Aminolysis and Ammonolysis of Dimethyl 3-Hydroxyglutarate. Synthesis of (R)-4-Amino-3-hydroxybutanoic Acid. *J. Org. Chem.* 61, 6024– 6027.

Purchartová, K., Marhol, P., Gažák, R., Monti, D., Riva, S., Kuzma, M., Křen, V. (2011). Regioselective alcoholysis of silybin A and B acetates with lipases. *J. Mol. Catal. B-Enzym* 71, 119-123.

Queiroz, N. Nascimento, M. (2002). *Pseudomonas sp.* Lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (R, S)-methyl mandelate. *Tetrahedron Lett.* 43, 5225-5227.

Reetz, M.T. (2002). Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 145–150.

Rocchietti, S., Urrutia, A., Pregolato, M., Tagliani, A., Guisán, J., Fernández-Lafuente, R., Terreni, M. (2002). Influence of the derivative preparation and substrate structure on the enantioselectivity of penicillin G acylase. *Enzyme Microb. Tech.* 31, 88-93.

Rodrigues, D. Mendes, A., Adriano, W., Gonçalves, L., Giordano, R. (2008). Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* Volume 51, 100-109

Sabuquillo, P., Reina, J., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. Fernández-Lafuente, R. (1998). Interfacial affinity chromatography of lipases: separation of different

fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups. *Biochim. Biophys. Acta.* 1388, 337-348.

Salgin U, Salgin S, Takaç S. (2007). The enantioselective hydrolysis of racemic naproxen methyl ester in supercritical CO₂ using *Candida rugosa* lipase. *J Supercrit. Fluid.* 43, 310-316.

Schmidt, M., Baumann, M., Henke, E., Konarzycka-Bessler, M., Bornscheuer, U.T. (2004). Directed Evolution of Lipases and Esterases. *Method. Enzymol.* 388, 199-207.

Secundo, F., Carrea, G., Tarabiono, C., Gatti-Lafranconi, P., Brocca, S., Lotti, M., Jaeger, K., Puls, M., Eggert, T. (2006). The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 39, 166-170.

Sobolev, A, Franssen, M., Poikans, J., Duburs, G. de Groot, A. (2002). Enantioselective lipase-catalysed kinetic resolution of acyloxymethyl and ethoxycarbonylmethyl esters of 1,4-dihydroisonicotinic acid derivatives. *Tetrahedron-Asymmetr.* 13, 2389-2397.

Sommer, B. R., O'hara, R., Askari, N., Kraemer, H. C., Kennedy II, W. A. (2005). The effect of oxybutynin treatment on cognition in children with diurnal incontinence. *J Urology.* 173, 2125-2127.

Straathof, A.J.J., Jongejan, J.A. (1997). The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction. *Enzyme Microb. Tech.* 21, 559-571.

Sugiura, M. Isobe, M. (1975). Comparative Studies on the adsorption of lipase and various proteins at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta.* 397, 412-417.

Takaç, S., Bakkal, M. (2007). Impressive effect of immobilization conditions on the catalytic activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase toward S-Naproxen production. *Process Biochem.* 42, 1021-1027.

Taylor, R.F. (1991). *Protein Immobilization: fundamentals and applications*, Marcel Dekker, New York.

Terreni, M.; Pagani, G.; Ubiali, D.; Fernández-Lafuente, R.; Mateo, C., Guisán, J. M. (2001). Modulation of Penicillin Acylase Properties via Immobilization Techniques: One-pot Chemoenzymatic Synthesis of Cephmandole from Cephalosporin C. *Bioorgan. Med. Chem.* 18, 2429-2432.

Testa, Mario. (1986). Estrategia, coherencia y poder en las propuestas de salud: primera parte / Strategy, coherence and power in the health proposals: first part. *Cuad. méd. soc. (Ros.)*. 38, 3-24.

Tian, Z., Chen, S., Zhang, Y., Huang, M., Shi, L., Huang, F., Fong, C., Yang, M., Xiao, P. (2006). The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones. *Phytomedicine*. 13, 181-186.

Torres, R., Mateo, C., Fuentes, M., Palomo, J., Ortiz, C., Fernández-Lafuente, R. Guisan, J.M. (2003). A novel heterofunctional epoxy-amino Sepabeads for a new enzyme immobilization protocol: Immobilization–Stabilization of Beta-Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Progr.* 19, 1056-1060.

Torres, R., Pessela, B., Fuentes, M., Munilla, R., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. (2005). Stabilization of enzymes by multipoint attachment via reversible immobilization on phenylboronic activated supports. *J Biotechnol.* 120, 396-401.

Torres, R. Mateo, C. Grazú, V. Guisan, J.M., Fernandez Lafuente, R. Lopez, F. (2006). One-Step Purification, Immobilization and Stabilization of Poly-Histidine Tagged Enzymes by Using Metal Chelate-Epoxy Supports. Immobilization of Enzymes and Cells, 2 edición (ed.Totowa) Humana Press, pp. 117-128.

Traverse, J.F., Snapper, M.L. (2002). High-throughput methods for the development of new catalytic asymmetric reactions. Drug Discov. Today. Volume 7, 1002-1012

Ujang, Z., Husain, W., Seng, M., Rashid, A. (2003). The kinetic resolution of 2-(4-chlorophenoxy) propionic acid using *Candida rugosa* lipase. Process. Biochem. 38, 1483-1488.

Uwe, T.B., Rodríguez, G., Hidalgo, A., Gollin, A., Lyon, J., Hitchman, T. S., Weiner, D.P. (2005). Selectivity of lipases and esterases towards phenol esters. J Mol. Catal. B-Enzym. 36, 8-13.

Vasel, B., Hecht, H., Schmid, R.D., Schomburg, D. (1993). 3D-Structures of the lipase from *Rhizomucor miehei* at different temperatures and computer modelling of a complex of the lipase with triaurylglycerol. J. Biotechnol. 28, 99-115.

Veeraragavan, K., Gibbs, B. F. (1989). Detection and partial purification of two lipases from *Candida rugosa*. Biotechnol. Lett. 11, 345-348.

Wahler, D., Reymond, J. (2001). Novel methods for biocatalyst screening. Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 152-158.

Wei Xi, W., Xu, J.H. (2005). Preparation of enantiopure (S)-ketoprofen by immobilized *Candida rugosa* lipase in packed bed reactor. Process Biochem. 40, 2161-2166

Wheatley, B., Donald, E., Schmidt, J. (1999). Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide activated Supports. *J Chromatogr. A.* 849, 1–12.

Wilson, L., Palomo, J.M., Fernández-Lorente, G., Illanes, A., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. (2006a). Effect of lipase–lipase interactions in the activity, stability and specificity of a lipase from *Alcaligenes* sp. *Enzyme Microb. Tech.* 39, 59-264.

Wilson, L., Palomo, J.M., Fernández-Lorente, G., Illanes, A., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. (2006b). Improvement of the functional properties of a thermostable lipase from *alcaligenes* sp. via strong adsorption on hydrophobic supports. *Enzyme Microb. Tech.* 38, 975-980.

Won, J., Ki, Y., Sang, K., Sun, L. (2007). Biocatalytic enantioconvergent separation of racemic mandelic acid. *Sep. Purif. Technol.* 53, 178-182.

Yadav, J.S., Subba Reddy, B.V., Padmavani, B., Venugopal, Ch., Bhaskar Rao, A. (2007). Enzymatic kinetic resolution of racemic 4-tetrahydropyrans by *Candida rugosa* lipase. *Tetrahedron Lett.* 48, 4631-4633.

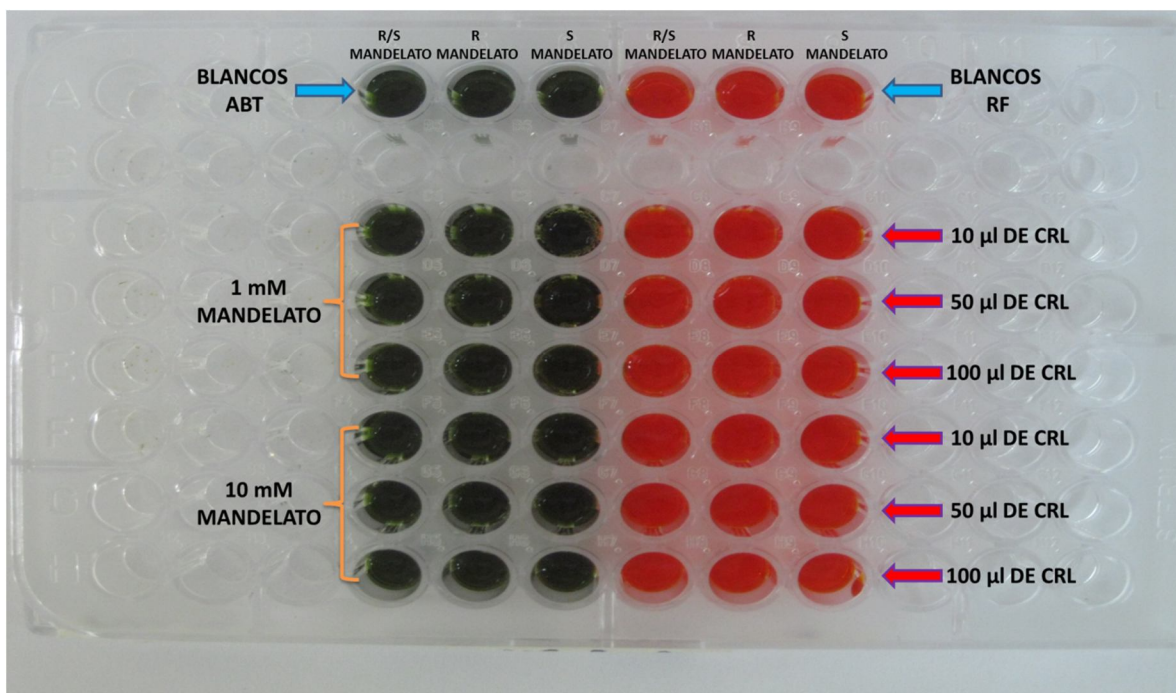
Zaks, A. (2001). *Applied Biocatalysis in Specialty Chemicals and Pharmaceuticals.* *Drug Discov. Today.* 6, 669-670.

ANEXOS

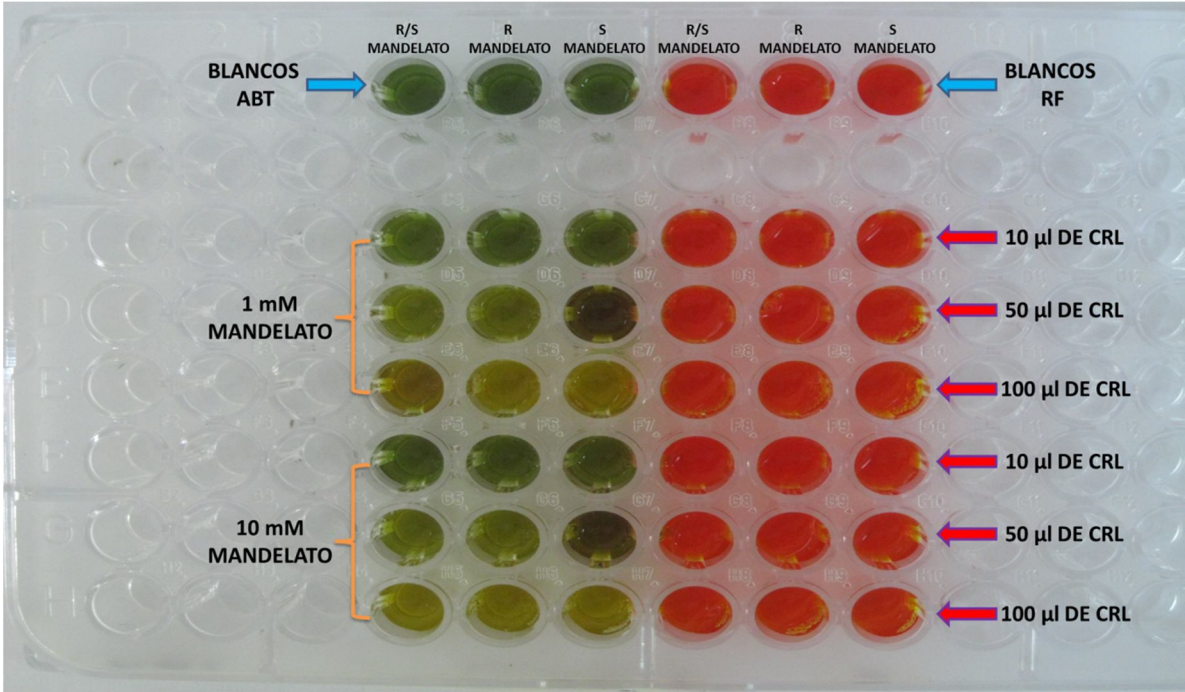
ANEXO 1. ENSAYOS CUALITATIVOS PARA DETERMINAR LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE LA CRL SOLUBLE UTILIZANDO LOS INDICADORES DE PH ABT Y RF

Los ensayos de las figuras muestran el cambio de color en el tiempo de cada uno de los indicadores (ABT y RF) debido a la formación del ácido mandélico producido en la reacción de hidrólisis del mandelato de metilo catalizada por extracto soluble de CRL (extracto enzimático de 25 mg/ml). Se utilizaron dos concentraciones (1 y 10 mM) de mandelato de metilo, con el propósito de evaluar el cambio en la intensidad de la coloración de cada uno de los indicadores en los pozos debido a la aparición del ácido mandélico. En Cada uno de los pocillos se adicionaron 50 μ L de indicador al 0.1% p/v (ABT o RF), CRL (10, 50 y 100 μ L respectivamente), 40 μ L de mandelato de metilo (R/S-mandelato, R-mandelato y S-mandelato) y buffer fosfato 25 mM pH 7 hasta completar un volumen de 200 μ L.

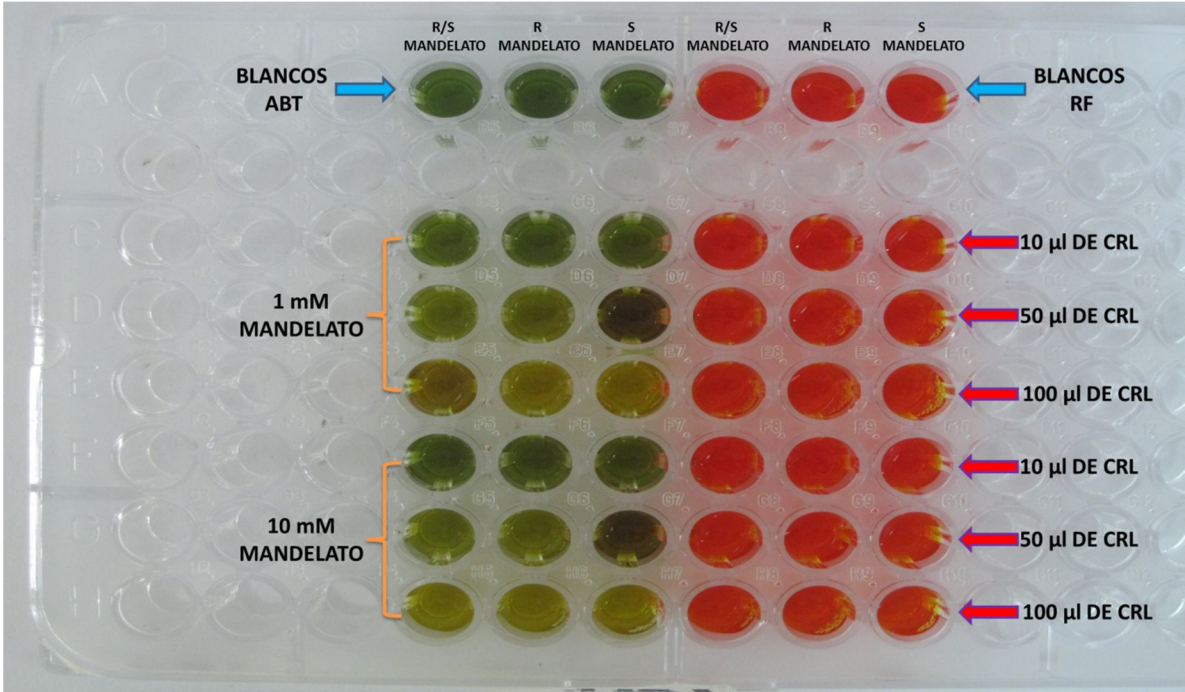
Tiempo cero (t=0)



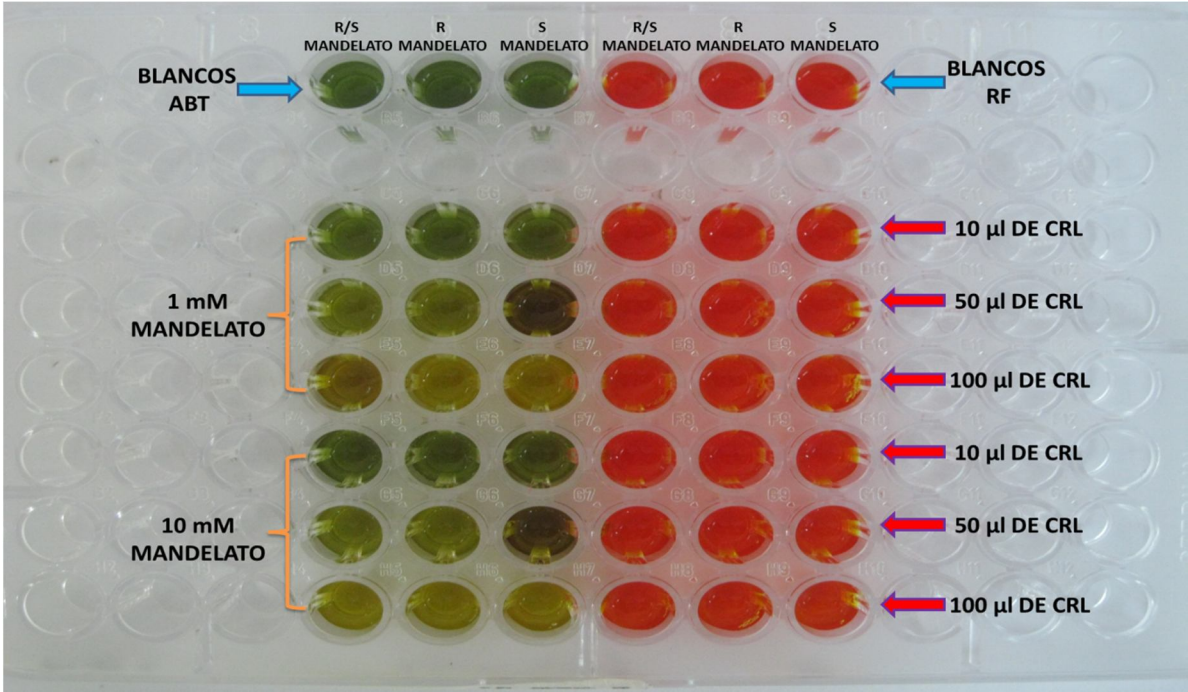
Tiempo 1 hora (t=1H)



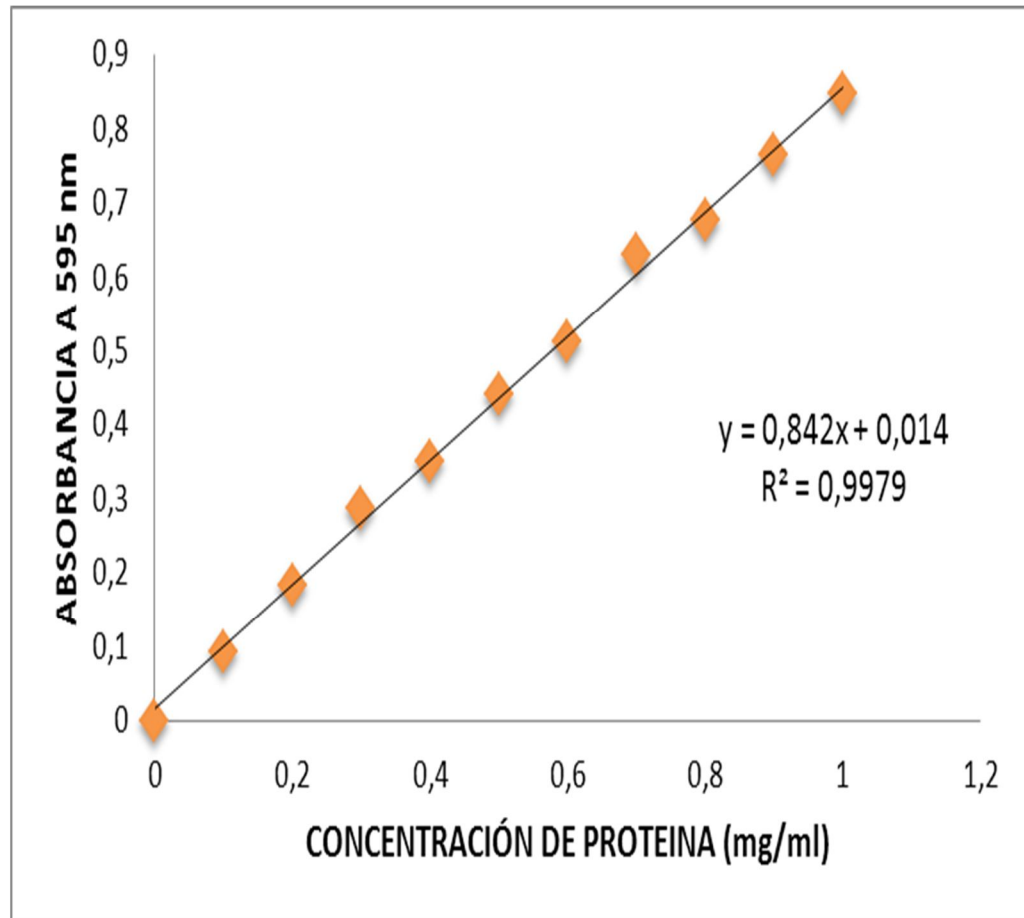
Tiempo 2 horas (t=2H)



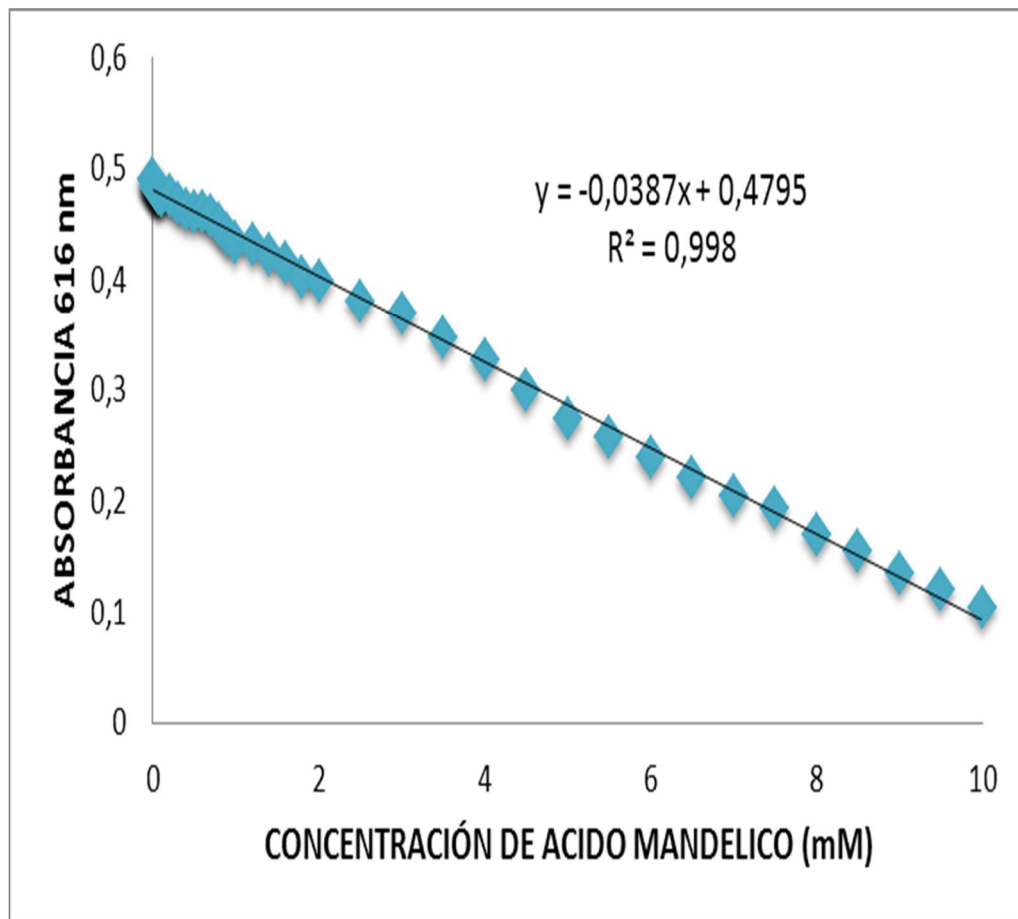
Tiempo 4 horas (t=4H)



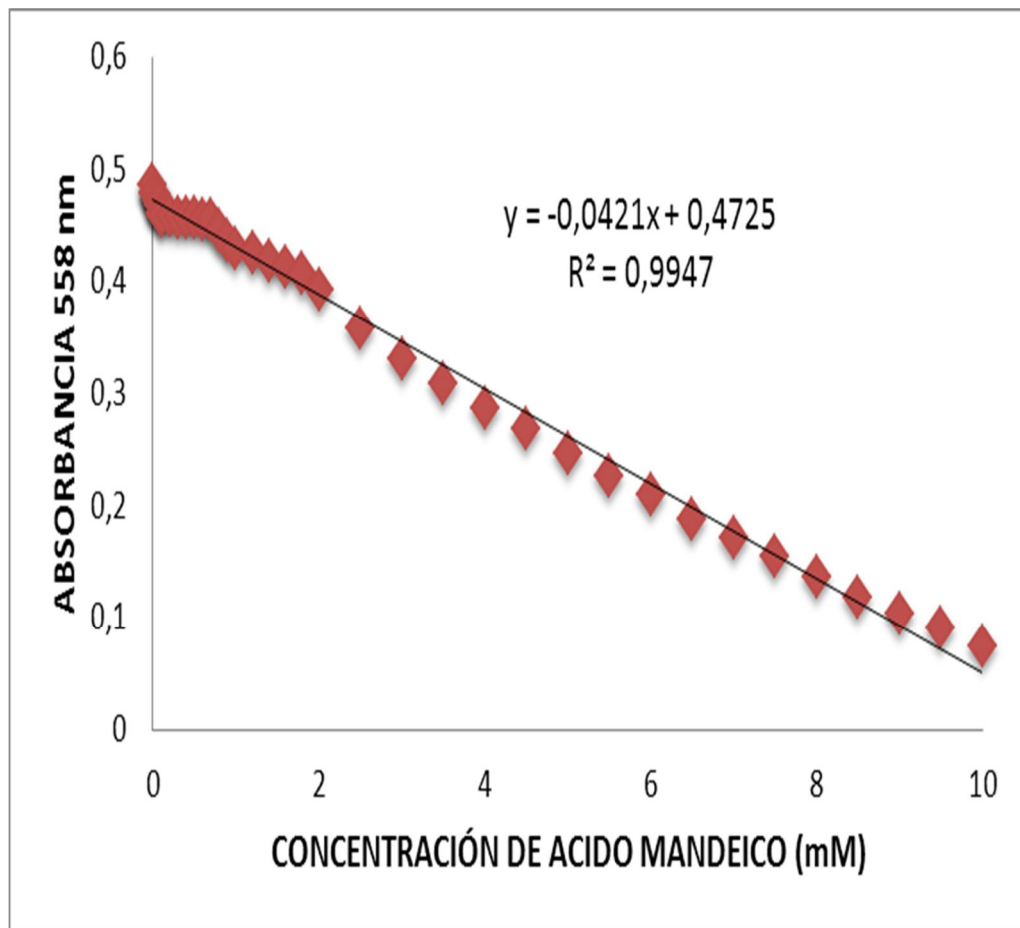
**ANEXO 2. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA
CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DEL BRADFORD**



**ANEXO 3. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR LA
CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO MANDÉLICO UTILIZANDO AZUL DE
BROMOTIMOL (ABT).**

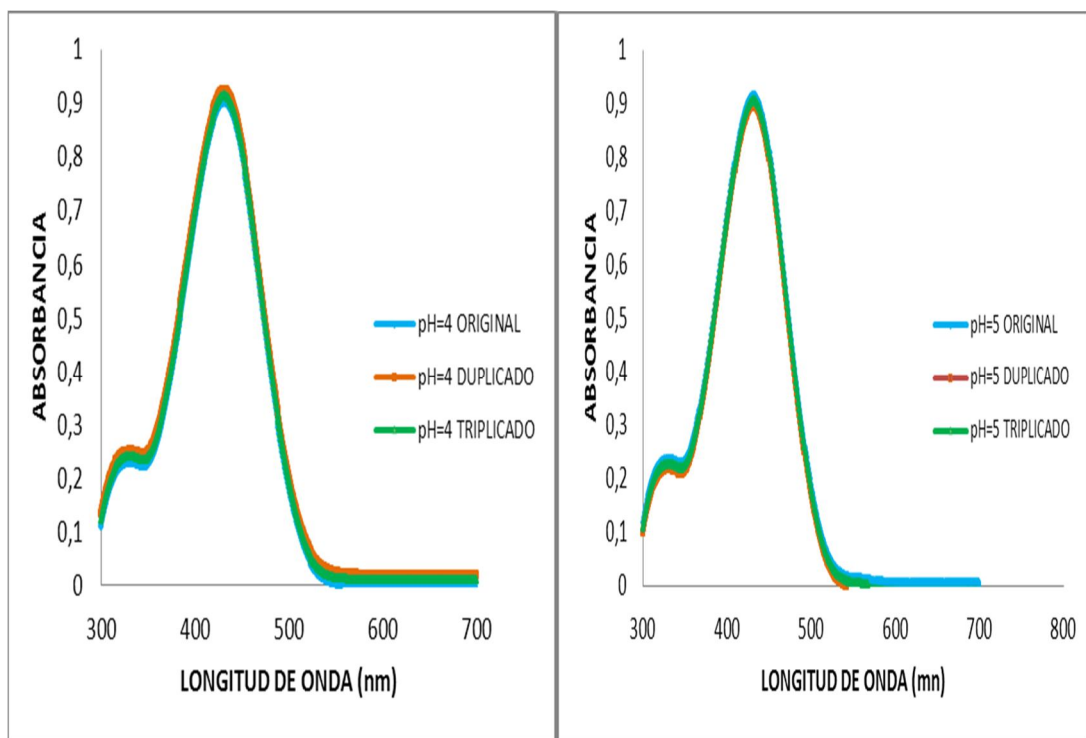


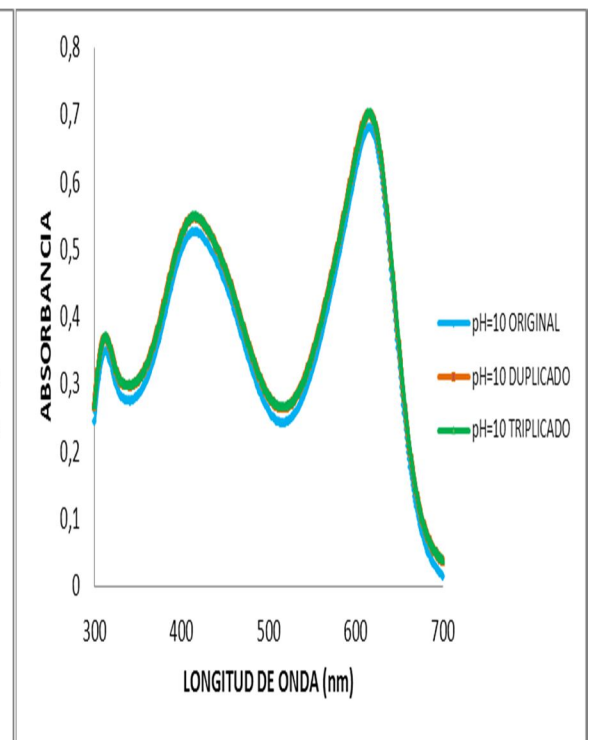
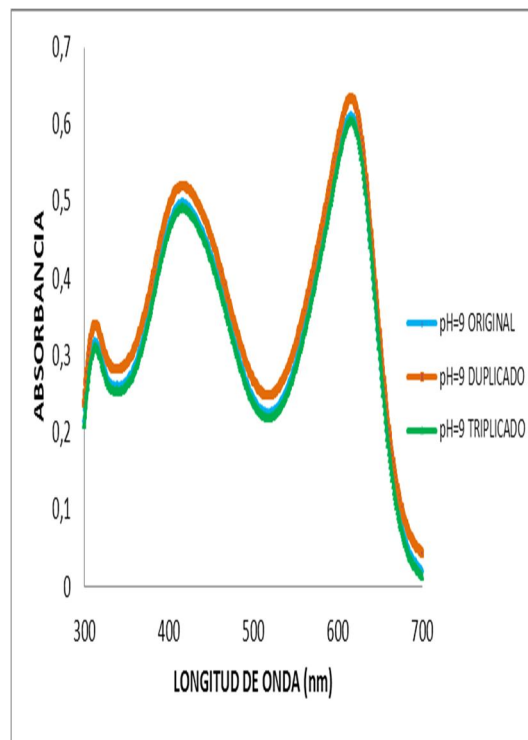
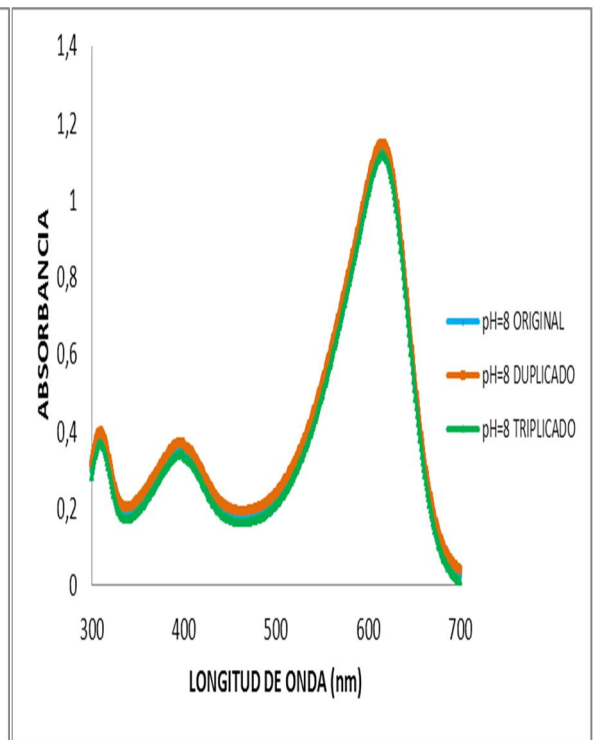
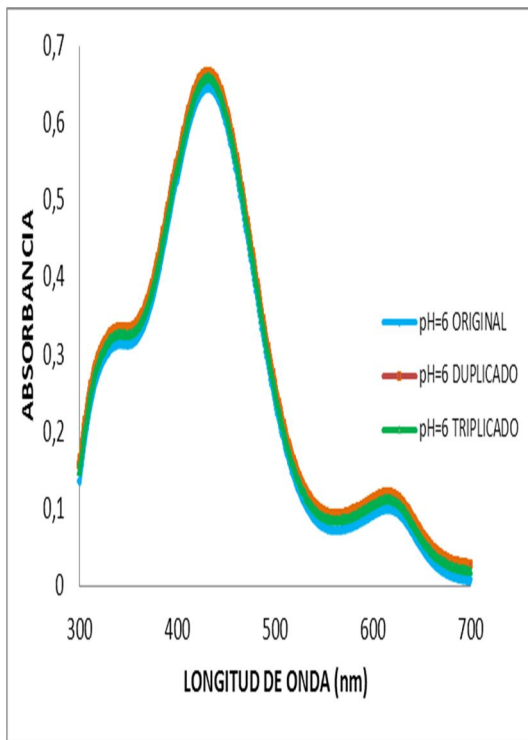
**ANEXO 4. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR LA
CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO MANDÉLICO UTILIZANDO ROJO DE FENOL
(RF)**



ANEXO 5. DETERMINACIÓN DE LAS LONGITUDES DE ONDA DE MÁXIMA ABSORCIÓN PARA EL AZUL DE BROMOTIMOL EVALUADO EN DIFERENTES VALORES DE PH.

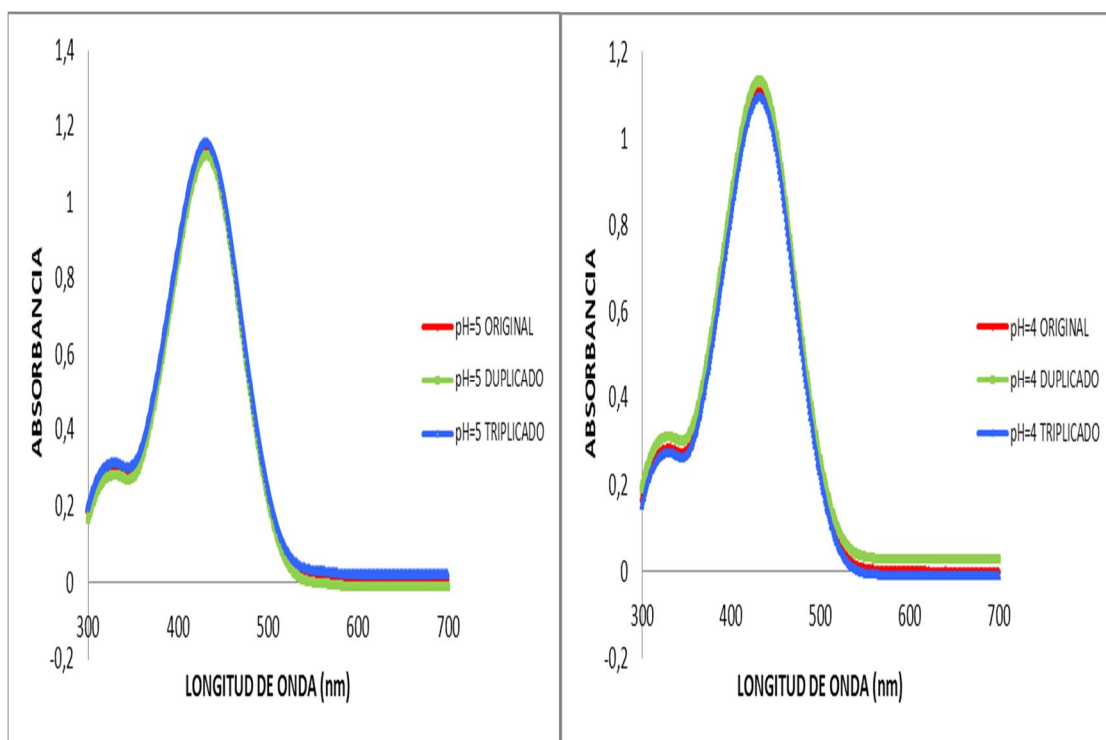
En las gráficas se muestran los espectros obtenidos para el ABT cuando el indicador fue preparado en soluciones buffer de diferentes valores de pH (4, 5, 6, 8, 9 y 10). El objetivo de este experimento fue identificar la especie aniónica y protonada del indicador y las λ_{\max} a la cual absorbe cada especie. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado.

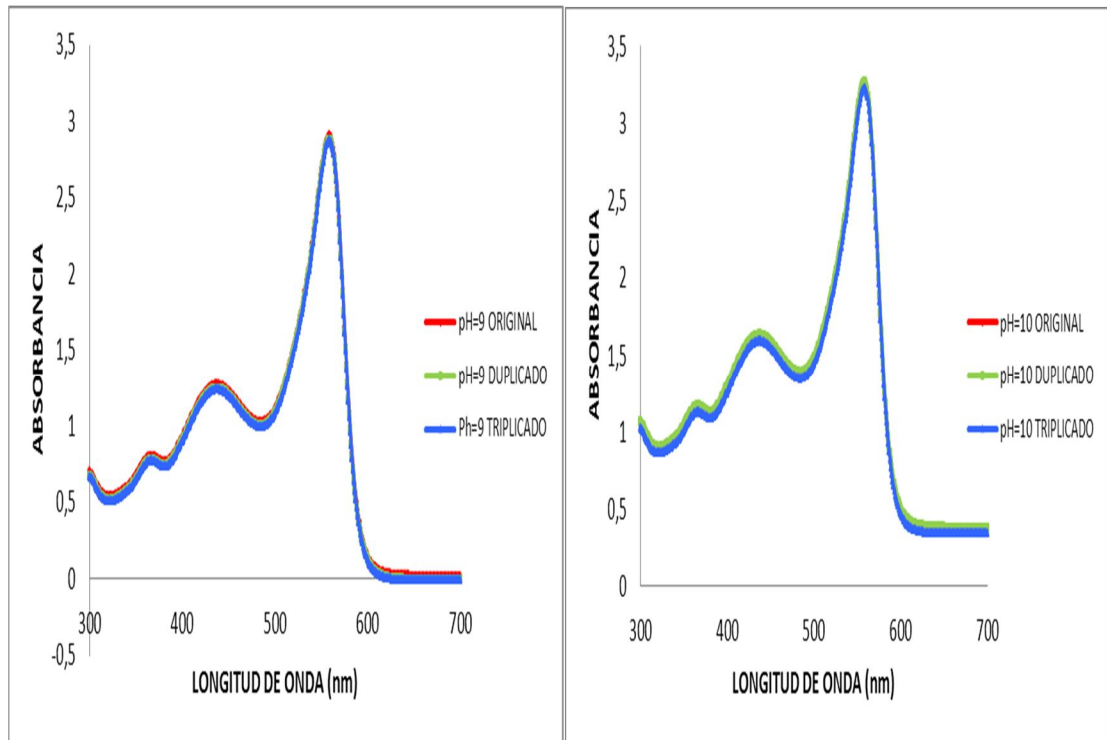
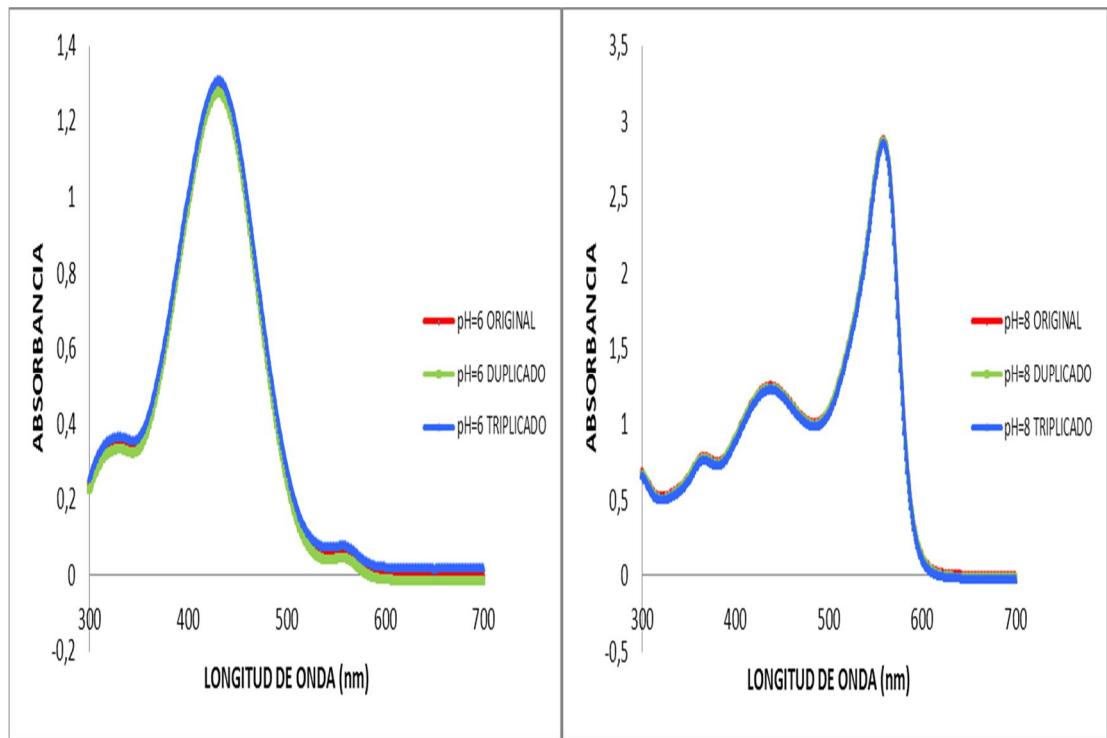




ANEXO 6. DETERMINACIÓN DE LAS LONGITUDES DE ONDA DE MÁXIMA ABSORCIÓN PARA EL ROJO DE FENOL EVALUADO A DIFERENTES VALORES DE PH.

Al igual que con el ABT, el RF fue evaluado bajo las mismas condiciones y con el mismo objetivo. A continuación se muestran los espectros obtenidos.





ANEXO 7. CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA PARA LAS LIPASAS CRL Y QL

La actividad específica (A.E) se determinó de la siguiente manera:

$$ACTIV.ESP \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{m}{\epsilon} \times \frac{1 \times 10^6 \mu mol}{1 mol} \times \frac{1 litro}{1000 ml} \times \frac{60 seg}{1 min} \times \frac{V_{ENSAYO}}{V_{ENZIMA}} \times \frac{FD}{C_{PROTEINA}}$$

Donde:

m = pendiente (mol/L* min)

ϵ = coeficiente de extinción molar del PNPB (3100 M⁻¹.cm⁻¹)

V_{ENSAYO} = Volumen total de la reacción

V_{ENZIMA} = Volumen de la solución enzimática

FD = Factor de dilución enzimático

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

U = cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un mol de p-NPB a 25°C

Ej.

Realizando un ensayo de actividad con pNPB partiendo de una dilución 1:50 de un preparado enzimático de CRL y una posterior medida del ensayo de Bradford se obtuvieron los siguientes datos.

Si $m = 1.259 \text{ E-3}$; $V_{\text{ENSAYO}} = 2.54 \text{ ml}$; $V_{\text{ENZIMA}} = 0.02 \text{ ml}$; $C_{\text{PROTEINA}} = 1.086 \text{ mg/ml}$

Utilizando la formula antes mostrada se calcula la actividad específica:

$$A.E \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{1.259 \times 10^{-3}}{3100} \times \frac{1 \times 10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ litro}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{60 \text{ seg}}{1 \text{ min}} \times \frac{2.54}{0.02} \times \frac{50}{1.086}$$
$$= 142.5 \frac{U}{mg}$$

ANEXO 8. CÁLCULO DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD PARA LOS DERIVADOS DE CRL

La relación enantiomérica E fue calculada como la relación entre las velocidades iniciales de hidrólisis de ambos isómeros puros la ecuación reportada por Straathof y Jonjean (1997):

$$\text{si } c_{s_0}^S = c_{s_0}^R = c_{s_0}$$

$$E = \frac{r_0^S}{r_0^R} = \frac{V_{max}^S \frac{c_{s_0}^S}{K_m^S + c_{s_0}^S}}{V_{max}^R \frac{c_{s_0}^R}{K_m^R + c_{s_0}^R}} = \frac{V_{max}^S / K_m^S + c_{s_0}}{V_{max}^R / K_m^R + c_{s_0}}$$

Donde,

$c_{s_0}^S$ = *Concentración inicial del enantiómero S*

$c_{s_0}^R$ = *Concentración inicial del enantiómero R*

c_{s_0} = *Concentración inicial de los enantiómeros R o S*

r_0^S = *velocidad inicial del enantiómero S*

r_0^R = *velocidad inicial del enantiómero R*

V_{max}^S = *velocidad máxima del enantiómero S*

V_{max}^R = *velocidad máxima del enantiómero R*

K_m^S = *Constante de Michaelis – Menten para el enantiómero S*

K_m^R = *Constante de Michaelis – Menten para el enantiómero R*

Determinada las velocidades de cada enantiómeros de las curvas de concentración vs tiempo, se procedió a determinar la enantioselectividad mediante la forma simplificada de la ecuación de Straathof y Jonjean:

$$E = \frac{r_0^S}{r_0^R}$$

Ej.

Realizando un ensayo de hidrólisis de los enantiómeros R y S mandelato de metilo con el derivado EC-CRL se obtuvieron los siguientes datos:

ENANTIOMERO	TIEMPO (HORAS)	CONVERSION (%)
R-MANDELATO DE METILO	0	0
	1	0.3
	2	1.5
	3	2.2
S-MANDELATO DE METILO	0	0
	1	7.8
	2	16.4
	3	26.3

Realizando una gráfica de conversiones vs tiempo se determinan las velocidades iniciales de cada uno de los enantiómeros y se calcula la velocidad mediante la fórmula establecida por Straathof y Jonjean (1997):

$$E = \frac{r_0^S}{r_0^R} = \frac{8.75}{0.78} = 11.22$$