



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas

**“Estudio del biocatalizador de CALB en TiO_2
en la esterificación enantioselectiva de
ibuprofeno”**

Tesina de grado

Fittipaldi, Antonela Soledad

Director:Dr. Llerena Suster, Carlos R.

Año:2016

Agradecimientos

Quiero agradecer al CiProVe por ofrecerme los recursos necesarios y la oportunidad de realizar este trabajo en un ambiente tan agradable, gracias a todos los integrantes de este grupo que siempre me brindaron su ayuda ante cada inquietud que se me presentaba. Especialmente debo mencionar a mi director, Carlos Llerena Suster, que me acompañó y me enseñó todo lo necesario para dar este último paso de la carrera de grado, agradezco su paciencia y su gran generosidad. Este trabajo no hubiera sido posible sin la buena predisposición que encontré en todos ellos.

Por otro lado, no puedo dejar de mencionar en los agradecimientos a toda mi familia que me apoyaron desde un comienzo y se alegraron conmigo por cada logro, principalmente a mi papá Darío y mis hermanas, Tatiana y Lara. Son fundamentales para mí.

Y por último mi otro gran sostén son mis amistades, las de siempre, las que me encontré en esta ciudad y las que me regaló la facultad, mis compañeros del comienzo y los del final, que entre tardes de estudio, mucho mate y nervios pre-exámenes se fueron fortaleciendo e hicieron este camino más fácil. Son otro gran premio que me llevo de mi paso por la UNLP.

A todos ellos un sincero GRACIAS de corazón.

ÍNDICE

1. OBJETIVOS	9
1.1. Objetivo general	9
1.2. Objetivos específicos	9
2. INTRODUCCIÓN	10
2.1. Química verde	10
2.2. Biocatálisis	12
2.3. Uso de enzimas en biocatálisis	13
2.3.1. Lipasas	15
2.3.1.1. Reacciones catalizadas por lipasas	16
2.3.1.2. Lipasa B de Candida antarctica, CALB	17
2.3.1.2.1. Estructura	19
2.3.2. Inmovilización de enzimas	22
2.3.2.1. Inmovilización por adsorción	24
2.3.2.2. Características del TiO ₂	27
2.4. Ingeniería de medios	28
2.5. Ibuprofeno	29
2.5.1. Efectos adversos	30
2.5.2. Resolución racémica	30
2.5.3. Esterificación enantioselectiva de (R/S)-ibuprofeno	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1. Materiales	34
3.2. Preparación de los biocatalizadores	35
3.2.1. Biocatalizadores a partir de un extracto crudo enzimático	35
3.2.2. Biocatalizador a partir de CALB pura	38
3.2.2.1. Purificación de CALB mediante cromatografía de exclusión molecular	38
3.2.2.2. Inmovilización de CALB pura	39
3.2.3. Cuantificación de proteínas	40
3.2.3.1. Curva de calibración	40

3.2.3.2. Determinación de las proteínas adsorbidas y la isoterma de adsorción	41
3.2.4. Análisis mediante electroforesis desnaturalizante	41
3.2.4.1. Preparación de los geles.....	42
3.2.4.2. Preparación de las muestras	43
3.2.4.3. Desarrollo de la electroforesis	43
3.3. Estudio de los biocatalizadores	45
3.3.1. Análisis cuantitativo por microsonda de electrones	46
3.3.2. Estudio de la actividad biocatalítica	46
3.3.2.1. Determinación de la actividad acuosa	48
3.3.2.2. Determinación de porcentaje de conversión.....	49
3.3.2.3. Medida de enantioselectividad.....	49
3.3.3. Medidas estabilidad de los biocatalizadores	50
3.3.3.1. Determinación de la actividad enzimática	51
3.3.3.2. Obtención de los espectros UV- visible.....	51
4. RESULTADOS y DISCUSIÓN	53
4.1. Preparación de los biocatalizadores	53
4.1.1. Cromatografía de exclusión molecular	53
4.1.2. Cuantificación de proteínas.....	55
4.1.2.1. Curva de calibración	55
4.1.2.2. Proteínas adsorbidas.....	56
4.1.3. Electroforesis desnaturalizante.....	60
4.2. Estudio de los biocatalizadores	61
4.2.1. Análisis cuantitativo por microsonda de electrones	61
4.2.2. Estudio de la actividad biocatalítica	63
4.2.2.1. Presencia de cosolvente.....	64
4.2.2.2. Proteínas adsorbidas	64
4.2.2.3. Efecto Sorbitol-Glicerol	66
4.2.2.4. Efecto de la actividad acuosa, a_w	68
4.2.3. Medidas de estabilidad de los biocatalizadores	71
4.2.3.1. Medida de actividad catalítica	72

4.2.3.2. Espectros UV-Visible	74
5. CONCLUSIONES	78
6. BIBLIOGRAFÍA.....	81

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

El siguiente trabajo aborda el estudio de biocatalizadores basados en la inmovilización de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) sobre TiO_2 .

1.2. Objetivos específicos

- Preparar biocatalizadores mediante inmovilización por adsorción de la enzima CALB sobre nanopartículas de TiO_2 .
- Optimizar las condiciones de inmovilización.
- Analizar el efecto del agregado de promotores de la actividad sorbitol y glicerol durante la preparación.
- Estudiar la estabilidad de los biocatalizadores preparados en distintos medios de reacción.
- Estudiar el efecto de la actividad acuosa sobre la actividad catalítica.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Química verde

El término de química verde se refiere a la invención, el diseño y la aplicación de productos y procesos químicos para la eliminación o reducción del uso y generación de sustancias peligrosas (contaminantes)¹

Los términos invención y diseño promueven a un activo involucramiento de la comunidad científica en pensar nuevos productos y procesos. La limitación del uso y generación de sustancias peligrosas, no sólo condiciona a que las sustancias producidas (productos y residuos) no contaminen sino también a que todas las sustancias usadas (reactivos, solventes) sean inocuas².

Los Principios de la química verde se indican en la **Tabla 1**.

La incorporación de procesos biocatalizados en la industria involucra varios de los principios de la Química Verde, especialmente la catálisis, la eficiencia energética y la menor derivatización. Por otra parte, se pueden combinar pasos biocatalizados con pasos químicos en la síntesis de un compuesto químico determinado.

El desarrollo de la química verde está en expansión aunque falta mucho para llegar a los niveles necesarios para reducir la contaminación. Una de las principales fallas está en la incorporación de estas nuevas tecnologías a la industria².

1. Prevención	Es mejor prevenir la generación de desperdicios que tratarlos o eliminarlos luego de haber sido creados.
2. Economía atómica	Los métodos sintéticos deben diseñarse para maximizar la incorporación en el producto final de todos los materiales empleados durante su procesamiento.
3. Síntesis química menos peligrosa	Siempre que sea posible, los métodos sintéticos deben diseñarse para usar y generar sustancias que posean poca o ninguna toxicidad para la salud humana o ambiental.
4. Diseño de sustancias más seguras.	Los productos químicos deben diseñarse a los efectos de su función deseada reduciendo su toxicidad.
5. Solventes y sustancias auxiliares más seguras.	El uso de sustancias auxiliares (solventes, agentes de separación, etc.) debería ser innecesario siempre que sea posible, e inocuos cuando se empleen.
6. Diseño para la eficiencia energética	Los requerimientos energéticos de los procesos químicos deberían reconocerse por su impacto ambiental y económico y deben ser minimizados. Si fuera posible, los métodos sintéticos deberían llevarse a cabo a temperatura ambiente y presión atmosférica.
7. Uso de materiales renovables	Deben emplearse materias primas u otros materiales renovables, siempre que sea técnica y económicamente practicable.
8. Reducción de la derivatización	La derivatización innecesaria (uso de agentes bloqueantes, protección/desprotección de grupos, modificación temporaria de procesos físicos y químicos) debe reducirse o evitarse de ser posible, ya que estos pasos requieren de reactivos adicionales que pueden generar desperdicios
9. Catálisis	Los reactivos catalíticos (lo más selectivos posible) son superiores a los reactivos estequiométricos.
10. Diseño para la degradación	Los productos químicos deben diseñarse de tal forma que al fin de su vida útil se descompongan en productos de degradación inocuos y no persistan en el ambiente
11. Análisis en tiempo real para la prevención de la polución	Las metodologías analíticas necesitan desarrollarse aún más para permitir un monitoreo y control en tiempo real y durante el proceso antes de la formación de sustancias peligrosas.
12. Química segura para la prevención de accidentes.	Las sustancias y la forma de una sustancia empleada en un proceso químico deben elegirse para minimizar el potencial de accidentes químicos, incluyendo escapes, explosiones e incendios.

Tabla 1. Principios de la química verde¹

2.2. Biocatálisis

La biocatálisis se puede definir como la disciplina que involucra el uso de biocatalizadores en la transformación química de la materia³. La biocatálisis aprovecha el poder catalítico de las enzimas que naturalmente cumplen funciones vitales en los seres vivos para la obtención de distintos productos orgánicos. Las enzimas son el núcleo de los procesos biocatalíticos.

Los biocatalizadores pueden ser un extracto enzimático más o menos purificado o todo el ámbito natural de las enzimas: células, tejidos u órganos. Son también, biocatalizadores, estos componentes unidos, mediante distintas interacciones, a una gran diversidad de soportes.

Los beneficios del uso de biocatalizadores, comparado con los métodos de síntesis química, se conocen ampliamente y se describirán a lo largo de este capítulo. La biocatálisis tiene especial importancia cuando las sustancias producidas mediante estos procesos no se pueden obtener de otra manera o cuando muestran ventajas económicas y/o ambientales con respecto a métodos de producción exclusivamente químicos⁴. Dado que permite evitar las variadas fuentes contaminantes que podemos encontrar en una reacción estequiométrica química tradicional como el exceso de reactivos, solventes contaminantes, altas temperaturas y presiones, residuos en abundancia, mezclas racémicas, entre otros. En ese sentido, la biocatálisis permite cumplir con los principios 1, 6, 8, 9, y 12 de la química verde¹ Error! Marcador no definido. Error! Marcador no definido., enumerados en la **tabla 1**.

Se emplea la biocatálisis en la creación de nuevas rutas que disminuyan el uso de reactivos costosos, en la obtención de moléculas genéricas y/o complejas⁵ necesarias en la producción de reactivos químicos, de intermediarios farmacéuticos y agroquímicos, principios activos farmacéuticos e ingredientes alimentarios⁶. Por otro lado, surgieron nuevas oportunidades para la biocatálisis debido a nuevos requerimientos industriales como la limitada vigencia de las patentes de los fármacos, la rápida elaboración de procesos para compensar los altos costos de desarrollo que deben afrontar las empresas farmacéuticas y la promoción de soluciones ecológicas que dejen rastros mínimos en el medio ambiente^{7,8}.

Se han empleado biocatalizadores en procesos tan diversos como en la producción de compuestos quirales para obtener una droga enantioméricamente pura, en la síntesis de polímeros, de péptidos, de antibióticos como la amoxicilina⁷, de edulcorantes como el aspartamo⁹, de ciclodextrinas; en biorremediación y la lista se sigue ampliando a diario¹⁰.

2.3. Uso de enzimas en biocatálisis

Naturalmente las enzimas se pueden encontrar tanto en el interior de las células como en espacios extracelulares, pueden estar en gran abundancia o en cantidades mínimas, pueden estar asociadas a ciertas organelas o membranas, o formando complejos enzimáticos o estar libres, pueden estar como proenzimas o pueden necesitar cofactores. Según el caso se tendrá que encontrar métodos adecuados para poder extraerlas, acondicionarlas y usarlas en biocatálisis².

Es importante conocer el grado de pureza necesario para utilizar una enzima en un proceso biocatalítico, esto permite ahorrar pasos de purificación (costosos y difíciles de escalar) usando, si es posible, extractos crudos con un mínimo aislamiento. En algunos casos, incluso, estos componentes del extracto crudo que acompañan a las enzimas pueden servir como una matriz protectora ante efectos adversos durante la inmovilización, exposición a solventes orgánicos, etc.¹¹

El medio de reacción controlado (sustratos, medio, temperatura, etc.) donde se utilizan los biocatalizadores puede permitir que, transformen y produzcan sustancias distintas a las naturales, incluso para que actúen usando otros mecanismos catalíticos, ampliando de esa manera su rango de acción².

Algunas ventajas del uso de enzimas en biocatálisis son:

- Poseen altas velocidades de reacción.
- Son selectivas, poseen altas enantio y regioselectividades, cualidades muy valiosas para la producción de compuestos bioactivos, permite la reducción de los pasos de una síntesis orgánica y la disminución en la producción de desechos, entre otras ventajas^{1,12}.
- Se puede regular su actividad.
- Operan bajo condiciones suaves de reacción por lo que genera un gasto menor de energía, es conveniente en el diseño del reactor y es una cualidad importante cuando los productos de síntesis son lábiles.
- Tienen una alta eficiencia por masa de biocatalizador.
- Se inmovilizan fácilmente de formas variadas permitiendo su versatilidad y reutilización.
- Se pueden utilizar varias enzimas en combinación para realizar transformaciones.

- Las enzimas pueden catalizar reacciones asimétricas muy complejas que son extremadamente difíciles de realizar por síntesis química

Por otra parte también suelen aparecer algunos inconvenientes como:

- La inestabilidad de las enzimas, se degradan en condiciones relativamente suaves, por lo que exigen un manejo más delicado que otro tipo de catalizadores.

- El precio elevado de las enzimas.

- Pueden necesitar cofactores, lo cual implica un encarecimiento del proceso biocatalizado.

- La especificidad respecto a sustrato, esto solo permite un rango de acción acotado.

- Es necesario un paso de extracción y purificación (parcial o completa) que puede encarecer el proceso y ocasionar la pérdida de parte de la actividad original.

Con el objetivo de utilizar los biocatalizadores en procesos industriales a gran escala se han invertido grandes esfuerzos para solucionar estos problemas y se han logrado desarrollar técnicas que mejoran la estabilidad de las enzimas y que facilitan su recuperación y reutilización. Los avances de la biología molecular han permitido la manipulación del material genético, el aislamiento de genes y su expresión con el fin de obtener determinadas proteínas en grandes cantidades, esto provocó la disminución del precio de las enzimas⁴. Además pueden ser modificadas estructuralmente mediante mutagénesis sitio-dirigida y evolución dirigida¹³, para modificar la especificidad, para adquirir nuevas funcionalidades y otras características de las enzimas de manera de optimizar su performance en la reacción de interés.

A pesar de sus limitaciones, las enzimas son catalizadores muy atractivos para síntesis orgánica y se consideran herramientas importantes para el desarrollo de la química verde debido a sus ventajas.

2.3.1. Lipasas

Las lipasas o glicerol esterhidrolasas son un grupo de enzimas que actúan como catalizadores en la hidrólisis reversible de triglicéridos de grasas animales y aceites vegetales (catabolismo de grasas y aceites) para obtener como producto final glicerol y ácidos grasos libres (**Figura 1**) o productos intermediarios como mono y diglicéridos. Naturalmente actúan en la interfase orgánica-acuosa.¹⁴

Según la nomenclatura de IUBMB se clasifican en: Hidrolasas. Esterasas. Triacilglicerol lipasas (EC 3.1.1.3)¹⁵.

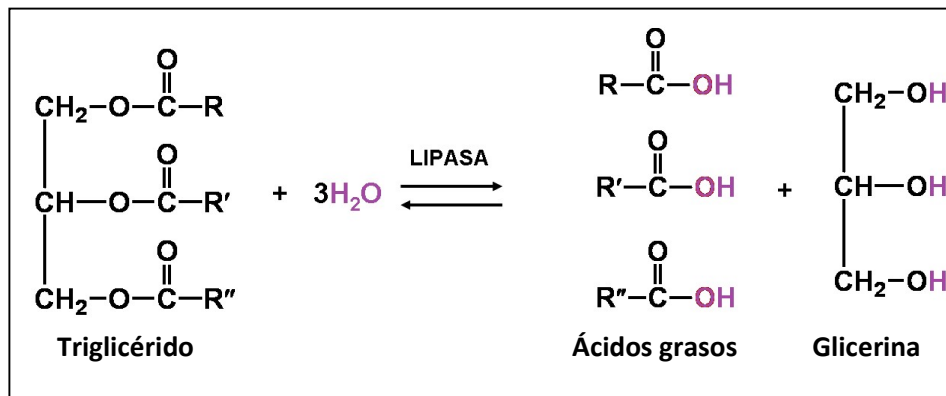


Figura 1. Reacción de hidrólisis de triglicéridos catalizada por las lipasas en su función biológica

Todas las lipasas aceptan ésteres de longitud de cadena mediana (de 4 átomos de carbono, C4) a larga (C16), algunas son incluso capaces de hidrolizar ésteres de ácidos grasos muy largos (C22). La especificidad de sustrato (referida a la especie dadora del grupo acilo) está determinada por la forma del centro activo que impone las preferencias en el tamaño de cadena que acepta cada lipasa¹⁶. Los triglicéridos suelen ser moléculas grandes que deben encajar en la cavidad del centro activo para que puedan ser hidrolizados correctamente.

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, han sido aisladas de microorganismos, plantas y animales¹⁷. En el campo de la biocatálisis se han enfocado principalmente sobre las de origen microbiano debido a su gran accesibilidad y a que su producción pudo manipularse gracias a la ingeniería genética actual¹⁸. Pueden encontrarse 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^{19,20}.

Las lipasas muestran diferentes tipos de especificidad²¹ pueden ser específicas para un determinado lípido, para una determinada posición en un triglicérido (1,3-específicas o 2-específicas), o para un determinado ácido graso del triglicérido.

Las razones del enorme potencial biotecnológico de las lipasas son su gran estabilidad en disolventes orgánicos, no requieren cofactores, tienen una amplia especificidad de sustrato y presentan una elevada enantioselectividad²².

Actualmente el estudio de las lipasas está orientado al desarrollo de aplicaciones de química fina de interés fundamentalmente farmacéutico y básicamente en la resolución de compuestos enantioméricos ya que en las normativas de legislación se tiende a exigir productos ópticamente puros en lugar de mezclas racémicas. Por otro lado, otra aplicación interesante en estudio, es el tratamiento de residuos incluyendo la destrucción, prevención o limpieza de sólidos, películas y efluentes con un alto contenido en grasas²³.

2.3.1.1. Reacciones catalizadas por lipasas

Como se mencionó anteriormente estas enzimas catalizan naturalmente la hidrólisis de triglicéridos, es decir la hidrólisis del enlace éster. Sin embargo, aunque son muy específicas en cuanto al enlace químico sobre el cual actúan también catalizan otras reacciones no necesariamente lipolíticas, lo que hace que esta clase de enzimas tenga una amplia utilización en diversas reacciones. La **Figura 2** presenta las reacciones catalizadas por las lipasas¹⁴⁴.

La concentración de agua en el medio puede determinar si la reacción se desplaza hacia la síntesis o hidrólisis del enlace éster. Esta capacidad de catalizar la reacción inversa proporciona aplicaciones muy interesantes ya que permite la síntesis de ésteres, la transesterificación y la interesterificación²⁴.

La *transesterificación* se define como una reacción de síntesis en la cual el sustrato donante del grupo acilo es un éster y se distinguen dos tipos de transesterificación según la especie aceptora del grupo acilo sea el glicerol (glicerólisis) o un alcohol (alcohólisis).

La *interesterificación* es un proceso en el cual se intercambia la composición de ácidos grasos entre un éster y un ácido graso (acidólisis) o entre dos ésteres.

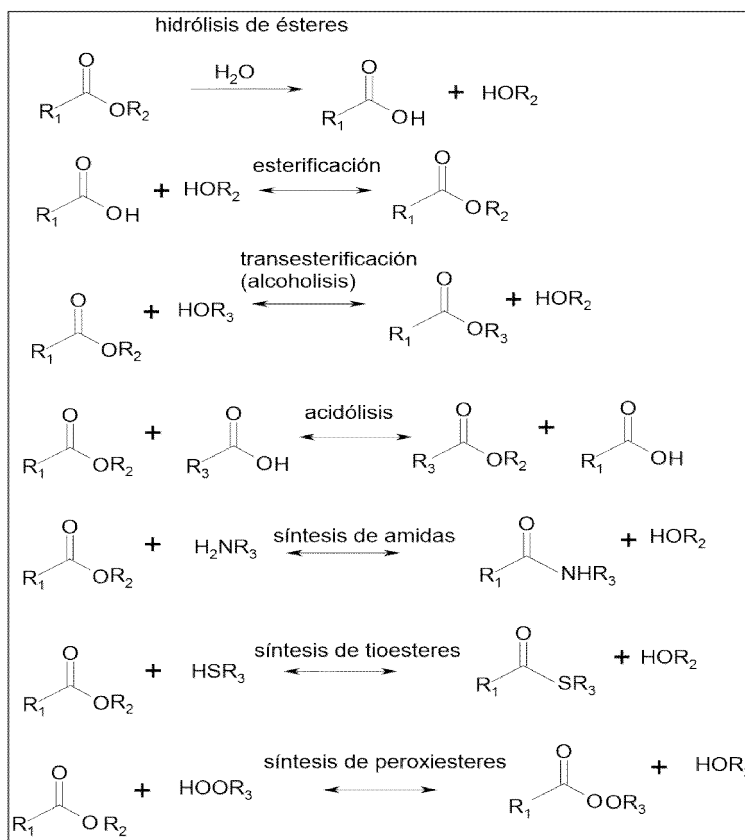


Figura 2. Reacciones catalizadas por las lipasas.

2.3.1.2. Lipasa B de *Candida antarctica*, CALB

Las lipasas más conocidas, estudiadas y aplicadas, sin duda, son las de levaduras (*Candidasp*)². La lipasa producida por la *Candida antarctica* (CAL) es la más versátil de todas las lipasas que se utilizan en biotransformaciones preparativas. La *Cándida antártica* es una levadura basidiomiceto que, fue aislada en la Antártida en la búsqueda de enzimas capaces de operar en condiciones extremas para poder usarlas en formulaciones de detergentes²⁵. Esta levadura produce dos isoenzimas de la CAL, A y B. La CALB es menos termoestable (aunque lo es mucho más que la mayoría de las lipasas) y no depende de cationes metálicos²⁶.

CALB presenta especificidad más bien amplia hacia el sustrato donador de acilo y presenta un alto grado de selectividad hacia el sustrato alcohol²⁷. Es menos activa frente a triglicéridos grandes pero resulta muy activa sobre un rango muy amplio de ésteres no naturales (ésteres simples, amidas y tioles)²⁶. Ha demostrado ser altamente esteroespecífica tanto en hidrólisis como en síntesis orgánica²⁸.

La CALB es una de las lipasas más comúnmente usadas como biocatalizador en un rango muy amplio de aplicaciones. De hecho, se comercializan distintos biocatalizadores comerciales como Novozym 435 (Novo Nordisk) o Chyrazyme (Roche Molecular Biochemicals).

Algunas características de esta enzima se mencionan en la **tabla 2**.

Es una proteína excepcionalmente robusta cuando se encuentra en agua, se desactiva a 50-60 °C (en forma inmovilizada el límite operacional aumenta a 60-80 °C) y también muestra una resistencia elevada a la desnaturalización por adición de disolventes orgánicos²⁹. En literatura se reporta que CALB ha sido empleada a temperaturas de 150 °C³⁰ y en disolventes orgánicos de alta polaridad como acetonitrilo y dimetilsulfóxido y en fluidos supercríticos³¹.

CAL B	
Peso molecular (kD)	33
Punto isoeléctrico (PI)	6.0
pH óptimo	7
Actividad específica (LU/mg)	435
Termoestabilidad a 70 °C ^a20 min	15
.....120 min	0
pH estabilidad ^b	7-10
Activación interfacial	No
Especificidad posicional hacia triglicéridos	<i>Sn</i> -3

LU: Actividad lipásica en tributirina

^a actividad residual luego de incubación a 70 °C en buffer 0,1M Tris (pH = 7) durante 20 m y 120 m.

^b pH al cual más del 75% de la actividad es retenida durante incubación por 20 h a temperatura ambiente.

Tabla 2. Características de CAL B²⁵

2.3.1.2.1. Estructura

El sitio activo de esta enzima es accesible al solvente externo mediante un estrecho canal de paredes muy hidrofóbicas, sin embargo en la vecindad de la serina catalítica, en el fondo del canal, se encuentran tres aminoácidos hidrofílicos que pueden generar una red de puentes de hidrogeno accesibles al solvente. Según Uppenberg y colaboradores esto impone restricciones sobre la orientación de sustratos lipídicos anfílicos en el sitio activo²⁶. Estas características solo permiten la interacción en el sitio activo de triglicéridos de pequeño tamaño. Los factores más importantes determinantes de la selectividad por el sustrato son la restricción física, la naturaleza hidrofóbica del bolsillo del sitio activo y el mecanismo de estabilización del intermediario tetraédrico. CALB, en comparación con otras lipasas, tiene menos espacio en el bolsillo del sitio activo²⁷. En la lipasa de

Candida rugosa, por ejemplo, el túnel está en las inmediaciones del centro activo y es capaz de albergar una cadena de, al menos, doce átomos de carbono¹⁶.

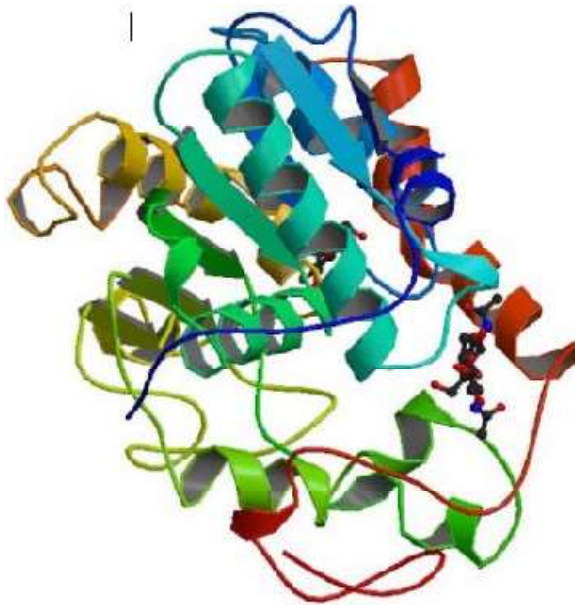


Figura 3. Estructura tridimensional de CALB (1TCB del PDB)²⁶

En el caso de la lipasa B de *Candida antarctica* estudios por difracción de Rayos X han demostrado que el bolsillo del sitio activo está compuesto por dos canales, uno de ellos aloja al grupo acilo y el otro al grupo alcohol de la molécula de sustrato (éster) como puede verse en la **Figura 4**³².

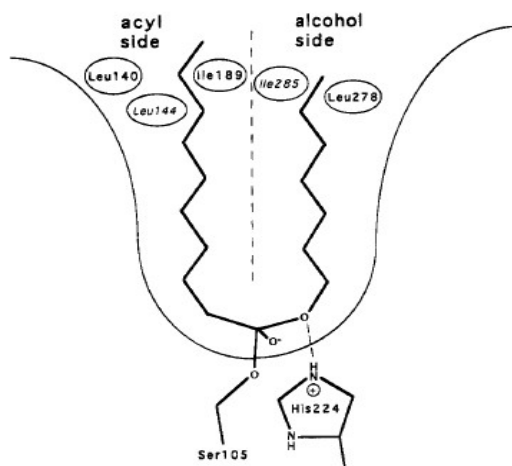


Figura 4. Esquema del sitio activo de CALB formado por dos canales paralelos²⁸.

En contraste con muchas otras lipasas esta enzima parece ser bastante rígida y no muestra un efecto de activación interfacial lo que la convierte en una especie intermedia entre una esterasa y una lipasa típica²⁶. El fenómeno de activación interfacial hace referencia a que al entrar en contacto con la interfase lípido/agua ocurre un cambio conformacional descubriendo al sitio activo (reordenamiento del bucle que recubre el sitio activo)³³. Su secuencia de aminoácidos no posee homología significativa con las secuencias de otras lipasas. El mecanismo de acción de la CALB es un típico serin-proteasas que se detalla el esquema en la **Figura 5**³⁴.

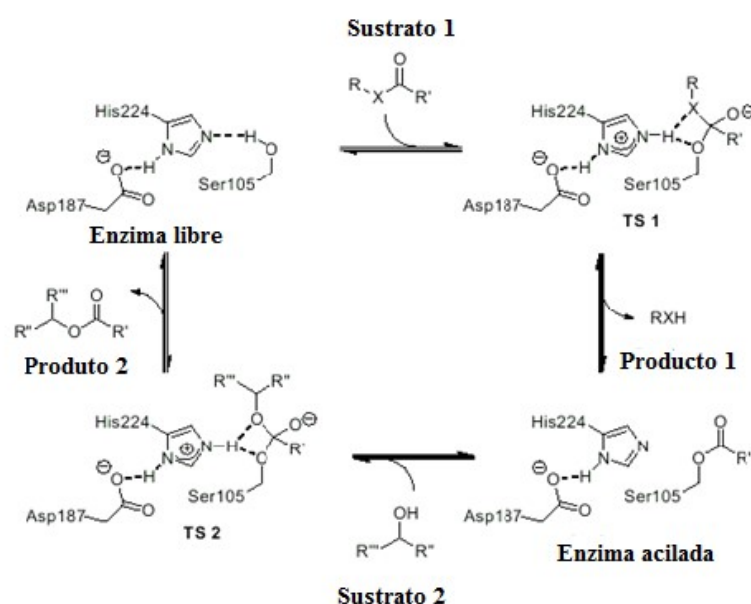


Figura 5. Mecanismo de acción de la CALB. En el primer paso la enzima es acetilada por el donador de acilo (sustrato 1), formando un intermediario sustrato 1-enzima (TS1), luego se genera el producto 1, causando la formación del complejo acetil-enzima. Posteriormente en el segundo paso la enzima acetilada es desacetilada a causa de un reactivo nucleófilo, en este caso el alcohol (sustrato 2), formando el respectivo éster como segundo producto, dejando la enzima libre para actuar nuevamente.

2.3.2. Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas se define como aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. puede ser por unión a un material inerte o no³⁵. La inmovilización de enzimas permite un uso más eficaz del catalizador (catálisis enzimática en fase heterogénea), dado que la estructura proteica de la enzima se estabiliza y se posibilita el desarrollo de procesos continuos con las numerosas ventajas operacionales asociadas, de esta manera, el proceso biotecnológico se vuelve económicamente rentable³⁶. Esta técnica permite usar las enzimas en condiciones de altas temperaturas y mayores rangos de pH, como se mencionó en la sección **2.3.1.2**, para el caso de la CALB. Este procedimiento protege a las enzimas de la desnaturalización y previene la aglomeración aumentando el área efectiva disponible para la catálisis en reacciones en las que se utilizan medios orgánicos³⁷. Además facilita la reutilización del biocatalizador, la separación de la enzima y los productos del medio de reacción y disminuye las limitaciones en la transferencia de masa³⁸.

En la **Tabla 3** se muestran las ventajas y desventajas comparativas de la utilización de enzimas inmovilizadas y de las enzimas libres.

La inmovilización de enzimas se debe realizar mediante el método más adecuado según la finalidad del biocatalizador. Los diversos métodos de inmovilización se pueden clasificar en función de la presencia o ausencia de soporte, de las características del mismo, del tipo de unión implicado en la inmovilización, etc. En las **Figuras 6y 7** se muestran los métodos de inmovilización clasificados según la unión química o física de las enzimas al soporte o entre sí (como en el caso de inmovilización por reticulado).

ENZIMA SOLUBLE		ENZIMA INMOVILIZADA	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ■ Menor costo ■ Utilizable en caso de sustrato con alto peso molecular ■ No existen pérdidas de actividad (mayor actividad específica) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Gran cantidad de enzima remanente en el producto luego de finalizada la reacción ■ No es posible la reutilización de la enzima ■ La reacción podría estar limitada por inhibición por producto ■ Dificultad de un control preciso ■ Es necesario detener la reacción enzimática (calor, cambio en el pH), lo cual puede afectar al producto 	<ul style="list-style-type: none"> ■ La enzima es reutilizable ■ La reacción puede terminarse separando la enzima del sustrato ■ El control es más preciso ■ Menor impacto de la inhibición por producto ■ Mayor estabilidad a condiciones de temperatura y pH ■ Puede usarse en forma batch o continua ■ Existe una gran flexibilidad en el diseño de reactores 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Pérdida de capacidad catalítica durante el proceso de inmovilización ■ Presencia de restricciones difusionales o estéricas ■ Inactivación con una operación continua ■ Mayor costo, debido al soporte y proceso de inmovilización ■ Necesita control del estado sanitario durante el proceso

Tabla 3. Ventajas y desventajas del empleo de enzimas inmovilizadas. Comparación con las enzimas libres³⁹.

Algunos de los métodos de inmovilización enzimática utilizados carecen de un soporte, entre ellos se encuentran la formación de cristales enzimáticos entrecruzados (CLECs) y agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs), la unión de las enzimas a polietilenglicol (PEG) o similares y la liofilización de la enzima junto a distintos co-liofilizadores como éteres corona, surfactantes, etc.

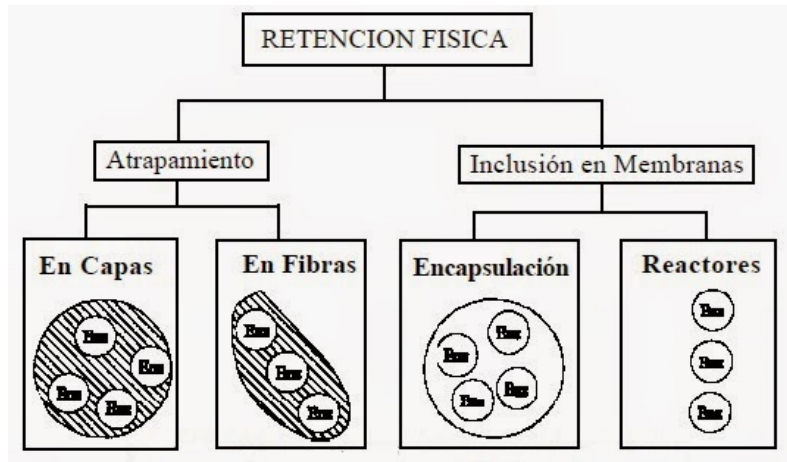


Figura 6. Métodos generales de inmovilización de enzimas mediante retención física de la enzima.

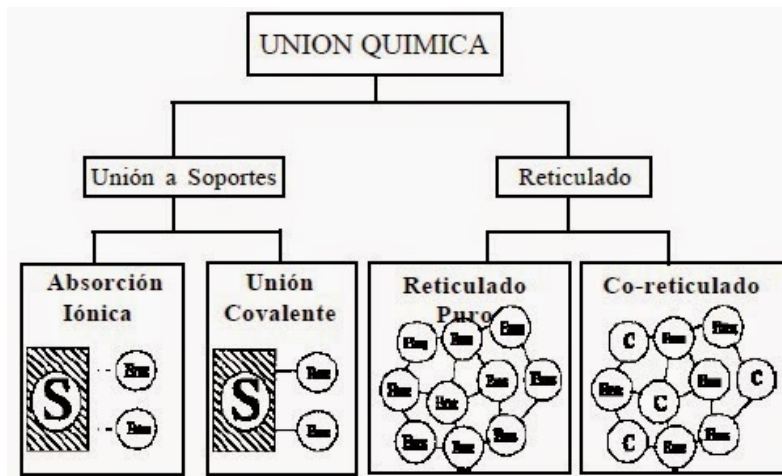


Figura 7. Métodos generales de inmovilización de enzimas por unión química a la enzima³⁵

2.3.2.1. Inmovilización por adsorción

En esta técnica la enzima se une al soporte a través de interacciones iónicas y otras uniones débiles como puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals, es un procedimiento suave

y en general no afecta la actividad enzimática⁴⁰, se generan interacciones muy similares a las que se establecen en membranas biológicas.

Los principales factores que influyen en la adsorción son¹⁴:

-pH del medio: controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y el sólido.

-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.

-Diámetro de poro: debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima, se debe tener en cuenta cuando se trabaja con soportes porosos, no es el caso de las nanopartículas de TiO₂.

-Presencia de iones que actúen como cofactores.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ■ Sencillez ■ Bajo costo ■ Cambios conformacionales despreciables de la enzima ■ No hay cambios de especificidad enzimática ■ Derivados estables en medios con bajo contenido de agua 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Optimización de las variables que controlan la adsorción ■ Derivados poco estables desde el punto de vista mecánico ■ La reversibilidad del proceso (desorción)

Tabla 4. Ventajas y desventajas de la inmovilización por adsorción.

El principal inconveniente del método (**Tabla 4**) es la reversibilidad del proceso de adsorción dado que los cambios en las condiciones de operación como el pH y la temperatura pueden provocar el desplazamiento de la enzima hacia la fase soluble. Cuando se trabaja con solventes no polares no existe dicha reversibilidad⁴¹ y por lo tanto es aconsejable el uso de este método de inmovilización.

Existe una amplia variedad de soportes de distintos materiales empleados en la técnica de adsorción que difieren en tamaño, porosidad, densidad y forma aunque generalmente se

encuentran como esferas también existen en forma de cilindros, hojas y fibras. Se ha estudiado la inmovilización por adsorción sobre soportes sólidos tales como poliamida, celite, vidrio poroso, sílica, titania, zeolitas, polipropileno o alúmina. En estos casos, el grado de activación enzimática y estabilización depende estrictamente de la naturaleza de la matriz sólida⁴².

Soportes inorgánicos		Soportes orgánicos	
Naturales	Manufacturados	Polímeros naturales	Polímeros sintéticos
<ul style="list-style-type: none"> ■ Bentonita ■ Piedra pómez ■ Sílice, etc 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Óxido de metales ■ Vidrios porosos ■ Vidrios no porosos ■ Alúmina ■ Cerámicas ■ Gel de sílice, etc. 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agaragar, agarosa, alginatos, quitina, quitosano, etc.) ■ Proteínas fibrosas (colágeno, queratinas, etc.) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Poliolefinas (poliestireno) ■ Polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamida, polimetacrilatos, etc.) ■ Otros (alcohol polivinílico, poliamidas, etc.)

Tabla 5. Tipos de soportes utilizados en los procesos de inmovilización.

En la **Tabla 5** se agrupan algunos de los diferentes soporte utilizados para el proceso de inmovilización, al elegir uno de ellos se deben tener en cuenta las diferentes propiedades de los soportes disponibles, como la relación superficie/volumen, la capacidad de unión de proteínas, la compatibilidad e insolubilidad en el medio de reacción, la estabilidad mecánica y química, la posibilidad de recuperación luego de su uso y la flexibilidad conformacional.

2.3.2.2. Características del TiO₂

Entre los posibles soportes propuestos figuran los óxidos inorgánicos. Este tipo de soportes tienen un bajo costo y alta disponibilidad, con ellos se pueden inmovilizar enzimas mediante métodos muy sencillos, poseen una gran área superficial y una escasa reactividad y, a excepción del SiO₂, su utilización como soportes de enzimas es poco común.

Estos óxidos, en presencia de agua, generan un pH específico en su superficie que se puede medir como pH superficial en el punto de carga cero (pzc) mediante medidas electroforéticas⁴³. Los óxidos que potencialmente pueden usarse como soportes (MgO, γ -Al₂O₃, ZrO₂, TiO₂, Nb₂O₅, SiO₂) en medios acuosos, poseen distintos pzc superficial. El TiO₂, resultaría mejor soporte para enzimas que otros óxidos ya que presenta un pH en pzc de 6,0 a 6,4. Óxidos más ácidos o básicos podrían desactivar a las enzimas.

El TiO₂ también conocido como titanía, no resulta tóxico para el ambiente y constituye un aditivo alimenticio certificado por los EEUU (U.S. Department of Health & Human Services). Es usado en una gran diversidad de industrias como en la manufactura de chocolate blanco, cosméticos, pasta de dientes, pantallas solares y quesos. Como no posee actividad química en organismos y no es venenoso, la titanía, se vuelve interesante no sólo como aditivo alimenticio sino también en la tinción y en el embalado de alimentos, en la cosmética y en la medicina. Por otra parte, tiene buenas propiedades mecánicas, electrónicas y ópticas. Se pueden encontrar unas pocas investigaciones previas acerca del uso de TiO₂ como soporte para la inmovilización de enzimas¹⁴.

Propiedades	Valor
Densidad	4200 Kg/m ³
Masa molar	79.9g/mol
Punto de fusión	1830 °C
Punto de ebullición	2500 °C
Solubilidad	Insoluble en agua

Tabla 6. Propiedades físicas y solubilidad del TiO₂.

2.4. Ingeniería de medios

La ingeniería de medios se refiere a la modificación de la naturaleza del medio de reacción para influenciar las propiedades de la enzima con la que se está trabajando⁴⁴. A primera vista el uso de solventes orgánicos para llevar a cabo reacciones biocatalíticas estaría enfrentado con la Química verde, porque resultan contaminantes y son muy volátiles, sin embargo existen muchas ventajas potenciales muy interesantes.

Se utilizan mezclas de solventes acuoso-orgánicas o solventes orgánicos puros⁴⁵ ya que proporcionan:

- 1) alta solubilidad relativa de muchos compuestos;
- 2) la posibilidad de revertir reacciones de hidrólisis a síntesis en medios no acuosos;
- 3) la posibilidad de disminuir reacciones secundarias indeseables en medios orgánicos, tales como la hidrólisis enzimática del producto, así como la inhibición por sustrato y/o producto;
- 4) la relativa facilidad en recobrar el producto y el biocatalizador de sistemas que contengan una fase orgánica.

La disminución de la actividad acuosa debido a la presencia del solvente orgánico conduce a la reducción de la actividad hidrolítica. Se supone que el intercambio de agua por el solvente orgánico inerte disminuye la concentración y actividad del agua, reduciendo así la velocidad de las reacciones competitivas de hidrólisis¹⁰.

Por otro lado, la presencia de un solvente orgánico puede provocar alteraciones estructurales significativas en la molécula enzimática y, como consecuencia de ello, en sus propiedades catalíticas^{46,47}. En solventes orgánicos anhidros, las enzimas son considerablemente menos activas pero a la vez pueden ser mucho más estables que en medio acuoso, su selectividad (enantio, regio y quimioselectividad) puede variar significativamente y suelen exhibir el fenómeno conocido como memoria de pH respondiendo en su funcionalidad al valor de pH del medio desde el cual fueron precipitadas o liofilizadas^{48,49}. La biocatálisis en medio orgánico puede realizarse en fase homogénea, si el solvente es miscible con el agua⁵⁰ o en fase heterogénea, cuando el solvente es inmiscible con el agua que constituye una segunda fase y puede ser o no perceptible

51.

2.5. Ibuprofeno

El ibuprofeno, ácido (RS)-2-(p-isobutilfenil) propiónico, es el nombre genérico de la droga que compone medicamentos como el Ibupirac®, Sindol®, Ibuevanol®, Matrix® entre otros. Es ampliamente utilizado a nivel mundial debido a su alta efectividad, baja incidencia de efectos adversos y toxicidad en las dosis recomendadas⁵². Este fármaco pertenece a la familia de los antiinflamatorios no esteroides (AINEs) que son un grupo variado y químicamente heterogéneo de fármacos principalmente antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos, por lo tanto reducen los síntomas de inflamación, dolor y fiebre respectivamente. Todos ejercen sus efectos por acción de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa o ácido graso dioxigenasa (COX) lo que resulta en una disminución de la producción de prostaglandinas (PG) y tromboxanos a partir del ácido araquidónico; estos compuestos son conocidos mediadores celulares en los procesos inflamatorios.^{53,54,55}

El ibuprofeno posee un carbono secundario asimétrico que da origen a los enantiómeros R(-) y S(+)(**Figura 6**), siendo el S(+)-ibuprofeno 160 veces más activo que su enantiómero⁵⁶. Por otra parte, se ha comprobado que el S(+)-ibuprofeno puro actúa dentro de los 12 minutos de ingestión mientras que la mezcla racémica demora 30 minutos. Esto estaría relacionado a que in vivo el enantiómero R(-) sufre una inversión quiral catalizada por enzimas, por medio de la cual parte del mismo es transformado en la forma activa S(+)⁵⁷.

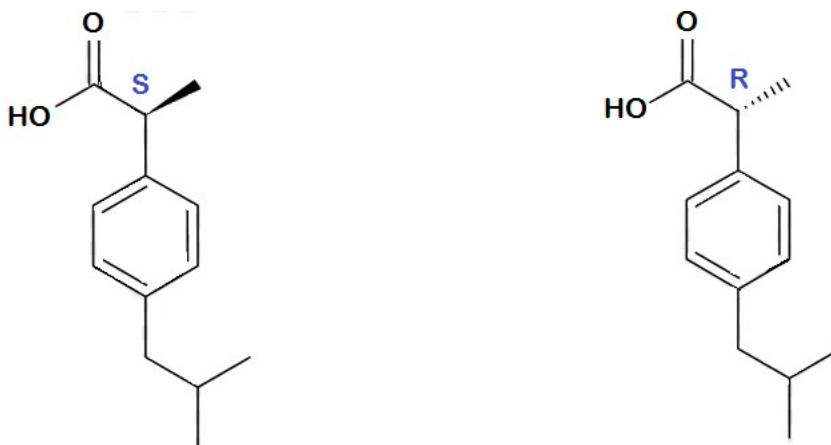


Figura 6. Estructuras del S(+)-ibuprofeno y R(-)-ibuprofeno.

2.5.1. Efectos adversos

Entre los efectos adversos más importantes de los AINEs se encuentra la irritación directa o indirecta del tracto gastrointestinal^{53,58}, es el efecto no deseado más frecuente, generalmente es leve y reversible e incluso no da síntomas, pero en ocasiones pueden ser muy graves¹⁴.

También existe un efecto a nivel renal, en personas que presentan una enfermedad renal de base y se debe a la expresión constitutiva, en este órgano, de ambas isoenzimas de la COX^{53,59}. Como consecuencia genera una disminución del filtrado glomerular que conduce a aumento de presión arterial e hiperpotasemia.

Por último, posee también un efecto antiagregante-trombótico ya que la mayoría de los AINEs inhiben a la COX-1 en las plaquetas previniendo la formación de tromboxano A2 el cual induce la agregación plaquetaria⁵³. Por lo tanto, AINEs a dosis bajas reducen el riesgo de síndromes coronarios. Por su parte, los inhibidores selectivos de la COX-2 no inhiben la síntesis de tromboxano A2, y dicha consecuencia podría más bien incrementar el riesgo de trombosis¹⁴.

Los efectos colaterales gastrointestinales como hemorragias y úlceras asociados a tratamientos crónicos han sido mayoritariamente atribuidos a la acidez generada por el R(-)-ibuprofeno⁶⁰. Además se observó que el mecanismo de inversión del enantiómero R(-) al S(+)-mencionado previamente, puede generar efectos negativos debido a la acumulación de ibuprofeno en adipocitos.

2.5.2. Resolución racémica

Entre el 20 y el 25 % de los fármacos comercializados hoy día, son compuestos quirales y en su gran mayoría se siguen utilizando como racémicos. La consecuencia más inmediata de la estereoespecificidad, desde el punto de vista de su aplicación terapéutica, se basa en la posibilidad de que los diferentes enantiómeros presenten, entre sí, distinto comportamiento farmacodinámico, farmacocinético y toxicológico, que a su vez, puede diferir de la actividad biológica del racémico⁶¹.

La separación de enantiómeros, resolución racémica, se basa en que los enantiómeros que componen una mezcla racémica reaccionan a distinta velocidad con un reactivo quiral o un catalizador como una enzima⁶². Esta es la ruta más prometedora para la obtención de enantiómeros puros a escala industrial y se ha estudiado extensamente en los últimos años para múltiples casos.

Las estrategias posibles para llevar a cabo dicha resolución involucran métodos cromatográficos, físicos y enzimáticos. La **Figura 7** muestra las técnicas comúnmente utilizadas para la resolución de enantiómeros.

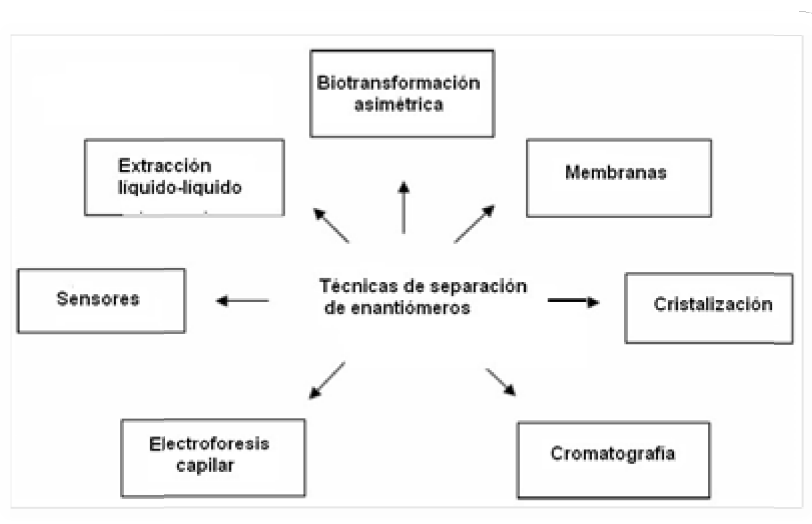


Figura 7. Técnicas utilizadas para separar enantiómeros

La resolución racémica por cinética enzimática (biotransformación asimétrica), particularmente la resolución de ibuprofeno catalizada por lipasas ha sido extensamente estudiada en las últimas dos décadas⁵⁷ y es posible llevarla a cabo mediante dos estrategias diferentes:

- 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 en medio orgánico.

2.5.3. Esterificación enantioselectiva de (R/S)-ibuprofeno

En base a lo expuesto en la sección 2.5.1 podemos concluir que un tratamiento farmacológico con el isómero S(+)-ibuprofeno puro tendría las siguientes ventajas¹⁴:

- Reducción de la dosis administrada
- Disminución de efectos secundarios gastrointestinales directos
- Disminución de potenciales efectos adversos asociados a la acumulación de ibuprofeno

en tejido adiposo

- Se evitaría la variabilidad de respuesta al no producirse la inversión in vivo
- Disminución del tiempo requerido para el desarrollo de la acción terapéutica deseada.

Por estos motivos se comprende el interés y la importancia de aumentar los niveles de obtención del enantiómero S(+). En las últimas décadas se ha estudiado la resolución enantiomérica del (R/S)-ibuprofeno mediante la esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas^{63, 64, 65}. Las lipasas más usadas en la esterificación de profenos provienen de los hongos *Candida Rugosa*, *Rhizomucormiehei* y *Candida antarctica*. Las dos primeras esterifican preferentemente al S-ibuprofeno y CALB esterifica más eficientemente al R-ibuprofeno, lo que representa una ventaja ya que queda sin reaccionar el isómero de interés, permite la obtención directa del S-ibuprofeno⁵⁷. Contrariamente a la hidrólisis, como ya fue mencionado, esta reacción se desarrolla a mayor velocidad en medios compuestos en forma predominante por solventes orgánicos.

La esterificación de (R/S)-ibuprofeno por vía enzimática ha sido llevada a cabo casi exclusivamente en un medio compuesto por un solvente orgánico siendo los solventes más utilizados ciclohexano e isooctano. Si bien operando en medio orgánico se han reportado altas conversiones de ácido y elevadas enantioselectividades, el uso de un co-solvente orgánico implica asumir el costo del mismo, de las operaciones de transporte, separación y reciclado; y el riesgo de que se produzcan fugas nocivas tanto para individuos como para el medio ambiente¹.

Por otra parte, es importante destacar que la esterificación de ibuprofeno y otras drogas no esteroides, independientemente de la enantioselectividad del proceso, ha sido reportada como una manera eficiente de obtener una prodroga (mezcla de ésteres) que no genere los problemas

gastrointestinales frecuentemente asociados a los AINEs como consecuencia del grupo carboxílico libre presente en estos compuestos ²¹.

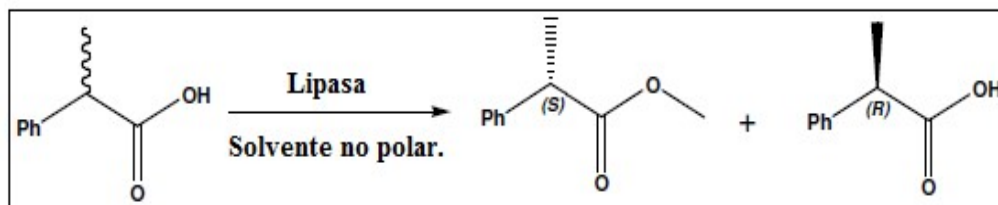


Figura 8. Reacción de esterificación enantioselectiva de profenos, en esta figura la lipasa es específica para esterifica el enantiómero S.

Para evaluar la resolución alcanzada se suelen analizar dos parámetros, por un lado la conversión de ibuprofeno a éster del mismo, expresado como porcentaje de conversión (%X) y por otro la enantioselectividad. El %X es el porcentaje de ibuprofeno esterificado en relación al ibuprofeno total, este parámetro no toma en cuenta el tipo de isómero convertido. La enantioselectividad da una medida de la selectividad de la reacción hacia alguno de los isómeros y se puede expresar como relación enantiomérica (E) y exceso enantiomérico (ee%).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

A continuación se agrupan los reactivos y los equipos utilizados en el presente trabajo según su marca correspondiente.

De Biopack fueron el ácido fosfórico 85 % p/v, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y el β -mercaptoetanol. De Sigma los reactivos D-Sorbitol, acrilamida pureza ≥ 99 %, persulfato de amonio y los tamices moleculares tipo 4A. De J. T. Baker el etanol absoluto, metanol y acetona. Marca Bio-Rad el dodecilsulfato de sodio (SDS), glicina y persulfato de amonio. Marca Merck isooctano, amoníaco, N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) y fenolftaleína. Marca Anedra el ácido acético glacial y el acetato de amonio. El reactivo Comasie Brilliant Blue G-250 fue marca USB. El extracto crudo de CAL B Lipozyme fue de Novozym. Las nanopartículas de TiO_2 $43.1 \pm 0.1 \text{ m}^2/\text{g}$ Aeroxide P-18 EvonikInd. El Ibuprofeno 99 % marca Parafarm. El glicerol marca Fluka. La solución standard KOH 1N de Laboratorios Oliveri. El azul de bromotimol Carlos Erba. El patrón de peso molecular (LMW kit de calibración para electroforesis que contiene Fosforilasa B 97,4 kDa; Seroalbúmina Bovina 66,2 kDa; Ovoalbúmina 45 kDa; Anhidrasa Carbónica 31 kDa; Inhibidor de Tripsina 21,5 kDa y Lisozima 14,4 kDa) y SEPHACRYL S-100 HR fueron de GE Healthcare.

Se utilizaron los siguientes equipos: cromatógrafo ÄKTA purifier de GE Healthcare, con una columna de SEPHACRYL S-100 HR, un HPLC ISCO modelo 2350, con una columna quiral Núcleo Dex β PM, una centrífuga refrigerante HERMLE Z 323 K, centrífuga eppendorf minispinn, liofilizador L-T4 (Rifacor), un shaker Gyromax™ 787R y un espectrofotómetro Agilent 8453, un equipo EDAX SS Apollo 40 acoplado a un microscopio electrónico medioambiental FEI Quanta 200, el higrómetro HANNA HI 9564.

3.2. Preparación de los biocatalizadores

Los biocatalizadores descritos en este trabajo se prepararon mediante una inmovilización de la lipasa sobre un soporte de nanopartículas de TiO_2 mediante adsorción simple. Se usaron dos fuentes enzimáticas de CALB: un extracto crudo (EC) y CALB purificada a partir de ese mismo extracto.

3.2.1. Biocatalizadores a partir de un extracto crudo enzimático

Se prepararon varias soluciones de inmovilización cuyas composiciones se detallan en la **tabla 7**. Los biocatalizadores realizados a partir de extracto crudo fueron nombrados con las siglas EC y un número que sigue el orden cronológico, en los casos que se realizaron los biocatalizadores por duplicado, triplicado y cuadruplicado se le adicionó una letra minúscula para diferenciarlos en la inmovilización. Para los ensayos de actividad estos duplicados se reunieron y homogeneizaron.

Biocatalizador	Vol EC (mL)	Agentes promotores de actividad S y G				
		SG 25	S 25	G 25	S 50	G 50
EC	1,5	-	-	-	-	-
EC1	1,3	✓	-	-	-	-
EC2	1,3	-	-	-	-	-
EC3	1,2	✓	-	-	-	-
EC4	1,2	✓	-	-	-	-
EC5	1,35	✓	-	-	-	-
EC6	1,3	✓	-	-	-	-
EC7	1,2	✓	-	-	-	-
EC8	1,2	✓	-	-	-	-
EC9	1,2	-	✓	-	-	-
EC10	1,2	-	✓	-	-	-
EC11	1,2	-	-	✓	-	-
EC12	1,2	-	-	✓	-	-
EC13	1,3	-	-	-	-	-
EC14	1,3	✓	-	-	-	-
EC15	1,3	-	-	-	-	✓
EC16	1,3	-	-	-	✓	-

Tabla 7. Composición de las soluciones de inmovilización de todos los biocatalizadores realizados a base de extracto crudo.

En todos los casos se agregó entre 1,0 mL y 1,5 mL de extracto crudo comercial de CALB L (Lipozyme® CalBL) y según cada caso se agregaron 3,6 mL de alguna de las distintas soluciones de agentes promotores de actividad. Las soluciones utilizadas fueron 25% p/V sorbitol – 25% p/V glicerol, 25% p/V glicerol, 25% p/V sorbitol, 50% p/V glicerol o 50% p/V sorbitol. El volumen final fue de 21 ml llevado con agua destilada.

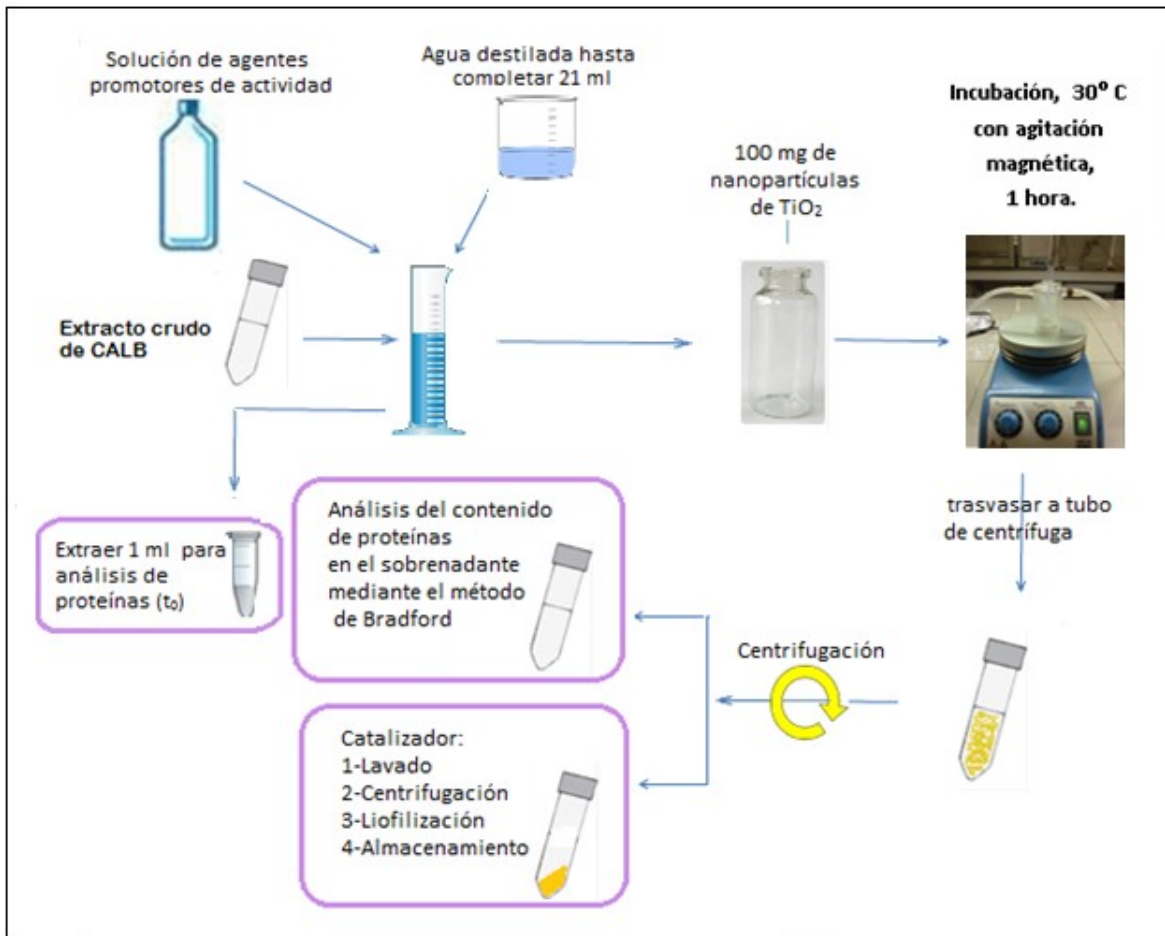


Figura 9. Procedimiento de inmovilización de extracto crudo comercial.

Se tomó 1 ml de cada solución inicial (t_0) para analizar el contenido de proteínas. Los 20 ml restantes se mezclaron con 100 mg de dióxido de titanio en un frasco de vidrio y se colocaron en un baño a 30°C con agitación magnética durante 1h. Luego se trasvasó a tubo falcon y se centrifugó a 9600 x g 20 min, 4° C en una centrifuga refrigerada Hermle, procedimiento mostrado en la **Figura 9**. Se guardó el sobrenadante (t_f) en heladera para analizar y se resuspendió el precipitado con 10 ml de agua destilada recolectando también el sólido remanente en el frasco. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones.

El sólido se liofilizó durante 48 h y se conservó a 4°C.

3.2.2. Biocatalizador a partir de CALB pura

Se realizaron los biocatalizadores P1, P2, P3 y P4 con distintas concentraciones de CALB pura. La lipasa fue purificada, mediante cromatografía líquida, a partir del mismo extracto crudo utilizado para preparar los biocatalizadores mencionados en **3.2.1**.

3.2.2.1. Purificación de CALB mediante cromatografía de exclusión molecular

Se realizó una cromatografía líquida con el propósito de obtener CALB pura a partir del extracto crudo comercial de CALB (Lipozyme® CalB L).

El extracto crudo posee: sólidos orgánicos totales (TOS) (4%), glicerol (25%), sorbitol (25%), agua (46%), benzoato de sodio (0,2%) y sorbato de potasio (0,1%) de acuerdo al documento técnico de Novozymes⁵⁷.

Dada la composición del extracto se desarrolló un método utilizando una cromatografía de exclusión molecular. Este método de purificación permite separar proteínas y ácidos nucleicos de distintos tamaños y, principalmente, la gran cantidad de pequeñas moléculas presentes en el extracto crudo ^[Error! Marcador no definido].

Se utilizó una columna KX 16 (Pharmaciabiotech) de 1,5 cm de diámetro rellena con Sephacryl S-100 HR (GE Healthcare), el largo de la columna obtenido fue de 34 cm y el volumen (VC) de la misma 60,08 cm³.

Se utilizó el equipo ÄKTA purifier (GE Healthcare). En el detector acoplado al equipo se seleccionaron 3 longitudes de ondas: 280 nm, 260 nm y 215 nm, que permiten identificar la presencia de proteínas, ácidos nucleicos y enlace peptídico, respectivamente.

Se utilizó como solvente de elución (fase móvil) el buffer de acetato de amonio-amoniaco (NH₄Ac / NH₃), 0,1 M, pH 7,75. El mismo fue filtrado utilizando un filtro Osmonics de 0,22 μm y

desgasificado mediante la aplicación de vacío antes de realizar la corrida. Del mismo modo se procedió con el agua y el etanol al 20% que se utilizaron en los lavados de columna. La muestra de extracto crudo se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos en un tubo eppendorf® para garantizar que no se inyecten sólidos en el equipo. Se sembró 1 ml en cada corrida que se llevó a cabo (**Figura 10**). Se realizó primero un lavado con 1 VC etanol 20 % con un flujo de 1 ml min^{-1} y otro con 1VC de agua destilada. Luego se continuó con 1 VC del buffer de elución para equilibrar la columna, antes de inyectar la muestra. La inyección y elución de la muestra se realizó con una velocidad de flujo del solvente de $0,5 \text{ ml min}^{-1}$.

Se colectó la fracción correspondiente a la CALB y se liofilizó para separar tanto el agua como los componentes del buffer. El sólido obtenido se conservó en la heladera a 4°C .

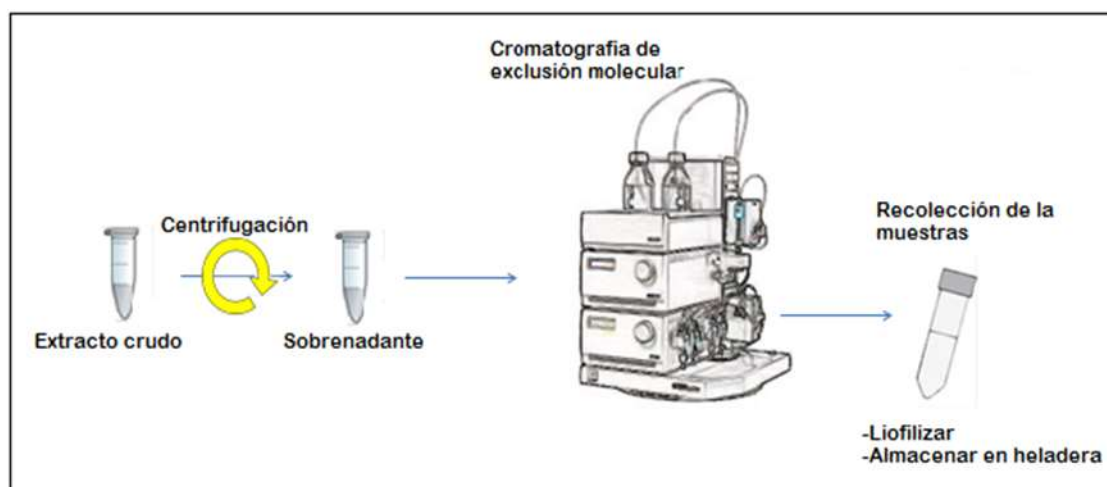


Figura 10. Esquema de purificación del extracto enzimático de CALB.

3.2.2.2. Inmovilización de CALB pura

Se prepararon 4 biocatalizadores a partir de la mezcla de distintas soluciones de 20 ml de CALB pura entre 0,3 mg/mL y 0,80 mg/mL y 100 mg de TiO_2 . Se siguió el procedimiento de inmovilización que se muestra en la **figura 9**. Las muestras a t_0 y los sobrenadantes se reservaron para analizar el contenido de proteínas por el ensayo de Bradford.

3.2.3. Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método de Bradford⁶⁶ para cuantificar el contenido proteico de las soluciones iniciales (t_0) y finales (t_f) de las inmobilizaciones descritas previamente, lo que permitió calcular las proteínas adsorbidas a las nanopartículas del soporte.

Para preparar el reactivo de Bradford se utilizaron 100 mg de Coomassie Brilliant blue G-250, 50 mL de etanol 95 % y 100 mL solución H_3PO_4 85 % p/v, se llevó a volumen final 1000 mL con agua destilada, se filtró y almacenó en un frasco color caramelo.

Para cada solución analizada mediante este método, se mezclaron 50 μ L de muestra con 2,5 mL del reactivo de Bradford. Además se realizaron ensayos blanco, en los que se agregaron 50 μ L de agua destilada a 2,5 mL de reactivo de Bradford. Cada muestra se analizó por cuadruplicado. Se dejó reposar por 15 minutos y se midió la absorbancia a λ 595 nm en una cubeta de vidrio.

3.2.3.1. Curva de calibración

Para establecer las concentraciones de proteínas en las diferentes muestras usamos una curva de calibración realizada con CALB pura (Sigma) como patrón.

Se calculó la concentración real de la solución patrón conociendo su absorbancia a 280 nm y utilizando la ley de Lambert-Beer que relaciona la absorbancia a 280 nm, la concentración C , el coeficiente de absortividad molar ϵ (calculado en la bibliografía^{Error! Marcador no definido.}) y el camino óptico (L de 1 cm):

$$A = C \cdot \epsilon \cdot L$$

A partir de ésta solución se realizaron cinco diluciones. La solución patrón y las diluciones se analizaron por el método de Bradford por cuadruplicado.

La diferencia entre los valores de absorbancia a 595 nm obtenidos en las muestras y el promedio de los blancos fue graficada en función de la concentración de las diluciones mencionadas. A partir de estos datos se realizó la regresión lineal de la curva y se obtuvo el valor

de la pendiente que permite relacionar los datos de absorbancia obtenidos con los de concentración de proteínas presentes en las soluciones analizadas.

3.2.3.2. Determinación de las proteínas adsorbidas y la isoterma de adsorción

Se determinó la concentración proteica de las soluciones iniciales y finales de las inmobilizaciones de los biocatalizadores a partir del dato de absorbancia a 595 nm.

Se obtuvo el valor promedio de absorbancia a 595 nm para cada muestra analizada, se le restó el valor promedio de absorbancias de los ensayos blanco y se dividió por el valor de la pendiente de la curva de calibración para hacer el pasaje a concentración de proteínas. Usando este dato y el volumen total de las soluciones de inmobilización (20 mL) se pudo calcular la masa de CALB de las soluciones analizadas. A partir de la diferencia de la masa en t_0 y t_f se obtuvo la cantidad de proteínas absorbida al TiO_2 para cada biocatalizador preparado.

3.2.4. Análisis mediante electroforesis desnaturizante

Se realizó la electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE) de acuerdo al método desarrollado por Laemmli⁶⁷, que permitirá la observación cualitativa de las proteínas presentes en las muestras iniciales y finales de la inmobilización para complementar el análisis cuantitativo de proteínas.

3.2.4.1. Preparación de los geles

Se utilizó un equipo MiniProtean®III de BioRad. Se prepararon geles de poliacrilamida de 0,75 mm de espesor con los componentes indicados en la **tabla 8**.

Componentes		
	Gel de resolución (12%)	Gel de stacking
acril-bis 30:0,8	3,5 mL	1,16 ml
buffer tris 3M pH 8,8	0,94 mL	-
buffer tris 0,5M pH 6,8	-	0,87 ml
SDS 10%	75 µL	70 µl
TEMED	4 µL	4 µl
persulfato de amonio 1,5 %	450 µl	420 µl
agua destilada	2,61 ml	4,53 ml

Tabla 8. Composición de los geles de resolución y de stacking

Las soluciones de TEMED y persulfato de amonio (preparada en el momento) se adicionaron inmediatamente antes de verter el gel entre los vidrios porque son catalizadores de la polimerización de la acrilamida y bisacrilamida. Se agregó primero la solución correspondiente al gel de resolución dejando un centímetro superior para el gel de stacking. Una vez que polimerizó, se agregó hasta el borde del vidrio la solución del gel de stacking y se colocó el peine. Se esperó hasta que polimerice el gel de stacking y se retiró el peine.

3.2.4.2. Preparación de las muestras

Sobre alícuotas de las distintas soluciones a analizar se agregaron 5 volúmenes de acetona fría de manera de precipitar las proteínas de las muestras. Después de un reposo de 30 minutos a 4°C, se centrifugaron, se separó el sobrenadante acetónico y se eliminaron los restos de acetona con una bomba de vacío. Los sólidos remanentes se redisolieron en distintos volúmenes de buffer de muestra (**Tabla 9**) y se llevó a un baño de agua en ebullición durante 10 min. El SDS y el β -mercaptoetanol que componen el buffer junto con el paso de calentamiento de las muestras garantizan la desnaturalización y despliegue de las proteínas presentes en las muestras.

Buffer de muestra	
Componente	Volumen
Glicerol	4 mL
TRIS	393,5 mg
SDS	1 g
β -mercaptoetanol	2,5mL
Azul de bromotimol	3 mg
Agua destilada	Hasta 50 mL

Tabla 9. Detalle del buffer de muestra utilizado

3.2.4.3. Desarrollo de la electroforesis

Como ilustra la **Figura 11** se colocaron los vidrios en el soporte y luego en la cuba de electroforesis, se llenó con el buffer de corrida, detallado en la **Tabla 10**, en la parte interior (entre los dos geles) cuidando que llegue hasta la parte superior del vidrio para que haya conducción de corriente. Se agregó más buffer de corrida en la cuba, en la parte exterior.

Se sembraron distintos volúmenes de muestras iniciales y finales junto con un patrón de peso molecular comercial (LMW, GE Healthcare) y buffer de muestra (**Tabla 9**).

Se conectaron los electrodos a la cubaelectroforética y a la fuente de alimentación y se aplicó inicialmente una corriente de 30 mA para la corrida en el gel de stacking y luego se aumentó a 60 mA para el gel de resolución. Hasta que el frente de corrida llega a la parte inferior del gel de resolución.

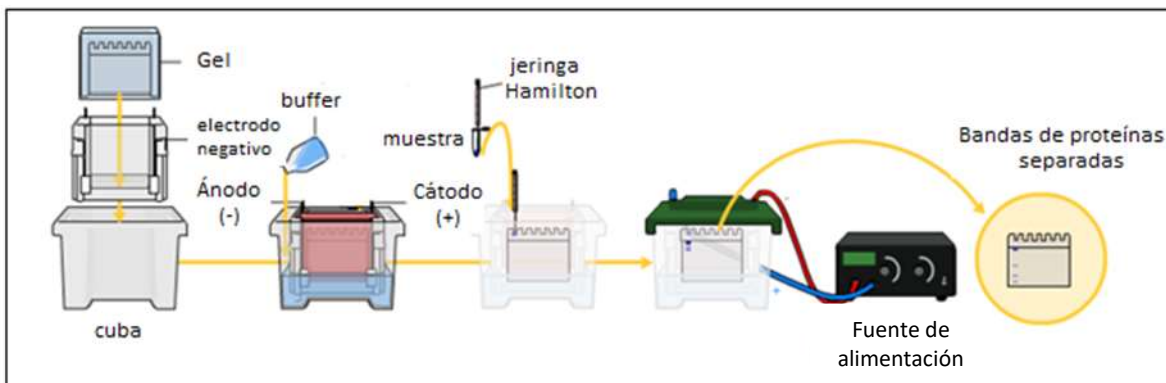


Figura 11. Procedimiento de corrida electroforética en una cubeta vertical como la que se utilizó en el presente trabajo.

Finalmente se retiraron los geles de los vidrios para realizar la detección de las proteínas, se sumergieron en la solución colorante a base de Comassie Blue (**Tabla 10**) y se dejaron con agitación orbital durante varias horas. Por último, se decoloró con la solución decolorante (**Tabla 10**).

Buffer de corrida	Tris 0,025 M Glicina 0,19 M SDS 0,0035 M HCl h' pH 8.8 H ₂ O csp 100mL
Solución colorante	ComassieBrillant Blue R 250 0.1%, Metanol 25% Acético glacial 10%
Solución decolorante	Ácido acético glacial 10% Etanol 25%

Tabla 10. Detalle del buffer de corrida utilizado, de la solución colorante y solución decolorante para el revelado de los geles

3.3. Estudio de los biocatalizadores

Esta sección comprende el análisis de la superficie de los biocatalizadores por microsonda de electrones (EDS) que permite cuantificar y observar la distribución de los elementos presentes en el soporte de TiO₂; el estudio de la actividad catalítica en la reacción de esterificación de ibuprofeno por medio del cálculo de porcentaje de conversión (%X) y del porcentaje de exceso enantiomérico (%eeS) de los biocatalizadores en distintas condiciones de reacción y, por último, el análisis de la estabilidad de los biocatalizadores en las mezclas de reacción (MR) utilizadas para detectar si hubo desorción de algún componente.

3.3.1. Análisis cuantitativo por microsonda de electrones

Se empezó a desarrollar una metodología de cuantificación de proteínas inmovilizadas mediante el uso de una microsonda de electrones. En esta técnica se utiliza un microscopio electrónico de barrido (SEM) con un detector de energía dispersiva (EDS de sus siglas en inglés Energydispersivespectrometro) que permite coleccionar los rayos X generados por la muestra y realizar un análisis semicuantitativo y de distribución de elementos en superficies. Se debe utilizar una muestra sólida que sea conductora, de no ser así se debe recubrir la muestra con una película de un material conductor como carbón o metal.

El equipo usado fue un EDAX SS Apollo 40 acoplado a un microscopio electrónico medioambiental FEI Quanta 200.

El microanálisis se usó para cuantificar la cantidad de C, O y Ti en las muestras de CALB pura, TiO_2 y en los biocatalizadores preparados tanto con CALB pura como con el extracto crudo. El análisis fue realizado sobre pastillas delgadas de cada muestra que se fijaron sobre soportes de aluminio mediante pintura de plata. La cuantificación se realizó usando las líneas de adsorción K de los elementos (la L sólo se usó en el caso del Ti) y la contribución de la capa de C atmosférico fue restada. El análisis se llevó a cabo a 0,3 y 0,6 torr, 12,5 kV, spot 7y cuenta de 80 seg.

Utilizando estos datos y la información del porcentaje de estos elementos en CALB y TiO_2 , se calculó la cantidad de proteína en cada muestra.

Esta información se comparó con la obtenida por los métodos por vía húmeda utilizados para la cuantificación de proteínas (método de Bradford).

3.3.2. Estudio de la actividad biocatalítica

La actividad catalítica analizada fue la esterificación enantioselectiva del R/S ibuprofeno con etanol. Su estudio incluyó la determinación del porcentaje de conversión del ibuprofeno (%X) a través de una titulación ácido-base del ibuprofeno remanente, el cálculo del exceso enantiomérico

del sustrato S-ibuprofeno (%ees) por HPLC quiral y la medida de actividad acuosa (a_w). La **Figura 12** muestra un esquema general de ensayo de actividad biocatalítica.

Para realizar los ensayos de actividad se prepararon distintas mezclas de reacción (MR). Con y sin isooctano como cosolvente agregado, con y sin tamices moleculares. Los detalles se muestran en la **Tabla 11**. Las MR se encuentran saturadas en ibuprofeno pero difieren en la relación molar etanol-ibuprofeno que es 7:1 en la MR EIbu mientras que en la MR con isooctano como cosolvente, IEIbu es 1:1.

Mezcla de reacción (MR)	Componentes y concentraciones		
	Solvente	Sustrato	Tamices
IEIbu	isooctano	Ibuprofeno 0,12 M etanol 0,12M	No
EIbu	Etanol c/ 4,8 % agua destilada	Ibuprofeno 1,65 M	No
IEIbu*	isooctano	Ibuprofeno 0,12 M etanol 0,12 M	Si

Tabla 11. Composición de las MR utilizadas en los ensayos de actividad catalítica.

En cada ensayo se colocaron 20 mg de catalizador con 10 ml de la MR correspondiente en un frasco color caramelo tapado. Se incubó durante 24 h en estufa a 45 °C y agitación orbital 200 rpm. En algunos ensayos también se adicionaron distintas cantidades (alrededor de 60 mg y de 120mg) de tamices moleculares para disminuir el contenido de agua en el medio durante la reacción de esterificación de ibuprofeno. Además se realizaron las pruebas de control sin biocatalizador.

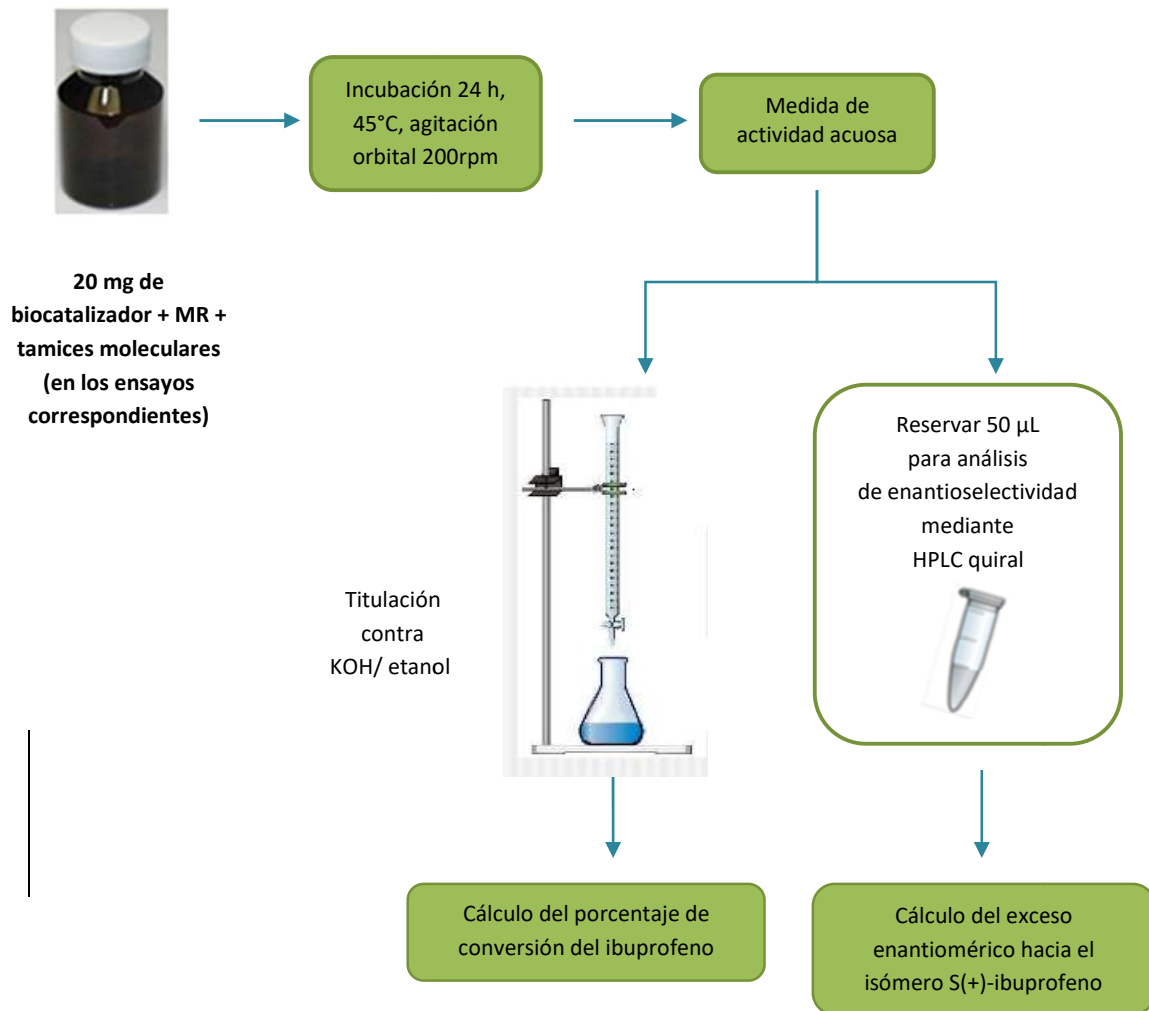


Figura 12. Esquema general del análisis de la actividad de los biocatalizadores preparados

3.3.2.1. Determinación de la actividad acuosa

En varios ensayos, se midió la actividad acuosa (a_w) de las MR antes y después de la medida de actividad biocatalítica.

Se colocaron los frascos en una bolsa hermética y la atmosfera de la bolsa se saturó con N_2 seco. Una vez estabilizada una humedad mínima en la bolsa, se midió la a_w colocando un higrómetro HANNA HI 9564, dentro de los frascos.

3.3.2.2. Determinación de porcentaje de conversión

Para calcular el porcentaje de conversión (%X) se realizó una titulación de las muestras luego de la incubación con una solución de KOH 0,1 M en etanol, utilizando fenolftaleína como indicador del punto final (**Figura 12**).

Con el volumen gastado en el blanco (VB) y el volumen gastado en cada muestra (VM) se determinó el porcentaje de conversión:

$$X\% = \frac{(VB - VM) \times 100}{VB} * \frac{m}{20}$$

Siendo *m* la masa biocatalizador usado. Dicha masa fue aproximadamente 20 mg, como se indicó previamente y el cociente *m*/20 sirve para normalizar los resultados de los distintos ensayos realizados.

3.3.2.3. Medida de enantioselectividad

Antes de realizar la titulación se tomaron 50 µL de las muestras para realizar la medida de enantioselectividad.

Las muestras se diluyeron con volúmenes de metanol para alcanzar valores de ibuprofeno entre 100 y 500 ppm, adecuados para el detector, y se inyectaron en un equipo de HPLC, ISCO modelo 2350, utilizando una columna quiral (Núcleo Dex β PM). El solvente de elución fue metanol-TEAA 0,1 % 60:40, el flujo 0,7 ml/min y la presión 1570 Psi. Se analizó cada muestra por triplicado.

A partir de los cromatogramas se obtuvieron los valores de áreas correspondientes a los isómeros del ibuprofeno. Usando estos valores, junto a un factor de corrección obtenido a partir del análisis de ibuprofeno racémico, se calculó el exceso enantiomérico de S, *ees%* mediante la siguiente ecuación:

$$ees\% = \left[\frac{(S - f \times R)}{(S + f \times R)} \right] \times 100$$

Siendo S y R las áreas de los picos correspondientes a los isómeros S y R respectivamente y *f* el factor de corrección calculado a partir del cociente de las áreas de cada uno en la mezcla racémica.

3.3.3. Medidas estabilidad de los biocatalizadores

Para estudiar la estabilidad de los biocatalizadores preparados se les realizó un tratamiento previo al ensayo de actividad. Dicho tratamiento consistió en incubar las muestras en las mismas condiciones (solventes, temperatura, tiempo) en las que se realizó el ensayo de actividad pero se excluyó de las mezclas de reacción el ibuprofeno de manera que la reacción de esterificación no se produzca (**Figura 13**). Se utilizaron las mezclas de reacción con isooctano como cosolvente y sin cosolvente (**Tabla 12**), ambas sin ibuprofeno, incubación en estufa a 45° C, 200 rpm de agitación orbital durante 24 h. Luego de la incubación se trasvasó, cada solución, a un tubo de centrifuga de 15 ml y se centrifugó a 9600 × g, una temperatura de 4°C durante 20 m.

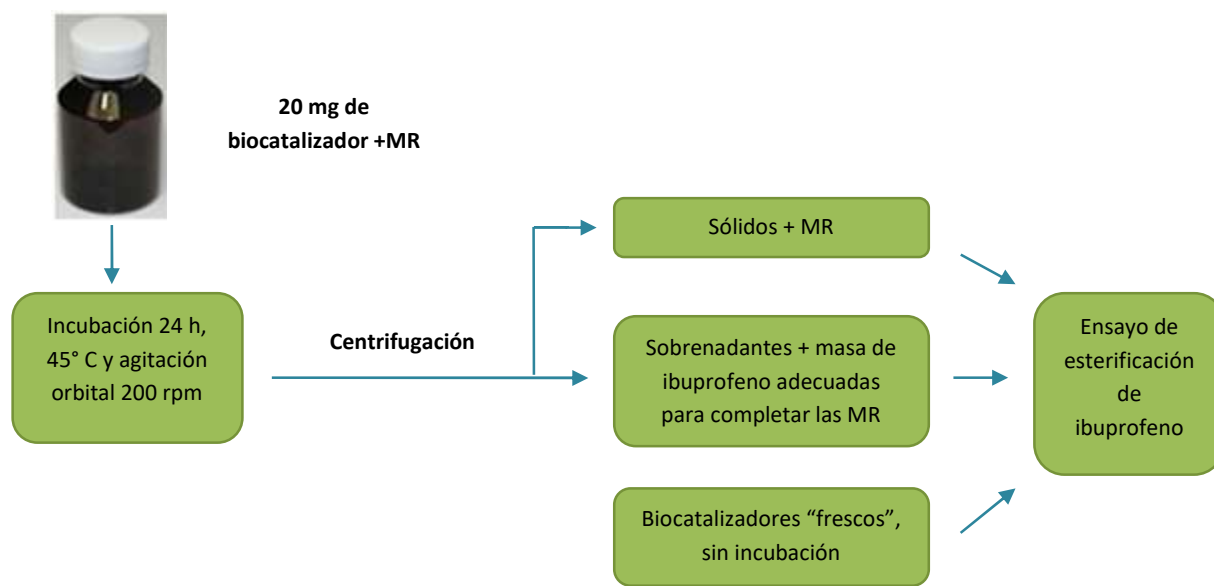


Figura 13. Procedimiento de medida de estabilidad del biocatalizador.

3.3.3.1. Determinación de la actividad enzimática

Realizado el tratamiento, se analizó la actividad tanto en los sólidos como en los sobrenadantes y en biocatalizadores sin el tratamiento previo.

Sobre los sólidos se agregó mezcla de reacción correspondiente, con o sin cosolvente (MR IEI o MR IE), y se realizó el ensayo de actividad de la misma manera que se detalló previamente.

A los sobrenadantes se les agregó cantidades de ibuprofeno adecuadas para alcanzar la concentración 0,12 M de las mezclas de reacción y se realizaron los ensayos de actividad de igual forma.

En paralelo se realizaron medidas de actividad con los mismos biocatalizadores “frescos”, es decir, sin incubación previa, como se muestra en la **Figura 13**.

3.3.3.2. Obtención de los espectros UV- visible

La obtención de espectros de absorbancia en la región UV-Visible (200-750nm) de las soluciones de incubación y de los sobrenadantes que se indican en la **tabla 12** permitirá obtener información de la composición de las mismas, en particular si alguno de los componentes de los biocatalizadores se liberó del soporte.

La solución de extracto crudo en EI (EC en EI) se preparó liofilizando durante 24 h 250 µL de EC para deshidratarlo y en base a esto se disolvió en 10 mL de solución de etanol en isooctano.

La solución de sorbitol-glicerol en EI se obtuvo disolviendo 4,5 %p/V sorbitol-4,5 %p/V glicerol en la solución EI. Dichas concentraciones son semejantes a las presentes en la mayoría de las soluciones de inmovilización.

El blanco en el espectrofotómetro fue realizado con agua destilada.

Espectro UV de las soluciones:	Isooctano puro
	Etanol 0,12 M en isooctano (EI)
	sorbitol- glicerol en EI
	EC en EI
	Soluciones sobrenadantes (t_f)

Tabla 12. Soluciones analizadas mediante el espectro UV-Vis. EC se refiere al extracto crudo liofilizado y disuelto en EI, y t_f a las soluciones de los sobrenadantes correspondientes al tiempo final de los ensayos de estabilidad.

4. RESULTADOSy DISCUSIÓN

En este capítulo se expondrán los resultados obtenidos siguiendo la metodología indicada en el capítulo anterior. En primer lugar, se detalla inmovilización enzimática sobre el soporte y en la segunda parte, el estudio del comportamiento de los biocatalizadores en distintas condiciones.

4.1. Preparación de los biocatalizadores

En esta sección se exponen los resultados de la preparación de biocatalizadores basados en la enzima CALB.

En primer término, se analizará la purificación de dicha enzima por cromatografía de exclusión molecular para la preparación de biocatalizadores con CALB pura. Por otro lado, se determinará la cantidad de CALB adsorbida sobre el TiO_2 en los distintos biocatalizadores. Por último, se estudiarán las soluciones de inmovilización mediante electroforesis desnaturalizante.

4.1.1. Cromatografía de exclusión molecular

Se realizó la purificación de CALB para preparar biocatalizadores, a partir de la misma, con lo que se estudie su composición mediante EDS. Dicho análisis sería mucho más complejo en biocatalizadores preparados con extracto crudo ya que existirían una variedad grande de sustancias adsorbidas sobre el TiO_2 . La preparación de estos biocatalizadores también se utilizó para obtener la isoterma de adsorción de los mismos.

Se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular para purificar la enzima a partir del extracto crudo, como se describe en la sección **3.2.2.2.1**.

En el proceso de elución se utilizó un buffer de acetato de amonio-amoniaco ($\text{NH}_4\text{Ac} / \text{NH}_3$), 0,5 M, de pH 7,75, se eligió esta fase móvil porque, además de poseer el pH indicado posee la particularidad de que sus componentes son volátiles y se separan de la muestra durante la liofilización sin dejar restos en la CALB purificada⁶⁸.

La **figura 14** muestra el cromatograma obtenido, es un gráfico del perfil de absorbancia en función del volumen de elución en el que se pueden observar cuatro picos. El primer pico (P1) presentó un máximo a los 27 ml y los valores de absorbancia a 260 nm y 280 nm coinciden. El segundo pico (P2) presentó un máximo a los 32 ml de elución siendo la absorbancia a 280 nm un poco mayor que la 260 nm. El tercer pico (P3) eluyó a los 38 ml y también muestra una absorbancia mayor a 280 nm que a 260 nm. El cuarto pico (P4) se extiende entre los 60 mL y 80 mL y su absorbancia a 260 nm es mayor que a 280 nm.

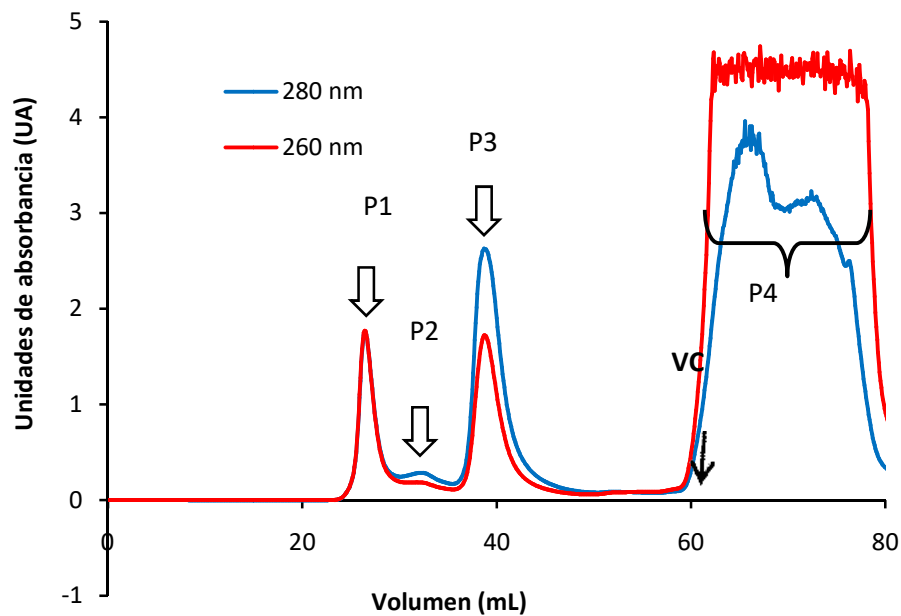


Figura 14. Cromatografía de exclusión molecular del extracto crudo centrifugado

Dado que, las proteínas poseen un máximo de absorbancia a 280 nm, debido a la presencia de los aminoácidos aromáticos y los ácidos nucleicos presentan un máxima a 260 nm, la relación

entre las absorbancias a 280 nm y a 260 nm permite inferir los componentes de cada pico. En P1 habría presencia de ácidos nucleicos, además de proteínas, porque presenta una absorbancia similar a 260 nm y a 280 nm. Por otro lado, dichos ácidos serían de un tamaño mayor que las proteínas ya que eluyeron antes de la columna. En cambio, los picos P2 y P3 son principalmente proteicos. El P4 eluyó en torno a un volumen de columna por lo que se puede considerar que se compone de sustancias de bajo peso molecular; por la gran intensidad de absorbancia y la amplitud del pico estarían en gran cantidad en la muestra. Se puede suponer, teniendo en cuenta la información que se tiene del extracto crudo que entre esas sustancias están los conservantes sorbato de potasio que presenta un máximo de absorbancia a 260 nm y benzoato sódico que presenta a 230 nm.

El tercer pico tuvo mayor intensidad de absorbancia a 280 nm y por lo tanto el mayor contenido proteico, teniendo en cuenta que el extracto crudo está compuesto principalmente por CALB, se puede considerar que en este pico eluye esta lipasa. Por otra parte, la presencia de CALB en el P3 fue comprobada en trabajos previos⁶⁸ **Error! Marcador no definido.** Por estas razones, se colectó el volumen eluido entre los 36 mL y 44 mL y se procedió a su liofilización.

4.1.2. Cuantificación de proteínas

4.1.2.1. Curva de calibración

La **figura 15** muestra la curva de calibración de CALB pura que se debió realizar para el análisis cuantitativo de proteínas. Fue necesario realizar dicha curva de calibración en vez de utilizar una proteína patrón como la seroalbúmina bovina (BSA) debido a un estudio realizado anteriormente⁶⁸ que evidencia que la pendiente de la curva de calibración obtenida con CALB es considerablemente menor que la de la proteína patrón BSA. La absorbancia a 280 nm se atribuye a la presencia de aminoácidos aromáticos, principalmente Tyr, Trp y Phe, la abundancia de estos

residuos es sensiblemente menor en la CALB que en la proteína patrón BSA, de ser utilizada para evaluar la concentración de CALB se estaría subestimando el valor.

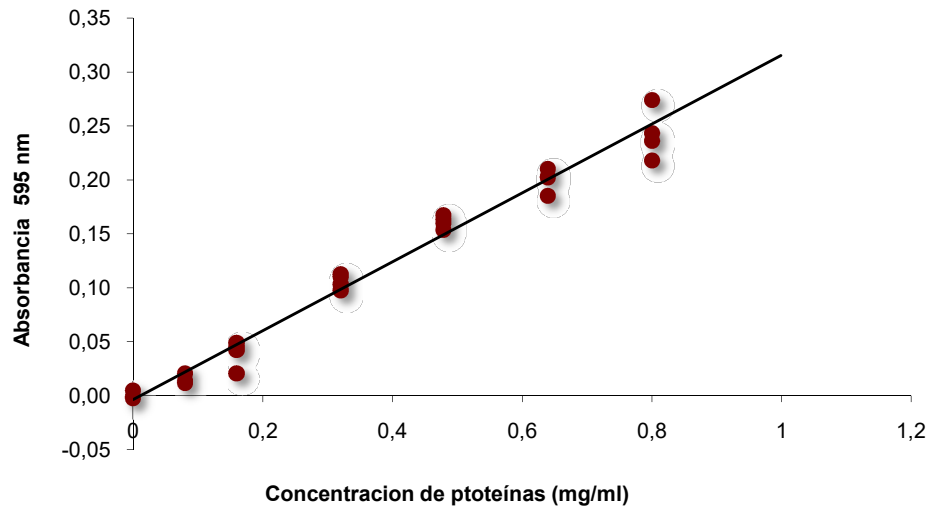


Figura 15. Curva de calibración a partir de solución patrón de CALB pura.

La solución patrón de lipasa CALB presentó una absorbancia a 280nm de 0,9858, con este dato y aplicando la ley de Lambert-Beer se obtuvo la concentración de la solución patrón de CALB pura que fue de 0,799 mg/mL. Como se explica en la sección 3.2.3.1., se graficó la recta y se obtuvo la ecuación que relaciona los datos de absorbancia con los de concentración de proteínas. De la curva graficada se obtuvo un valor de la pendiente de 0,3362 ($R^2 = 0,98$). El mismo se utilizó para calcular las concentraciones de todas las muestras analizadas por el método de Bradford.

4.1.2.2. Proteínas adsorbidas

Las soluciones iniciales t_0 y finales t_f de todos los ensayos de inmovilización, se analizaron por cuadruplicado mediante el método de Bradford. Los resultados de absorbancia promedio se convirtieron en concentración de proteína utilizando la pendiente de la recta obtenida de la curva de calibración. Con estos datos y el volumen total (20,0 mL) se calculó la masa de proteínas en las

soluciones. La cantidad de CALB que se adsorbió en el soporte de dióxido de titanio durante la incubación, se obtuvo haciendo la diferencia de proteínas entre t_0 y t_f . Estos datos junto a la desviación estándar de cada ensayo, se muestran en las **tablas 16, 17 y 18**.

Biocatalizador	C inicial (mg/ml)	C final (mg/ml)	Prot inicial (mg)	Prot final (mg)	Protads(mg)
P1	0,372 ± 0,028	0,014 ± 0,019	7,44 ± 0,55	0,28 ± 0,39	7,17 ± 0,67
P2	0,736 ± 0,028	0,316 ± 0,063	15,09 ± 0,03	6,48 ± 1,30	8,62 ± 1,41
P3	0,354 ± 0,034	0,000 ± 0,018	7,08 ± 0,68	0,00 ± 0,36	7,08 ± 0,77
P4	0,804 ± 0,025	0,257 ± 0,020	16,08 ± 0,50	5,14 ± 0,40	10,94 ± 0,64

Tabla 16. Se indican la concentración inicial y final y la masa de proteínas inicial y final de todas las inmobilizaciones realizadas a partir de CALB pura. La última columna presenta la masa de proteínas adsorbidas sobre 100 mg de TiO₂ calculada a partir de los datos anteriores.

Biocatalizador	C inicial(mg/ml)	C final(mg/ml)	Prot inicial(mg)	Prot final(mg)	Protads(mg)
EC	1,003 ± 0,017	0,459 ± 0,028	20,05 ±	9,18 ±	10,87 ± 0,65
EC2	0,601 ± 0,038	0,098 ± 0,043	12,02 ±	1,96 ±	10,06 ± 1,15
EC13	0,735 ± 0,045	0,211 ± 0,024	14,69 ±	4,23 ±	10,47 ± 1,02

Tabla 17. Igual que la tabla 16, pero contiene de todas las inmobilizaciones realizadas a partir de extracto crudo de CALB (EC) sin SG.

Biocatalizador	C inicial (mg/ml)	C final (mg/ml)	Prot inicial(mg)	Prot final(mg)	Protads(mg)
EC1	0,601 ± 0,038	0,156 ± 0,041	12,62 ± 0,76	3,27 ± 0,85	9,35 ± 1,14
EC3	0,489 ± 0,041	0,052 ± 0,035	9,78 ± 0,82	1,04 ± 0,70	8,74 ± 1,07
EC4	0,454 ± 0,029	0,065 ± 0,039	9,08 ± 0,78	1,30 ± 0,78	7,79 ± 0,97
EC5	0,673 ± 0,041	0,121 ± 0,040	13,46 ± 0,82	2,42 ± 0,80	11,1 ± 1,14
EC6a	0,518 ± 0,042	0,168 ± 0,036	10,36 ± 0,61	3,36 ± 0,83	7,02 ± 1,11
EC6b	0,514 ± 0,038	0,169 ± 0,035	10,28 ± 0,72	3,38 ± 0,77	6,42 ± 1,04
EC6c	0,560 ± 0,032	0,238 ± 0,039	11,20 ± 0,65	4,76 ± 0,78	6,45 ± 1,01
EC6d	0,537 ± 0,063	0,198 ± 0,044	10,74 ± 1,26	3,95 ± 0,80	6,79 ± 1,53
EC7a	0,429 ± 0,068	0,121 ± 0,033	8,58 ± 1,35	2,42 ± 0,66	6,15 ± 1,50
EC7b	0,408 ± 0,051	0,095 ± 0,036	8,16 ± 1,03	1,90 ± 0,72	6,25 ± 1,25
EC8a	0,396 ± 0,027	0,080 ± 0,030	7,92 ± 0,54	0,56 ± 0,60	6,31 ± 0,81
EC8b	0,397 ± 0,025	0,098 ± 0,039	7,94 ± 0,50	1,96 ± 0,78	5,97 ± 0,92
EC9	0,463 ± 0,037	0,108 ± 0,035	9,26 ± 0,74	2,16 ± 0,69	7,09 ± 1,02
EC10	0,397 ± 0,025	0,068 ± 0,024	7,94 ± 0,50	1,36 ± 0,48	6,59 ± 0,69
EC11	0,400 ± 0,033	0,076 ± 0,039	8,00 ± 0,66	1,52 ± 0,78	6,48 ± 1,03
EC12	0,435 ± 0,028	0,089 ± 0,028	8,70 ± 0,55	1,78 ± 0,56	6,93 ± 0,79
EC14	0,715 ± 0,051	0,176 ± 0,028	14,31 ± 1,01	3,52 ± 0,56	10,78 ± 1,16
EC15	0,658 ± 0,030	0,160 ± 0,020	13,15 ± 0,61	3,21 ± 0,39	9,94 ± 0,72
EC16	0,662 ± 0,026	0,180 ± 0,021	13,24 ± 0,51	3,61 ± 0,42	9,63 ± 0,66

Tabla 18. Ídem tabla 16 pero contiene las inmobilizaciones realizadas a partir de extracto crudo de CALB(EC) con SG, S o G agregado. Las letras a,b,c,d se refiere a repeticiones del mismo ensayo.

Con los datos de proteínas adsorbidas en 100 mg de soporte y la concentración inicial de CALB en las soluciones de inmobilización presentados en las tablas precedentes se graficaron las isotermas de adsorción para analizar el efecto de las distintas soluciones de inmobilización en la adsorción de la enzima.

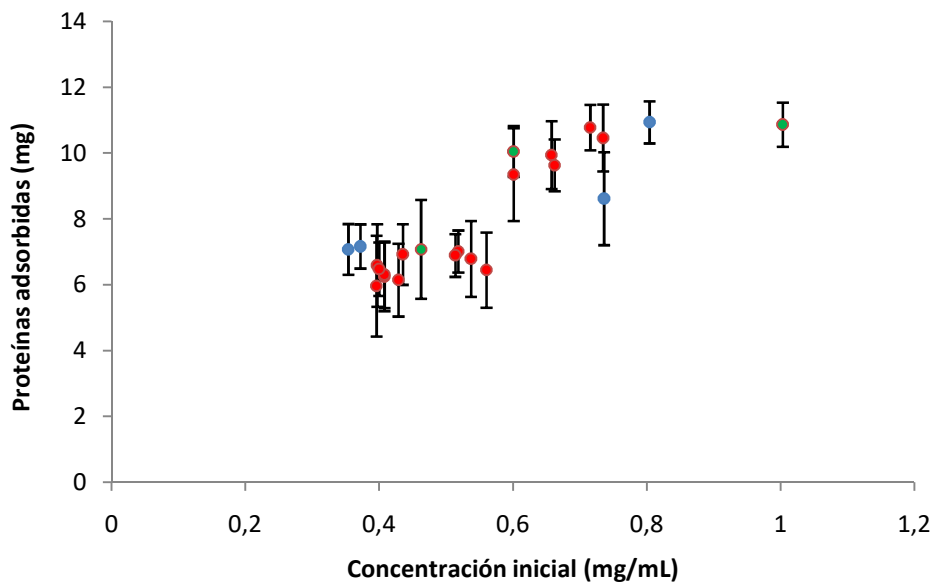


Figura 16. Isotherma de adsorción de CALB. ●CALB pura, ●ECsin SG y ●ECcon SG/S/G.

Observando las isothermas de adsorción se evidencia que la cantidad de proteínas adsorbidas al soporte aumentó cuando la concentración inicial de proteínas fue mayor y que existe un máximo entre 10 y 11 mg de proteínas adsorbidas cada 100 mg de soporte, ya que al aumentar la concentración inicial de la solución no se logra mayor adsorción. El valor límite de concentración inicial a partir del cual no se observa mayor adsorción de CALB es alrededor de 0,7 mg/mL, este sería el valor óptimo para obtener la mayor adsorción de proteínas posible en las condiciones de trabajo, sin desperdiciar muestra.

Los distintos tipos de biocatalizadores preparados mostraron isothermas de adsorción coincidentes y valores similares en los máximos de adsorción. Esto permite considerar que la adsorción de proteínas es independiente de la presencia de glicerol, sorbitol y el resto de las sustancias presentes en el extracto.

4.1.3. Electroforesis desnaturalizante

En la siguiente figura se muestra el gel SDS-PAGE en el que se sembró las muestras correspondientes a la solución de CALB pura diluida, un marcador de peso molecular a los t_0 y t_f del catalizador EC7b que fue sintetizado a partir de extracto crudo y solución de agentes promotores de actividad 25 % p/V sorbitol - 25 % p/V glicerol, **figura 17**.

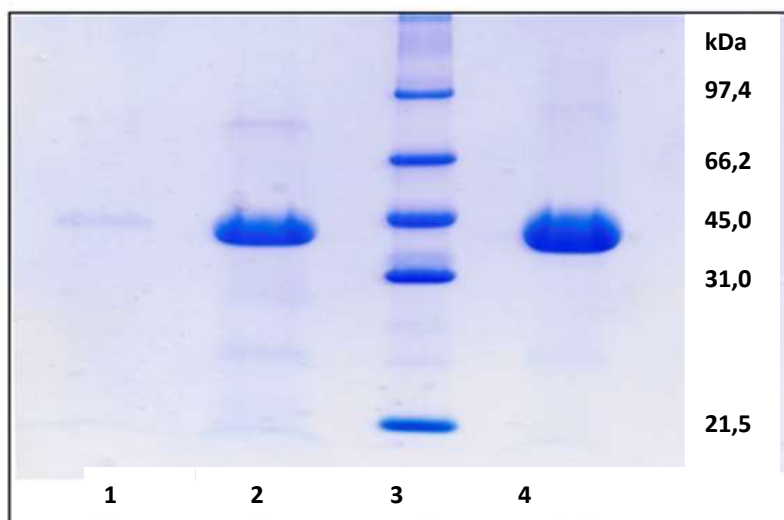


Figura 17. Corrida electroforética SDS-PAGE. Se sembraron 15 μ L t_f EC7b (calle 1), 15 μ L t_0 EC7b (calle 2), 3 μ L Patrón de PM en kDa (calle 3), 15 μ L de solución de CALB purificada diluida (calle 4).

En las calles 1, 2 y 4 aparece una banda de mayor intensidad que corre a una altura entre las bandas de 31 y 45 kDa del patrón de peso molecular. Dicha banda correspondería a la lipasa CALB cuyo peso molecular es 33,5 kDa y aparece en forma más intensa en las muestras t_0 y en la solución de CALB pura, y en menor intensidad en la muestra t_f , correspondiente al sobrenadante luego de la inmovilización. En las calles 2 y 4 aparecen bandas de mayor y menor peso molecular correspondientes a las impurezas aunque en la solución de CALB pura (calle 4) estas se encuentran

en menor cantidad, la mayoría de estas impurezas fueron eliminadas durante el proceso de purificación.

La diferencia de intensidad que se observa en la banda correspondiente a la proteína en las calles 1 y 2 se debe a que gran parte de la proteína presente en la solución inicial se adsorbió al soporte.

4.2. Estudio de los biocatalizadores

En esta sección se interpretarán los resultados obtenidos con las distintas técnicas utilizadas para estudiar y caracterizar los biocatalizadores producidos. Se incluyen los análisis cuantitativos por microsonda de electrones (EDS), las medidas de actividad biocatalítica en los distintos medios, y la determinación de la estabilidad de los biocatalizadores en las condiciones de reacción.

4.2.1. Análisis cuantitativo por microsonda de electrones

La **tabla 19** muestra la masa de C y Ti obtenida mediante el análisis por EDS, las cantidades de lipasa, soporte y otras especies orgánicas calculadas con esos valores y la comparación entre la cantidad de proteínas obtenida mediante los ensayos bioquímicos (Método de Bradford) en tres biocatalizadores de CALB/TiO₂. Dos de ellos preparados con CALB pura, conteniendo distintas cantidades de proteínas adsorbidas y uno preparado con extracto crudo.

El cálculo de las cantidades de lipasa y TiO₂ se realizaron utilizando los valores obtenidos por EDS de C y Ti y los porcentajes teóricos de C y Ti en CALB y TiO₂ 53,52 % y 59,95% respectivamente. La cantidad de las otras especies orgánicas (glicerol y sorbitol) en EC se obtuvo considerando una cantidad similar de proteínas adsorbidas que en P4 y conociendo el porcentaje teórico de C en los polialcoholes (39,5%).

Biocatalizador	P3	P4	EC
Masaspor EDS (mg)			
C	3,61	4,56	6,13
Ti	56,52	54,90	54,93
Masascalculadas (mg)			
Proteínas	6,75	8,52	8,50
Glicerol-Sorbitol	0,00	0,00	4,00
TiO₂	94,28	91,58	91,63
Proteínas adsorbidas (mg cada 100 mg de soporte)			
EDS	7,16	9,30	9,28
Bradford	7,08	10,94	10,90
Polialcoholes adsorbidos (mg cada 100 mg de soporte)			
EDS	0,00	0,00	4,37

Tabla 19. Resultados obtenidos por el análisis por microsonda de electrones de los biocatalizadores P3, P4 y EC.

La cuantificación de C en el biocatalizador preparados con extracto crudo mostró una mayor cantidad que el preparado con CALB pura, 6,13% y 4,56% respectivamente. Esta diferencia se puede atribuir a los demás componentes del EC unidos sobre el soporte y representan 4,37 mg de polialcoholes (glicerol y sorbitol) cada 100 mg de soporte.

Se puede observar que este nuevo método para cuantificar proteínas unidas al soporte sólido mostró resultados similares a los obtenidos por el método de Bradford, muy usado en soluciones de proteínas. Se destaca que no existen antecedentes en la literatura en esta disciplina por lo cual se debió realizar la puesta a punto y el análisis de esta técnica.

4.2.2. Estudio de la actividad biocatalítica

Esta sección presenta los resultados obtenidos de la actividad enzimática de los biocatalizadores en los distintos ensayos de esterificación de ibuprofeno racémico con etanol.

Las distintas condiciones que se estudiaron fueron:

- Mezclas de reacción con y sin isooctano
- Uso de biocatalizadores con distintos agregados de agentes promotores de la actividad, sorbitol y glicerol
- Distinta actividad acuosa en el MR por el agregado de tamices moleculareso agua.

Luego de que la reacción de esterificación se determinó el porcentaje de conversión del ibuprofeno (%X) a través de la titulación ácido-base del ibuprofeno remanente y el cálculo del exceso enantiomérico del sustrato S-ibuprofeno (%ees) por HPLC quiral. La **figura 18** muestra a modo de ejemplo el cromatograma obtenido en la corrida de una solución de ibuprofeno racémico. Se observa que primero eluyó el S-ibuprofeno que no se esterificó y después el R-ibuprofeno. Para cada ensayo se realizó una corrida similar, con las áreas de cada pico se calculó el exceso enantiomérico, como se explicó en el ítem **3.3.2.3**.

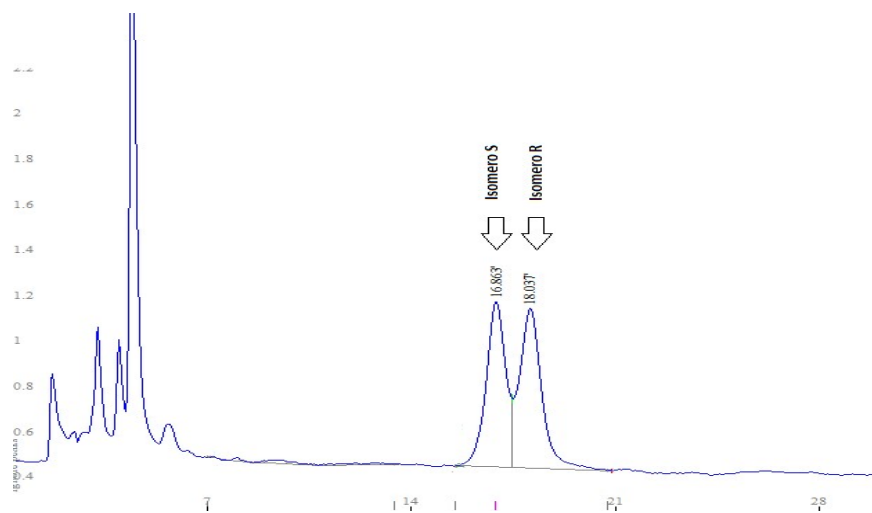


Figura 18. Cromatograma resultado de HPLC quiral de una solución de ibuprofeno racémico. El eje horizontal indica el tiempo de retención en minutos y el eje vertical la intensidad. Se encuentran señalados con flechas los picos correspondientes al isómero S-ibuprofeno y al R-ibuprofeno

4.2.2.1. Presencia de cosolvente

Se determinó la actividad biocatalítica en los dos medios de reacción: IEIbu (con cosolvente) y EIbu (sin cosolvente), **tabla 11**. En estos ensayos se utilizó el catalizador EC6.

Se obtuvo una gran diferencia en la actividad catalítica en ambos medios siendo el medio IEIbu más eficiente con un porcentaje de conversión de $43,2 \pm 1,8$ frente al EIbu donde fue de $9,5 \pm 1,1$. Estos resultados se exponen en las **figuras 20 y 21**. El etanol en concentraciones elevadas provoca la disminución de la actividad catalítica, esto concuerda con datos encontrados en la bibliografía⁶⁹ donde se atribuye al etanol la inhibición por sustrato por un efecto de deshidratación sobre las moléculas de proteínas, a su vez este efecto depende de varios factores, como el tipo de enzima, el soporte de inmovilización utilizado, la composición del medio de reacción y la condiciones de operación.

Por este motivo se decidió seguir trabajando con el medio IEIbu para el resto de los ensayos realizados.

4.2.2.2. Proteínas adsorbidas

En esta sección se estudia la relación entre los datos de proteínas adsorbidas al soporte con los resultados de actividad catalítica.

En la **tabla 20** se muestran los resultados de proteínas adsorbidas al soporte, porcentaje de conversión (%X) y enantioselectividad para el sustrato S-ibuprofeno (%ees) de los biocatalizadores EC3, EC4, EC5, EC6, EC7 y EC14 sintetizados en presencia de ambos agentes promotores de actividad sorbitol y glicerol. Con estos resultados se realizó el gráfico que se presenta en la **figura 19**, en el mismo se observa que, si bien la cantidad de proteínas adsorbidas es variable, la actividad catalítica y el exceso enantiomérico resultante es similar. Por ejemplo, al comparar los biocatalizadores EC7 y EC14, EC7 contiene 6,20 mg de proteínas adsorbidas, cantidad mucho menor que EC14, que posee 10,78 mg de proteínas adsorbidas, sin embargo la actividad catalítica del primero es de 46,9 % y 31,3 % de exceso enantiomérico hacia el enantiomero S-ibuprofeno y el

segundo tiene un 44,8 % de actividad y 32,1 % de exceso enantiomérico hacia el enantiómero S-ibuprofeno.

Biocatalizador	Protads (mg)	%X	%ees
EC3	8,74	52,1 ± 4,6	33,5
EC4	7,79	47,3 ± 1,2	32,2
EC5	11,1	47,8±2,1	36,6
EC6	6,67	43,2 ± 1,8	26,8
EC7	6,20	46,9 ± 1,8	31,3
EC14	10,78	44,8 ± 3,0	32,1

Tabla20. Proteínas adsorbidas a la superficie del catalizador, porcentaje de conversión (%X) y de enantioselectividad (%ees).

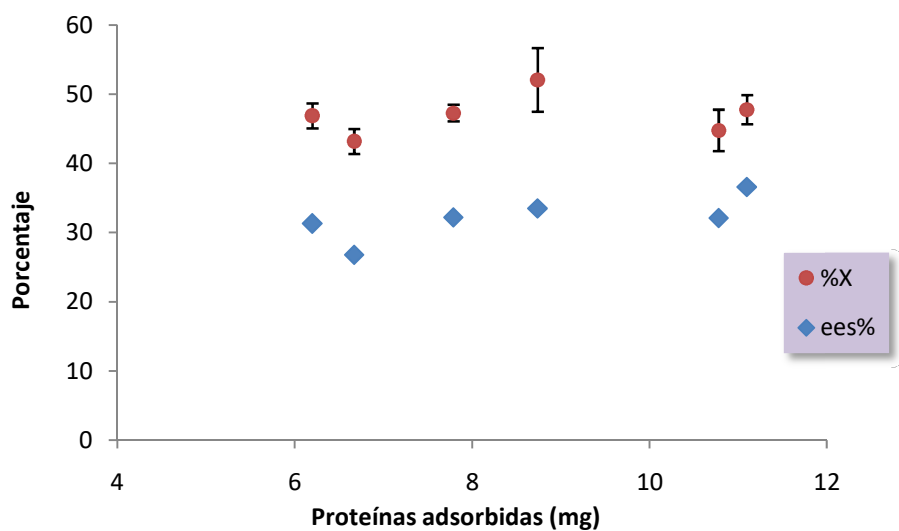


Figura 19. Gráfico que relaciona proteínas adsorbidas con los porcentajes de conversión (%X) y de enantioselectividad (%ees).

En el rango de cantidad de proteínas adsorbidas logrado en este trabajo, la actividad de los biocatalizadores es similar, esto podría indicar que la cantidad de proteína que se adsorbe extra al soporte se encuentra inactiva y esto puede deberse a problemas difusionales. Por ejemplo, a que se adsorban formando capas de proteínas, las que se encuentran debajo no alcanzan el sustrato.

En conclusión no se ha encontrado una correlación evidente entre la masa de proteínas adsorbidas al soporte y la actividad del biocatalizador.

4.2.2.3. Efecto del agregado de agentes promotores de la actividad

Se conoce que estas sustancias tienen un efecto positivo sobre la actividad enzimática^{68,70}. En ese sentido, se estudió el efecto del agregado de los agentes promotores de actividad sorbitol y glicerol en el proceso de inmovilización sobre la actividad catalítica resultante.

Para ello se comparó la actividad de los distintos biocatalizadores en las mismas condiciones de reacción, se utilizó la MR con cosolvente y bajo contenido acuoso (IEIbu*). Los biocatalizadores estudiados fueron los que se sintetizaron de la siguiente manera (**Tabla 7**):

- sin agregado de agentes promotores (EC13),
- con 3,6 mL de la mezcla de ambos agentes promotores, (EC8),
- con 3,6 mL de la solución de sorbitol 25% (EC9)
- con 3,6 mL de solución de glicerol 25% (EC10),
- con 3,6 mL de solución de Sorbitol al 50 % (EC15)
- con 3,6 mL de solución de glicerol al 50 % (EC16)

Los resultados obtenidos, graficados en la **figura 20**, muestran que la actividad catalítica aumenta un 39,7 % cuando en la preparación del biocatalizador se agregan ambos promotores (EC8) con respecto a un biocatalizador sin agregados EC13. Cuando sólo se adiciona uno de los agentes promotores al 25% se observa que disminuye el porcentaje de conversión con respecto a EC8, en el caso de EC10 (25% G) se obtuvo un 87,4 % de conversión y con EC9 (25% S) un 87,6% de conversión. A los biocatalizadores EC15 y EC16 se les adicionó solo uno de los agentes promotores en el doble de concentración suplantando la cantidad del otro y se observó que con el agregado

de sorbitol al 50 % la actividad sigue siendo menor que el biocatalizador que presenta ambos aditivos EC8, alcanzando el 89,7 % de conversión. En cambio, con el agregado de glicerol al 50 % la actividad aumenta al 113,6 %.

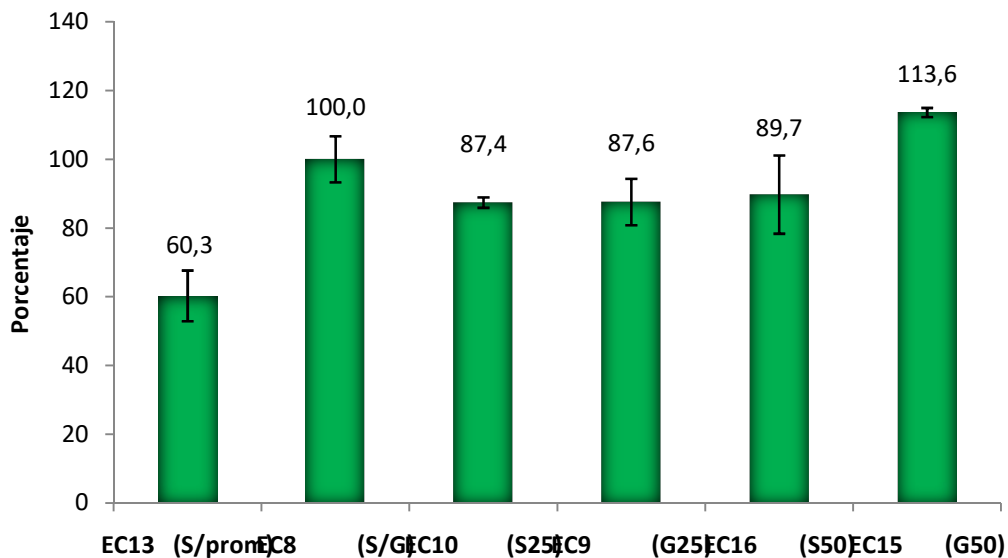


Figura 20. Efecto del agregado de distintas cantidades de agentes promotores y sin el agregado de los mismos. En el eje de las abscisas se indica el porcentaje de conversión respecto a EC8 que contiene S 25%- G 25% se considera el 100%.

En efecto, estos agentes que ya se encuentran presentes en el extracto crudo, al adicionarlos en el proceso de inmovilización también se adsorben a la superficie de TiO_2 y favorecen la actividad catalítica de la enzima dado que permitirían mantener su estructura nativa y por lo tanto, el porcentaje de conversión del biocatalizador aumenta. Cuando se adiciona solo uno de los agentes promotores manteniendo la concentración de 25 % los porcentajes de conversión alcanzados con sorbitol o con glicerol son muy similares y resultan menor que cuando están presente ambos pero mayor que cuando no se adiciona ninguno. Por otra parte al adicionar otra vez por separado pero en el doble de concentración el efecto positivo en la actividad enzimática resultó mayor con el agregado de la solución de glicerol al 50 % inclusive superó al de S25-G25 en

un 13,6 %. En el caso en que se adicionó la solución de sorbitol al 50 % el resultado no mostró diferencia significativa con respecto a EC10.

Podemos notar que la actividad catalítica no depende de las proteínas adsorbidas sino de los componentes del medio. En distintas fuentes bibliográficas se detalla que, cuando se emplean medios orgánicos en biocatálisis casi siempre incorporan otros componentes además de las enzimas puras, como impurezas de proteínas, azúcares, polisacáridos, polioles, buffers, sales, etc. Todos estos componentes mencionados pueden afectar las relaciones de agua disponible para el catalizador y el agua tiene un efecto importante sobre la actividad de tal biocatalizador. Algunos aditivos pueden cambiar considerablemente el perfil actividad/ a_w , de enzimas, promoviendo la actividad a valores más bajos de a_w ⁷¹. Se los considera “imitadores” o “reemplazantes” del agua. En este sentido, líquidos como el glicerol, etilenglicol o formamida realzarán considerablemente la actividad de enzima^{72, 73}. La adición de dichos aditivos, manteniendo el contenido de agua fijo, reduce a_w ; lo que se representa un aumento en el perfil velocidad/ a_w en niveles del agua menores a los considerados óptimos para las enzimas. Esto ha sido demostrado directamente en los sistemas de a_w conocida⁷⁴.

Por otra parte, se comprobó el efecto positivo de la presencia de sorbitol durante la inmovilización, en estudios de transesterificación entre tributirina y 2-pentanol en isooctano con lipasas provenientes de *Candida rugosa* inmovilizada en celite. Cuando la enzima fue empleada en presencia de sorbitol, resultaron velocidades de reacción 16 veces mayores que en el control y disminuyó la hidrólisis⁷⁰. Se atribuye el efecto a que el sorbitol protegió la enzima durante la adsorción sobre la matriz sólida, situación de stress que produce la inmovilización⁷⁰.

4.2.2.4. Efecto de la actividad acuosa

Incluso aunque los medios de reacción contienen principalmente solventes orgánico y/o sustratos, el agua es necesaria para mantener la enzima activa. Por otra parte, el agua en la mezcla de reacción puede causar el equilibrio desfavorable en la reacción inversa a la hidrólisis y conducir a reacciones de hidrólisis en reacciones de transesterificación. Por lo tanto, los estudios de la influencia del contenido de agua en el medio de reacción orgánico sobre las reacciones catalizadas por enzimas hidrolíticas tienen una importancia crucial⁷⁵.

Se han publicado numerosos informes sobre el efecto de actividad de agua sobre la actividad catalítica de hidrolasas en medio orgánico^{76,77}, enzimas diferentes tienen exigencias bastante diferentes para la actividad acuosa y que sistemas diferentes (distintos soportes de inmovilización y distintos solventes orgánicos) van a influir en la actividad a_w resultante y por lo tanto en la actividad catalítica.

Considerando el sistema de trabajo presentado, se espera que disminuyendo la cantidad de agua del medio gracias al efecto de los tamices moleculares se podría favorecer la esterificación al verse afectado el equilibrio de la reacción y aumentar la actividad del biocatalizador.

En este sentido, se realizaron distintas determinaciones:

En los ensayos realizados con el biocatalizador EC7 se utilizó la MR con cosolvente (IEIbu) con distintos contenidos acuoso. En un caso conteniendo sólo los componentes de la MR, con adición de agua hasta saturar el solvente y con agregado de tamices moleculares. Los resultados se muestran en la **tabla 21**.

Como se esperaba, la a_w inicial en la MR con tamices moleculares fue la más chica, de sólo, 5,4, en el medio se encuentra el que corresponde a la MR sin tamices que fue de 45,5 y se llegó a un mayor valor, 57,5, en la MR que se le adicionó agua destilada. Por otra parte, se observó que la a_w final es similar en todos los casos, entre 79 % y 89%. La actividad catalítica observada no tuvo una diferencia importante entre los tres ensayos. La actividad en IEIbu* resultó sólo levemente mayor que en los otros dos ensayos.

En las condiciones ensayadas no se puede concluir que una menor a_w implique un aumento en la actividad de los biocatalizadores con SG agregado. Tampoco podemos observar una relación entre el aumento de la a_w durante el ensayo ($a_{w\text{final}} - a_{w\text{inicial}}$) y el porcentaje de conversión como era esperado.

	MR	a_w i	a_w f	Actividad (%X)
EC7	IEIbu	45,5	89,3	43,4 ± 1,7
	IEIbu*	5,4	88,7	46,9 ± 1,8
	IEIbu c/agua	57,5	78,7	45,9 ± 1,9

Tabla 21. Indica los datos del biocatalizador EC7 que fue ensayado, las MR utilizadas, la actividad acuosa inicial que corresponde a la MR y final y los porcentajes de conversión.

En la **tabla 22** se muestran los resultados obtenidos utilizando el catalizador EC8. En los mismos se estudió el efecto del agregado de tamices durante el ensayo de actividad en los cuales se utilizó la MR con cosolvente y bajo contenido acuoso IEIbu* y además se le agregaron tamices moleculares durante la incubación (**figura 12**), uno tuvo el doble de la masa de tamices que el otro (65,8 mg y 125,0 mg) esto provocó la disminución de actividad acuosa cuanto más tamices se agregaron, podemos notar que la a_w final es menor cuando la masa de tamices moleculares es mayor y que se obtuvo un pequeño aumento en la actividad catalítica. Los resultados fueron menores a otros ensayos debido a un inconveniente técnico ocurrido en la agitación durante la incubación de los mismos durante el ensayo de actividad.

	MR	Tamices	a_w i	a_w f	Actividad (%X)
EC8	IEIbu*	65,8 mg	9,8	40,9	26,7 ± 2,6
	IEIbu*	125 mg	9,8	30,2	29,7 ± 0,8

Tabla 22. Indica los datos del biocatalizador EC8 que fue ensayado, las MR utilizadas junto con los tamices adicionados en los ensayos correspondientes, la actividad acuosa inicial que es la a_w de la MR y final y los porcentajes de conversión.

En conclusión se observó que el aumento de a_w durante ambos ensayos fue menor que en los anteriores porque la actividad fue menor y porque suponemos que parte del agua producida fue adsorbida por los tamices, en mayor cantidad cuando más tamices se agregaron. La actividad fue mayor al aumentar la cantidad de tamices moleculares pero se deberían realizar más pruebas para comprobar esta aseveración.

Por último, se analizó el efecto del uso de MR con bajo a_w y de a_w normal (**tabla 11**) utilizando los biocatalizadores preparados con sólo uno de los promotores, EC9 (sintetizado con 25% S) y EC12 (sintetizado con 25% G).

En estos ensayos también se obtuvo baja actividad por problemas en la agitación. Como se muestra en la **tabla 23**, se observó una notoria mayor conversión en el medio de menor a_w . En EC9 la actividad catalítica aumentó de 23,95 % a 32,95 % y en el caso de EC12 la actividad fue levemente mayor, de 27,5 % a 34,4 % cuando disminuyó el contenido de agua del medio.

	MR	Actividad (%X)
EC9 (25%S)	IEIbu	23,9
	IEIbu*	32,9
EC12 (25%G)	IEIbu	27,5
	IEIbu*	34,4

Tabla 23. Indica los biocatalizadores ensayados, las MR utilizadas y el porcentaje de conversión

Observando los catalizadores EC7, EC9 y EC12 también se puede comparar el aumento de actividad cuando se utilizó la MR IEIbu y la MR con bajo contenido acuoso IEIbu* en cada caso, el porcentaje de aumento de la actividad catalítica de cada biocatalizador fue de 8 %, 38 % y 25% respectivamente resultando más favorable esta estrategia de la disminución de la actividad acuosa para provocar el aumento de la actividad catalítica en el caso de EC9 que fue sintetizado solo con sorbitol 25% como agente promotor.

4.2.3. Medidas de estabilidad de los biocatalizadores

En estudios previos se comprobó que existe desorción de la enzima en medio acuoso ^{Error!} debido a la reversibilidad de la unión iónica entre la enzima y el soporte, esta unión es sensible a las condiciones del medio y en el caso del agua que es una sustancia polar se vuelve más lábil. Por este motivo se estudió la estabilidad de los biocatalizadores preparados en los

medios de reacción utilizados en este trabajo: con cosolvente, etanol 0,12M, ibuprofeno 0,12M en isooctano, y sin cosolvente, ibuprofeno 1,65 M en etanol con 4,8% de agua.

Para probar que no hubiera desorción proteica en los medios de reacción utilizados se realizó un tratamiento previo al ensayo de actividad como se describió previamente (**figura13**), se utilizó el biocatalizador EC6. El sobrenadante que se obtuvo se analizó mediante la determinación de actividad catalítica y mediante espectroscopia UV-Visible.

4.2.3.1. Medida de actividad catalítica

En la **figura 21** y la **figura 22** se muestran los resultados de la actividad catalítica de los biocatalizadores que fueron sometidos al tratamiento de incubación previa, los sobrenadantes de los mismos y, a modo de comparación, biocatalizadores que no fueron sometidos al tratamiento en ambos medios, IEIbu e EIbu.

Se observa que no hay diferencia significativa en el porcentaje de conversión alcanzado entre los catalizadores que sufrieron el tratamiento previo y los que no. Se alcanzó una conversión de 43,2 % cuando no se realizó el tratamiento previo y 47,4 % con tratamiento previo en presencia de cosolvente, mientras que sin tratamiento previo fue de 9,5 % y los que se fueron pretratados de 7,0 % en un medio sin cosolvente.

También se ve que los sobrenadantes no presentan actividad o es muy poca en el caso de la **figura 21**, esto indicaría que no hay enzima activa en la solución.

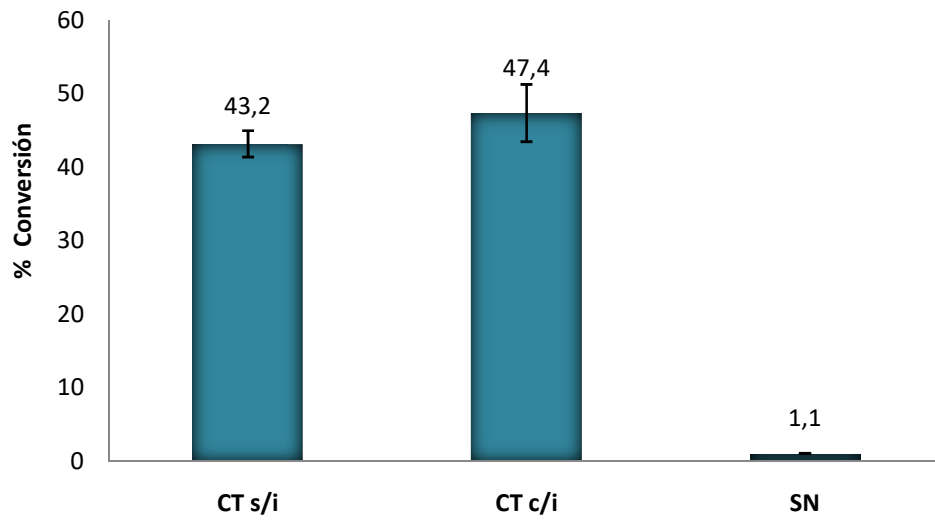


Figura 21. Porcentaje de conversión (%X) de los biocatalizadores sin tratamiento de incubación previa (CT s/i), y de sólidos (CT c/i) y sobrenadantes de los biocatalizadores tratados en un medio que contiene cosolvente.

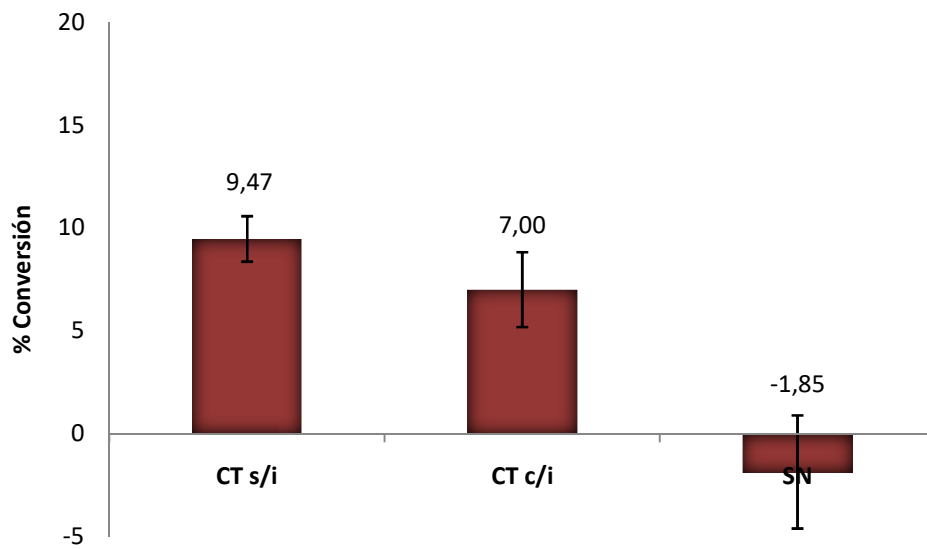


Figura 22. Porcentaje de conversión (%X) de los biocatalizadores sin tratamiento de incubación previa (CT s/i), con incubación previa (CT c/i) y los sobrenadantes de los últimos (SN) en un medio que no contiene cosolvente.

Los biocatalizadores en los que se utilizó la MR sin cosolvente tuvieron un %X notoriamente más bajo que los que contenían isooctano como cosolvente como se mencionó en el ítem **4.2.2.1**.

En base a los resultados obtenidos se podría concluir que los pretratamientos de los biocatalizadores no afectan negativamente la actividad de los mismos. Además se evidenció que no se desprende enzima activa del soporte de manera significativa ya que no se observó actividad en el sobrenadante. Sin embargo, no se puede descartar la presencia de enzima que se desorbió inactiva en el medio, dichas proteínas podrían constituir un contaminante del producto. Para descartar su presencia se realizaron los espectros UV-visibles de las soluciones de los sobrenadantes (ítem **4.2.4**).

Por otra parte, también es remarcable que los niveles de actividad se mantienen elevados aún después de 24 h en las condiciones de exposición a solventes orgánicos, agitación intensa y alta temperatura. Estos resultados contrastan con lo observado en buffer acuoso donde se observó actividad enzimática en los sobrenadantes luego de 1 h de incubación ^{iError! Marcador no definido.}. Esto se puede explicar por la distinta polaridad de los solventes usados en cada caso. Los solventes orgánicos como isooctano e, incluso, etanol no estarían produciendo desorción enzimática desde el TiO₂ al medio.

4.2.3.2. Espectros UV-Visible

Para detectar si existe desorción de enzima inactiva u otras sustancias desde los biocatalizadores, se estudiaron los espectros de absorción UV-visibles de distintas soluciones. En un caso, una solución de sorbitol 25%p/V-glicerol 25%p/V en etanol en isooctano (SG+EI) y otra compuesta por extracto crudo liofilizado en el mismo medio (EC+EI). En dichos espectros se observarían las señales obtenidas debidas a los agentes promotores en la primera solución y al resto de los componentes presentes en el extracto crudo en la segunda. Estos espectros se compararon con el de las soluciones sobrenadantes de los ensayos de estabilidad.

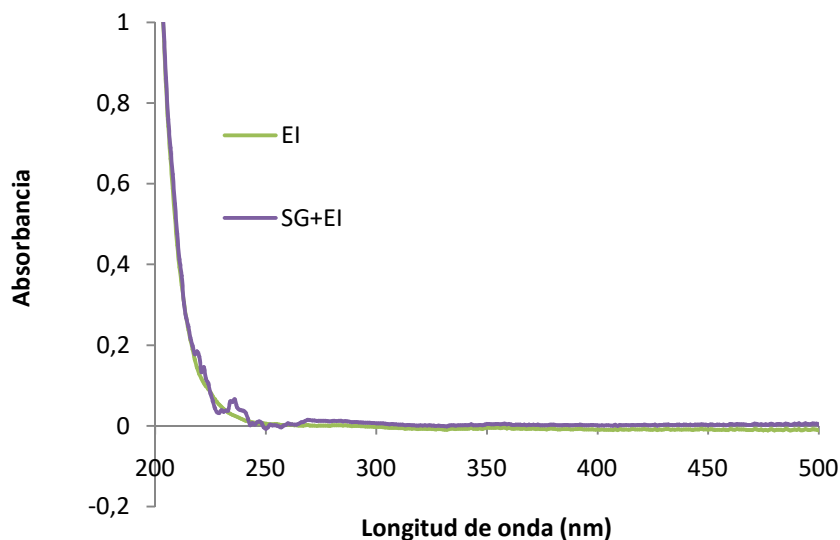


Figura 23. Espectros de absorción UV-visible de la sc. de etanol en isooctano (EI) y de una sc. de sorbitol 25%p/V-glicerol 25%p/V en EI (SG+EI).

La **Figura 23** muestra el espectro de absorción de las soluciones EI y la solución de sorbitol 25%p/V-glicerol 25%p/V en EI. Se observa en ambas soluciones un comportamiento similar, la absorbancia aumenta hacia las menores longitudes de onda mientras que es muy baja por encima de 230 nm. Por lo tanto, se considera que ni el sorbitol ni el glicerol presentan alguna señal característica en EI por encima de 230 nm que interfiera con la visualización de otras sustancias que se pueden desprender.

La **figura 24** presenta los espectros UV-Visibles de la solución EI y de una solución de extracto crudo en EI (EC+EI). En este caso también se observa altos niveles de absorbancia alrededor de 200 nm. A 230 nm aproximadamente se observa una diferencia entre ambos espectros que puede deberse a otras impurezas presentes en el EC como el benzoato de sodio⁶⁸. Además en el espectro de la solución que contiene el extracto crudo se observa un pico importante que abarca un rango de longitudes de onda desde 250 nm a 300 nm, esto corresponde a la suma de absorbancias de distintas especies con picos individuales conocidos a 280 nm y 260 nm como las proteínas y ácidos nucleicos respectivamente y otras impurezas presentes en el EC, como el sorbato de potasio que también tiene una absorbancia característica a 260 nm⁶⁸.

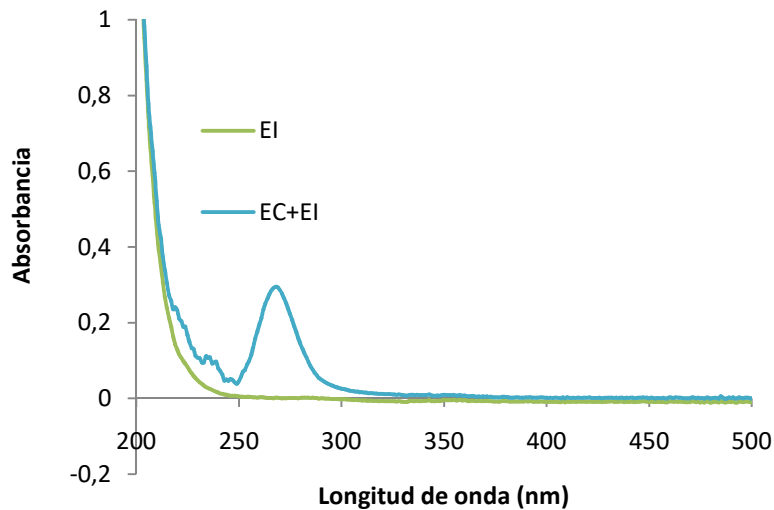


Figura 24. Espectros de absorción UV-visible de la sc. de etanol en isoctano (EI) y de una sc. de extracto crudo liofilizado en EI (EC+EI).

Estos resultados son útiles para identificar las señales de los componentes del extracto crudo que en caso de encontrarse en el espectro de absorción de los sobrenadantes, indicaría la existencia de desorción de alguno de los componentes del biocatalizador al medio.

El espectro de absorción obtenido a partir de las muestras correspondientes a los sobrenadantes de las pruebas de estabilidad (**Figura 25**) no presentan picos de absorbancia notorios en el rango de 250 nm a 300 nm que se observó el espectro de absorción de EC+EI en la **figura 24**, solo se observó un leve aumento de la absorbancia. Esto indicaría que no hubo desprendimiento de proteínas y otras sustancias durante el tratamiento de incubación o que fue muy escaso. Por otro lado no se puede afirmar nada sobre el desprendimiento de los agentes promotores sorbitol y glicerol ya que de acuerdo a la **figura 22** no se detecta ninguna señal de absorbancia.

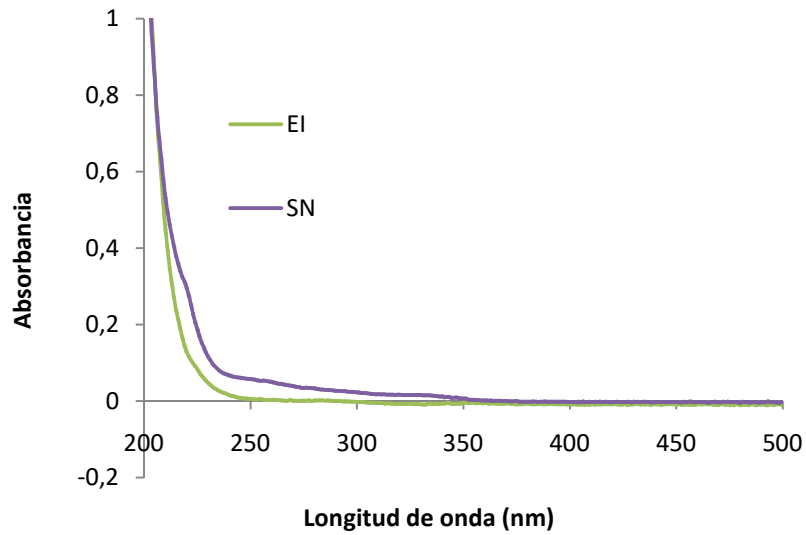


Figura 25. Espectros de absorción UV-visible de los sobrenadantes de los ensayos de estabilidad M1 y M2 que contienen MR sin ibuprofeno (EI: sc. de etanol en isooctano)

5. CONCLUSIONES

Durante la preparación del biocatalizador se observó que:

- Se logró purificar CALB a partir del extracto crudo comercial mediante una cromatografía de exclusión molecular para preparar los biocatalizadores P, con el fin de obtener la isoterma de adsorción a partir de los datos de cuantificación de proteínas y por otro lado estudiar los componentes de la superficie por EDS.
- Se verificó la purificación de la enzima mediante la electroforesis SDS-page de la muestra de CALB purificada, que resulto similar a CALB pura sigma.
- En cuanto a la adsorción de proteínas se vio que a mayor concentración de proteínas iniciales en la mezcla de inmovilización la cantidad de proteínas adsorbidas aumenta hasta un máximo entre 10 y 11 mg de proteínas adsorbidas cada 100 mg de soporte. Se pudo concluir que el valor óptimo para obtener la mayor adsorción de proteínas posible en las condiciones de trabajo es de 0,7 mg/mL.
- No parece haber diferencia en la adsorción de proteínas entre distintas fuentes de la enzima como CALB pura, extracto crudo y EC con agregado de promotores de actividad.

En relación al estudio de los biocatalizadores sintetizados se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se estudiaron los componentes adsorbidos en la superficie de los biocatalizadores mediante EDS. Este nuevo método de microsonda de electrones, para cuantificar proteínas unidas al soporte sólido mostró resultados similares a los obtenidos por el método de Bradford, muy usado en soluciones de proteínas. El cálculo de las cantidades de lipasa y TiO_2 se realizó utilizando los valores obtenidos por EDS de C y Ti y los porcentajes teóricos de C y Ti en CALB y TiO_2 . La cuantificación de C en el biocatalizador preparados con extracto crudo mostró una mayor cantidad que el preparado con CALB pura, 6,13% y 4,56% respectivamente. Esta diferencia tiene sentido debido a la presencia de los demás componentes del EC unidos al soporte y representan 4,37 mg de polialcoholes (glicerol y sorbitol) cada 100 mg de soporte.

- Resultaron porcentajes de conversión más elevados en el medio de reacción que contenía el co-solvente (IEIbu) en comparación con el que no (EIbu).

- Se observa un efecto positivo en el porcentaje de conversión obtenido cuando se suplementan agentes promotores de actividad en el proceso de inmovilización del biocatalizador ya que el extracto crudo cuenta con una cantidad pequeña de sorbitol y glicerol. Este efecto fue aún mejor cuando se adicionó solo glicerol 50%.

- En el estudio del efecto de la actividad acuosa (a_w) en la reacción de esterificación con distintos contenidos acuoso en la MR IEIbu:

No se puede concluir que una a_w menor no implicaría un aumento en la actividad de los biocatalizadores con SG agregado. Tampoco se observó relación entre el aumento de la a_w (a_w final - a_w inicial) y el % X como era esperado. Al adicionar tamices durante el ensayo de actividad el %X aumentó cuando el número de tamices fue mayor y el contenido acuoso fue menor. Se deberían realizar más pruebas para comprobar esta aseveración.

Al disminuir la a_w de la MR en los biocatalizadores que se sintetizaron con un solo agente promotor se obtuvo mayor %X en el biocatalizador sintetizado solo con sorbitol 25%.

- Los biocatalizadores sintetizados demostraron ser estables en las condiciones de alta temperatura, presencia de solventes orgánicos y agitación intensa de ambos medios de reacción (con y sin co-solvente). En ese sentido, se observaron porcentajes de conversión muy similares entre los biocatalizadores que sufrieron tratamiento previo y los que no.

- Por otro lado, en ambos casos los sobrenadantes de la incubación no esterificaron el ibuprofeno y se comprobó por espectroscopia que no hubo desorción de la enzima activa ni de otros componentes en forma notoria.

En este trabajo se logró obtener de forma sencilla, económica y rápida un biocatalizador basado en CALB inmovilizada sobre nanopartículas de TiO_2 que resultaron ser estables, activos para la esterificación enantioselectiva de ibuprofeno racémico en condiciones de agitación de 200 rpm, 45 °C y medio orgánico con presencia de cosolvente. Se obtuvieron resultados prometedores.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ¹Anastas, P. T., Warner, J. C. (1998). Green Chemistry: Theory and Practice. Oxford University Press. New York. p. 30.
- ²Llerena Suster, C. R. F. (2011). Fitoproteasas como biocatalizadores en síntesis orgánica en medios acuosos orgánicos. Tesis Doctoral. LIPROVE. Fac Cs. Exactas. UNLP.
- ³Monsalve, L. N. (2009). Biocatálisis aplicada a reacciones de esteroides, terpenos y dicetonas y a la síntesis de poliamidoaminas lineales. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- ⁴Jordi, C. (2015). La lipasa B de *Candida* antártica en la síntesis de biocatalizadores. Tesina de grado. LIPROVE. Fac. de Cs Exactas. UNLP.
- ⁵Pollard, D. J., Woodley J. M. (2007). Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends in Biotechnol.* **25**:66-73.
- ⁶Adamczak, M., Hari Krishna, S. (2004). Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis. *Food Technol. Biotechnol.* **42**:251-64.
- ⁷Sheldon, R. A., Van Rantwijk, F., Van Langen, L. M., Wegman, M. A., Cao, L., Janssen, M. H. A. (2001), Biocatalysts and Biocatalysis in the synthesis of β -lactam antibiotics: chemistry, biocatalysis & process integration. (Bruggink, A., Roy, P.D.,eds.). Kluwer Acad Publ, Dordrecht.
- ⁸Woodley, J.M. (2008). New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Tibtech.* **26**:321-327.
- ⁹Shin, G. H., Kim, C., Kim, H. J., Shin, C. S. (2003). Stereoselective enzymatic synthesis of an aspartame precursor of N-CBZ-LAsp-L-PheOMe. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* **26**:2001-208.
- ¹⁰Morcelle del Valle, S. (2004). Proteasas de látex de *Funastrum clausum*. Caracterización y purificación y aplicación en la síntesis de péptidos en medios orgánicos. Tesis Doctoral. LIPROVE. Fac Cs. Exactas. UNLP.
- ¹¹Clapés, P., Morán, C., Infante, M.R. (1999). Enzymatic synthesis of arginine based surfactants. *Biotechnol. Bioeng.*, **63**:333-343.
- ¹²Guzmán, F., Barberis, S., Illanes, A. (2007). Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electr. J. Biotech.* **10**:279-314
- ¹³Boersma, Y.L., Dröge M.J., Quax W.J. (2007). Selection strategies for improved biocatalysts. *FEBS J.* **274**: 2181-95.
- ¹⁴Jose, C. (2013). Resolución biocatalítica de enantiómeros del ibuprofeno. Tesis Doctoral. CINDECA. Fac de Cs. Exactas. UNLP.
- ¹⁵IUBMB Nomenclature Homepage. <http://www.iubmb.org/>, 6/6/2015
- ¹⁶Pleiss J., Fischer M., Schmid R.D. (1998). Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem. Phys. Lipids.* **93**:67-80.
- ¹⁷Brockman, H. L. (1984). General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches, en "Lipasas. (B. Borgstrom y H.L. Brockman, eds.), Elsevier, Amsterdam, p. 346.
- ¹⁸Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V. T. (1999). Biochem: The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**:119-131.
- ¹⁹Cygler M., Schrag J.D., Ergon F. (1992) Advances in structural understanding of lipases. *Biotech. Genet. Eng. Rev.* **10**:143-184.
- ²⁰Cygler M., Schrag J.D. (1997) Lipases and Full-size image $\alpha\beta$ hydrolase fold. *Methods Enzymol.* **284**: 3-27.
- ²¹Arroyo-Sánchez M. (1995). Síntesis de ácidos 2-aril-propiónicos homoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- ²²Arroyo, M. (2000). Síntesis enantioselectivas catalizadas por lipasas microbianas. *An Real Soc Esp Fis.* **1**:19-24.

-
- ²³ Hernández-Fernández F.J. (2008). Desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos basados en el uso de líquidos iónicos, fluidos supercríticos y tecnología de membranas. Tesis doctoral. Universidad de Murcia, Murcia, España.
- ²⁴ Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Van Heuvel, M., Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS. Microbiol Rev.***15**:29-63.
- ²⁵ Kirk, O., Christensen, M. W. (2002). Lipase from *Candida antarctica*: Unique biocatalyst from a unique origin. *Org Process Res Dev.* **6**:446-451.
- ²⁶ Anderson, E. M., Larsson, K. M., Kirk, O. (1998). One biocatalyst- many applications: the use of *Candida Antarctica B*-lipase in organic synthesis. *Biocatal. Biotransform.***16**:181-204.
- ²⁷ Schmid R.D., Verger R. (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**:1608-1633.
- ²⁸ Uppenberg, J. Hansen, M.T. Patkar, S., Jones, T.A. (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida Antarctica*. *Structure***2**: 293-308.
- ²⁹ Salis A., Svensson I., Monduzzi M., Solinas V., Adlercreutz P. (2003). The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginose*. *Biochim. Biophys. Acta.***1646**: 145-151.
- ³⁰ Lozano P., De Diego T., Carrié D., Vaultier M., Iborra J.L. (2003). Lipase Catalysis in Ionic Liquids and Supercritical Carbon Dioxide at 150 °C. *Biotechnol. Prog.* **19**: 380-382.
- ³¹ Ottosson J., Fransson L., King J.W., Hult K. (2002). Size as a parameter for solvent effects on *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity. *Biochem. Biophys. Acta.***1594**: 325-334.
- ³² Uppenberg J., Oehrner N., Norin M., Hult K., Kleywegt G.J., Patkar S., Waagen V., Anthonen T., Jones A. (1995). Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry.***34**(51): 16838-16851.
- ³³ Verger R. (1997). Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends biotechnol.***15**: 32-38
- ³⁴ GIFTEX. Grupo de investigación en Fisicoquímica Teórica y Experimental. <http://ciencias.uis.edu.co/~mario/Lipasa-funcion-estructura.html>.
- ³⁵ Arroyo, M. (1998). Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Arms Pharm.***39**:23-39.
- ³⁶ Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. (2000). Industrial Biotransformations. Weinheim: Wiley-VCH.
- ³⁷ Llerena-Suster, C.R.F., Foresti, M.L., Briand, L.E., Morcelle, S.R. (2009). Selective adsorption of plant cysteine peptidases onto TiO₂. *Coll Surf B: Biointerfaces*, **72**:1 16-24.
- ³⁸ Reslow, M., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1988). On the importance of the support material for bioorganic synthesis. *Eur. J. Biochem.* **172**: 523-78.
- ³⁹ Quiroga, E., Obregón, W.D., Illanes, A. (2009). Inmovilización de fitoproteasas. En Enzimas proteolíticas de vegetales superiores. Aplicaciones industriales. (Caffini, N.O., ed.). 1a ed. - Buenos Aires, Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
- ⁴⁰ Godia Casablanca, F., López-Santín, J. (1998). Ingeniería bioquímica. (Godia Casablanca, F., López Santín, J, ed). Editorial Síntesis. Madrid.
- ⁴¹ Pérez-Victoria Moreno de Barreda I. (2006). Acilaciones regioselectivas de oligosacáridos catalizada por enzimas: caracterización y propiedades de los productos. Tesis doctoral. Universidad de Granada, Granada, España.
- ⁴² Ferreira L., Ramos, M. A., Dordick, J. S., Gil, M. H. (2003). Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.***21**:189-99.
- ⁴³ Deo, G., Wachs, I.E., Haber, J. (1994). Vanadium Oxide Monolayer Catalysts. *Crit. Rev. Surf. Chem.* **4**: 141.
- ⁴⁴ Wescott, C.R., Klibanov, A.M. (1994). The solvent dependence of enzyme specificity. *Biochim. Biophys. Acta***1206**: 1-9
- ⁴⁵ Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **XXX**:81-87.

- ⁴⁶ Barberis, S., Illanes, A. (1996). Catálisis enzimática en fase orgánica: aspectos cinéticos y termodinámicos. *Ing. Quim.* **322**:165-73.
- ⁴⁷ Quiroga, E., Camí, G., Marchese, J., Barberis, S. (2007). Organic solvents effect on the secondary structure of araujain hl, in different media. *Biochem. Eng. J.* **35**: 198-202.
- ⁴⁸ Xu, K., Klibanov, A.M. (1996). pH control of the catalytic activity of cross-linked enzyme crystals in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 9815-9.
- ⁴⁹ Klibanov, A. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**: 241-6.
- ⁵⁰ Castro, G.R., Knubovets, T. (2003). Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures. *Critic. Rev. Biotechnol.* **23**: 195-231.
- ⁵¹ Krieger, N., Bhatnagar, T., Baratti, J. (2004). Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. *Food Technol. Biotechnol.* **42**: 279-86.
- ⁵² Matkovic S.R., Valle G. M., Briand L.E. (2005). Quantitative analysis of ibuprofen in pharmaceutical formulations through FTIR spectroscopy. *Lat. Am. Appl. Res.* **35**: 189-195.
- ⁵³ Flórez, J. (1998). Farmacología Humana, 3º Ed. (Ediciones Científicas y técnicas, S.A.). Barcelona. España. b) Flórez, J. (2003). Farmacología Humana, 4º Ed. (Masson, Ed). Barcelona. España.
- ⁵⁴ Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. (2002). Inmunología Celular y Molecular, 4º ed McGraw-Hill-Interamericana, España S.A.U.
- ⁵⁵ Steinbach G., Lynch P., Phillips R. (2000). The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *New Engl J Med.* **342** (26): 1946-1952.
- ⁵⁶ Adams, S. S., Bresloff, P., Manson, G. C. (1976). Pharmacological difference between the optical isomers of ibuprofen: evidence for metabolic inversion of the (-)isomer. *J. Pharm Pharmac.* **28**:256–257.
- ⁵⁷ Foresti, M. L., Galle, M., Ferreira, M. L., Briand, L. E. (2009). Enantioselective esterification of ibuprofen with ethanol as reactant and solvent catalyzed by immobilized lipase: experimental and molecular modeling aspects. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84**:1461-1473.
- ⁵⁸ Boyce, E., Takiya, L. (2000). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Review of factors guiding formulary selection. *Formulary.* **35**:142-168.
- ⁵⁹ Schnitzer, T. (2001). Cyclooxygenase aril-2-specific inhibitors: are they safe?. *American Med. J.* **110** (1A):46-49.
- ⁶⁰ Stinson S.C. (1995). Chiral Drugs. *Chem. Eng. News.* **73** (41): 44-74.
- ⁶¹ Covadonga Álvarez Álvarez (2002). Influencia del enantiomorfismo en la solubilidad y velocidad de disolución de distintos fármacos racémicos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de farmacia, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España
- ⁶² Carvalho, P. O., Cass, Q. B., Calafatti, S. A., Contesini, F. J., Bizaco, R., (2006). Review-alternatives for the separation of drug enantiomers: ibuprofen as a model compound. *Braz. J. Chem Eng.* **23**:291-300.
- ⁶³ Sánchez, A., Valero, F., Lafuente, J., Solá, C. (2000). Highly enantioselective esterification of racemic ibuprofen in a packed bed reactor using immobilised *Rhizomucor miehei* lipase. *Enzyme Microb Tech.* **27**:157–166.
- ⁶⁴ Ikeda, Y., Kurokawa, Y. (2002). Enantioselective esterification of racemic ibuprofen in isooctane by immobilized lipase on cellulose acetate titanium iso-propoxide gel fiber. *J. Biosci Bioeng.* **93**: 1:98-100.
- ⁶⁵ López Belmonte M.T., Alcántara A.R., Sinisterra J.V. (1997). Enantioselective esterification of 2-arylpropionic acids catalyzed by immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. *J Org Chem.* **62**: 1831–1840.
- ⁶⁶ Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- ⁶⁷ Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.

-
- ⁶⁸ Llerena Suster, C. R., Briand, L. E., Morcelle, S. R. (2014). Analytical characterization and purification of a commercial extract of enzymes: A case study. *Coll Surf B: Biointerface*.**121**:11-20.
- ⁶⁹ Pires-Cabrera, P., da Fonseca, M.M.R., Ferreira-Dias, S. (2009). Synthesis of ethyl butyrate in organic media catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams: A kinetic study. *Biochem Eng J*.**43** (3): 327–332
- ⁷⁰ Triantafyllou, A. Ö., Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1995). Effects of sorbitol addition on the action of free and immobilized hydrolytic enzymes in organic media. *Biotechnol Bioeng*.**45**:406-414.
- ⁷¹ Valiveti, R. H., Halling, P. J., Peilow, A. D., Macrae, A. R. (1994). Relationship between water activity and catalytic activity of lipases in organic media. *Eur J. Biochem*. **222**:461-466
- ⁷² Tanaka, T., Ono, E., Ishihara, M., Yamanaka, S. & Takinami, K. (1981) Enzymatic acyl exchange of triglycerides in hexane, *Agric. Biol. Chem.* **45**:2387-2389.
- ⁷³ Kitaguchi, H. & Klibanov, A. M. (1989) Enzymatic peptide synthesis via segment condensation in the presence of water mimics, *J. Am. Chem. Soc.* **111**:9272-9273.
- ⁷⁴ Adlercreutz, P. (1993) Activation of enzymes in organic media at low water activity by polyols and saccharides, *Biochim. Biophys. Acta***1163**:144-148.
- ⁷⁵ Ma, L., Persson M., Adlercreutz P. (2002) .Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. *Revista: Elsevier Science Inc***31**:1024–1029
- ⁷⁶ Valivety RH, Halling PJ, Macrae AR. (1992).Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. *Biochim Biophys Acta*;**1118**:218–22.
- ⁷⁷ Andersson M, Adlercreutz P. (2001). A kinetic study of almond-glucosidase catalysed synthesis of hexyl-glycosides in low aqueous media. Influence of glycosyl donor and water activity. *J Mol CatalB: Enzyme*. **14**:69–76.