

Memoria presentada para optar  
al grado de Doctor en Farmacia por:

**Miguel Arroyo Sánchez**

**"SÍNTESIS DE ÁCIDOS 2-ARIL-PROPIÓNICOS HOMOQUIRALES  
MEDIANTE ESTERIFICACIÓN ENANTIOSELECTIVA  
CATALIZADA POR LIPASAS INMOVILIZADAS"**

Director:

**D. José Vicente Sinisterra Gago**

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Facultad de Farmacia

Universidad Complutense

Madrid, Octubre 1995

Quiero expresar mi agradecimiento más sincero:

Al Dr. D. José Vicente Sinisterra, Catedrático de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, por la dirección de este trabajo, y en especial, por su confianza, apoyo y orientación en todo momento.

Al Dr. J. Burguillo y a su grupo de investigación del Departamento de Químico-Física de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca, en especial a D. Oscar Redondo, por la realización de las microscopías electrónicas y por el análisis de la pureza óptica de las muestras de ketoprofeno por cromatografía HPLC.

A todos los miembros de nuestro equipo de investigación, especialmente a los Dres. D. Andrés Alcántara y D. José María Sánchez Montero, por su buen humor e interés durante todo este tiempo. A este último agradecerle también su ayuda en todo el tema que trata sobre la actividad de agua.

Y a todos mis compañeros del Departamento y, en concreto, a todos aquellos con los que he compartido tan buenos ratos en nuestro recorrido itinerante hasta el laboratorio nº6: mi incondicional amigo Carlos, María José, Mayda, Chami, Isabel, Fernando, Ana y Mariano. Por último, no puedo dejar de mencionar a Chema, un ejemplo de trabajo y amistad.

Por último, agradecer a la Universidad Complutense de Madrid la concesión de la Beca predoctoral de Formación de Profesorado y Personal Investigador, que me ha permitido la realización de este trabajo durante el período 1992-1995.

*A mi familia*

---

	Pág.
<b>PRÓLOGO</b>	1
<b>CAPÍTULO I: OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b>	7
<b>CAPITULO II: INMOVILIZACION DE LIPASAS</b>	11
<b>II.1. INTRODUCCION</b>	
<b>II.1.1. Enzimas</b>	13
II.1.1.1. Estructura, clasificación y nomenclatura de las enzimas.	14
II.1.1.2. Catálisis enzimática y su aplicación en procesos biocatalizados.	17
II.1.1.3. Cinética enzimática.	20
<b>II.1.2. Lipasas</b>	21
II.1.2.1. Estructura y mecanismo de acción.	22
II.1.2.2. Homologías estructurales entre lipasas. Especificidad de sustrato.	25
II.1.2.3. Aplicaciones de las lipasas.	28
II.1.2.4. Lipasa de <i>Candida rugosa</i> .	31
II.1.2.5. Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> .	33
<b>II.1.3. Inmovilización de lipasas</b>	35
II.1.3.1. Aspectos generales sobre la inmovilización de enzimas.	35
II.1.3.2. Lipasas inmovilizadas.	39
<b>II.2. PARTE EXPERIMENTAL</b>	45
II.2.1. Lipasas nativas y sustratos	45
II.2.2. Determinación del contenido en proteína de los preparados comerciales.	46
II.2.3. Medida de la actividad de las lipasas de <i>C. rugosa</i> y <i>C. antarctica</i> .	48
II.2.4. Caracterización y funcionalización de los soportes.	49
II.2.5. Inmovilización de las lipasas comerciales.	54
II.2.6. Actividad enzimática de los derivados inmovilizados.	56
II.2.7. Termoestabilidad de las lipasas inmovilizadas.	57
<b>II.3. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	59
<b>II.3.1. Inmovilización de la lipasa de <i>Candida rugosa</i>.</b>	59
II.3.1.1. Inmovilización sobre soportes orgánicos.	59
II.3.1.2. Inmovilización sobre soportes inorgánicos.	62
II.3.1.3. Estabilidad térmica de los diferentes derivados inmovilizados.	63

II.3.2. Inmovilización de la lipasa B de <i>Candida antarctica</i> .	68
II.3.2.1. Inmovilización sobre soportes orgánicos.	69
II.3.2.2. Inmovilización sobre soportes inorgánicos.	70
II.3.2.3. Estabilidad térmica de los diferentes derivados inmovilizados.	71
<b>CAPÍTULO III: LIPASAS INMOVILIZADAS EMPLEADAS EN MEDIOS ORGÁNICOS</b>	<b>79</b>
<b>III.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>81</b>
<b>III.1.1. Catálisis enzimática en medios orgánicos.</b>	<b>81</b>
III.1.1.1. Ventajas.	82
III.1.1.2. Aplicaciones de las enzimas hidrolíticas en síntesis.	83
III.1.1.3. Elección del disolvente.	84
<b>III.1.2. Importancia del agua en las reacciones biocatalizadas en medios orgánicos.</b>	<b>85</b>
III.1.2.1. Actividad de agua: definición.	86
III.1.2.2. Isotermas de adsorción.	87
III.1.2.3. La competencia por el agua en un sistema biocatalítico.	89
III.1.2.4. Medida y control de la $a_w$ del sistema.	90
<b>III.2. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>90</b>
III.2.1. Reactivos.	90
III.2.2. Procedimiento para realizar la esterificación.	90
III.2.3. Análisis del grado de esterificación.	93
III.2.4. Diseño de experimentos.	94
III.2.5. Ensayos OVAT.	95
III.2.6. Elección del alcohol.	95
III.2.7. Elección del disolvente.	95
III.2.8. Isotermas de adsorción y pre-equilibrado de reacciones a una $a_w$ .	95
<b>III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>97</b>
III.3.1. Influencia de la cadena alcohólica en la reacción de esterificación.	97
III.3.2. Influencia del disolvente.	98
III.3.3. Influencia de las condiciones de reacción.	99
III.3.4. Influencia del agua.	103

---

<b>CAPÍTULO IV: RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS (R,S) 2-ARIL PROPIÓNICOS</b>	117
<b>IV.1. INTRODUCCIÓN</b>	119
<b>IV.1.1. Empleo de lipasas en la obtención de ácidos 2-aril propiónicos homoquirales.</b>	119
<b>IV.1.2. Estereoselectividad de las lipasas.</b>	124
IV.1.2.1. Predicción de la estereoselectividad.	126
IV.1.2.2. Esterificaciones enantioselectivas catalizadas por lipasas.	131
<b>IV.2. PARTE EXPERIMENTAL</b>	134
IV.1. Determinación del exceso enantiomérico por RMN.	134
IV.2. Determinación del exceso enantiomérico por HPLC.	136
<b>IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	137
<b>IV.3.1. Estereoselectividad de la lipasa de <i>Candida rugosa</i>.</b>	137
<b>IV.3.2. Estereoselectividad de la lipasa B de <i>Candida antarctica</i>.</b>	138
IV.3.2.1. Influencia de las condiciones de reacción.	139
IV.3.2.2. Influencia de la $\alpha_w$ del sistema.	140
IV.3.2.3. Influencia del disolvente.	143
IV.3.2.4. Zona de reconocimiento del ácido en el centro activo.	147
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES</b>	153
<b>CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA</b>	159

# *Prólogo*



La presente Tesis Doctoral se ha dividido en seis capítulos:

En el Capítulo I se realiza una exposición de los objetivos y del plan de trabajo propuesto para la realización de esta Memoria. Los tres capítulos siguientes se han dividido a su vez en tres partes bien diferenciadas: una introducción teórica del tema, una sección en la que se detallan las metodologías experimentales seguidas y una parte final en la que se exponen y discuten los resultados obtenidos durante el desarrollo del trabajo.

El Capítulo II se inicia con una exposición de algunos aspectos básicos de las enzimas, para profundizar posteriormente en el mundo de las lipasas y sus aplicaciones. A continuación, nos hemos centrado en la inmovilización de las lipasas, parte fundamental de este capítulo. Se detalla la obtención de derivados inmovilizados de lipasa de *Candida rugosa* activos, estables y reproducibles; y la descripción, por primera vez, de la inmovilización covalente de la lipasa B de *Candida antarctica*. Parte de los resultados de este capítulo han sido expuestos en diferentes congresos nacionales e internacionales y han sido publicados en las revistas científicas que se detallan a continuación:

Publicaciones:

Arroyo, M.; Moreno, J.M. y Sinisterra, J.V. "Immobilisation / Stabilisation of lipase from *Candida rugosa* on different hydroxilic supports" en *J. Mol. Catal.* **1993**, *83*, 261-71.

Moreno, J.M.; Arroyo, M. y Sinisterra, J.V. "Stabilisation of lipase from *Candida rugosa* by covalent immobilisation". en *Studies in Organic Chemistry 47 "Stability and stabilisation of enzymes"*, V.J.J. Van der Tweel, A. Harder and R.M. Buitelaar Eds. 1993. Elsevier, Amsterdam, pp. 391-398.

Congresos:

"Estudio de la inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa*". Autores: M. Arroyo, J.M. Moreno y J.V. Sinisterra. **Comunicación oral** presentada en el *XIII Simposio Iberoamericano de Catálisis* celebrado en Segovia (julio 1992).

"Stabilisation of lipase from *Candida rugosa* by covalent immobilisation". Autores: J.M. Moreno, M. Arroyo y J.V. Sinisterra. **Poster** presentado en el *International*

*Symposium on Stability and Stabilization of Enzymes* celebrado en Maastrich (Holanda, Noviembre 1992).

"Estudio de biocatalizadores inmovilizados de lipasa de *Candida rugosa*". Autores: M. Arroyo, J.M. Moreno y J.V. Sinisterra. **Comunicación oral** presentada en la *Reunión Anual del Grupo Especializado de Catálisis* celebrada en Córdoba (Julio 1993).

En el Capítulo III se realiza un estudio teórico del empleo de las lipasas en medios orgánicos y sus aplicaciones en síntesis. Se describen todos los factores que influyen en la actividad enzimática de las lipasas nativas e inmovilizadas cuando se utilizan en la síntesis de ésteres de sustratos no naturales (como los ácidos 2-aryl propiónicos) en el seno de un medio orgánico. Estos factores son: las condiciones experimentales, el disolvente y fundamentalmente la presencia de agua en estos medios ligeramente hidratados.

El Capítulo IV trata sobre la enantioselectividad de las lipasas, propiedad de gran utilidad en la resolución de mezclas racémicas de ácidos y alcoholes. Se detallan los intentos para resolver las mezclas racémicas de los ácidos 2-aryl propiónicos mediante el empleo, en medios orgánicos, de las lipasas inmovilizadas que se detallan el capítulo I de la Tesis. En el desarrollo del capítulo se discute sobre la diferente estereoselectividad de la lipasa de *C. rugosa* y de la lipasa B de *C. antarctica*, y sobre el interés que presenta esta última en la obtención de los ácidos *S*(+) puros, los cuales presentan actividad antiinflamatoria. Se hace un estudio exhaustivo de las variables que pueden modular la estereoselectividad de la lipasa B de *C. antarctica*. Los resultados de los capítulos III y IV están parcialmente recogidos en las siguientes publicaciones y congresos:

Publicaciones:

Sinisterra, J.V.; Llama, E.F.; del Campo, C.; Cabezas, M.J.; Moreno, J.M. y Arroyo, M. "Stereoselectivity of Chemically Modified  $\alpha$ -Chymotrypsin and Immobilized Lipases" en *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2* **1994**, 1333-1336.

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

Arroyo, M.; Moreno, J.M. y Sinisterra, J.V. "Alteration of the activity and selectivity of immobilized lipases by the effect of the amount of water in the organic medium" en *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1995**, *97*, 195-201.

Arroyo, M. y Sinisterra, J.V. "Influence of chiral carvones on selectivity of pure lipase-B from *Candida antarctica*." en *Biotechnol. Lett.* **1995**, *17*, 525-530.

#### Congresos:

"Esterificación enantioselectiva de antiinflamatorios no esteroídicos catalizada por lipasas microbianas en medio orgánico". Autores: M.T. López-Belmonte, M. Arroyo, A. Alcántara y J.V. Sinisterra. **Poster** presentado en la *Reunión Anual del Grupo Especializado de Catálisis* celebrada en Córdoba (Julio 1993).

"Alteration of the stereoselectivity of immobilized or chemical modified enzymes". Autores: J.V. Sinisterra, E.F. Llama, C. del Campo, M.J. Cabezas, A. Gradillas, M. García, J.M. Moreno, M. Arroyo y M.T. López-Belmonte. **Poster** presentado en el *European Symposium on Biocatalysis* celebrado en Graz (Austria, Septiembre 1993).

"Obtención de ácidos S(+) 2-arylpropiónicos con actividad antiinflamatoria no esteroídica mediante el empleo de lipasas inmovilizadas". Autores: M. Arroyo, J.M. Moreno y J.V. Sinisterra. **Comunicación oral** presentada en el *II Congreso Ibérico de Biotecnología* celebrado en Vilamoura (Portugal, Octubre 1994).

"Resolution of Chiral Drugs using lipase from *Candida antarctica*". Autores: M. Arroyo, J.L. Bermúdez, M.S. Castro, J.C. Checa, A. Gradillas, C. Ramírez y J.V. Sinisterra. **Poster** presentado en el *Curso ASI NATO "Engineering of/with Lipases"* celebrado en Oporto (Portugal, Mayo 1995).

"Immobilization of Pure Microbial Lipases Increase Thermostability and Enantioselectivity". Autores: J.M. Moreno, M.J. Hernáiz, M. Arroyo, M.T. López-Belmonte, I. Borreguero y J.V. Sinisterra. **Poster** presentado en el *Curso ASI NATO "Engineering of/with Lipases"* celebrado en Oporto (Portugal, Mayo 1995).

En el Capítulo V se exponen las conclusiones finales del trabajo realizado y presentado en esta Memoria; y finalmente el Capítulo VI recoge las citas bibliográficas que se han consultado en la preparación de la introducción de los temas y en la discusión de los resultados.



## ***Capítulo I:***

# ***Objetivos y Plan de Trabajo***



La presente Tesis Doctoral se encuadra dentro de la línea de trabajo del Proyecto de Investigación: "*Resolución de racematos de ácidos 2-aril propiónicos con actividad antiinflamatoria usando lipasas inmovilizadas como biocatalizadores*" (Código PB 90-0010C02-01).

Muchos fármacos sintéticos se emplean como mezclas racémicas, aunque el efecto terapéutico sólo reside en uno de los enantiómeros. Un ejemplo lo encontramos en los antiinflamatorios no esteroídicos de la familia de los ácidos 2-aril propiónicos, donde sólo el isómero *S*(+) es activo. En la actualidad existen en el mercado 28 marcas de este tipo de antiinflamatorios, entre los cuales destaca el naproxeno (13 registros) y el ketoprofeno (9 registros). La Industria Farmacéutica se ha planteado sustituir la síntesis asimétrica de los isómeros *S*(+), que es cara y poco eficaz, por la resolución enzimática de las mezclas racémicas mediante el empleo de lipasas. Pero estas lipasas se deben inmovilizar para disponer de biocatalizadores estables y activos durante mucho tiempo, y que se puedan reutilizar, de tal forma que el proceso biotecnológico sea rentable. Asimismo los materiales que soportan las lipasas deben poseer buenas propiedades mecánicas para que se puedan utilizar en reactores de tanque agitado o de otro diseño. Con estos antecedentes, nos propusimos como objetivos de la Tesis:

1. La obtención de derivados inmovilizados de lipasa comercial de *C. rugosa* y de lipasa B de *C. antarctica* activos y estables, por unión covalente a soportes con buenas propiedades mecánicas.
2. Análisis de los factores que influyen en la esterificación catalizada por las lipasas inmovilizadas en el seno de un disolvente orgánico.
3. Puesta a punto de un método de obtención del isómero *S*(+) de los ácidos 2-aril propiónicos con actividad antiinflamatoria, mediante la esterificación enantioselectiva de estos ácidos catalizada por la lipasa B de *C. antarctica*, que pudiera ser escalado a nivel industrial.

El plan de trabajo seguido se puede resumir en las siguientes partes:

1. Inmovilización de las lipasas sobre soportes orgánicos (agarosa tosilada, zuro de maíz tosilado, sefarosas tresilada y epoxidada) y soportes inorgánicos (sílice y alúmina activadas con triclorotriazina).
2. Análisis de las variables estructurales y experimentales que influyen en la esterificación de los ácidos catalizada por las lipasas inmovilizadas en un medio orgánico. Entre las primeras destacarían: el tipo de disolvente, tipo de alcohol y la estructura del ácido. Empleo de la metodología del diseño experimental para el análisis de las variables técnicas del proceso: temperatura, agitación, relación molar ácido/alcohol, cantidad de biocatalizador y agua en el medio. Estudio más profundo de cada variable por separado.
3. Resolución de las mezclas racémicas de los ácidos 2-aril propiónicos mediante esterificación enantioselectiva catalizada por las lipasas inmovilizadas. Influencia de las variables estructurales y técnicas en el curso estereoquímico de la reacción.

## ***Capítulo II:***

# ***Inmovilización de lipasas***



## II.1. INTRODUCCIÓN

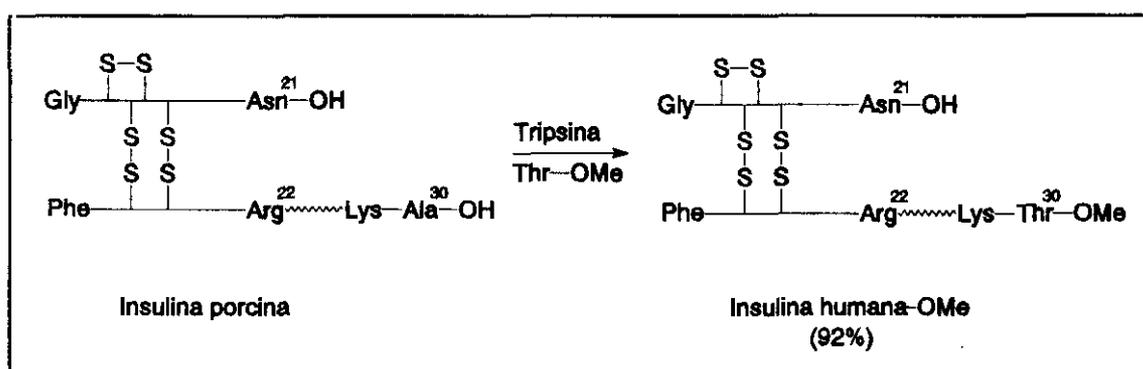
### II.1.1. ENZIMAS

Los métodos enzimáticos son una alternativa en la síntesis de compuestos lábiles tanto en Química Orgánica como en Química Farmacéutica<sup>1</sup>. Como ejemplos podemos citar:

1) *Preparación de sintones quirales* : desde un punto de vista práctico, los métodos enzimáticos que conducen a la preparación de sustancias quirales son más enantioselectivos que aquellos basados en el empleo de catalizadores homogéneos con los complejos de metales de transición.

2) *Química Fina*: muchas sustancias que se emplean en laboratorios de Bioquímica, Farmacología, etc. se obtienen a gran escala mediante métodos enzimáticos de síntesis. Así las enzimas han resultado ser útiles en la producción, en grandes cantidades, de ácido aspártico<sup>2</sup>, ácido málico y 5'-fosfato de guanosina (GMP, empleado como edulcorante) y ácido 6-amino penicilánico (6-APA)<sup>3</sup>.

3) *Obtención de productos farmacéuticos*: la Química Farmacéutica se ha beneficiado de los últimos avances de la Biotecnología<sup>4</sup>, en especial en el campo de la síntesis de polipéptidos. Un ejemplo es el empleo de peptidasas para unir cadenas de oligosacáridos a proteínas o para modificar oligosacáridos de glicoproteínas. Asimismo, la semisíntesis de la insulina humana a partir de la insulina porcina es un proceso original de los laboratorios Novo Nordisk que debe encuadrarse dentro de estos métodos<sup>5</sup> (Esquema 1).



Esquema 1. Obtención de insulina humana según patente de Novo Nordisk.

4) *Biotecnología*: muchos compuestos empleados como reactivos en Análisis Clínicos, sensores biológicos o aditivos alimentarios (colorantes y edulcorantes) se sintetizan a través de rutas en las que aparece, como uno de los pasos intermedios, una modificación o una síntesis catalizada por enzimas.

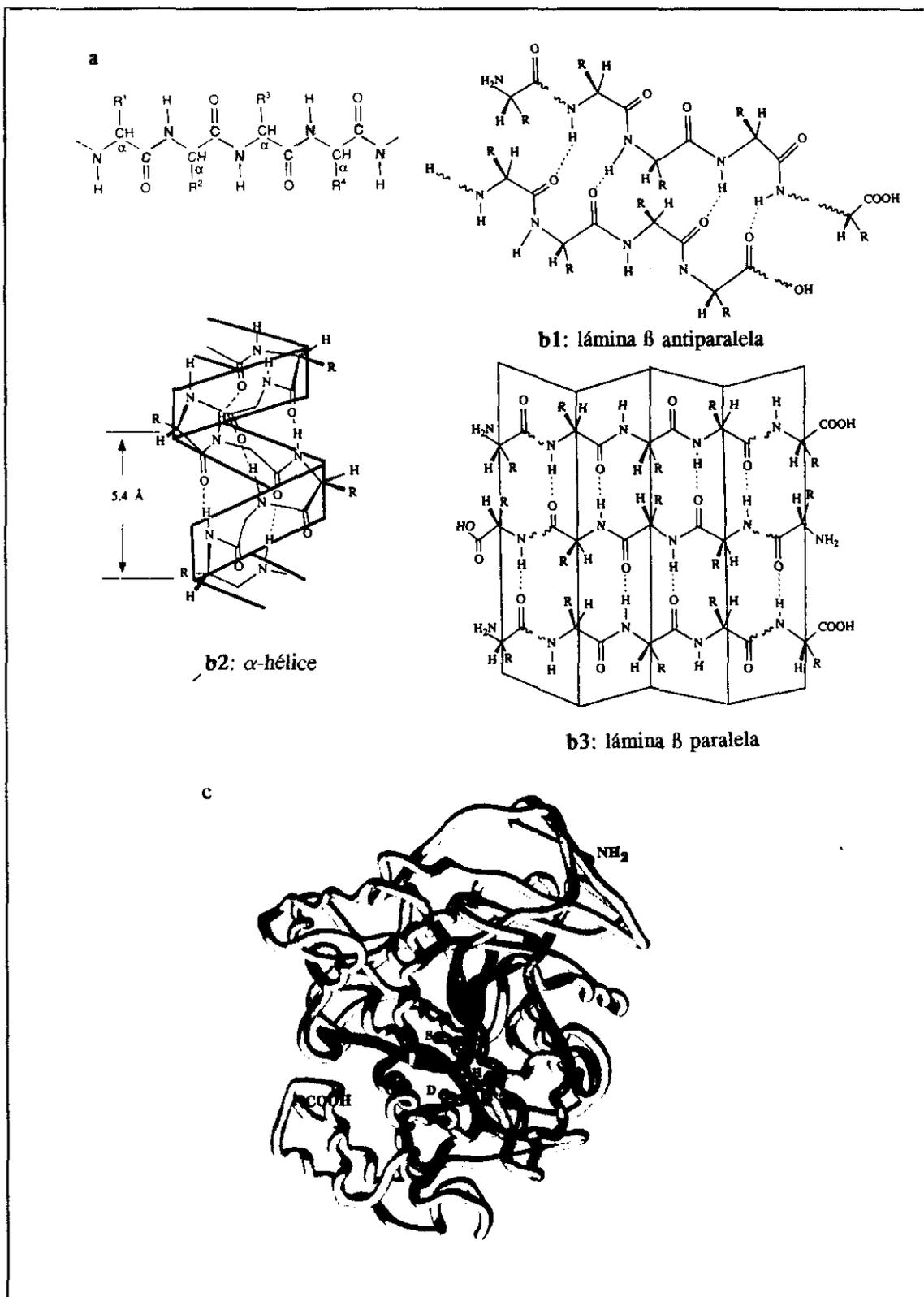
#### II.1.1.1. Estructura, clasificación y nomenclatura de las enzimas.

Las enzimas son proteínas desarrolladas por las células de organismos vivos con la función específica de catalizar reacciones químicas *in vivo*<sup>6</sup>. También son capaces de catalizar *in vitro* reacciones en las que intervienen tanto sustratos naturales como no naturales<sup>7</sup>.

Como todas las proteínas, las enzimas poseen una estructura primaria, secundaria y terciaria. La estructura 1<sup>a</sup> está constituida por la secuencia de aminoácidos unidos por enlace peptídico, mientras que la 2<sup>a</sup> y la 3<sup>a</sup> otorgan a la enzima su forma tridimensional (Figura 1) según se ha podido deducir por cristalografía de Rayos X.

La conformación que adopta la cadena polipeptídica debido a los enlaces de hidrógeno o estructura 2<sup>a</sup>, puede ser de tipo  $\alpha$ -helicoidal o de lámina  $\beta$ . La estructura 3<sup>a</sup> se refiere a la forma globular de la proteína, la cual se mantiene gracias a enlaces tipo disulfuro entre grupos tiol adyacentes y a enlaces iónicos entre grupos carboxílicos libres y grupos amino. Los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas son fundamentales en la estructura tridimensional total de la enzima. La estructura 4<sup>a</sup> sólo aparece en aquellas enzimas constituidas por varias subunidades, las cuales establecen entre sí asociaciones de tipo no covalente.

Debido a su estructura proteica, las enzimas son muy sensibles a los cambios que se producen en su entorno. La presencia de disolventes orgánicos, una concentración alta de sales, un pH o una temperatura extremas, pueden provocar la desnaturalización de la enzima, es decir, la pérdida de sus estructuras 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup>. Con pequeñas variaciones del pH o de la temperatura no se llega a la desnaturalización, pero la enzima pierde actividad al haber cambios en su conformación. En general, la mayoría de las enzimas desarrollan su actividad óptima a pH=7 y a una temperatura de 37°C.



**Figura 1.** Estructura de las enzimas: (a) estructura primaria; (b) estructura secundaria y (c) estructura terciaria.

Las enzimas se han clasificado sistemáticamente en 6 clases principales, cada una de las cuales se divide a su vez en subclases, según el tipo de reacción que catalizan (Tabla 1). Cada enzima se designa por un nombre recomendado, generalmente corto y apropiado para su uso habitual, por un nombre sistemático que identifica la reacción que cataliza y por un número de clasificación que identifica a la enzima de forma inequívoca. Para ilustrar con un ejemplo, las lipasas empleadas en la presente Tesis vienen clasificadas con el número E.C. 3.1.1.3, donde E.C. son las iniciales en inglés de Comisión de Enzimas, la primera cifra «3» representa el nombre de la clase (hidrolasa), la segunda cifra «1» representa a la subclase (esterasa, por hidrolizar un enlace éster), la tercera cifra «1» a la sub-subclase (esterasa que reconoce ésteres del glicerol) y la cuarta cifra «3» designa a la glicerol-éster-hidrolasa de ácidos de cadena larga.

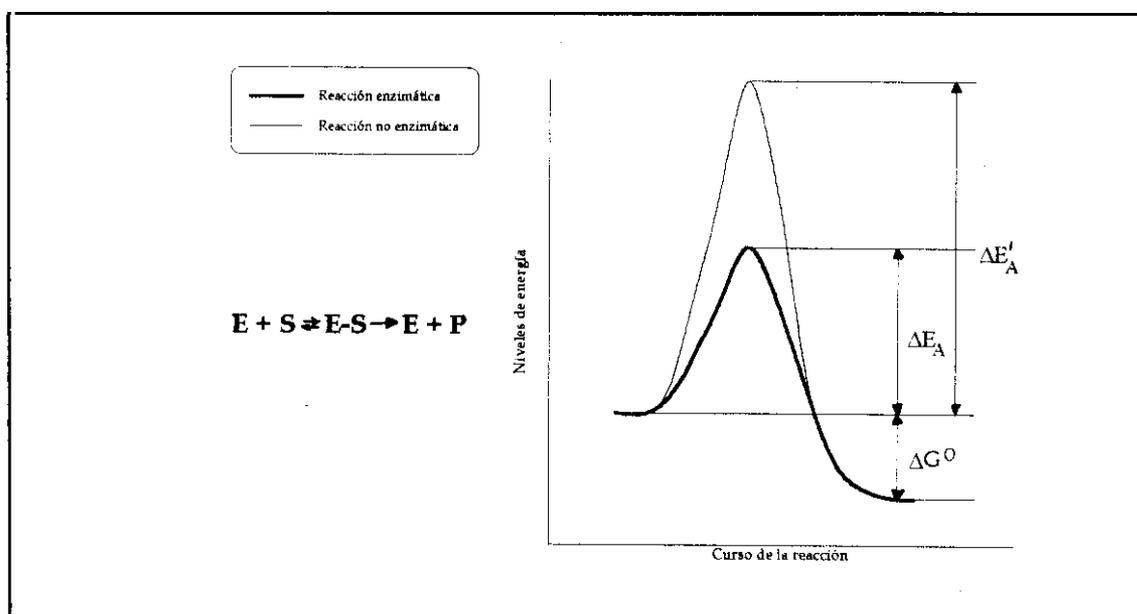
Tabla 1. Clasificación internacional de las enzimas.

1.- OXIDO REDUCTASAS: (Reacciones de oxido-reducción)	1.1 - Actúan sobre alcoholes >-OH 1.2 - Actúan sobre cetonas >C=O 1.3 - Actúan sobre alquenos >=CH- 1.4 - Actúan sobre grupos amino -NH <sub>2</sub> 1.5 - Actúan sobre grupos imino =NH
2.- TRANSFERASAS: (Transferencia de grupos funcionales)	2.1 - Grupos de un átomo de C 2.2 - Grupos aldehídicos o cetónicos 2.4 - Grupos glucosilo 2.7 - Grupos fosfato 2.8 - Grupos que contienen azufre
3.- HIDROLASAS: (Reacciones de hidrólisis)	3.1 - Esteres 3.2 - Enlaces glucosídicos 3.4 - Enlaces peptídicos 3.5 - Otros enlaces C-N 3.6 - Anhídridos de ácido
4.- LIASAS: (Adición a dobles enlaces)	4.1 - >C=C< 4.2 - >C=O 4.3 - >C=N-
5.- ISOMERASAS (Reacciones de isomerización)	5.1 - Racemasas
6.- LIGASAS: (Formación de enlaces con escisión de ATP)	6.1 - Entre átomos de C y O 6.2 - Entre átomos de C y S 6.3 - Entre átomos de C y N 6.4 - Entre átomos de C y C

### II.1.1.2. Catálisis enzimática y su aplicación a procesos biocatalizados.

Las enzimas, como catalizadores, tienen las siguientes características principales:

1) Como todo catalizador, **aceleran el curso de las reacciones** al disminuir la energía de activación necesaria para que se lleven a cabo. Las enzimas normalmente catalizan las reacciones con mayor eficacia que los catalizadores inorgánicos. Como ejemplo tenemos la descomposición del agua oxigenada en agua y oxígeno. La energía de activación necesaria para que suceda la reacción en ausencia de catalizador es de 75 KJ/mol. En cambio, esta energía es de 50 kJ/mol en presencia de platino, y disminuye a 8 kJ si está presente la peroxidasa (antiguamente denominada catalasa). Este efecto tan drástico se debe a que las enzimas forman un complejo intermedio enzima-sustrato, que posteriormente se transforma en la enzima inicial y el producto (Figura 2).



**Figura 2.** Efecto de la catálisis enzimática sobre la energía de activación.  $\Delta E_A$  es la energía de activación para una reacción catalizada por una enzima mientras que  $\Delta E'_A$  es aquella para una reacción no enzimática.  $\Delta G^\circ$  es la energía libre de la reacción.

2) **las enzimas son selectivas:** la formación del complejo enzima-sustrato sucede en una pequeña región de la enzima denominada centro activo, el cual suele estar localizado en un hueco o cavidad. La especificidad enzimática reside inherentemente en este centro activo, que posee las dimensiones correctas, la topología adecuada y el alineamiento óptimo de

grupos contraiónicos y regiones hidrofóbicas para acomodar a un sustrato específico. Solamente unos pocos aminoácidos (5-10) dentro del centro activo están directamente implicados en la catálisis enzimática y constituyen el centro de fijación. Estos aminoácidos no están localizados consecutivamente en la cadena polipeptídica, sino que se encuentran juntos tras el plegamiento característico de la enzima. De todas formas, aquellos aminoácidos que no intervienen directamente en la catálisis también son importantes, ya que son esenciales en el mantenimiento de la conformación activa de la enzima.

Se han propuesto varios modelos para explicar la selectividad de las enzimas sobre un determinado sustrato. El modelo de "la llave y la cerradura"<sup>8</sup>, que da una versión rígida de las enzimas, ha sido ampliamente superado por el modelo del "acoplamiento o encaje inducido"<sup>9</sup>. En este modelo, el sustrato induce la orientación de los residuos en el centro activo para que se una al centro de fijación y suceda la catálisis. La selectividad de las enzimas es la base de muchas aplicaciones en Síntesis Orgánica, como por ejemplo, la posibilidad de llevar a cabo transformaciones muy selectivas con estructuras quirales y polifuncionales.

3) **Las enzimas pueden ser objeto de regulación**, es decir, su actividad catalítica puede estar influenciada por la concentración de sustratos, productos y otras especies químicas presentes en solución. El tema de la regulación de las enzimas, de enorme importancia en los sistemas metabólicos donde normalmente actúan, es un inconveniente cuando se emplean como catalizadores. Así cuando la concentración del producto de la reacción biocatalizada aumenta hasta cierto valor, puede existir una inhibición de la enzima<sup>6c,10</sup>. Hay varias formas de evitar este problema: la eliminación del producto del medio de reacción a medida que se va formando (a veces un verdadero inconveniente) o el aumento de la cantidad de enzima (que supone un aumento en el coste).

4) Ciertas enzimas pueden requerir la **presencia de cofactores** para que sean activas. El aporte de estos cofactores y su regeneración significa un encarecimiento del proceso biocatalizado.

5) La mayoría de las enzimas son solubles en agua y presentan mayor actividad "in vivo" a pH=7-8 y a temperatura ambiente.

6) Se pueden utilizar varias enzimas en combinación para realizar transformaciones que sucedan en varios pasos sucesivos.

7) Las enzimas se degradan en condiciones relativamente suaves. Los químicos, acostumbrados a conservar sus catalizadores metálicos durante mucho tiempo sin una pérdida considerable de actividad, se enfrentan con unos biocatalizadores que requieren un manejo mucho más cuidadoso. Las enzimas se pueden desnaturalizar mediante diversos mecanismos como: la acción de proteasas presentes como contaminantes en los preparados enzimáticos; la temperatura o los cambios del medio que pueden alterar la conformación de la proteína; la contaminación microbiana; la autooxidación; etc. Por tanto la manipulación de las enzimas, tanto durante su utilización como durante su conservación, exige un manejo más delicado que con otro tipo de catalizadores.

La inestabilidad, el precio elevado y la especificidad respecto a sustrato son los principales inconvenientes que presentan los procesos catalizados por enzimas. Sin embargo, muchos de estos problemas se han superado por las siguientes razones:

1) Un gran número de reacciones enzimáticas transforman sustratos estereoselectivamente y originan intermedios o productos de mucho interés en síntesis.

2) Con el objetivo de utilizar los biocatalizadores en procesos industriales a gran escala, se han desarrollado técnicas que mejoran la estabilidad de las enzimas y que facilitan su recuperación y reutilización<sup>11</sup>.

3) Los avances de la Biología Molecular y los nuevos métodos del DNA recombinante han permitido la manipulación del material genético, el aislamiento de genes y su expresión con el fin de obtener determinadas proteínas en grandes cantidades<sup>12</sup>. Como consecuencia, el precio de las enzimas ha bajado espectacularmente. Estas técnicas también permiten la alteración estudiada de las propiedades de las enzimas.

4) La limitación que supone la insolubilidad de ciertos sustratos en agua, sobre los que las enzimas no son realmente activas, se ha visto en parte superada por la posibilidad de realizar reacciones en fases heterogéneas en las que una pequeña parte del sustrato está presente en una disolución donde se suspende la enzima<sup>13</sup>. A veces las enzimas pueden tolerar pequeñas concentraciones de un cosolvente orgánico como el etilenglicol, el glicerol, el dimetil sulfóxido (DMSO) o la dimetilformamida (DMF)<sup>14</sup>.

### II.1.1.3. Cinética enzimática.

La actividad enzimática se expresa en unidades que indican los micromoles de sustrato transformado o de producto formado por minuto en el curso de la reacción. Una unidad enzimática (UE) se suele definir como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto en unas determinadas condiciones de pH y temperatura. La actividad enzimática específica viene expresada como el número de UE/mg de proteína.

En una reacción enzimática simple en la que un sustrato S se transforma en un producto P por acción de una enzima E en un proceso que sigue una cinética de Michaelis-Menten<sup>15</sup> y sin inhibiciones por producto o por otras especies, la velocidad de aparición del producto viene dada por la ecuación [1]:

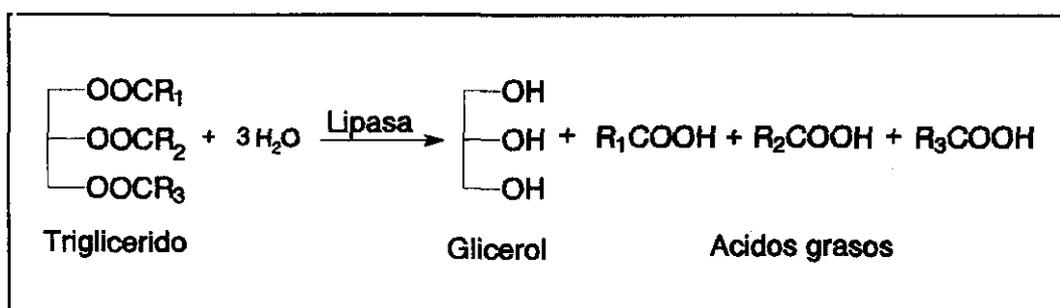
$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad [1]$$

Para una cantidad fija de enzima, un aumento en la concentración de sustrato da lugar a un aumento en la velocidad de reacción hasta que todos los sitios activos de la enzima se encuentran ocupados. Entonces un aumento en la concentración de sustrato no produce un aumento en la velocidad de reacción. Es más, si se aumenta mucho esta concentración, la mayoría de las enzimas se desactivan. La máxima eficacia en el empleo de la enzima viene establecida por su velocidad máxima,  $V_{\max}$ . La constante de Michaelis,  $K_m$ , nos indica la mínima concentración de sustrato que debe haber en solución para conseguir un empleo eficaz de la enzima. Los parámetros  $K_m$  y  $V_{\max}$  se calculan realizando ensayos de actividad a diferentes concentraciones de sustrato y aplicando los métodos gráficos de Lineweaver-Burk o Edie-Hofstee. A partir de la  $V_{\max}$  se puede calcular la contante catalítica,  $k_{cat}$ , o número de recambio de una enzima, que es el número máximo de moléculas de sustrato transformadas en producto por unidad de tiempo y por molécula de enzima totalmente saturada de sustrato, y que viene dada por la expresión [2]:

$$k_{cat} = \frac{V_{\max}}{[E]_T} \quad [2]$$

## II.1.2. LIPASAS

Las lipasas (glicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.3) son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis reversible de triacilglicéridos de grasas animales y de aceites vegetales para originar ácidos grasos y glicerol (Esquema 2). Esta hidrólisis tiene lugar a través de los pasos intermedios de formación de diacilglicéridos y monoacilglicéridos.



**Esquema 2.** Función biológica de las lipasas: la hidrólisis de triglicéridos.

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas por la Naturaleza y han sido aisladas en microorganismos, plantas y animales<sup>16</sup>. En concreto, las lipasas microbianas han recibido una atención especial debido a sus aplicaciones industriales, médicas y a su gran accesibilidad. Se pueden encontrar en bacterias, levaduras y hongos, y la mayoría son lipasas exocelulares, es decir, atraviesan la membrana celular una vez sintetizadas y pasan al medio externo. Muchas de estas lipasas microbianas han sido purificadas y secuenciadas<sup>17</sup>. En general son glicoproteínas que contienen entre un 3 y un 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.

La mayoría de las lipasas de origen microbiano presentan su actividad máxima a intervalos amplios de pH que van de 5,6 a 8,5<sup>18</sup>, y presentan máxima estabilidad a pH neutro<sup>19</sup>. Por otro lado, las lipasas son activas en intervalos amplios de temperatura, que varían de -20°C a 45°C, si bien el intervalo óptimo es de 30-45°C<sup>20</sup>. Por encima de los 40°C

muchas lipasas microbianas pierden rápidamente su actividad, a excepción de las producidas por *Aspergillus niger*, *Rhizopus japonicus*, *Chromobacterium viscosum* y *Geotrichum candidum* que son estables a temperaturas superiores a 50°C<sup>21</sup>.

### II.1.2.1. Estructura y mecanismo de acción de las lipasas.

Una concentración elevada de glicéridos y otros compuestos orgánicos en agua conduce a fases heterogéneas con la consiguiente formación de una **interfase**. Las lipasas tienen la capacidad de catalizar la hidrólisis del enlace éster en esta interfase situada entre una fase lipóide (que constituye el propio sustrato) y una fase acuosa donde la enzima está disuelta. Por tanto, las lipasas son capaces de hidrolizar micelas y emulsiones, a diferencia de las esterasas (carboxil éster hidrolasas, EC 3.1.1.1) que atacan a las moléculas de sustrato completamente solubles en agua<sup>22</sup>.

Las interpretaciones teóricas sobre la activación en la interfase y la posterior hidrólisis de los sustratos se han basado en los datos estructurales que se han divulgado recientemente para algunas lipasas. En estos estudios estructurales se ha recurrido a la mutagénesis dirigida y al análisis por difracción de Rayos X de los cristales obtenidos a partir de lipasas purificadas.

En el caso de la lipasa pancreática humana, la eliminación de la serina en posición 152 supone la inactivación de la enzima<sup>23</sup>. Este aminoácido está incluido en una secuencia Gly-His-Ser-Leu-Gly<sup>24</sup>, similar a la encontrada en la lipasa hepática porcina, que es Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly<sup>25</sup>. Hasta la fecha se han examinado más de 21 secuencias de lipasas, tanto en eucariontes como en procariontes, y a pesar de las diferencias existentes, siempre encontramos la secuencia consenso **Gly-X-Ser-X-Gly**<sup>26</sup>. Por esta razón se pensó en la existencia de un centro de reconocimiento de la interfase, topográficamente diferente al centro activo.

Desde 1990 se han descrito las estructuras tridimensionales de diez lipasas (Tabla 2). Estas estructuras, a pesar de que poseen diferentes secuencias de aminoácidos y difieren en tamaño (22-60 KDa), se pliegan de una forma similar y poseen centros activos parecidos. El plegamiento de todas estas lipasas se corresponde al modelo de  $\alpha/\beta$  hidrolasa en el que es característico un núcleo de láminas  $\beta$  (en su mayoría dispuestas paralelamente) rodeadas por

$\alpha$ -hélices<sup>27</sup>. Este plegamiento incluye la triada catalítica típica de las lipasas (serina, histidina y glutámico o aspártico), así como un hueco donde encaja un oxianión.

**Tabla 2.** Estructura cristalina de diversas lipasas determinada por Rayos X.

Lipasa de...	Peso (KDa)	Año	Archivo en PDB <sup>a</sup>
<i>Rhizomucor miehei</i> <sup>28</sup>	29,5	1990	3TGL
Pancreática humana <sup>23</sup>	~ 37	1990	-
<i>Pseudomonas glumae</i> <sup>29</sup>	33,1	1993	1THA
<i>Humicola lanuginosa</i> <sup>30</sup>	~ 30	1994	-
<i>Rhizopus delemar</i> <sup>30</sup>	~ 29	1994	-
<i>Penicillium camemberti</i> <sup>30</sup>	30,0	1994	-
<i>Candida antarctica</i> (B) <sup>31</sup>	33,3	1994	1TCA
<i>Geotrichum candidum</i> <sup>32</sup>	60	1991	1THG
<i>Candida rugosa</i> (abierto) <sup>33</sup>	60	1993	1CRL
<i>Candida rugosa</i> (cerrado) <sup>34</sup>	60	1994	1TRH

<sup>a</sup>Archivo de la estructura en el Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, Upton, Nueva York (EE.UU.).

Resumiendo, la acción catalítica de las lipasas se divide en dos etapas:

1) **Activación interfacial** : en solución acuosa, un segmento helicoidal de la cadena proteica denominado "tapadera" cubre el centro activo de la lipasa. En las lipasas pequeñas como la de *Mucor miehei* una única  $\alpha$ -hélice forma la tapadera mientras que en las lipasas de gran tamaño como la de *C. rugosa* está formada por dos  $\alpha$ -hélices. En presencia de una interfase o en un medio orgánico la tapadera se abre, lo que se ha comprobado recientemente mediante el análisis del complejo inhibidor-lipasa de *Mucor miehei*<sup>35</sup>. La apertura de la tapadera provoca un cambio total en la superficie de la entrada al centro activo, de manera que se vuelve más hidrofóbica y se favorece la interacción de la enzima con el sustrato (Figura 4).

2) **Hidrólisis del enlace éster del sustrato**: la hidrólisis sucede mediante un mecanismo similar al de las serín-proteasas<sup>36</sup> con los siguientes pasos (Figura 5):

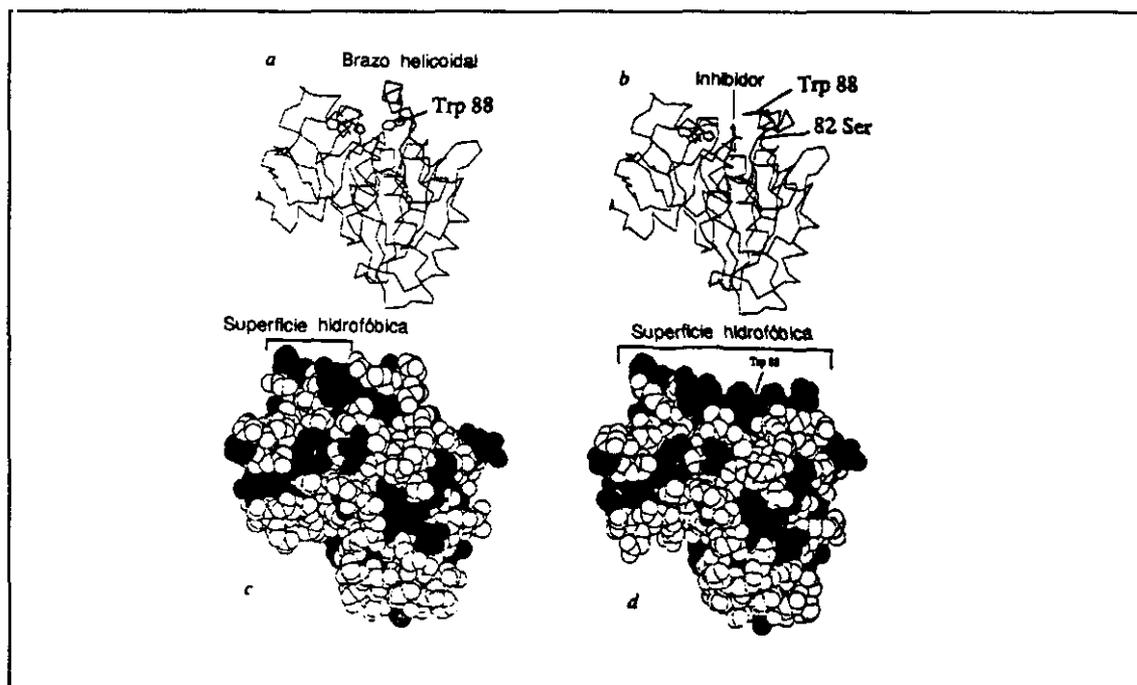


Figura 4. Activación interfacial de la lipasa de *Mucor miehei*.  
 c y a : enzima nativa; b y d: complejo inhibidor-lipasa.

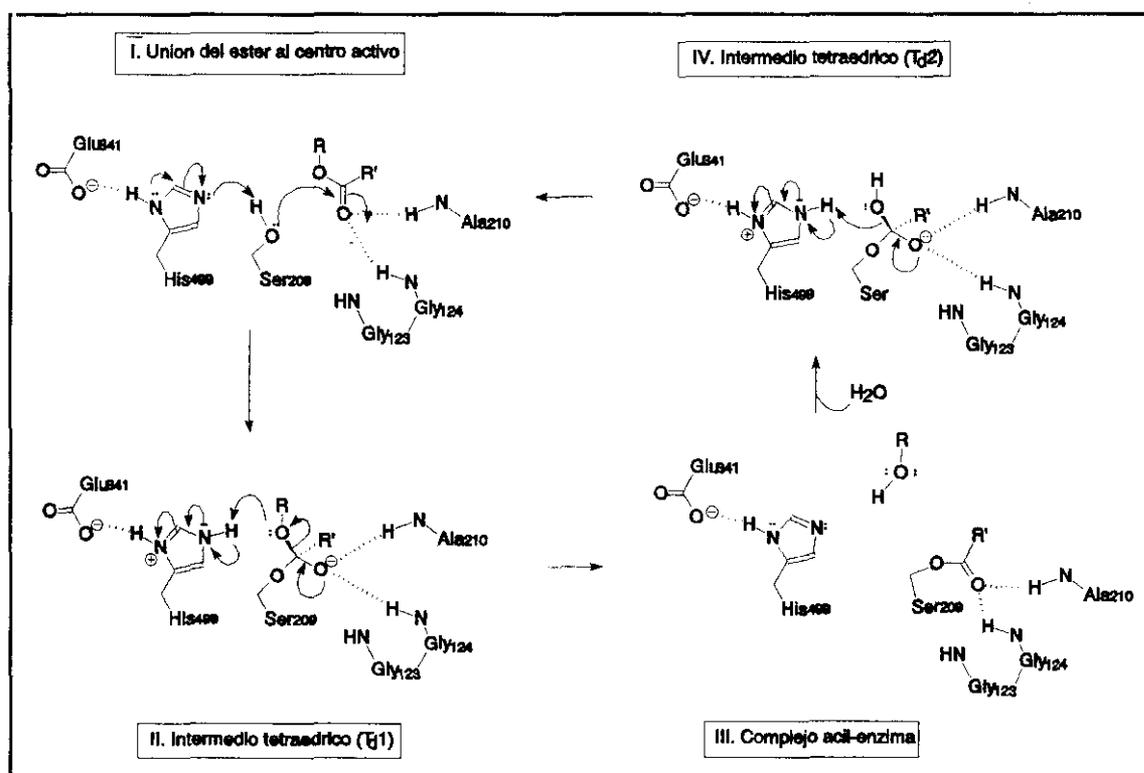


Figura 5. Mecanismo de acción de las lipasas. La numeración de los aminoácidos corresponde al centro activo de la lipasa de *Candida rugosa*.

I. El sustrato se sitúa en el centro activo de la lipasa de tal manera que el carbono carbonílico toma contacto con el grupo -OH de la serina. El protón del grupo hidroxilo de la serina se transfiere al N<sub>ε</sub> de la histidina de la triada catalítica y el O<sub>γ</sub> con carga negativa ataca nucleofílicamente al grupo carbonilo del sustrato con lo que se produce un intermedio tetraédrico (T<sub>d1</sub>).

II. La carga negativa, en un principio situada en el O<sub>γ</sub> de la serina, sufre una translocación hacia el oxígeno del grupo carbonilo, originando un oxianión. Este oxianión encaja en un hueco que se forma tras la apertura de la tapadera. En la cutinasa de *Fusarium solani*<sup>37</sup> y en la acetilcolinesterasa de *Torpedo californica*<sup>38</sup>, que carecen de tapadera y en las que no sucede la activación interfacial, también se ha observado este hueco en el centro activo.

III. El intermedio tetraédrico se rompe cuando el protón cedido a la histidina se transfiere al oxígeno de alcohol. El alcohol se libera y seguidamente se forma el complejo acil-enzima.

IV. Se produce un segundo ataque nucleofílico, esta vez de una molécula de agua sobre el carbono carbonílico del complejo acil-enzima. Se forma un nuevo intermedio tetraédrico (T<sub>d2</sub>) que, a continuación se rompe, liberando un ácido graso y regenerando el -OH de la serina.

La función del ácido glutámico/aspártico, presente en la triada catalítica, es la estabilización de la carga positiva generada sobre la histidina en los intermedios tetraédricos.

#### II.1.2.2. Homologías estructurales entre lipasas. Especificidad de sustrato.

Dentro de su estructura, todas las lipasas tienen en común un núcleo de láminas β paralelas rodeadas por α hélices. Además poseen una triada catalítica cuyo orden en la secuencia aminoacídica es similar. En la Tabla 3 se pueden observar las homologías existentes entre varias lipasas y esterasas. Se cree que todas estas enzimas proceden de un mismo gen y que posteriormente han sufrido una evolución diferente con el tiempo.

A pesar de esta similitud estructural y de la presencia de un mecanismo catalítico parecido, las lipasas presentan una especificidad de sustrato bien diferente entre ellas. Este comportamiento se debe a las variaciones estructurales en la región próxima al centro activo.

Los triglicéridos suelen ser moléculas grandes que deben encajar en la cavidad del centro activo para que puedan ser hidrolizados correctamente. En el caso de la lipasa B de *C. antarctica*, el centro activo se encuentra al final de un profundo y estrecho túnel que sólo es capaz de admitir triglicéridos de pequeño tamaño. En cambio, en la lipasa de *C. rugosa*, el túnel que está en las inmediaciones del centro activo, es capaz de albergar una cadena de, al menos, doce átomos de carbono. A continuación, veremos estas diferencias de especificidad entre las lipasas microbianas más comunes.

**Tabla 3.** Homologías en las secuencias aminoacídicas de varias hidrolasas.

Hidrolasa	Secuencia consenso alrededor de la serina (Gly-X-Ser-X-Gly)	Histidina	Asp/Glu	Bolsillo del oxiamión
Lipasa <u>P. glumae</u>	-Gly85-His86-Ser87-Gln88-Gly89-	-His285-Leu286-	-Asp263-	-Leu17-Ala18-
Lipasa <u>M. miehei</u>	-Gly142-His143-Ser144-Leu145-Gly146-	-His257-Leu258-	-Asp203-	-Gly81-Ser82-
Lipasa <u>H. lanuginosa</u>	-Gly144-His145-Ser146-Leu147-Gly148-	-His258-Leu259-	-Asp201-	-Gly82-Ser83-
Lipasa <u>P. cambembertii</u>	-Gly143-His144-Ser145-Leu146-Gly147-	-His259-Ile260-	-Asp199-	-Gly83-Ser84-
Lipasa <u>R. delemar</u>	-Gly143-His144-Ser145-Leu146-Gly147-	-His257-Leu258-	-Asp204-	-Gly82-Thr83-
Cutinasa <u>F. solani</u>	-Gly118-Tyr119-Ser120-Gln121-Gly122-	-His188-Leu189-	-Asp175-	-Gly41-Ser42-
Lip. pancreática humana	-Gly150-His151-Ser152-Leu153-Gly154-	-His263-Leu264-	-Asp176-	-Gly76-Phe77-
Lipasa <u>C. antarctica</u>	-Thr103-Trp104-Ser105-Gln106-Gly107-	-His224-Ala225-	-Asp187-	-Gly39-Thr40-
Lipasa <u>C. rugosa</u> (I)	-Gly207-Glu208-Ser209-Ala210-Gly211-	-His449-Ser450-	-Glu341-	-Gly123-Glu124-
Lipasa <u>G. candidum</u> (II)	-Gly215-Glu216-Ser217-Ala218-Gly219-	-His463-Gly464-	-Glu354-	-Gly131-Ala132-
Acetilcolinesterasa de <u>T. californica</u>	-Gly198-Glu199-Ser200-Ala201-Gly202-	-His440-Gly441-	-Glu327-	-Gly118-Gly119-

Las lipasas muestran diferentes **tipos de especificidad:**

- 1) especificidad para un determinado lípido
- 2) especificidad para una determinada posición en un triglicérido
- 3) especificidad para un determinado ácido graso del triglicérido

**1) Lipasas específicas para determinados lípidos:** Es el caso de la lipasa producida por una cepa de *Penicillium cyclopium*<sup>39</sup> que presenta mayor actividad sobre monoglicéridos que sobre di y triglicéridos. Este tipo de selectividad es dependiente de la temperatura en el caso de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*<sup>40</sup>.

2) En función de su **especificidad posicional**, las lipasas se dividen en dos grupos:

a) lipasas no específicas: no presentan una especificidad determinada por las posiciones 1,2 ó 3 de los triglicéridos. Dan lugar a ácidos grasos y glicerol, sin aparecer diglicéridos ni monoglicéridos como productos intermedios. A este grupo pertenecen las lipasas producidas por *C. rugosa*<sup>41</sup>, *C. antarctica*<sup>42</sup>, *Chromobacterium viscosum*<sup>43</sup>, *Pseudomonas fluorescens*<sup>44</sup> y *Geotrichum candidum*<sup>45</sup>.

b) lipasas específicas que pueden presentar dos tipos de especificidad posicional:

I. lipasas 1,3-específicas: liberan los ácidos grasos unidos a las posiciones 1 y 3 del glicerol. Este tipo de especificidad se ha observado en las lipasas de *Rhizopus arrhizus*<sup>55</sup>, *Aspergillus niger*<sup>45,46a</sup>, *Rhizopus delemar*<sup>47</sup> y *Mucor miehei*<sup>46a</sup>.

II. lipasas 2-específicas: este tipo de especificidad es extremadamente raro y sólo encontramos como ejemplo la lipasa de *Geotrichum candidum*, capaz de hidrolizar los ésteres del ácido oleico y linoleico en la posición 2 del glicerol<sup>47</sup>.

3) Otros factores que influyen en la especificidad de las lipasas son la **longitud de cadena** y el **grado de insaturación de los ácidos grasos del triglicérido**.

a) longitud de cadena: la lipasa de *Mucor miehei* presenta una actividad similar en la liberación de ácidos con 4 y 6 átomos de carbono a pH igual a 5,3 ó 8, en cambio, los ácidos grasos de cadena más larga se liberan más lentamente a pH ácido<sup>48</sup>. En las lipasas de *Chromobacterium viscosum*<sup>43</sup> y *Geotrichum candidum*<sup>49</sup>, la especificidad se centra preferentemente en los ácidos con 8 ó 10 átomos de carbono. La lipasas de *Penicillium cyclopium*<sup>50</sup> y *Candida antarctica*<sup>42</sup> son más activas frente a triglicéridos con ácidos de cadena corta que con los de cadena larga; las lipasas de *Aspergillus niger* y *Rhizopus delemar* muestran más actividad hacia triglicéridos con ácidos de longitud de cadena de tamaño medio<sup>50</sup>.

b) para una misma longitud de cadena de un determinado ácido graso, las lipasas muestran mayor preferencia a medida que aumenta el número de dobles enlaces en el esqueleto hidrocarbonado, hasta cierto número<sup>49</sup>.

### II.1.2.3. Aplicaciones de las lipasas microbianas.

La oferta comercial de lipasas microbianas por parte de laboratorios japoneses, europeos y americanos (Tabla 4), se ha incrementado espectacularmente, debido a su gran número de aplicaciones y a su bajo precio.

Tabla 4. Lipasas Microbianas Comerciales más utilizadas.

Lipasa de...	Nombre Comercial	Laboratorio Suministrador
<i>Aspergillus niger</i>	Amano A	Amano
<i>Candida rugosa</i>	Lipase OF, Amano Lipase AY	Sigma, Amano, Fluka
<i>Candida antarctica (B)</i>	SP525, SP435A, Novozym 435	Novo Nordisk, Fluka
<i>Geotrichum candidum</i>	Amano Lipase GC	Sigma, Amano
<i>Humicola lanuginosa</i>	Amano R-10, Lipolase	Amano, Novo Nordisk
<i>Mucor miehei</i>	Amano MAP-10, Lipozyme	Amano, Novo Nordisk
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Amano P, PS, PS30, LP80, SAM-I	Amano, Fluka
<i>Rhizopus arrhizus</i>	-	Sigma, Boehringer-Mannheim, Fluka

Las aplicaciones más importantes de las lipasas de origen microbiano son:

1. Hidrólisis de aceites y grasas (Industrias de Detergentes, Textil y de Alimentación):

a) para la obtención de ácidos grasos y glicerol a escala industrial, como Miyoshi Oil & Fat Co., laboratorio que emplea la lipasa de *C. rugosa* en la producción de jabones<sup>51</sup>. El proceso enzimático es más barato que el convencional y se obtienen productos con mejor olor y color;

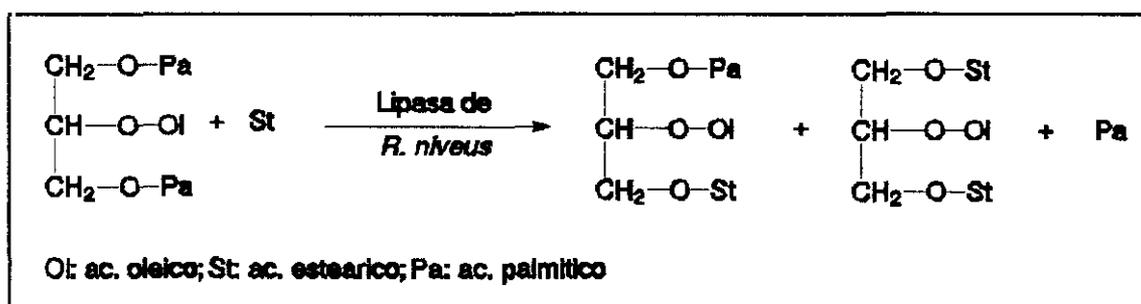
b) últimamente han aparecido en el mercado detergentes para prendas de vestir que contienen lipasas microbianas en su formulación<sup>52</sup> (un ejemplo es Lipolase™ de los laboratorios Novo Nordisk). Estos detergentes con "acción enzimática" permiten disminuir la temperatura de lavado, así como reducir la cantidad de surfactante y evitar la contaminación medioambiental.

c) la aparición del aroma en muchos productos lácteos se debe, en gran medida, a la

acción de las enzimas sobre la grasa de la leche. De esta forma, mediante el empleo de lipasas, se puede potenciar el aroma de los quesos y las mantequillas<sup>53</sup>. Concretamente el aroma del queso azul se consigue gracias a la actuación de lipasas microencapsuladas sobre determinados ácidos grasos<sup>54</sup>.

## 2. Interesterificación de aceites y grasas (Industria Alimentaria).

Las interesterificaciones, o intercambio de grupos acilo entre ésteres, se han utilizado predominantemente en la industria de los aceites y grasas para modificar la composición y/o las propiedades físicas de los triglicéridos. Una de estas industrias es la compañía japonesa Fuji Oil Co. que ha empleado la lipasa 1,3 específica de *Rhizopus niveus* para modificar la composición de los ácidos grasos del triglicérido que en mayor proporción se encuentra en el aceite de palma<sup>55</sup> (Esquema 3). Con la modificación han logrado, a partir de un aceite barato y abundante, una mezcla de triglicéridos que se corresponden a los presentes en el aceite de coco.

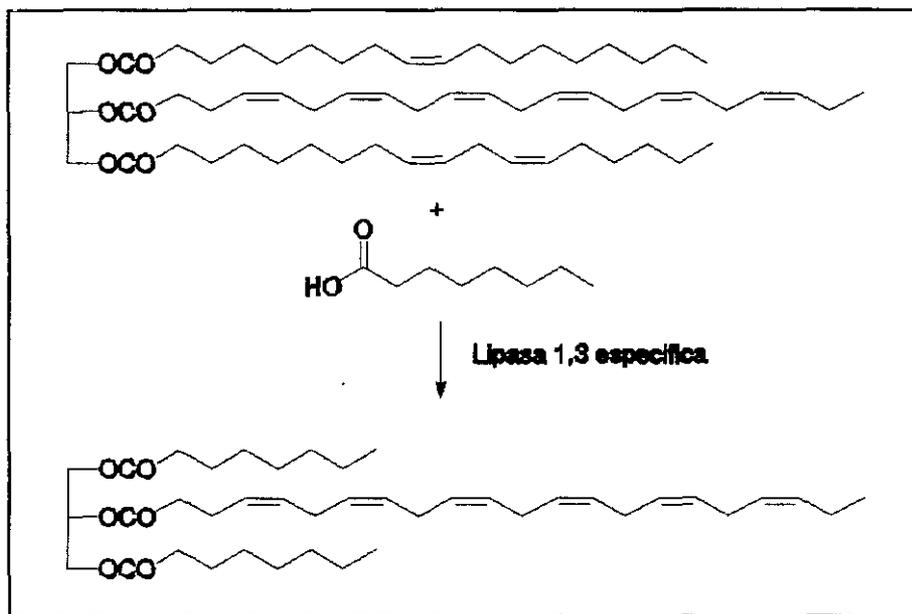


**Esquema 3.** Las interesterificaciones catalizadas por las lipasas permiten el intercambio de grupos acilos.

La industria alimentaria se ha beneficiado de estos métodos de interesterificación con triglicéridos. De esta forma, se han conseguido margarinas que no funden hasta los 30°C mediante el intercambio de cadenas de acilo saturadas por insaturadas<sup>56</sup>. En todos estos procesos el control del contenido en agua es muy importante.

La interesterificación también se ha empleado en la obtención de lípidos "estructurados" de gran utilidad en nutrición parenteral. Estos triglicéridos modificados contienen ácidos grasos de cadena media (por ejemplo de 8-12 átomos de carbono) en las posiciones 1 y 3 del glicerol, que son hidrolizados más eficientemente por la lipoproteínlipasa y la lipasa pancreática humana<sup>57</sup>. Estas enzimas, presentes en sangre e intestino

respectivamente, hidrolizan con más dificultad ésteres de ácidos grasos de cadena larga que de cadena media. Este hecho supone un gran avance en nutrición parenteral y enteral, ya que se pueden utilizar aceite de soja (con ácidos grasos de cadena media incorporados) como fuente de energía, en sustitución de aceites naturales (Esquema 4). Estos últimos, administrados continuamente, superan las necesidades diarias de ácidos grasos poliinsaturados, con riesgo de toxicidad<sup>58</sup>.



Esquema 4. Formación de triglicéridos de interés en nutrición parenteral.

### 3. Esterificaciones e hidrólisis de ésteres (Industria Alimentaria, Farmacéutica y Química).

a) Esterificación de ácidos grasos. Los alcoholes terpénicos y sus ésteres son componentes mayoritarios de los aceites esenciales y son conocidos por su aroma y sabor<sup>59</sup>. Al sintetizar químicamente estos ésteres, sus propiedades organolépticas disminuyen a diferencia de los obtenidos de fuentes naturales<sup>60</sup>. Mediante métodos enzimáticos se pueden obtener estos ésteres con una calidad semejante a los naturales<sup>61</sup>. En concreto, las lipasas se han mostrado eficaces en la esterificación de alcoholes terpénicos con ácidos grasos de cadena corta y mediana<sup>62</sup>.

b) Esterificaciones e hidrólisis enantioselectivas. En Química Orgánica, el mayor interés de las lipasas radica en su aplicación a la síntesis de compuestos ópticamente activos mediante la hidrólisis o la síntesis enantioespecífica de ésteres<sup>63</sup>.

c) Esterificaciones regioselectivas. Las lipasas también se están empleando en la síntesis de nuevos compuestos que son difíciles de obtener mediante los métodos químicos tradicionales. Por ejemplo, se han conseguido llevar a cabo acilaciones regioselectivas en esteroides<sup>64</sup>, hidratos de carbono<sup>65</sup> y glicoles<sup>66</sup>.

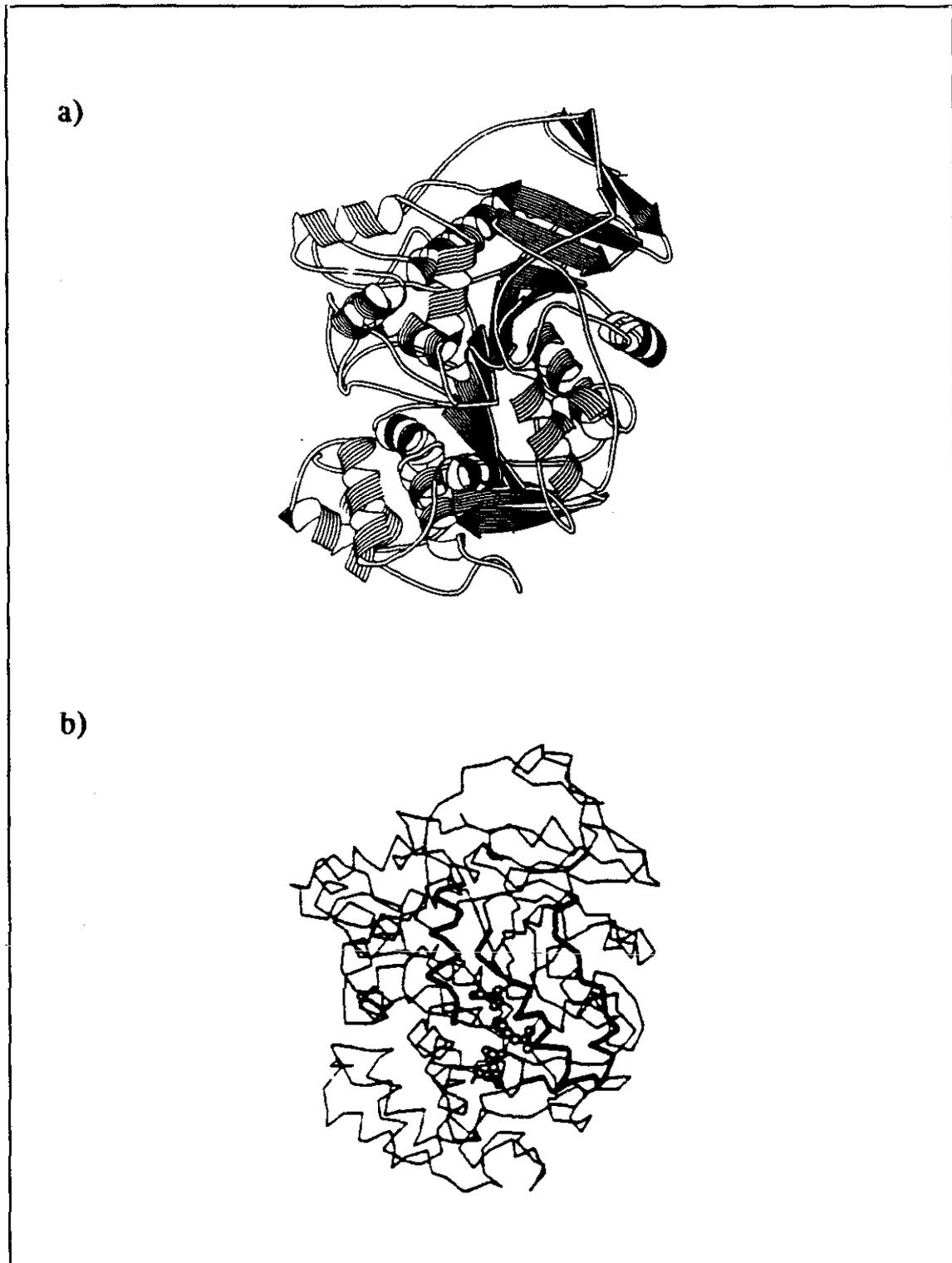
#### II.1.2.4. Lipasa de *Candida rugosa*

*Candida rugosa* es una levadura no formadora de esporas, aislada por primera vez de suelos naturales en 1962<sup>67</sup>. Tomizuka y cols.<sup>68</sup> purificaron en 1966 una preparación comercial de la lipasa que sintetiza esta levadura, para determinar su composición en aminoácidos y su peso molecular. La enzima poseía residuos hidrofóbicos (leucina e isoleucina principalmente) y contenía también xilosa y manosa, por lo que se trataba de una glicoproteína. Desde entonces y hasta 1989, a pesar de que esta enzima se había empleado para una amplia variedad de propósitos, poco se conocía de su estructura proteica. En 1992 se descubrió que *Candida rugosa* produce cinco formas isoenzimáticas de lipasa<sup>69</sup>, cuando en un principio se pensaba que producía exclusivamente dos isoenzimas<sup>70</sup>.

En la actualidad se habla indistintamente de lipasa de *C. rugosa* o *C. cylindracea*, aunque el contenido en guanina/citosina de los genes que codifican la síntesis de las lipasas de estas levaduras es bien diferente: 61 % para la lipasa de *C. cylindracea* y un 49 % para la de *C. rugosa*<sup>71</sup>.

Todas las isoformas de la lipasa de *C. rugosa* presentan una gran similitud con la lipasa de *Geotrichum candidum*, en las que el 45 % de la secuencia aminoacídica coincide<sup>72</sup>. A partir de este hecho y basándose en la estructura conocida por rayos X de la lipasa de *G. candidum*<sup>72</sup> se ha propuesto un modelo estructural para la lipasa de *C. rugosa*<sup>73</sup> representado en la Figura 6.

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 6b). En su conformación abierta, la lipasa de *C. 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<sub>γ</sub> expuesto al medio.



**Figura 6.** La lipasa de *Candida rugosa*. (a) Representación tridimensional; (b) Modelo estructural. Las líneas gruesas corresponden a la tapadera y las esferitas a la triada catalítica

### II.1.2.5. Lipasa B de *Candida antarctica*.

*Candida antarctica* es una levadura que produce dos formas isoenzimáticas de lipasa: la lipasa A con un peso molecular de 45 KDa y un punto isoelectrónico  $pI=7,5$ ; y la lipasa B con un peso de 33 KDa y un  $pI=6,0$ <sup>74</sup>. Estas enzimas fueron aisladas debido a su aplicación potencial en muchos procesos industriales<sup>75</sup>.

La lipasa B es la isoforma más interesante dentro del campo de la Síntesis Orgánica a tenor de las referencias aparecidas últimamente en la bibliografía. Así esta enzima inmovilizada ha sido empleada en la síntesis de triglicéridos<sup>76</sup> y de ésteres de alcoholes terpénicos<sup>77</sup>, así como en esterificaciones regioselectivas de azúcares<sup>78</sup>, nucleósidos<sup>79</sup> y esteroides<sup>80</sup>.

La estructura de la lipasa B de *Candida antarctica* contiene siete láminas  $\beta$  rodeadas por 10  $\alpha$ -hélices, con una dimensión de 30 x 40 x 50 Å (Figura 7). La secuencia consenso Gly-X-Ser-X-Gly, existente en la mayoría de las lipasas, no aparece en esta enzima. En su lugar aparece la secuencia Treonina-W-Serina-Q-Glicina. La triada catalítica está compuesta por serina 105, aspártico 187 e histidina 224. La serina se encuentra rodeada por la treonina 40, la glutamina 157 y el ácido aspártico 134, aminoácidos unidos por enlace de hidrógeno y cuyos átomos polares se sitúan a 5 Å del  $O_\gamma$ . Estos residuos están expuestos al disolvente y pueden tener una función importante en la especificidad de sustrato.

El entorno del centro activo está formado por una cavidad de 12 Å de profundidad desde el  $O_\gamma$  de la serina hasta la superficie de la proteína, y una anchura de 10 x 4 Å. Esta cavidad está delimitada por tres regiones de la proteína: la espiral comprendida entre los aminoácidos 242 y 268; la hélice  $\alpha_{10}$  (del residuo 268 al 287, cerca del extremo C-terminal) y la hélice  $\alpha_5$ . Esta última  $\alpha$ -hélice es de pequeño tamaño (entre los residuos 142 y 146) y posee gran movilidad, por lo que pudiera desempeñar la función de "tapadera". La entrada a la cavidad del centro activo se sitúa en el centro de una gran superficie plana de 450 Å<sup>2</sup>, con forma triangular y ligeramente cóncava. En esta superficie hay muchas cadenas alifáticas de aminoácidos - que pueden interaccionar con la interfase durante la hidrólisis de lípidos - así como tres residuos cargados (aspártico 223, glutámico 188 y lisina 290) cercanos a la entrada de la cavidad.

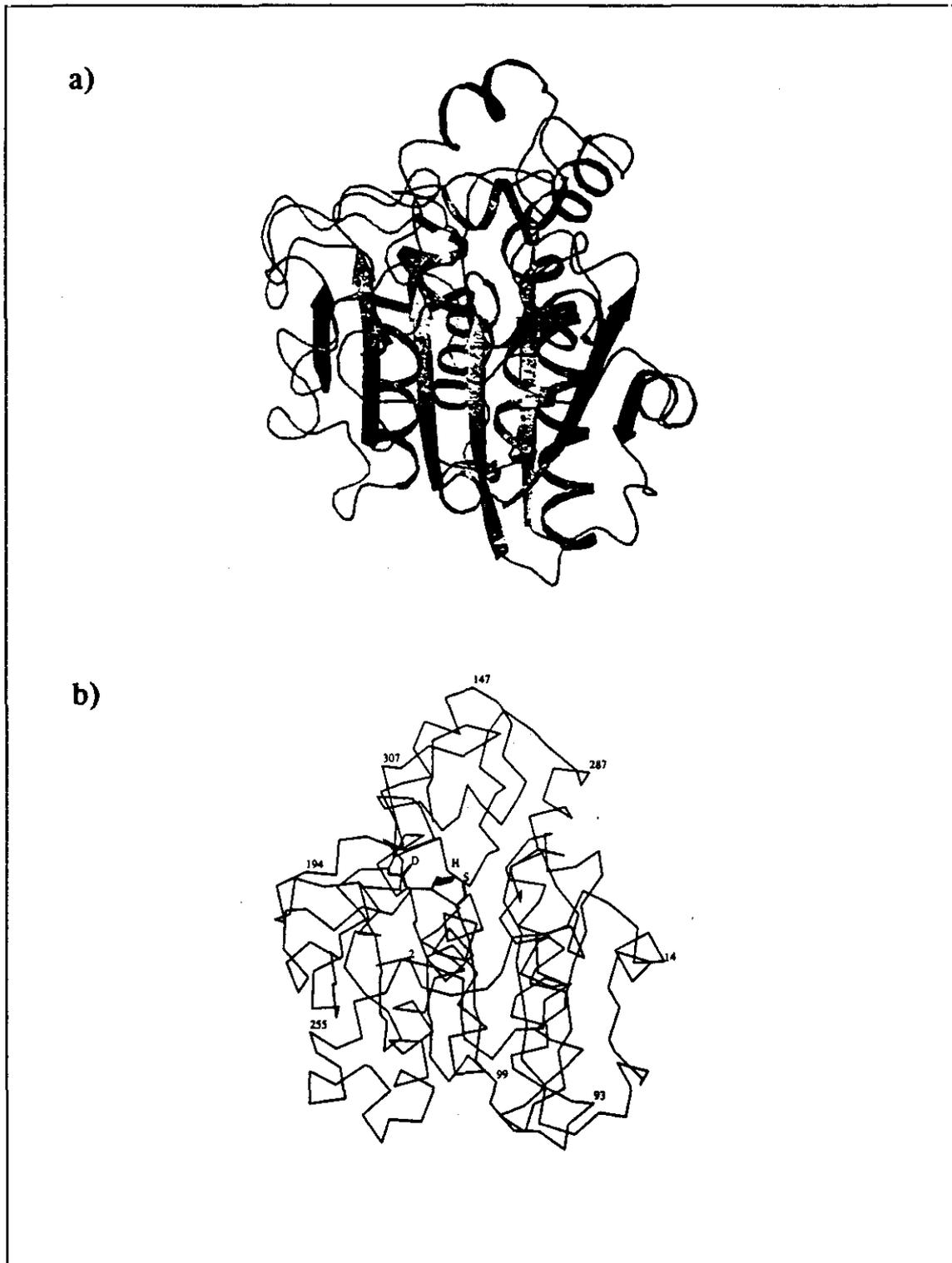


Figura 7. La lipasa B de *Candida antarctica*. (a) Estructura tridimensional; (b) Modelo estructural

## II.1.3. INMOVILIZACIÓN DE LIPASAS

### II.1.3.1. Aspectos generales sobre la inmovilización de enzimas.

La inmovilización de enzimas según la definición establecida en la 1ª Conferencia sobre Ingeniería Enzimática<sup>81</sup>, es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte<sup>82</sup>.

Como **ventajas** del empleo de enzimas inmovilizadas podemos destacar:

- 1.- La posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costes del proceso.
- 2.- El aumento de la estabilidad de la enzima frente a los cambios de pH y al aumento de la temperatura.
- 3.- El estudio bioquímico de sistemas proteicos *in vivo* que difícilmente podrían ser simulados en soluciones homogéneas<sup>83</sup>.

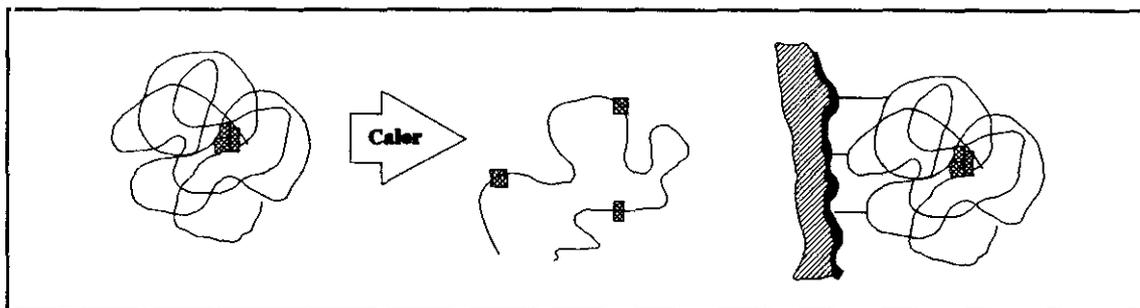
Los principales **inconvenientes** del proceso de inmovilización son<sup>84</sup>:

- 1.- La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.
- 2.- La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteína inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.
- 3.- Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización.
- 4.- El biocatalizador es más caro que la enzima nativa.

El incremento en la estabilidad de las enzimas generalmente observado después de la inmovilización se explica por una restricción en los cambios conformacionales de la enzima debido a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte. La enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química (Esquema 5).

Se han utilizado una gran variedad de materiales naturales o sintéticos, orgánicos e inorgánicos, como **soportes** para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente nos los encontramos

en forma de cilindro, hojas, fibras y más corrientemente en forma de esferas.



Esquema 5. La inmovilización estabiliza a la enzima al restringir su libertad de movimiento.

Los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos, en función de su naturaleza:

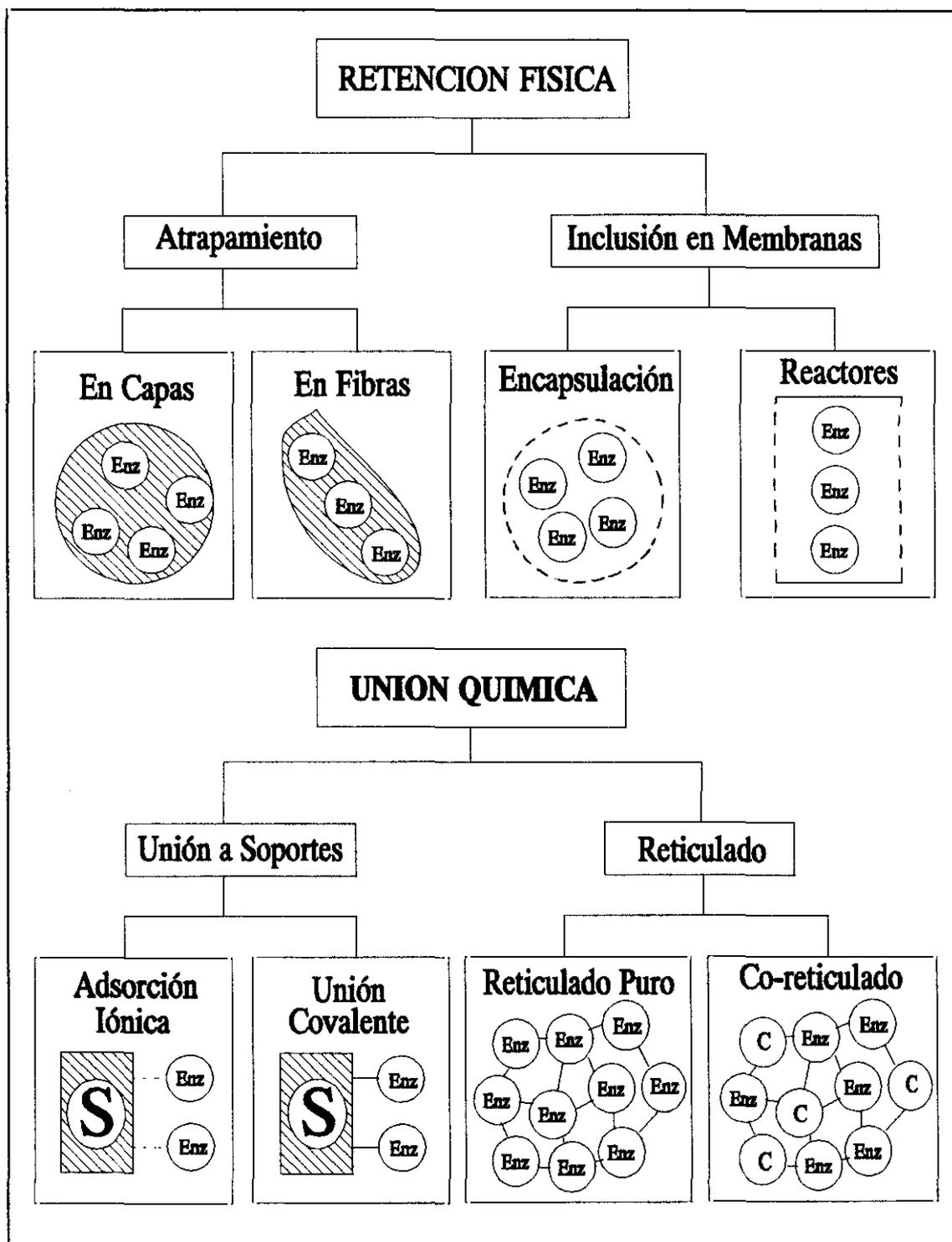
1) Soportes inorgánicos. Dentro de este grupo tenemos una gran variedad de tipos de soportes como pueden ser: sílice, bolas de vidrio, alúmina, ortofosfatos y fosfatos, óxidos de magnesio, óxidos de titanio, tierras de diatomeas, etc.

2) Soportes orgánicos. Estos a su vez se pueden subdividir en diferentes subgrupos:

- Proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc).
- Polímeros sintéticos (acrilatos, acrilamidas, alcohol polivinílico, etc).
- Polisacáridos (sefadex, celulosa, agarosa, quitina, zuro de maíz, etc).
- Otros: hidrogeles, resinas fenólicas, etc.

Desde que en 1916 se inmovilizó la invertasa sobre alúmina y carbón, se han desarrollado un elevado número de técnicas para la inmovilización de enzimas<sup>11a</sup>. Normalmente no existe un método que se pueda considerar el mejor para inmovilizar enzimas en general, por lo que resulta muy interesante examinar todos los métodos disponibles y compararlos, ya que la actividad, estabilidad y facilidad de manejo del biocatalizador puede variar enormemente y de forma imprevisible con el método utilizado. En general, los **métodos de inmovilización** se pueden dividir en dos grandes categorías: 1) *Retención física* y 2) *Unión química* (Esquema 6).

Los derivados inmovilizados preparados deben estar caracterizados según las indicaciones establecidas por el *Working Party on Immobilized Biocatalysts*<sup>85</sup>, que aparecen resumidas en la Tabla 5.



Esquema 6. Métodos generales de inmovilización de enzimas.

**Tabla 5.** Indicaciones para la caracterización completa de un derivado inmovilizado

<b>CARACTERIZACIÓN DE UN DERIVADO INMOVILIZADO</b>	<b>Descripción general</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Esquema de reacción</li> <li>2. Enzimas a insolubilizar</li> <li>3. Tipo de soporte empleado</li> <li>4. Método de inmovilización</li> </ol>
	<b>Preparación</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Condiciones de reacción</li> <li>2. Rendimiento en peso seco</li> <li>3. Actividad residual del sobrenadante</li> </ol>
	<b>Caracterización físico-química</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Configuración del biocatalizador</li> <li>2. Grado de hinchamiento</li> <li>3. Grado de compresibilidad en columna</li> <li>4. Abrasión en sistemas de agitación</li> <li>5. Velocidad mínima de fluidización</li> </ol>
	<b>Cinética</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Estabilidad de la enzima almacenada</li> <li>2. Estabilidad operacional</li> <li>3. Posibilidad de reutilización</li> <li>4. Grado de conversión</li> <li>5. Limitaciones difusionales</li> </ol>

En la Tabla 6 se presenta un breve resumen de las ventajas e inconvenientes de estos métodos de insolubilización.

**Tabla 6.** Comparación de los diferentes métodos de inmovilización

<b>METODO</b>	<b>Inclusión en membranas</b>	<b>Atrapamiento</b>	<b>Reticulado</b>	<b>Adsorción química</b>	<b>Unión covalente</b>
<b>Preparación</b>	Intermedia	Difícil	Intermedia	Sencilla	Difícil
<b>Fuerza de unión</b>	Débil	Media	Débil-Media	Media	Fuerte
<b>Actividad enzimática</b>	Media-Alta	Baja	Baja	Media	Alta
<b>Regeneración soporte</b>	Posible	Imposible	Imposible	Posible	Difícil
<b>Coste proceso</b>	Medio-Alto	Medio	Medio	Bajo	Alto
<b>Estabilidad</b>	Media	Alta	Alta	Baja	Alta
<b>Validez</b>	General	General	Limitada	General	Limitada
<b>Resistencia microbiana</b>	Sí	Sí	Sí	No	No

En el siguiente apartado, explicaremos de forma resumida los diferentes métodos aplicados a la inmovilización de lipasas.

## II.1.3.2. Lipasas inmovilizadas

### II.1.3.2.1. Lipasas inmovilizadas por *RETENCIÓN FÍSICA*

A) **ATRAPAMIENTO**: consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano.

Tabla 7. Lipasas inmovilizadas por atrapamiento

Lipasa de...	Gel de atrapamiento
<i>Humicola lanuginosa</i>	Alginato <sup>86</sup> ; Polipropilenglicol <sup>86</sup>
<i>Pseudomonas sp.</i>	Colágeno <sup>87</sup>
<i>Rhizopus delemar</i>	Polipropilenglicol <sup>88</sup>
<i>Rhizopus arrizhus</i>	Polipropilenglicol <sup>88</sup>
<i>Mucor miehei</i>	Colágeno <sup>87</sup>
<i>Candida rugosa</i>	Polietilenglicol; Polipropilenglicol <sup>89</sup>
<i>Candida cylindracea</i>	Poliacrilamida <sup>90</sup> ; Poliuretano <sup>91</sup> ; Alginato <sup>92</sup> ; Carragenina <sup>93</sup> ; Alcohol polivinílico <sup>93</sup>

El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se produce la polimerización con lo que se obtiene un derivado de naturaleza gelatinosa. En la Tabla 7 aparecen algunos ejemplos de lipasas inmovilizadas por atrapamiento.

B) **INCLUSIÓN EN MEMBRANAS**: Dividida en dos tipos:

1) *Microencapsulación*: En esta técnica, descrita por primera vez por Chang<sup>94</sup> en 1964, las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes

(generadas por surfactantes). Mediante esta metodología se han inmovilizado diferentes lipasas microbianas y obtenido derivados estables al almacenamiento a 4°C durante al menos 3 meses<sup>95</sup>. La microencapsulación de lipasas se ha empleado en la industria alimentaria para acelerar el proceso de curación de los quesos<sup>96</sup>.

2) *Reactores de membrana*: El desarrollo de reactores o sistemas que contengan enzimas atrapadas ha despertado gran interés en la industria. Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor. En general, en esta metodología, se procede inicialmente a la adsorción de la enzima sobre la membrana que formará el reactor. Esta adsorción se puede realizar de dos formas:

- 1.- mediante el paso de una solución tamponada de enzima a través de la membrana; esta técnica se ha utilizado en la adsorción de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* sobre membranas acrílicas<sup>97</sup> y en la inmovilización de la lipasa de *C. rugosa* sobre membranas celulósicas<sup>98</sup>.
- 2.- por contacto continuo de una solución de enzima con la membrana; en este caso como ejemplos tenemos las lipasas de *R. delemar*, *P. fluorescens*, *M. miehei* y *C. viscosum* inmovilizadas sobre membranas de polipropileno<sup>99</sup>.

#### II.1.3.2.2. Lipasas inmovilizadas por **UNIÓN QUÍMICA**

A) **RETICULADO**: también denominado entrecruzamiento o "cross-linking". El método del reticulado consiste en uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. En 1967, Hartman y Wold<sup>100</sup> introdujeron por vez primera esta técnica en la química de proteínas y, desde entonces, ha sido ampliamente utilizada en la estabilización de muchas enzimas<sup>101</sup>. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehidos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e, incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida.

Un procedimiento muy común consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre una resina de intercambio iónico o un soporte polimérico (con lo que se consigue una elevada

carga enzimática) y posteriormente añadir el reactivo bifuncional. Concretamente, el reactivo más empleado en el entrecruzamiento de lipasas es el **glutaraldehído** (v.g. las lipasas de *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizopus*<sup>102</sup> y *Candida*<sup>103,104</sup>), aunque también se ha empleado la heximetilendiamina (v.g. la lipasa de *H. lanuginosa*<sup>86</sup>).

## B) UNIÓN A SOPORTES:

### 1. Lipasas inmovilizadas por *ADSORCIÓN*

Es el método más empleado en la obtención de derivados inmovilizados de lipasa. La enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. El procedimiento general consiste en la unión electrostática de la enzima al soporte por impregnación y posterior liofilización del derivado.

Los principales factores que se deben tener en cuenta al realizar la adsorción, son:

- 1.- el pH del medio: controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido;
- 2.- la fuerza iónica: al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína;
- 3.- el diámetro de poro: debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima;
- 4.- la presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima, pueden incrementar la carga enzimática del derivado.

Como principales ventajas de este método destacan: su preparación sencilla, su bajo coste, no hay cambios de especificidad enzimática y los derivados son estables en medios de trabajo con bajo contenido en agua. Los inconvenientes se centran en la optimización de las variables que controlan la adsorción, así como que los derivados obtenidos son poco estables desde el punto de vista mecánico, ya que la unión es débil.

Algunos ejemplos de inmovilización de lipasas por adsorción aparecen en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Lipasas inmovilizadas por adsorción.

Lipasa de...	Soporte
<i>Aspergillus niger</i>	Celite <sup>105</sup> ; Vidrio poroso (CPG) <sup>106</sup> ; Polipropileno <sup>107</sup>
<i>Humicola lanuginosa</i>	Amberlite <sup>86</sup>
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Celite <sup>108</sup>
<i>Geotrichum candidum</i>	Alúmina <sup>102</sup>
<i>Mucor miehei</i>	Celite <sup>109</sup>
<i>Rhizopus delemar</i>	Vidrio poroso <sup>110</sup> ; Celite <sup>88</sup>
<i>Candida rugosa</i>	Titanio <sup>111</sup> ; Sefadex <sup>112</sup> ; Celulosa <sup>113</sup> ; Poliestireno <sup>114</sup>
<i>Candida cylindracea</i>	Spherosil <sup>115</sup> ; Celite <sup>116</sup> ; Sílice <sup>117b</sup> ; Alúmina <sup>117a</sup> ; Vidrio poroso <sup>117a</sup> ; Carbón activo <sup>117b</sup> ; Polipropileno <sup>118</sup> ; Celulosa <sup>119</sup> ; Sefarosa <sup>120</sup>

Una variante dentro de la técnica de la adsorción consiste en emplear *resinas de intercambio iónico*, las cuales contienen grupos funcionales y contraiones móviles. Estos contraiones se pueden intercambiar reversiblemente por otros iones de la misma carga, sin que se produzcan cambios en la matriz insoluble. Las lipasas se pueden inmovilizar mediante este método, ya que estas proteínas pueden estar cargadas según el pH del medio y su composición en aminoácidos. Siguiendo este procedimiento, se han inmovilizado las lipasas de *Mucor miehei* sobre Duolite<sup>121</sup> y otras resinas macroporosas<sup>122</sup>, la de *Candida rugosa* sobre Duolite y Amberlite<sup>110</sup>, y finalmente la de *Candida antarctica* sobre Duolite y otras resinas macroporosas<sup>75</sup>.

## 2. Lipasas inmovilizadas por *UNIÓN COVALENTE*

La unión covalente de una enzima a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. Los grupos funcionales implicados con mayor frecuencia en la unión a soportes son los grupos  $\epsilon$ -amino de las lisinas y los grupos carboxílico del ácido aspártico y glutámico, todos ellos situados hacia el exterior de la superficie proteica.

**Ventajas:**

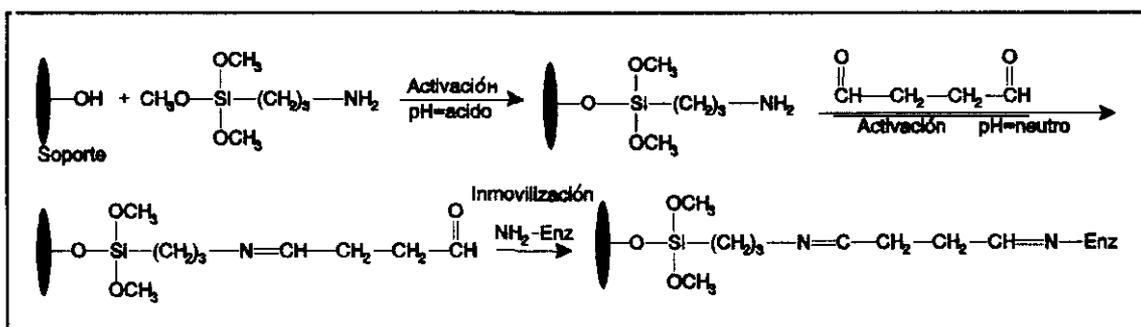
- 1.- La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla;
- 2.- La carga de enzima permanece constante después de la inmovilización;
- 3.- Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado, tanque agitado.
- 4.- Mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria.

**Inconvenientes**

- 1.- Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
- 2.- El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo.
- 3.- La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

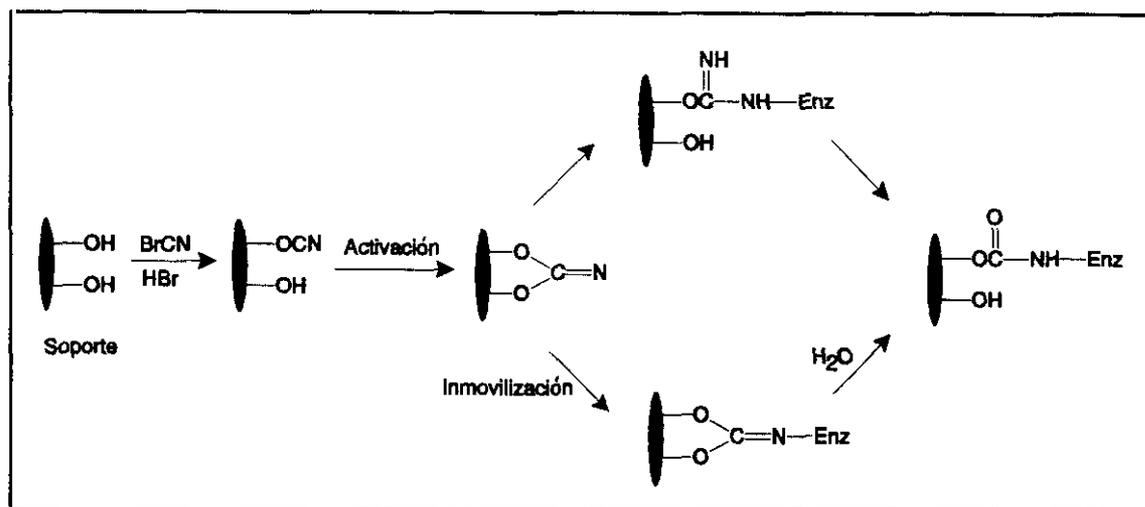
A continuación citaremos algunos de los métodos más empleados en la inmovilización covalente de lipasas (Esquemas 7-11):

1) *Vía aminosilano*: se funcionaliza un soporte inorgánico con  $\gamma$ -aminopropil-trimetoxi-silano en medio acuoso o en tolueno. Ha sido empleado en la inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae* sobre alúmina<sup>123</sup> y en la de *C. rugosa* sobre vidrio poroso<sup>124</sup>.



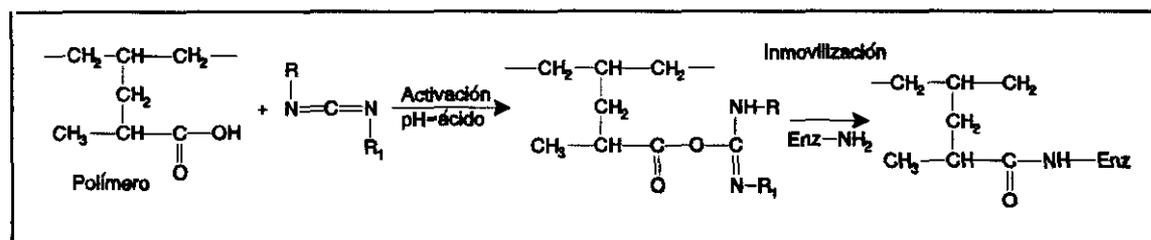
Esquema 7. Inmovilización covalente *Via aminosilano*

2) *Método del bromocianógeno*. Fue descrito por Ritz y cols.<sup>125</sup> en 1961. Se ha recurrido a este método para inmovilizar las lipasas de *Geotrichum candidum* en agarosa<sup>126</sup> y la de *Candida rugosa* sobre sefarosa<sup>127</sup>.



Esquema 8. Inmovilización covalente mediante el *Método del bromocianógeno*.

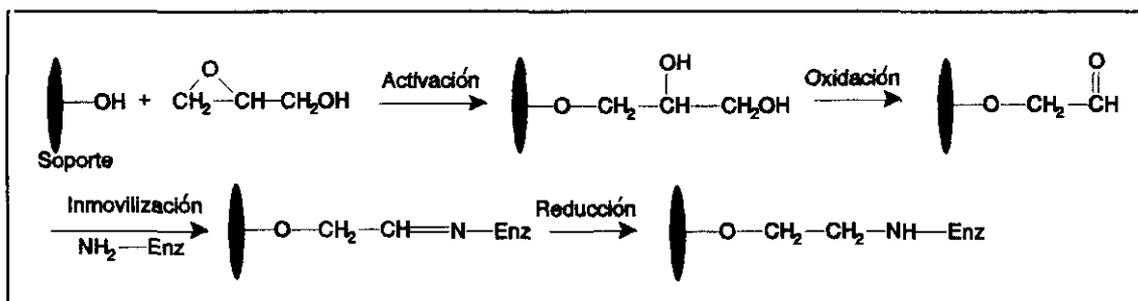
3) *Método de la carbodiimida*. La unión de enzimas a polímeros carboxílicos vía carbodiimida fue descrita en 1965 por Weliky y Weetal<sup>128</sup>. Siguiendo esta metodología, se han activado aminoalquilderivados del vidrio, carboximetil-celulosa y carboxil-agarosa para posteriormente inmovilizar la lipasa de *Geotrichum candidum*<sup>126</sup>. Por otra parte, la lipasa de *C. rugosa* se ha inmovilizado sobre quitosan activado mediante este método<sup>103</sup>.



Esquema 9. Inmovilización covalente mediante el *Método de la carbodiimida*

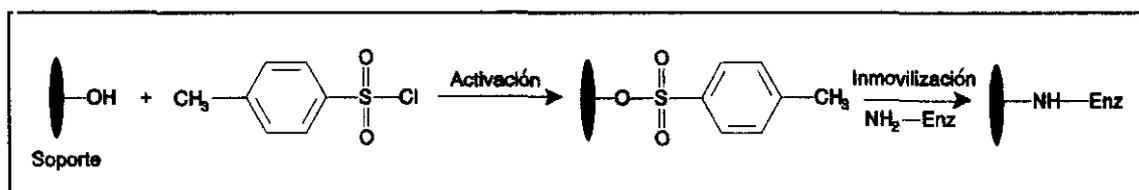
4) *Método del glicidol*. Permite la polifuncionalización de polisacáridos como la agarosa, la obtención de derivados muy estables y el control del número de uniones enzima-

soporte<sup>129</sup>. Mediante este método se ha inmovilizado la lipasa de *C. rugosa*<sup>130</sup>.



Esquema 10. Inmovilización covalente mediante el *Método del glicidol*

6) *Vía cloruros de tosilo*. Es un método rápido y de manejo sencillo. Descrito por Mosbach y cols.<sup>131</sup> con el cloruro de p-toluen sulfonilo, se ha ampliado a otros compuestos similares y derivados de éste. Mediante esta técnica se ha podido inmovilizar la lipasa de *C. rugosa* sobre quitina, sefarosa y trisacril, todos estos soportes tosilados<sup>103</sup>.



Esquema 11. Inmovilización covalente mediante el *Método del cloruro de tosilo*

## II.2. PARTE EXPERIMENTAL

### II.2.1. Lipasas nativas y sustratos.

En esta Memoria se ha trabajado con las siguientes **lipasas**:

a) Lipasa de *Candida rugosa* (EC 3.1.1.3) tipo VII, (LCR), suministrada por Sigma Chemicals Co. (Missouri, EE.UU.). El preparado comercial poseía una actividad de 900 U/mg sólido, donde 1 unidad es la cantidad de polvo comercial que produce un micromol de ácido oleico en una hora, a pH=7.2 y a 37°C, usando como sustrato aceite de oliva.

b) Lipasa B de *Candida antarctica*, (LBCA), suministrada por Novo Nordisk Biondustrias, S.A. (Madrid, España) bajo la denominación de SP525.

Las disoluciones de enzima se prepararon en tampón Tris/HCl 0,1 M (pH=8,0), en el cual una cantidad pesada del polvo comercial se mantuvo en agitación durante 2 horas a 4°C. El material insoluble se separó mediante centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos y posterior decantación. Para el caso de los preparados enzimáticos de lipasa de *C. antarctica* se obtuvieron disoluciones homogéneas que no necesitaron eliminación de material insoluble. La congelación a -20°C de estas disoluciones en viales de plástico permitió su conservación hasta su empleo.

Como **sustratos** para la determinación de la actividad enzimática se emplearon, una disolución de aceite de oliva al 50% (Sigma, artículo 800-1) para la lipasa de *C. rugosa*, mientras que para la lipasa B de *C. antarctica* se utilizó triacetina pura (Sigma, artículo T-5376), ya que esta última enzima no muestra buena actividad con triglicéridos de cadena larga en comparación con otras lipasas<sup>42</sup>.

### II.2.2. Determinación del contenido en proteínas de las lipasas suministradas

El contenido en proteínas del preparado comercial de lipasa de *C. rugosa* suministrado por la casa Sigma es del 22%; de este porcentaje un 3% corresponde a lipasa pura<sup>132</sup>.

Para la determinación de proteínas en el producto SP525 (lipasa B de *C. antarctica*) se recurrió al método del Biuret. En medio alcalino las sustancias con dos o más enlaces peptídicos (fundamentalmente proteínas) forman con las sales de cobre un complejo coloreado de intensidad proporcional al número de enlaces. El nombre de biuret se debe a que la biurea da reacción positiva. La metodología seguida fue la de Gornall y cols.<sup>133</sup> :

a) **Reactivo de Biuret**: Disolver 1,5 g de sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) y 6,0 g de tartrato sódico potásico ( $\text{NaK C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) en 500 ml de agua destilada. Añadir con agitación constante, 300 ml de NaOH al 10% (P/V). Completar con agua destilada hasta un litro y guardar en botellas de plástico. Este reactivo puede almacenarse indefinidamente, pero debe ser desechado si aparecen depósitos como consecuencia de una contaminación o de una preparación defectuosa. La adición de yoduro potásico al 1% (P/V) aumenta la estabilidad del reactivo.

b) *Patrón de proteína*. Se preparó una solución de albúmina de suero bovino que contenía 10 mg/ml de agua destilada. En tubos de ensayo numerados y perfectamente limpios se añaden cantidades de la solución patrón de proteína y se igualan los volúmenes con agua destilada. A continuación se añade el reactivo de biuret, se agita y se deja a temperatura ambiente (20-25°C) durante 30 minutos, o a 37°C durante 20 minutos para que se desarrolle la reacción. El color observado al término de este período de incubación es estable durante al menos una hora. Las lecturas de absorbancia se deben realizar a una  $\lambda = 540-550$  nm.

**Tabla 9.** Protocolo para la preparación de la recta de calibrado en la determinación de proteínas por el método del Biuret.

Disolución enzimática	Tubo	REACTIVOS (ml)			Proteína (mg/ml)
		Proteína	H <sub>2</sub> O	Biuret	
	B	-	1.0	4.0	Blanco
	1	0.1	0.9	4.0	0.2
	2	0.2	0.8	4.0	0.4
	3	0.3	0.7	4.0	0.6
SEROALBUMINA	4	0.4	0.6	4.0	0.8
BOVINA	5	0.5	0.5	4.0	1.0
	6	0.6	0.4	4.0	1.2
	7	0.7	0.3	4.0	1.4
	8	0.8	0.2	4.0	1.6
	9	0.9	0.1	4.0	1.8
LBCA (SP525)	10	0.05	0.95	4.0	-

En la Tabla 9 se indica el protocolo a seguir para realizar la curva de calibrado y la determinación de proteína de las diferentes soluciones. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu modelo 2100, a una  $\lambda = 545$  nm. La solución problema de LBCA se preparó a partir de una disolución del polvo suministrado por la casa comercial (producto SP525) de concentración 125 mg/ml, de la que se tomaron 50  $\mu$ l para posteriormente enrasar hasta 1 ml de agua. Después se añadieron los 4 ml del reactivo de biuret y se incubó en las condiciones indicadas. La Figura 7 muestra los datos de absorbancia de las soluciones del patrón de concentración creciente. Del valor de absorbancia obtenido de la solución problema de SP525 y a partir de la ecuación de la recta, se calculó la cantidad de proteína de este producto, que fue de un 10 %.

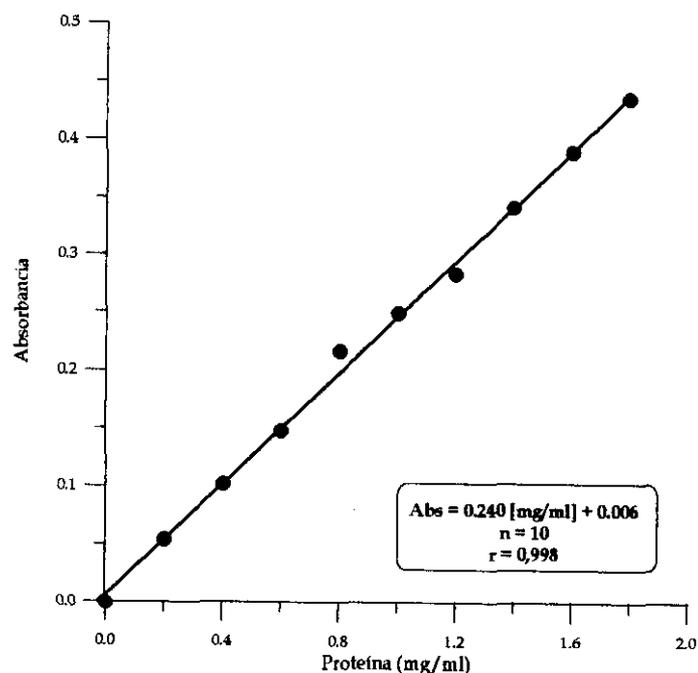


Figura 7. Recta de calibrado de la seroalbúmina bovina para realizar el Biuret.

### II.2.3. Medida de la actividad hidrolítica de las lipasas comerciales.

Todas las medidas se llevaron a cabo en un sistema potenciométrico de valoración a pH constante (pHstato Crison, modelo Micrott 2022).

La reacción se realizó añadiendo a la cubeta de reacción 5 ml del tampón de trabajo y un volumen determinado de la solución enzimática. La mezcla permaneció 5 minutos en agitación hasta que alcanzó la temperatura deseada y posteriormente se añadió el sustrato elegido. Las velocidades iniciales se midieron en las siguientes condiciones: pH fijo, agitación constante y valoración con NaOH de concentración 0,05-0,0001 N (con un factor determinado con ftalato potásico como patrón).

En todos los casos las experiencias se realizaron por triplicado y el resultado final se indicó como la media de los tres valores obtenidos con un error máximo del 5%. La velocidad inicial se calculó en micromoles de ácido formado por minuto.

A continuación se detallan las condiciones en los estudios de actividad realizados con las lipasas nativas:

1) *Variación de la actividad lipásica de la LCR con la concentración de enzima.* Con el fin de conocer la concentración de lipasa útil en las medidas de actividad, se realizó un estudio en las siguientes condiciones: tampón Tris/HCl 0,001M (pH=7,5), una  $T^a = 35^{\circ}\text{C}$ , una concentración de sustrato de 2,275 mg trioleína/ml, una velocidad de agitación de 500 rpm y un tiempo de reacción de 10 minutos. La concentración de LCR en el reactor se varió entre 0 y 1,25 mg/ml.

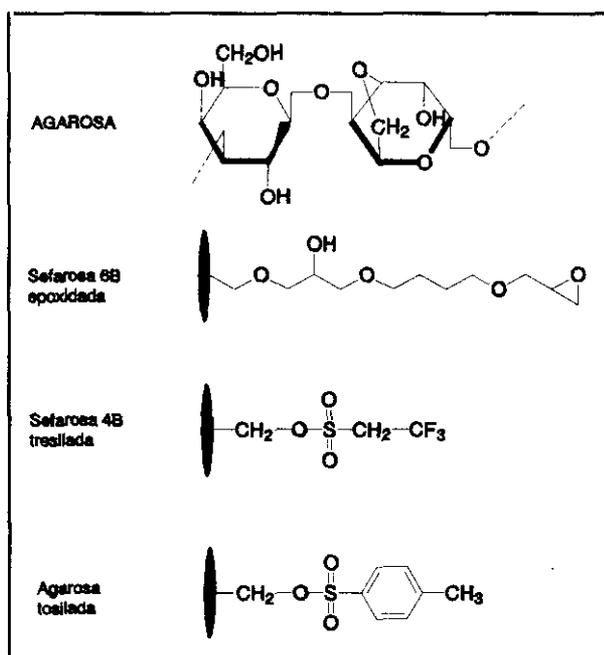
2) *Variación de la actividad de la LBCA con la concentración de enzima.* Del mismo modo se calculó la concentración de LBCA útil en las medidas de actividad. En este estudio las condiciones fueron: tampón Tris/HCl 0,001M (pH=7,0),  $T^a = 37^{\circ}\text{C}$ , una concentración de sustrato de 11,6 mg de triacetina/ml, una velocidad de agitación de 500 rpm y un tiempo de registro de 10 minutos. La concentración de SP525 se varió entre 0 y 0,275 mg/ml.

#### II.2.4. Caracterización y funcionalización de los soportes.

1) SOPORTES ORGANICOS: en la inmovilización de la LCR y de la LBCA se han empleado como soportes de tipo orgánico, agarosa, sefarosa y zuro de maíz.

a) *Agarosa y sefarosa*: son dos tipos de polisacáridos empleados comúnmente en la inmovilización de enzimas. La agarosa es uno de los componentes del agar, mientras que la sefarosa es un gel de agarosa que ha sido sometido a una purificación con el fin de eliminar los polisacáridos cargados. Según el porcentaje de agarosa que contienen, hay diferentes sefarosas: 4B (4%), 6B (6%) con un tamaño de partícula de 45-165  $\mu\text{m}$ . La agarosa es un polímero compuesto por unidades del bisacárido D-galactosa y 3-6 anhidro L-galactosa (Esquema 12). Los grupos -OH primarios de estos residuos azucarados pueden ser fácilmente funcionalizados, para posteriormente unir covalentemente una enzima. En esta memoria hemos empleado sefarosas ya funcionalizadas (sefarosa 6B epoxidada y sefarosa 4B tresilada) y comercializadas por la casa Pharmacia LKB (Uppsala, Suecia), así como el gel de agarosa Bio-Gel A-150 nm de los laboratorios BioRad (Richmond, CA, EE.UU). Este último gel de agarosa, sin funcionalizar, posee un 1 % de agarosa y tiene un tamaño de partícula de 74-149

nm. En la inmovilización se empleó este gel activado mediante el método del cloruro de p-toluen sulfonilo<sup>134</sup>.



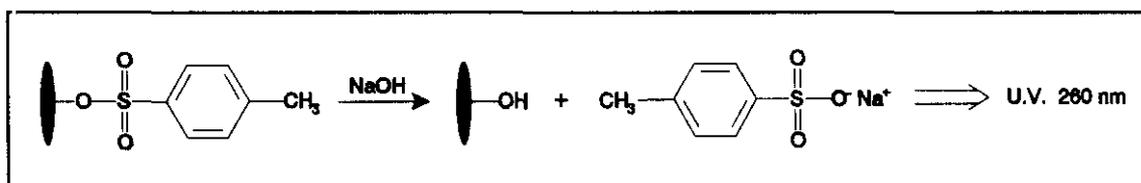
Esquema 12. La funcionalización de la agarosa permite la posterior inmovilización de las lipasas.

En resumen, las agarosas empleadas en la inmovilización de las lipasas objeto de nuestro estudio han sido (Esquema 12):

- 1) *Sefarosa 6B epoxiactivada*: es un gel de agarosa compuesto por pequeñas bolitas de 45-165  $\mu\text{m}$  de diámetro, con un brazo espaciador de 12 átomos de carbono. La concentración de grupos oxirano es de 19-40  $\mu\text{eq/ml}$  de gel húmedo.
- 2) *Sefarosa 4B tresilada*: se trata de un gel de agarosa activado con cloruro de tresilo (cloruro de 2,2,2 trifluorosulfonil etano).
- 3) *Agarosa tosilada*: antes de llevar a cabo la activación de la agarosa sin funcionalizar, se procedió al secado de esta agarosa, ya que el proceso de activación no se puede llevar a cabo en presencia de agua. Se toma un volumen determinado ( $V$  ml) de Bio-gel húmedo y se le adicionan  $10 \times V$  ml de agua destilada, agitándose durante 5 minutos para eliminar los aditivos comerciales que lleva el gel comercial; a continuación se filtra por gravedad y el residuo que permanece en el papel de filtro se vuelve a lavar con  $10 \times V$  ml de agua destilada, seguidamente se realizan sucesivos lavados con  $2 \times (10 \times V)$  ml de una mezcla de

agua/acetona 3:1 (v/v), 2x(10xV) ml de agua/acetona 1:3 (v/v) y 2x(10xV) ml de acetona purificada y seca. Estos lavados tienen como objetivo eliminar, dentro de lo posible, el agua que lleva el gel, lo cual se consigue triturando con una espátula, lo más finamente posible, el gel húmedo de agarosa y dejándolo reposar durante una noche en una estufa desecadora a 40°C, a fin de eliminar tanto la acetona como las posibles trazas de agua que contenga. Posteriormente, con la ayuda de un mortero de porcelana se reduce el sólido hasta el estado de polvo fino con lo que queda listo para la posterior activación. El método elegido para la activación de la agarosa es el de **tosilación**, descrito por Siniterra y cols<sup>134</sup>. Por cada gramo de agarosa seca se adicionan 50 ml de acetona pura y seca, y 1 gramo de cloruro de p-toluensulfonilo. A continuación, se mantiene la mezcla en agitación durante 2 horas. Seguidamente se filtra la mezcla por gravedad y se lava con 90 ml de acetona, en dos porciones una de 60 y otra de 30 ml por cada gramo de soporte activado, con el fin de eliminar el cloruro de p-toluensulfonilo que no ha reaccionado. Si el soporte no se va a utilizar en la inmovilización, se seca a vacío y se guarda a -20°C junto con una bolsa de gel de sílice para preservarlo de la humedad. Cuando se utiliza para llevar a cabo la inmovilización de la enzima es necesario volver el soporte tosilado hasta el medio acuoso. Para ello se realiza un primer lavado con agua/acetona 1:3 (v/v), luego agua/acetona 3:1 (v/v) y finalizamos con agua.

El grado de funcionalización de los soportes se determinó según el método descrito por Sinisterra y cols.<sup>135</sup> que puede resumirse en el Esquema 13.



**Esquema 13.** Determinación del grado de activación de los soportes tosilados.

Un peso determinado de soporte tosilado (0,1 g) se suspende durante 3 horas en una disolución alcalina (10 ml de NaOH 0,1 N) a temperatura ambiente, con lo cual se produce un reacción de sustitución nucleófila alifática inversa a la reacción de activación, esto es, intercambio del grupo tosilato por un hidroxilo. El tosilato sódico liberado se cuantifica

espectrofotométricamente, mediante la realización previa de un recta de calibrado, a 260 nm. La recta de calibrado obtenida aparece en la Figura 8.

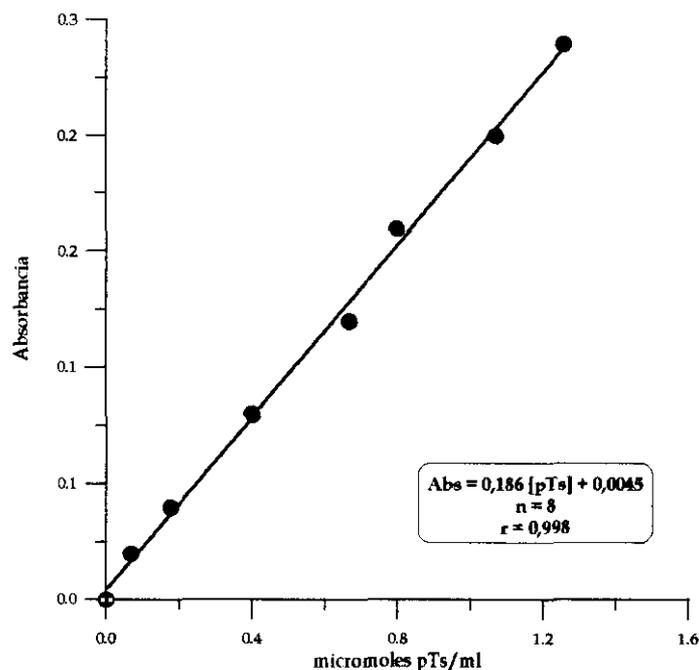


Figura 8. Recta de calibrado del p-toluensulfonato (pTs).

b) *Zuro de maíz*. Es la parte dura de la mazorca de maíz, cortada y tamizada, que por sus excelentes propiedades mecánicas puede servir como soporte. A pesar de su insolubilidad en agua, presenta una gran afinidad por la misma y puede absorber un volumen de agua tres veces superior al suyo.

El zuro utilizado forma parte de la gama EU-Grits, producido por la sociedad EURAMA (Maubourgnat, Francia) bajo la forma de partículas más o menos esféricas. Nosotros hemos utilizado dos tipos de zuro que difieren en el diámetro de partícula (0,5-0,8 y 2-4 mm). La composición del producto es<sup>136</sup>: Humedad máxima (10 %), materia celulósica (25-36 %), proteínas brutas (3-6 %), minerales (1-2,5 %), materia grasa (0,5-1,5 %) y lignina hemicelulósica (44-60 %).

Por tanto el zuro de maíz presenta grupos -OH primarios provenientes de las moléculas de glucosa de la celulosa y una gran variedad de grupos fenólicos y alcohólicos de la lignina. Estos grupos se pueden activar y posteriormente el zuro activado emplearlo en la

inmovilización de enzimas. Pero antes de la activación, el zuro de maíz exige un tratamiento previo que consiste en el lavado sucesivo, con una solución de NaOH 0,1 N, hasta que los líquidos de filtrado dejen de estar coloreados. Mediante este proceso se eliminan pigmentos que luego podrían interferir en la medida del grado de activación. Posteriormente se lava primero con agua destilada y posteriormente con acetona pura y seca (10 ml/g de soporte), se filtra y se deseca en estufa a 40°C durante 6 horas.

La activación del zuro de maíz mediante el método del tosilo se realizó mediante la adición por cada gramo de zuro pretratado de 50 ml de acetona pura y seca junto con un gramo de cloruro de p-toluen sulfonilo. La mezcla se mantuvo en agitación durante 20 horas. La activación del zuro se determinó de forma análoga a la agarosa.

2) SOPORTES INORGANICOS. Se emplearon los siguientes soportes:

a) *Alúmina*. La alúmina utilizada fue suministrada por Merck bajo la denominación Aluminum 60 activ. basich, Korngröße 0,063-0,200 nm. (70-230 mesh ASTM), n° art. 1067. Esta alúmina presenta como principales características un diámetro de poro de 40-100 Å, una superficie específica de 59,1 m<sup>2</sup>/g y un volumen de poro de 0,241 cm<sup>3</sup>/g.

b) *Sílice*. Suministrada por la casa Merck bajo la denominación Kieseghel 60, Korngröße 0,015-0,040 nm (art. 15111). Esta sílice posee como principales características texturales un diámetro de poro de 33-200 Å, una superficie específica de 316 m<sup>2</sup>/g y un volumen de poro de 0,790 cm<sup>3</sup>/g.

La funcionalización de los soportes inorgánicos se realizó mediante el método de la triclorotriazina<sup>137</sup> (Figura 9). Con tal fin se suspendió 1 gramo de soporte inorgánico en 10 ml de tolueno, y posteriormente se añadieron a este volumen 300 mg de 2,4,6 tricloro 1,3,5 triazina y 0,6 ml de trietilamina (en relación molar 2:1 con la triclorotriazina) para neutralizar el ácido clorhídrico que se desprende en el proceso de activación. Pasado este tiempo el soporte activado se filtró a vacío y se lavó con 10 ml de tolueno en primer lugar y posteriormente con 10 ml de acetona por gramo de sólido. Finalmente se secó a temperatura ambiente.

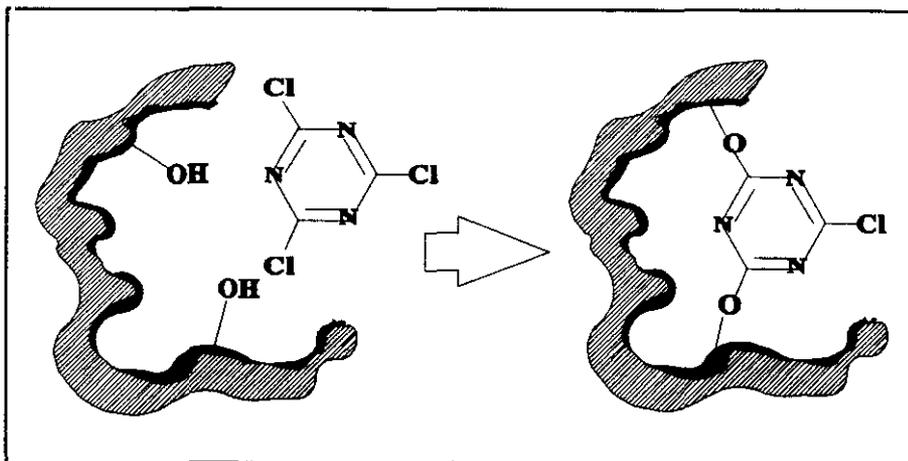


Figura 9. Funcionalización de los soportes inorgánicos con 1,1,1 triclorotriazina.

El grado de funcionalización se calculó mediante el método de Möhr de valoración de cloruros<sup>138</sup> tanto del líquido de filtrado y lavado obtenido después de la activación como del soporte activado. En el primer caso se mezclaron 5 ml del líquido de filtrado con 10 ml de NaOH 0,1 N en una ampolla de decantación. Tras una agitación vigorosa durante 5 minutos se separó una fase orgánica y una acuosa. La fase orgánica sufrió dos extracciones más con sosa en las mismas condiciones. Un ml del volumen final resultante de las tres fases acuosas recogidas, se mezcló con 10 ml de tampón fosfato/NaOH 0,1 M (pH=7,0) y con 0,05 g. de  $K_2CrO_4$ . Esta mezcla se valoró con una solución de  $AgNO_3$  hasta la formación de un precipitado rojo. Para la valoración de los iones cloruro remanentes en el soporte se procedió a suspender 0,1 gramos de soporte en una disolución de NaOH 0,1 N. Después de mantener la mezcla en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, se tomó 1 ml de la solución y se siguió el procedimiento de valoración descrito anteriormente. En ambos casos se realizaron ensayos en blanco.

### II.2.5. Inmovilización de las lipasas comerciales.

La metodología general fue la siguiente:

1º) se pesa una cantidad de polvo comercial de lipasa (que contendrá una cantidad de lipasa pura calculada por cualquier método válido de determinación de proteínas) y se disuelve en 10 ml. de tampón Tris/HCl 0,1M (pH=8,0). Esta disolución enzimática se mantiene en

agitación durante 2 horas a 4°C. El material insoluble se separa por centrifugación a 5000 r.p.m. durante 15 minutos. Se determina su actividad enzimática.

2º) Los 10 ml de la disolución enzimática junto con una cantidad de soporte activado (1-2 g. según el tipo de soporte) se mantienen en agitación durante 3-6 horas a 4°C.

3º) Los derivados obtenidos se filtran a vacío y se lavan, primero con 10 ml. de tampón y después con 10 ml. de agua bidestilada. El volumen de los líquidos de filtrado y lavado se recoge y se mide en una probeta. Posteriormente se determina la actividad enzimática de estos líquidos. La cantidad de enzima inmovilizada será la diferencia entre la cantidad de enzima de partida y la presente en el líquido de filtrado y lavado, ambas conocidas por las medidas de actividad realizadas.

#### I. La inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* se ha realizado sobre:

1) *Agarosa tosilada*: la inmoviliación se llevó a cabo con cantidades diferentes de enzima (250-375-500-625-750-1000 mg. de polvo comercial) disueltas en 10 ml. de tampón Tris/HCl 0,1M (pH=8,0). Se añadió 1 gramo de agarosa tosilada a cada una de estas disoluciones y la mezcla se mantuvo a 4°C con agitación lenta durante 3 horas.

2) *Zuro tosilado*: sobre los dos tipos de zuro de diferente tamaño de partícula, se inmovilizaron diferentes cantidades de lipasa. Con este propósito, se prepararon disoluciones enzimáticas con diferente concentración de lipasa (10-12,5-25-50-75-100 mg. de polvo comercial por ml.) en 10 ml. de tampón Tris/HCl 0,1M (pH=8,0), a las cuales se añadió 1 gramo de zuro tosilado. La inmovilización se realizó a 4°C con agitación durante 3 horas.

3) *Sílice y alúmina activada con TCT*: se realizó un estudio sobre la cantidad de enzima añadida sobre el proceso de inmovilización. Para ello, se prepararon tres disoluciones de lipasa comercial de 20, 40 y 80 mg/ml en 10 ml. de tampón Tris/HCl 0,1M (pH=8,0). Dos gramos de soporte inorgánico activado con TCT se añadieron a cada una de estas disoluciones, y la mezcla se mantuvo en agitación a 4°C durante tres horas.

#### II. La inmovilización de la lipasa B de *Candida antarctica* se ha realizado sobre:

a) *Sefarosa 6B epoxiactivada*: se prepararon dos derivados con diferente carga enzimática. Para ello, se dispuso de dos disoluciones del producto SP525 de concentración 3 y 10 mg/ml en 10 ml de tampón Tris/HCl 0,1M (pH=8,0). Dos gramos de sefarosa epoxiactivada se

añadieron a estas disoluciones, y la mezcla se mantuvo a 4°C durante 6 horas.

b) *Sefarosa 4B tresilada*: se prepararon otros dos derivados en las mismas condiciones que en el caso de la sefarosa epoxiactivada.

c) *Sílice activada con TCT*: se prepararon dos disoluciones de diferente concentración de producto SP525 (3 y 10 mg/ml) en 10 ml. de tampón Tris/HCl 0,1M (pH=8,0). A cada disolución fueron añadidos 1,5 gramos de sílice activada con TCT, y la mezcla se mantuvo con agitación a 4°C durante 6 horas.

Además de estos derivados preparados en nuestro laboratorio, la casa Novo Nordisk Bioindustrias (Madrid, España) nos suministró gratuitamente derivados inmovilizados de esta lipasa bajo las denominaciones:

a) *SP435A*: LBCA inmovilizada sobre la resina LEWATIT OC 1600 (Casa Bayer), de carácter polimérico. Las especificaciones técnicas del derivado sólo informaban sobre su actividad en la síntesis de laurato de propilo (12000 PLU).

b) *Novozym 435*: LBCA inmovilizada sobre una resina acrílica macroporosa (LEWATIT E). Las partículas del producto son de un tamaño comprendido entre 0,3-0,9 mm de diámetro y su densidad 430 Kg/m<sup>3</sup>, y puede ser enviado con un contenido en agua del 1-2% (P/P). El derivado poseía una actividad de 7000 PLU.

#### II.2.6. Actividad enzimática de los derivados inmovilizados.

Se determinó la **actividad retenida** de los derivados inmovilizados respecto de la enzima soluble. Se siguió la metodología del apartado II.2.3 para determinar la actividad de los derivados de lipasa de *Candida rugosa* y de lipasa B de *C. antarctica*. Para ello, se adicionó una cantidad de derivado inmovilizado ( P gramos cuyo contenido en lipasa no debe sobrepasar la cantidad útil determinada con las lipasas nativas) a 5 ml. de tampón Tris/HCl 1mM (pH=7,5 para la LCR y pH=7,0 para la LBCA) en el reactor del pHstato, y se dejó homogeneizar y atemperar a 35°C (LCR) ó 37°C (LBCA) durante 5 minutos. Tras la inyección del sustrato, trioleína o triacetina según la lipasa, se midió la actividad enzimática de hidrólisis valorando con disoluciones de sosa 0,005 N durante 10 minutos en el pHstato en las condiciones descritas en el apartado II.2.3.

La actividad retenida se expresa como el porcentaje de actividad que presenta la

enzima inmovilizada con respecto a la enzima nativa en las mismas condiciones. En la mayoría de los casos esta actividad es menor del 100%, es decir la enzima pierde parte de su actividad, pero es mucho más estable frente a la desactivación térmica.

### II.2.7. Termoestabilidad de los derivados inmovilizados.

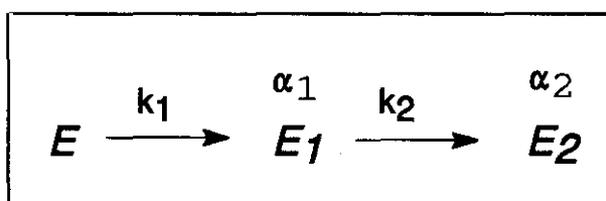
Se realizó un estudio comparativo de la estabilidad térmica de los derivados inmovilizados obtenidos frente a la enzima soluble. Para ello se almacenaron ( $P$  gramos de derivado con la misma cantidad de enzima en todos los ensayos) en condiciones extremas de temperatura ( $50^{\circ}\text{C}$ ) en presencia del tampón de trabajo. Cada cierto tiempo después del almacenamiento se midió la actividad residual en hidrólisis. Las condiciones de los ensayos de actividad fueron idénticas que en el apartado II.2.6.

Los valores de actividad en función del tiempo, se ajustaron a una ecuación de decrecimiento exponencial simple [3], o a una ecuación de decrecimiento exponencial doble [4], según el caso.

$$A = A_0 \cdot e^{-kt} + A_1 \quad [3]$$

$$A = A_1 \cdot e^{-k_1 t} + A_2 \cdot e^{-k_2 t} \quad [4]$$

Para explicar los resultados se acudió al modelo de desactivación de Henley y Sadana<sup>139</sup>, representado en el Esquema 14:



Esquema 14. Esquema de desactivación enzimática.

donde  $k_1$  y  $k_2$  son las constantes cinéticas de desactivación;  $E$ ,  $E_1$  y  $E_2$  son la enzima y los intermedios que aparecen durante la desactivación, y  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  son las relaciones entre las actividades específicas  $E_1/E$  y  $E_2/E$ , respectivamente. Estos autores asumen que la actividad

enzimática,  $A$ , a un tiempo  $t$  es el promedio de las actividades específicas de cada estado (ecuación [5]), siendo  $E_0$  la actividad inicial a tiempo  $t=0$ .

$$A = \frac{E + \alpha_1 \cdot E_1 + \alpha_2 \cdot E_2}{E_0} \quad [5]$$

Esta actividad puede escribirse, en función de los parámetros iniciales como [6], ecuación en la que se asumen decrecimientos exponenciales simples para describir la desactivación, y donde  $\alpha_2$  y  $\alpha_1$  se expresan en tanto por ciento.

$$A = \alpha_2 + \left[ 100 + \frac{\alpha_1 \cdot k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 \cdot k_2}{k_2 - k_1} \right] \cdot e^{-k_1 t} + \left[ \frac{\alpha_2 \cdot k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_1 \cdot k_1}{k_2 - k_1} \right] \cdot e^{-k_2 t} \quad [6]$$

Las curvas de desactivación obtenidas con los datos experimentales, se ajustaron mediante la utilización del programa SIMFIT<sup>140</sup>. A partir de estas ecuaciones ajustadas, se calcularon los coeficientes de desactivación  $k_1$  y  $k_2$ , los valores de actividad  $A_i$ , las relaciones  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , la vida media ( $t_{1/2}$ ) y el factor de estabilización (F). Este factor se define como la relación entre la vida media del derivado inmovilizado y la vida media de la enzima en solución en las mismas condiciones de almacenamiento y con la misma cantidad de proteína.

## II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### II.3.1. INMOVILIZACIÓN DE LA LIPASA DE *Candida rugosa*

En un primer momento se determinó la cantidad óptima de enzima comercial a emplear en cada ensayo. Esta cantidad se encuentra en el intervalo en el cual la actividad es directamente proporcional a la concentración de lipasa. A partir de un determinado valor de concentración de enzima, la actividad permanece constante. Con la lipasa de *C. rugosa*, la respuesta fue lineal hasta alcanzar el valor de 0,4 mg/ml de polvo comercial (Figura 10). A partir de estos resultados se estableció el valor de 0,3 mg/ml como la concentración de lipasa adecuada para realizar todos los ensayos de hidrólisis.

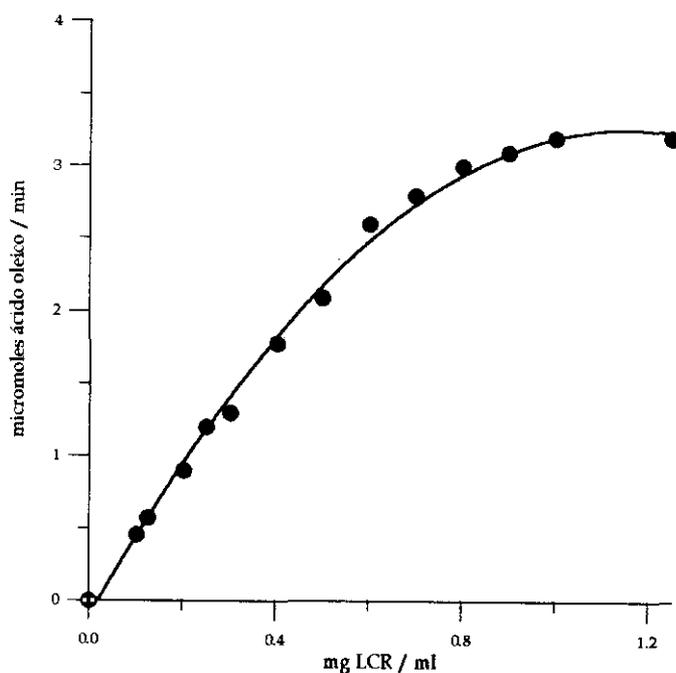


Figura 10. Variación de la actividad enzimática con la concentración de LCR.

#### II.3.1.1. Inmovilización sobre soportes orgánicos.

1. **AGAROSA TOSILADA.** En la inmovilización de la LCR, se empleó la agarosa de BioRad (Biogel A-150 nm, 100-200 mesh) activada mediante el método del cloruro de p-toluen sulfonilo, descrito por nuestro grupo en la inmovilización de nucleasas<sup>141</sup> (Esquema 11).

En el caso particular de las nucleasas, la inmovilización se produce por reacción exclusiva de los grupos  $\epsilon$ -amino de las lisinas situadas en la superficie de la enzima. En cambio, las lipasas son glicoproteínas que poseen azúcares en su estructura, con lo que la inmovilización puede ocurrir tanto por sustitución nucleofílica con intervención de las lisinas como por acción de los grupos alcohólicos primarios de los polisacáridos presentes en la enzima. Los resultados de la inmovilización de la lipasa de *C. rugosa* sobre la agarosa tosilada aparecen en la Tabla 10.

Tabla 10. Inmovilización de la lipasa de *C. rugosa* sobre agarosa tosilada<sup>a</sup>

Derivado	pH	mg añadidos/ ml agarosa	Inmovilización <sup>b</sup>		Actividad retenida <sup>c</sup> (%)
			(%)	(mg/ml gel)	
LCR-A-1	7	25	12	3	82
LCR-A-2	8	25	29	7,2	76
LCR-A-3	9	25	43	10,7	24
LCR-A-4	8	37,5	32	12	75
LCR-A-5	8	50	45	22,5	70
LCR-A-6	8	62,5	52	32,5	75
LCR-A-7	8	75	40	30	73
LCR-A-8	8	100	35	35	76

<sup>a</sup> Grado de activación: 8,8  $\mu$ moles de tosilo / g. de soporte; <sup>b</sup> Referido a la cantidad de polvo de lipasa comercial añadido en la inmovilización; <sup>c</sup> Actividad lipásica medida con trioleína.

El pH del medio en el que se efectúa el proceso de inmovilización (LCR-A-1, A-2 y A-3) influye tanto en la cantidad de lipasa unida como en la actividad retenida de los derivados. Un aumento en el pH se traduce en un aumento en el porcentaje de enzima inmovilizada, debido al carácter básico de los grupos  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de las lisinas superficiales. En cambio la actividad del derivado disminuye con el pH de inmovilización, posiblemente por un cambio conformacional en la estructura proteica inmovilizada. Teniendo en cuenta estos datos, se estableció el pH=8,0 como el valor de compromiso para la inmovilización de la lipasa de *C. rugosa*. En estas condiciones, al aumentar la cantidad de enzima añadida durante el proceso de inmovilización (LCR-A-4  $\rightarrow$  A-8) se consigue un máximo del 52% de enzima unida a la agarosa (LCR-A-6), que se corresponde con una carga enzimática de 32,5 mg de lipasa por ml. de gel húmedo. La carga máxima que la agarosa puede admitir está

comprendida entre 30 y 35 mg/ml. de gel. Estos valores son superiores a los descritos por otros autores, como por ejemplo Kilara y cols.<sup>127</sup> que emplearon la sefarosa 4B activada mediante el método del bromocianógeno (0,5 mg de lipasa/ml. de gel); Otero y cols.<sup>116</sup> que optaron por la sefarosa 6B activada mediante el método del glicidol (1,25 mg lipasa/ml. gel) y finalmente Shaw y cols.<sup>103</sup>, que utilizaron la quitina tosilada y activada con ácido 6-amino hexanoico (19 mg lipasa/ml. gel) para inmovilizar esta misma lipasa.

Los altos valores de actividad retenida (73-76%) obtenidos, nos hacen concluir que este método de inmovilización no altera apreciablemente el centro activo de la lipasa y/o su forma de unión a la interfase, ya que, dado el carácter hidrófilo del soporte, la enzima sigue encontrándose en agua, situación análoga a la de la enzima nativa.

**2. ZURO DE MAÍZ TOSILADO.** Debido a su naturaleza celulósica, el zuro de maíz es un excelente soporte, que ya ha sido empleado en la inmovilización de nucleasas<sup>142</sup>. La reacción con cloruro de p-toluen sulfonilo se utilizó para la activación de los dos tipos de zuro que diferían en el tamaño de partícula. Los resultados de la inmovilización de la lipasa de *C. rugosa* sobre los zuros tosilados aparece en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Inmovilización de la lipasa de *C. rugosa* sobre zuro tosilado.

Soporte (diámetro)	Derivado	mg añadidos/ g. soporte	Inmovilización <sup>a</sup> (%) (mg/g sop.)		Actividad retenida <sup>b</sup> (%)
<b>ZURO<sup>c</sup></b> (0,5-0,8 mm)	LCR-Z-1	62,5	25	15,6	33
	LCR-Z-2	125	38	47,5	25
	LCR-Z-3	250	64	160	2
	LCR-Z-4	375	80	300	1
	LCR-Z-5	500	67	335	1
<b>ZURO<sup>d</sup></b> (2-4 mm)	LCR-Z-6	50	49	24,5	16
	LCR-Z-7	62,5	63	39,4	18
	LCR-Z-8	125	68	85	17
	LCR-Z-9	250	82	205	10
	LCR-Z-10	375	80	300	5

<sup>a</sup>Referido a la cantidad de polvo de lipasa comercial añadido en el proceso de inmovilización; <sup>b</sup>Actividad lipásica medida con trioleína; <sup>c</sup>Activación del zuro pequeño: 32,5  $\mu$ moles tosilato/g. de soporte; <sup>d</sup>Activación del zuro grande: 15,6  $\mu$ moles de tosilato/g. soporte.

Al comparar los resultados obtenidos con los dos tipos de zuro de maíz para una misma relación cantidad lipasa/g. soporte al comienzo del proceso de inmovilización (LCR-Z-1 y Z-7), se puede observar cómo el zuro tosilado de tamaño grande de partícula es capaz de inmovilizar mayor cantidad de lipasa (63%) que el zuro de tamaño pequeño de partícula (25%). En estos derivados la actividad retenida no difiere ostensiblemente (18 y 25%, respectivamente). A medida que se aumenta la cantidad de enzima al comienzo del proceso de inmovilización, el porcentaje de lipasa unida es mayor hasta igualar valores (LCR-Z-4 y LCR-Z-10), pero los derivados pierden actividad de forma drástica.

La disminución de actividad que presentan aquellos derivados preparados con altas cargas enzimáticas se debe a la formación de agregados en multicapas de esta glicoproteína sobre el soporte. El pequeño porcentaje de actividad que retiene el derivado se debe exclusivamente a aquellas moléculas de lipasa que se encuentran en superficie sobre las demás, y que pueden catalizar la reacción de hidrólisis del sustrato.

Estos resultados nos indican que el zuro de maíz es un mal soporte para esta enzima.

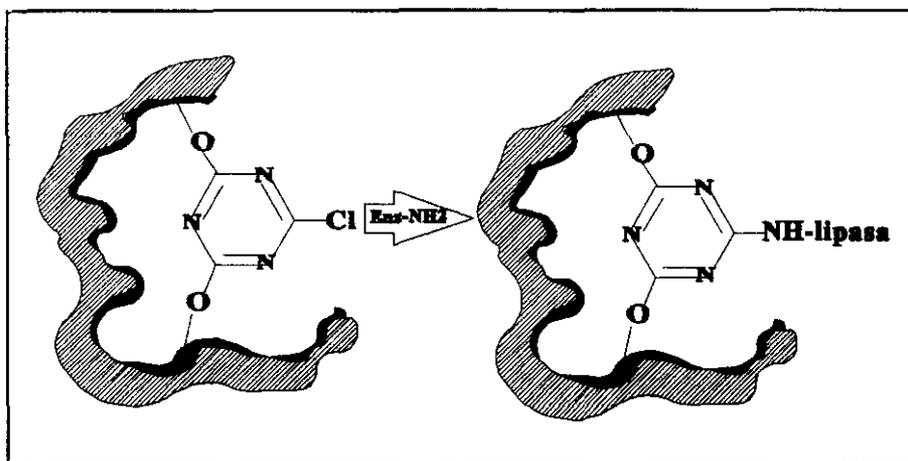
### II.3.1.2. Inmovilización sobre soportes inorgánicos.

En la inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* se emplearon tanto sílice como alúmina activada mediante el método de la triclorotriazina. La unión de la enzima al soporte se ilustra en la Figura 11. Los resultados de esta inmovilización aparecen en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Inmovilización de la lipasa de *C. rugosa* sobre soportes inorgánicos activados con triclorotriazina

Soporte	Derivado	mg añadidos/ g. soporte	Inmovilización (%) (mg/g sop.)		Actividad retenida (%)
ALÚMINA <sup>a</sup>	LCR-AL-1	100	40	40	41
	LCR-AL-2	200	24	48	35
	LCR-AL-3	400	27	108	26
SÍLICE <sup>b</sup>	LCR-S-1	100	51	51	69
	LCR-S-2	200	31	62	66
	LCR-S-3	400	37	148	44

<sup>a</sup>Grado de activación: 0,19 g. de TCT/g. de alúmina; <sup>b</sup>Grado de activación: 0,24 g. de TCT/g. de sílice.



**Figura 11.** Inmovilización de la lipasa sobre soportes inorgánicos activados con triclorotriazina.

En primer lugar podemos observar cómo la cantidad de lipasa unida (en mg) aumenta con la cantidad de enzima añadida al inicio de proceso de inmovilización y viene determinada por el grado de activación del soporte. En todo caso, es conveniente añadir poca carga enzimática inicialmente a la vista de los valores de porcentaje de lipasa inmovilizada.

La disminución de la actividad retenida de los derivados inorgánicos se debe a la formación de agregados en multicapa, como sucedía con el zuro de maíz tosilado.

Al comparar estos derivados con los anteriormente descritos, puede apreciarse cómo los derivados preparados sobre sílice (LCR-S-1 y S-2) contienen mayor carga enzimática (51-62 mg lipasa/g soporte) que los de agarosa (30-35 mg lipasa/g soporte), aunque su actividad retenida es ligeramente inferior (un 66-69% frente a un 73-76%) en la hidrólisis de trioleína.

Según estos dos criterios de valoración, podemos afirmar que los derivados de LCR obtenidos con sílice activada via TCT y con agarosa tosilada son los más interesantes.

### II.3.1.3. Estabilidad térmica de los derivados de lipasa de *C. rugosa*.

Todos los derivados inmovilizados de lipasa de *C. rugosa* descritos en los apartados anteriores, se pueden conservar durante al menos un mes en nevera a 4°C, sin que exista una pérdida apreciable de actividad.

Se estableció una temperatura extrema de almacenamiento de 50°C para realizar un estudio de estabilidad frente a la desactivación térmica. Las curvas de desactivación

enzimática de la lipasa comercial nativa e inmovilizada se ajustaron a unas ecuaciones de decrecimiento doble exponencial (Tabla 13).

Tabla 13. Desactivación enzimática a 50°C de los derivados inmovilizados de LCR.

Derivado	A <sub>1</sub> <sup>a</sup>	k <sub>1</sub> (h <sup>-1</sup> )	A <sub>2</sub> <sup>a</sup>	k <sub>2</sub> (h <sup>-1</sup> )	α <sub>1</sub> <sup>b</sup>	t <sub>1/2</sub> (h)	F <sup>c</sup>
Nativa	32,9	19,9	67,1	0,446	66	0,5	1
LCR-A-2	28,2	0,737	72,1	0,011	71	26	52
LCR-A-4	26,4	0,765	74,0	0,014	73	27	54
LCR-A-5	29,7	0,774	70,6	0,019	68	18	36
LCR-A-6	27,8	1,091	72,5	0,021	71	18	36
LCR-A-7	29,8	1,061	70,4	0,023	69	16	32
LCR-A-8	32,3	0,660	70,1	0,023	68	16	32
LCR-Z-2	6,41	1,084	93,6	0,011	93	42	84
LCR-Z-3	6,00	0,334	94,7	0,013	91	50	100
LCR-Z-5	12,75	0,294	87,5	0,035	77	44	88
LCR-Z-8	52,5	0,498	47,9	0,032	45	4	8
LCR-Z-9	64,0	0,256	37,4	0,053	30	4	8
LCR-Z-10	89,2	0,135	11,5	0,018	10	6	12
LCR-S-1	29,4	1,095	70,6	0,040	68	16	32
LCR-S-3	51,0	0,215	49,3	0,004	48	19	38

<sup>a</sup>Tanto por ciento de actividad referido al valor inicial. <sup>b</sup> Porcentaje de actividad del estado intermedio E<sub>1</sub> con respecto a la actividad inicial. <sup>c</sup> Factor de estabilización.

De los resultados de la Tabla 13 y según el modelo de Henley y Sadana<sup>139</sup> (ver apartado II.2.7), se deduce que la lipasa nativa e inmovilizada sufre una primera desactivación que la conduce a un estado todavía activo ( $\alpha_1 \neq 0$ ) el cual, a continuación, se desactiva totalmente ( $\alpha_2 = 0$ ). En todos los casos, la desactivación se ajusta al caso 2 del modelo, en el cual  $k_1 > k_2$ .

Como principales conclusiones podemos decir que:

1) La lipasa de *C. rugosa* comercial en estado nativo se desactiva en dos pasos con un estado intermedio E<sub>1</sub> que posee un 66% de actividad con respecto a la enzima original. El primer

paso es fulminante ( $k_1 = 19,9 \text{ h}^{-1}$ ) hasta llegar al intermedio, el cual se desactiva rápidamente ( $k_2 = 0,446 \text{ h}^{-1}$ )

2) Con la inmovilización se consigue estabilizar a la enzima ya que disminuye considerablemente el valor de  $k_2$ , y también se produce una disminución del valor de  $k_1$ . Si nos fijamos en cada tipo de derivado en particular, vemos que:

a) El comportamiento de los derivados obtenidos con agarosa tosilada es similar (Figura 12), de manera que sufren una primera desactivación (de orden 20 veces menor que la enzima nativa, según sus valores de  $k_1$ ) hasta llegar al mismo intermedio  $E_1$ , con un 70% aproximadamente de actividad con respecto a la inicial. Este intermedio se encuentra estabilizado y se desactiva lentamente, al tener una  $k_2$  muy pequeña. El incremento en la carga enzimática (LCR-A-2 a LCR-A-8, Tabla 10) disminuye la estabilidad térmica. Este hecho se debe a la formación de un mayor número de uniones enzima-soporte en aquellos derivados preparados con menor cantidad de lipasa (LCR-A-2 y A-4), de tal forma que  $E_1$  tiene mayor resistencia a la desactivación térmica (el valor de  $k_2$  disminuye aún más).

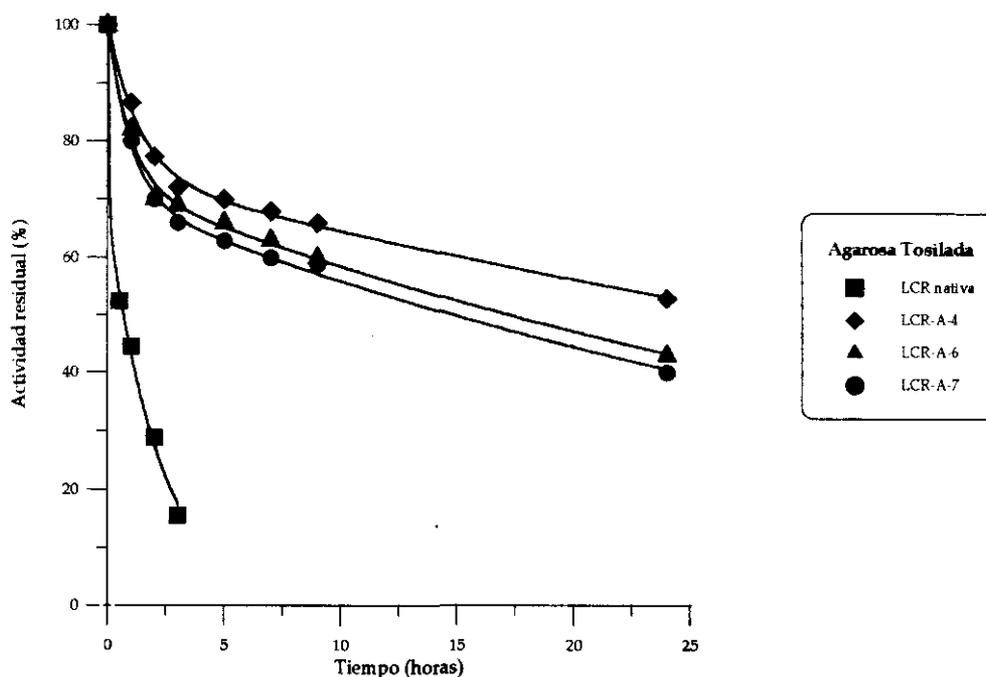


Figura 12. Desactivación a 50°C de los derivados inmovilizados de LCR sobre agarosa tosilada.

2) Los derivados preparados con zuro tosilado de menor tamaño de partícula (LCR-Z-3 y Z-5; Figura 13) son más termorresistentes que aquellos obtenidos con el zuro de mayor tamaño

(LCR-Z-8, Z-9 y Z-10; Figura 14), y a su vez, más estables que los preparados con agarosa tosilada. La razón estriba en que estos derivados alcanzan, tras una primera desactivación, un estado intermedio  $E_1$  con un 90% de actividad, la cual disminuye lentamente. No obstante, estos derivados carecen de utilidad práctica debido a su baja actividad retenida (Tabla 11).

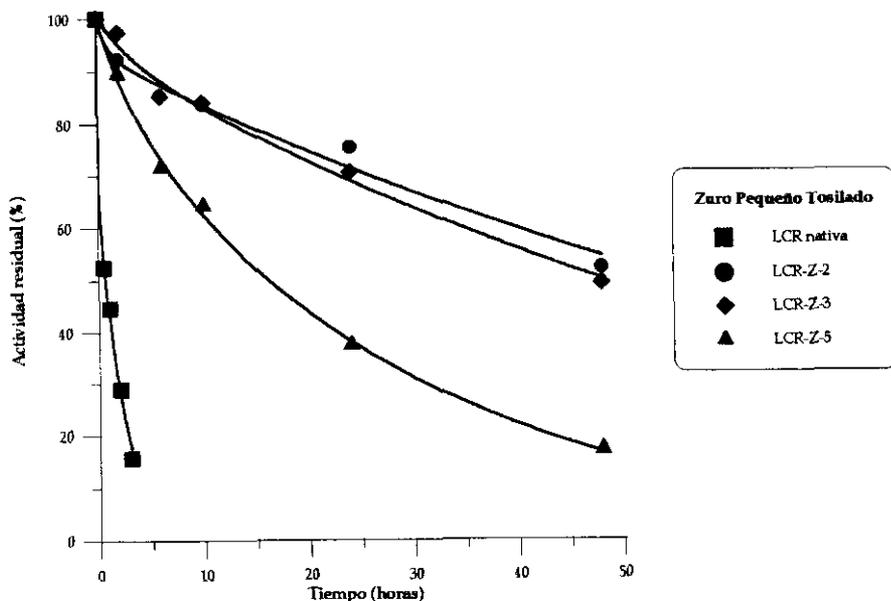


Figura 13. Desactivación a 50°C de los derivados inmovilizados de LCR sobre zuro pequeño tosilado.

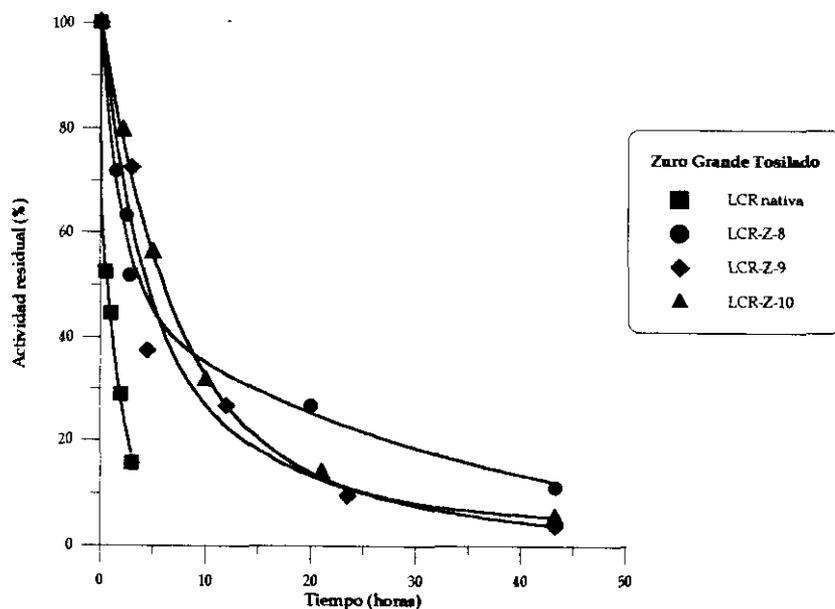
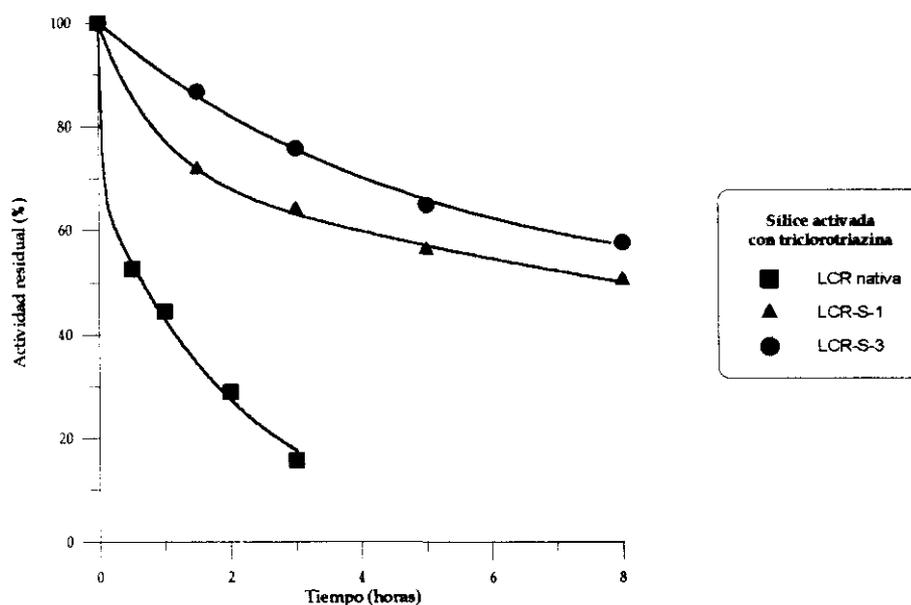


Figura 14. Desactivación a 50°C de los derivados inmovilizados de LCR sobre zuro grande tosilado.

3) En la desactivación de los derivados preparados sobre sílice activada con TCT (Figura 15), el intermedio E<sub>1</sub> del derivado obtenido con menor carga enzimática (LCR-S-1) tiene más actividad ( $\alpha_1 = 68\%$ ) que el derivado obtenido con mayor carga enzimática (LCR-S-3 con un  $\alpha_1 = 48\%$ ). En el primer caso no hay tanta formación de agregados de lipasa y la unión es fundamentalmente en monocapa, por lo que LCR-S-1 es más activo y estable.



**Figura 15.** Desactivación a 50°C de los derivados inmovilizados de LCR sobre sílice activada con TCT.

Como conclusión, podemos decir que la inmovilización produce una estabilización de la lipasa nativa de *C. rugosa* en todos los derivados obtenidos. Esta estabilización se debe, evidentemente, a una restricción en los grados de libertad de la proteína por efecto de la unión al soporte. Conclusiones análogas se han propuesto en la inmovilización de la misma lipasa sobre diferentes polímeros<sup>129</sup>.

La menor estabilidad de los derivados obtenidos al inmovilizar sobre sílice (LCR-S-1 y S-3) respecto a los obtenidos por inmovilización sobre agarosa (LCR-A-4) se debería a las condiciones de ensayo (50°C y derivado sin liofilizar). En estas condiciones, la sílice, al ser un soporte hidrófobo, favorece una mayor concentración de agua sobre las moléculas de enzima. De este modo, las moléculas de agua chocan libremente contra la proteína y la enzima se desnatura más rápidamente. Por el contrario, la agarosa retiene más agua, al ser un soporte muy hidrófilo, y preserva a la enzima de ser desnaturada.

### II.3.2. INMOVILIZACIÓN DE LA LIPASA B DE *Candida antarctica*

Se determinó la concentración óptima de lipasa comercial dentro del intervalo en que la actividad enzimática es proporcional a la cantidad de enzima añadida en el ensayo (Figura 16). La respuesta fue lineal hasta alcanzar un valor de 0,15 mg de SP525/ml; por tanto, los ensayos se realizaron con cantidades por debajo de este valor de concentración, tanto con la enzima en solución como inmovilizada.

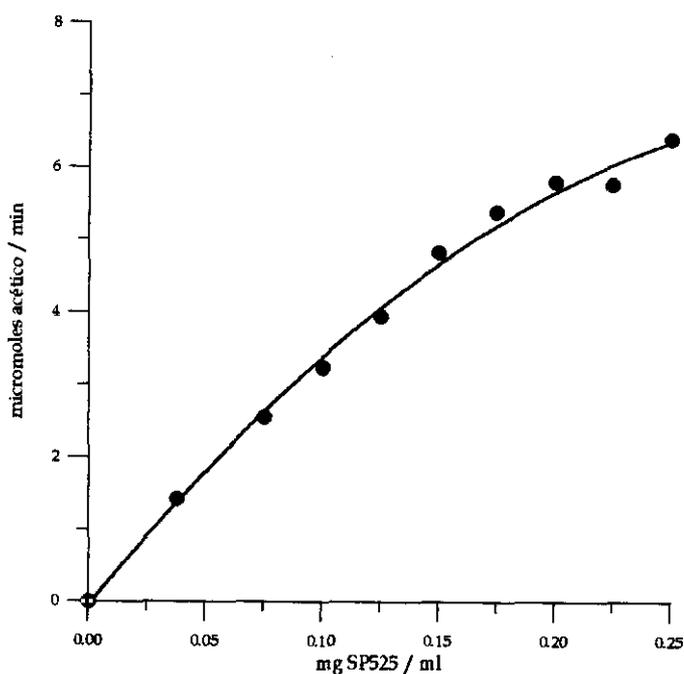


Figura 16. Variación de la actividad enzimática con la concentración de LBCA.

En la inmovilización de la lipasa B de *C. antarctica* se han empleado tanto soportes orgánicos como inorgánicos, activados según diferentes metodologías. Por un lado, como soportes orgánicos, se ha recurrido a sefarosas con grupos activados de diferente longitud; y por otro lado, se han utilizado sílice y alúmina activadas con triclorotriazina como soportes inorgánicos. Los resultados de la Tabla 14, nos conducen a las conclusiones que se comentan en los dos siguientes apartados.

Tabla 14. Inmovilización de la lipasa B de *Candida antarctica*.

Derivado	Soporte activado	mg añadidos/ g. soporte	Inmovilización <sup>c</sup> (%)	(mg/g sop.)	Actividad Retenida <sup>f</sup> (%)
LBCA-SE-1	Sefarosa epoxiactivada <sup>a</sup>	15	44	6,6	39
LBCA-SE-2	Sefarosa epoxiactivada <sup>a</sup>	50	18,4	9,2	49
LBCA-ST-1	Sefarosa tresilada <sup>b</sup>	15	42,5	6,4	72
LBCA-ST-2	Sefarosa tresilada <sup>b</sup>	50	27,4	13,7	28
LBCA-S-1	Sílice-TCT <sup>c</sup>	20	90,2	18,1	38
LBCA-S-2	Sílice-TCT <sup>c</sup>	67	48,8	32,5	31
LBCA-AL-1	Alúmina-TCT <sup>d</sup>	67	9,3	6,2	17

<sup>a</sup>19-40  $\mu$ eq de grupos oxirano/ml gel húmedo, <sup>b</sup>Grado de activación no suministrado por la casa comercial Pharmacia; <sup>c</sup>0,24 g TCT/g sílice, <sup>d</sup>0,19 g TCT/g alúmina, <sup>e</sup>referido a la cantidad de SP525 añadido en el proceso de inmovilización, <sup>f</sup>actividad enzimática en hidrólisis de triacetina.

### II.3.2.1. Inmovilización de la LBCA sobre soportes orgánicos.

1) La cantidad de lipasa B inmovilizada sobre sefarosa es menor que la que se obtuvo en el caso de la lipasa de *C. rugosa* comercial sobre agarosa tosilada (30-35 mg, Tabla 10). Este hecho ha de atribuirse a que la lipasa B de *C. antarctica* se ha inmovilizado pura, mientras que el polvo comercial de LCR contiene muchas impurezas y sólo un 3% de lipasa pura. J.M. Moreno<sup>143</sup> demostró que el aumento en el grado de purificación de esta última lipasa, disminuye la cantidad de enzima pura unida a un soporte durante el proceso de inmovilización. Posiblemente, los glicopéptidos y otras moléculas que acompañan a la lipasa de *C. rugosa* en el preparado comercial, favorecen la unión de la enzima al soporte.

2) El tipo de sefarosa (4B ó 6B) y la longitud del brazo espaciador (12 átomos de carbono para la sefarosa 6B epoxidada y ninguno para la 4B tresilada) no influye en la cantidad de lipasa inmovilizada, tanto si se utiliza mucha o poca carga enzimática en el proceso de inmovilización. En la inmovilización de la LCR sobre diferentes polímeros, Shaw y cols.<sup>103</sup> observaron un comportamiento diferente, en el que la cantidad de lipasa inmovilizada variaba según la cadena unida a la matriz. En este estudio, la cantidad de lipasa inmovilizada era menor en soportes con un brazo espaciador de 2 carbonos que en aquellos con 6 ó 12 carbonos. Sin embargo, el brazo espaciador enzima-soporte, sí parece influir en

la actividad retenida de los derivados obtenidos con las sefarosas activadas. Un brazo largo, como en el caso de la sefarosa epoxidada permite cambios conformacionales en la enzima (LBCA-SE-1), lo que no sucede con la sefarosa tresilada en la que el brazo más corto posibilita una mayor rigidez de la proteína y, por tanto, una mayor estabilidad (LBCA-ST-1). En este último caso, si se aumenta la cantidad de lipasa en el proceso de inmovilización (LBCA-ST-2), aumenta la carga enzimática, pero disminuye la actividad por formación de agregados en multicapa.

### II.3.2.2. Inmovilización de la LBCA sobre soportes inorgánicos.

En primer lugar podemos observar cómo la alúmina activada con TCT no es un soporte adecuado para la inmovilización de la LBCA, debido a los resultados tan bajos de inmovilización y actividad retenida.

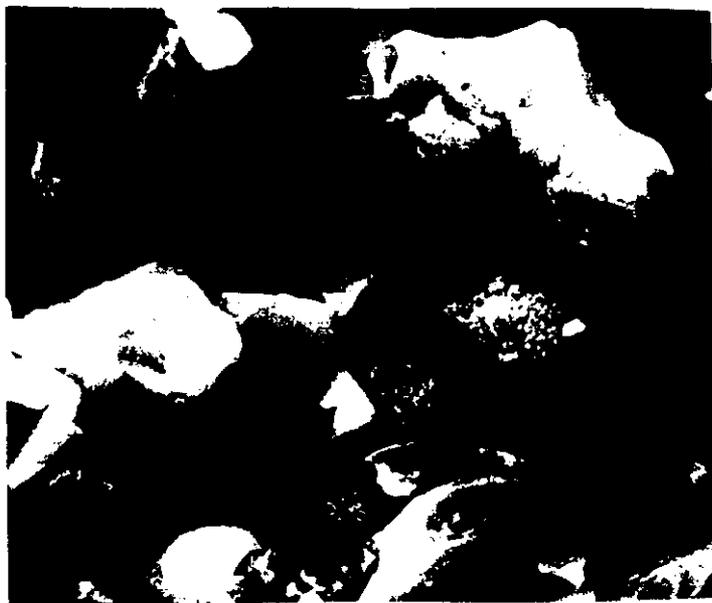
En cambio, la sílice es capaz de admitir mayor carga enzimática, la cual se incrementa al aumentar la cantidad de lipasa añadida al comienzo de la inmovilización. Los valores de actividad retenida de los derivados en sílice nos indican la formación de agregados enzimáticos en multicapa, como sucedía con la lipasa de *C. rugosa* (Tabla 12). Estos agregados se han visualizado mediante fotografías de microscopía electrónica (Figura 17).

### II.3.2.3. Estabilidad térmica de los derivados de lipasa B de *C. antarctica*.

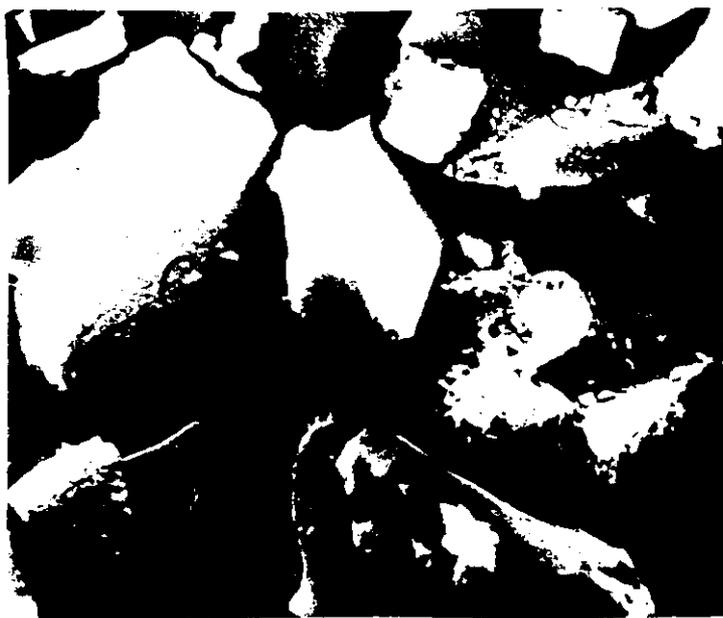
Se realizó un estudio comparativo de la termoestabilidad a 50°C de los derivados inmovilizados de LBCA preparados en nuestro laboratorio, los suministrados por la casa Novo Nordisk y la lipasa nativa en solución. De los resultados de la Tabla 15, se puede deducir que:

1) La lipasa soluble sufre una desactivación térmica de tipo exponencial simple; es decir, sigue el caso 1 del modelo de Henley y Sadana, en el cual  $\alpha_1=0$ ,  $\alpha_2=0$  y  $k_2=0$ . Por tanto, la lipasa B de *C. antarctica* pierde totalmente su actividad en un solo paso, mientras que la lipasa de *C. rugosa* lo hace en dos pasos con la aparición de un estado intermedio que se desactiva más lentamente. Esta diferencia de comportamiento se debe atribuir al grado de pureza de la enzima o/y a la ruptura de los puentes disulfuro dentro de la estructura proteica.

a)



b)



**Figura 17.** Microscopía electrónica: a) sílice activada con TCT; b) lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada sobre sílice (escala: 1cm = 5  $\mu$ m).

Por un lado, la lactosa que contiene el preparado comercial de LCR<sup>132</sup>, y que está ausente en la LBCA, podría estabilizar a la proteína. Por otro lado, la ruptura de puentes disulfuro, con diferente ubicación en cada una de las lipasas, alteraría la estructura secundaria y terciaria de la proteína de diferente manera. De esta forma, la ruptura del puente disulfuro cys<sub>218</sub>-cys<sub>258</sub> presente en la LBCA sería letal, ya que alteraría una zona de la proteína que forma la cavidad del centro activo. Por el contrario, la LCR posee en total dos puentes disulfuro (cys<sub>60</sub>-cys<sub>97</sub> y cys<sub>268</sub>-cys<sub>277</sub>) alejados del centro activo, por lo que su ruptura no sería tan letal y daría lugar a una especie molecular de menor actividad catalítica (Tabla 14).

Tabla 15. Desactivación enzimática a 50°C de los derivados inmovilizados de lipasa B de *C. antarctica*.

Derivado	A <sub>1</sub>	k <sub>1</sub> (h <sup>-1</sup> )	A <sub>2</sub>	k <sub>2</sub> (h <sup>-1</sup> )	α <sub>1</sub>	t <sub>1/2</sub> (h)	F
Nativa	98,9	1,30	0	0	0	0,5	1
LBCA-SE-1	43,6	1,80	56,0	0,03	55	4	8
LBCA-SE-2	57,8	0,70	43,3	0,06	40	2,5	5
LBCA-ST-1	52,8	1,01	47,2	0,01	47	2,5	5
LBCA-ST-2	27,6	0,56	73,3	0,08	63	4,5	9
LBCA-S-1	12,5	0,85	87,8	0,02	86	24	48
LBCA-S-2	74,0	0,42	24,6	0,01	23	2,5	5
SP435A	46,7	4,10	52,6	0	53	0,5	1
Novozym 435	101	0,05	0	0	0	14	28

2) Los derivados de LBCA preparados por unión covalente en nuestro laboratorio, siguen un modelo de desactivación exponencial doble (Figuras 18-20). Según los modelos propuestos, los derivados se desactivan según el caso 2, donde  $k_1 > k_2$ , y en el cual el intermedio E<sub>1</sub> está ligeramente estabilizado al poseer una  $k_2$  tan pequeña. En la preparación de los derivados sobre sílice, un aumento en la carga enzimática tiene un efecto posterior en la estabilidad de la lipasa. Una carga mayor durante el proceso de inmovilización origina una unión de moléculas de enzima en multicapa, y el derivado posee un intermedio con baja actividad (LBCA-S-2 con α<sub>1</sub>=23%). Sin embargo, en el derivado LBCA-S-1, la unión fundamentalmente se realiza en monocapa y su intermedio posee mayor actividad (α<sub>1</sub>=86%).

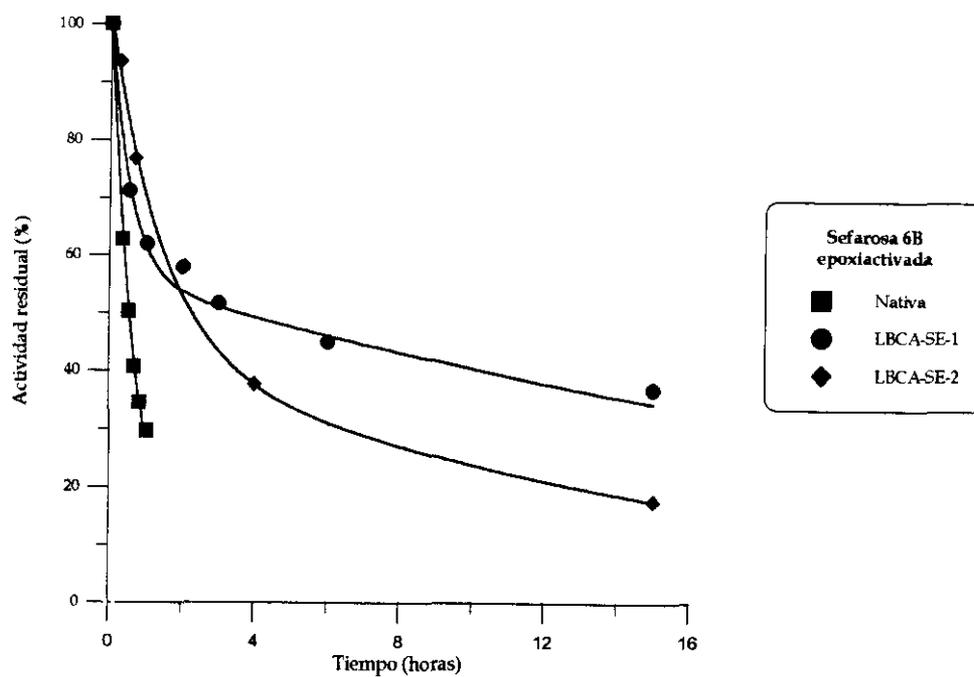


Figura 18. Desactivación a 50°C de los derivados inmovilizados de LBCA sobre sefarosa 6B epoxidada.

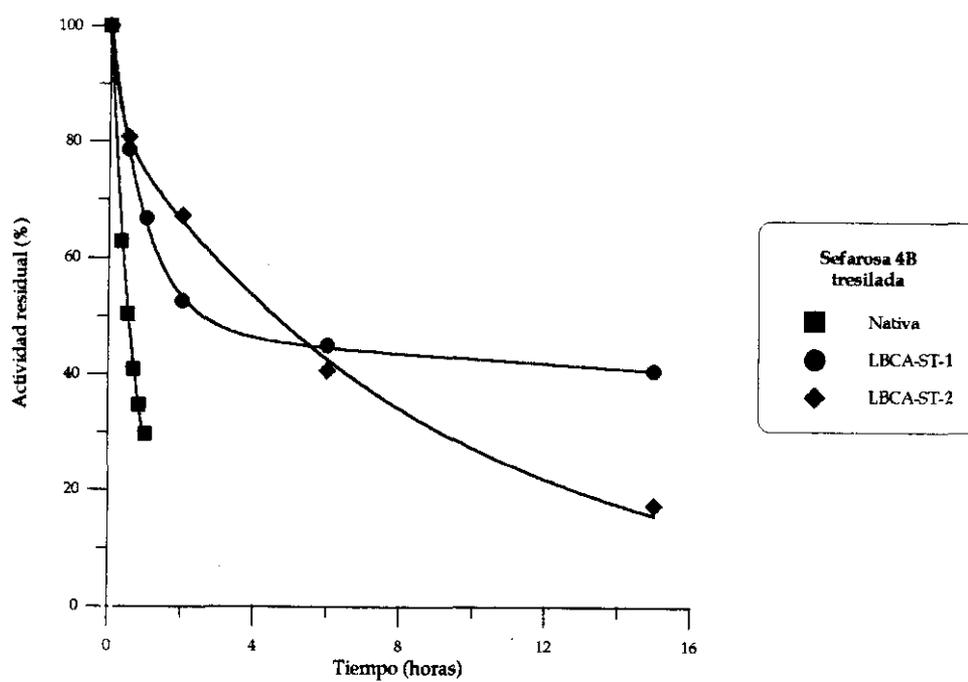


Figura 19. Desactivación a 50°C de los derivados inmovilizados de LBCA sobre sefarosa 4B tresilada.

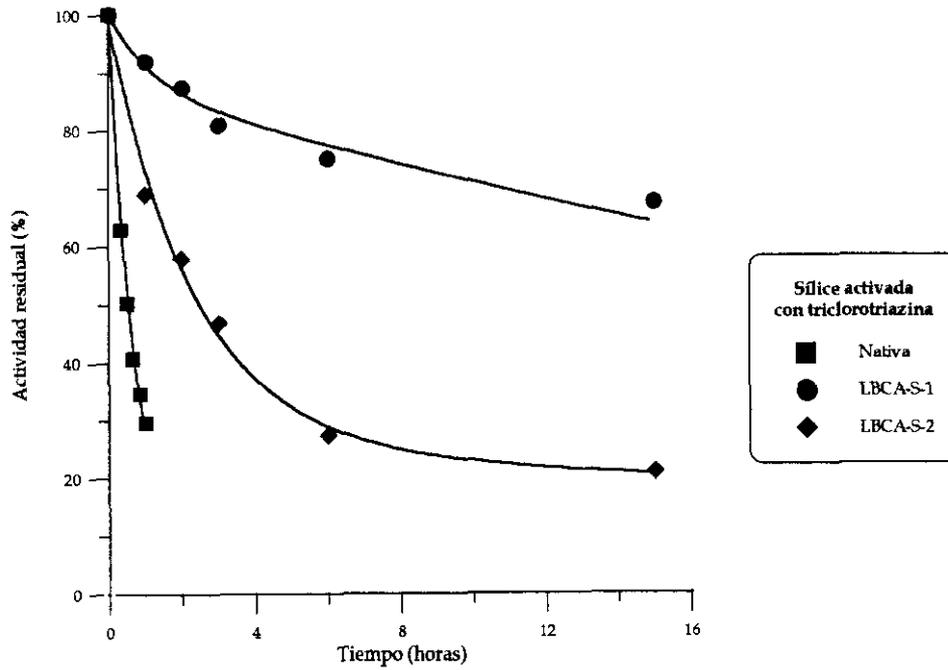


Figura 20. Desactivación a 50°C de los derivados inmovilizados de LBCA sobre sílice activada con triclorotriazina.

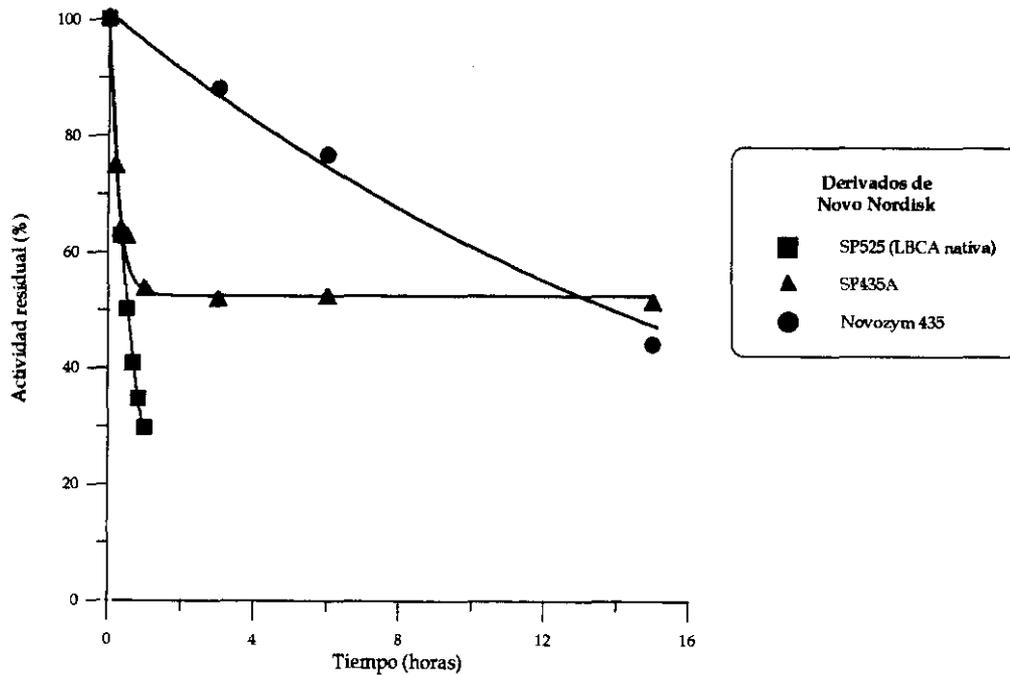


Figura 21. Desactivación a 50°C de los derivados inmovilizados de LBCA sobre resinas, administrados por Novo Nordisk.

3) La desactivación de los dos derivados suministrados por Novo Nordisk Bioindustrias S.A. es completamente diferente (Tabla 15 y Figura 21). Este hecho se debe a la diferente estructura de los soportes donde la enzima se encuentra inmovilizada, como se puede apreciar en las fotos de microscopía electrónica (Figuras 22 y 23).

Después de una rápida desactivación, el derivado SP435A mantiene su actividad durante mucho tiempo. Este tipo de desactivación seguiría el modelo 3 de Henley y Sadana, en el cual  $\alpha_2=0$  y  $k_2=0$ . Al poseer un valor nulo de  $k_2$ , el intermedio  $E_1$  ( $\alpha_1=53\%$ ), está muy estabilizado. Esta gran estabilidad se debe a la localización de la lipasa, que va alojada en unas grandes cavidades que presenta el soporte (Figura 22b) donde se encuentra a refugio de ser desnaturalizada por efecto de la temperatura.

El soporte base de Novozym 435 es bien diferente al de SP435A. Son pequeñas esferas donde la lipasa se encuentra adsorbida en superficie (Figura 23). La fragilidad de estas esferitas (se desmenuzan con una agitación continuada en reactor) junto con la gran exposición de la lipasa al medio, explican su mayor desactivación térmica en comparación con SP435A. Novozym 435 sufre una desactivación de tipo exponencial simple sin la aparición de ningún estado intermedio (caso 1,  $\alpha_1=0$ ,  $\alpha_2=0$  y  $k_2=0$ ). El hecho de que la enzima se encuentre adsorbida en superficie, sin ninguna protección, hace que el patrón de desactivación sea análogo al de la enzima en estado nativo, pero más lento.

a)



b)

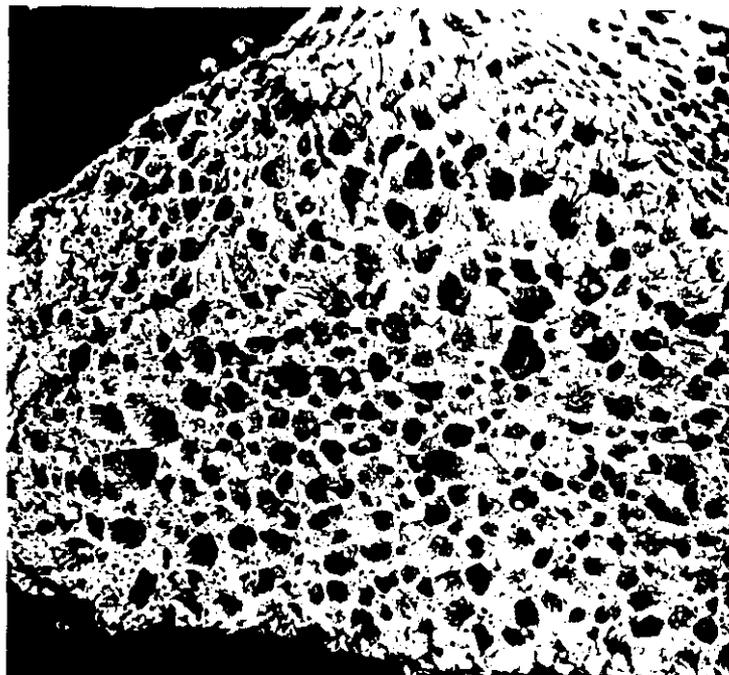
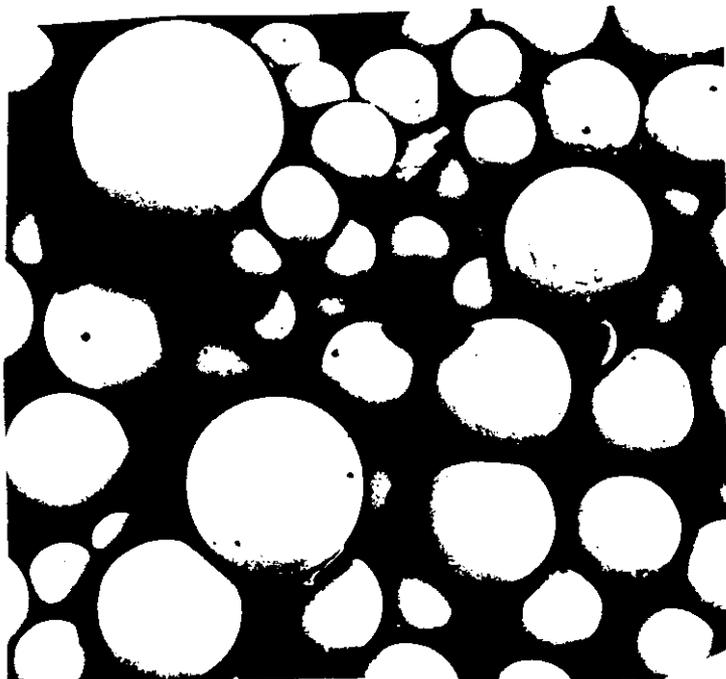


Figura 22. Microscopía electrónica del derivado SP435A de lipasa B de *C. antarctica*. (a) escala: 1cm = 200  $\mu$ m; (b) escala: 1cm = 50  $\mu$ m.

a)



b)



Figura 23. Microscopía electrónica del derivado **Novozym 435**.  
(a) escala: 1cm = 200  $\mu\text{m}$ ; (b) escala: 1cm = 20  $\mu\text{m}$ .



## ***Capítulo III:***

### ***Lipasas inmovilizadas empleadas en medios orgánicos***



## III.1. INTRODUCCIÓN

### III.1.1. CATÁLISIS ENZIMÁTICA EN MEDIOS ORGÁNICOS.

El agua es el medio donde las enzimas actúan normalmente durante los procesos biológicos. En esta situación, las enzimas se pliegan de tal forma que los aminoácidos apolares se sitúan en el interior, mientras que los residuos polares se colocan en la superficie, donde se encuentran hidratados<sup>145</sup>. Este efecto no existe en el seno de un disolvente orgánico, en el cual los residuos apolares son solubles y los hidrófilos y/o cargados son insolubles, con lo que la enzima es propensa a replegarse de forma inversa a su estado natural. Todos estos hechos plantean la siguiente pregunta: **¿ cómo son capaces la enzimas de retener su actividad catalítica en un medio orgánico ?**.

Este comportamiento, en principio inusual, se ha explicado de diversas maneras. Todas estas explicaciones coinciden en señalar que la estructura enzimática en el medio orgánico permanece inalterada y, por tanto, la enzima mantiene su actividad.

Por ejemplo, algunos autores afirman que la enzima nativa en el seno del disolvente orgánico sufre un posible atrapamiento cinético, debido a las interacciones hidrofóbicas producidas por la baja constante dieléctrica del medio, lo que mantiene inalterada la estructura de la proteína. Esta *rigidez enzimática* se ha comprobado en la proteinasa  $\alpha$ -lítica mediante complicadas técnicas de RMN de deuterio en estado sólido<sup>146</sup>, y también en la  $\alpha$ -quimotripsina mediante técnicas de resonancia de spin electrónico<sup>147</sup>. Esta rigidez explicaría la gran estabilidad térmica de las enzimas en medios no acuosos.

Otros autores han comprobado que, después de liofilizar una disolución de enzima, ésta permanece con la conformación que poseía al pH de la disolución de partida. Dicha conformación se mantiene cuando la enzima liofilizada se emplea en disolventes orgánicos anhidros<sup>148</sup>.

Finalmente se ha logrado comprobar, mediante el análisis de los diagramas de difracción de Rayos X, que la estructura de la subtilisina Carlsberg cristalizada en acetonitrilo anhidro es idéntica a la de la enzima obtenida en agua<sup>149</sup>.

### III.1.1.1. Ventajas de la catálisis enzimática en un medio orgánico.

El empleo de las enzimas en medios orgánicos presenta las siguientes ventajas frente a su utilización en medios acuosos:

1. se pueden realizar reacciones termodinámicamente imposibles de llevar a cabo en agua;
2. se incrementa la solubilidad de reactivos apolares;
3. se produce un desplazamiento del equilibrio termodinámico a favor del proceso<sup>150</sup>;
4. la recuperación de los productos de la reacción en disolventes de bajo punto de ebullición es más sencilla<sup>151</sup>;
5. se produce una mejora de la estabilidad térmica de las enzimas. Las enzimas disueltas en agua se inactivan cuando se las somete a altas temperaturas, debido a un desplegamiento parcial de la proteína y a las alteraciones dentro de la estructura secundaria de la molécula<sup>152</sup>. En todos estos procesos de desactivación interviene el agua que, al chocar con la proteína, provoca su cambio conformacional. Este hecho llevó a pensar que en medios anhidros la estabilidad de la enzima a temperaturas altas, mejoraría. Esta hipótesis fue confirmada por Zaks y Klibanov en 1984. Estos autores observaron cómo la lipasa pancreática porcina perdía totalmente su actividad en pocos segundos en un medio acuoso a 100°C. En cambio suspendida en tributirina anhidra y heptanol a la misma temperatura, incrementaba sorprendentemente su vida media hasta 12 horas<sup>153</sup>.
6. al ser insolubles en el medio orgánico, las enzimas se pueden recuperar mediante una simple filtración;
7. no hay posibilidad de contaminación bacteriana.
8. se evitan reacciones secundarias provocadas por el agua, como son la hidrólisis de los anhídridos de ácido utilizados como agentes acilantes, o la polimerización de las quinonas, utilizadas como regenerador de cofactores;
9. aquellas enzimas inmovilizadas por adsorción sobre superficies no porosas no se desprenden del soporte cuando se emplean en un medio orgánico. Por tanto, no hace falta recurrir a la inmovilización por enlace covalente ni a otros métodos de atrapamiento de enzimas, más complejos que la adsorción y necesarios cuando se trabaja con enzimas en medios acuosos.

### III.1.1.2. Aplicaciones de las enzimas hidrolíticas en procesos de síntesis.

De los seis tipos de enzimas existentes, las hidrolasas (proteasas, esterasas y lipasas) son las más empleadas en Síntesis Orgánica por las siguientes razones:

- 1) la fácil adquisición de enzimas hidrolíticas de muy diverso origen;
- 2) su gran estabilidad en medios no acuosos;
- 3) no suelen requerir cofactor para ser activas.

Como resultado, más del 60% de todas las biotransformaciones de compuestos no naturales descritas durante las dos últimas décadas se han realizado con hidrolasas (Figura 24).

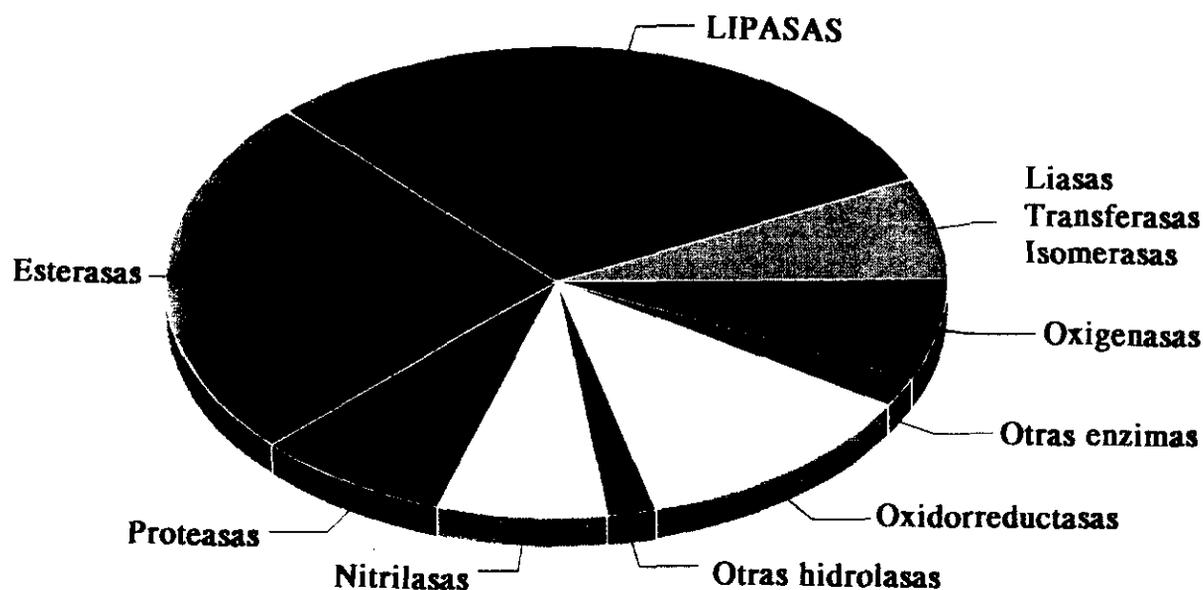


Figura 24. Enzimas empleadas en biotransformaciones.

Las enzimas hidrolíticas se pueden emplear tanto en medio acuoso como en medios orgánicos. En el primer caso, las hidrólisis catalizadas por las hidrolasas tienen un interés limitado en Síntesis Orgánica; sin embargo estas enzimas, en un medio orgánico, catalizan una gran variedad de reacciones sintéticas: esterificaciones, interesterificaciones, lactonizaciones, tiotransesterificaciones, aminolisis y oximolisis.

### III.1.1.3. Elección de disolvente.

De todos los parámetros que caracterizan a un disolvente orgánico: coeficiente de solubilidad de Hildebrand ( $\delta$ ), la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ), el momento dipolar ( $\mu$ ) o el coeficiente de partición P (en el sistema n-octanol/agua), etc., éste último es el que ejerce una mayor influencia en la actividad catalítica de la enzima<sup>154</sup>. Así se ha podido comprobar cómo la actividad enzimática es baja en disolventes cuyo  $\log P < 2$ , moderada si  $2 < \log P < 4$ , y alta si el  $\log P > 4$ . Aquellos disolventes con un  $\log P$  mayor de 4, no alteran la *capa de agua esencial* situada alrededor del biocatalizador, con lo que éste permanece activo.

### III.1.2. LA IMPORTANCIA DEL AGUA EN LAS REACCIONES BIOCATALIZADAS EN UN MEDIO ORGÁNICO

La presencia del agua es fundamental en la actividad catalítica de las enzimas, ya que ayuda a mantener la conformación activa mediante interacciones de tipo no covalente: interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals<sup>155</sup>. Al sustituir el agua por un disolvente orgánico se produce, en principio, una distorsión de la estructura proteica con la consiguiente pérdida de actividad enzimática. De hecho, ninguna enzima sería capaz de mantenerse activa en un disolvente totalmente anhidro si no fuera por la presencia de una mínima cantidad de agua. Así una enzima en un medio orgánico, se puede mantener completamente hidratada y activa mediante la adición de un pequeño volumen de agua, el cual previene la posible alteración que pueda provocar el medio orgánico de reacción en el microentorno de la proteína. En este principio se basa la catálisis enzimática en medios prácticamente anhidros, tema que ha merecido el interés de muchos investigadores y la organización de varios congresos internacionales<sup>156</sup>.

Es obvio que la presencia de agua es necesaria para la catálisis enzimática; lo que no parece tan claro es la cantidad mínima que requiere una enzima para mantenerse activa. Por ejemplo, son suficientes únicamente 50 moléculas de agua por molécula de enzima para que la  $\alpha$ -quimotripsina sea activa en octano<sup>157</sup>. En el caso de otras enzimas hidrolíticas como la subtilisina o las lipasas, también es necesaria una cantidad mínima de agua<sup>148,158,159</sup>. Pero para

otras enzimas es fundamental una gran nivel de hidratación. Como ejemplos nos encontramos la peroxidasa de rábano que dobla su actividad con un 0,25 % (v/v) de tampón en tolueno respecto a un 0,025 %<sup>160</sup>; y la polifenol oxidasa, que necesita aproximadamente un 0,5 % (v/v) de agua ( $3,5 \times 10^7$  moléculas de agua por molécula de enzima) para ser activa en cloroformo<sup>161</sup>. Entre el primer caso y este último existe una gran variación en cuanto a la cantidad de agua en el disolvente necesaria para la actividad de las enzimas mencionadas. Por tanto, esta magnitud no es del todo satisfactoria para controlar la actividad de la enzima en medios orgánicos ligeramente hidratados. Un método más correcto es relacionar la actividad catalítica con la cantidad de agua *disponible* por la enzima en un disolvente orgánico. De aquí surge la necesidad de recurrir al concepto de **actividad de agua ( $a_w$ )**, que parece ser el parámetro que mejor describe la distribución de agua en sistemas multifásicos<sup>162</sup>.

### III.1.2.1. Actividad de agua: definición.

Si suponemos un sistema cerrado en el que una fase gaseosa húmeda se encuentra en equilibrio con una fase líquida, también húmeda, podemos definir la actividad de agua ( $a_w$ ) de la fase líquida a una temperatura dada como [7]:

$$a_w = \frac{f_w}{f_w^\circ} \quad [7]$$

donde  $f_w$  es la fugacidad del agua en la mezcla a la temperatura de equilibrio, y  $f_w^\circ$  es la fugacidad del agua pura a la misma temperatura.

Si la concentración del agua en el sistema es pequeña (como sucede en los procesos biocatalizados en medios orgánicos ligeramente hidratados) y se trabaja a bajas presiones (p.e. a presión ambiental de 1 atm), se puede suponer que el vapor de agua se comporta como un gas ideal, y podemos sustituir la fugacidad por la presión de vapor ([8]).

$$a_w = \frac{P_w}{P_w^\circ} \quad [8]$$

La presión de vapor del agua pura en estas condiciones se considera igual a la unidad.

La ecuación transformada y expresada en tanto por ciento se define como *Humedad Relativa en el Equilibrio* (HRE) [9].

$$HRE = P_w \cdot 100 = a_w \cdot 100$$

[9]

### III.1.2.2. Isotermas de adsorción.

En la práctica,  $a_w$  se determina introduciendo la muestra en una cámara de medida cerrada, a temperatura constante y con un volumen lo más pequeño posible (ver apartado III.2.8). Pasado un tiempo, se alcanza el equilibrio entre la humedad del aire de la cámara y la de la muestra. Esta humedad relativa del aire en la cámara de medida, corresponde a  $P_w$ , y si consideramos  $P_w^\circ = 1$ , obtenemos el valor de  $a_w$  a partir de [8].

La forma más común de representar estos datos, es una curva que mide la variación de la cantidad de agua añadida (g. agua/g. muestra) frente a  $a_w$ . Según las medidas sean efectuadas durante la deshidratación de la muestra (*desorción*) o en el curso de la rehidratación de la misma (*adsorción o resorción*) se obtendrán dos curvas, que no tienen porqué coincidir (fenómeno de histéresis).

Una isoterma de absorción se divide en tres zonas (Figura 25):

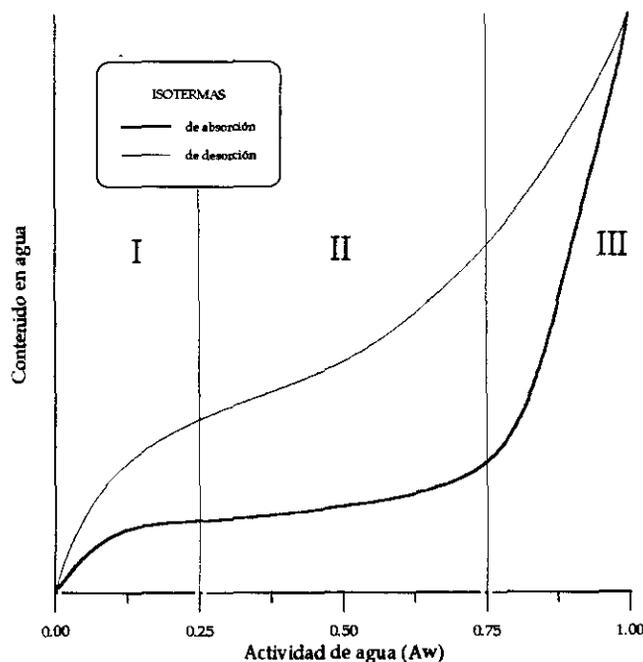


Figura 25. Isoterma teórica de adsorción-desorción.

Zona I. El agua presente en esta zona de la isoterma es el agua más fuertemente unida y más inmóvil, que en el caso de las proteínas correspondería al agua de cristalización. Este agua está unida a zonas polares de la proteína por interacciones agua-ión o agua-dipolo. La entalpía de vaporización de este agua es mucho mayor que la del agua pura, y no puede congelarse a  $-40^{\circ}\text{C}$ . El límite de las zonas I y II corresponde al contenido de humedad "monocapa". Al contrario de lo que pueda inferirse del nombre, la monocapa no significa la cobertura de toda la materia seca por una capa simple de moléculas de agua densamente empaquetadas, sino que se trata de la cantidad de agua necesaria para formar una monocapa sobre los grupos altamente polares y accesibles de la materia seca.

Zona II. El agua añadida en la zona II ocupa los restantes sitios de la primera capa y varias capas adicionales (agua en multicapa). La entalpía de vaporización del agua en multicapa es ligera o moderadamente mayor que la del agua pura.

Zona III. El agua de la zona III es el agua menos fuertemente ligada y más móvil (molecularmente) y se denomina "agua de la fase masiva". Tiene una entalpía de vaporización igual que la del agua pura, por lo que se trata de agua congelable.

### III.1.2.3. La competencia por el agua en un sistema biocatalítico.

La disponibilidad del agua alrededor de las moléculas activas de enzima depende de la presencia de elementos en el sistema que pueden competir por el agua, según sea su afinidad por la misma, como: los disolventes orgánicos, los reactivos, los aditivos y los soportes.

1) Disolventes: los disolventes compiten con la enzima por el agua. Según su polaridad, estos disolventes podrán disolver mayor (polares) o menor (apolares) cantidad de agua, y todo ello redundará en la actividad catalítica de la enzima. Esta capacidad de captación de agua por parte del disolvente se verá reflejada en su isoterma de adsorción. Peter Halling pudo comprobar la similitud de las isotermas de las proteínas en aire y en disolventes de diferente polaridad hasta un valor de  $a_w$  próximo a  $0,5^{163}$ . De este descubrimiento se deduce que el disolvente no influye en el agua fuertemente ligada a la

enzima (que suele corresponder al agua que queda después de la liofilización).

Al realizar estudios de actividad con lipasas en disolventes tan dispares como el hexano y la 3-pentanona, se observó que, en todos los casos e independientemente de la polaridad del medio, la actividad óptima se situaba en torno a una  $a_w = 0,55$ <sup>164</sup>.

Por tanto, la actividad de agua permite establecer las condiciones idóneas de reacción, independientemente de la naturaleza del disolvente y de su capacidad para absorber agua.

2) Reactivos: la naturaleza y concentración de los sustratos sobre los que actúan las enzimas, pueden alterar la distribución del agua en el sistema. Una concentración elevada de alcohol<sup>165</sup> o de ácido<sup>166</sup> en una reacción de esterificación catalizada por lipasas, puede provocar una disminución drástica de la actividad enzimática debido a un aumento de la capacidad de la fase orgánica para solubilizar agua, y por tanto de sustraerla del biocatalizador. Se pueden fijar unas condiciones óptimas de  $a_w$  en el medio que permitan compatibilizar una elevada concentración de reactivos con una actividad enzimática interesante.

### 3) Aditivos:

- las sales pueden competir por el agua con las moléculas de enzima<sup>167</sup>. De la misma forma, los azúcares presentes en muchos preparados enzimáticos comerciales, son capaces de captar agua<sup>168,169</sup>.

- compuestos similares al agua como el glicerol y otros glicoles<sup>170</sup>, la N,N dimetil formamida<sup>171</sup> y el dimetil sulfóxido<sup>172</sup> son capaces de alterar la actividad enzimática. La adición de estos compuestos produce un incremento en la actividad de muchos biocatalizadores en medios orgánicos con una  $a_w$  baja, pues actúan como miméticos del agua.

4) Soportes: Reslow demostró claramente en 1988 cómo la naturaleza del material que soportaba una enzima inmovilizada, era capaz de influir en la actividad catalítica<sup>173</sup>. La causa de este comportamiento era la *acuofilia* del soporte, definida como la capacidad de éste para retener agua. Estudios análogos<sup>166,174</sup> demostraron que los soportes hidrofóbicos favorecen la actividad catalítica frente a los soportes de tipo hidrofílico. De todas formas, ni la capacidad del soporte para absorber agua, ni su contenido en agua pueden pronosticar una actividad

determinada en una reacción biocatalizada.

En el equilibrio, la  $a_w$  será la misma en todas las fases del sistema, incluyendo el soporte donde la enzima se encuentra inmovilizada. Controlando el valor de  $a_w$  del sistema, se ha podido comprobar que el perfil actividad enzimática/ $a_w$  es prácticamente el mismo en la mayoría de los soportes empleados<sup>175-178</sup>.

#### III.1.2.4. Medida y control de la $a_w$ del sistema.

Realizar una reacción biocatalizada en un medio orgánico con  $a_w$  conocida, permite:

1. Determinar el efecto de agua en el equilibrio hidrolítico;
2. Predecir la actividad enzimática (al conocer la cantidad de agua unida) si se cambia la concentración de enzima, el disolvente, los reactivos o/y el soporte;
3. Indicar si hay presencia de fases acuosas emulsionadas en el medio orgánico.

Por todas estas razones es necesario disponer de métodos de medida y control de  $a_w$ . El control de la  $a_w$  es complicado si en la reacción se consume o se produce agua. Hay sensores que mantienen la actividad de agua mediante la adición o eliminación de agua<sup>179</sup>. Pero más interesante es disponer de un método que no necesite una medida directa para fijar la  $a_w$ . Un primer intento consistió en la utilización de un gel de sílice pre-equilibrado a una determinada  $a_w$  y posterior adición al medio de reacción<sup>180</sup>. Halling y cols. tuvieron más éxito al introducir pares de sales sólidas hidratadas como sistema para mantener una determinada  $a_w$  en un medio de reacción<sup>165</sup>. La actividad de agua se mantiene ya que el hidrato mayor puede ceder moléculas de agua, mientras que el hidrato menor puede captar agua. Frente al uso de una solución salina saturada, donde la  $a_w$  inicial del medio de reacción se ajusta por equilibrio a través de la fase gaseosa<sup>181</sup>, los pares de sales actúan como reguladores de  $a_w$  a un valor constante durante toda la reacción. Los diferentes valores de  $a_w$  constante se pueden lograr mediante la adición del par correcto<sup>182</sup>.

## **III.2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **III.2.1. Reactivos.**

El ácido ( $\pm$ ) 2-fenil propiónico fue suministrado por Fluka (Buchs, Suiza). El ibuprofeno y el flurbiprofeno, ambos ácidos en forma racémica, fueron generosamente cedidos por los laboratorios Boots Pharmaceuticals (Nottingham, Inglaterra). Los enantiómeros puros del ketoprofeno así como el racémico, fueron suministrados gratuitamente por los laboratorios Menarini (Badalona, España), mientras que el naproxeno racémico fue cedido por Syntex (Palo Alto, California, Estados Unidos). Todos los alcoholes empleados se compraron a Sigma (St.Louis, Missouri, EE.UU.) y los disolventes a Merck (Alemania), a excepción de las carvonas que fueron suministradas por Fluka.

### **III.2.2. Procedimiento para realizar la esterificación.**

Se prepara una disolución del ácido 2-aril propiónico (66 mM) y del alcohol (66-268 mM) en un volumen de disolvente orgánico (5 ó 10 ml.). La reacción comienza al añadir diferentes cantidades de lipasa (nativa o inmovilizada) a este medio. Las reacciones se llevaron a cabo a una temperatura fija en unos reactores de 25 ml. durante un tiempo determinado. Cada cierto tiempo se añadieron 100  $\mu$ l del medio de reacción a 1,4 ml del mismo disolvente, para posteriormente analizar la conversión de éster mediante cromatografía de gases.

### **III.2.3. Análisis del grado de esterificación.**

El seguimiento de las reacciones enzimáticas se realizó mediante cromatografía de gases, para lo cual se empleó un cromatógrafo Shimadzu GC-14A equipado con un detector de ionización de llama (FID), inyector con split (1:2) y una columna SPB<sup>TM</sup>-1 sulfur 15 x 0,32 mm (Supelco Inc. Bellafonte, PA, EE.UU). La temperatura del inyector se dispuso a

200°C y la del detector a 350°C; la fase móvil empleada fue una corriente de nitrógeno. El flujo de esta corriente, así como la temperatura de la columna varió según el sustrato a separar:

- Acido R,S 2-fenil propiónico y su éster propílico. La separación se consiguió con una temperatura de horno de 180°C y un flujo de nitrógeno de 3 ml/min. En estas condiciones, el ácido tiene un tiempo de retención de 3,15 minutos, y el éster de 4,2 min. A partir de los datos suministrados por el cromatograma se calculó la conversión en éster a través de dos métodos cuantitativos, ambos coincidentes:

1) *Método directo o de normalización de áreas*. En este método se considera que la suma de las áreas de todos los picos corresponde al 100% de los solutos separados y, por tanto, el área del soluto A será el porcentaje en peso del mismo en la muestra. Para poder aplicar este método es necesario que todos los componentes de la muestra se eluyan de la columna y que el detector presente igual sensibilidad para todos ellos, dando respuestas lineales y reproducibles. Esta condición sólo se cumple cuando se trata de series homólogas de solutos de alto punto de ebullición. En el caso de la separación del ácido 2-fenil propiónico (p.e. =260°C) y su éster propílico se cumplen estos requisitos. De todas formas, se comprobó la veracidad del método por comparación con el método cuantitativo del patrón externo.

2) *Método de la calibración absoluta o del estándar externo*. Consiste en utilizar un estándar externo, para lo cual se debe disponer de mezclas sintéticas cuyas concentraciones de analito (ácido 2-fenil propiónico) sean conocidas con precisión. Se prepara una curva de calibrado directa (área frente a concentración) a partir de los cromatogramas correspondientes obtenidos inyectando el mismo volumen de mezcla sintética (0,2 µl.) en cada caso. Cuando se inyecta igual volumen de la mezcla problema procedente del medio de reacción, el área obtenida se correlaciona directamente con la cantidad de ácido remanente a través de la curva de calibrado. La curva de calibrado para el ácido R,S 2-fenil propiónico disuelto en isooctano aparece en la Figura 26.

Los resultados obtenidos con el método del patrón externo coinciden con el método directo, por lo que éste último ha sido elegido, por su sencillez, como método para calcular la conversión en éster de los demás ácidos aril-propiónicos empleados en esta Tesis Doctoral.

Todos ellos cumplen las condiciones necesarias para poder aplicar éste método cuantitativo.

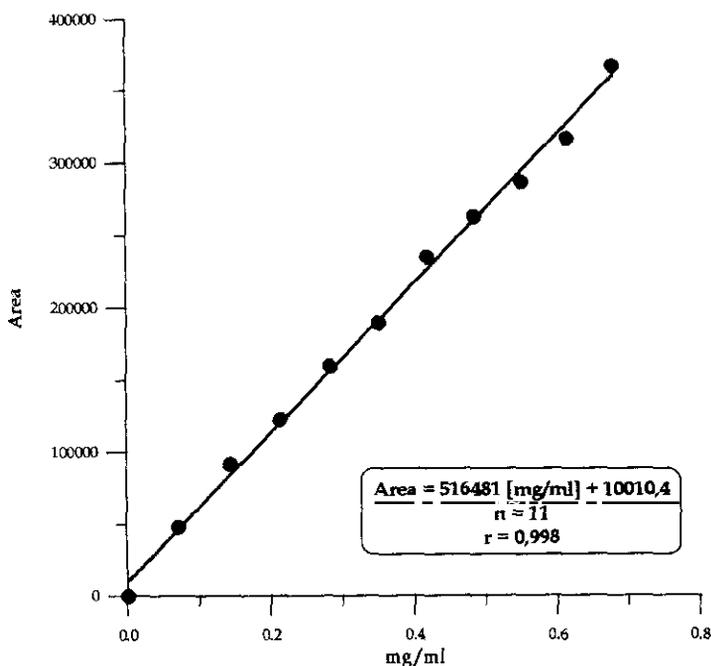


Figura 26. Recta de calibrado por C.G. para el ácido 2-fenil propiónico.

- Ibuprofeno (ácido *R,S* 2-(4'-isobutil)-fenil propiónico) y su éster propílico. Su separación se logró con una temperatura de 180°C en columna y con un flujo de N<sub>2</sub> de 12 ml/min. En estas condiciones el ácido tiene un tiempo de retención de 4 min. y el éster de 5.2 min.
- Naproxeno (ácido *R,S* 2-(6'-metoxi-2'-naftil) propiónico) y su éster propílico. La condiciones de separación fueron una temperatura de columna de 190°C y un flujo de nitrógeno de 30 ml/min., en las que el ácido tiene un tiempo de retención de 9,1 min. y el éster de 11,6 min.
- Flurbiprofeno (ácido *R,S* 2-(2'-fluoro-4'-bifenil) propiónico) y su éster propílico. La separación se consiguió con una temperatura de columna de 170°C y un flujo de nitrógeno de 30 ml/min. En estas condiciones el ácido tiene un tiempo de retención de 15,3 min. y el éster de 18,7 min.
- Ketoprofeno (ácido *R,S* 2-(3'-benzoil) fenil propiónico) y su éster propílico. Su separación se consiguió con una temperatura de columna de 165°C y un flujo de nitrógeno de 30 ml/min. El ácido se eluye primero a los 48 min. y éster aparece a 54 min.

### III.2.4. Diseño de experimentos.

Para estudiar las variables que influyen en un proceso biocatalizado se pueden seguir dos metodologías :

1) Los ensayos O.V.A.T. ("One Variable At Time") en los que se estudia una variable dentro de un intervalo de trabajo, mientras las demás permanecen constantes. Desafortunadamente este método no permite determinar, con máxima certeza, las variables que más influyen en el proceso, ya que nos limitamos a investigar únicamente una parte del intervalo de definición de la variable. Por añadidura, no se observa la influencia conjunta de las diferentes variables objeto del estudio.

2) El análisis factorial es un método de variación múltiple en el cual, todos los parámetros de estudio cambian simultáneamente de manera programada. De este modo se desarrolla un estudio eficiente y racional de las variables elegidas en todo su intervalo, y permite obtener una información adicional de los efectos debidos al conjunto de dos o más variables<sup>183</sup>. Este tipo de estudios se han realizado en el análisis de las variables que influyen en la esterificación del aceite de yoyoba catalizada por la lipasa de *Mucor miehei*<sup>184</sup>. En nuestro caso hemos aplicado la metodología del diseño de experimentos al estudio de las variables que más influyen en el proceso de esterificación del *R,S* ibuprofeno con 1-propanol en isooctano catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (SP435A). Para ello se preparó inicialmente una disolución 66 mM de ibuprofeno racémico en 10 ml. de isooctano. Se establecieron los valores máximos (+) y mínimos (-), así como el punto central (0) de las seis variables objeto del estudio (Tabla 16).

**Tabla 16.** Variables y niveles en el diseño de experimentos.

Variables	-1	0	1
X <sub>A</sub> (μl de agua )	0	150	300
X <sub>B</sub> (°C)	24	37	50
X <sub>C</sub> (r.p.m.)	100	300	500
X <sub>D</sub> (mg de SP435A)	100	300	500
X <sub>E</sub> (rel. molar ac/alc)	1:1	1:2	1:4
X <sub>F</sub> (horas)	3	5	7

El número total de experimentos fue de diecinueve, de los cuales dieciséis constituyeron el diseño factorial en sí (combinación de las variables en sus niveles máximo y mínimo), y tres (correspondientes al punto central) permitieron un análisis estadístico del diseño y el cálculo de los límites de confianza del estudio. Las experiencias se realizaron con las variables establecidas aleatoriamente por el programa STATGRAPHICS<sup>185</sup>.

La respuesta elegida fue la conversión en éster (Y%) determinada por cromatografía gaseosa, la cual se puede expresar como una función polinómica de las seis variables del estudio :

$$Y=b_0+\sum b_i X_i+\sum b_{ij} X_i X_j \quad [10]$$

### III.2.5. Ensayos OVAT (Influencia de cada variable por separado).

Estos ensayos se realizaron para completar y comprobar los resultados obtenidos en el diseño de experimentos. Las variables estudiadas por separado y las condiciones de reacción son las siguientes :

1) *Influencia de la temperatura.* Las condiciones de reacción fueron: una disolución de ibuprofeno (66 mM) y 1-propanol (66 mM) en 10 ml. de isooctano; 500 mg de derivado SP435A; una velocidad de agitación de 300 rpm. Los valores de temperatura fueron: 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 100°C.

2) *Influencia de la cantidad de biocatalizador añadido al medio.* Condiciones: una disolución de ibuprofeno (66 mM) y 1-propanol (66 mM) en 10 ml de isooctano; una temperatura de 50°C; una velocidad de agitación de 300 rpm. Las cantidades de derivado SP435A añadidas en cada caso fueron: 50, 100, 300, 500 y 750 mg.

3) *Influencia de la relación molar ácido/alcohol.* Condiciones iniciales: una temperatura de 50°C; 500 mg de derivado SP435A; una velocidad de agitación de 300 rpm. En la disolución de ibuprofeno (66 mM) en 10 ml. de isooctano, se fue variando la concentración de 1-propanol (66-132-268 mM) para conseguir diferentes relaciones molares de ácido/alcohol (1:1-1:2-1:4).

### III.2.6. Elección del alcohol.

Se prepararon diferentes disoluciones de ácido *R,S* 2-fenil propiónico (66 mM) en 10 ml. de isooctano con distintos alcoholes primarios (1-propanol, 1-butanol, 1-octanol), secundarios (isopropanol, ciclohexanol) y terciarios (ter-butanol) con una concentración 264 mM. Se analizó la conversión en éster a diferentes tiempos catalizada por 500 mg de derivado SP435A, a 50°C y con una agitación de 300 rpm.

### III.2.7. Elección del disolvente.

Se prepararon disoluciones de ácido *R,S* 2-fenil propiónico (66 mM) y 1-propanol (264 mM) hasta un volumen de 10 ml. con diversos disolventes orgánicos que variaban en su logP. Los disolventes empleados fueron: isooctano, ciclohexano, tolueno, éter diisopropílico, isobutil metil cetona, 1,4 dioxano y tetrahidrofurano. Posteriormente se catalizó la esterificación del ácido, tras la adición a estas disoluciones de 500 mg del derivado SP435A. La reacción se llevó a cabo a 50°C y con una velocidad de agitación de 300 rpm.

### III.2.8. Isotermas de adsorción y equilibrado de las reacciones a una $a_w$ .

Como paso previo a la utilización de las muestras en reacciones de síntesis y en la obtención de las diferentes isotermas de adsorción se realizó el secado de las mismas. Para ello se introdujeron las muestras en un desecador en cuyo interior se colocó  $P_2O_5$  anhidro. Posteriormente se conectó el desecador a una trompa de vacío durante al menos dos horas a temperatura ambiente, hasta conseguir un exhaustivo secado.

Las medidas de actividad de agua se realizaron en un medidor modelo ROTRONIC HYGROSCOPIC D.T. de la casa comercial Aname, especial para disolventes orgánicos, que permitió una lectura simultánea de la humedad y de la temperatura (Figura 27). Las medidas se efectuaron a una temperatura fija de 25°C, para lo cual se acopló un baño termostatizado a la célula de medidas. El aparato mide la humedad relativa en el equilibrio (HRE) con la ayuda de un captador higrométrico eléctrico.

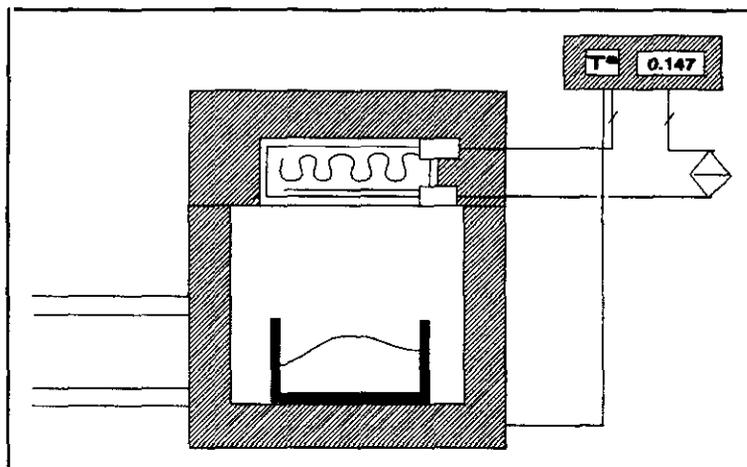


Figura 27. Captador electrónico de humedad empleado para medir la actividad de agua.

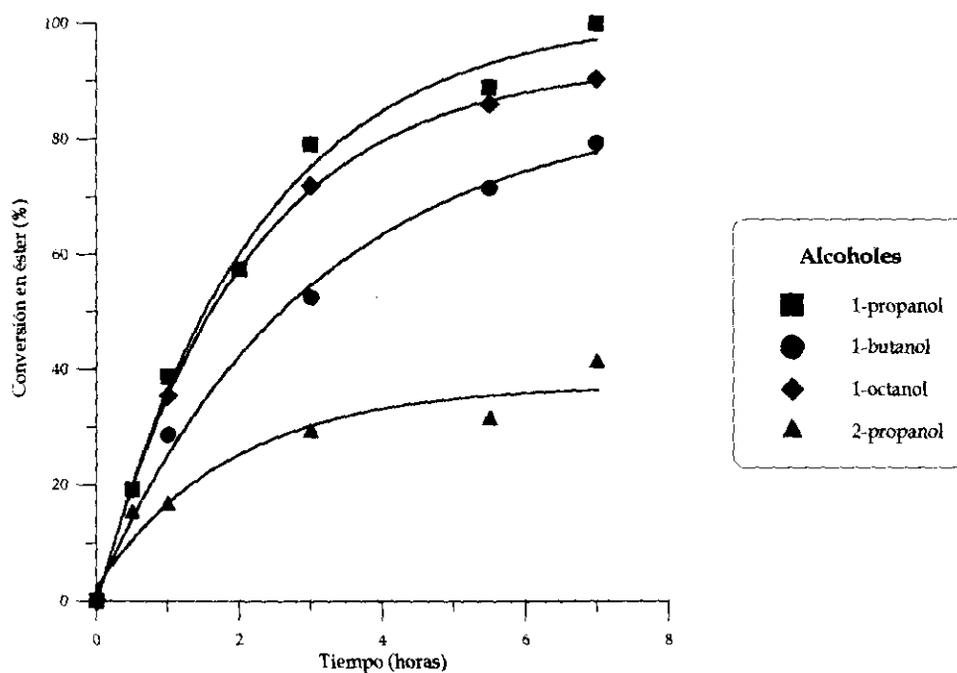
Antes de realizar una isoterma es conveniente calibrar el aparato. Para ello se emplearon disoluciones patrón de actividad de agua conocida, concretamente una sal-11 con una H.R. del 11,3% y una sal-98 de H.R. 98% de la casa comercial Novasina. Las isotermas de adsorción se obtuvieron representando la variación del valor de  $a_w$  con la adición de agua a la muestra seca (100-200 mg). Las isotermas con disolvente se realizaron con la misma cantidad de muestra sólida a la cual se le añadió 1 ml de isooctano anhidro ( con  $< 0,005\%$  de agua, producto 36006-6 de la casa Aldrich).

El equilibrado de las reacciones a una determinada  $a_w$ , se realizó equilibrando previamente el biocatalizador (P gramos) a la actividad de agua deseada, y añadiendo posteriormente la disolución de ácido y alcohol en isooctano (5 ml). El valor de  $a_w$  de la mezcla así obtenida suele ser menor si no se ha equilibrado también el disolvente previamente a la  $a_w$  deseada. Las reacciones a  $a_w = 1$ , se realizaron mediante la preparación de una disolución de ácido y alcohol en isooctano con un 20% de agua hasta un volumen total de 5 ml. Posteriormente se añadió el biocatalizador; de esta forma nos aseguramos que la mezcla se encontraba a una actividad  $a_w = 1$ .

### III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### III.3.1. Influencia de la cadena alcohólica en la reacción de esterificación

Las lipasas no específicas (como la de *C. rugosa*, *C. antarctica*, etc.) catalizan la reacción de esterificación tanto con alcoholes primarios como con secundarios, a diferencia de las lipasas específicas (p.e la de *M. miehei*) que lo hacen preferentemente con alcoholes primarios. Este hecho se ha podido comprobar en la esterificación del ácido *R,S* 2-fenil propiónico en isooctano catalizada por la LBCA inmovilizada (SP435A) con diferentes alcoholes (Figura 28). La síntesis de ésteres con alcoholes primarios tiene lugar a gran velocidad, mientras que con el isopropanol la esterificación es más lenta. No hubo reacción ni con alcohol terbutílico ni con ciclohexanol. Resultados análogos han sido descritos por Mustranta<sup>186</sup> en la esterificación del ibuprofeno catalizada por la lipasa nativa de *C. rugosa* en n-hexano.



**Figura 28.** Influencia de la cadena alcohólica en la esterificación del ácido *R,S* fenil propiónico catalizada por la LBCA inmovilizada. 66 mM ácido + 264 mM alcohol en 10 ml de isooctano;  $T^a = 50^{\circ}\text{C}$ ; 500 mg de SP435A; velocidad de agitación = 300 rpm.

Se escogió el 1-propanol para realizar todas las reacciones siguientes, dada su gran reactividad. De esta manera, nos asegurábamos que la naturaleza de los reactivos no fuera un factor limitante del proceso.

### III.3.2. Influencia del disolvente.

En la Figura 29 puede observarse la variación de la actividad enzimática específica frente a logP, parámetro que nos informa acerca del carácter lipóide del disolvente. La actividad de la LBCA inmovilizada (SP435A) aumenta en aquellos disolventes apolares ( $\log P > 2$ ) mientras que disminuye en aquellos más hidrófilos y solubles en agua ( $\log P < 2$ ). Resultados similares han obtenido otros autores que han empleado la lipasa nativa de *Candida rugosa* en la esterificación en medio orgánico del *R,S* ibuprofeno<sup>186</sup> y del ácido *R,S* 2-cloro propiónico<sup>187</sup>, que es un intermedio en la síntesis de herbicidas.

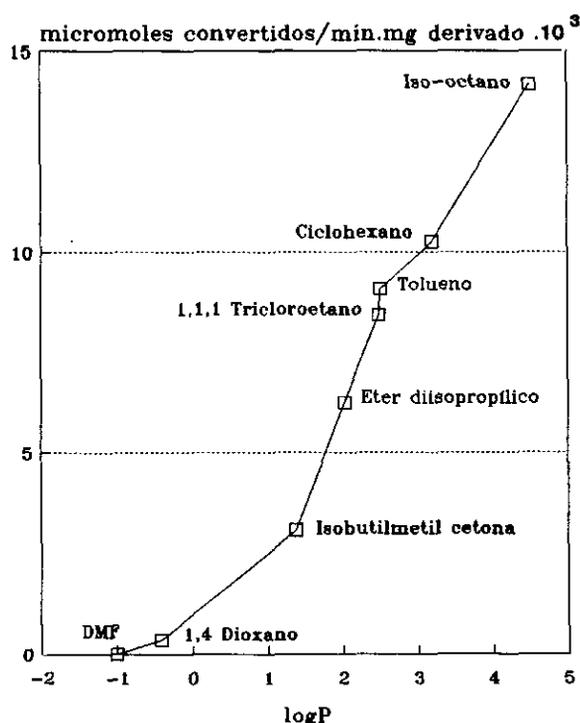


Figura 29. Influencia de la naturaleza del solvente en la esterificación del ac. ( $\pm$ ) 2-fenil propiónico con propanol ( $V_T=10$  ml de disolvente, 66mM ácido + 264mM 1-propanol,  $T^a=50^\circ\text{C}$ , 500 mg de SP435A y velocidad agitación=300 rpm).

### III.3.3. Influencia de las condiciones de reacción

En la esterificación del ibuprofeno con propanol catalizada por SP435A en isooctano - tomada como reacción modelo - se ha empleado la metodología del *diseño experimental* para estudiar la influencia de las condiciones de reacción sobre la actividad sintética de la enzima. Se fijó un volumen inicial de isooctano de 10 ml con una concentración de *R,S* ibuprofeno 66 mM, y se consideraron las variables de la Tabla 16 (página 93), con sus niveles máximos y mínimos.

Los experimentos fueron realizados de acuerdo con un diseño factorial de 2<sup>6</sup>. Los resultados de grado de esterificación, aparecen en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Diseño factorial: matriz experimental

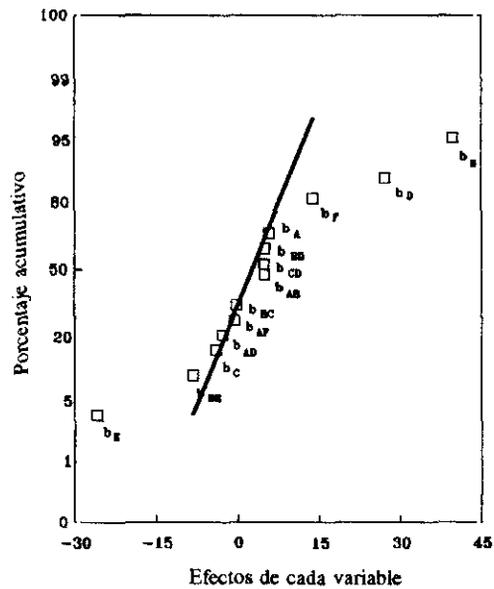
Exp	X <sub>A</sub>	X <sub>B</sub>	X <sub>C</sub>	X <sub>D</sub>	X <sub>E</sub>	X <sub>F</sub>	Y(%)
1	-	-	-	-	-	-	7,4
2	+	-	-	-	+	-	1,8
3	-	+	-	-	+	+	26,4
4	+	+	-	-	-	+	80,3
5	-	-	+	-	+	+	2,9
6	+	-	+	-	-	+	16,6
7	-	+	+	-	-	-	43,9
8	+	+	+	-	+	-	16,7
9	-	-	-	+	-	+	49,6
10	+	-	-	+	+	+	22,0
11	-	+	-	+	+	-	49,0
12	+	+	-	+	-	-	84,4
13	-	-	+	+	+	-	11,3
14	+	-	+	+	-	-	34,5
15	-	+	+	+	-	+	91,0
16	+	+	+	+	+	+	71,2
17	0	0	0	0	0	0	42,4
18	0	0	0	0	0	0	40,5
19	0	0	0	0	0	0	43,7

La conversión en ester (en %) es función polinómica de las seis variables según la ecuación [10]. Un análisis estadístico (Tabla 18) y el método de Daniels<sup>188</sup> (Figura 30) nos permitieron determinar las variables más influyentes en el proceso de esterificación.

Tabla 18. Análisis estadístico

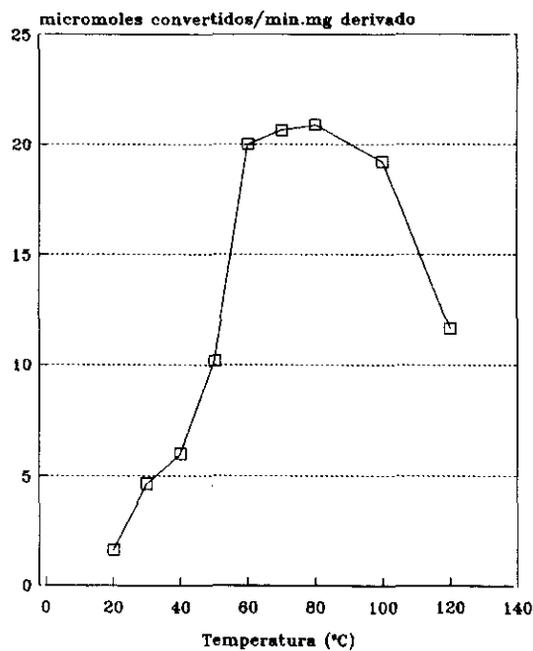
Número de experimentos: 16	
Grados de libertad : 15	
<b>Resultados del análisis estadístico</b>	
$b_D = 38,06$	$b_{AB} = b_{CE} = 4,89$
$b_A = 5,75$	$b_{AC} = b_{BE} = -8,29$
$b_B = 39,6$	$b_{BC} = b_{AE} = b_{DF} = -0,23$
$b_C = -4,1$	$b_{AD} = b_{EF} = -2,81$
$b_D = 27,2$	$b_{BD} = b_{CF} = 4,87$
$b_E = -25,81$	$b_{CD} = b_{BF} = 4,85$
$b_F = 13,88$	$b_{DE} = b_{AF} = -0,69$
<b>Análisis del punto central (t de Student)</b>	
Nivel de confianza: 95 %	
$C_m = 42,22$ %	
$t_2(\alpha=0,05) = 4,303$	
$S_x = 1,597$	
Límites de confianza: $\pm 4,86$	

Figura 30. Método de Daniels

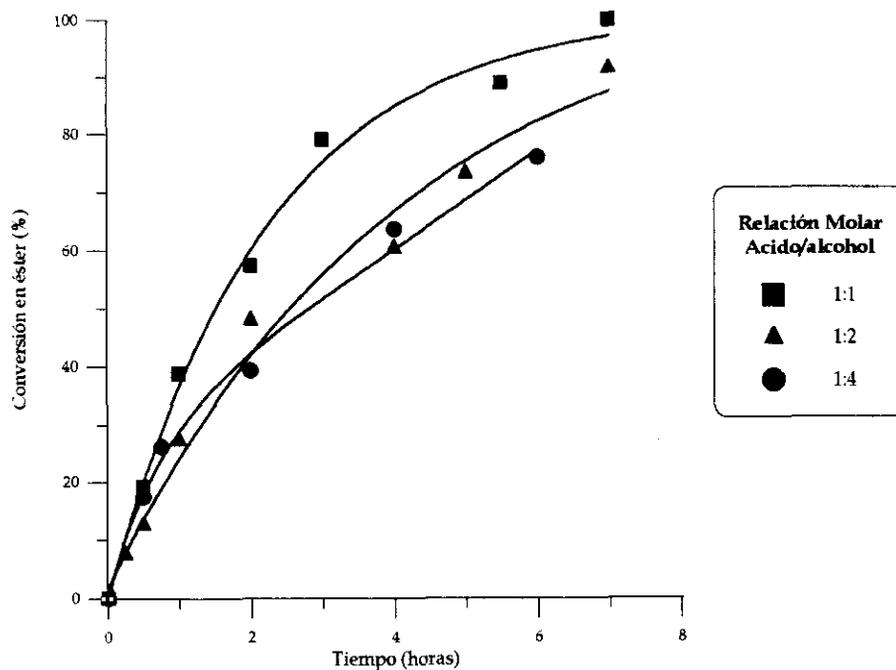


El método de Daniels nos indica que las variables más influyentes son aquellas que no se ajustan a la recta. Por tanto, las condiciones que favorecerían la reacción serían : una temperatura alta, una relación molar ácido/alcohol de 1:1, una adición de derivado alta y, obviamente, reacciones a tiempo largo. La velocidad de agitación y la cantidad de agua añadida no son factores significativos en la esterificación.

Efectivamente, como se puede observar en la Figura 31, a temperaturas superiores a 50°C hay un incremento en la velocidad de esterificación que alcanza un máximo a 80°C. A temperaturas superiores, la actividad sintetasa empieza a decaer. Este dato coincide con los resultados de Eigtved y cols.<sup>189</sup> de Laboratorios Novo, que encontraron una temperatura óptima de actuación de 85°C en la acidólisis y transesterificación del ácido láurico con aceite de soja catalizada por la misma enzima. Akoh y Claon<sup>77c</sup> también observaron un incremento en la actividad del derivado SP435 en la esterificación del citronelol con ácido acético en n-hexano, a temperaturas superiores a los 50°C. Por otro lado, Mutua y Akoh<sup>190</sup> encontraron máxima actividad a 55°C en la transesterificación del metil glucósido con oleato de metilo en una mezcla benceno/piridina, reacción esta vez catalizada por el derivado SP382, el cual contiene las dos isoformas de lipasa de *C. antarctica*.



**Figura 31.** Influencia de la temperatura en la actividad sintetasica de SP435A (Isooctano, relación molar ibuprofeno/propanol = 1:1 (66mM); agitación = 300 rpm y 500 mg de SP435A)



**Figura 32.** Influencia de la relación ácido/alcohol en la esterificación del ibuprofeno catalizada por SP435A (10 ml de isooctano, ibuprofeno 66mM + propanol, agitación=300 rpm, 500 mg de SP435A, T<sup>a</sup>=50°C)

En cuanto a la relación molar ácido/alcohol, si se trata de una relación 1:1, la reacción de esterificación es más rápida que con las relaciones 1:2 y 1:4 (Figura 32). Este hecho ha sido constatado por otros autores que emplearon la lipasa de *Candida rugosa* purificada<sup>191</sup> e inmovilizada<sup>192</sup>. En ambos casos, una relación molar 1:1 incrementaba la actividad enzimática. Es decir, un incremento en la concentración del alcohol disminuye la actividad sintetas de la lipasa al ocupar sitios catalíticos y no permitir el acceso al sustrato o/y por su efecto desnaturalizante de proteínas.

Finalmente, al ir aumentando la cantidad de derivado inmovilizado añadido al medio, la reacción de esterificación sucede con mayor velocidad (Figura 33), alcanzándose la máxima productividad con 500 mg de derivado (Tabla 19).

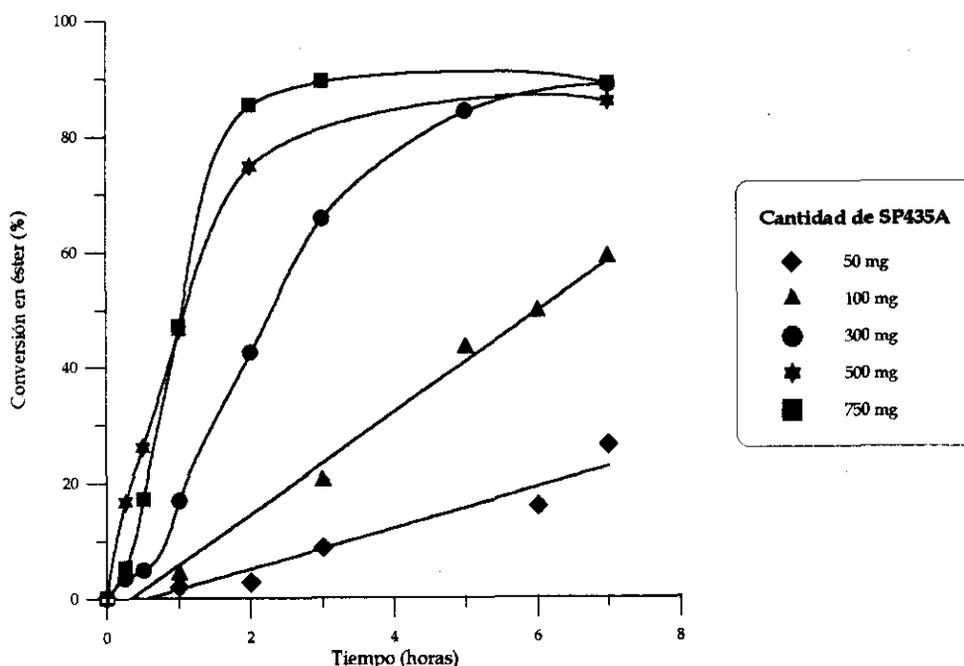


Figura 33. Influencia de la cantidad de SP435A en la esterificación del ibuprofeno (10 ml de isooctano, ibuprofeno 66mM + propanol 66mM, agit=300 rpm, T<sup>a</sup>=50<sup>a</sup>C)

Tabla 19. Productividad de SP435A en la esterificación del R,S ibuprofeno con 1-propanol.

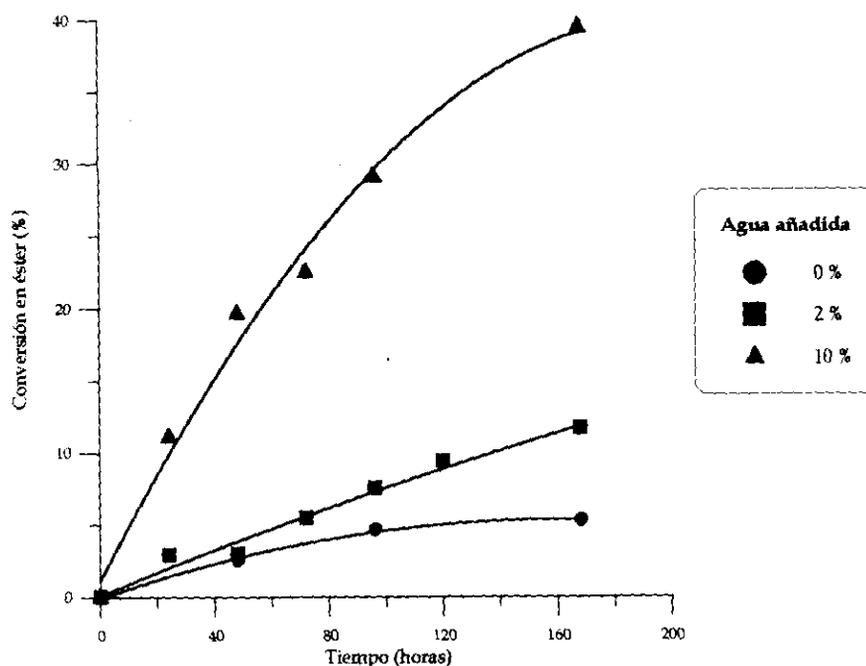
mg. de SP435A	C(%) en 1 hora	μmol ibuprofeno esterificados/mg SP435A.h
50	1,9	0,25
100	4,0	0,26
300	17,0	0,37
500	46,3	0,61
750	47,0	0,41

### II.3.4. Influencia del agua

Hemos visto en el apartado III.1.2. de este Capítulo, el papel fundamental que desempeña el agua en las reacciones enzimáticas catalizadas en medios orgánicos. Si se trata de enzimas inmovilizadas, no sólo el disolvente sino que también el soporte puede tener capacidad para captar o ceder agua. En la esterificación del ibuprofeno con 1-propanol en isooctano catalizada por lipasas nativas e inmovilizadas, el grado de conversión depende del agua presente en el medio. Se ha analizado esta influencia teniendo en cuenta:

1. La cantidad de agua añadida al medio (en peso). En estos estudios preliminares utilizamos la lipasa de *Candida rugosa* y algunos de los derivados descritos en el Capítulo II.
2. La actividad de agua ( $a_w$ ). Para ello empleamos la lipasa B de *Candida antarctica*.

En un primer momento, se analizó el efecto del agua en la lipasa nativa de *C. rugosa* comercial. Al añadir cantidades crecientes de agua al medio, se observó un incremento en la actividad sintética (Figura 34).



**Figura 34.** Influencia de la cantidad de agua añadida al medio en la esterificación del ibuprofeno con 1-propanol catalizada por la LCR nativa en isooctano. 66 mM ácido y 66 mM alcohol en 10 ml de isooctano;  $T^a = 30^\circ\text{C}$ ; 500 r.p.m.; 75 mg. de LCR (tipo VII) en polvo.

Si la lipasa se encuentra inmovilizada, la distribución del agua va a depender de las características del soporte y de su acuofilia (Aq). Efectivamente, los resultados experimentales expuestos en la Tabla 20 así lo demuestran.

**Tabla 20.** Influencia de la liofilización y de la presencia de agua en la esterificación del ibuprofen en isooctano, catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada.

Reseña	Derivado inmovilizado	mg derivado /10 ml disolvente	Carga de enzima <sup>a</sup>	mg lipasa activa/ 10 ml isooctano	μl de agua añadidos <sup>b</sup>	Actividad sintética a 96 h. <sup>c</sup>
1	LCR-A-2 liofilizado	250	296	74	0	0
2	LCR-A-2 liofilizado	250	296	74	500	0.015
3	LCR-A-2 liofilizado	250	296	74	1000	0.012
4	LCR-A-2 sin liofilizar	1000	74	74	1000	0.012
5	LCR-A-2 sin liofilizar	1000	74	74	2500	0.016
6	LCR-S-3 liofilizado	1000	56	56	0	0
7	LCR-S-3 liofilizado	2000	56	112	1000	0
8	LCR-S-3 sin liofilizar	2000	40	80	1000	0.031
9	LCR-S-3 sin liofilizar	2000	40	80	1500	0.014
10	LCR-AL-3 liofilizado	1000	57	57	0	0
11	LCR-AL-3 liofilizado	2000	57	114	1000	0
12	LCR-AL-3 sin liofilizar	2000	38	76	1000	0.009
13	LCR-AL-3 sin liofilizar	2000	38	76	1500	0.021

<sup>a</sup> mg of lipasa activa inmovilizada por gramo de derivado liofilizado o seco.

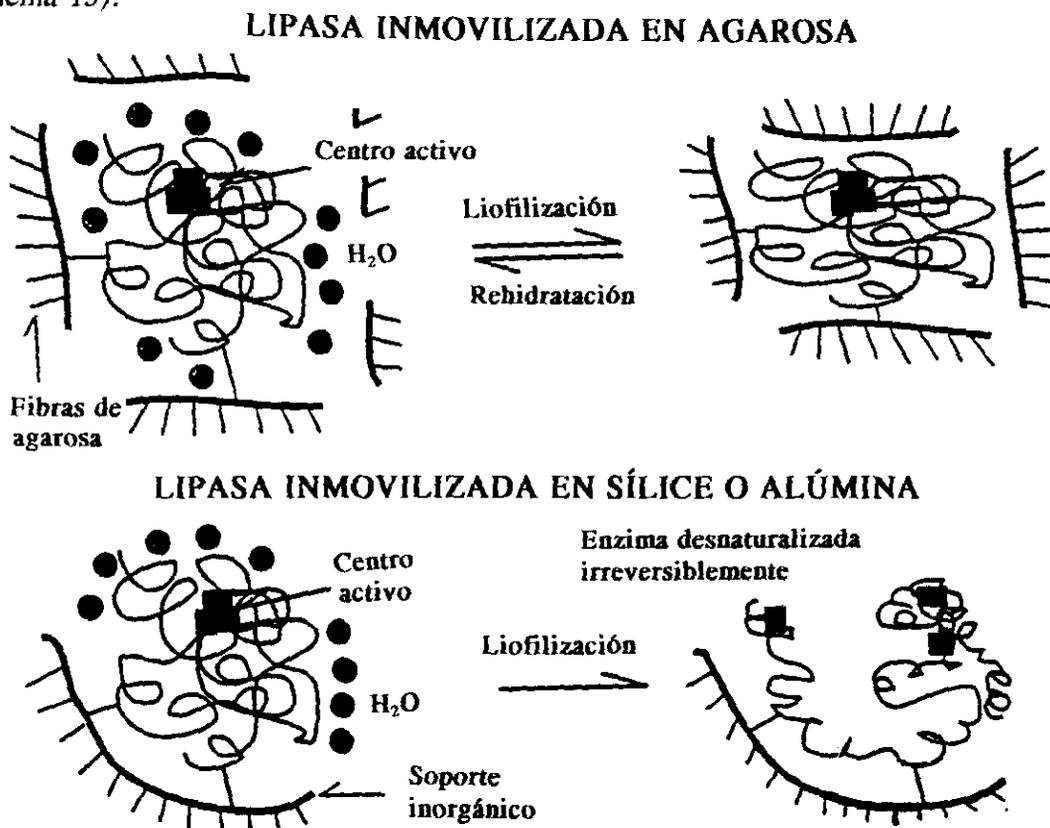
<sup>b</sup> cantidad de agua añadida a los 10 ml. de volumen de reacción.

<sup>c</sup> La actividad sintética se expresa en μmoles of ibuprofen esterificado por mg de lipasa activa y hora. Condiciones: 66 mM ibuprofen + 66 mM 1-propanol en 10 ml de isooctano; T<sup>a</sup> = 30°C; agitación: 500 rpm.

Como primera conclusión, vemos que todos los derivados de LCR utilizados requieren agua para ser catalíticamente activos. La liofilización durante 48 horas de los derivados, inmediatamente después de ser preparados, produce la eliminación de la capa de agua esencial que posee toda enzima, y su consiguiente desactivación, ya que no catalizan la esterificación en el medio orgánico (reseñas 1, 6 y 10 de la Tabla 20).

La adición de 500 microlitros de agua al medio de reacción (10 ml) tiene como consecuencia una reactivación del derivado en agarosa, por rehidratación de este soporte de carácter tan hidrofílico (Aq = 13,8)<sup>173</sup> y de la enzima. Este comportamiento también lo

presenta la  $\alpha$ -quimotripsina inmovilizada en el mismo soporte<sup>193</sup>. Cantidades de agua superiores a este valor no provocan un aumento en la actividad, ya que las nuevas moléculas de agua son absorbidas por el gel de agarosa en vez de situarse en el microentorno enzimático. Por tanto podemos considerar esta cantidad de agua (500  $\mu$ l de agua/250 mg de derivado en agarosa liofilizado) como la necesaria para restablecer tanto la estructura del polímero de agarosa como la capa de agua esencial que necesita la lipasa para ser activa. Con ello se logra que las moléculas rígidas de enzima pasen a su conformación flexible y activa (Esquema 15).



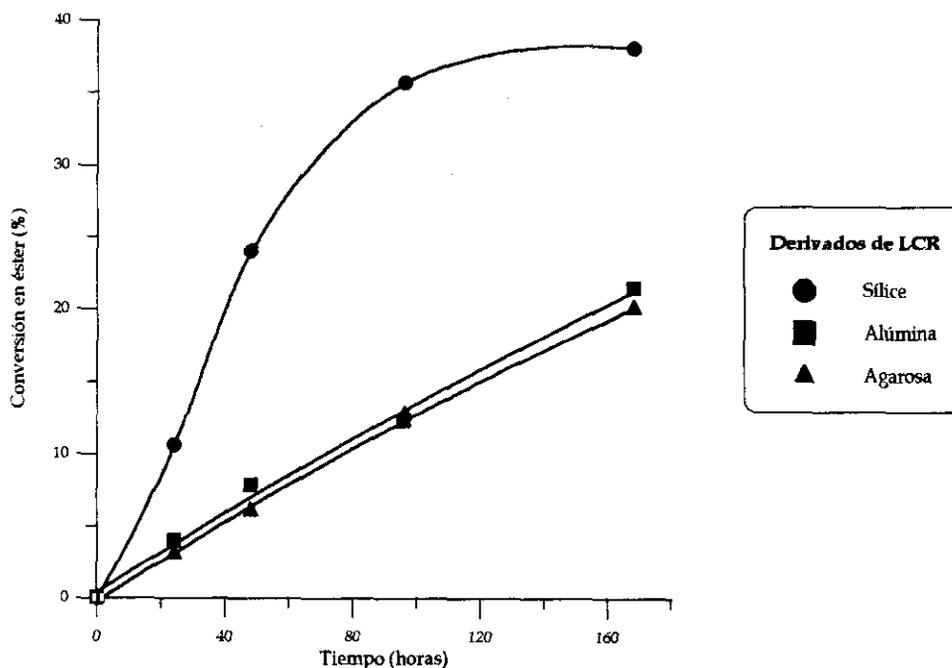
**Esquema 15.** Influencia de la liofilización sobre la actividad de los derivados inmovilizados de LCR empleados en síntesis.

Por el contrario, la liofilización durante 48 horas de los derivados inmovilizados sobre soportes inorgánicos (alúmina y sílice) supone una deshidratación drástica de la enzima inmovilizada. Como consecuencia principal, la estructura de la lipasa sufre una terrible distorsión debido a la naturaleza rígida del soporte y, por el contrario, flexible de la proteína (Esquema 15). Esta distorsión tiene un efecto letal para la lipasa, ya que es irreversible. La

adición de cantidades crecientes de agua al medio con el fin de restaurar la actividad de los derivados inmovilizados inorgánicos, son vanos (reseñas 6-7 y 10-11 de la Tabla 20). Por tanto, se debe trabajar en síntesis con este tipo de derivados recién preparados y humectados, y nunca someterlos a un proceso de liofilización.

La capacidad sintética de los derivados enzimáticos inmovilizados sobre soportes inorgánicos se ve alterada cuando se añade una mayor proporción de agua al medio de reacción. Por un lado, un incremento en la cantidad de agua añadida produce una disminución en la actividad sintética del derivado en sílice (reseña 8 y 9). Sin embargo, cuando se trata de alúmina sucede lo contrario: la actividad aumenta (reseña 12 y 13). Las causas de este suceso deben atribuirse a que la alúmina es más higroscópica que la sílice. Por esta razón, su mecanismo de actuación se sitúa entre la agarosa y la sílice.

Parece claro que el soporte interviene de manera decisiva en la actividad catalítica del derivado. Aquellos soportes hidrófilos como la agarosa, sustraerán y retendrán el agua del microentorno de la lipasa, y los derivados serán menos activos que aquellos preparados con soportes hidrofóbicos, en los cuales habrá más agua a disposición de la enzima (Figura 35).



**Figura 35.** Influencia del soporte en la esterificación del ibuprofeno en isooctano hidratado catalizada por la LCR inmovilizada. 66 mM ibuprofeno y 66 mM 1-propanol en 10 ml de isooctano. A este volumen se le añadió 1 ml de agua, la cantidad de derivado suficiente para que hubiera 75 mg de LCR y se mantuvo en agitación de 500 rpm a 30°C.

En el apartado III.1.2. se comentó que la mayoría de los efectos producidos por el agua en las reacciones biocatalizadas en medios orgánicos, se analizaban con mayor rigor cuando se trabaja con la actividad termodinámica de agua ( $a_w$ ). Los resultados obtenidos con la LCR nos vienen a confirmar este hecho. Dependiendo del soporte necesitaremos añadir mayor o menor cantidad de agua para conseguir una actividad satisfactoria, pero nunca sabremos con exactitud la cantidad óptima. Como consecuencia, hemos tratado de buscar un método sencillo que nos permita determinar las condiciones óptimas de hidratación, en términos de  $a_w$ , que requiere un enzima (nativa o inmovilizada) para mostrar su máxima actividad. Para ello hemos empleado la lipasa B de *Candida antarctica* pura (ya hemos visto que los aditivos, azúcares y otros productos existentes en los preparados comerciales de estas lipasas pueden competir por el agua) y la hemos inmovilizado en diversos soportes que difieren en su grado de afinidad por el agua.

Antes de comenzar deberemos tener en cuenta que, todos los componentes de la mezcla de reacción serán capaces de captar agua independientemente de acuerdo con su isoterma de adsorción. Un cambio en el perfil actividad catalítica/ $a_w$  significará que algún elemento o componente no enzimático tiene un efecto directo sobre las moléculas de enzima.

#### A. Influencia de la $a_w$ en la actividad de la LBCA nativa.

En primer lugar, realizamos la isoterma del producto SP525 (LBCA nativa) tanto en aire como en isooctano (Figura 36). La similitud de la isotermas hasta alcanzar un valor de  $a_w = 0,45$  sugiere que este intervalo de hidratación corresponde a la solvatación gradual de los grupos polares remanentes de la lipasa. Sin embargo, este intervalo no corresponde a la monocapa que cubre la enzima, y las regiones hidrofóbicas de la proteína se encuentran expuestas al disolvente. A una  $a_w > 0,5$  las curvas correspondientes a las isotermas en aire y en disolvente orgánico se separan. A partir de este punto, que vamos a denominar *punto de divergencia*, la isoterma de adsorción de la enzima sumergida en isooctano se sitúa por debajo de la isoterma en aire. Este hecho nos indica que para la misma cantidad de agua añadida por gramo de muestra, se alcanza una mayor  $a_w$  en presencia de isooctano que en aire. A la luz de la ecuación [7], el isooctano - disolvente hidrófobo - rechaza el agua añadida y evita la hidratación de la proteína que se encuentra en su seno.

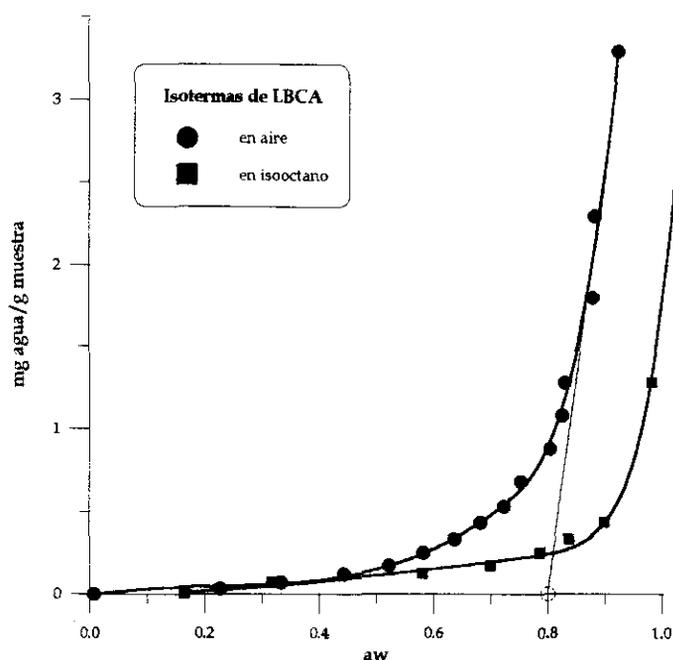
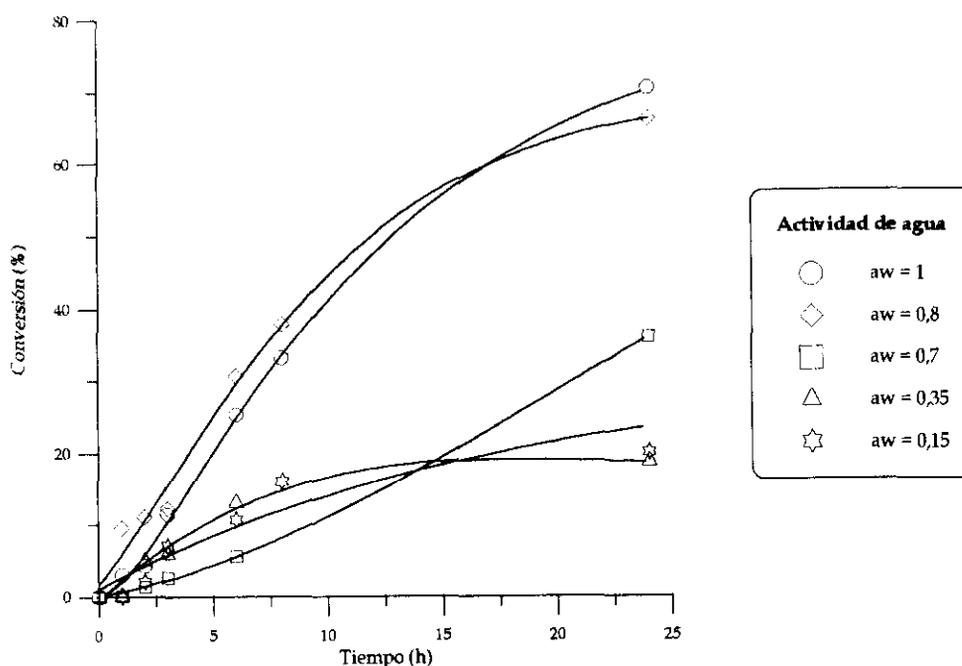


Figura 36. Isotermas de adsorción de la LBCA nativa. (100 mg de SP525 con/sin 1 ml de isooctano).

Se ha visto que muchas muestras de enzima en polvo equilibradas a  $a_w$  altas en el seno de un disolvente, tienen la apariencia de una suspensión y muestran una gran actividad<sup>194</sup>. En nuestro caso así sucede con la LBCA; esta enzima equilibrada en isooctano a valores elevados de  $a_w$  (0,8 y 1) presenta una mayor actividad en la esterificación del ibuprofeno con propanol (Figura 37). En cambio, a  $a_w$  bajas, la LBCA presenta menor actividad. Esta actividad catalítica tan reducida se recupera al generarse moléculas de agua durante la esterificación, con lo que aumenta la  $a_w$  del sistema hasta alcanzar un valor óptimo para la lipasa. En el caso de la mezcla de reacción equilibrada a una  $a_w$  inicial de 0,35, se genera la suficiente cantidad de agua en el curso de la esterificación para superar el punto de divergencia y el biocatalizador se activa, y a las 48 horas alcanza un 59% de conversión en éster con una  $a_w$  final  $> 0,8$  (datos no mostrados en la Figura 37).

Sin embargo, en la mezcla pre-equilibrada a  $a_w=0,15$ , la lipasa prácticamente no tiene actividad; la esterificación apenas se lleva a cabo, con lo que se genera poca agua. En este caso, se alcanza una  $a_w=0,35$  a las 48 horas, valor anterior al punto de divergencia y, por tanto, en la zona donde la lipasa no dispone de agua suficiente para ser activa.



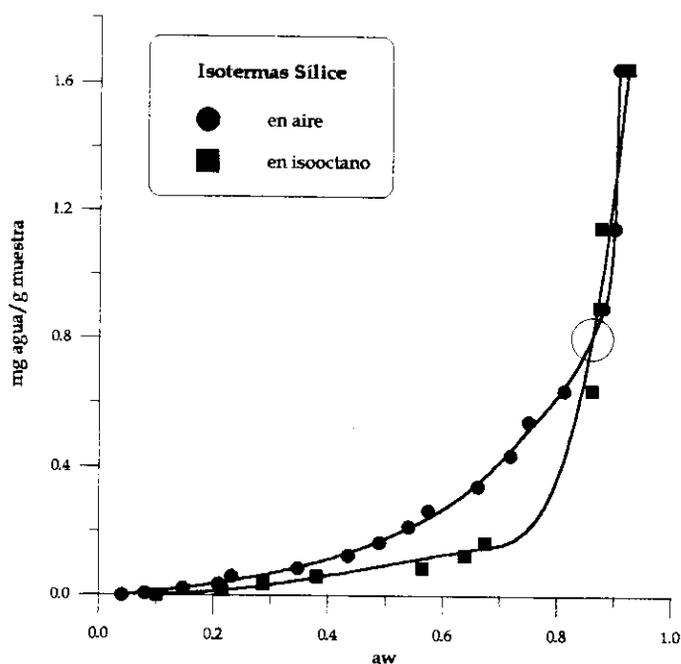
**Figura 37.** Influencia de la  $a_w$  del sistema en la actividad sintética de la LBCA nativa. (66 mM ibuprofeno + 66 mM 1-propanol en 5 ml de isooctano; 15,6 mg de SP525;  $T^a = 37^\circ\text{C}$ ; la mezcla de reacción se equilibró a distintas  $a_w$  con la adición de agua y la ayuda del captador higrométrico).

### B. Influencia de la $a_w$ en la actividad de la LBCA inmovilizada.

Se ha investigado la influencia de la naturaleza de diferentes soportes, con control de  $a_w$ , en la esterificación del ibuprofeno en isooctano catalizada por la LBCA inmovilizada.

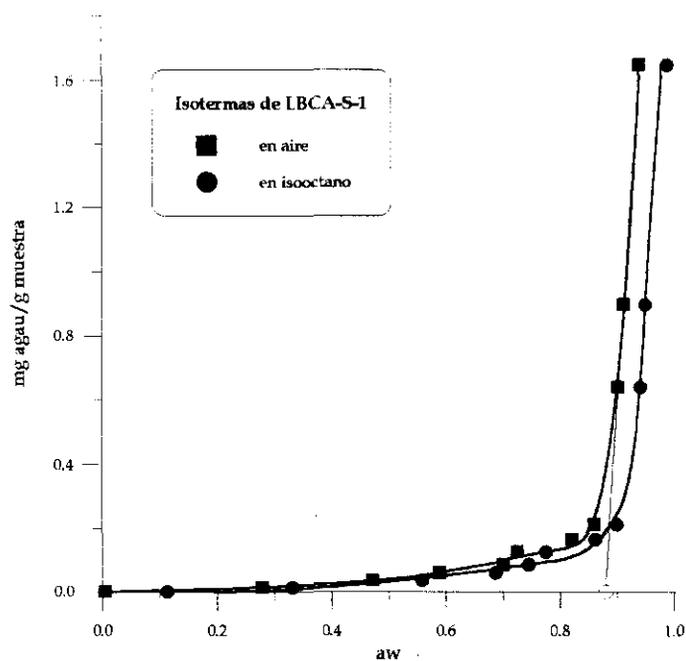
1. LBCA inmovilizada sobre sílice. Se empleó el derivado LBCA-S-1, descrito y caracterizado en el apartado II.2.6., debido a su mayor estabilidad frente a la desactivación térmica (Tabla 15). Podemos ver que las parejas de isothermas aire-isooctano del soporte y del derivado inmovilizado son bien diferentes. En el caso del soporte, las isothermas se separan rápidamente para cortarse en un punto a  $a_w=0,85$  (Figura 38). Parece que el disolvente hidrófobo protege a la sílice de la hidratación, hasta llegar a una situación en que se "hiperactiva" (posiblemente por formación de un hidrato inestable) y capta todo el agua disponible. De esta forma, a una  $a_w=0,85$ , la sílice en isooctano alcanza la misma estructura

de hidrato que tiene en aire. Veremos más adelante que este valor es crucial en el comportamiento del derivado en síntesis.

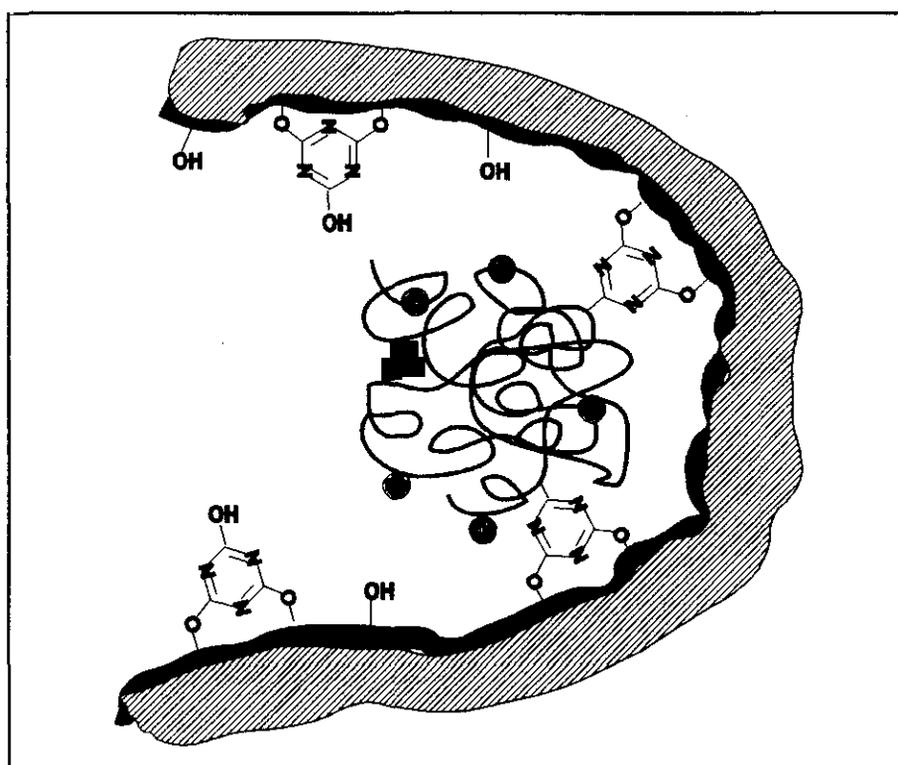


**Figura 38.** Isotherma de la sílice sin activar.  
(200 mg de sílice con/sin 1 ml de isooctano)

En cuanto a las isoterma del derivado (Figura 39), prácticamente coinciden hasta valores muy altos de  $a_w$ . Estas isoterma se sitúan por debajo de las isoterma obtenidas para la sílice pura. Si seguimos el razonamiento anterior, parece que el derivado inmovilizado se encuentra protegido por una estructura lipóide que evita su hidratación. En esta protección no interviene la proteína, cuya proporción en peso con respecto al derivado es muy pequeña (18,1 mg de SP525/ g de sílice; Tabla 14). Por tanto este escudo hidrofóbico se debe al soporte, y concretamente al soporte activado con triclorotriazina obtenido antes de proceder a la inmovilización de la lipasa. De acuerdo con el proceso de activación, la superficie de la sílice se encuentra recubierta de anillos de triazina, algunos de los cuales están implicados en la unión a la enzima (Figura 40). Si volvemos a la fotografía del derivado (Figura 17), vemos que las moléculas de enzima se unen al soporte en puntos muy concretos, y el resto de la superficie de la sílice estará recubierta de anillos de triazina, dado el elevado grado de activación del soporte (0,24 g de TCT / g sílice, Tabla 14).



**Figura 39.** Isoterma del derivado inmobilizado de LBCA sobre sílice activada con triclorotriazina (200 mg de LBCA-S-1 con/sin 1 ml de isoctano).

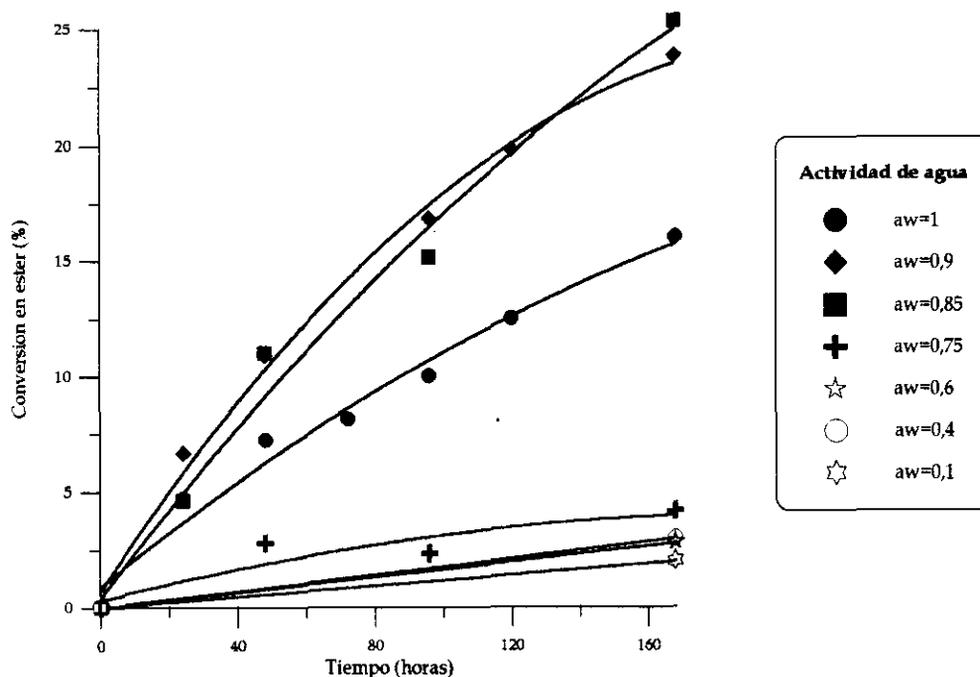


**Figura 40.** Los anillos de triazina que cubren la superficie de la sílice forman un escudo que evita la hidratación de la lipasa.

Evidentemente, estos anillos insaturados son más hidrófobos que la sílice, y pueden comportarse como escudo protector frente a la hidratación del derivado. De ahí que, con una mínima cantidad de agua, se alcance la capa de hidratación ( $a_w = 0,85$ ).

Como es obvio, una deshidratación severa producida por la liofilización eliminaría todo el agua que se encuentra situada fundamentalmente en los agregados moleculares de enzima sobre la sílice, y como consecuencia, provocaría una desnaturalización irreversible tal y como vimos con la LCR inmovilizada sobre este mismo soporte (Tabla 20).

Al igual que la lipasa nativa, el derivado apenas posee capacidad sintética cuando se equilibra con la disolución de sustratos en isooctano a un valor de  $a_w$  que se localice en el tramo en el que coinciden las isoterma en aire y en disolvente ( $a_w < 0,75$ , Figura 41). En este intervalo, la enzima no se encuentra hidratada. A valores superiores de  $a_w$ , la lipasa inmovilizada en sílice mejora considerablemente de actividad, alcanzando un máximo a una  $a_w$  de 0,85-0,9: el valor donde cortan las isoterma del soporte. Un valor de  $a_w = 1$  supone un exceso de agua en el medio y el proceso sintético no se ve favorecido por razones termodinámicas al concentrar el agua en los agregados moleculares de enzima.



**Figura 41.** Influencia de la  $a_w$  del sistema en la actividad sintética de la LBCA inmovilizada sobre sílice. 66 mM ibuprofeno + 66 mM 1-propanol en 5 ml de isooctano; 1 g de LBCA-S-1;  $T^a = 37^\circ\text{C}$ ; agitación= 500 rpm.

En nuestro grupo de trabajo se ha desarrollado un método semiempírico que nos permite conocer el valor de  $a_w$  al cual se debe pre-equilibrar el sistema para obtener la máxima actividad de una enzima incluida en un medio orgánico<sup>195</sup>. El método consiste en prolongar la segunda pendiente de la isoterma del derivado en aire hasta que corte el eje de abscisas. En el derivado de sílice, la segunda pendiente corta en un valor situado entre  $a_w=0,85$  y  $0,9$  (Figura 39). Con estos dos valores se consiguió máximo grado de esterificación. Parece clara la conveniencia de equilibrar las reacciones a la  $a_w$  correcta, ya que una situación de hidratación excesiva ( $a_w=1$ ) o, por el contrario, de falta de hidratación, disminuyen la actividad sintética.

Con este método podemos determinar la cantidad de agua que necesita el derivado (g. agua/g. derivado \* ml isooctano) para que presente mayor actividad. Veremos más adelante que el método se cumple para otros soportes.

**2. Lipasa inmovilizada sobre sefarosa:** En un primer momento pudimos realizar las isotermas de adsorción de la sefarosa tresilada (Figura 42), al ser este soporte más estable frente a la adsorción física de agua. No las hicimos con la sílice activada, ya que la adsorción de agua hubiera provocado la hidrólisis de la triclorotriazina, la formación de cloruro de hidrógeno, y el consiguiente daño a la célula de captación del aparato de medida.

El hecho sorprendente de que las isotermas de la enzima nativa se encuentren por encima de las correspondientes a la sefarosa (que es un polisacárido muy hidrófilo), se explica por la activación de este soporte. La sefarosa está activada con grupos tresilo (Esquema 12, pág. 50), los cuales son más hidrófobos que el grupo hidroxilo primario. De ahí que adsorba menos agua de la que cabía esperar y que sean tan similares sus isotermas de adsorción en agua e isooctano.

La inmovilización de la LBCA nativa sobre la sefarosa tresilada tiene dos efectos:

1. une la enzima al soporte;
2. el agua del tampón hidroliza el grupo tresilo, y se obtienen grupos -OH primarios. Como consecuencia de este proceso aumenta la hidrofilia del soporte. Este hecho explicaría cómo la isoterma en isooctano del derivado inmovilizado se sitúa por encima de la del soporte; y cómo las dos isotermas - en aire e isooctano - del derivado son tan diferentes (Figura 43).

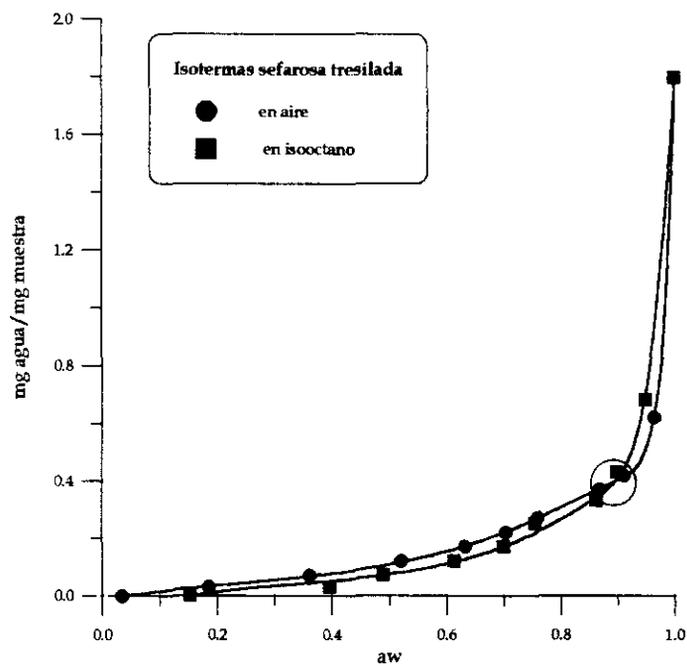


Figura 42. Isotherma de la sefarosa tresilada. (100 mg de sefarosa con/sin 1 ml de isooctano).

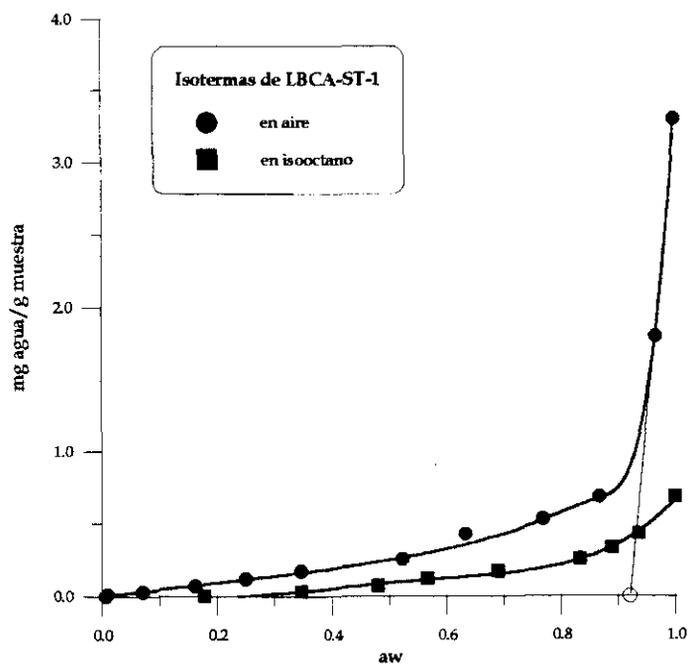
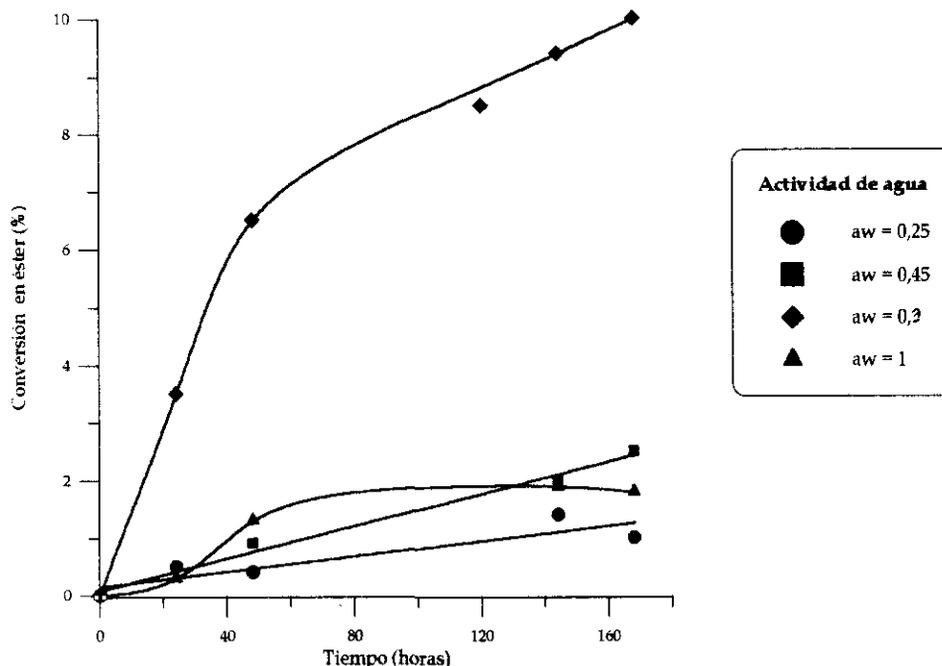


Figura 43. Isotherma del derivado inmovilizado de LBCA sobre sefarosa tresilada (100 mg de LBCA-ST-1 con/sin 1 ml de isooctano).

El punto de corte de la prolongación la segunda pendiente de la isoterma en aire con el eje de abscisas (Figura 43) nos da un valor de  $a_w=0,9$ . Y a este valor se logra la mayor actividad del derivado (Figura 44).



**Figura 44.** Influencia de la  $a_w$  del sistema en la actividad sintética de la LBCA inmovilizada sobre sefarosa tresilada. 66 mM ibuprofeno + 66 mM propanol en 5 ml de isooctano; 150 mg de LBCA-ST-1;  $T^a = 37^\circ\text{C}$ ; 500 rpm.

**3. LBCA inmovilizada sobre una resina polimérica (SP435A).** El Lewatit OC 1600 es el soporte más hidrofóbico de todos los empleados. Al carecer del soporte como tal, solo pudimos medir las isotermas del derivado SP435A (Figura 45). Este derivado alcanza una  $a_w=1$  con una cantidad mínima de agua en comparación con los otros derivados inmovilizados covalentemente. Las isotermas de adsorción en aire e isooctano son muy similares, y se sitúan por debajo de todas las isotermas medidas anteriormente, lo que nos hace pensar que la enzima se encuentra protegida frente a la hidratación en este derivado más que en ningún otro. Por tanto, si volvemos a la fotografía del derivado (Figura 22), la lipasa se encuentra alojada en las cavidades del soporte a refugio de la hidratación y de los cambios del entorno (temperatura, disolventes, etc.). Este hecho explicaría la gran termoestabilidad de este derivado y su gran actividad.

El método para determinar la  $a_w$  óptima en la esterificación del ibuprofeno en isooctano, se verificó con este derivado. Al alcanzar la isoterma en aire el valor máximo de hidratación, la segunda pendiente se puede considerar casi paralela al eje de ordenadas, y cortaría cerca de  $a_w=1$ . A este valor de  $a_w$ , el derivado mostró mayor actividad (Figura 46).

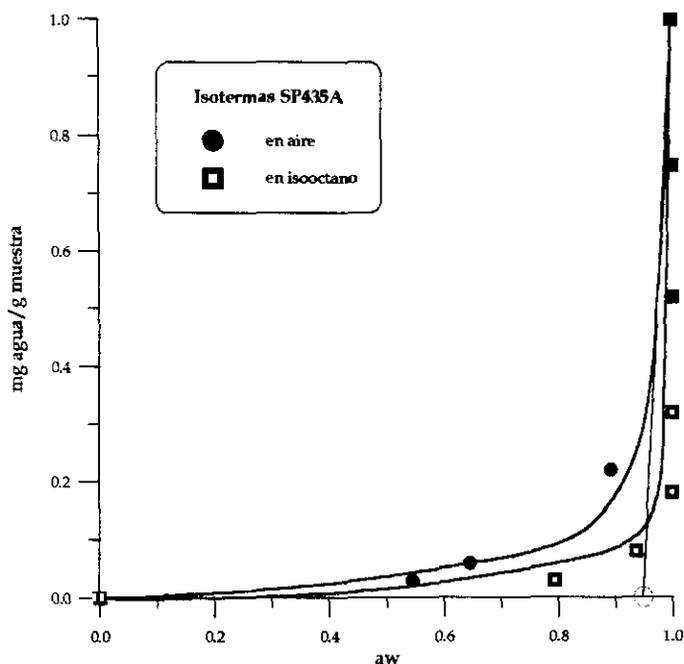


Figura 45. Isoterma del derivado SP435A (realizada con 100 mg).

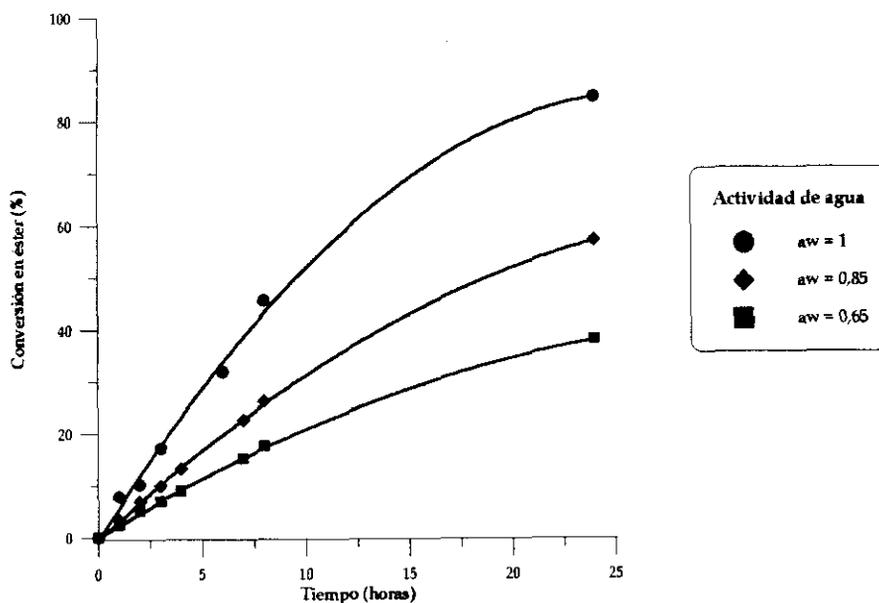


Figura 46. Influencia de la  $a_w$  del sistema en la actividad sintética de SP435A. 66 mM ibuprofeno + 66 mM propanol en 5 ml de isooctano; 50 mg de SP435A;  $T^a=37^\circ\text{C}$ ; 500 rpm.

## *Capítulo IV:*

### *Resolución enzimática de ácidos (R,S) 2-aryl propiónicos*



## IV.1. INTRODUCCIÓN

### IV.1.1. EMPLEO DE LIPASAS EN LA OBTENCIÓN DE ÁCIDOS 2-ARIL PROPIÓNICOS HOMOQUIRALES.

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<sup>196</sup>. 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<sup>197</sup>.

A pesar de todo, la mayoría de estos fármacos se han vendido como mezclas racémicas hasta hace poco<sup>198</sup> al no existir una normativa clara al respecto, ni métodos económicos para realizar la separación de enantiómeros. 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<sup>199</sup>. Entre estas directrices destaca el estudio exhaustivo al que deberán ser sometidos los posibles nuevos fármacos racémicos antes de ser aprobados y puestos a la venta. Este hecho ha forzado a muchas empresas farmacéuticas a sintetizar isómeros puros, o por el contrario dedicarse a la fabricación de moléculas aquirales. De ahí el pronóstico de que, para el año 2000, el 80% de este tipo de fármacos sintéticos sean introducidos como enantiómeros puros.

#### IV.1.1.1. Los ácidos 2-aril propiónicos: un tipo de antiinflamatorios no esteroídicos.

Los antiinflamatorios no esteroídicos (AINEs) son un conjunto de fármacos ampliamente utilizados para suprimir o aliviar dolores de muy diversa localización, naturaleza o intensidad, tanto agudos como crónicos; así como para controlar o mejorar procesos

inflamatorios de diversa etiología. La inmensa mayoría de las molestias y dolores que pueden surgir durante la actividad cotidiana (mialgias, cefalalgias, artralgias, artritis y artrosis de diverso tipo) y el malestar que acompaña frecuentemente a los procesos infecciosos virales o bacterianos, pueden ser paliados con estos fármacos. Estos agentes terapéuticos tan utilizados a nivel mundial, se pueden clasificar en varias categorías (Tabla 21).

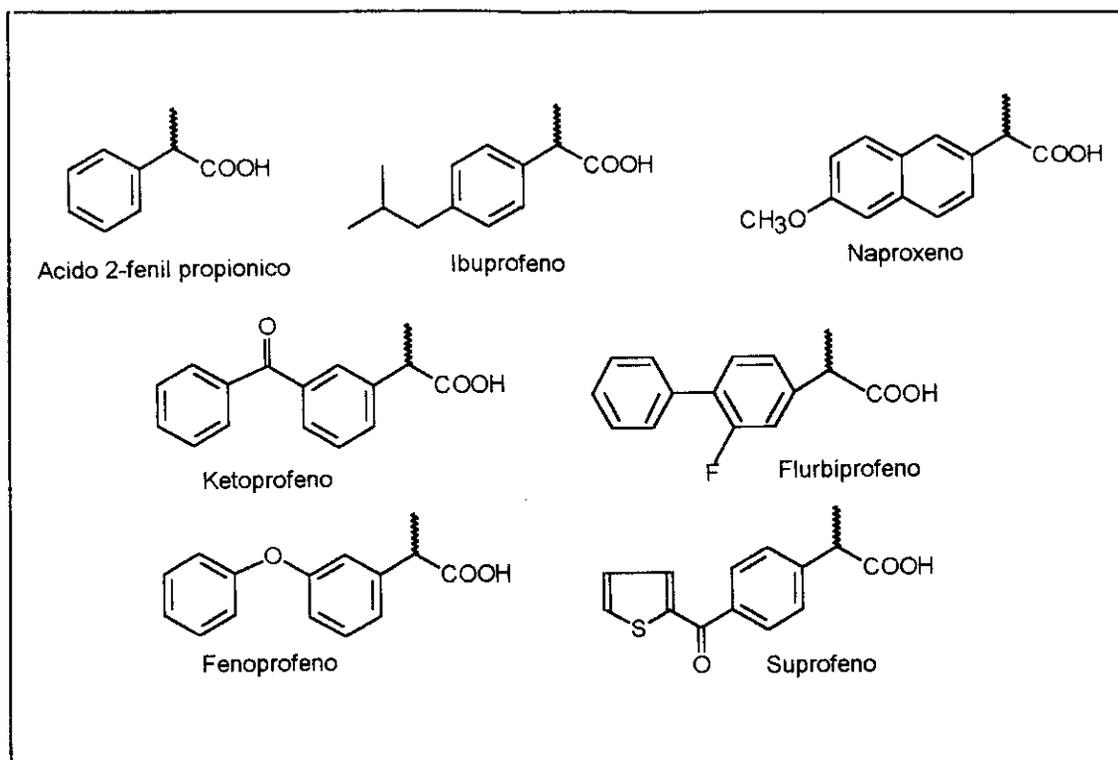
**Tabla 21.** Resumen de las familias de antiinflamatorios no esteroídicos

<b>Grupo</b>	<b>Prototipo de la familia</b>
Acido Salicílico	Acido Acetilsalicílico
Pirazolonas	Dipirona, Fenilbutazona
Para-aminofenol	Paracetamol
Acido Indolacético	Indometacina
Acido Pirrolacético	Talmetín
Acido Bencenoacético	Diclofenac
Acido Propiónico	Naproxeno
Acido Antranílico	Acido Mefenámico
Oxicans	Piroxican

Dentro de los antiinflamatorios no esteroídicos, los ácidos 2-aril propiónicos forman un grupo relativamente homogéneo por sus características físicas y farmacológicas. El primero utilizado fue el ibuprofeno, pero más tarde surgieron un gran número de derivados: naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno, suprofeno, etc. El piketoprofeno es un derivado amídico del ketoprofeno, de aplicación tópica (Esquema 16).

Se utilizan en la artritis reumatoide, espondilitis anquilopoyéticas y en los ataques agudos de gota. Algunos también se emplean como analgésicos (ibuprofeno, naproxeno), a dosis inferiores a las recomendadas en las enfermedades reumáticas, y últimamente se ha popularizado su uso en el tratamiento de las dismenorreas.

Por lo que respecta a su mecanismo de acción, se conoce que estos compuestos actúan inhibiendo la ciclooxigenasa, enzima que cataliza la unión del oxígeno al ácido araquidónico, con lo que se inhibe la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub> y de las prostaciclina, mediadores celulares responsables del proceso inflamatorio. Una rápida visión a la estructura química de estos ácidos pone de manifiesto la presencia de un centro quiral en la molécula.



Esquema 16. Estructuras de los ácidos 2-aril propiónicos.

Estos fármacos son producidos y comercializados como racémicos, a pesar de que su efecto terapéutico reside básicamente en el isómero S(+)<sup>200</sup>. Es bien conocido el ejemplo del naproxeno, cuyo isómero S(+) es 28 veces más activo que el R(-) como antiinflamatorio<sup>201</sup>. Por otra parte, el isómero S(+) del ibuprofeno es 160 veces más potente que el R(-) en la inhibición de prostaglandinas "in vitro"<sup>202</sup>. Sin embargo, el ibuprofeno se utiliza como racémico en clínica, basándose en el hecho de que el isómero inactivo R(-) se transforma enzimáticamente "in vivo" en el enantiómero activo S(+)<sup>203</sup>. De todas formas, el tratamiento con isómeros puros de los ácidos aril-propiónicos sería mucho más ventajoso, por las siguientes razones:

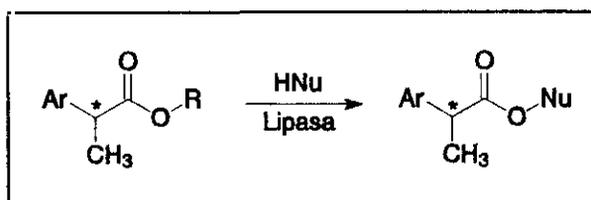
1. Permitiría una reducción en la dosis administrada al paciente;
2. Disminuirían los efectos secundarios debidos a la concentración, en tejido adiposo, del isómero R(-) no transformado enzimáticamente<sup>204</sup>.
3. Evitaría la variabilidad de la respuesta terapéutica, al no producirse la inversión enantiomérica "in vivo"<sup>205</sup>.

Parece claro el interés que tiene la obtención de los ácidos S(+) 2-aril propiónicos puros. Aunque la síntesis asimétrica por vía química de los ácidos S(+) es técnicamente viable, la metodología no resulta rentable ya que requiere reactivos de elevado coste y no proporciona un rendimiento aceptable en enantiómero puro para su comercialización posterior<sup>206</sup>. En la actualidad, la Industria Farmacéutica se plantea la resolución enzimática de la mezcla racémica de estos ácidos mediante el empleo de lipasas, que presentan como ventajas: su amplia especificidad, elevada enantioselectividad, gran estabilidad y tolerancia con mucho sustrato (> 1M), bajo coste económico y disponibilidad comercial. Las estrategias que se podrían seguir para la resolución de los ácidos (R,S) 2-aril propiónicos catalizada por las lipasas, pueden ser:

1. *Hidrólisis enantioselectiva*, a partir de un éster racémico en un medio acuoso;
2. *Síntesis enantioselectiva* del éster, a partir de un ácido racémico, mediante una esterificación o una transesterificación.

De esta forma, se han obtenido ácidos R(-) y S(+) 2-aril propiónicos con diferente pureza enantiomérica (Tabla 22). Solo interesarían aquellos métodos en los que la estereoespecificidad de la lipasa y la estrategia en la resolución fueran los adecuados para obtener el ácido S(+) puro, con un exceso enantiomérico próximo al 100%. Si la lipasa no fuera enantioespecífica para estos sustratos, habría que mejorar su estereoselectividad variando las condiciones del medio. A continuación entraremos en detalle sobre estos temas.

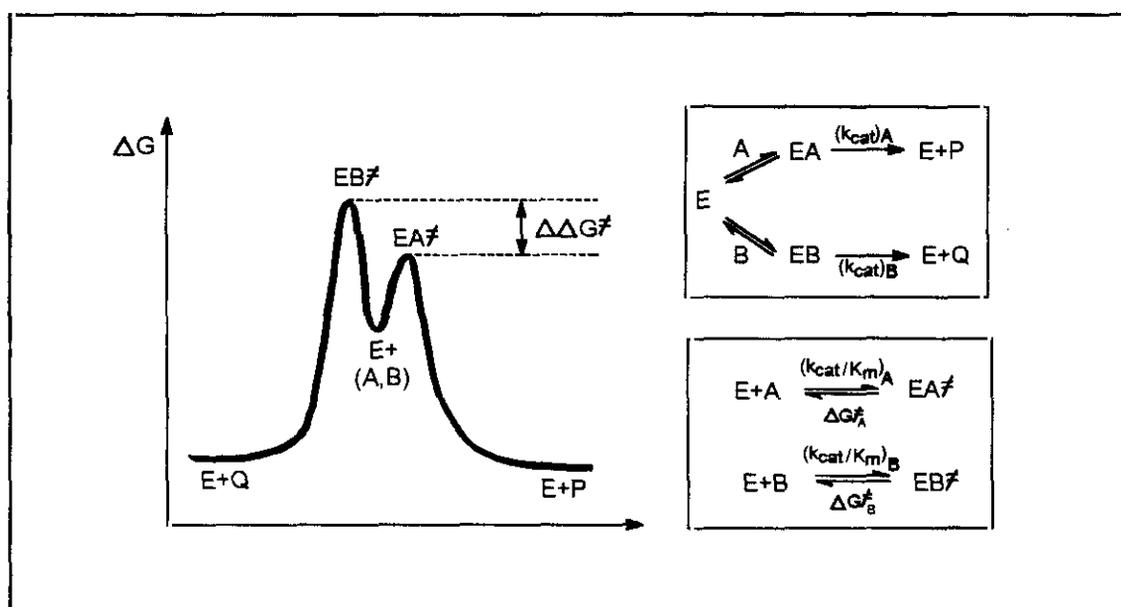
Tabla 22. Métodos biotecnológicos de resolución de ácidos 2-aril propiónicos con lipasas.



Ácido	Reacción	R	HNu	Lipasa (espf.)	Conv (%)	ee <sub>ácido</sub>	Ref
NAPROXENO	Hidrólisis	CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>M. miehei</i> (R)	18	95% R(-)	207
	Hidrólisis	CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>R. arrhizus</i> (R)	11	97% R(-)	207
	Hidrólisis	CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>C. rugosa</i> (S)	39	>98% S(+)	207
	Hidrólisis	CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>Rhizopus sp.</i> (R)	19	92% R(-)	207
	Hidrólisis	CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>R. oryzae</i> (S)	45	>98% S(+)	207
	Hidrólisis	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>C. rugosa</i> (S)	25	95% S(+)	208
	Hidrólisis	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>C. rugosa</i> (S) semipurificada	31	>98% S(+)	209
	Hidrólisis	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>C. rugosa</i> (S) inmovilizada	29	100% S(+)	210
	Esterificación	H	butanol	<i>C. rugosa</i> (S)	62	99% R(-)	211
	Esterificación	H	butanol	<i>M. javanicus</i> (R)	39	8% S(+)	211
	Esterificación	H	butanol	<i>Rhizopus sp.</i> (R)	15	11% S(+)	211
	Esterificación	H	butanol	<i>A. niger</i> (R)	23	5% S(+)	211
	Esterificación	H	trimetil silil metanol	<i>C. rugosa</i> (S)	53	>99% R(-)	212
IBUPROFENO	Hidrólisis	CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>C. rugosa</i> (S)	42	95% S(+)	213
	Hidrólisis	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>C. rugosa</i> (S) semipurificada	47	>98% S(+)	209
	Hidrólisis	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>C. rugosa</i> (S) inmovilizada	31	100% S(+)	210
	Hidrólisis	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl	H <sub>2</sub> O	<i>C. antarctica</i> (R)	63	58% R(-)	214
	Esterificación	H	propanol	<i>C. rugosa</i> (S)	32	-	215
	Esterificación	H	pentanol	<i>C. rugosa</i> (S)	49	99% R(-)	186
	Amoniolisis	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl	NH <sub>3</sub>	<i>C. antarctica</i> (R)	56	96% S(+)	214
KETOPROFENO	Hidrólisis	CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>C. rugosa</i> (S)	50	60% S(+)	216
	Hidrólisis	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>C. rugosa</i> (S) inmovilizada	21	100% S(+)	210
	Hidrólisis	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>C. rugosa</i> (S) semipurificada	19	>98% S(+)	209
FLURBIPROFENO	Hidrólisis	CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>C. rugosa</i> (S)	39	65% S(+)	216
SUPROFENO	Hidrólisis	CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	<i>C. rugosa</i> (S)	49	>95% S(+)	216

### IV.1.2. ESTEREOSELECTIVIDAD DE LAS LIPASAS.

La gran utilidad de las lipasas empleadas en Síntesis Orgánica, reside en su baja especificidad por sustrato y su elevada enantioselectividad. Esta última característica fundamental ha permitido la realización de transformaciones regio y enantioselectivas. Todas estas reacciones selectivas se basan en la formación de un complejo diastereoisomérico entre el reactivo quiral y la enzima, donde la energía del estado de transición del complejo ( $\Delta G^\ddagger$ ) con un isómero y otro es diferente (Figura 47).



**Figura 47.** Reacciones enantioselectivas catalizadas por lipasas empleando una mezcla racémica A + B. E=enzima(lipasa); P=producto procedente de A; Q=producto procedente de B.

En una transformación enantioselectiva, si los dos enantiómeros A y B compiten por el centro activo de la enzima y se cumplen las exigencias de la teoría del estado estacionario postuladas por Michaelis-Menten, las dos velocidades de las reacciones en competición serán:

$$v_A = (k_{cat}/K_m)_A [E] [A] \quad [11]$$

$$v_B = (k_{cat}/K_m)_B [E] [B] \quad [12]$$

La "relación de enantioselectividad" o "factor bioquímico de estereoselectividad" (E) se puede definir como la relación existente entre los parámetros  $v_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$  de los dos enantiómeros A y B ([13]).

$$E = \frac{V_A}{V_B} = \frac{(V_{\max}/K_m)_A}{(V_{\max}/K_m)_B} \quad [13]$$

Como estas constantes cinéticas específicas están relacionadas con la energía libre de ambos estados de transición, la enantioselectividad de una reacción está relacionada con la diferencia de energía de los estados de transición correspondientes a cada isómero.

$$\Delta \Delta G^* = (\Delta G_A^* - \Delta G_B^*) = -RT \ln (k_{cat}/K_m)_A / (k_{cat}/K_m)_B \quad [14]$$

En vez de determinar todos estos parámetros, característicos de las reacciones correspondientes a cada uno de los enantiómeros, es más sencillo acudir a la expresión matemática propuesta por Sih, que relaciona el valor de E con la conversión (c) y el exceso enantiomérico del sustrato ( $ee_s$ ) o del producto ( $ee_p$ ), parámetros que resultan más fáciles de determinar<sup>217</sup>. Estas ecuaciones han sido ampliamente empleadas en reacciones irreversibles; en el caso de que la conversión del sustrato sea reversible y se llegue al equilibrio, estas ecuaciones deben tener en cuenta la constante de equilibrio ( $k_{eq}$ ) de la reacción<sup>218</sup>.

#### Reacciones irreversibles:

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} \quad [15]$$

$$E = \frac{\ln[1-c(1+ee_p)]}{\ln[1-c(1-ee_p)]} \quad [16]$$

#### Reacciones reversibles:

$$E = \frac{\ln\{1 - (1+k_{eq})[c+ee_s(1-c)]\}}{\ln\{1 - (1+k_{eq})[c-ee_s(1-c)]\}} \quad [17]$$

$$E = \frac{\ln\{1 - (1+k_{eq})c(1+ee_p)\}}{\ln\{1 - (1+k_{eq})c(1-ee_p)\}} \quad [18]$$

En estas ecuaciones, la conversión y los excesos enantioméricos se expresan en tanto por uno.

### IV.1.2.1. Predicción de la estereoselectividad de las lipasas.

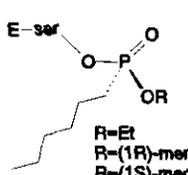
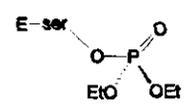
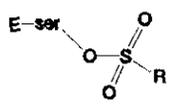
En un pasado no muy lejano, se utilizaban las lipasas al azar para catalizar reacciones enantioselectivas de hidrólisis o de esterificación. Recientemente se han propuesto modelos y reglas empíricas, basados en los datos bibliográficos de enantioselectividad de muchas lipasas y programas de ordenador, que evitan el tedioso proceso de selección de la lipasa adecuada para resolver un determinado sustrato racémico. Por ejemplo, una regla para la resolución de alcoholes secundarios se basa en los tamaños de los subsitios del estereocentro, con lo que se puede predecir qué enantiómero reacciona más rápido<sup>219</sup>.

La determinación, por difracción de Rayos X, de las estructuras tridimensionales de las lipasas cristalinas (Tabla 2) y de algunos "análogos del estado de transición" (Tabla 23) de éstas, ha permitido explicar el mecanismo de este tipo de reacciones estereoespecíficas. Estos análogos, bien simulan el intermedio tetraédrico que da lugar al complejo acil-enzima ( $T_d1$ ), bien se asemejan al intermedio que se produce en la desacilación ( $T_d2$ ). En el primer caso, los análogos se obtienen con fosfonatos, mientras que en el segundo caso se sintetizan con sulfonatos.

Tabla . Estructuras cristalinas de los análogos del estado de transición de algunas lipasas

Lipasa de...	Sustrato unido a la serina	Año	Archivo en PDB
<i>Rhizomucor miehei</i>	n-hexilfosfonil-O-etil <sup>25</sup> Dietilfosforil <sup>220</sup>	1991 1992	5TGL 4TGL
<i>Humicola lanuginosa</i> <sup>221</sup>	Dietilfosforil n-dodecilfosfonil-O-etil	1994	-
<i>Candida rugosa</i> <sup>222</sup>	n-dodecilsulfonil n-hexadecilsulfonil n-hexilfosfonil-O-(1R)-mentil n-hexilfosfonil-O-(1S)-mentil	1994	-
<i>Candida antarctica</i> (B) <sup>223</sup>	n-hexilfosfonil-O-etil	1994	-

<p>Esteres de n-hexil fosfonilo</p>  <p>R=Et R=(1R)-mentilo R=(1S)-mentilo</p>	<p>Esteres fosforil dietílicos</p> 	<p>Esteres n-álquil sulfonílicos</p>  <p>R=n-C12H25 R=n-C16H33</p>
---	--	--

Todas estas estructuras muestran una orientación similar del grupo éster fosfórico en el centro activo, con regiones diferentes para la unión de la cadena alcohólica y del resto acilo.

### 1. Estereoselectividad de la lipasa de *Candida rugosa*.

En el centro de fijación del sitio activo de la lipasa de *Candida rugosa*, se pueden distinguir tres regiones bien diferenciadas:

- la región  $M_L$ , por encima de la lámina  $\beta$ ;
- un bolsillo hidrofóbico; y
- un túnel, por encima de una  $\alpha$ -hélice.

La cadena alcohólica se une a la región  $M_L$  y al bolsillo hidrofóbico, mientras que el resto acilo se fija en el túnel y en el bolsillo hidrofóbico.

I. *Zona de fijación de la cadena alcohólica.* Las estructuras de los análogos de la lipasa de *C. rugosa* que contienen *1R* y *1S* mentol, poseen diferencias que explican cómo esta lipasa reacciona más lentamente con los isómeros *S* del mentol. Con el enantiómero que reacciona más rápido, el (*1R*)-mentol, el  $N_{e2}$ -H de la histidina 449 de la triada catalítica, forma dos enlaces de hidrógeno: uno con el oxígeno  $O_\gamma$  de la serina 209 del centro activo y otro con el oxígeno  $O_\gamma$  del mentol. Este último enlace no se produce con el (*1S*)-mentol (Figura 48).

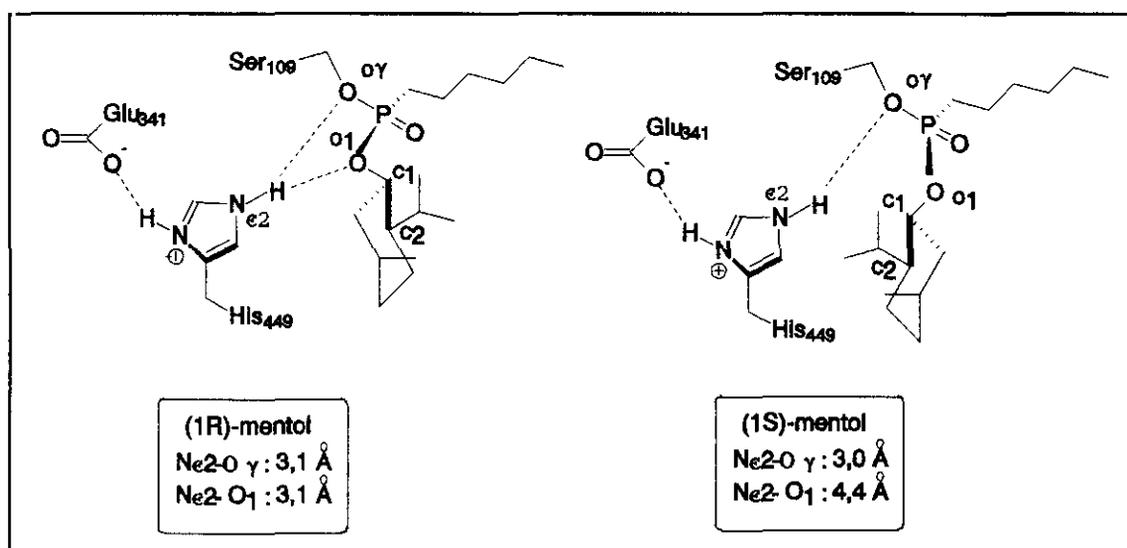
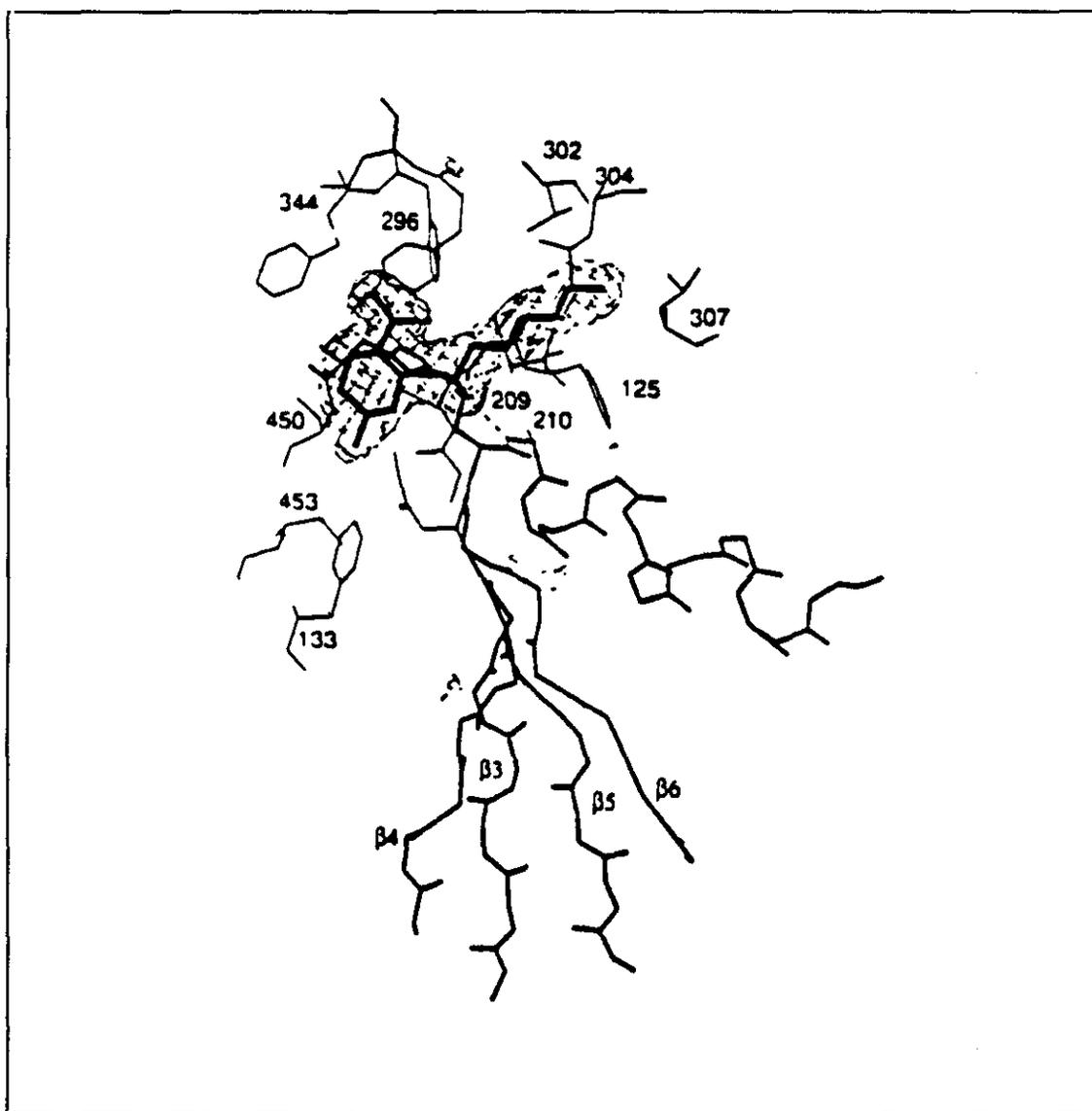


Figura 48. El (*1R*)-mentol reacciona más rápido que el (*1S*)-mentol en la LCR.

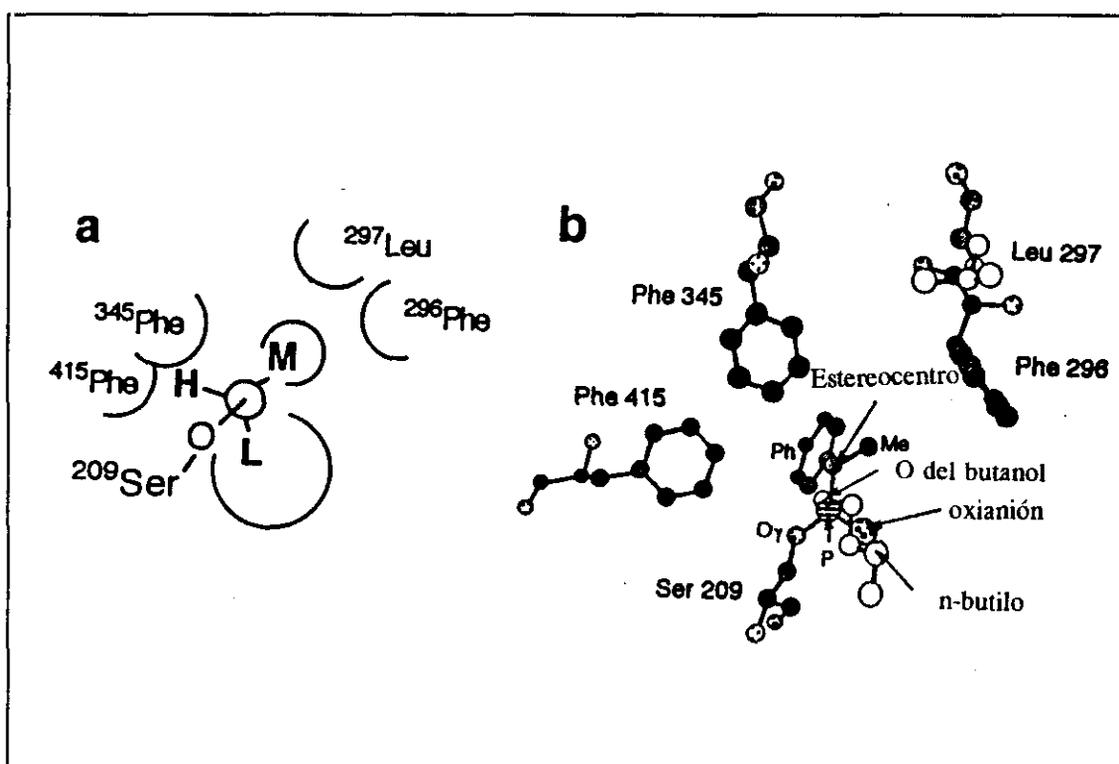
Pero, además existen otras dos interacciones entre el mentol y el centro activo de la lipasa de *C. rugosa*. Este centro activo se localiza en el fondo de una depresión cuyas paredes son estrechas, de manera que el anillo del mentol se sitúa por encima. Por otra parte, el fondo de la depresión, que está formado por el final de la lámina  $\beta$ , asegura que los sustituyentes grandes se dirijan hacia el bolsillo hidrofóbico (Figura 49). Este último hecho explica cómo la inserción de grupos voluminosos en sustratos simétricos produce aumentos de enantioselectividad<sup>219,224</sup>.



**Figura 49.** Estructura cristalina del análogo de LCR con (1R)-mentol. Zonas del centro activo que explican la R-enantioespecificidad por los alcoholes 2°.

II. *Zona de fijación del grupo acilo*. En cuanto a la zona de unión al resto acilo, no se ha podido estudiar con los análogos del estado de transición sintetizados hasta ahora. Mediante el análisis de los resultados publicados en la hidrólisis de ésteres de ácidos aril-propiónicos, aril-oxi-propiónicos,  $\alpha$ -halo-fenil-acéticos y del ácido mandélico, y basándose en el complejo que contiene el (*1R*)-mentol, se ha descubierto en la lipasa de *C. rugosa*<sup>225</sup>:

- el túnel, que era capaz de albergar la cadena de seis carbonos del mentol es, por tanto, lo suficientemente grande para acomodar el sustituyente grande (v.g. fenilo) de los ácidos carboxílicos quirales. En la lipasa de *M. miehei* aparece un canal, en vez de un túnel;
- exclusivamente la configuración *S* en estos ácidos permite al sustituyente mediano eludir los aminoácidos aromáticos Phe415 y Phe345. Por tanto, la enantioselectividad de la lipasa de *C. rugosa* viene determinada por estos residuos aminoacídicos. De hecho, las cinco isoformas de esta lipasa poseen fenil-alanina en las posiciones 345 y 415 (Figura 50). En cambio, la lipasa II de *G. candidum* posee leucina en esa posición, lo que podría influir en su diferente enantioselectividad hacia los ácidos carboxílicos quirales.



**Figura 50.** (a) Centros de unión de las ácidos carboxílicos en la LCR que explican su *S*-enantioespecificidad. (b) Modelo propuesto para la hidrólisis del *S*-fenil propionato de butilo.

## 2. Lipasa B de *Candida antarctica*.

La cavidad donde se sitúa el centro activo de la LBCA se puede dividir en dos zonas: una de fijación a la parte alcohólica, y otra de fijación al grupo acilo. Se trata de dos canales que discurren paralelos desde la serina 105 hasta la superficie, solamente separados por dos residuos hidrofóbicos, la isoleucina 189 y la isoleucina 285.

I. *Zona de fijación a la parte alcohólica.* La LBCA presenta una gran estereoselectividad hacia los alcoholes secundarios, mucho mayor que otras lipasas, como se ha podido comprobar en reacciones de hidrólisis<sup>226</sup> y transesterificación<sup>227</sup>. Un estudio estructural ha permitido modelizar los dos enantiómeros del butanoato de 1-metoxi 3-feniletoksi 2-propilo dentro del centro activo de la LBCA<sup>223</sup>. La enzima reacciona preferentemente con el isómero R de este sustrato, con un relación  $E=55$ <sup>226a</sup>. El grupo metoximetilo del isómero R encaja en un pequeño bolsillo flexible, muy cercano al triptófano 104, tras un leve movimiento de este residuo (Figura 51a). El isómero S mantiene el enlace de hidrógeno con la histidina, pero el grupo voluminoso que se prolonga desde el centro quiral del alcohol, tiene que rotar dentro del centro activo y no permite un buen acoplamiento (figura 51b).

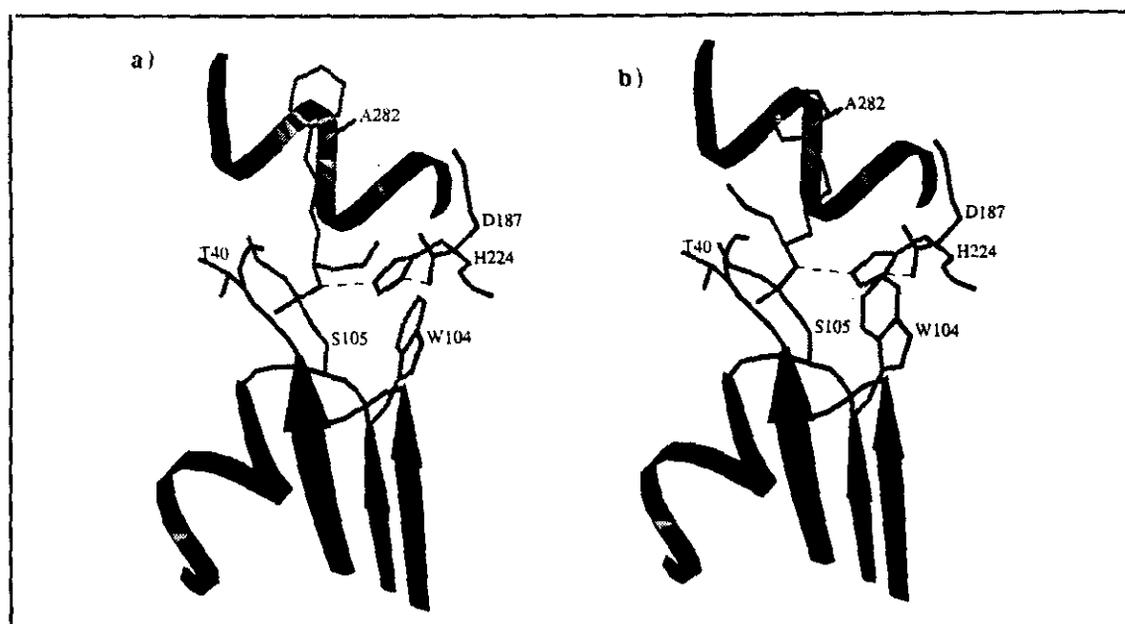


Figura 51. Estructura del butanoato dentro del centro activo de la LBCA, después de su minimización por ordenador.

En cuanto a la *zona de reconocimiento del grupo acilo* en el centro activo de la LBCA, se sabe poco ya que esta enzima se ha empleado poco con ácidos quirales<sup>49</sup>. Este punto ha constituido uno de los objetivos de nuestro trabajo.

Todas las interacciones mencionadas explican la preferencia de las lipasas por un determinado enantiómero. Sólo las pequeñas diferencias relativas a su composición aminoacídica y la posición de los lazos polipeptídicos, confieren a las lipasas diferente enantioselectividad. La mutagénesis dirigida, mediante el cambio específico de algunos aminoácidos de la secuencia de la lipasa, podría mejorar e incluso invertir su enantioselectividad hacia los alcoholes y los ácidos quirales.

#### IV.1.2.2. Esterificaciones enantioselectivas catalizadas por lipasas.

Durante muchos años las lipasas se han empleado ampliamente en la hidrólisis enantioselectiva de ésteres racémicos en medios acuosos<sup>229-231</sup>. Este método no está exento de inconvenientes como: la conversión de las moléculas a ésteres, la insolubilidad de la mayoría de los ésteres en agua y su sensibilidad a la misma, etc. De ahí que se hayan buscado otras estrategias alternativas a la hidrólisis enantioselectiva para llevar a cabo la resolución de mezclas racémicas.

En el mecanismo de la reacción de hidrólisis, el intermedio acil-enzima se forma por reacción del nucleófilo presente en el centro activo de la enzima (normalmente el -OH del residuo de serina) con la cadena de acilo de la molécula del éster (Figura 5, apartado II.1.2.1). En un medio compuesto por agua, este intermedio se hidroliza inmediatamente, regenerando la enzima y liberando el ácido. En principio, otros nucleófilos pueden competir con el agua por este intermedio, pero en medio acuoso la reacción de hidrólisis prevalece. Sin embargo, si el medio de reacción está compuesto por un medio orgánico, cualquier nucleófilo puede atacar al intermedio acil-enzima con lo que se produce una reacción de síntesis. De este modo, las lipasas pueden catalizar una gran variedad de reacciones sintéticas en un medio orgánico: esterificaciones, transesterificaciones, tiotransesterificaciones, aminolisis, oximolisis, etc., que suelen suceder con gran estereoselectividad<sup>232</sup>.

De la misma forma que en la hidrólisis, si la enzima es enantioespecífica, la reacción

de síntesis se detiene cuando se alcanza el 50% de conversión, y como resultado se obtienen los isómeros con un 100% de exceso enantiomérico (e.e.). En este caso el factor de enantioselectividad (E) es superior a 100. Por ejemplo, la lipasa de *Candida rugosa* es capaz de esterificar enantioselectivamente el isómero (-) del mentol con ácido láurico en heptano, con lo que se obtiene el éster (-) con un 95% de exceso enantiomérico<sup>233</sup>.

Si la enzima no es enantioespecífica ( $E < 10$ ), el proceso biocatalítico pierde interés sintético. La aplicación de determinadas técnicas que aumentan la selectividad de las enzimas ha permitido el empleo de lipasas económicas pero con menor estereoselectividad ( $E = 10-20$ ). En muchos casos, la modificación de una o varias condiciones de la reacción ("ingeniería del medio") ha mejorado el resultado de estas resoluciones<sup>234</sup>. A continuación se citan alguna de estas técnicas aplicadas a la resolución de ácidos y alcoholes racémicos en medios orgánicos.

*1. Modificación del disolvente orgánico.* La naturaleza del disolvente puede influir en la enantioselectividad de algunas lipasas. Las últimas investigaciones se han centrado en relacionar alguna propiedad fisico-química del disolvente con la selectividad enzimática, para así, poder racionalizar todos estos procesos biocatalíticos. Se sabe que el logP está relacionado con la lipofilia del disolvente y, por tanto, con la eliminación o mantenimiento de la monocapa de agua esencial de la enzima, mientras que la constante dieléctrica del disolvente da una idea acerca de la flexibilidad de la lipasa en el disolvente. Sin embargo, en unos casos se han podido establecer relaciones coherentes con toda esta información, mientras que en otros no ha sido así. Por ejemplo, Carrea y cols.<sup>235</sup> realizaron un estudio exhaustivo y sistemático de la influencia de un gran número de disolventes en la resolución de diversos alcoholes quirales, entre los que destacaban el mucolítico ( $\pm$ ) trans-sobrerol y la feromona ( $\pm$ ) sulcatol. Para ello, emplearon las lipasas porcina, de *Pseudomonas sp.*, de *Pseudomonas cepacia*, de *Chromobacterium viscosum* y de *Mucor miehei*. La influencia del disolvente parecía clara, pero en ninguno de los casos se pudo relacionar el aumento de selectividad con alguna de las características fisico-químicas del disolvente, como su logP o su constante dieléctrica.

Más afortunados fueron Nakamura y cols.<sup>236</sup>, los cuales lograron relacionar el aumento de enantioselectividad de la lipasa de *Pseudomonas sp.* con las características del disolvente. Así, aquellos disolventes cíclicos con un logP próximo a 1 dieron mejor resultado en la

resolución de alcoholes secundarios.

Las investigaciones se complicaron al observar que el efecto del disolvente sobre la selectividad enzimática es diferente cuando se emplean diferentes enzimas para la resolución de un mismo sustrato, y también cuando se trata de una misma enzima utilizada en la resolución de sustratos diferentes. En algunos casos, el mejor disolvente para un determinado sustrato era el peor para la resolución de otro de estructura diferente<sup>237</sup>. Estos hechos han planteado la posibilidad de que haya una interacción entre una o más moléculas de disolvente con la enzima, dentro o cerca de su centro activo. Estas moléculas de disolvente orgánico intervendrían en la asociación ( $K_m$ ) o en la transformación ( $k_{cat}$ ) de un enantiómero en mayor medida que el otro.

2. *Modificación en la cantidad de agua presente en el disolvente.* El contenido en agua del disolvente puede influir en la enantioselectividad de un proceso biocatalizado por lipasas. Así, en la esterificación del ácido ( $\pm$ )  $\alpha$ -bromo propiónico catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* en hexano, a medida que aumenta la cantidad de agua en el medio, se incrementa la enantioselectividad del proceso. La enzima es cinco veces más estereoselectiva cuando hay un 0,125 % (v/v) de agua que en hexano anhidro<sup>33</sup>. Por tanto, el agua añadida permitió a la enzima adoptar la conformación adecuada para distinguir entre ambos enantiómeros.

Por otra parte, en la esterificación de ácidos metil alcanóicos con n-alcoholes catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* en ciclohexano es más enantioselectiva cuanto mayor es  $a_w$ <sup>34</sup>. No obstante, hay estudios en los que la variación de la  $a_w$  o del contenido de agua en el medio no influyen en el valor de  $E$ <sup>35</sup>.

3. *Variación de la temperatura.* Las enzimas, como cualquier otro catalizador, muestra su mayor grado de enantioselectividad a temperaturas bajas. Esta afirmación se apoya en diversas observaciones de diferentes grupos de investigación que trabajan tanto con hidrolasas<sup>36</sup> como con deshidrogenasas<sup>37</sup>.

Sólo hasta 1992 no se ha racionalizado este efecto de la temperatura. Fue Phillips quien propuso la existencia de una temperatura racémica ( $T_r$ ) en la que la diferencia de energía libre ( $\Delta\Delta G$ ) en las dos direcciones estereoquímicas de la reacción era la misma<sup>38</sup>. Un

aumento de la temperatura produce una disminución en la pureza óptica de los productos de reacción, ya que la reacción se halla controlada por la diferencia de entropía de activación ( $\Delta\Delta S$ ). Varias lipasas, empleadas en procesos de esterificación, presentan esta relación inversa entre temperatura y enantioselectividad<sup>244</sup>.

## IV.2. PARTE EXPERIMENTAL

Los reactivos, la metodología a seguir para realizar las reacciones y el método cromatográfico para analizar el grado de esterificación están descritos en la parte experimental de los capítulos anteriores.

La determinación del exceso enantiomérico del ácido remanente de las reacciones de esterificación finalizadas a un tiempo determinado, se realizó mediante dos métodos:

1. Resonancia Magnética Nuclear, y 2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

### IV.2.1. Determinación del exceso enantiomérico por RMN.

Los métodos de discriminación quiral por Resonancia Magnética Nuclear se basan en la creación de diastereoisómeros de la muestra a analizar con un compuesto quiral ópticamente puro. Se puede recurrir a un disolvente quiral (cuyo empleo es poco frecuente) o bien a la adición de un reactivo quiral o reactivo de desplazamiento en un disolvente inerte ( $CL_4C$  o  $CL_3CD$ ). Mediante estos métodos se consigue que cada uno de los enantiómeros tenga un desplazamiento químico ( $\delta$ ) diferente. La proporción de los dos enantiómeros se calcula a partir de la integral de las dos señales obtenidas por desdoblamiento.

Ultimamente el reactivo de desplazamiento que mejores resultados ha dado en el análisis de ácidos carboxílicos quirales es la 1,2 difenil etano diamina. Este reactivo se ha empleado con éxito en la determinación de la pureza enantiomérica de diversos ácidos 2-aril propiónicos<sup>245</sup>, y ha sido el método alternativo a la cromatografía en el análisis de nuestras muestras.

Antes de la determinación del exceso enantiomérico, se realizó la separación del ácido remanente del éster formado durante la reacción. El método analítico de separación fue el siguiente: se filtra el derivado y el medio de reacción se concentra en un Rotavapor marca



#### IV.2.2. Determinación del exceso enantiomérico por HPLC.

La cromatografía está basada en la distribución de un compuesto entre dos fases: una móvil y otra estacionaria. Hasta hace pocos años, la mayoría de las fases estacionarias utilizadas en cromatografía gaseosa y cromatografía líquida eran aquirales, lo que significaba que la separación de enantiómeros no podía hacerse directamente, sino que previamente había que formar diastereoisómeros por reacción con un agente ópticamente puro.

Brooks y Gilbert<sup>246</sup> desarrollaron por primera vez un método de separación de los dos isómeros del ibuprofeno por cromatografía de gases, basado en la formación de amidas diastereoisoméricas de este ácido con *R*(+)  $\alpha$ -metil bencil amina. A partir de entonces, han ido apareciendo en la bibliografía diversos métodos de separación de enantiómeros de ácidos 2-aril propiónicos mediante cromatografía, previa derivatización<sup>247</sup>.

Más útil resulta acudir a un método cromatográfico directo donde los enantiómeros son separados directamente por el uso de una fase estacionaria quiral y una fase móvil aquiral. Nosotros hemos empleado columnas tipo *Chiralcel* (Daicel Chemical Ind., Japón), cuya fase estacionaria supramolecular deriva de la celulosa, y que requieren la utilización de una fase normal. Las condiciones de trabajo para los ácidos 2-aril propiónicos fueron:

- ácido *R,S* fenil propiónico: Columna *Chiralcel* OD; fase móvil compuesta por hexano/isopropanol/ácido fórmico (98:2:1); un flujo de 0,75 ml/min.;  $\lambda$ =254 nm.;  $t_R$ =21 min. y  $t_S$ =23 min.
- *R,S* ibuprofeno: Columna *Chiralcel* OD; fase móvil compuesta por hexano/isopropanol/ácido trifluoroacético (100:1:0,1); un flujo de 1 ml/min.;  $\lambda$ =270 nm.;  $t_R$ =20 min. y  $t_S$ =23 min.
- *R,S* naproxeno: Columna *Chiralcel* OD; fase móvil compuesta por hexano/isopropanol/ácido fórmico (97:3:1); un flujo de 0,4 ml/min.;  $\lambda$ =270 nm.;  $t_R$ =46 min. y  $t_S$ =50 min.
- *R,S* ketoprofeno: Columna *Chiralcel* OJ; fase móvil compuesta por hexano/isopropanol/ácido fórmico (9:1:0,5); un flujo de 1 ml/min.;  $\lambda$ =254 nm.;  $t_R$ =14 min. y  $t_S$ =20 min.

### IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### IV.3.1. ESTEREOSELECTIVIDAD DE LA LIPASA DE *C. rugosa*.

En un primer momento y como referencia para nuestro trabajo posterior, empleamos los diferentes derivados inmovilizados de la lipasa de *Candida rugosa* en la esterificación enantioselectiva del *R,S* ibuprofeno con 1-propanol en isooctano. Nativa o inmovilizada, esta lipasa es **S-enantioselectiva**, es decir, esterifica mayoritariamente el enantiómero S(+) del ibuprofeno (Tabla 24).

**Tabla 24.** Esterificación enantioselectiva del *R,S* ibuprofeno catalizada por la LCR nativa e inmovilizada

Reseña	Derivado <sup>a</sup>	$\mu\text{l}$ de agua/10 ml de isooctano	c(%) <sup>b</sup>	t(h)	ee(%) <sup>c</sup>	E
1	Nativa	200	12	192	15,7	> 100
2	Nativa	1000	40	192	71,7	> 100
3	LCR-A-2	1000	20	168	35,4	> 100
4	LCR-A-2	2500	29	168	37,2	31
5	LCR-S-3	1000	40	192	75,3	> 100
6	LCR-S-3	1500	21	192	24,6	26
7	LCR-AL-3	1000	23	192	16,9	4
8	LCR-AL-3	1500	32	192	16,0	2

<sup>a</sup> Se añadió la cantidad suficiente de derivado no liofilizado para que hubiera 75 mg de lipasa en los 10 ml de isooctano. Condiciones: 66 mM ( $\pm$ ) ibuprofeno + 66 mM 1-propanol; T<sup>a</sup> = 30°C; 500 rpm; <sup>b</sup> Conversión en éster; <sup>c</sup> Exceso enantiomérico de R(-) ibuprofeno; <sup>d</sup> E calculado según la ecuación [15].

La enantioselectividad observada corresponde a la descrita por Mustranta<sup>186</sup> y Hedström<sup>215</sup> para la LCR nativa. En cuanto al efecto de la inmovilización sobre la enantioselectividad de la enzima, existe un comportamiento diferente entre la lipasa nativa y la inmovilizada. La enantioselectividad se mantiene en el caso de la lipasa nativa independientemente de la adición de mayor o menor cantidad de agua al medio. Sin embargo, la enantioselectividad de la lipasa inmovilizada varía con el soporte y con la cantidad de agua

añadida. De esta forma, el derivado en alúmina no mejora su baja estereoselectividad con una adición suplementaria de agua (reseña 7 y 8). En los demás derivados, que son enantioespecíficos, un exceso de agua en el microentorno enzimático aumenta la actividad hidrolasa del éster S formado con lo que disminuye el exceso enantiomérico, y por consiguiente, el valor de E.

Como conclusión, destacaremos al derivado en sílice como un biocatalizador que presenta la misma actividad y enantioselectividad que la lipasa nativa en la resolución del ibuprofeno racémico. En esta resolución habría que establecer unas condiciones de hidratación óptimas para que el derivado mostrara máxima actividad y no perdiera selectividad. De todas formas, su interés es limitado en la resolución de ácidos 2-aril propiónicos, ya que, al ser S-enantioselectivo, se obtendría el ácido R(-), el cual carece de efecto terapéutico.

#### IV.3.2. ESTEREOSELECTIVIDAD DE LA LIPASA B DE *Candida antarctica*

En primer lugar se determinó la estereoselectividad de la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada sobre la resina Levatit OC (derivado SP435A) en la esterificación de los isómeros puros del ketoprofeno con 1-propanol en el seno de isobutil-metil cetona.

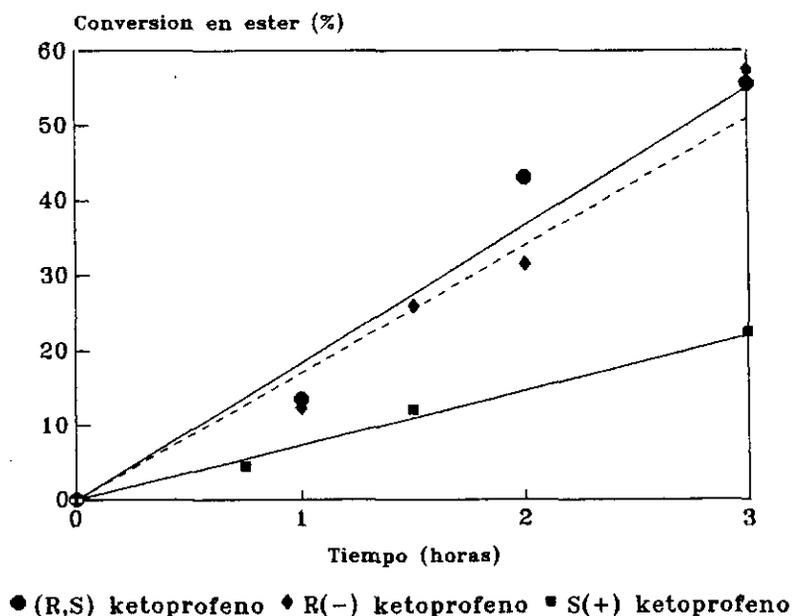


Figura 53. Esterificación del ketoprofeno con 1-propanol catalizada por la LBCA inmovilizada (SP435A). 66 mM ácido y 66 mM de 1-propanol en 10 ml de IBMK; 300 mg de SP435A;  $T^{\circ} = 50^{\circ}\text{C}$ ; velocidad de agit. = 300 rpm.

Se utilizó este disolvente, en el cual la enzima es activa, ya que solubiliza completamente este ácido. La LBCA es R-estereoselectiva ( $E=2,5$ ) y no enantioespecífica, ya que esterifica el enantiómero  $R(-)$  a mayor velocidad que el  $S(+)$ . Asimismo, se observa que la mezcla racémica se esterifica a una velocidad similar a la del  $R(-)$  ketoprofeno (Figura 53). A partir de aquí decidimos analizar todas las variables que pudieran influir en la estereoselectividad de la LBCA sobre los ácidos 2-aril propiónicos.

#### IV.3.2.1. Influencia de las condiciones de reacción en la estereoselectividad de LBCA.

Se analizó la influencia de diversas variables técnicas en la esterificación estereoselectiva del ibuprofeno en isooctano catalizada por la LBCA inmovilizada (SP435A). Con este fin, se recurrió al diseño multifactorial propuesto en el apartado III.2.4.

**Tabla 25.** Enantioselectividad de la LBCA inmovilizada (SP435A) en diferentes condiciones de reacción.

Reacción	X <sub>A</sub>	X <sub>B</sub>	X <sub>C</sub>	X <sub>D</sub>	X <sub>E</sub>	X <sub>F</sub>	c(%)	ee(%)	E
1	-	-	-	-	-	-	7,4	2,1	1,73
2	+	-	-	-	+	-	1,8	0	1,00
3	-	+	-	-	+	+	26,4	4,7	1,36
4	+	+	-	-	-	+	80,3	26,3	1,39
5	-	-	+	-	+	+	2,9	1,0	2,01
6	+	-	+	-	-	+	16,6	7,3	2,31
7	-	+	+	-	-	-	43,9	16,2	1,76
8	+	+	+	-	+	-	16,7	4,6	1,66
9	-	-	-	+	-	+	49,6	16,2	1,61
10	+	-	-	+	+	+	22,0	1,0	1,07
11	-	+	-	+	+	-	49,0	9,4	1,32
12	+	+	-	+	-	-	84,4	48,8	1,73
13	-	-	+	+	+	-	11,3	1,5	1,28
14	+	-	+	+	-	-	34,5	8,1	1,47
15	-	+	+	+	-	+	91,0	16,0	1,14
16	+	+	+	+	+	+	71,2	31,2	1,66
17	0	0	0	0	0	0	42,4	11,4	1,51
18	0	0	0	0	0	0	40,5	10,9	1,53
19	0	0	0	0	0	0	43,7	12,2	1,54

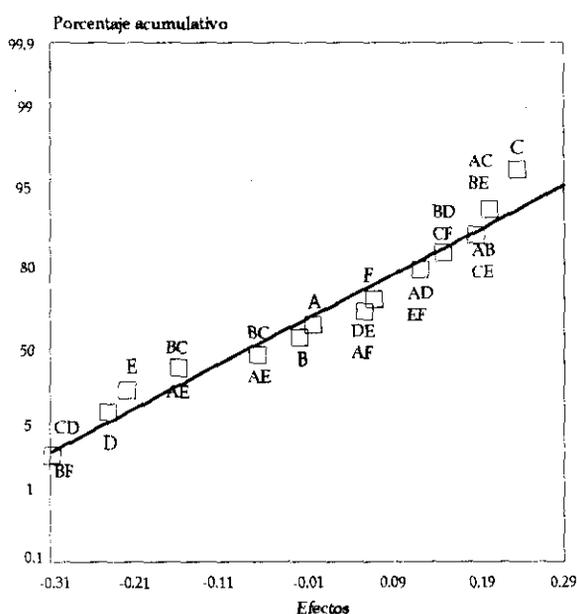
<sup>a</sup>  $\mu$ l de agua; <sup>b</sup> Temperatura ( $^{\circ}$ C); <sup>c</sup> Velocidad de agitación (r.p.m.); <sup>d</sup> mg of lipasa inmovilizada (SP435A); <sup>e</sup> relación molar ácido/alcohol; <sup>f</sup> Tiempo de reacción (horas); <sup>g</sup> Conversión en éster; <sup>h</sup> Exceso enantiomérico de  $S(+)$  ibuprofeno calculado por HPLC. <sup>i</sup> Relación enantiomérica :  $E = \ln[(1-c)(1-ee_s)]/\ln[(1-c)(1+ee_s)]$ .  
Condiciones iniciales: solución 66 mM de ibuprofeno en 10 ml de isooctano.

En la Tabla 25, aparecen los datos de exceso enantiomérico del ácido (mayoritariamente S(+)) ibuprofeno), a partir de los cuales se realizó el cálculo del valor de E según la ecuación [15]. Somos conscientes del valor cualitativo de este resultado, pues no hemos trabajado en condiciones irreversibles y de pseudoprimer orden. Con estos datos, se realizó el estudio estadístico (Tabla 26) y se aplicó el método de Daniels (Figura 54) para determinar qué variables influían más en el valor de E.

**Tabla 26.** Análisis estadístico

Número de experimentos: 16	
Grados de libertad: 15	
<b>Resultados del análisis estadístico</b>	
$b_0 = 1,53$	$b_{AB} = b_{CE} = 0,205$
$b_A = 0,01$	$b_{AC} = b_{BE} = 0,217$
$b_B = -0,06$	$b_{BC} = b_{AE} = b_{DF} = -0,155$
$b_C = 0,26$	$b_{AD} = b_{EF} = 0,135$
$b_D = -0,24$	$b_{BD} = b_{CF} = 0,162$
$b_E = -0,22$	$b_{CD} = b_{BF} = -0,305$
$b_F = 0,07$	$b_{DE} = b_{AF} = 0,07$
<b>Análisis del punto central (t de Student)</b>	
Nivel de confianza: 95 %	
$E_m = 1,526$	
$t_2 (\alpha=0,05) = 4,303$	
$S_x = 0,015$	
Límites de confianza: $\pm 0,038$	

**Figura 54.** Método de Daniels



Todos los puntos se ajustaron a una recta, por tanto la estereoselectividad del proceso es independiente de las condiciones de reacción.

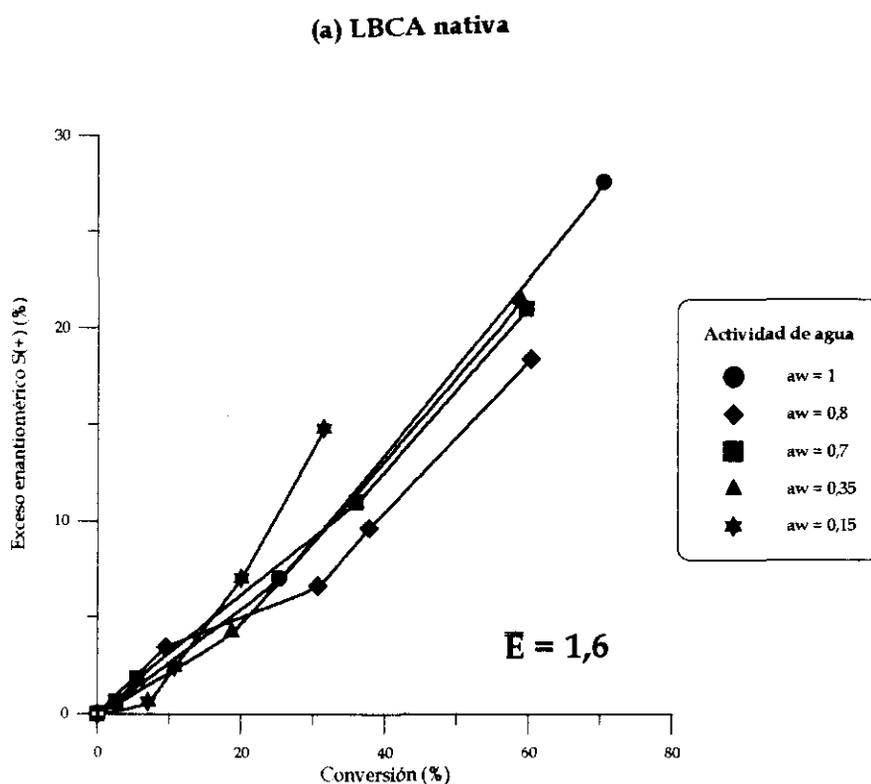
#### IV.3.2.2. Influencia de la $a_w$ sobre la estereoselectividad de la LBCA.

En el apartado II.3.4. (pág.107) vimos la gran influencia que ejerce el agua, en términos de  $a_w$ , en la actividad catalítica de la LBCA, tanto en su forma nativa como inmovilizada. Del mismo modo que estudiamos el curso cinético de todas las reacciones, también tuvimos en cuenta su estereoquímica. En las Figura 55 aparece representado el exceso enantiomérico de ácido S(+)) remanente frente al grado de conversión en éster de las reacciones de esterificación del ibuprofeno con 1-propanol catalizadas en isoocetano por la

LBCA nativa (SP525), inmovilizada covalentemente sobre sílice (LBCA-S-1), e inmovilizada por adsorción sobre Levatit OC (SP435A).

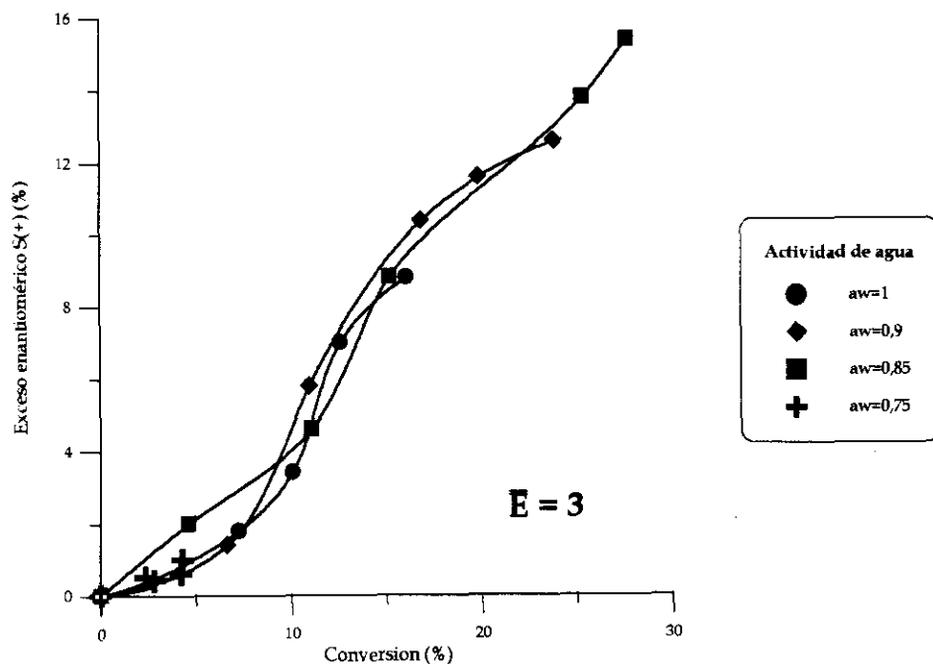
Vemos que el perfil de las curvas, que corresponden a E, es prácticamente el mismo a diferentes  $a_w$ , tanto para la lipasa nativa como para la inmovilizada. Por tanto, la presencia de agua no altera la estereoselectividad de la LBCA empleada en isooctano, como habíamos predicho en el diseño experimental. Estos resultados coinciden con los expuestos por Carrea y cols.<sup>240a</sup>, que tampoco observaron cambios de enantioselectividad de la lipasa de *Pseudomonas sp.* utilizada en la transesterificación del ( $\pm$ ) sulcatol con acetato de vinilo en presencia de disolventes orgánicos pre-equilibrados a diferentes  $a_w$ .

El soporte no parece influir en la estereoselectividad de forma decisiva, ya que los valores de E son muy similares en todos los casos.



**Figura 55a.** Influencia de la  $a_w$  en la estereoselectividad de la LBCA nativa. (Mismas condiciones que en la Figura 37).

(b) LBCA inmovilizada en sílice



(c) LBCA inmovilizada en Lewatit OC 1600

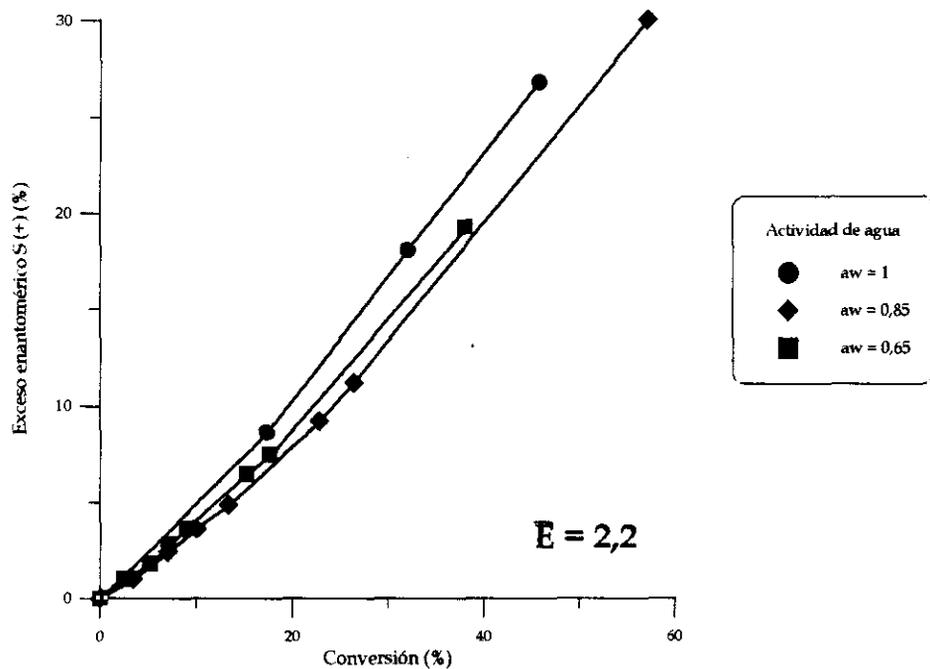


Figura 55. Influencia de la  $a_w$  en la estereoselectividad de la LBCA inmovilizada. (Mismas condiciones que en las fig. 41 y 44 respectivamente).

#### IV.3.2.3. Influencia del disolvente en la estereoselectividad de la LBCA.

Hemos analizado la influencia de las propiedades del disolvente en la actividad y en la estereoselectividad de la LBCA en estado nativo. En este estudio, la enzima pura catalizó la reacción de esterificación del *R,S* ibuprofeno con 1-propanol en el seno de diferentes disolventes orgánicos (Tabla 27).

**Tabla 27.** Influencia de las propiedades fisico-químicas del disolvente en la esterificación estereoselectiva del *R,S* ibuprofeno catalizada por la LBCA nativa.

Disolvente	logP <sup>a</sup>	$\epsilon^a$	C(%) <sup>b</sup>	t(h)	e.e.(%) <sup>c</sup>	E <sup>d</sup>
Isooctano	4,50	1,95	81	24	26	1,4
Ciclohexano	2,50	2,02	49	24	20	1,8
(-) Carvona <sup>e</sup>	2,80	-	17	24	2,5	1,3
(+) Carvona <sup>e</sup>	2,80	-	5	24	- <sup>f</sup>	-
Eter diisopropílico	1,90	3,88	26	24	0	1,0
Isobutil metil cetona	1,38	13,11	3	24	- <sup>f</sup>	-
Acetonitrilo	-0,33	35,94	25	24	15	3,0
(+) Carvona <sup>e</sup>	2,80	-	48	144	18,2	1,8
Isobutil metil cetona	1,38	13,11	31	144	12,4	2,0

<sup>a</sup> Valores obtenidos de la ref.248; <sup>b</sup> Conversión en éster; condiciones de reacción: 66 mM ibuprofeno y 66 mM 1-propanol en 5 ml de disolvente; T<sup>a</sup>=50°C; [SP525]=7 mg/ml; no hubo adición de agua. <sup>c</sup> Exceso enantiomérico de *S*(+) ibuprofeno calculado por HPLC; <sup>d</sup> Relación enantiomérica : E = ln[(1-c)(1-ee)]/ln[(1-c)(1+ee)]. <sup>e</sup> El logP se calculó por fragmentos según la ref.249, por otra parte no está descrito el valor de  $\epsilon$ . <sup>f</sup> no determinado.

*Influencia del disolvente en la actividad.* Como se indicó en el apartado III.3.2, el disolvente orgánico empleado en la esterificación afecta notablemente a la actividad de la LBCA inmovilizada (SP435A), de manera que es mayor en disolventes apolares (con elevado logP) que en disolventes hidrofílicos, ya que estos últimos son propensos a disolver la capa esencial de agua de las proteínas<sup>250</sup>. Lo mismo sucede con la lipasa en estado nativo (Tabla 27), cuya actividad sintética aumenta con el logP del disolvente. Pero encontramos dos excepciones: las carvonas y el acetonitrilo. Por tanto, hay que considerar otras propiedades del disolvente que puedan afectar a la actividad catalítica de la enzima.

La actividad catalítica con la carvona debería ser mayor a tenor de su logP (2,80). Sin embargo, es baja y cambia según se emplee la (-) o la (+) carvona. Por tanto la estructura del disolvente debe influir en la esterificación del ácido. En cuanto a la actividad de la lipasa en acetonitrilo (logP=-0,33) debería ser nula y, en cambio, llega a un valor equiparable al éter diisopropílico (logP=1,9). Este resultado no nos extrañó, ya que ya se había descrito la actividad de la LBCA en la esterificación del geraniol en este disolvente<sup>77c,d</sup>.

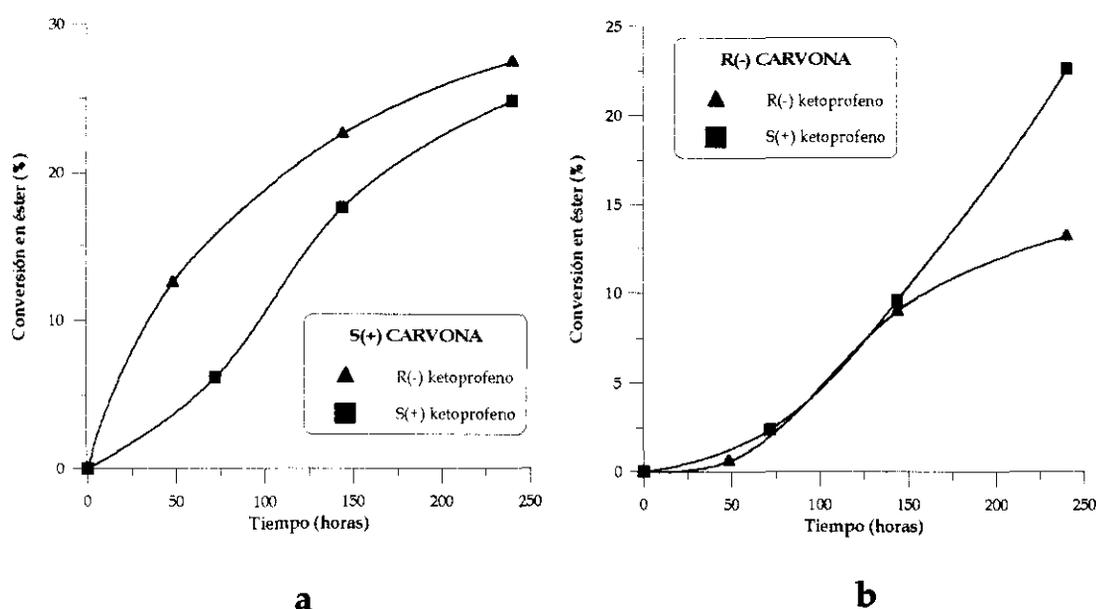
Por tanto, el logP no es un parámetro definitivo en la elección de un disolvente a emplear en Biocatálisis, ya que no incluye las interacciones específicas disolvente-enzima, el carácter ácido y/o básico (definido por los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  de Taft<sup>251</sup>) o el efecto de la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) del disolvente sobre la actividad enzimática. Este último parámetro es de gran importancia, ya que la mayoría de las interacciones no covalentes presentes en la proteína son de tipo electrostático, y de acuerdo con la ley de Coulomb, están inversamente relacionadas con la  $\epsilon$ <sup>252</sup>. En otras palabras, las enzimas deberían ser más flexibles en aquellos disolventes con un valor de  $\epsilon$  elevado. De esta forma, la LBCA puede presentar una mayor flexibilidad en acetonitrilo ( $\epsilon=35,94$ ), lo que facilitaría las interacciones enzima-sustrato, y aumentaría su actividad. Por otra parte, el acetonitrilo es el único disolvente utilizado que tiene carácter ácido ( $\alpha=0,19$ ) y podría interactuar con el Asp 145 situado en la región  $\alpha_5$ , posible tapadera del centro activo, provocando su apertura y facilitando la entrada de los sustratos en el centro activo.

*Influencia del disolvente en la estereoselectividad.* En todos los disolventes el R(-) ibuprofeno se esterificó preferentemente frente al S(+), a excepción del éter diisopropílico, donde se obtuvo un racémico. De nuevo, hemos tenido que considerar los parámetros fisico-químicos y las características estructurales de los disolventes para explicar las pequeñas variaciones de estereoselectividad.

1. Disolventes aquirales. Si volvemos a recurrir al valor meramente cualitativo de E, parece que el acetonitrilo mejora ligeramente la estereoselectividad del proceso, pero en ningún caso podemos asegurar que los disolventes aquirales ejerzan una influencia considerable sobre la enantioselectividad de la lipasa.

2. Disolventes quirales. Las diferencias en la conversión y en la enantioselectividad del proceso catalizado por la LBCA en (-) ó (+) carvona (Tabla 27), hace pensar en la formación de *complejos diastereoisoméricos disolvente-sustrato*, de diferente estabilidad.

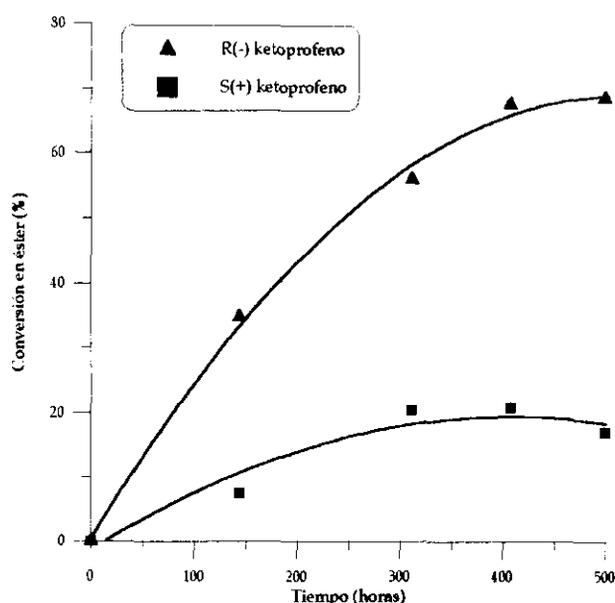
Para comprobar esta hipótesis, hemos acudido a construir el modelo más simple posible, basado en el empleo de los isómeros puros del ketoprofeno, de la *R*(-) y *S*(+) carvona puras y de la lipasa B de *C. antarctica* pura. Los resultados aparecen en la Figura 56. La velocidad de síntesis con los dos enantiómeros del ketoprofeno es parecida en la *S*(+) carvona, mientras que la enantioselectividad aumenta en presencia de la *R*(-) carvona.



**Figura 56.** Esterificación del *R*(-) y el *S*(+) ketoprofeno catalizada por la LBCA nativa en el seno de *R*(-) carvona (a) y *S*(+) carvona (b). 66 mM de ácido y 66 mM de 1-propanol en 5 ml de carvona;  $T^a = 24^\circ\text{C}$ ; [SP525] = 7 mg/ml; sin adición de agua; velocidad de agitación = 300 rpm.

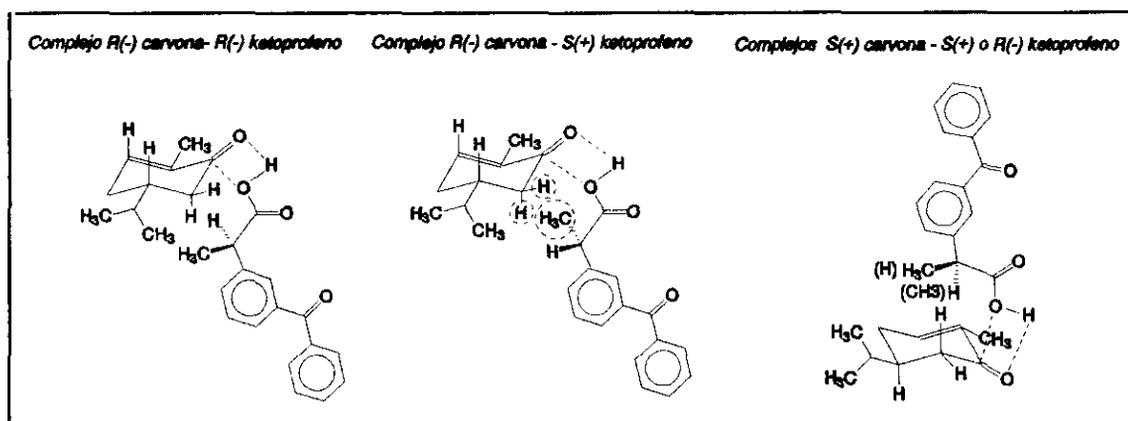
Si comparamos estos resultados con los obtenidos con la isobutil metil cetona (Figura 57), observamos cómo el comportamiento de la LBCA es similar en este disolvente y en la *R*(-) carvona, pero no sucede lo mismo con la *S*(+) carvona. Este hecho nos indica que el disolvente quiral sí afecta al curso estereoquímico de la reacción. Una posible explicación sería la formación de un complejo diastereoisomérico carvona-ácido, cuya estabilidad dependería de la geometría de la carvona y que determinaría la estereoselectividad del proceso. Los disolventes aquirales originarían complejos de la misma estabilidad, por lo que

la estereoselectividad del proceso estaría regulada por la propia enzima.



**Figura 57.** Esterificación del R(-) y el S(+) ketoprofeno catalizada por la LBCA nativa en el seno de isobutil metil cetona. 66 mM de ácido y 66 mM de 1-propanol en 5 ml de IBMK; T<sup>a</sup> = 24 °C; [SP525] = 7 mg/ml; sin adición de agua; velocidad de agitación = 300 rpm.

Según sea la configuración de la carvona, la solvatación de su grupo carbonilo con el el grupo ácido del ketoprofeno se verá favorecida o desfavorecida. Si admitimos que la interacción de la cetona con el ácido tiene lugar a través de los grupos polares (COOH y C=O) en la cara de la carvona menos impedida estéricamente, se puede dar las interacciones que aparecen en la Figura 58.



**Figura 58.** Complejos diastereoisoméricos carvona-ketoprofeno

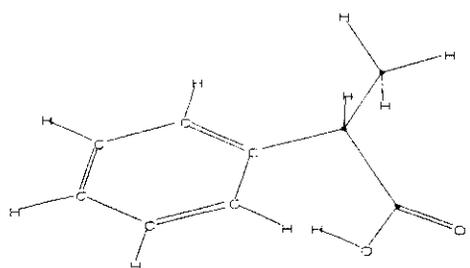
La interacción entre la *S*(+) carvona y los ácidos *R*(-) ó *S*(+) tendría el mismo valor energético, debido a la localización de la molécula del ketoprofeno cerca de la zona plana de la enona. De esta forma, no se notarían diferencias de enantiopreferencia entre la isobutil metil cetona y la *S*(+) carvona. Sin embargo, la interacción de la *R*(-) carvona con el *R*(-) ó *S*(+) ketoprofeno mostraría un nivel energético diferente, debido a razones de tipo estérico relacionadas con el contacto del grupo  $\alpha$ -metilo del ácido con el anillo de la carvona. De esta manera, la *R*(-) carvona formaría un complejo más estable con el *R*(-) ketoprofeno que con el *S*(+). Como primera consecuencia, el *R*(-) ketoprofeno sería liberado más lentamente en este disolvente que el *S*(+) ketoprofeno. A continuación se esterificaría a una velocidad aparentemente menor que en *S*(+) carvona, tal y como se observa en la Figura 56. Como resultado final, se produciría la racemización o incluso, según la conversión lograda, la inversión en la estereoselectividad del proceso.

Así pues, los disolventes quirales actúan con los catalizadores quirales (en nuestro caso, la LBCA) en los procesos de resolución de mezclas racémicas. Estos resultados respaldan las últimas teorías propuestas por el grupo de Carrea, que sugieren una interacción específica del disolvente con la enzima<sup>253</sup> y/o con el sustrato<sup>254</sup> para originar complejos diastereoisoméricos. En estos estudios emplearon también carvonas junto con diversas hidrolasas nativas o inmovilizadas.

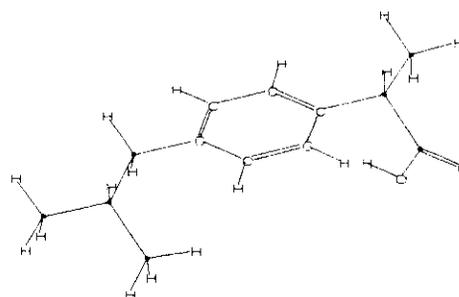
#### IV.3.2.4. Zona de reconocimiento del ácido en el centro activo de la LBCA.

A partir de la geometría de diversos sustratos, se procedió a modelizar la posible forma del centro de reconocimiento del grupo acilo en el centro activo de la LBCA, el cual no se ha descrito hasta la fecha. Para este estudio se emplearon el ácido 2-fenil propiónico racémico y los siguientes antiinflamatorios no esteroídicos en forma racémica: ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno y flurbiprofeno. A pesar de su bajo logP (que produce una disminución de la actividad), el estudio tuvo que realizarse en isobutil metil cetona, disolvente en el que todos estos ácidos son solubles, con el fin de obtener resultados comparables.

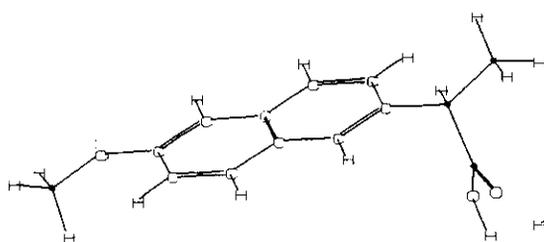
Los ácidos fueron minimizados mediante la metodología de la Mecánica Molecular, con el programa MMX y el campo de fuerzas AMBER. El programa informático PCMODEL permitió dibujar los confórmeros de mínima energía<sup>255</sup> (Figura 59).



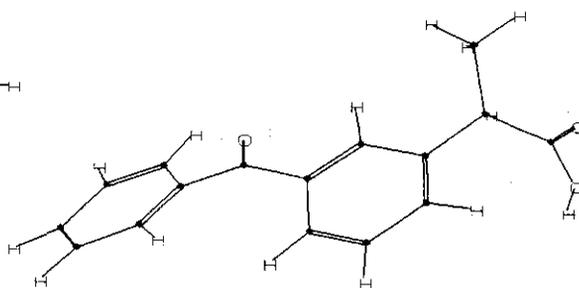
*R*(-) 2-fenil propiónico



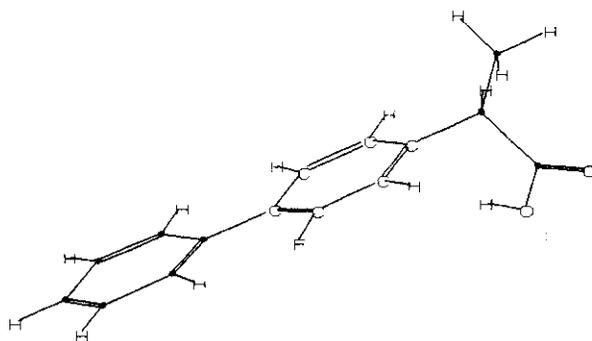
*R*(-) ibuprofeno



*R*(-) naproxeno



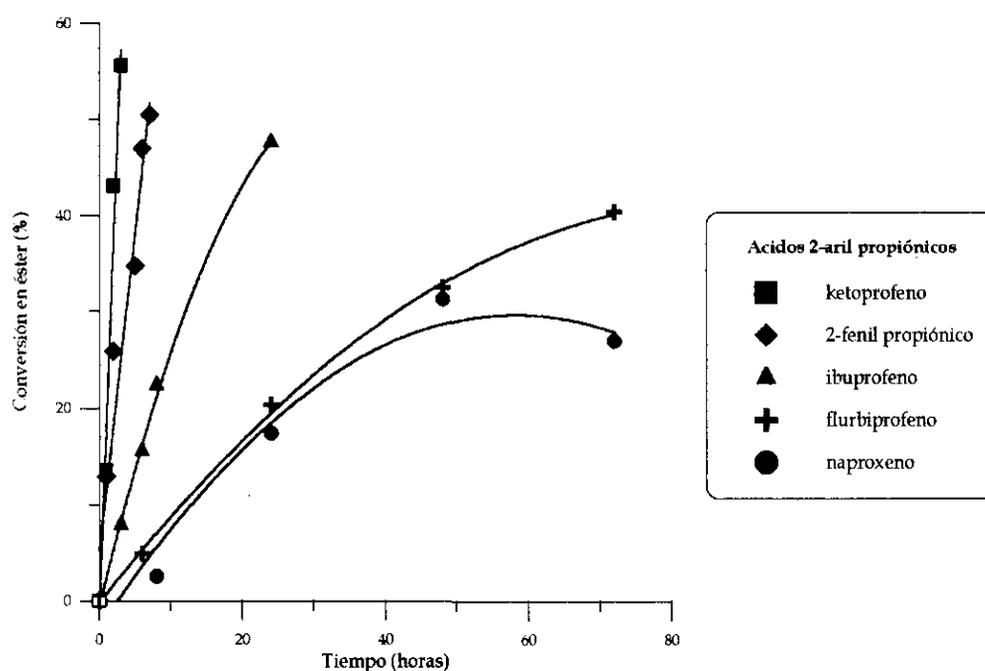
*R*(-) ketoprofeno



*R*(-) flurbiprofeno

Figura 59. Confórmers de mínima energía de los ácidos 2-aril propiónicos.

El orden de reactividad observado (ketoprofeno > 2-fenil propiónico > ibuprofeno > naproxeno = flurbiprofeno)(Figura 60), no está relacionado con el valor de logP de cada uno de los ácidos, pues es lo suficientemente alto como para que no existan restricciones difusionales a través del disolvente. Tampoco el tamaño de las moléculas parece ser un factor determinante en la conversión (Tabla 28). Es posible que la baja reactividad del naproxeno y el flurbiprofeno se deba a la rigidez de estas dos estructuras, que encajarían con más dificultad en el túnel del subsitio "Ar". Este túnel tendría unas dimensiones aproximadas de  $4 \times 10 \times 10 \text{ \AA}$ . Evidentemente esta hipótesis debería ser comprobada y ampliada con un estudio más profundo de Dinámica Molecular que considere, simultáneamente, enzima y sustrato.



**Figura 60.** Esterificación de los ácidos aril-propiónicos catalizada por la LBCA. 66 mM ácido + 66 mM 1-propanol en 10 ml de isobutil metil cetona; 300 mg de SP435A,  $T^a = 50^\circ\text{C}$ ; velocidad de agitación=300 rpm.

La reactividad (Figura 60) y enantioselectividad (Tabla 29) que presenta la lipasa B de *C. antarctica* en la esterificación de las ácidos 2-arilpropiónicos en comparación con las que presenta la lipasa de *C. rugosa* en la hidrólisis de los ésteres etílicos de los mismos sustratos<sup>501</sup>, nos han permitido descubrir las siguientes diferencias en el centro activo de estas enzimas:

**Tabla 28.** Características de los ácidos 2-aril propiónicos

Ácido	logP	d <sub>1</sub> (Å) <sup>b</sup>	d <sub>2</sub> (Å) <sup>c</sup>
2-fenil propiónico	1,84	6,05	6,13
Ibuprofeno	3,74	8,77	9,12
Naproxeno	2,83	9,94	10,37
Ketoprofeno	2,66	9,95	11,05
Flurbiprofeno	3,48	9,91	10,53

<sup>a</sup> LogP calculado por fragmentos según la referencia 249. <sup>b</sup> Distancia desde el carbono quiral hasta el extremo opuesto de la molécula (sustituyente en para en el anillo). <sup>c</sup> Distancia desde el carbono del grupo carboxílico.

**Tabla 29.** Enantioselectividad en la esterificación de los ácidos 2-aril propiónicos catalizada por SP453A en IBMK<sup>a</sup>

Sustrato	Conversión en ester <sup>a</sup> (%)	t(h)	e.e. ácido S(+) <sup>b</sup>	E <sup>c</sup>
<i>R,S</i> ketoprofeno	55,6	3	38	2,6
<i>R,S</i> ácido 2-fenil propiónico	43,8	7	26	2,5
<i>R,S</i> ibuprofeno	47,6	24	29	2,5
<i>R,S</i> flurbiprofeno	40,4	72	18	2,0
<i>R,S</i> naproxeno	31,2	48	4	1,3

<sup>a</sup> Condiciones de reacción : 66 mM ácido + 66 mM 1-propanol en 10 ml de isobutil metil cetona; 300 mg de SP435A, T<sup>a</sup>=50°C; velocidad de agitación=300 rpm. <sup>b</sup> Exceso enantiomérico de forma S(+) calculado por RMN. <sup>c</sup> Relación enantiomérica :  $E = \ln[(1-c)(1-ee_s)]/\ln[(1-c)(1+ee_s)]$ .

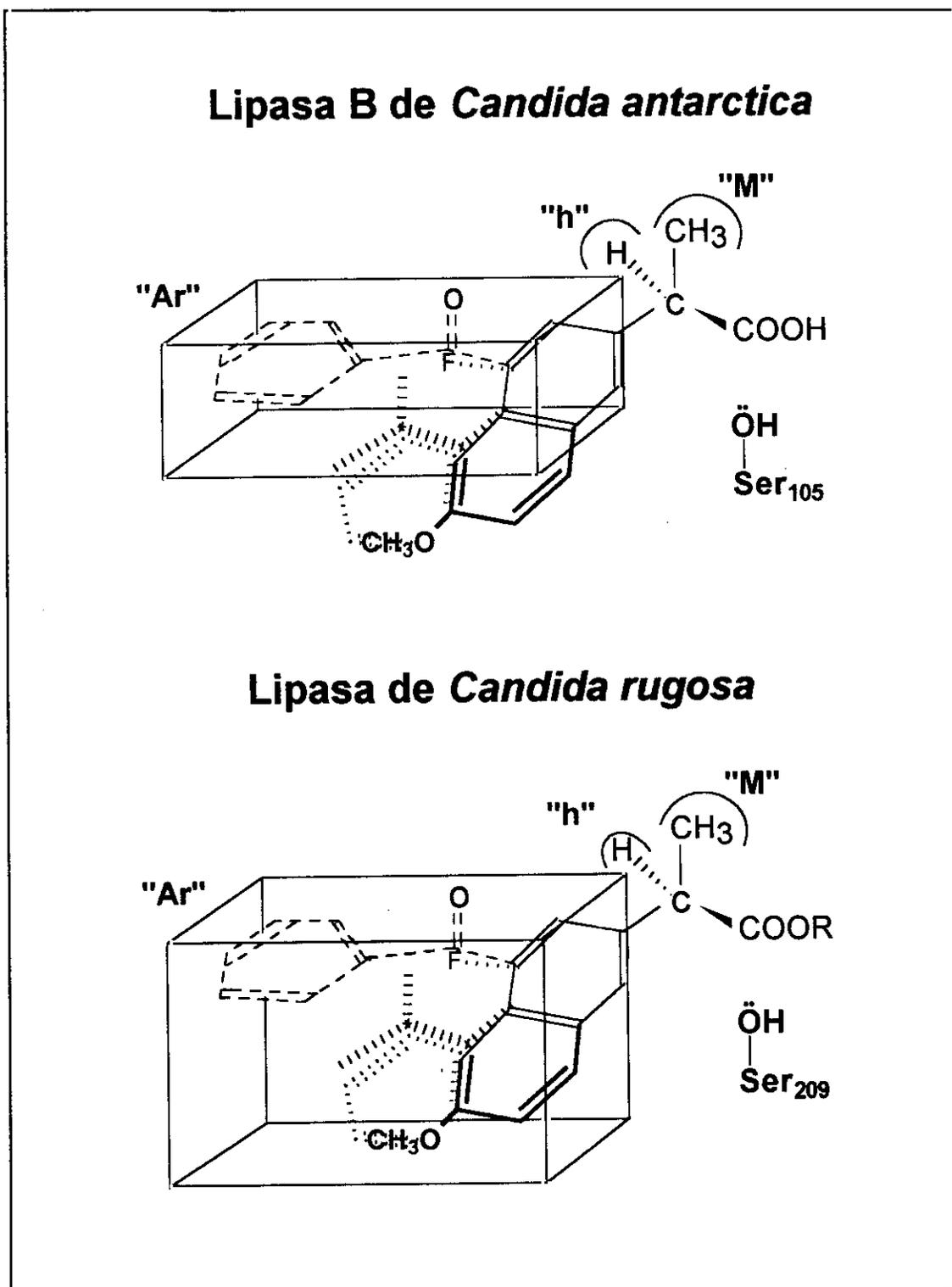
1. *Centro de reconocimiento del grupo alcohólico.* La LCR es capaz de hidrolizar ésteres de alcoholes primarios de hasta 16 átomos de carbono de longitud. Por otro lado, el centro de reconocimiento del grupo alcohólico de la LBCA también es capaz de albergar alcoholes primarios de cadena larga, como se ha podido comprobar en la la síntesis del éster octílico del ácido fenil propiónico (Figura 28). Las diferencias estriban en la anchura de este centro. La LCR no puede hidrolizar ésteres de alcoholes secundarios y terciarios, por el contrario la LBCA puede sintetizar una gran variedad de ésteres de alcoholes secundarios y con gran enantioselectividad<sup>227</sup>.

2. Centro de reconocimiento para el grupo acilo. Existen diferencias en los distintos subsitios que reconocen los tres sustituyentes alrededor del carbono quiral:

a) El subsitio para el sustituyente grande ("Ar") de la LCR es capaz de admitir sin dificultad sustituyentes aromáticos grandes y rígidos como el naproxeno<sup>210</sup>; en cambio este sustrato presenta problemas estéricos cuando tiene que encajar en el subsitio "Ar" de la LBCA. Por tanto, presumimos una mayor amplitud en esta zona para la LCR y un subsitio de poca profundidad para la LBCA. Este hecho explicaría las dificultades que presenta esta enzima en la hidrólisis de triglicéridos con ácidos grasos de cadena larga, como la trioleína. Por otra parte, este subsitio es muy estrecho, lo que explicaría los buenos resultados obtenidos con el ketoprofeno, única molécula que podría acoplarse con mayor facilidad debido a la posibilidad de giro que tiene su grupo cetónico.

b) La elevada enantioselectividad que presenta la LCR hacia los isómeros *S*(+) de los ácidos 2-aril propiónicos, tanto en esterificación como en hidrólisis, nos indica la existencia de un gran impedimento estérico en el subsitio "h" que sólo admitiría como sustituyente pequeño al hidrógeno. Por el contrario, el subsitio "h" de la LBCA podría alojar con dificultad moderada un grupo metilo, lo que explicaría su baja R-estereoselectividad.

c) En cuanto al subsitio "M", desconocemos las dimensiones que presenta en la LBCA, al haber empleado sólo ácidos 2-aril propiónicos. En el caso de la LCR, se ha comprobado que los ácidos fenil butíricos son hidrolizados con mayor dificultad que los fenil propiónicos<sup>210</sup>. Por tanto, en esta enzima debe existir cierta restricción estérica en la zona, que no admita sustituyentes mucho mayores que el metilo.



**Figura 61.** Centro de reconocimiento del ácido en el centro activo de la (a) LBCA y (b) LCR, este último tomado de la referencia 210.

***Capítulo V:***  
***Conclusiones***



## V. CONCLUSIONES

Como se comentó en el Capítulo I, uno de los objetivos principales de la presente Tesis Doctoral era el estudio, por primera vez, de la actividad y estereoselectividad de la lipasa B de *Candida antarctica* en la resolución de sustratos no naturales como son los ácidos (*R,S*) aril propiónicos. En todo momento, la lipasa de *Candida rugosa* ha sido una referencia constante en nuestro estudio, al ser una enzima muy conocida y estudiada por nuestro grupo de investigación.

En primer lugar, se procedió a la **inmovilización covalente** de las dos lipasas sobre diferentes soportes activados mediante distintas metodologías. Podemos decir que:

1. La lipasa de *C. rugosa* se inmoviliza mejor sobre agarosa y sílice. Los derivados obtenidos sobre sílice poseen mayor carga enzimática (51-62 mg lipasa/g de sílice) que los obtenidos con agarosa (30-35 mg de lipasa/g de agarosa), aunque su actividad en la hidrólisis de trioleína es menor (66-69% frente a 73-78%).

2. Es la primera vez que se inmoviliza covalentemente la lipasa B de *C. antarctica* (producto SP525 de Novo) sobre este tipo de soportes. En el caso de los soportes de tipo orgánico, el brazo espaciador de las sefarosas influye en la estabilidad de la lipasa inmovilizada. Un brazo largo, como en la sefarosa epoxidada, permite cambios conformacionales en la proteína que hacen disminuir su actividad y estabilidad. Sin embargo, en la sefarosa tresilada donde el brazo es más corto, la lipasa se encuentra más rígida, con lo que presenta mayor estabilidad. Por otro lado, dentro de los soportes inorgánicos, la alúmina no es un soporte adecuado para la inmovilización de la lipasa B de *C. antarctica*, debido a los resultados tan bajos de cantidad de lipasa inmovilizada y actividad retenida. Sin embargo, la sílice es capaz de admitir mayor carga enzimática, pero a expensas de una formación de agregados multienzimáticos en su superficie con la consiguiente pérdida de actividad y termoestabilidad. Las principales desventajas que muestran los derivados suministrados por Novo en comparación con los preparados en nuestro laboratorio son: a) la poca resistencia de Novozym 435 a la abrasión mecánica en los reactores de tanque agitado

habitualmente utilizados en las reacciones de síntesis; b) la rápida desactivación que sufre SP435A cuando se almacena en el tampón de trabajo a 50°C, aunque la actividad residual se mantiene durante mucho tiempo, posiblemente debido a las moléculas de enzima ocluidas en los poros que presenta el soporte. La principal ventaja de los derivados de Novo consiste en su gran actividad, debida seguramente a su elevada carga enzimática.

En segundo lugar, al analizar la **enantioselectividad del proceso**, observamos que la lipasa de *C. rugosa* esterificaba mayoritariamente el isómero *S*(+) del ibuprofeno. Por tanto, la esterificación enantioselectiva catalizada por esta enzima, como método para la resolución de las mezclas racémicas de los ácidos 2-aryl propiónicos, tiene un interés limitado, ya que se obtiene el ácido *R*(-) puro, enantiómero que carece de efecto antiinflamatorio.

La lipasa B de *Candida antarctica* presenta una selectividad contraria a la lipasa de *C. rugosa*, y en principio, es adecuada para obtener los isómeros *S*(+) puros; hecho que no había sido descrito anteriormente en la bibliografía. Las primeras pruebas realizadas consistentes en la esterificación de los isómeros puros del ketoprofeno en isobutil metil cetona y pruebas posteriores con otros sustratos, nos confirmaron la R-estereoselectividad de la lipasa B de *C. antarctica* hacia los ácidos aril propiónicos. Al no ser enantioselectiva, es decir no esterificaba exclusivamente el ácido *R*(-) de los antiinflamatorios, nos propusimos analizar todos los factores que pudieran intervenir en el curso cinético y estereoquímico de la reacción, con la finalidad de mejorar la selectividad del proceso. El resultado de estos estudios, basados en la resolución del ibuprofeno son:

1. Las condiciones experimentales (analizadas con ayuda de un diseño experimental) que favorecen la reacción de esterificación, son: una temperatura alta, una relación molar ácido/alcohol de 1:1 y una adición elevada de derivado inmovilizado. Ninguna de las variables experimentales del diseño afectan a la estereoselectividad del proceso.

2. El pre-equilibrado de las reacciones a diferentes valores de  $a_w$ , ha permitido el análisis más riguroso de la influencia de la cantidad de agua en el proceso. A partir de las isotermas de adsorción, hemos establecido un método para determinar la  $a_w$  óptima que debe poseer el sistema para que la lipasa -nativa o inmovilizada - presente una mayor actividad sintética. Ni el soporte ni la  $a_w$  del sistema influyen en la estereoselectividad de esta lipasa.

3. El logP del disolvente es el parámetro que mejor se ha podido correlacionar con el aumento de actividad de la lipasa, de tal manera que aquellos disolventes con  $\log P > 2$  son los más adecuados para obtener conversiones altas. Pero, en otros disolventes, ha habido que recurrir a otros parámetros para explicar los cambios de actividad y selectividad. Así, el sorprendente incremento de actividad obtenido con el acetonitrilo (cuyo  $\log P < 0$ ) se ha podido relacionar con su parámetro  $\alpha$  de Taft. Este es el único disolvente utilizado con carácter ácido, y por tanto, con posibilidad de interactuar con el aspártico 145 presente en la hélice  $\alpha_5$ , considerada tapadera del centro activo. La estereoselectividad de la enzima no varía en gran medida en presencia de los diferentes disolventes aquirales. Sin embargo, en presencia de los dos enantiómeros de las carvonas, empleadas como disolventes quirales, se observan cambios de selectividad. Estos cambios se explican por una posible formación de complejos diastereoisoméricos disolvente-ácido de diferente estabilidad, que liberan un isómero del ácido a mayor velocidad que el otro.

Finalmente procedimos a la **resolución de los ácidos aril-propiónicos racémicos** en un disolvente en el que todos fueran solubles y la lipasa B de *C. antarctica* activa. La isobutil metil cetona cumplía estos requisitos y permitió obtener resultados comparables. De la reactividad observada y de los resultados de estereoselectividad, hemos deducido que:

a) estructuras rígidas, como la de los anillos del naproxeno y el flurbiprofeno, no encajan con facilidad en el túnel del subsitio "Ar" del centro activo de la enzima. El ketoprofeno es un buen sustrato ya que encaja en el centro activo tras una posible torsión de la molécula en su grupo cetónico.

b) Con todos los ácidos, la enzima se muestra igual de estereoselectiva. La lipasa B de *C. antarctica* reconoce el isómero *R*(-) de los antiinflamatorios en mayor medida que el *S*(+), debido a la topografía del centro de reconocimiento del grupo acilo dentro del sitio activo.



*Capítulo VI:*

*Bibliografía*



## VI. BIBLIOGRAFÍA

- 1 (a) Davies, H.G.; Green, R.H.; Kelly, D.R. y Roberts, S.M. "*Biotransformations in Preparative Organic Chemistry*", Academic Press, 1989. (b) Copping, L.G.; Martin, R.E.; Pickett, J.A.; Bucke, C. y Bunch, A.W. (eds.) "*Opportunities in Biotransformations*" Elsevier Science, 1990. (c) Dordick, J.S. (ed.) en "*Biocatalysts for Industry*", Plenum Press, 1991. (d) Faber, K. en "*Biotransformations in Organic Chemistry*", Springer-Verlag, 1992. (e) Turner, M.K. *Trends Biotech.* **1995**, *13*, 253.
- 2 Abbot, B.J., *Adv. Appl. Microbiol.* **1976**, *20*, 203.
- 3 Vandamme, E.J., en "*Microbial Enzymes and Bioconversions*", A.H. Rose eds., Academic Press, London, 1980, pág. 467.
- 4 (a) Findeis, M.A. y Whitesides, G.M. *Annu. Rep. Med. Chem.* **1984**, *19*, 263. (b) Whitesides, G.M. en "*Enzymes in Organic Synthesis*" (Ciba Found. Symp.111), Pitman, London 1985, pág. 76.
- 5 Markussen, J., UK Pat. Appl. 2069502 (1980).
- 6 (a) Walsh, C. en "*Enzymatic Reaction Mechanisms*", Freeman, San Francisco, 1977. (b) Fersht, A. en "*Enzyme Structure and Mechanism*", Freeman, New York, 1985. (c) Dixon, M. y Webb, E.C. en "*Enzymes*", Academic Press, New York, 1978.
- 7 (a) Yamada, H. y Shimizu, S. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **1988**, *27*, 622. (b) Wong, C.-H. *Science* **1989**, *244*, 1145. (c) Hutchinson, C.W. *Trends Biotech.* **1990**, *8*, 348. (d) Ward, O.P. y Young, C.S. *Enz. Microb. Technol.* **1990**, *12*, 482.
- 8 Fischer, E. *Ber. Detsch. Chem. Ges.* **1894**, *24*, 2683.
- 9 Koshland, D. y Boyer, P. *Ann. Rev. Biochem.* **1968**, *37*, 374.
- 10 (a) Creighton, T.E. en "*Proteins: Structure and Molecular Properties*", Freeman, San Francisco, 1986, cap.6. (b) Segel, I.H. en "*Enzyme Kinetics*", Wiley, New York, 1975.
- 11 (a) Mosbach, K. *Method. Enzymol.* vol. 44, **1976**, . (b) Mosbach, K. *Method. Enzymol.* vol. 135-137, **1987**. (c) Chibata, I. en "*Immobilized Enzymes*", Wiley, New York, 1978.
- 12 (a) Gerhartz, W. en "*Enzymes in Industry*", VCH, Berlin, 1990. (b) Wu, R. y Grossman, L. *Method. Enzymol.* vol. 153-155, **1987**, . (c) Goeddel, D.V. *Method. Enzymol.* vol. 185, **1990**, 185.

- 13 Carrea, G. *Trends Biotech.* 1984, 2, 102.
- 14 (a) Antonini, E.; Carrea, G. y Cremones, P. *Enz. Microb. Technol.* 1981, 3, 291.  
(b) Lilly, M.D. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1982, 32, 162. (c) Martinek, K.; Levashov, A.V.; Khmel'nitsky, Y.L.; Klyachko, N.L. y Berezin, I.V. *Science* 1982, 218, 889.
- 15 Michaelis, L. y Menten, M.L. *Biochem. Z.* 1913, 49, 333-369.
- 16 Börgstrom, B. y Brockman, H.L. (eds.) en "*Lipases*", Elsevier, Amsterdam, 1984.
- 17 Cygler, M.; Schrag, J.D. y Ergun, F., *Biotech. Genet. Eng. Rev.* 1992, 10, 143-184.
- 18 Kilara, A. *Process Biochem.* 1985, 20, 33-45.
- 19 Sugiura, M. *Lipases*, Börgstrom, B. y Brockman, H.L. (eds.), Elsevier, Amsterdam, 1984, págs. 505-523.
- 20 Jensen, R.G. *Lipids* 1983, 18, 650-657.
- 21 Macrae, A.R. y Hammond, R.C. *Biotech. Genet. Eng. Rev.* 1985, 3, 193-205.
- 22 Desnuelle, P. Capítulo sobre las lipasas en "*The Enzymes*" (Boyer, P.D.), Academic Press, New York, 1972, pág. 575-616.
- 23 Winkler, F.K.; D'Arcy, A. y Hunziker, W. *Nature* 1990, 343, 771-774.
- 24 Chapus, C.; Sémériva, M.; Bovier-Lapierre, C. y Desnuelle, P. *Biochemistry* 1976, 15, 4988-4991.
- 25 Guidoni, A.; Benkouka, F.; De Caro, J. y Röver, M. *Biochim. Biophys. Acta* 1981, 660, 148-150.
- 26 Kordel, M.; Menge, U.; Morelle, G.; Hedmann, H. y Schmid, R.D. en "*Lipases: structure, mechanism and genetic engineering*" (Alberghina, L.; Schmid, R.D. y Verger, R. eds.), VCH Weinheim, Alemania, 1991, pág.421-424.
- 27 Ollis, D.L.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S.M.; Harel, M.; Remington, S.J.; Silman, I.; Schrag, J.D.; Sussman, J.L.; Verscheuren, K.H.G. y Goldman, A., *Prot. Eng.* 1992, 5, 197-211.
- 28 Brady, L.; Brzozowski, A.M.; Derewenda, Z.S.; Dodson, D.; Dodson, G.; Tolley, S.; Turkenburg, J.P.; Christiansen, L.; Høge-Jensen, B.; Nørskov, L.; Thim, L. y Menge, U., *Nature* 1990, 343, 767-770.

- 29 Noble, M.E.M.; Cleasby, A.; Johnson, L.N., Egmond, M.R. y Frenken, L.G.J. *FEBS Lett.* **1993**, *331*, 123-8.
- 30 Derewenda, U.; Swenson, L.; Green, R.; Wei, Y.; Dodson, G.G.; Yamaguchi, S.; Haas, M.J. y Derewenda, Z.S., *Nature Struct. Biol.* **1994**, *1*, 36-47.
- 31 Uppenberg, J.; Hansen, M.T.; Patkar, S. y Jones, T.A., *Structure* **1994**, *2*, 293-308.
- 32 Schrag, J.D.; Li, Y.; Wu, S. y Cygler, M., *Nature* **1991**, *351*, 761-4.
- 33 Grochulski, P.; Li, Y.; Schrag, J.D.; Bouthillier, F.; Smith, P.; Harrison, D.; Rubin, B. y Cygler, M., *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 12843-7.
- 34 Grochulski, P.; Li, Y.; Schrag, J.D. y Cygler, M., *Prot. Sci.* **1994**, *3*, 82-91.
- 35 Brzozowski, A.M.; Derewenda, V.; Derewenda, Z.S.; Dodson, G.; Lawson, D.M.; Turkenburg, J.P.; Bjorkling, F.; Hugel-Jensen, B.; Datkar, S.A. y Thim, L., *Nature* **1991**, *351*, 491-494.
- 36 Fink, A.L., en "*Enzyme Mechanisms*" (Page, M.I. y Williams, A., eds.), Royal Society of Chemistry, Londres, 1987, pág 159.
- 37 (a) Martínez, C.; De Geus, P.; Lauwereys, M.; Mathysens, G. y Cambillau, C., *Nature* **1992**, *356*, 615-618. (b) Martínez, C.; Nicolas, A.; Van Tilbeurgh, H.; Egloff, M.-P.; Cudrey, C.; Verger, R. y Cambillau, C., *Biochemistry* **1994**, *33*, 83-89.
- 38 Sussman, J.L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Glodman, A.; Toker, L. y Silman, I., *Science* **1991**, *253*, 872-879.
- 39 Okumura, S.; Iwai, M. y Tsujisaka, Y., *J. Biochem.* **1980**, *87*, 205-211.
- 40 (a) McNeill, G.P.; Shimizu, S. y Yamane, T., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, *67*, 779-783. (b) McNeill, G.P., Shimizu, S. y Yamane, T. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1991**, *68*, 1-5.
- 41 Benzonana, G. y Esposito, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, *231*, 15-22.
- 42 Rogalska, K.; Cudrey, C.; Ferrato, F. y Verger, R. *Chirality* **1993**, *5*, 24-30.
- 43 Sugiura, M. e Isobe, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, *23*, 1226-1230.
- 44 Sugiura, M., Oikawa, T., Hirano, K. e Inukai, T. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *488*, 353-358.

- 45 (a) Okumura, S.; Iwai, M. y Tsujisaka, Y. *Agric. Biol. Chem.* 1976, 40, 655-660.  
(b) Tsujisaka, Y.; Okumura, S. e Iwai, M. *Biochim. Biophys. Acta* 1977, 489, 415-422.
- 46 (a) Benzonana, G. *Lipids* 1974, 9, 166-172. (b) Sonnet, P.E. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1988, 65, 900-904.
- 47 Jensen, R.G.; Galluzo, D.R. y Bush, V.J. *Biocatalysis* 1990, 3, 307-316.
- 48 Moskowitz, G.J.; Cassaigne, R.; West, I.R.; Shen, T. Y Feldman, L.I. *J. Agric. Food Chem.* 1977, 25, 1146-1150.
- 49 Iwai, M.; Tsujisaka, Y.; Okumura, S. y Katsumoto, H. *Yakagaku* 1980, 29, 587-591.
- 50 Iwai, M. y Tsujisaka, Y. en "*Lipases*" (Borgström, B. y Brockman, H.L., eds.) Elsevier, Amsterdam, 1984, págs. 443-469.
- 51 *Jap. Chem. Week* 1981, 14 mayo, pág.2.
- 52 (a) Hüge-Jensen, B.; Anreassen, F.; Christensen, T.; Christensen, L.; Thim, L. y Boel, E., *Lipids* 1989, 24, 781. (b) Pierce, G.E.; Wick, C.B. y Palmer, D.T. *Eur. Pat.* 0385401 (1990). (c) Batenburg, A.M.; Egmond, M.R.; Frenken, L.G.J. y Virrips, C.T. *Eur. Pat.* 0407225A1 (1991).
- 53 (a) Stead, R. *J. Dairy Res.* 1986, 53, 481-505. (b) Whitaker, J.R. *Food Biotech.* 1990, 4, 669-687.
- 54 Pannel, L., *Tesis Doctoral* de la Universidad de Wiscosin (Madison, EE.UU), 1989.
- 55 Matsuo, T.; Sawamura, N.; Hashimoto, Y.; Hashida, W. *U.S. Pat.* 4268527 (1981).
- 56 Eigtved, P.; Hansen, T.T.; Hüge-Jensen, B. Resúmenes del 13<sup>th</sup> *Scandinavian Symposium on Lipids*, Reykjavik, 1985.
- 57 Carpentier, Y.A., *Clin. Nutr.* 1989, 8, 115-125.
- 58 Jensen, G.L.; Mascioli, E.A.; Seidner, D.L.; Istfan, N.W.; Domnitch, A.M.; Selleck, K.; Babbayan, V.K.; Blackburn, G.L. y Bistrrian, B.R., *J. Parent. Ent. Nutr.* 1990, 14, 467-471.
- 59 Croteau, R. en "*Fragrance and Flavour Substances*" (R. Croteau, ed.) Verlag, Alemania, 1980. pág.13.
- 60 Bauer, K.; Garbe, D. y Surburg, H. en "*Common Fragrance and Flavour Materials*" VCH Publishers, New York, 1990.

- 61 Armstrong, D.W.; Gillies, B. y Yamazaki, H. "*Flavour Chemistry: Trends and Developments*." (G. Charalambous, ed.), Elsevier Science Publishers, New York, 1989, pág. 104-120.
- 62 (a) Iwai, M.; Okumura, S. y Tsujisaka, Y., *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 2731.  
(b) Gillies, B.; Yamazaki, H.; y Armstrong, D.W. *Biotechnol. Lett.* **1987**, *9*, 709-714.
- 63 Wong, C.H. y Whitesides, G.M. en "*Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*", Tetrahedron Organic Chemistry Series vol. 12, Baldwin, J.E. y Magnus, P.D. Eds., Elsevier Sci. Pub., Oxford, 1994, pág. 71-108.
- 64 Riva, S. y Klibanov, A.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3291-3295.
- 65 (a) Therisod, M. y Klibanov, A.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3977-3981.  
(b) Chopineau, J.; McCafferty, F.D.; Therisod, M. y Klibanov, A.M. *Biotechnol. Bioeng.* **1988**, *31*, 208-214.
- 66 Holla, E.W. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **1989**, *28*, 220-221.
- 67 Yamada, K. y Hachida, H., *J. Agric. Chem. Soc. Japan* **1962**, *36*, 858.
- 68 Tomizuka, N.; Ota, Y. y Yamada, K., *Agric. Biol. Chem.* **1966**, *30*, 576-584.
- 69 (a) Longhi, S.; Fussetti, F.; Grandori, R.; Lotti, M.; Vanoni, M. y Alberghina, L., *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1131*, 227-232. (b) Lotti, M.; Grandori, R.; Fussetti, F.; Longhi, S.; Brocca, S.; Tramontano, A. y Alberghina, L., *Gene* **1993**, *124*, 45-55.
- 70 Veeraragavan, K. y Gibbs, B.F., *Biotechnol. Lett.* **1989**, *11*, 345-348.
- 71 Kawaguchi, Y. y Honda, H. en "*Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*" (Alberghina, L.; Schmid, R.D.; Verger, R., eds.), VCH Weinheim, Alemania (1991), pág. 221-230.
- 72 Shimada, Y.; Sugihura, A.; Hozumi, T. y Tominaga, Y., *J. Biochem.* **1990**, *107*, 703-707.
- 73 Longhi, S.; Lotti, M.; Fussetti, M.; Pizzi, E.; Tramontano, A. y Alberghina, L., *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1165*, 129-133.
- 74 Patkar, S.A.; Björkling, F.; Zundel, M.; Schulein, M.; Svendsen, A.; Heldt-Hansen, H.P. y Gormsen, E., *Ind. J. Chem.* **1993**, *32B*, 76-80.
- 75 Michiyo, M., W.O. Patent WO88/02775 (1988). *Chem. Abstr.* *110*, 20529.

- 76 (a) Ergan, F. y Trani, M. *Biotechnol. Lett.* 1991, 13, 19-24. (b) Akoh, C.C. *Biotechnol. Lett.* 1993, 15, 949-954.
- 77 (a) Claon, P.A. y Akoh, C.C. *Biotechnol. Lett.* 1993, 15, 1211-1216. (b) Claon, P.A. y Akoh, C.C. *Biotechnol. Lett.* 1994, 16, 235-240. (c) Claon, P.A. y Akoh, C.C. *Enzyme Microb. Technol.* 1994, 16, 835-838. (d) Claon, P.A. y Akoh, C.C. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1994, 71, 575-578.
- 78 (a) Björkling, F.; Godtfredsen, S.E. y Kirk, O. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1989, 934-935. (b) Kirk, O.; Björkling, F.; Godtfredsen, S.E. y Larsen, T.O. *Biocatalysis* 1992, 6, 127-134. (c) Pulido, R.; López-Ortiz, F. y Gotor, V. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* 1992, 2891-2898.
- 79 Moris, F. y Gotor, V. *J. Org. Chem.* 1993, 58, 653-660.
- 80 Bertinotti, A.; Carrea, G.; Ottolina, G. y Riva, S. *Tetrahedron* 1994, 50, 13165-13172.
- 81 "Enzyme Engineering", L.B. Wingard, ed., Interscience Publishers, New York, 1972.
- 82 "Protein immobilization: fundamentals and applications", R.F. Taylor, ed., Marcel Dekker INC, New York, 1991.
- 83 (a) Royer, G.P. y Uy, R., *J. Biol. Chem.* 1973, 248, 2627. (b) Martinek, K.; Goldmacher, V.S.; Klibanov, A.M. y Berezin, I.V., *FEBS Lett.* 1975, 51, 152.
- 84 Martinek, K. y Mozhaev, V.V., *Advances in Enzymology* 1987, 57, 179.
- 85 "Guidelines for the characterization of immobilized biocatalysts", *Enzyme Microb. Technol.* 1983, 5, 304-307.
- 86 Omar, I.C.; Saeki, H.; Nishio, N. y Nagai, S., *Agric. Biol. Chem.* 1988, 52, 1381.
- 87 Karube, I.; Yugeta, Y. y Suzuki, S., *Biotechnol. Bioeng.* 1977, 19, 1493.
- 88 Yokozeki, K.; Yamanaka, S.; Takimani, K.; Hirose, Y.; Tanaka, A.; Sonomoto, K. y Fukui, S. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1982, 14, 1-5.
- 89 Kwon, R.A.; Kim, K.H. y Rhee, J.S., *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 1987, 15, 122.
- 90 Tahoun, M.K., *Food Chem.* 1986, 22, 297.
- 91 Marlot, C.; Langrand, G.; Triantaphylides, C. y Baratti, J., *Biotechnol. Lett.* 1985, 7, 647.

- 92 Hertzberg, S.; Kvittingen, L.; Anthonsen, T. y Skaj-Braek, G., *Enzyme Microbiol. Technol.* **1992**, *14*, 42.
- 93 Hertzberg, S.; Fuskevag, O.M. y Anthosen, T. en "*Biocatalysis in Non-Conventional Media*", J. Tramper et al., eds., Elsevier, Amsterdam, 1992, pág. 337.
- 94 Chang, T.M.S., *Science* **1964**, *146*, 524.
- 95 (a) Asaji, K.; Kitajima, M. y Shizuo, M., *Japanese Pat.* 1943608 (1971). (b) Idem, *Japanese Pat.* 42594 (1971).
- 96 (a) Magee, E.L. y Olson, N.F., *J. Dairy Sci.* **1981**, *64*, 600. (b) Magee, E.L., Lindsay, R.C. y Olson, N.F., *J. Dairy Sci.* **1981**, *64*, 616. (c) Low, B.A., "*Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*", F.L. Davies et al., eds. Elsevier, Amsterdam, 1984, pág. 187. (d) Soda, M.J., *J. Food Protection* **1986**, *49*, 395.
- 97 Taylor, F.; Panzer, C.C.; Craig, J.C. y O'Brien, D.J., *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *29*, 215.
- 98 (a) Pronk, W.; Boswinkel, G. y Van't Riet, *Enzyme Microbiol. Technol.* **1992**, *14*, 214. (b) Pronk, W.; Boswinkel, G. y Van't Riet, *Biocatalysis* **1992**, *5*, 305. (c) Van der Padt, A.; Sewalt, J.J.W.; Agoston, S.M.I. y Van't Riet, *Enzyme Microbiol. Technol.* **1992**, *14*, 805-812.
- 99 Hoq, M.M.; Tagani, H.; Yamane, T y Shimizu, S., *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 335.
- 100 Hartman, F.C. y Wold, F., *Biochemistry* **1967**, *6*, 2439.
- 101 (a) Freddman, R.B., *Trends Biochem. Sci.* **1979**, *4*, 193. (b) Barbaric, S.; Leustek, I.; Paulovic, B.; Cesi, V. y Mildner, P., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988**, *9*, 173.
- 102 Kosugi, Y.; Igusa, H. y Tomizuka, N., *Yukagaku* **1987**, *36*, 67.
- 103 Shaw, J.F.; Chang, R.C.; Wang, F.F. y Wang, Y.J., *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, *35*, 132.
- 104 Gray, C.J.; Narang, J.S. y Barker, S.A. *Enzyme Microbiol. Technol.* **1990**, *12*, 800-807.
- 105 (a) Lieberman, R.B. y Ollis, D.F., *Biotechnol. Bioeng.* **1975**, *17*, 1401. (b) Wisdom, R.A.; Dunnill, P. y Lilly, M.D., *Enzyme Microbiol. Technol.* **1985**, *7*, 567.
- 106 Wisdom, R.A., Dunnill, P.; Macrae, A. y Lilly, M.D., *Enzyme Microbiol. Biotechnol.* **1984**, *6*, 443.

- 107 Malcata, F.X.; Hill, C.G. y Admunson, C.H. *Biotechnol. Bioeng.* 1991, 38, 853-868.
- 108 Wehjte, E.; Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. *Biotechnol. Bioeng.* 1993, 41, 171-178.
- 109 Macrae, A.R. en "*Biocatalysis in Organic Synthesis*", J. Tramper et al. eds., Elsevier, Amsterdam, 1985, pág. 195.
- 110 Yokozeki, K.; Yamanaka, S.; Takimani, K.; Hirose, Y.; Tanaka, A.; Sonomoto, K. y Fukui, S., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1983, 17, 107.
- 111 Cambou, B. y Klibanov, A.M. *Biotechnol. Bioeng.* 1984, 16, 1449.
- 112 (a) Kang, S.T. y Rhee, J.S., *Biotechnol. Lett.* 1988, 10, 341. (b) Kang, S.T. y Rhee, J.S., *Biotechnol. Bioeng.* 1989, 33, 1469.
- 113 (a) Pronk, W.; Kerkhof, P.J.A.M.; Van Helden, C. y Van't Riet, K., *Biotechnol. Bioeng.* 1988, 32, 512. (b) Geluk, M.A.; Norde, W.; Van Kalsbeek, H.K.A.J. y Van't Riet, K., *Enzyme Microbiol. Technol.* 1992, 14, 748.
- 114 Ruckenstein, E. y Wang, X. *Biotechnol. Bioeng.* 1993, 42, 821-828.
- 115 Lavayre, J. y Baratti, J., *Biotechnol. Bioeng.* 1982, 24, 1007.
- 116 Otero, C.; Guisán, J.M. y Ballesteros, A., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1988, 19, 163.
- 117 (a) Brady, C.; Metcalfe, L.; Slaboszewski, D. y Frank, D., *U.S. Patent* 4629742 (1986). (b) Park, J.H. y Lee, Y.-C., *Kor. J. Food Sci. Technol.* 1985, 17, 75.
- 118 Hoq, M.M.; Yamane, T.; Shimizu, S.; Funada, T. y Ishida, S., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1985, 62, 1016.
- 119 Brady, C.; Metclafe, L.; Slaboszewski, D. y Frank, D., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1988, 65, 917.
- 120 Yamane, T.; Funada, T. y Ishida, S., *J. Ferment. Technol.* 1982, 60, 517.
- 121 Jensen, B.H.; Galluzo, D.R. y Jensen, R.G., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1988, 65, 902.
- 122 Posorske, L.H.; Lefebver, G.K.; Miller, C.A.; Hansen, T.T. y Glening, B.L., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1988, 65, 922.
- 123 (a) Neklyudov, A.D.; Shvedov, B.D. y Tsibanov, V.V., *Prikl. Biokhim. Microbiol.* 1981, 17, 510. (b) Aydemir, T. y Telefoncu, A. *Ind. J. Chem.* 1994, 33B, 387-390.

- 124 Kobayashi, T.; Kato, I.; Ohmiya, K. y Shimizu, S., *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 413.
- 125 Ritz, M.A. y Summaria, L.J., *Nature* **1961**, *189*, 576.
- 126 Kroll, J.; Hassanien, F.R.; Glapinska, E. y Franzke, C., *Die Nahrung* **1980**, *24*, 215.
- 127 Kilara, A.; Shanani, K.M. y Wagner, F.W., *Biotechnol. Bioeng.* **1977**, *19*, 1703.
- 128 Weliky, N. y Weetal, H.H., *Immunochemistry* **1965**, *2*, 293.
- 129 Guisán, J.M., *Enzyme Microbiol. Technol.* **1988**, *10*, 373.
- 130 (a) Otero, C.; Guisán, J.M. y Ballesteros, A., *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1988**, *19*, 163. (b) Yamane, T.; Funada, T. e Ishida, S., *J. Ferment. Technol.* **1982**, *60*, 517. (c) Otero, C.; Pastor, E. y Ballesteros, A., *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1990**, *26*, 35.
- 131 Nilsson, K. y Mosbach, K., *Eur. J. Biochem.* **1980**, *112*, 397.
- 132 Hernáiz, M.J.; Rúa, M.; Celda, B.; Medina, P.; Sinisterra, J.V. y Sánchez-Montero, J.M., *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1994**, *44*, 213-229.
- 133 Gornall, A.G.; Bardawill, C.S. y David, M.M., *J. Biol. Chem.* **1949**, *177*, 751.
- 134 Sánchez-Montero, J.M.; Ballesteros, A. y Sinisterra, J.V., *Pat. Española* 8803769 (1988).
- 135 Ballesteros, A.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V., *J. Mol. Catal.* **1986**, *38*, 227.
- 136 Khan, S. y Siddiqui, A.M., *Biotechnol. Bioeng.* **1985**, *27*, 415.
- 137 Aparicio, J. y Sinisterra, J.V., *J. Mol. Catal.* **1993**, *80*, 269.
- 138 Kolthoff, J.M.; Sandell, E.B.; Meehan, E.J. y Bruckenstein, S., "Análisis Químico Cuantitativo", Ed. Nizer SRL, Buenos Aires, Argentina, 1976, págs. 824-830.
- 139 Henley, J.P. y Sadana, A., *Enzyme Microbiol. Technol.* **1985**, *7*, 50.
- 140 Programa SIMFIT (versión 3.2) "A Computer Package for Simulation, Curve-Fitting, Graph-Plotting and Statistical Analysis using Life Science Models". Bardsley, W.G., University of Manchester, U.K.

- 141 (a) Alcántara, A.R.; Ballesteros, A. y Sinisterra, J.V., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1990, 30, 297. (b) Moreno, J.M.; Sánchez-Montero, J.M.; Ballesteros, A. y Sinisterra, J.V., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1991, 31, 43.
- 142 (a) Moreno, J.M.; Sánchez-Montero, J.M.; Sinisterra, J.V. y Nielsen, L.B., *J. Mol. Catal.* 1991, 69, 419. (b) Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V., *J. Mol. Catal.* 1993, 84, 391.
- 143 Moreno, J.M., Tesis Doctoral de la Universidad Complutense de Madrid (1994).
- 145 Branden, C. y Tooze, J. "*Introduction to Protein Structure*", Garland, New York, 1991. (b) Creighton, T.E. 1991.
- 146 Burke, P.A.; Griffin, R.G. y Klibanov, A.M. *Biotechnol. Bioeng.* 1993, 42, 87.
- 147 Affleck, R.; Haynes, C.A. y Clark, D.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 1567-1570.
- 148 Zaks, A. y Klibanov, A.M. *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 3194-3201.
- 149 Fitzpatrick, P.A.; Steinmetz, A.C.V.; Ringe, D. y Klibanov, A.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 8653-8657.
- 150 Dordick, J.S. *Biotechnol. Prog.* 1992, 8, 259-267.
- 151 Gupta, M.N. *Eur. J. Biochem.* 1992, 203, 25-32.
- 152 (a) Tanford, C. *Ad. Protein Chem.* 1968, 23, 121-282. (b) Feeney, R.E. "*Chemical Deterioration of Proteins*" (Whitaker, J.R.; Fujimaki, M. eds.) American Chemical Society, Washington, 1980, pág.1. (c) Ahern, T.J. y Klibanov, A.M. *Science* 1985, 228, 1280-1284.
- 153 Zaks, A. y Klibanov, A.M. *Science* 1984, 224, 1249-1251.
- 154 Laane, C.; Borren, S.; Hilhorst, R. y Veeger, C. "*Biocatalysis in Organic Media*", Laane, C.; Tramper, J. y Lilly, M.D. eds., Elsevier, Amsterdam, 1987, pp. 65-84.
- 155 Schulz, G.E. y Schirmer, R.H. "*Principles of Protein Structure*", Springer-Verlag, New York, 1979.
- 156 (a) Laane, C.; Tramper, J. y Lilly, M.D. "*Biocatalysis in Organic Media*", Elsevier, Amsterdam, 1987. (b) Tramper, J. y Vermue, M.H. "*Biocatalysis in Non-conventional Media*", Elsevier, Amsterdam, 1992.
- 157 Zaks, A. y Klibanov, A.M. *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 2767-2768.

- 158 Margolin, A. y Klibanov, A.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3802-3804.
- 159 Therisod, M. y Klibanov, A.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5638-5640.
- 160 Dordick, J.S. *Enzyme Microbiol. Technol.* **1989**, *11*, 194.
- 161 Kazandjian, R.Z. y Klibanov, A.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5448-5450.
- 162 Halling, P.J. *Enzyme Microbiol. Technol.* **1994**, *16*, 178-206.
- 163 Halling, P.J. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1040*, 225-228.
- 164 Valivety, R.H.; Halling, P.J. y Macrae, A.R. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1118*, 218-222.
- 165 Kvittingen, L.; Sjursnes, B.; Anthosen, T. y Halling, P.J. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2793-2802.
- 166 Norin, M.; Boutelje, J.; Holmberg, E. y Hult, K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**, *28*, 527-530.
- 167 Ross, N.W. y Schneider, H. *Enzyme Microbiol. Technol.* **1991**, *13*, 370-377.
- 168 Yamane, T.; Ichiryu, T.; Nagata, M.; Veno, A. y Shimizu, S. *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, *36*, 1063-1069.
- 169 Sánchez-Montero, J.M.; Hamon, V.; Thomas, D. y Legoy, M.D. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1078*, 345-350.
- 170 Tanaka, T.; Ono, E.; Ishihara, M.; Yamanaka, S. y Takinami, K. *Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45*, 2387-9.
- 171 Kitaguchi, H. y Klibanov, A.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9272-9273.
- 172 Reslow, M., Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. *Biocatalysis* **1992**, *6*, 307-318.
- 173 Reslow, M., Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. *Eur. J. Biochem.* **1988**, *172*, 573-578.
- 174 Kawamoto, T.; Sonomoto, K. y Tanaka, A. *Biocatalysis* **1987**, *1*, 137-145.
- 175 Adlercreutz, P. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *199*, 609-614.
- 176 Valivety, R.H.; Halling, P.J.; Peilow, A.D. y Macrae, A.R. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1122*, 143-146.

- 177 Valivety, R.H.; Halling, P.J.; Peilow, A.D. y Macrae, A.R. *Eur. J. Biochem.* 1994, 222, 461-466.
- 178 Oladepo, D.K.; Halling, P.J. y Larsen, V.F. *Biocatalysis* 1994, 8, 283-287.
- 179 Khan, S.A.; Halling, P.J. y Bell, G. *Enzyme Microbiol. Technol.* 1990, 12, 453-458.
- 180 Goldberg, H.; Parvaresh, F.; Thomas, D. y Legoy, M.D. *Biochim. Biophys. Acta* 1988, 957, 359-362.
- 181 Goderis, H.L.; Ampe, G.; Feyten, M.P., Fouwe, B.L., Guffens, W.M.; Van Cauwenbergh, S.M. y Tobback, P.P. *Biotechnol. Bioeng.* 1987, 30, 258-266.
- 182 Halling, P.J. *Biotechnol. Tech.* 1992, 6, 271-276.
- 183 Dewing, S.N. y Morgan, S.L. "Experimental Design: A Chemometric Approach", Elsevier, Amsterdam, 1987.
- 184 García, T.; Martínez, M. y Aracil, J. *Enzyme Microbiol. Technol.* 1993, 15, 607-611.
- 185 Statgraphics, STSC Inc. 2115 East Jefferson St. Rockville, MD 20852 (1992).
- 186 Mustranta, A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992, 38, 61-66.
- 187 Bòdnar, J.; Gubicza, L. y Szabó, L-P. *J. Mol. Catal.* 1990, 61, 353-61.
- 188 Daniels, C. *Technometrics* 1959, 1, 311-341.
- 189 Heldt-Hansen, H.; Ishii, M.; Patkar, S.A.; Hansen, T.T. y Eigtved, P. en *ACS Sym. Ser.* 1989, 389 (Biocatal. Agric. Biotechnol.), 158-72.
- 190 Mutua, L.N. y Akoh, C.C. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1993, 70, 43.
- 191 Sánchez-Montero, J.M; Thomas, D. y Legoy, M.D. *Biochim. Biophys. Acta* 1991, 1078, 345-50.
- 192 Rao, A.M., Murray, M.A. y John, V.T. en *Biocatalysis* 1991, 4, 253-64.
- 193 (a) Martín, M.T.; Sinisterra, J.V. y Heras, A. *J. Mol. Catal.* 1993, 80, 127. (b) Martín, M.T.; Sinisterra, J.V. y Heras, A. *J. Mol. Catal.* 1994, 89, 397.
- 194 (a) Parker, M.C.; Moore, B.D. y Blacker, A.J. *Biocatalysis* 1994, 10, 269-277. (b) Zaks, A. y Klibanov, A.M. *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 8017-8021.

- 195 De la Casa, R. Tesina de Licenciatura de la Universidad Complutense de Madrid, 1994.
- 196 Testa, B. y Mayer, M. *Prog. Drug Res.* **1988**, *32*, 249-303.
- 197 Ariens, E.J. *Med. Res. Rev.* **1986**, *6*, 451-466.
- 198 Ariens, E.J.; Wuis, E.W. y Veringa, E.J. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 9-18.
- 199 Borman, S. *Chem. Eng. News* **1992**, 15 de junio, pág 5.
- 200 Simonyl, M. *Med. Chem. Rev.* **1984**, *4*, 359.
- 201 Roszowski, A.P.; Rooks, W.H.; Tomolinis, A.J. y Miller, L.M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1971**, *179*, 114-123.
- 202 Adams, S.S., Bresloff, P. y Mason, G.C. *J. Pharm. Pharmacol.* **1976**, *28*, 256-257.
- 203 (a) Geisslinger, G.; Schuster, O.; Stock, K.P.; Loew, D.; Bach, G.L. y Brune, K. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1990**, *38*, 493-497. (b) Lee, E.J.D.; Williams, K.; Day, R.; Graham, G. y Champion, D. *J. Clin. Pharmacol.* **1985**, *19*, 660-674.
- 204 Williams, K.; Day, R.; Knihinicki, R. y Duffield, K. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35*, 3403-3405.
- 205 Hutt, A.J. y Caldwell, J. *J. Pharm. Pharmacol.* **1983**, *35*, 693-704.
- 206 (a) Meyers, A.I.; Knaus, G.; Kamata, K. y Ford, M.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 567. (b) Takaishi, N.; Imai, H.; Bertelo, C.A. y Stille, J.K. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 264. (c) Tsuchiashi, G.; Mitamura, S.; Kitajima, K. y Kobayashi, K. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 5427. (d) Consiglio, G.; Pino, P.; Flowers, L.I. y Pittman, C.U. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 612. (e) Hiyama, T. y Wakasa, N. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 3259.
- 207 Gu, Q.-M.; Chen, C.S. y Sih, C.J. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 1763.
- 208 Battistel, E.; Bianchi, D.; Cesti, P. y Pina, C. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *38*, 659-664.
- 209 Hernáiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10749.
- 210 Moreno, J.M. y Sinisterra, J.V. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1995**, *98*, 171-184.
- 211 Tsai, S.W. y Wei, H.J. *Enzyme Microbiol. Technol.* **1994**, *16*, 328-333.

- 212 Tsai, S.W. y Wei, H.J. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 64-68.
- 213 Berlund, M.; Holmquist, E.; Hedenström, K.; Hult, K. y Högberg, H.E. *Tetrahedron Assym.* **1993**, *4*, 1869.
- 214 de Zoete, M.C.; Kock-van Dalen, A.C.; van Rantwijk, F. y Sheldon, R.A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1831.
- 215 Hedström, G.; Backlund, M. y Slotte, J.P. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *42*, 618-624.
- 216 Sih, C.J.; Gu, Q.-M.; Fulling, G.W.S.H. y Reddy, D.R. *Dev. Ind. Microb.* **1988**, 221-229.
- 217 Chen, C.S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G. y Sih, C.J., *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299.
- 218 Chen, C.S.; Wu, S.H.; Girdaukas, G. y Sih, C.J., *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2812-2817.
- 219 Kazlauskas, R.J.; Weissfloch, A.N.E.; Rappaport, A.T. y Cuccia, L.A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.
- 220 Derewenda, U.; Brzozowski, A.M.; Lawson, D.M. y Derewenda, Z.S. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1532-1541.
- 221 Lawson, D.M.; Brzozowski, A.M.; Rety, S.; Verma, C. y Dodson, G.G. *Prot. Eng.* **1994**, *7*, 543-550.
- 222 (a) Cygler et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180-3186. (b) Grochulski, P. et al. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3494-3500.
- 223 Uppenberg, J. 1994. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 65.
- 224 Gupta, A.K. y Kazlauskas, R.J. *Tetrahedron Assym.* **1993**, *4*, 879-888.
- 225 Ahmed, S.N.; Kazlauskas, R.J.; Morinville, A.H.; Grochulski, P.; Schrag, J.D. y Cygler, M. *Biocatalysis* **1994**, *9*, 209-225.
- 226 (a) Waagen, V.; Hollingsaeter, I.; Partali, V.; Thorstad, O. y Anthosen, T. *Tetrahedron Assym.* **1993**, *4*, 2265-2274. (b) Hansen, T.V.; Waagen, V.; Partali, V.; Anthosen, H.W. y Anthosen, T. *Tetrahedron Assym.* **1995**, *6*, 499-504.
- 227 (a) Öhrner, N.; Martinelle, M.; Mattson, A.; Norin, T. y Hult, K. *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 263-268. (b) Frykman, H.; Öhrner, N.; Norin, T. y Hult, K. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1367-1370. (c) Orrenius, C.; Mattson, A.; Norin, T.; Öhrner, N. y

- Hult, K. *Tetrahedron Assym.* **1994**, *5*, 1663-6. (d) Öhrner, N.; Martinelle, M.; Mattson, A.; Norin, T. y Hult, K. *Biocatalysis* **1994**, *9*, 105-114.
- 228 Quirós, M.; Sánchez, V.M.; Brieva, R.; Rebolledo, R. y Gotor, V. *Tetrahedron Assym.* **1993**, *4*, 1105-1112.
- 229 Whitesides, G.M. y Wong, C.H. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **1985**, *24*, 617-638.
- 230 Jones, J.B. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3351-3403.
- 231 Yamada, H. y Shimizu, S. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **1988**, 622-642.
- 232 Zaks, A. y Klivanov, A.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 3192-3196.
- 233 Lagrand, G.; Baratti, J.; Buono, G. y Triantaphylides, C. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 29-32.
- 234 (a) Faber, K.; Ottolina, G. y Riva, S. *Biocatalysis* **1993**, *8*, 91-132. (b) Carrea, G.; Ottolina, G. y Riva, S. *Trends Biotech.* **1995**, *13*, 63-70.
- 235 (a) Bovara, R.; Carrea, G.; Ferrara, L. y Riva, S. *Tetrahedron Assym.* **1991**, *2*, 931-938. (b) Secundo, F., Riva, S. y Carrea, G. *Tetrahedron Assym.* **1992**, *3*, 267-280. (c) Carrea, G.; Danieli, B.; Palmisano, G.; Riva, S. y Santagostino, M. *Tetrahedron Assym.* **1992**, *3*, 775-778. (d) Baldoli, C.; Maiorana, S.; Carrea, G. y Riva, S. *Tetrahedron Assym.* **1993**, *4*, 767-772.
- 236 Nakamura, K.; Takebe, Y.; Kitayama, T. y Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4941-4944.
- 237 Carrea, G.; Ottolina, G. y Secundo, F. "*Biocatalysis in Non-Conventional Media*" (Tramper, J.; Vermiee, M.H.; Beefink, H.H. y von Stocker, U. Eds.), Elsevier, Amsterdam, **1992**, pág. 111-119.
- 238 Kitaguchi, H.; Itoh, I. y Ono, M. *Chem. Lett.* **1990**, 123-6.
- 239 Högberg, H.-E.; Edlund, H.; Berglund, P. y Hedenström, E. *Tetrahedron Assym.* **1993**, *4*, 2123-26.
- 240 (a) Bovara, R.; Carrea, G.; Ottolina, G. y Riva, S. *Biotechnol. Lett.* **1993**, *15*, 169-174. (b) Terradas, F.; Teston-Henry, M.; Fitzpatrick, P.A. y Klivanov, A.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 390-396. (c) Martins, J.F.; da Ponte, M.N. y Barreiros, S. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *42*, 465. (d) Brieva, R.; Crich, J.Z. y Sih, C.J. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1068-1075.
- 241 Lam, L.K.P.; Hui, R.A.H.F. y Jones, J.B. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2047-50.

- 242 Keinan, E.; Hafeli, E.K.; Seth, K.K. y Lamed, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 162-9.
- 243 Phillips, R.S. *Enzym. Microbiol. Technol.* **1992**, *14*, 417-419.
- 244 (a) Holmberg, E. y Hult, K. *Biotechnol. Lett.* **1991**, *13*, 323. (b) Bornscheuer, U.; Schapder, S.; Scheper, T.; Schugerl, K. *Tetrahedron Assym.* **1991**, *2*, 1011. (c) Gubicza, L. y Szakács-Schmidt, A. *Biocatalysis* **1994**, *9*, 131-143.
- 245 Fullwood, R. y Parker, D. *Tetrahedron Assym.* **1992**, *3*, 25.
- 246 Brooks, C.J. y Gilbert, M.T. *J. Chromatogr.* **1974**, *99*, 541-551.
- 247 (a) Goto, J.; Goto, N. y Nambara, T. *J. Chrom.* **1982**, *239*, 559. (b) Wainer, I.W. y Doyle, T.D. *J. Chrom.* **1984**, *284*, 117. (c) McDaniel, D.M. y Snider, B.G. *J. Chrom.* **1987**, *404*, 123. (d) Bojarski, J. *J. Liq. Chromatogr.* **1989**, *12*, 2685.
- 248 Riddick, J.A.; Bunger, W.B. y Sakano, T.K. "*Organic Solvents: Physical Properties and Methods of Purification*", John Wiley and Sons, New York, 1986.
- 249 Hansch, C. y Leo, A. "*Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*"; Wiley & Sons, New York, 1979.
- 250 Laane, C.; Boeren, S.; Voos, K. y Veeger, C. *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 81-87.
- 251 Kamlet, M.J.; Abboud, J.L.M.; Abraham, M.H. y Taft, R.W. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2877-2887.
- 252 (a) Guinn, R.M.; Skerker, P.S.; Kavanaugh, P. y Clarck, D.S. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *37*, 303-308. (b) Affleck, K.; Haynes, C.A. y Clarck, D.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5167-5170.
- 253 Secundo, F.; Riva, S. y Carrea, G. *Tetrahedron Assym.* **1992**, *3*, 267-280.
- 254 (a) Ottolina, G.; Gianinetti, F.; Riva, S. y Carrea, G. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 535-536. (b) Ottolina, G.; Bovara, R.; Riva, S. y Carrea, G. *Biotechnol. Lett.* **1994**, *16*, 923-928.
- 255 (a) Burker, V. and Allinger, M.L. "*Molecular Mechanics*", ACS monograph 177, Am. Chem. Soc., Washington, D.C. 1982. (b) Clark, T. "*A Handbook of Computational Chemistry : A practical guide to Chemical Structure and Energy Calculations*", Wiley Eds. New York, 1985. (c) Gilbert, K.E. and Gajewski, J.P.; Indiana University, Serena Software, MMX version 88.5 (1988). (d) Stelieu, K. University of Montreal; Serena Software, MMX version 88.5 (1988).