

Universitat de Lleida

## Ús de micelis fúngics com a biocatalitzadors en reaccions d'hidròlisi

Marta Maria Dolcet Negre

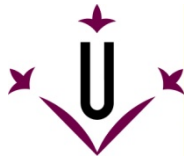
Dipòsit Legal: L.883-2015

<http://hdl.handle.net/10803/307537>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat de Lleida**  
**Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària**  
**Departament de Tecnologia d'Aliments**

**Programa de doctorat: Sistemes Agrícoles, Forestals i Alimentaris**

**Ús de micelis fúngics com a biocatalitzadors  
en reaccions d'hidròlisi**

**Marta Maria Dolcet Negre**  
**Tesi Doctoral**  
**Lleida, juliol de 2015**





**Universitat de Lleida**  
**Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària**  
**Departament de Tecnologia d'Aliments**

## **Ús de micelis fúngics com a biocatalitzadors en reaccions d'hidròlisi**

Memòria presentada per Marta Maria Dolcet Negre  
per adquirir el grau de Doctora per la Universitat de Lleida

Tesi realitzada al Departament de Tecnologia d'Aliments i al Departament de  
Química de la Universitat de Lleida sota la direcció de:

Dra. Mercè Torres i Grifo  
Dr. Ramon Canela i Garayoa

Lleida, juliol de 2015



## **Agraïments**

Després d'uns quants anys de molt esforç i sacrifici per acabar aquesta tesi, vull agrair-vos la vostra col·laboració a tots aquells que d'alguna manera hi heu participat. És per això, que us vull dir d'una forma tan senzilla com sincera, moltes gràcies a tots.



## Resum

Els monoacilglicerols (MAGs) enantiomèrics són intermedis de gran interès i la seva producció mitjançant enzims ofereix vies alternatives a les reaccions químiques tradicionals. Aquesta tesi té com a objectiu la seva síntesi a partir de dos precursors dels MAGs (el *rac*-palmitat de solketil i el *rac*-palmitat de glicidil), utilitzant micelis de fongs aïllats de residus de la indústria de l'oli com a biocatalitzadors.

En un primer intent d'obtenir MAGs, es va avaluar l'activitat epòxid-hidrolàsica dels micelis enfront el *rac*-fenil glicidil èter, el *rac*-benzil glicidil èter, el *rac*-1,2-epoxihexà i el *rac*-1,2-epoxioctà. A continuació, els micelis escollits es van utilitzar en la hidròlisi del *rac*-palmitat de glicidil. Només es va obtenir MAG amb el miceli de *Penicillium* sp., però com a mescla racèmica. L'efecte matriu associat a les reaccions amb micelis com ara la recuperació de l'anàlit adsorbit en la biomassa o l'extracció de components dels biocatalitzadors es van compensar realitzant l'extracció després de fortificar les mostres i patrons.

En un segon intent, el palmitat de glicidil enantioenriquit i sintetitzat pel miceli de *Mucor fragilis*, es va hidrolitzar amb el miceli de *Penicillium* sp. La hidròlisi enzimàtica del MAG enantiomèric va dificultar la seva obtenció.





## Resumen

Los monoacilgliceroles (MAGs) són intermediarios de gran interés y su producción mediante enzimas ofrece vías alternativas a las reacciones químicas tradicionales. Esta tesis tiene como objetivo su síntesis a partir de dos precursores de los MAGs (el *rac*-palmitato de solketilo y el *rac*-palmitato de glicidilo), utilizando micelios de hongos aislados de sustratos de la industria del aceite como biocatalizadores.

En un primer intento de obtener MAGs, se evaluó la actividad epóxido-hidrolásica de los micelios frente al *rac*-fenil glicidil éter, el *rac*-bencil glicidil éter, el *rac*-1,2-epoxihexano y el *rac*-1,2-epoxioctano. A continuación, los micelios seleccionados se utilizaron en la hidrólisis del *rac*-palmitato de glicidilo. Sólo se obtuvo MAG con el micelio de *Penicillium* sp., pero como mezcla racémica. El efecto matriz asociado a las reacciones con micelios como por ejemplo la recuperación del analito adsorbido en la biomasa o la extracción de componentes de los biocatalizadores se compensó realizando la extracción después de fortificar las muestras y patrones.

En un segundo intento, el palmitato de glicidilo enantioenriquecido y sintetizado por el micelio de *Mucor fragilis*, se hidrolizó con el micelio de *Penicillium* sp. La hidrólisis enzimática del MAG enantiomérico dificultó su obtención.



## Summary

Enantiomeric monoacylglycerols (MAGs) are known to be useful intermediates of great interest. They are difficult to synthesize by traditional chemical reactions and enzymatic production provide alternative routes. This thesis reports their synthesis from two precursors of MAGs (*rac*-solketal palmitate and *rac*-glycidyl palmitate) by using fungic mycelia isolated from olive oil wastes as biocatalysts.

In a first attempt to obtain MAGs, mycelia were screened towards *rac*-glycidyl phenyl ether, *rac*-benzyl glycidyl ether, *rac*-1,2-epoxyhexane and *rac*-1,2-epoxyoctane. Then, *rac*-glycidyl palmitate was hydrolysed by the mycelia selected by their epoxide hydrolase activity. Only *Penicillium* sp. mycelium yielded MAG, but as a racemic mixture. Matrix effects associated with mycelium-catalysed reactions such the need to recover the analyte adsorbed onto the biomass or the extraction of matrix components were compensated for using pre-extraction spiking approach.

In a second attempt, enantioenriched glycidyl palmitate, synthesised by *Mucor fragilis* mycelium, was hydrolysed by *Penicillium* sp. mycelium. There was difficult to obtain enantiomeric MAG because of its enzymatic hydrolysis.



# ÍNDIX GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>1</b>
1.1. La quiralitat .....	3
1.2. Obtenció de productes enantiopurs .....	6
1.2.1. Estratègies generals .....	6
1.2.2. Mètodes per millorar la resolució cinètica de racèmics.....	12
1.2.3. Síntesi a partir de la reserva quiral .....	17
1.2.4. Síntesi asimètrica .....	18
1.2.5. El «truc meso».....	20
1.3. Catàlisi amb enzims i microorganismes .....	23
1.3.1. Enzims.....	23
1.3.2. Consideracions generals sobre l'ús d'enzims com a catalitzadors .....	24
1.3.3. Reaccions catalitzades per hidrolases.....	26
1.3.4. Obtenció de productes quirals enantioenriquits o purs.....	28
1.3.4.1. Lipases.....	29
1.3.4.1.1. Resolucions cinètiques .....	35
1.3.4.1.2. Enantioselectivitat .....	41
1.3.4.1.3. Assajos per a lipases .....	43
1.3.4.2. Epòxid-hidrolases.....	48
1.3.4.2.1. Mecanisme d'obertura de l'anell d'oxirà.....	49
1.3.4.2.2. Estereoquímica .....	50
1.3.4.2.3. Enantioselectivitat i coeficients de regioselectivitat.....	51
1.3.4.2.4. Assajos per a epòxid-hidrolases .....	54
1.3.4.2.5. Epòxid-hidrolases de bacteris .....	55
1.3.4.2.6. Epòxid-hidrolases de fongs i llevats.....	57
1.3.4.2.7. Producció de MAGs a través de reaccions catalitzades per epòxid-hidrolases ...	58
<b>2. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL</b> .....	<b>59</b>
2.1. Objectius .....	61
2.2. Pla de treball .....	62
<b>3. MATERIALS I MÈTODES</b> .....	<b>63</b>
3.1. Productes comercials.....	65
3.2. Mètodes .....	65

3.2.1. Aïllament de fongs a partir de pinyola i d'oliassa .....	65
3.2.2. Avaluació de l'activitat epòxid-hidrolàsica .....	66
3.2.3. Detecció de proteases extracel·lulars en els brous de cultiu.....	67
3.2.4. Diafiltració dels brous de cultiu amb activitat epòxid-hidrolàsica .....	68
3.2.5. Influència de l'òxid d'estirè en la producció de biomassa fúngica i en l'activitat epòxid-hidrolàsica .....	69
3.2.6. Funcions de calibratge i avaluació de l'efecte de la matriu miceli .....	69
3.2.7. Validació del mètode de calibratge.....	71
3.2.8. Prova d'equivalència .....	73
3.2.9. Hidròlisi del <i>rac</i> -fenil glicidil èter, del <i>rac</i> -benzil glicidil èter, del <i>rac</i> -1,2-epoxihexà i del <i>rac</i> -1,2-epoxioctà.....	73
3.2.10. Síntesi del <i>rac</i> -palmitat de solketil catalitzada per la lipasa B de <i>C. antarctica</i> .....	75
3.2.11. Síntesi del <i>rac</i> -, del ( <i>R</i> )- i del ( <i>S</i> )-palmitat de glicidil catalitzada per la lipasa B de <i>C. antarctica</i> .....	76
3.2.12. Hidròlisi del grup epòxid del <i>rac</i> -, del ( <i>R</i> )- i del ( <i>S</i> )-palmitat de glicidil.....	78
3.2.13. Enantiopreferència de les epòxid-hidrolases.....	79
3.2.14. Hidròlisi del grup èster del <i>rac</i> -palmitat de solketil i del <i>rac</i> -palmitat de glicidil .....	79
3.2.15. Hidròlisi del grup epòxid del palmitat de glicidil enantioenriquit.....	81
3.2.16. Blancs de les reaccions.....	81
3.2.17. Anàlisi per HPLC-UV .....	81
3.2.18. Anàlisi per HPLC-UV quiral .....	82
3.2.19. Anàlisi per GC-FID quiral .....	82
3.2.20. Anàlisi per espectrofotometria UV-vis .....	83
3.2.21. Anàlisi per GC-FID .....	83
3.2.22. Anàlisi per GC-MS.....	84
3.2.23. Anàlisi per RMN .....	84
3.2.24. Rendiment, conversió, excés enantiomèric del producte i del substrat i, proporció de l'isòmer majoritari .....	84
<b>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....</b>	<b>87</b>
4.1. Aïllament de fongs a partir de pinyola i d'oliassa.....	89
4.2. Avaluació de l'activitat epòxid-hidrolàsica dels micelis .....	89
4.3. Avaluació de l'activitat epòxid-hidrolàsica dels brous de cultiu.....	91
4.4. Influència de l'òxid d'estirè en la producció de biomassa fúngica i en l'activitat epòxid-hidrolàsica .....	92
4.5. Linealitat de les funcions de calibratge .....	95

4.6. Efecte de la matriu miceli.....	95
4.7. Assajos de recuperació del 3-fenoxi-1,2-propandiol .....	99
4.8. Quantificació per HPLC-UV i per espectrofotometria UV-vis del 3-fenoxi-1,2-propandiol format en els assajos enzimàtics .....	100
4.9. Hidròlisi del <i>rac</i> -fenil glicidil èter, del <i>rac</i> -benzil glicidil èter, del <i>rac</i> -1,2-epoxihexà i del <i>rac</i> -1,2-epoxioctà .....	102
4.10. Síntesi del <i>rac</i> -palmitat de solketil i del <i>rac</i> -palmitat de glicidil.....	106
4.11. GC-MS i RMN del <i>rac</i> -palmitat de solketil i del <i>rac</i> -palmitat de glicidil purs.....	111
4.12. Síntesi de monopalmitina enantioenriquida .....	115
4.12.1. A partir de l'obertura de l'anell d'oxirà del <i>rac</i> -palmitat de glicidil .....	115
4.12.2. A partir de la hidròlisi enantiopreferent d'èsters precursors de la monopalmitina.....	119
4.12.3. A partir de l'obertura de l'anell d'oxirà del palmitat de glicidil enantioenrigit .....	127
<b>5. CONCLUSIONS.....</b>	<b>131</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>135</b>
<b>APÈNDIX A: IDENTIFICACIONS MOLECULARS .....</b>	<b>163</b>
<b>APÈNDIX B: FUNCIONS DE CALIBRATGE .....</b>	<b>167</b>
<b>APÈNDIX C: EQUACIONS PER A L'AVALUACIÓ DE L'EFECTE DE LA MARIU MICELI.....</b>	<b>171</b>
<b>APÈNDIX D: DERIVATS ACETILATS .....</b>	<b>175</b>
<b>APÈNDIX E: ARTICLES EN REVISIÓ .....</b>	<b>181</b>





## ÍNDIX DE FIGURES

FIGURA 1.1.1	Alguns dels compostos més utilitzats en la diferenciació d'enantiòmers per RMN	4
FIGURA 1.2.1	Mètodes per obtenir compostos enantiopurs	7
FIGURA 1.2.2	Mètodes de resolució per cristal·lització	10
FIGURA 1.2.3	Resolució cinètica d'una mescla racèmica	11
FIGURA 1.2.4	Resolució cinètica paral·lela d'una mescla racèmica	12
FIGURA 1.2.5	Rendiment total en un procés de successives resolucions a través de racemitzacions	13
FIGURA 1.2.6	Resolució cinètica dinàmica d'una mescla racèmica	14
FIGURA 1.2.7	Estereoinversió d'una mescla racèmica	15
FIGURA 1.2.8	Desracemització a través de cicles d'oxidació-reducció	16
FIGURA 1.2.9	Transformació enantioconvergent d'una mescla racèmica	16
FIGURA 1.2.10	Seqüències que proporcionen compostos quirals de tres carbonis a partir del D-manitol i de la L-serina	18
FIGURA 1.2.11	Síntesi asimètrica d'un substrat proquiral o <i>meso</i>	19
FIGURA 1.2.12	Obtenció dels dos enantiòmers d'un derivat del glicerol utilitzant un únic enzim	21
FIGURA 1.2.13	Obtenció dels dos enantiòmers d'un hidroxièster intermedi en la síntesi de prostaglandines	21
FIGURA 1.2.14	Síntesi asimètrica i resolució cinètica d'un substrat <i>meso</i>	22
FIGURA 1.3.1	Hidròlisi catalitzada per l'enzim quimotripsina	24
FIGURA 1.3.2	Mecanisme d'hidròlisi d'hidrolases amb serina en el centre actiu	27
FIGURA 1.3.3	Tipus de reaccions catalitzades per hidrolases en funció del nucleòfil	27
FIGURA 1.3.4	Hidròlisi i organofosforilació de les lipases	29
FIGURA 1.3.5	Exemples de C <sub>3</sub> -sintons quirals enantiopurs	35
FIGURA 1.3.6	Resolució del <i>rac</i> -benzoat de solketil combinant la hidròlisi enzimàtica i la cristal·lització preferencial	37
FIGURA 1.3.7	Hidròlisi del <i>rac</i> -butirat de glicidil i hidròlisi del ( <i>R</i> )-butirat de glicidil enantioenriquit per obtenir el ( <i>R</i> )- i el ( <i>S</i> )-glicidol enantiopurs	40
FIGURA 1.3.8	Hidròlisi del <i>rac</i> -butirat de glicidil i transesterificació del ( <i>R</i> )-glicidol enantioenriquit per obtenir el ( <i>R</i> )- i el ( <i>S</i> )-butirat de glicidil amb elevats excessos enantiomèrics	40
FIGURA 1.3.9	Prova de l'adrenalina	46
FIGURA 1.3.10	Mecanisme proposat per a EHs de mamífers	49
FIGURA 1.3.11	Hidròlisi d'epòxids terminals amb retenció o inversió de la configuració	50
FIGURA 1.3.12	Atac del carboni C <sub>1</sub> (atac $\alpha$ ), resultant el diol amb inversió de la configuració o atac del carboni terminal C <sub>2</sub> (atac 1- $\alpha$ ), resultant el diol amb retenció de la configuració	52
FIGURA 1.3.13	Obtenció de ( <i>R</i> )- i de ( <i>S</i> )-MAGs purs a partir del ( <i>S</i> )- i del ( <i>R</i> )-glicidol, respectivament	58
FIGURA 3.2.1	Hidròlisi del <i>rac</i> -fenil glicidil èter catalitzada pels enzims presents en els micelis i en els brous de cultiu dels fongs crescuts en el medi CSL	67

FIGURA 3.2.2	Hidròlisi del <i>rac</i> -fenil glicidil èter, del <i>rac</i> -benzil glicidil èter, del <i>rac</i> -1,2-epoxihexà i del <i>rac</i> -1,2-epoxioctà	74
FIGURA 3.2.3	Síntesi del <i>rac</i> -palmitat de solketil catalitzada per CAL-B	76
FIGURA 3.2.4	Síntesi del <i>rac</i> -palmitat de glicidil catalitzada per CAL-B	76
FIGURA 3.2.5	Síntesi del ( <i>R</i> )- i del ( <i>S</i> )-palmitat de glicidil catalitzada per CAL-B	77
FIGURA 3.2.6	Hidròlisi del grup epòxid del <i>rac</i> -, del ( <i>R</i> )- i del ( <i>S</i> )-palmitat de glicidil	78
FIGURA 3.2.7	Hidròlisi del <i>rac</i> -palmitat de solketil catalitzada pels micelis dels fongs crescuts amb oli de gira-sol	80
FIGURA 3.2.8	Hidròlisi del <i>rac</i> -palmitat de glicidil catalitzada pels micelis dels fongs crescuts amb oli de gira-sol	80
FIGURA 4.2.1	Hidròlisi del <i>rac</i> -fenil glicidil èter per EHs immobilitzades sobre els micelis dels fongs 1-22	90
FIGURA 4.3.1	Absència de proteases extracel·lulars en els brous de cultiu dels fongs 7 (esquerra) i 19 (dreta) indicat per l'absència d'halo al voltant dels pouets	91
FIGURA 4.4.1	Efecte de l'òxid d'estirè en la producció de biomassa durant el cultiu d' <i>A. niger</i> , d' <i>A. tubingensis</i> , d' <i>A. terreus</i> , de <i>P. aurantiogriseum</i> i de <i>Penicillium</i> sp.	93
FIGURA 4.4.2	Efecte de l'òxid d'estirè en l'activitat epòxid-hidrolàsica d' <i>A. niger</i> , d' <i>A. tubingensis</i> , d' <i>A. terreus</i> , de <i>P. aurantiogriseum</i> i de <i>Penicillium</i> sp.	94
FIGURA 4.6.1	Comparació entre les corbes de calibratge SC i post-MMC obtingudes per HPLC-UV (a l'esquerra) i espectrofotometria UV-vis (a la dreta)	97
FIGURA 4.6.2	Comparació entre les corbes de calibratge post-MMC i pre-MMC obtingudes per HPLC-UV (a l'esquerra) i espectrofotometria UV-vis (a la dreta)	98
FIGURA 4.8.1	Representació dels quocients i de les mitjanes dels rendiments de les reaccions d'hidròlisi obtinguts per HPLC-UV i per espectrofotometria UV-vis, corresponents a <i>A. niger</i> , <i>A. tubingensis</i> , <i>P. aurantiogriseum</i> , <i>Penicillium</i> sp. i <i>A. terreus</i>	101
FIGURA 4.10.1	Síntesi del palmitat de solketil catalitzada per CAL-B	107
FIGURA 4.10.2	Cromatograma de gasos del solketal que va quedar per reaccionar durant la síntesi del palmitat de solketil catalitzada per CAL-B	107
FIGURA 4.10.3	Síntesi del palmitat de glicidil catalitzada per CAL-B	109
FIGURA 4.10.4	Cromatograma de gasos del glicidol que va quedar per reaccionar durant la síntesi del <i>rac</i> -palmitat de glicidil catalitzada per CAL-B	110
FIGURA 4.11.1	Espectre de masses del <i>rac</i> -palmitat de solketil pur obtingut a partir de l'esterificació no enantioselectiva del <i>rac</i> -solketal amb l'àcid palmític catalitzada per CAL-B	111
FIGURA 4.11.2	Interpretació dels fragments iònics de l'espectre de masses del <i>rac</i> -palmitat de solketil pur	112
FIGURA 4.11.3	Espectre de masses del pic del <i>rac</i> -palmitat de glicidil pur obtingut a partir de l'esterificació no enantioselectiva del <i>rac</i> -glicidol amb l'àcid palmític catalitzada per CAL-B	113
FIGURA 4.11.4	Interpretació dels fragments iònics de l'espectre de masses del <i>rac</i> -palmitat de glicidil pur	114
FIGURA 4.12.1	Cromatograma de gasos de la hidròlisi del grup epòxid del <i>rac</i> -palmitat de glicidil catalitzada pel miceli de <i>Penicillium</i> sp. crescut a pH 3	115

FIGURA 4.12.2	Espectre de masses del pic de la monopalmitina obtinguda a partir de la hidròlisi del <i>rac</i> -palmitat de glicidil catalitzada pel miceli de <i>Penicillium</i> sp. crescut a pH 3	116
FIGURA 4.12.3	Interpretació dels fragments iònics dels espectres de masses de la monopalmitina	117
FIGURA 4.12.4	Hidròlisi completa, catalitzada per la lipasa comercial de <i>R. miehei</i> , del palmitat de glicidil que no va reaccionar durant la hidròlisi del grup epòxid del <i>rac</i> -palmitat de glicidil catalitzada pel miceli de <i>Penicillium</i> sp.	119
FIGURA 4.12.5	Hidròlisi d'un èster racèmic catalitzada per lipases en un sistema bifàsic orgànic-aquós	120
FIGURA 4.12.6	Hidròlisi del <i>rac</i> -palmitat de solketil catalitzada pel miceli de <i>T. minioluteus</i>	124
FIGURA 4.12.7	Hidròlisi del <i>rac</i> -palmitat de glicidil catalitzada pel miceli de <i>M. fragilis</i>	124
FIGURA 4.12.8	Escalat de la hidròlisi del <i>rac</i> -palmitat de solketil catalitzada pel miceli de <i>T. minioluteus</i>	125
FIGURA 4.12.9	Escalat de la hidròlisi del <i>rac</i> -palmitat de glicidil catalitzada pel miceli de <i>M. fragilis</i>	126
FIGURA 4.12.10	Hidròlisi del grup epòxid del palmitat de glicidil enantioenriquit catalitzada pel miceli de <i>Penicillium</i> sp. crescut a pH 3	127
FIGURA D.1	Acetilació del <i>rac</i> -1,2-hexandiol (R: C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) i del <i>rac</i> -1,2-octandiol (R: C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> )	177
FIGURA D.2	Expansió de la regió 3,6-5,1 ppm de l'espectre de RMN de <sup>1</sup> H dels derivats acetilats del <i>rac</i> -1,2-hexandiol	177
FIGURA D.3	Cromatograma de gasos (GC-FID quiral) dels derivats acetilats del <i>rac</i> -1,2-hexandiol	178
FIGURA D.4	Expansió de la regió 3,5-5,1 ppm de l'espectre de RMN de <sup>1</sup> H dels derivats acetilats del <i>rac</i> -1,2-octandiol	179
FIGURA D.5	Cromatograma de gasos (GC-FID quiral) dels derivats acetilats del <i>rac</i> -1,2-octandiol	180



## ÍNDIX DE TAULES

TAULA 1.3.1	Classificació dels enzims	24
TAULA 1.3.2	Comparació dels principals mètodes d'immobilització d'enzims	26
TAULA 1.3.3	Exemples de lipases comercials	30
TAULA 1.3.4	Especificitat de les lipases i les seves aplicacions	34
TAULA 1.3.5	Hidròlisi d'èsters de solketil racèmics	38
TAULA 1.3.6	Hidròlisi d'èsters de glicidil racèmics	39
TAULA 4.1.1	Fongs aïllats de pinyola i d'oliassa	89
TAULA 4.6.1	Comparació estadística dels pendents i de les ordenades a l'origen de les funcions de calibratge	96
TAULA 4.7.1	Exactitud dels resultats amb les funcions de calibratge pre-MMC	99
TAULA 4.8.1	Rendiments del diol assolits en la hidròlisi del <i>rac</i> -fenil glicidil èter catalitzada pels micelis d' <i>A. niger</i> , d' <i>A. tubingensis</i> , de <i>P. aurantiogriseum</i> , de <i>Penicillium</i> sp. i d' <i>A. terreus</i>	100
TAULA 4.9.1	Hidròlisi del <i>rac</i> -fenil glicidil èter, del <i>rac</i> -benzil glicidil èter; del <i>rac</i> -1,2-epoxihexà i del <i>rac</i> -1,2-epoxioctà catalitzada pels micelis d' <i>A. niger</i> , d' <i>A. tubingensis</i> , de <i>P. aurantiogriseum</i> , de <i>Penicillium</i> sp. i d' <i>A. terreus</i> crescuts a un pH inicial de 5 o de 3	103
TAULA 4.10.1	Síntesi del palmitat de glicidil amb diferents relacions molars alcohol:àcid	109
TAULA 4.12.1	Hidròlisi del grup epòxid del <i>rac</i> -, del ( <i>R</i> )- i del ( <i>S</i> )-palmitat de glicidil catalitzada pel miceli de <i>Penicillium</i> sp. crescut a pH 3	118
TAULA 4.12.2	Hidròlisi del <i>rac</i> -palmitat de solketil i del <i>rac</i> -palmitat de glicidil en <i>t</i> -BuOMe i en <i>t</i> -BuOH	122
TAULA A.1	Identificació molecular dels fongs 5, 17, 10 i 19 mitjançant la comparació amb la base de dades del GenBank utilitzant l'eina BLAST	165
TAULA B.1	Funcions de calibratge	169
TAULA D.1	Proporció i desplaçament químic del senyal del protó del <b>CH</b> secundari dels derivats acetilats del <i>rac</i> -1,2-hexandiol	178
TAULA D.2	Proporció i desplaçament químic del senyal del protó del <b>CH</b> secundari dels derivats acetilats del <i>rac</i> -1,2-octandiol	179



## 1. INTRODUCCIÓ

---





## 1.1. La quiralitat

La *quiralitat* és una propietat intrínsecament vinculada al desenvolupament i a l'evolució dels éssers vius. Aquest fet determina que la interacció de compostos amb molècules que tenen certa asimetria, origini respostes diferents per a cadascun dels enantiòmers del compost. Es diu que una molècula és *quiral* quan no és superposable amb la seva imatge especular. Els parells de molècules que compleixen aquesta condició s'anomenen *enantiòmers*.

Una mescla equimolecular de cada enantiòmer s'anomena *mescla racèmica* o *racèmic* i no té activitat òptica. En una mescla enantioenriquida (mescla en què predomina un dels enantiòmers), es defineix l'*excés enantiomèric* (*ee*) (equació 1.1.1) com el percentatge d'excés d'un enantiòmer sobre la mescla racèmica.

$$ee (\%) = \frac{|R - S|}{R + S} \times 100 = |\%R - \%S| \quad (1.1.1)$$

On  $|\%R - \%S|$  és el valor absolut de la diferència de percentatge entre els isòmers (*R*) i (*S*).

(Delgado, Minguillón i Joglar, 2002)

Existeixen diversos mètodes per a la determinació de l'excés enantiomèric (Sheldon, 1993). Una de les tècniques més clàssiques que no requereix la separació dels enantiòmers és la *polarimetria*. La determinació de la composició enantiomèrica d'una mostra per polarimetria suposa el coneixement previ de la *rotació òptica específica* del compost (equació 1.1.2):

$$[\alpha]_{\lambda}^T (\%) = \frac{\alpha}{l \cdot c} \times 100 \quad (1.1.2)$$

T: temperatura a la qual es realitza la mesura

$\lambda$ : longitud d'ona de la llum utilitzada

$\alpha$ : angle de rotació de la dissolució

l: longitud de la cubeta en dm

c: concentració de la dissolució en g / 100 mL

En condicions òptimes existeix una relació lineal entre la composició enantiomèrica i la rotació òptica de la mescla. A partir d'aquesta, es pot calcular la *puresa òptica* (equació 1.1.3).

$$p (\%) = \frac{[\alpha]_{\lambda}^T]_{\text{mescla}}}{[\alpha]_{\lambda}^T]_{\text{enantiòmer pur}}} \times 100 \quad (1.1.3)$$

La diferenciació d'enantiòmers per tècniques no quiròptiques com la *dilució isotòpica*, la *microcalorimetria diferencial d'escombrat* (DSC) o la *ressonància magnètica nuclear* (RMN), tampoc requereixen la separació dels enantiòmers; però necessiten selectors quirals. En RMN poden utilitzar-se *agents de derivatització quirals* (*Chiral Derivatizing Agents*, CDA) (figura 1.1.1a), *reactius de desplaçament quirals* (*Chiral Lanthanide Shift Reagents*, CLSR) (figura 1.1.1b) o *agents de solvació quirals* (*Chiral Solvating Agents*, CSA) (figura 1.1.1c).

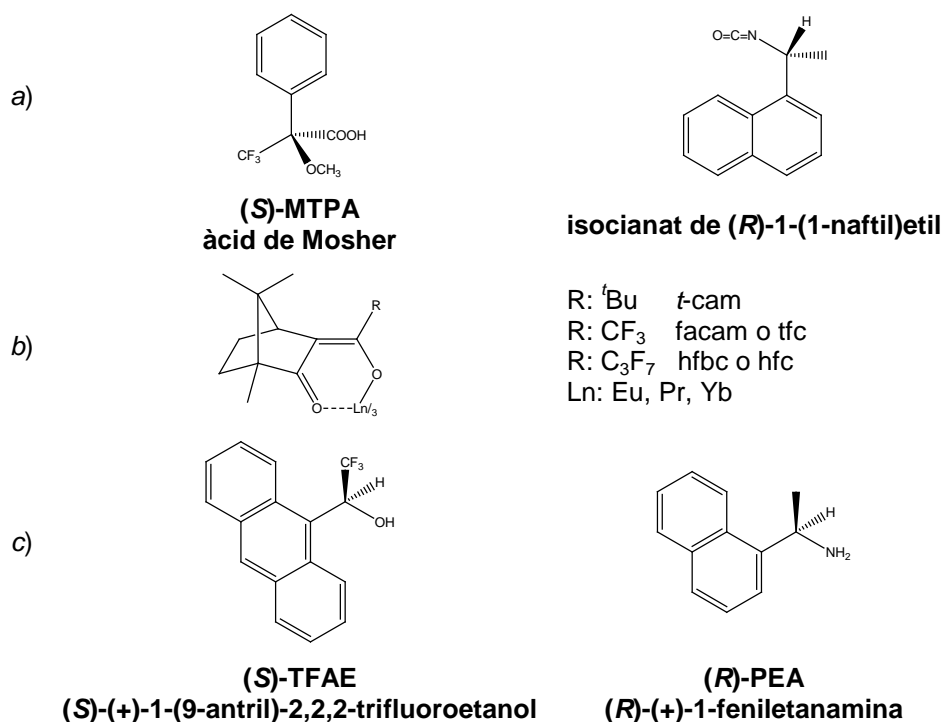


FIGURA 1.1.1. Alguns dels compostos més utilitzats en la diferenciació d'enantiòmers per RMN (Duddeck i Díaz, 2009; Quiroga, 2007; Wenzel i Wilcox, 2003).

L'ús de CDA suposa la derivatització dels enantiòmers que constitueixen la mostra i la seva conversió en diastereoisòmers. Es tracta, per tant, d'un mètode indirecte. En els altres dos casos, la diferenciació entre enantiòmers es produeix per l'associació selectiva d'aquests amb el selector quiral (CLSR o CSA). L'aparició en l'espectre de RMN de senyals separades per als enantiòmers permet la seva integració i, per tant, la determinació de la composició enantiomèrica (Duddeck i Díaz, 2009; Mcconnell *et al.*, 2007).

Són molts els mètodes els quals permeten quantificar els enantiòmers després de la seva separació física. Es tracta de tècniques de separació ja existents en les quals la participació d'un selector quiral en el sistema les converteix en enantioselectives. Les més utilitzades per a la determinació dels excessos enantiomèrics són la *cromatografia de gasos* (GC), la *cromatografia líquida d'alta resolució* (HPLC) i l'*electroforesi capil·lar* (CE) (Gübitz i Schmid, 2001).

### 1.2. Obtenció de productes enantiopurs

#### 1.2.1. Estratègies generals

Les diferències en l'activitat dels enantiòmers ha creat la necessitat d'obtenir molts productes en forma enantiomèricament pura. Els compostos quirals que s'extreuen de fonts naturals solen contenir una única forma enantiomèrica, però els que procedeixen d'un procés sintètic convencional solen ser mescles racèmiques. Per desenvolupar comercialment un dels enantiòmers es pot dur a terme la separació dels enantiòmers d'una mescla racèmica (*resolució*) o la síntesi estereoselectiva de l'enantiòmer desitjat. Ambdues estratègies tenen els seus avantatges i limitacions.

La separació dels enantiòmers d'una mescla racèmica, quan només se'n desitja un d'ells, representa una reducció molt important del rendiment. Aquesta limitació s'intenta minimitzar amb el desenvolupament de tècniques que permetin racemitzar i reciclar l'enantiòmer no desitjat.

Per dur a terme la síntesi estereoselectiva d'un enantiòmer d'un compost es pot optar per: a) utilitzar un substrat quiral enantiomèricament pur d'origen natural (sucres, aminoàcids, terpens, alcaloides, etc.) que ja tingui centres estereogènics amb la configuració adequada, és a dir, un compost procedent de la reserva quiral (*chiral pool*); o b) dur a terme una síntesi asimètrica a partir d'un substrat proquiral. En aquest cas, s'haurà d'utilitzar un auxiliar, un reactiu o un catalitzador quiral, que serà el responsable de la inducció asimètrica generada sobre el substrat. Els compostos quirals enantiopurs que formen la reserva quiral poden obtenir-se per extracció, fermentació o per síntesi a partir de substrats quirals o proquirals (figura 1.2.1) (Delgado, Minguillón i Joglar, 2002; Sheldon, 1993).

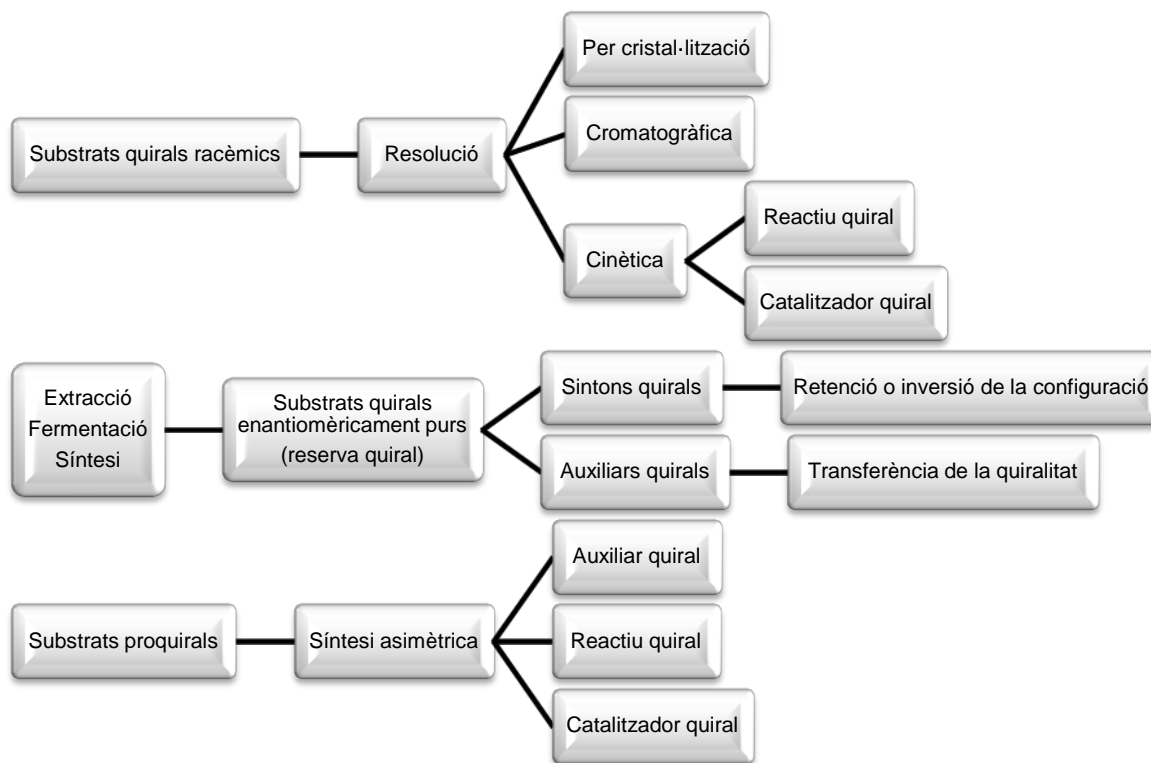


FIGURA 1.2.1. Mètodes per obtenir compostos enantiopurs (Sheldon, 1993).

Existeixen diverses tècniques per dur a terme la resolució de mesclades d'enantiòmers. Les més clàssiques són les que impliquen un procés de cristal·lització parcial. No obstant això, la separació cromatogràfica preparativa sobre fases estacionàries quirals i els processos de resolució cinètica enzimàtica s'utilitzen cada vegada més. Una característica dels processos de resolució és que el seu rendiment no pot ser superior al 50%, ja que aquest és el contingut de cada enantiòmer en la mescla racèmica i la seva utilitat no es restringeix exclusivament a la separació de mesclades racèmiques, sinó que també poden aplicar-se per a l'enriquiment de mesclades no racèmiques obtingudes per altres vies.

### a) Resolució per cristal·lització

En fase gasosa o líquida, els enantiòmers purs són indistingibles de les seves mescles. Només les propietats quiròptiques o l'ús de reactius quirals permeten distingir si es tracta d'un sol enantiòmer o bé d'una mescla d'enantiòmers. Això no és cert quan es consideren els sistemes cristal·lins i els seus equilibris sòlid-líquid o sòlid-gas. Els cristalls d'una parella d'enantiòmers presenten idèntics punts de fusió, patrons de difracció de raigs X, densitat i propietats espectroscòpiques; però produeixen rotacions oposades de la llum polaritzada.

Passa amb freqüència que els cristalls de mescles racèmiques estan constituïts per ambdós enantiòmers disposats en la mateixa xarxa cristal·lina de forma ordenada. És a dir, es presenten com un complex cristal·lí 1:1 que sol anomenar-se *compost racèmic*. Aquests cristalls són diferents dels que formen els enantiòmers per separat i, per tant, el seu punt de fusió pot ser també diferent del d'aquests. Els espectres d'IR i d'RMN en estat sòlid també són diferents. Una altra situació molt menys freqüent és que els dos enantiòmers s'empaquetin en la mateixa xarxa cristal·lina de forma desordenada. És el que s'anomena un *pseudoracemat*.

Així, un compost racèmic d'un cert excés enantiomèric presenta dos tipus de cristalls, els del compost racèmic amb els dos enantiòmers i els de l'enantiòmer en excés. En aquest cas pot aprofitar-se la diferència entre ells per obtenir un enantiòmer pur a partir de la mescla enriquida. En canvi, en el cas d'un pseudoracemat, qualsevol mescla d'enantiòmers conté un únic tipus de cristalls, la composició dels quals correspon a la relació d'enantiòmers en la mescla. Es tracta, doncs, d'una dissolució sòlida d'un en l'altre i no pot purificar-se cap d'ells per cristal·lització. Quan els enantiòmers cristal·litzen en cristalls separats, el compost s'anomena *conglomerat* i el racèmic constitueix un *eutèctic* o mescla de punt de fusió inferior a la de qualsevol dels seus components. Els conglomerats constitueixen del 5% al 10% dels casos, en canvi, els compostos racèmics més del 90% (Welch 2005).

La separació d'enantiòmers per cristal·lització es basa en la correlació existent entre el comportament dels enantiòmers i les seves mescles davant la fusió i la dissolució. Els racèmics que es presenten com a conglomerats són els únics que poden separar-se per cristal·lització directa. A escala industrial existeixen tres tècniques per a la cristal·lització directa de conglomerats. La primera consisteix a fer circular una dissolució sobresaturada del racèmic per dues cambres separades que contenen nuclis de cristal·lització de cadascun dels enantiòmers. Una vegada s'ha produït la precipitació, el líquid sobrenedant es concentra per addició de més racèmic en calent i es repeteix l'operació. És l'anomenada *cristal·lització simultània*.

També es pot dur a terme una *cristal·lització preferencial* del conglomerat. Aquesta tècnica consisteix a recollir alternativament els dos enantiòmers en una única cambra de precipitació (Nohira i Sakai, 2004; Sheldon, 1993).

Un fenomen que resulta molt convenient per a l'obtenció d'enantiòmers purs a partir de conglomerats és la combinació de la cristal·lització preferencial d'un d'ells amb la racemització de l'enantiòmer que roman en excés en la solució. El procés global es coneix com a *transformació asimètrica de la mescla d'enantiòmers induïda per cristal·lització* (o *desracemització*).

Quan ens trobem amb un compost racèmic en lloc d'un conglomerat, no es pot dur a terme una cristal·lització directa. El mètode utilitzat en aquest cas es basa en la formació i separació de diastereoisòmers (en forma o no salina), formats a partir de la mescla d'enantiòmers a separar i un agent de resolució enantiomèricament pur. És possible aconseguir rendiments superiors al 50% quan, simultàniament a la cristal·lització, té lloc l'*epimerització* del diastereoisòmer que roman en excés en la solució (interconversió de diastereoisòmers). El procés global es coneix com a *transformació asimètrica de la mescla de diastereoisòmers induïda per cristal·lització* (o *transformació asimètrica*) (Nohira i Sakai, 2004; Sheldon, 1993).



En la figura 1.2.2 es resumeixen els diferents mètodes per dur a terme la resolució de substrats quirals racèmics per cristal·lització.

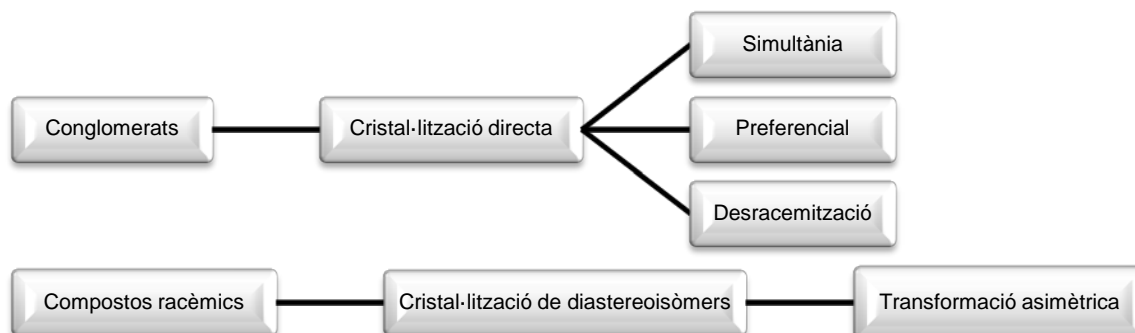


FIGURA 1.2.2. Mètodes de resolució per cristal·lització.

### b) Resolució cromatogràfica

Quant a les tècniques, la més utilitzada és la *cromatografia líquida d'alta resolució*. Es procedeix a injectar repetidament quantitats de mescla que estan pròximes al límit de saturació de la columna. A vegades, aquestes injeccions repetides es combinen amb la recirculació de la fracció intermèdia que encara conté mescla d'enantiòmers. Fins fa alguns anys, es considerava una tècnica massa cara i poc eficient des del punt de vista preparatiu. Però, actualment, s'ha convertit en una tècnica molt utilitzada per a la separació d'enantiòmers. Aquest canvi és degut tant a les millores tècniques (equips, suports, etc.) com al fet que els enantiòmers són productes d'alt valor afegit, la qual cosa permet compensar els costos de la separació. Com passa amb la cristal·lització, la separació pot dur-se a terme directament sobre els enantiòmers o sobre els diastereoisòmers obtinguts per reacció amb un agent de derivatització quiral.

A més de la cromatografia líquida convencional, cal destacar la de *llit mòbil simulat* (*Simulated Moving Bed, SMB*), una tècnica de separació cromatogràfica en continu que permet obtenir dues fraccions a partir d'una mescla. Aquesta tècnica es porta a terme connectant diverses columnes cromatogràfiques cap-cua (múltiple de quatre) entre les quals s'intercalen, mitjançant vàlvules, les entrades de fase mòbil i de mescla a separar i les sortides per a cadascun dels enantiòmers. Es tracta d'una tècnica especialment adequada per al tractament de grans quantitats de racèmic que presenta els avantatges de ser automatitzable i de poder treballar en continu.

Un dels inconvenients de la cromatografia líquida com a tècnica de separació a escala industrial és que s'han de tractar grans volums de dissolvent. En aquest cas, l'ús de fluids supercrítics, que s'eliminen a pressió atmosfèrica, permet minimitzar el problema. Altres tècniques com la separació a través de membranes enantioselectives i l'extracció o destil·lació en presència d'un selector quiral adequat, representen un considerable potencial per a la separació d'enantiòmers, si bé el seu ús a escala industrial és escàs (Yamamoto i Okamoto, 2004).

### c) Resolució cinètica

La *resolució cinètica* d'una mescla racèmica és aquell procés en el qual els dos enantiòmers d'un substrat racèmic es converteixen a diferent velocitat en els corresponents productes enantiomèrics, en presència d'un reactiu o catalitzador quiral, per exemple, un enzim. Per a què la resolució sigui eficient, cal que la velocitat de reacció d'un dels enantiòmers del substrat sigui molt més gran que la de l'altre (per exemple,  $k_A \gg k_B$ ) (figura 1.2.3).

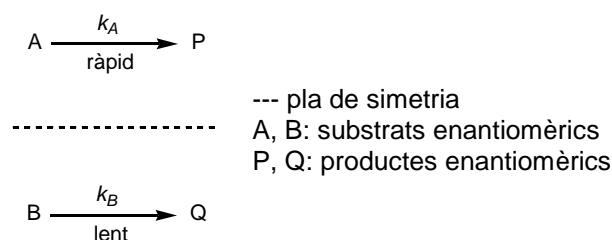


FIGURA 1.2.3. Resolució cinètica d'una mescla racèmica (Steinreiber, Faber i Griengl, 2008).

Per evitar l'acumulació del substrat enantiomèric menys reactiu (B) i, per tant, el descens gradual d' $ee_p$  a prop (o per sota) del 50% de conversió, Vedejs i Jure (2005) van dur a terme una *resolució cinètica paral·lela* per mantenir constant la proporció de substrats enantiomèrics. El procés va consistir a eliminar el substrat enantiomèric menys reactiu a través d'una reacció paral·lela (idealment a la mateixa velocitat que la del substrat enantiomèric més reactiu) que el transformés en un producte diferent (figura 1.2.4).

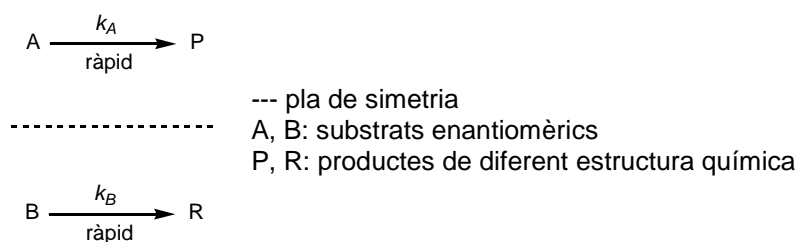


FIGURA 1.2.4. Resolució cinètica paral·lela d'una mescla racèmica (Vedejs i Jure, 2005).

Un dels problemes que pot afectar l'excés enantiomèric en una resolució cinètica enzimàtica és la reversibilitat de la reacció. En les reaccions d'hidròlisi, aquesta situació no es presenta, ja que un dels reactius de la reacció és l'aigua, que s'utilitza en excés i permet desplaçar l'equilibri del procés en la direcció desitjada. En canvi, en la resolució cinètica enzimàtica d'alcohols mitjançant una reacció d'acetilació en medi orgànic, es pot produir una disminució de l'excés enantiomèric.

### 1.2.2. Mètodes per millorar la resolució cinètica de racèmics

Tant en la resolució cinètica com en la resolució cinètica paral·lela, el rendiment teòric de cada enantiòmer mai pot superar el 50%. Com a conseqüència d'això, s'han establert els següents mètodes, englobats sota el nom de *desracemitzacions*, els quals permeten la transformació completa d'un substrat racèmic en un únic producte enantiomèric: a) successives resolucions cinètiques i racemitzacions, b) resolució cinètica dinàmica, c) estereoinversió (inversió de l'estereoquímica), d) desracemització cíclica i e) transformacions enantioconvergentes (Strauss, Felfer i Faber, 1999).

a) Successives resolucions cinètiques i racemitzacions

En les resolucions cinètiques és habitual, per evitar la pèrdua de la meitat del substrat, racemitzar el producte que no interessa (Q) i sotmetre'l a una altra resolució cinètica fins que tot el substrat racèmic s'hagi convertit en un únic producte enantiomèric (P). A primer cop d'ull pot semblar que aquest mètode no té massa interès ja que, teòricament, es necessiten un gran nombre de cicles per transformar tot el substrat racèmic en un únic producte enantiomèric; però el fet que no es produeixi pèrdua de substrat durant les resolucions cinètiques i les racemitzacions, permet obtenir un rendiment total de (P) > 95% després de cinc cicles (figura 1.2.5).

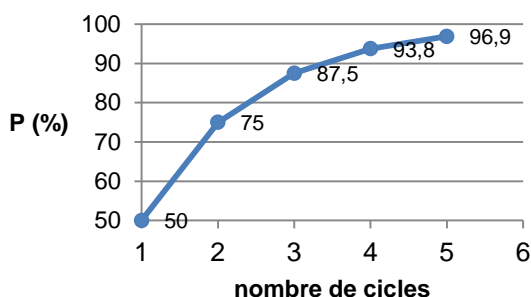
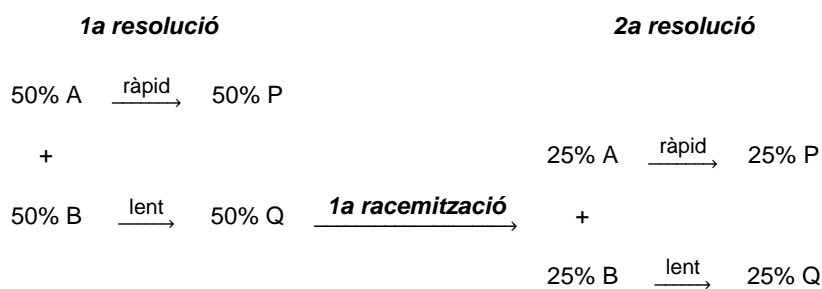


FIGURA 1.2.5. Rendiment total en un procés de successives resolucions a través de racemitzacions (Strauss, Felfer i Faber, 1999).

Per a què aquest mètode tingui èxit, cal que les racemitzacions es puguin dur a terme en condicions suaus per evitar reaccions secundàries. És per això que en els últims anys ha augmentat l'interès pels enzims racemases.

### b) Resolució cinètica dinàmica

Les limitacions de la resolució cinètica clàssica es poden minimitzar si s'utilitza una *resolució cinètica dinàmica* (figura 1.2.6). Aquest procés comprèn la resolució cinètica del substrat de partida (A + B) i la racemització *in situ* del substrat enantiomèric menys reactiu (B). Com a conseqüència d'això, tot el substrat es transforma en un únic producte enantiomèric (P) amb un rendiment teòric del 100%.

A diferència de la resolució cinètica clàssica, on la reacció disminueix la seva velocitat o inclús s'atura quan s'assoleix una conversió del 50% (s'ha consumit l'enantiòmer que reacciona més ràpid, (A)), la racemització constant de (B) durant el procés de resolució cinètica assegura la formació d'(A) i la reacció pot continuar fins que tot el substrat racèmic de partida s'ha convertit en el producte enantiomèric (P).

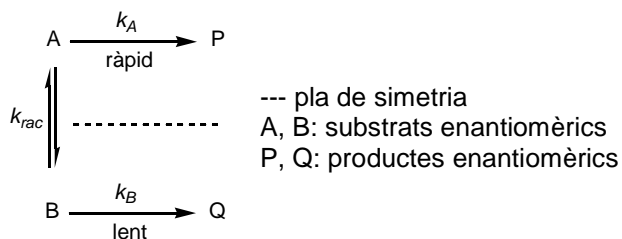


FIGURA 1.2.6. Resolució cinètica dinàmica d'una mescla racèmica (Steinreiber, Faber i Griengl, 2008).

La majoria de processos de resolució cinètica dinàmica combinen la resolució cinètica catalitzada per enzims i la racemització *in situ* utilitzant catalitzadors químics o racemases.

c) Estereoinversió

En un procés d'*estereoinversió*, un dels substrats enantiomèrics (A) es transformat en l'altre (B), per aconseguir aquest últim com a producte enantiomèricament pur (figura 1.2.7).

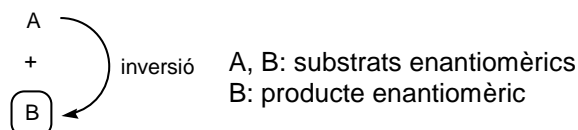


FIGURA 1.2.7. Estereoinversió d'una mescla racèmica (Gruber *et al.*, 2006).

d) Desracemització cíclica

La *desracemització cíclica* es basa en una seqüència cíclica d'oxidació-reducció. Suposem per raons de claredat que, en una primera etapa, només el substrat enantiomèric (A) és oxidat (enantioselectivitat absoluta) i que, per tant, l'enantiòmer (B) queda intacte, donant l'intermedi aquiral (P) amb un rendiment teòric del 50%. Si en una segona etapa, (P) és reduït de forma no selectiva, s'obindrà novament el substrat racèmic (25% (A) + 25% (B)). Així, després d'un primer cicle, la composició enantiomèrica del substrat de partida serà 25% (A) i 75% (B). Cicles posteriors d'oxidació-reducció donaran lloc a un augment gradual de l'enantiòmer (B) a expenses de l'(A). Aquest procés ha estat molt utilitzat en el cas d'alcohols secundaris i amines, combinant l'oxidació biocatalítica enantioselectiva i la reducció química no selectiva (figura 1.2.8).

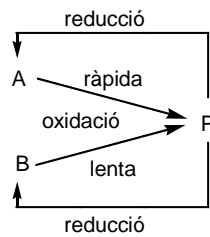


FIGURA 1.2.8. Desracemització a través de cicles d'oxidació-reducció (Gruber *et al.*, 2006).

### e) Transformacions enantioconvergentes

En els processos enantioconvergentes, cadascun dels enantiòmers és converteix en el mateix producte enantiomèric (P) per dues vies estereoquímiques diferents (figura 1.2.9).

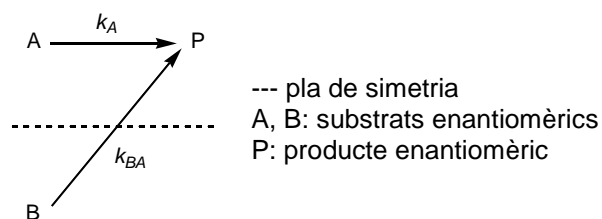


FIGURA 1.2.9. Transformació enantioconvergent d'una mescla racèmica (Faber i Kroutil, 2002; Lee, 2008).

### 1.2.3. Síntesi a partir de la reserva quiral

La reserva quiral (*chiral pool*) inclou una sèrie de compostos quirals enantiopurs que solen obtenir-se a partir de fonts naturals. Durant anys, l'utilització de substrats procedents de la reserva quiral ha representat un dels recursos més utilitzats per a l'obtenció de compostos quirals enantiopurs. Encara actualment, la síntesi a partir de compostos de la reserva quiral té una gran importància tot i el creixement i desenvolupament d'altres estratègies. No obstant això, un dels inconvenients que sol atribuir-se a la síntesi a partir d'un precursor de la reserva quiral és l'elevat nombre de transformacions que sol requerir el procés. A més, ha de realitzar-se un seguiment analític dels centres estereogènics presents en el precursor, així com de la configuració dels nous centres que es puguin crear en la molècula, sobre els quals la quiralitat preexistent pot exercir un cert control. El potencial de la reserva quiral és més ampli que la seva utilització com a blocs estructurals (*building blocks*) o sintons quirals, és a dir, compostos que poden ser incorporats en les noves molècules quirals. Ha de tenir-se en compte que la reserva quiral també és font d'agents de resolució, d'auxiliars quirals, de lligands enantiopurs per al seu ús en catalitzadors, així com de reactius quirals que es podran utilitzar en reaccions enantioselectives (Delgado, Minguillón i Joglar, 2002; Sheldon, 1993).

Els carbohidrats i els seus derivats constitueixen la font més abundant de compostos quirals enantiopurs i són els components de la reserva quiral més utilitzats com a sintons quirals. Un dels inconvenients de l'ús de carbohidrats com a precursors sintètics de compostos quirals enantiopurs és la presència en la seva estructura d'un considerable nombre de grups funcionals d'un caràcter químic molt similar. A més, en molts casos, no es requereixen tots els centres estereogènics del carbohidrat, per la qual cosa han d'eliminar-se en el transcurs de la síntesi. Per aquest motiu, els compostos de tres carbonis obtinguts a partir de carbohidrats i amb un únic centre estereogènic de configuració coneguda, resulten de gran interès (Delgado, Minguillón i Joglar, 2002; Sheldon, 1993).



En la figura 1.2.10 es mostren dues seqüències les quals, a partir del D-manitol i de la L-serina, condueixen a compostos d'aquest tipus.

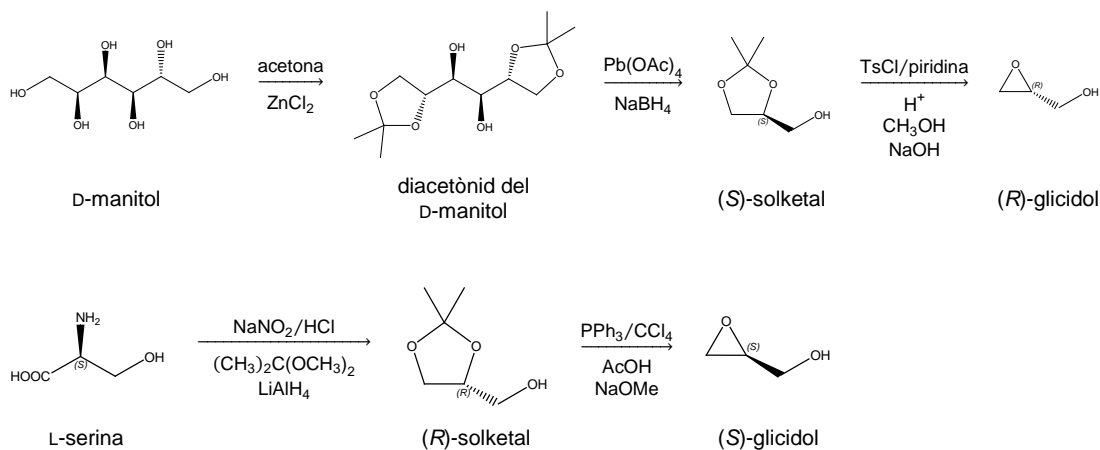


FIGURA 1.2.10. Seqüències que proporcionen compostos quirals de tres carbonis a partir del D-manitol i de la L-serina (Campo *et al.*, 2001; Hanson, 1991).

Aquests i altres compostos quirals de tres carbonis poden obtenir-se a través d'altres mètodes. Aquest és el cas, per exemple, dels dos enantiòmers del glicidol, que poden obtenir-se mitjançant la resolució cinètica enzimàtica d'èsters racèmics del glicidol o l'epoxidació de Sharpless de l'alcohol al·lílic. Ambdós mètodes són més ràpids que l'obtenció a partir del D-manitol (Klunder, Onami i Sharpless, 1989; Ladner i Whitesides, 1984).

### 1.2.4. Síntesi asimètrica

La generació de productes asimètrics a partir de substrats simètrics s'anomena *síntesi asimètrica*. Els compostos *meso* són un cas especial de compostos proquirals. Tenen dos o més centres estereogènics i un pla de simetria que divideix la molècula en dues meitats, una imatge especular de l'altra. La síntesi asimètrica d'un substrat proquiral o *meso* (M) produeix un únic producte (P o Q) amb un rendiment teòric del 100% (figura 1.2.11).

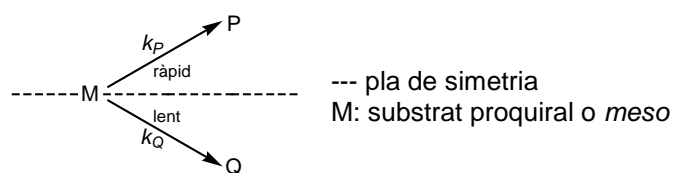


FIGURA 1.2.11. Síntesi asimètrica d'un substrat proquiral o meso (Steinreiber, Faber i Griengl, 2008).

Els grups idèntics que ocupen posicions que guarden una determinada relació de simetria s'anomenen *enantiotòpics* i se situen sempre en molècules aquirals; però donat que la diferenciació d'aquest tipus de grups origina una molècula quiral, es diu que la molècula original és *proquiral* i que té un *centre proestereogènic*, entenent com a tal aquell que té dos grups idèntics, la diferenciació dels quals origina un *centre estereogènic* (o asimètric). Aquest és el cas del carboni metínic del glicerol. Els grups enantiotòpics són únicament distingibles per sistemes quirals. Així, els reactius i catalitzadors quirals, entre ells els enzims, poden distingir-los i originar molècules quirals amb un cert excés enantiomèric a partir de les que no ho són (Quiroga, 2007).

Una reacció és *enantioselectiva* quan a partir d'un substrat proquiral i d'un reactiu o catalitzador quiral, s'obté preferentment un dels enantiòmers. El terme enantioespecífic s'aplica, en ocasions, a reaccions en què únicament un dels enantiòmers d'un racèmic experimenta la reacció. Aquest és el cas de nombroses resolucions cinètiques catalitzades per enzims d'elevada enantioselectivitat. Així, podem referir-nos a un enzim, el qual reacciona preferentment amb un enantiòmer d'un substrat racèmic, com a (*R*)- o (*S*)-específic (Quiroga, 2007; Sheldon, 1993).

Una de les tècniques més utilitzades en síntesi asimètrica és la *inducció asimètrica*, la qual consisteix a unir temporalment al substrat proquiral una molècula quiral enantiomèricament pura, anomenada *auxiliar quiral*, que actuarà transferint la seva quiralitat al producte final. Una vegada aconseguida la transformació, l'auxiliar quiral s'elimina.

Una altra de les tècniques consisteix a utilitzar reactius quirals; però igual que en el cas dels auxiliars quirals, es necessiten en quantitats estequiomètriques. El seu elevat preu i les escasses possibilitats de recuperar-los al final de la reacció han fet créixer l'interès per aquells processos amb catalitzadors quirals (metalls de transició i enzims), els quals s'utilitzen en quantitats catalítiques.

(Delgado, Minguillón i Joglar, 2002; Welch, 2005)

### 1.2.5. El «truc meso»

El «truc *meso*» (*meso trick*) consisteix en l'asimetrització d'un substrat *meso* en els dos sentits possibles. En la figura 1.2.12 se'n pot veure un exemple. Primer, una lipasa catalitza la transesterificació d'un diol *meso* amb acetat d'isopropenil i es forma un dels enantiòmers de l'acetat. Es tracta d'una síntesi asimètrica enantioselectiva a partir d'un substrat *meso* i no d'una resolució cinètica. Si aquest mateix diol *meso* es converteix en el corresponent diacetat proquiral per acetilació dels dos grups hidroxil, la mateixa lipasa pot catalitzar la hidròlisi del diacetat proquiral i donar l'enantiòmer oposat a l'obtingut per acetilació del diol. En aquest cas es tracta d'una hidròlisi asimètrica enantioselectiva.

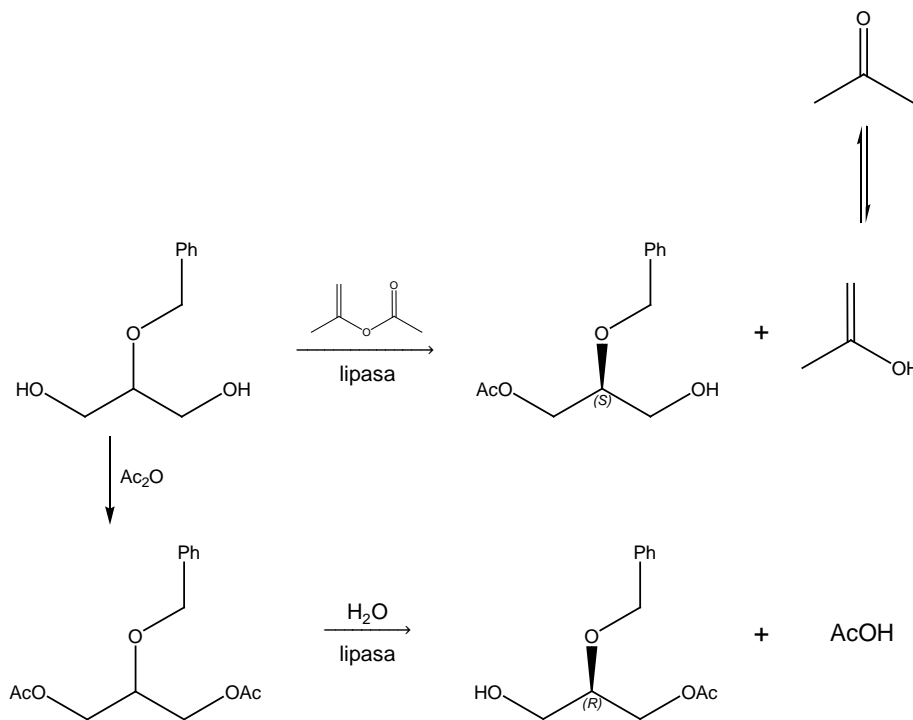


FIGURA 1.2.12. Obtenció dels dos enantiòmers d'un derivat del glicerol utilitzant un únic enzim.

L'asimetrització també pot ser el resultat de l'ús d'enzims hidrolítics d'enantioselectivitat oposada com es pot veure en la figura 1.2.13.

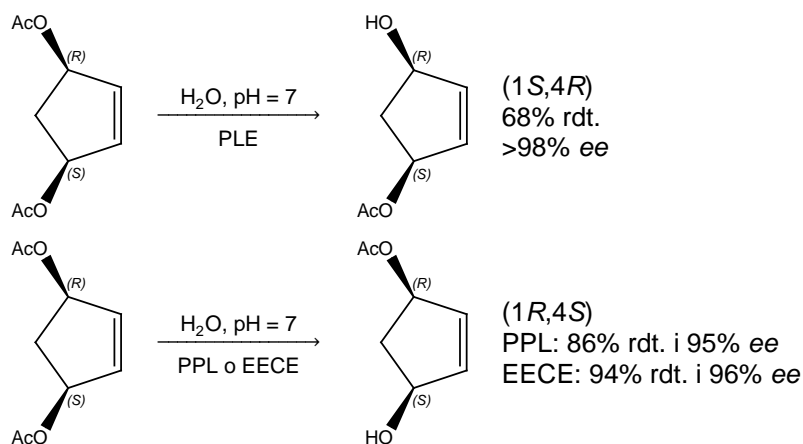


FIGURA 1.2.13. Obtenció dels dos enantiòmers d'un hidroxièster intermedi en la síntesi de prostaglandines (esterasa de fetge de porc, PLE; lipasa pancreàtica porcina, PPL; acetilcolinesterasa d'anguila elèctrica, EECE) (Sheldon, 1993).

Moltes vegades, l'asimetrització de substrats proquirals o *meso* catalitzada per lipases va seguida d'una resolució cinètica (figura 1.2.14). Per exemple, la hidròlisi d'un dièster *meso* pot donar un monoèster quiral, el qual també pot hidrolitzar-se donant un diol *meso*. Aquesta segona hidròlisi disminuirà el rendiment de monoèster; però augmentarà el seu excés enantiomèric.

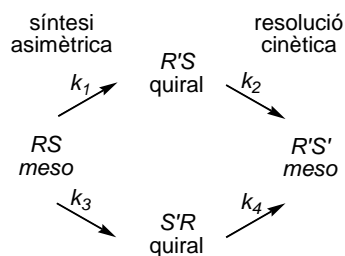


FIGURA 1.2.14. Síntesi asimètrica i resolució cinètica d'un substrat *meso* (Kroutil, Kleewein i Faber, 1997).

En els últims anys, els mètodes que utilitzen biocatalitzadors (cèl·lules senceres o enzims aïllats) per obtenir compostos quirals purs (òpticament purs) o enantioenriquits (òpticament actius) ha augmentat considerablement. Dins de les biotransformacions, predominen les reaccions catalitzades per diferents tipus d'hidrolases, les quals es veuran en els apartats següents.

### 1.3. Catàlisi amb enzims i microorganismes

#### 1.3.1. Enzims

Els enzims són proteïnes produïdes pels sistemes vius amb finalitat catalítica. Tot i la seva àmplia distribució a la natura, fins a finals del segle XX no es va començar a generalitzar el seu ús com a catalitzadors en síntesi orgànica. Un dels factors que ha promogut aquest desenvolupament és l'estereoselectivitat que pot aconseguir-se amb els enzims, més difícil d'assolir a través de mètodes químics.

La biocatàlisi engloba dos processos diferents. Per una part, els processos enzimàtics, en els quals intervenen enzims per catalitzar una transformació química. Es poden utilitzar enzims (aïllats de l'organisme que els conté) o cèl·lules senceres. Per una altra part, els processos fermentatius, la característica fonamental dels quals és la d'utilitzar microorganismes vius, moltes vegades modificats genèticament.

Existeixen en l'actualitat uns tres mil enzims, identificats, classificats i numerats per la *Comissió de Nomenclatura de la Unió Internacional de Bioquímica i Biologia Molecular* (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb>). A cada enzim se li ha assignat un codi indicatiu. Així, un enzim es designa per les sigles EC (*Enzyme Commission*) seguides de quatre xifres. La primera fa referència al tipus de reacció que l'enzim catalitza. Amb aquest criteri s'obtenen els sis grups de la taula 1.3.1. Cadascun d'ells conté una subclassificació a la qual es refereix la segona de les xifres. El tercer dígit es refereix a la naturalesa del cosubstrat i el quart és el número correlatiu d'ordre de l'enzim en el seu subgrup.

TAULA 1.3.1. Classificació dels enzims

EC.1	<i>Oxidoreductases</i>	Reaccions d'oxidació-reducció
EC.2	<i>Transferases</i>	Transferència de grups metil, acil, glicosil, fosfat...
EC.3	<i>Hidrolases</i>	Formació i hidròlisi d'èsters, d'amides, d'epòxids, de nitrils, de glicòsids, d'èters...
EC.4	<i>Liases</i>	Addició-eliminació de molècules petites sobre C=C, C=O, C=N...
EC.5	<i>Isomerases</i>	Isomeritzacions (epimeritzacions, transposicions...)
EC.6	<i>Lligases</i>	Formació de nous enllaços C-O, C-S, C-N i C-C amb despesa associada d'ATP

Font: Grundwald, 2009.

### 1.3.2. Consideracions generals sobre l'ús d'enzims com a catalitzadors

Tot i que a principis dels anys seixanta del segle XX ja es va descriure l'ús de l'enzim quimotripsina com a catalitzador de la hidròlisi d'un èster (figura 1.3.1), no va ser fins els anys vuitanta del segle passat quan l'utilització dels enzims com a catalitzadors va iniciar el desenvolupament espectacular que ha assolit actualment.

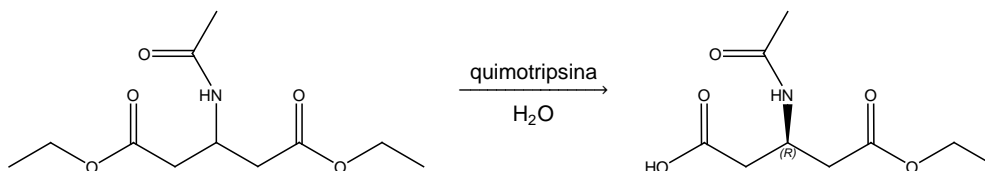


FIGURA 1.3.1. Hidròlisi catalitzada per l'enzim quimotripsina (Cohen i Khedouri, 1961).

Aquest endarreriment enfront a la catàlisi química té el seu origen en certes idees preconcebudes al voltant del funcionament i característiques dels enzims. La capacitat catalítica dels enzims s'atribueix a la seva estructura tridimensional i diversos factors, com l'elevada concentració en sals o la temperatura, contribueixen a l'alteració d'aquesta estructura amb la consegüent pèrdua de la capacitat catalítica (desnaturalització). Per aquest motiu, els enzims han estat considerats làbils, utilitzables únicament a temperatura ambient, en dissolució aquosa i en un estret marge de pH del medi.

A més, la seva coneguda especificitat de substrat feia pensar que serien poc eficaços davant d'altres substrats diferents dels naturals. Actualment, s'ha constatat que aquestes suposades limitacions condicionen el seu ús molt menys del que es creia en un principi.

L'ús d'enzims com a catalitzadors presenta clars avantatges davant d'altres mètodes. Un dels més importants és la seva elevada efectivitat catalítica, major que la de qualsevol catalitzador químic. Per una altra part, són preferibles a aquests des del punt de vista mediambiental. Les reaccions poden realitzar-se en condicions suaus, la qual cosa minimitza l'aparició de productes secundaris. A més, tot i ser extraordinàriament selectius, tant des del punt de vista regioselectiu com diastereoselectiu o enantioselectiu, admeten substrats diferents dels naturals (Illanes *et al.*, 2012).

No obstant això, el seu ús també comporta alguns desavantatges. Un dels més importants és que solament existeixen en una forma enantiomèrica. Així, si un enzim catalitza una reacció de forma enantioselectiva; però amb l'enantioselectivitat oposada a la desitjada, s'haurà de realitzar un estudi basat en el mètode de prova i error fins descobrir un enzim que mostri una selectivitat en el sentit desitjat. Per una altra part, la seva activitat és màxima en dissolució aquosa, medi on la major part dels compostos orgànics tenen una solubilitat limitada. A més, l'activitat de determinats enzims pot resultar inhibida pel propi producte de la reacció, la qual cosa pot limitar el rendiment del procés. Malgrat això, els avantatges que implica l'ús d'enzims en la síntesi de compostos enantiopurs ha fet que el seu ús sigui cada vegada més habitual (Illanes *et al.*, 2012).

Com l'obtenció d'enzims pot ser cara i a vegades difícil, per evitar pèrdues innecessàries del material enzimàtic, es pot recórrer a la immobilització dels enzims en suports sòlids que permetin la seva reutilització en els processos industrials. La immobilització consisteix a fixar o atrapar l'enzim en un material insoluble (gel, membrana, perles de vidre, etc.) de forma que no perdi l'activitat i permeti la seva recuperació. Es tracta d'utilitzar un sistema de dues fases fàcilment separables, una que contingui l'enzim i es pugui reutilitzar o utilitzar de forma contínua i una altra que contingui el producte.



La immobilització pot realitzar-se per mètodes físics, com l'adsorció no covalent de l'enzim en un suport insoluble, la retenció de l'enzim en gels o fibres i el confinament de l'enzim en una membrana que permeti el pas del substrat i eviti la pèrdua de l'enzim (microencapsulació i ultrafiltració); o per mètodes químics, mitjançant la formació d'enllaços covalents entre l'enzim i una matriu activada o copolimeritzant les molècules d'enzim i suport.

En la taula 1.3.2 es presenta una comparació d'aquests quatre mètodes d'immobilització d'enzims i s'indiquen els seus avantatges i inconvenients.

TAULA 1.3.2. Comparació dels principals mètodes d'immobilització d'enzims

<i>Característiques</i>	<i>Adsorció</i>	<i>Retenció</i>	<i>Confinament</i>	<i>Unió covalent</i>
<i>Preparació</i>	senzilla	difícil	senzilla	difícil
<i>Cost</i>	baix	moderat	alt	alt
<i>Intensitat de la unió</i>	variable	feble	forta	forta
<i>Pèrdua d'enzim</i>	sí	sí	no	no
<i>Aplicabilitat</i>	àmplia	àmplia	molt àmplia	selectiva
<i>Efecte de la matriu</i>	sí	sí	sí	no
<i>Barrera de difusió</i>	no	sí	sí	no
<i>Protecció microbiana</i>	no	sí	sí	no
<i>Problemes</i>	pèrdua d'enzim	poca difusió de molècules grans	cost elevat	cost elevat càrrega enzimàtica baixa

Font: Castillo, 2005.

### 1.3.3. Reaccions catalitzades per hidrolases

Les hidrolases (lipases, esterases, proteases, amidases, epòxid-hidrolases, nitrilases i glucosidases) constitueixen el grup més ampli de catalitzadors. El mecanisme d'hidròlisi d'aquests d'enzims és pot veure en la figura 1.3.2. Un grup nucleòfil del centre actiu de l'enzim ataca el grup carbonil del substrat. L'enzim és acilat pel substrat i requereix un nucleòfil extern per recuperar la seva forma activa.

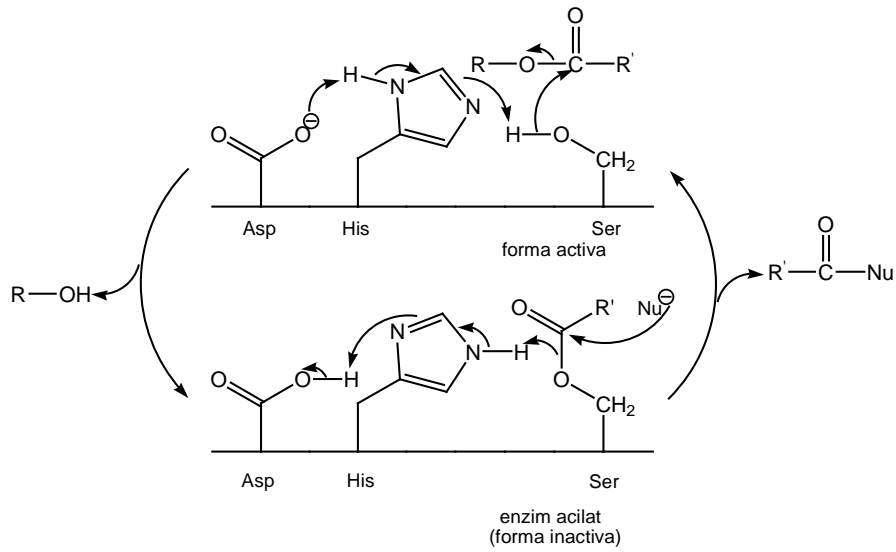


FIGURA 1.3.2. Mecanisme d'hidròlisi d'hidrolases amb serina en el centre actiu (Delgado, Minguillón i Joglar, 2002).

Les reaccions catalitzades per hidrolases no es restringeixen a reaccions d'hidròlisi, encara que aquestes són majoritàries. Depenent del nucleòfil, poden catalitzar diferents reaccions seguint el mateix mecanisme (figura 1.3.3).

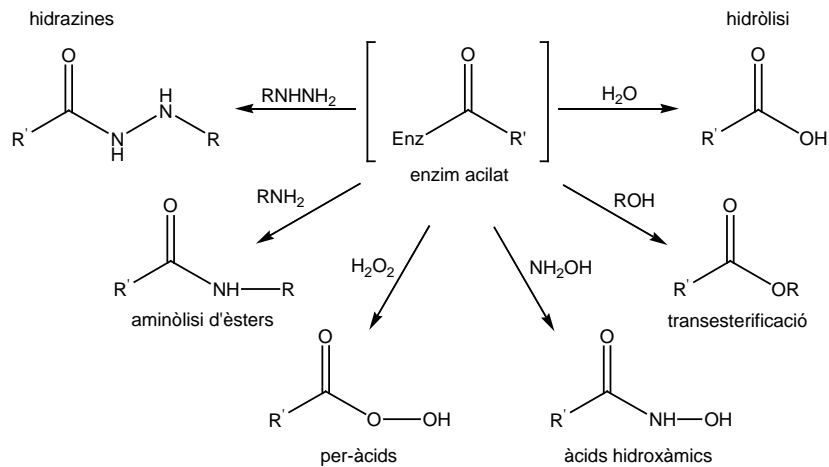


FIGURA 1.3.3. Tipus de reaccions catalitzades per hidrolases en funció del nucleòfil (Gotor-Fernández, Brieva i Gotor, 2006).

Les hidrolases poden actuar en medis no aquosos com ara dissolvents orgànics, fluids supercrítics i líquids iònics o inclús en medis sense dissolvent (Petersson, Adlercreutz i Mattiasson, 2007). Quan es parla de biocatàlisi en dissolvents orgànics es fa referència a aquells sistemes en què els enzims, lliures o immobilitzats, estan suspesos o dissolts en dissolvents orgànics que contenen la quantitat d'aigua necessària per assegurar l'activitat catalítica (en general inferior a un 5% v/v). Aquests sistemes de reacció són diferents dels aquosos en els quals s'afegeix una quantitat de dissolvent orgànic miscible amb l'aigua, per afavorir la dissolució dels substrats insolubles.

L'ús dels enzims en dissolvents orgànics té molts avantatges. Per exemple, és possible: a) transformar substrats inestables i poc solubles en aigua; b) evitar moltes reaccions secundàries que depenen de l'aigua; c) augmentar l'estabilitat tèrmica dels enzims evitant la seva desnaturalització; d) afavorir la síntesi d'enllaços èster i amida per hidrolases, i e) modificar, canviant el dissolvent orgànic, l'especificitat de substrat i la regio- i enantioselectivitat d'un determinat enzim (Carrea, Ottolina i Riva, 1995).

Malgrat tots aquests avantatges, cal tenir en compte que molts dissolvents orgànics són inflamables, tòxics i volàtils. És per això que en els últims anys han sorgit altres medis de reacció no convencionals (líquids iònics, fluids supercrítics i sistemes bifàsics líquid iònic / fluid supercrític) els quals no presenten aquests inconvenients.

### **1.3.4. Obtenció de productes quirals enantioenriquits o purs**

La gran demanda de productes quirals enantioenriquits o purs ha fet que hi hagi un gran interès en l'aplicació de biocatalitzadors (principalment hidrolases i oxidoreductases) en la síntesi asimètrica (asimetrització) de substrats proquirals o *meso* i en la resolució cinètica de substrats racèmics. Com, teòricament, el nombre de substrats racèmics (no simètrics) és més gran que el de substrats proquirals o *meso* (simètrics), la síntesi asimètrica s'utilitza menys que la resolució cinètica, tot i que el rendiment de la primera és superior (Gruber *et al.*, 2006).

Tenint en compte la seva relació amb la present tesi, només es descriuran les lipases i les epòxid-hidrolases i el seu ús en l'obtenció de productes quirals enantioenriquits o purs.

### 1.3.4.1. Lipases

Les lipases (EC 3.1.1.3) són enzims que hidrolitzen triacilglicerols (TAGs) formats per àcids grassos de cadena llarga, diferenciant-se així de les esterases (EC 3.1.1.1), les quals només accepten èsters solubles o TAGs formats per àcids grassos de cadena curta, com la tributirina.

Les lipases es troben en animals (Shimokawa *et al.*, 2005), plantes (Villeneuve, 2003) i microorganismes (Bornscheuer i Kazlauskas, 2006). Sovint presenten elevada regio- i estereoselectivitat, la qual cosa les converteix en biocatalitzadors interessants per a la producció de compostos enantiopurs. No requereixen cofactors i són bastant estables. Poden ser inhibides per compostos organofosforats mitjançant un procés similar al que s'ha vist per a la hidròlisi. L'enzim un cop fosforilat pot ser reactivat lentament per reacció amb l'aigua o romandre inhibit (figura 1.3.4).

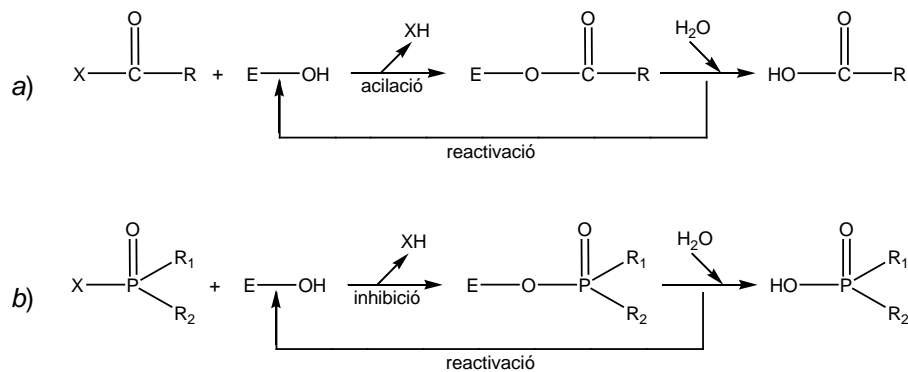


FIGURA 1.3.4. Hidròlisi (mecanisme a) i organofosforilació (mecanisme b) de les lipases (Estevez i Vilanova, 2009).

La síntesi de lipases pot ser induïda per la presència d'olis, àcids grassos, èsters hidrolitzables, *tweens*, sals biliars, glicerol, sucres, xerigot i polisacàrids. Altres paràmetres importants són: la presència de nitrogen i cations divalents (principalment  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ ), la temperatura, el pH, la velocitat d'agitació i l'aireig (Rashid *et al.*, 2001; Rathi, Saxena i Gupta, 2001; Sharma, Chisti i Banerjee, 2001).

## Introducció

---

La majoria de biotransformacions utilitzen lipases comercials (taula 1.3.3), les quals s'anomenen d'acord a l'organisme que les produeix.

TAULA 1.3.3. Exemples de lipases comercials

Abreviació	Lipases	Altres noms
<b>Lipases de mamífers</b>		
PPL	Pancreàtica porcina	
<b>Lipases fúngiques</b>		
CRL	<i>Candida rugosa</i>	<i>Candida cylindracea</i>
HLL	<i>Humicola lanuginosa</i>	<i>Thermomyces lanuginosa</i>
PcamL	<i>Penicillium camembertii</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>
RJL	<i>Rhizomucor javanicus</i>	<i>Mucor javanicus</i>
RML	<i>Rhizomucor miehei</i>	<i>Mucor miehei</i>
ROL	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Rhizopus javanicus</i> , <i>Rhizopus delemar</i> , <i>Rhizopus niveus</i>
CAL-A	lipasa A de <i>Candida antarctica</i>	
CAL-B	lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	
ANL	<i>Aspergillus niger</i>	
CLL	<i>Candida lipolytica</i>	
ProqL	<i>Penicillium roquefortii</i>	
<b>Lipases bacterianes</b>		
PCL	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
PFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
PfragiL	<i>Pseudomonas fragi</i>	
CVL	<i>Chromobacterium viscosum</i>	<i>Pseudomonas glumae</i>

Font: Bornscheuer i Kazlauskas, 2006.

Les lipases comercials més utilitzades en síntesi orgànica són: la lipasa pancreàtica porcina, la lipasa de *P. cepacia*, la lipasa de *C. rugosa* i la lipasa B de *C. antarctica*. Per a la modificació de lípids, la lipasa de *R. miehei* és la més important (Bornscheuer i Kazlauskas, 2006).

Com a característica general, totes les lipases presenten tres aminoàcids (serina, aspartat o glutamat i histidina) al centre actiu, els quals constitueixen la tríada catalítica. L'estructura 3D de les lipases revela l'existència d'una  $\beta$ -làmina central envoltada pels dos costats per un nombre variable d' $\alpha$ -hèlixs (plegament  $\alpha/\beta$ -hidrolasa). Les reaccions catalitzades per lipases tenen lloc en la interfase oli-aigua. Quan una lipasa es troba lliurement dissolta, en absència d'una interfase oli-aigua, roman en el seu estat inactiu i una  $\alpha$ -hèlix (o *tapa*) cobreix el centre actiu. En entrar l'enzim en contacte amb la interfase d'un sistema bifàsic, es desplega l' $\alpha$ -hèlix i es produeix l'activació interfacial de la lipasa. És a dir, quan el substrat no hi és, la *tapa* està tancada i l'enzim inactiu. En canvi, en presència de substrat, existeix la interfase oli-aigua, la *tapa* està oberta i la lipasa activa. Les lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, de *C. viscosum* i la lipasa B de *C. antarctica* no presenten activació interfacial tot i tenir una petita *tapa* (Ghanem, 2007).

La majoria de lipases converteixen els èsters d'àcids grassos saturats de cadena mitjana ( $C_4$ )-llarga ( $C_{18}$ ) i algunes d'elles, com la lipasa de *R. miehei*, hidrolitzen de forma eficient èsters d'àcids grassos de  $C_{22}$  (Rangheard *et al.*, 1989). Té un gran interès l'especificitat *cis* ( $\Delta$ -9) de la lipasa de *Geotrichum candidum* (Borgdorf i Warwel, 1999; Phillips, Pretorius i Rensburg, 1995). Les lipases també hidrolitzen els TAGs en la posició *sn*-1(3), en canvi, la hidròlisi en la posició *sn*-2 només la catalitzen quatre lipases microbianes: la lipasa A de *C. antarctica*, la lipasa de *G. candidum*, la lipasa de *Penicillium simplicissimum* i la lipasa de *C. rugosa*.

Les lipases són àmpliament utilitzades per catalitzar reaccions d'hidròlisi, d'esterificació, de transesterificació (alcohòlisi i acidòlisi) i d'interesterificació, aprofitant la seva eficiència catalítica, la seva especificitat d'àcid gras i la seva regio- i estereoselectivitat (Hassan, Shah i Hameed, 2006).

Les lipases *sn*-1,3-específiques han estat utilitzades per a la producció de TAGs estructurats, els quals són TAGs amb un determinat àcid gras en una posició específica del glicerol. Els TAGs estructurats inclouen, per exemple, els substituïts de la mantega de cacau i el Betapol<sup>®</sup> (Iwasaki i Yamane, 2000; Xu, 2000).

Les lipases també han estat molt estudiades pel que fa a la modificació d'olis rics en àcids grassos poliinsaturats (PUFAs) de gran valor com l'àcid araquidònic (AA o C20:2  $\omega_6$ ), l'àcid eicosapentaenoic (EPA o C20:5  $\omega_3$ ) i l'àcid docosahexaenoic (DHA o C22:6  $\omega_3$ ), entre altres. Molts dels PUFAs  $\omega_3$  presenten efectes terapèutics i nutricionals molt beneficiosos (Kovac *et al.*, 2000).

Generalment, les lipases poden classificar-se en tres grups en funció de la seva especificitat:

a) Especificitat posicional o regioespecificitat

La *regioespecificitat* és la capacitat que tenen algunes lipases per distingir les dues posicions externes dels TAGs i la posició interna. Les lipases poden dividir-se en dos grups en funció de la seva regioespecificitat. El primer grup el formen les lipases no específiques, les quals hidrolitzen a l'atzar, àcids grassos de qualsevol de les tres posicions del TAG i el segon grup, les lipases *sn*-1,3-específiques, les quals només hidrolitzen els àcids grassos situats en les posicions *sn*-1 i *sn*-3 dels TAGs i no actuen sobre l'àcid gras situat en la posició *sn*-2 a causa de l'impediment estèric (Saxena *et al.*, 1999). L'*estereoespecificitat* descriu la capacitat d'algunes lipases per distingir entre les posicions *sn*-1 i *sn*-3 (Villeneuve, 2003). Generalment, la regioespecificitat d'una lipasa es determina utilitzant trioleïna com a substrat. Per exemple, les lipases de *P. aeruginosa* LST-03 (Ogino *et al.*, 2000) i de *Bacillus thermoleovorans* ID-1 (Lee *et al.*, 2001) són no específiques i les de *Bacillus stearothermophilus*, de *Bacillus licheniformis* i de *Bacillus subtilis* són *sn*-1,3-específiques (Chen, Coolbear i Daniel, 2004).

### b) Especificitat d'àcids grassos

Per determinar l'especificitat d'àcid gras s'utilitzen TAGs. Existeixen diferències en la capacitat de les lipases per hidrolitzar els TAGs. Per exemple, Sinchaikul *et al.* (2001) van publicar que la lipasa de *B. stearrowthermophilus* P1 era capaç d'hidrolitzar TAGs amb àcids grassos de C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>, amb més activitat sobre la tricaprilina i la trilinolenina que sobre la trilinoleïna i la trioleïna. Kambourova *et al.* (2003) van demostrar que la lipasa de *B. stearrowthermophilus* MC7 tenia una àmplia especificitat vers els TAGs amb C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>, amb major activitat sobre la tributirina.

### c) Especificitat d'acilglicerols parcials

Una altra especificitat de les lipases es basa en la seva activitat sobre els monoacilglicerols (MAGs) i els diacilglicerols (DAGs) o acilglicerols parcials. Sakiyama *et al.*, (2001) van veure que la lipasa de *Pseudomonas* sp. LP7315 tenia una especificitat estricta vers els MAGs ja que l'enzim no era capaç d'hidrolitzar ni DAGs ni TAGs.



## Introducció

En la taula 1.3.4 es pot veure el tipus d'especificitat que presenten algunes lipases.

TAULA 1.3.4. Especificitat de les lipases i les seves aplicacions

<i>Especificitat</i>	<i>Lipases</i>	<i>Producció de</i>
<b><i>Regioespecificitat</i></b>		
<i>sn</i> -1,3-específica	<i>R. miehei</i> <i>R. oryzae</i>	TAGs
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>sn</i> -1,2(2,3)-DAGs per hidròlisi de TAG
	<i>R. delemar</i> <i>R. niveus</i>	<i>sn</i> -1,3-DAGs per esterificació d'àcids grassos
No específica	Pancreàtica porcina	<i>sn</i> -2-MAGs per hidròlisi de TAGs <i>sn</i> -1(3)-MAGs per esterificació d'àcids grassos
	<i>C. rugosa</i> <i>C. viscosum</i>	Àcids grassos per hidròlisi
	<i>P. fluorescens</i> <i>P. cepacia</i>	MAGs i DAGs per gliceròlisi
<b><i>Especificitat d'àcids grassos</i></b>		
Àcids grassos poliinsaturats de cadena llarga	<i>G. candidum</i> <i>C. rugosa</i>	
Àcids grassos saturats	<i>Fusarium oxysporum</i>	Hidròlisi selectiva
Àcids grassos insaturats <i>cis</i> - $\Delta$ 9	<i>G. candidum</i>	
Àcids grassos de cadena curta	<i>Cuphea</i> sp.	
<b><i>Especificitat d'acilglicerols parcials</i></b>		
MAGs	Acilhidrolasa de la patata (patatin)	MAGs per esterificació d'àcids grassos
MAGs i DAGs	<i>P. camembertii</i> <i>P. cyclopium</i> M1 <i>Fusarium</i> sp.	MAGs i DAGs per esterificació d'àcids grassos
TAGs	<i>P. roquefortii</i> <i>P. cyclopium</i> M1 <i>Penicillium expansum</i>	<i>sn</i> -1,2-DAGs per hidròlisi o alcoholisi de TAGs

Font: Bornscheuer, 2000.

### 1.3.4.1.1. Resolucions cinètiques

Donat el gran nombre d'exemples basats en resolucions cinètiques amb lipases, resulta impossible realitzar una taula representativa de tots ells sense que es converteixi en un llistat interminable. Alguns dels productes industrials obtinguts per resolució cinètica amb lipases són: L-mentol, (*R*)-enantiòmers d'àcids 2-ariloxipropiònics amb activitat herbicida, (*S*)-enantiòmers d'àcids 2-ariloxipropiònics amb activitat antiinflamatòria, aspartame, antihipertensors inhibidors de l'enzim convertidor d'angiotensina (ECA), (*R*)-carnitina, diltiazem (antagonista dels canals de calci), antibiòtics  $\beta$ -lactàmics i insecticides piretroides (Carrea i Riva, 2000).

Actualment, hi ha un gran interès pels  $C_3$ -sintons com a intermedis quirals en la síntesi de compostos òpticament actius. En la figura 1.3.5 se'n poden veure alguns exemples.

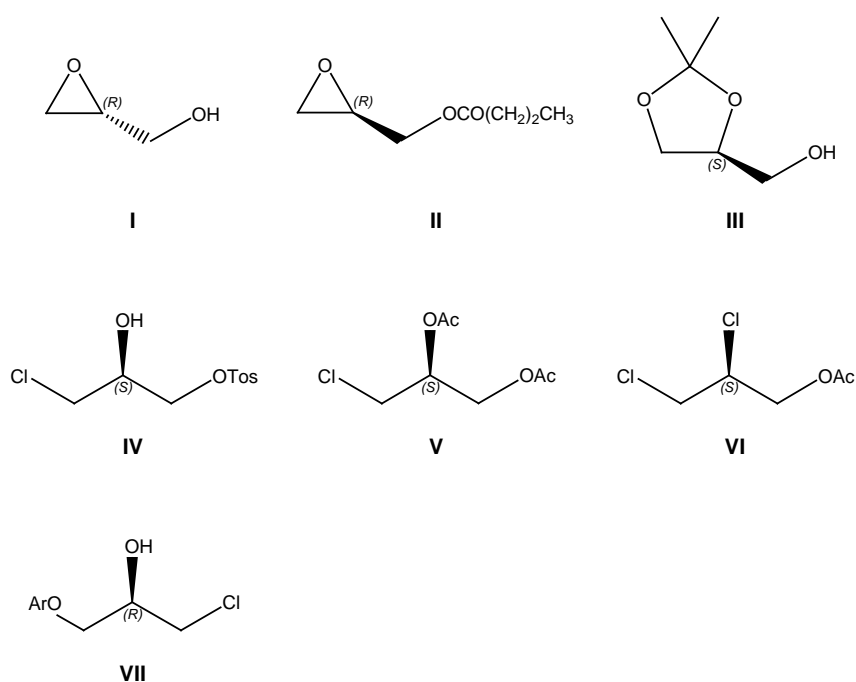


FIGURA 1.3.5. Exemples de  $C_3$ -sintons quirals enantiopurs (Campo *et al.*, 2001).

Abans de 1980, aquests intermedis quirals eren sintetitzats a partir del D-manitol, de l'àcid L-ascòrbic o de la L-serina; però des de llavors s'han desenvolupat altres vies, moltes d'elles enzimàtiques, que parteixen de l'alcohol al·lílic, del solketal, del glicidol o de l'epiclorohidrina. Per exemple, **I** i **II** poden obtenir-se per hidròlisi del butirat de glicidil racèmic catalitzada per la lipasa pancreàtica porcina (Kloosterman *et al.*, 1988), **III** per oxidació del *rac*-solketal catalitzada per la quinohemoproteïna alcohol-deshidrogenasa (QH-ADH) de *Comamonas testosteroni* (Jongejan, Machado i Jongejan, 2000) i **IV** per hidròlisi del corresponent butirat racèmic catalitzada per la lipoproteïna-lipasa (Hamaguchi, Ohashi i Watanabe, 1986a, 1986b). Els C<sub>3</sub>-sintons quirals **V** i **VI** poden obtenir-se per hidròlisi catalitzada per lipases, dels corresponents acetats racèmics preparats a partir del 3-cloro-1,2-propandiol i del 2,3-dicloro-1-propanol, respectivament (Iriuchijima, Keiyu i Kojima, 1982; Iriuchijima i Kojima, 1982). Ader i Schneider (1992a, 1992b, 1992c) van obtenir l'intermedi **VII** mitjançant la hidròlisi de l'acetat racèmic o la transesterificació de l'alcohol, catalitzades per lipases.

Entre els C<sub>3</sub>-sintons quirals anteriors cal destacar per la seva relació amb la present tesi, el (*S*)- i el (*R*)-solketal o el (*S*)- i el (*R*)-glicidol, els quals són *building blocks* quirals enantiopurs molt utilitzats per a la síntesi de compostos quirals òpticament actius, com es veurà més endavant.

Encara que, com s'ha explicat en l'apartat 1.2, aquests C<sub>3</sub>-sintons quirals enantiopurs poden obtenir-se químicament a partir de compostos de la reserva quiral, els mètodes enzimàtics basats en la resolució cinètica hidrolítica dels seus èsters racèmics ha rebut una atenció especial en els últims anys.

S'han utilitzat hidrolases comercials per catalitzar la hidròlisi d'èsters de solketal racèmics; però l'enantioselectivitat de la majoria d'aquestes reaccions no és bona i, per tant, és necessari combinar diferents mètodes per aconseguir solketal enantiomèricament pur (figura 1.3.6).

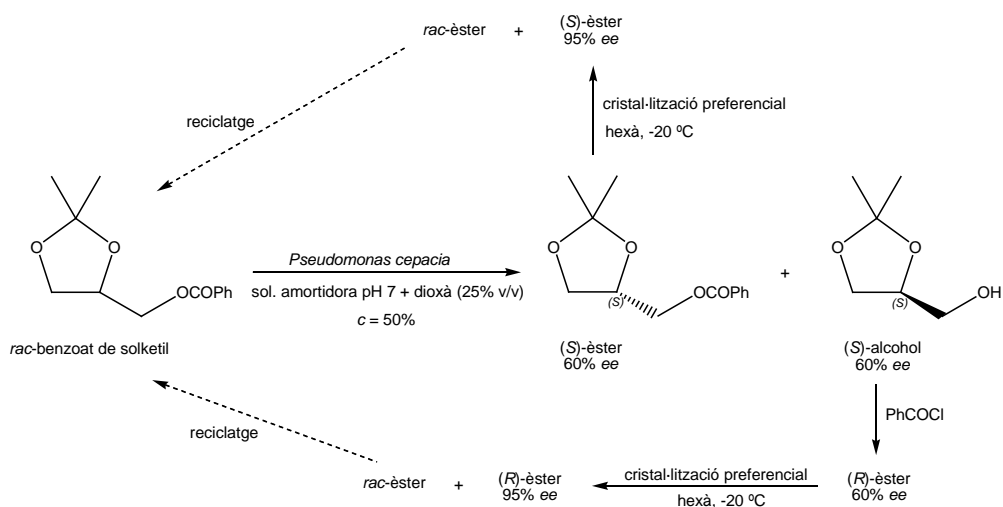
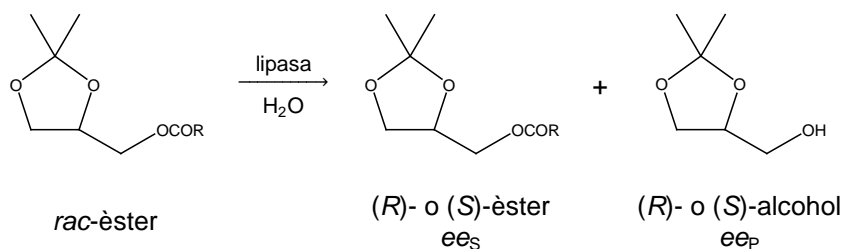


FIGURA 1.3.6. Resolució del *rac*-benzoat de solketil combinant la hidròlisi enzimàtica i la cristal·lització preferencial (Bianchi *et al.*, 1997).

S'han aïllat dues carboxilesterases de *Bacillus* sp. que hidrolitzen el benzoat i el caprilat de solketil racèmics amb bones enantioselectivitats (Dröge *et al.*, 2005; Romano *et al.*, 2005); però èsters més hidrosolubles com l'acetat o el butirat de solketil encara són difícils de resoldre. En la taula 1.3.5 es poden trobar més exemples d'hidròlisis enantioselectives d'èsters de solketil racèmics catalitzades per diferents carboxilesterases.

Segons la regla de Cahn-Ingold-Prelog, quan l'enzim presenta preferència pel (*R*)-èster, la hidròlisi dona lloc al (*S*)-alcohol. En canvi, quan l'enantiòmer més reactiu és el (*S*)-èster, s'obté el (*R*)-alcohol.

TAULA 1.3.5. Hidròlisi d'èsters de solketil racèmics

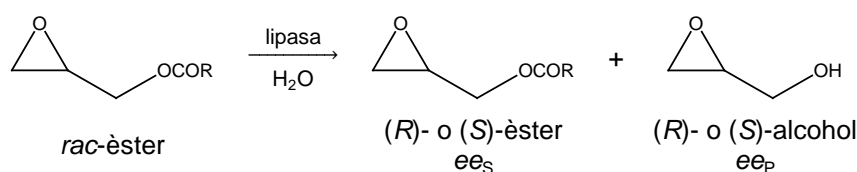


Substrat	Lipasa	$ee_S$ (%) / c. a.	$ee_P$ (%) / c. a.	c (%)	E	Referència
R: $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$	<i>P. cepacia</i>	23/(S)	62/(S)	27	5	Mezzetti, Keith i Kazlauskas, 2003
R: $\text{CH}_3$	<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS1553	91/(R)	69/(R)	57	17	Molinari <i>et al.</i> , 2004
R: Ph	<i>Bacillus coagulans</i> NCIMB9365	69/(S)	95/(S)	42	81	Romano <i>et al.</i> , 2005
R: $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$	<i>B. subtilis</i> (CesB)	>99,9/(R)	>99,9/(R)	—	>200	Dröge <i>et al.</i> , 2005
R: $(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	<i>Streptomyces</i> sp. 90852	21/(S)	50/(S)	30	4	Molinari <i>et al.</i> , 2005
R: $(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	<i>Streptomyces</i> sp. 90930	15/(R)	45/(R)	25	3	Molinari <i>et al.</i> , 2005

— No calculat

La resolució cinètica hidrolítica d'èsters de glicidil racèmics també ha estat l'objectiu de moltes biotransformacions. En la taula 1.3.6 es poden trobar alguns exemples d'hidròlisis enantioselectives d'èsters de glicidil racèmics catalitzades per diferents lipases. Igual que abans, la hidròlisi del (R)- i del (S)-èster dóna el (S)- i el (R)-alcohol, respectivament.

TAULA 1.3.6. Hidròlisi d'èsters de glicidil racèmics



Substrat	Lipasa	$ee_S$ (%) / c. a.	$ee_P$ (%) / c. a.	c (%)	E	Referència
R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<i>Rhizopus</i> sp. Bc0-09	97/(R)	—	53	—	Jia <i>et al.</i> , 2003
R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<i>R. oryzae</i>	89/(R)	89/(R)	50	51	Palomo <i>et al.</i> , 2004
R: CH <sub>3</sub>	pancreàtica porcina C8	54/(R)	69/(R)	44	9	Molinari <i>et al.</i> , 2004
R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	pancreàtica porcina C8	96/(R)	79/(R)	55	32	Molinari <i>et al.</i> , 2005
R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	B de <i>C. antarctica</i>	91/(S)	51/(S)	64	9	Palomo <i>et al.</i> , 2006
R: (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<i>B. subtilis</i> BSL2	98/(R)	—	52	108	Li <i>et al.</i> , 2008

— No calculat

Els dos enantiòmers del butirat de glicidil són C<sub>3</sub>-sintons quirals per a la producció de compostos biològicament actius de gran interès. El (R)-butirat de glicidil es pot obtenir per hidròlisi del *rac*-butirat de glicidil; però el (S)-butirat de glicidil, en canvi, és més difícil d'aconseguir ja que la majoria de lipases durant la hidròlisi presenten preferència pel (S)-èster, quedant el (R)-èster.

Palomo *et al.* (2006) van obtenir el (S)-butirat de glicidil mitjançant la resolució hidrolítica del *rac*-butirat de glicidil catalitzada per la lipasa B de *C. antarctica*.

## Introducció

Quan el producte enantioenriquit d'una primera resolució se sotmet a una segona resolució, es pot millorar l'excés enantiomèric (figures 1.3.7 i 1.3.8).

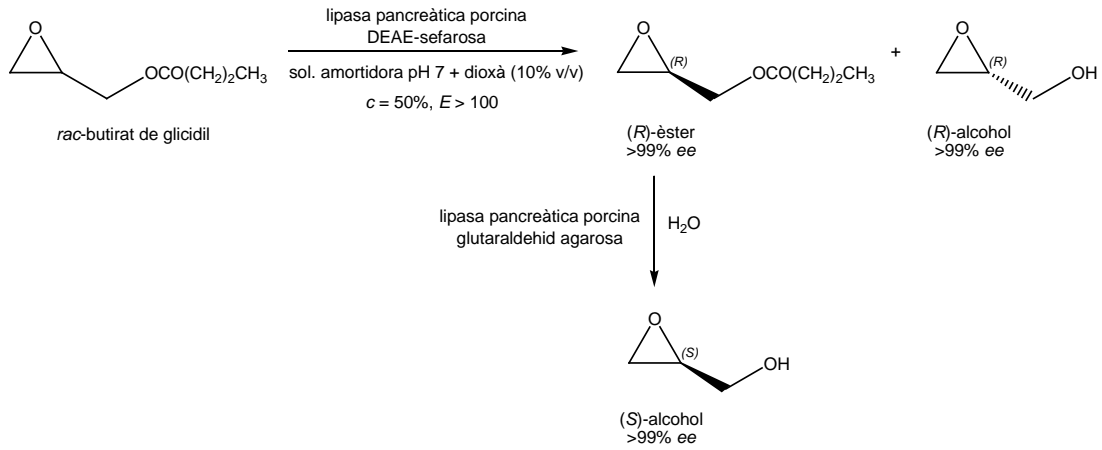


FIGURA 1.3.7. Hidròlisi del *rac*-butirat de glicidil i hidròlisi del (*R*)-butirat de glicidil enantioenriquit per obtenir el (*R*)- i el (*S*)-glicidol enantiopurs (Palomo *et al.*, 2005).

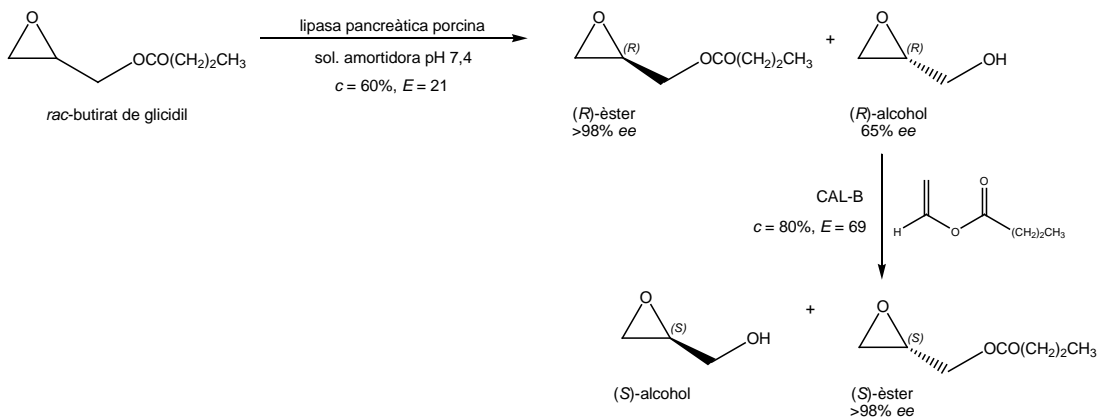


FIGURA 1.3.8. Hidròlisi del *rac*-butirat de glicidil i transesterificació del (*R*)-glicidol enantioenriquit per obtenir el (*R*)- i el (*S*)-butirat de glicidil amb elevats excessos enantiomèrics (Yu *et al.*, 2007).

### 1.3.4.1.2. Enantioselectivitat

En una resolució cinètica, l'excés enantiomèric (o puresa enantiomèrica) del producte i del substrat varia a mesura que la reacció avança. Per tant, comparar els excessos enantiomèrics de dues resolucions cinètiques només té sentit quan el grau de conversió és el mateix. Per comparar resolucions cinètiques, Chen *et al.* (1982, 1987) van desenvolupar unes equacions que permetien calcular l'enantioselectivitat.

L'enantioselectivitat o relació enantiomèrica ( $E$ ), mesura la capacitat de l'enzim per distingir els enantiòmers i es defineix com la relació de les constants de velocitat de pseudoprimer ordre per a les reaccions amb ambdós enantiòmers (equació 1.3.1).



El valor d' $E$  pot calcular-se a partir de les equacions 1.3.2, 1.3.3 i 1.3.4 per a reaccions irreversibles i de les equacions 1.3.5 i 1.3.6 per a reaccions reversibles.

Per a reaccions irreversibles:

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + ee_P)]}{\ln[1 - c(1 - ee_P)]} \quad (1.3.2)$$

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 - ee_S)]}{\ln[1 - c(1 + ee_S)]} \quad (1.3.3)$$

$$E = \frac{\ln \frac{[ee_P(1 - ee_S)]}{[ee_P + ee_S]}}{\ln \frac{[ee_P(1 + ee_S)]}{[ee_P + ee_S]}} \quad (1.3.4)$$



on  $c$  és la conversió del substrat i,  $ee_P$  i  $ee_S$  són els excessos enantiomèrics del producte (P) i del substrat menys reactiu (S), respectivament. En les equacions anteriors,  $c = ee_S / (ee_S + ee_P)$ .

En les reaccions irreversibles, el substrat enantiomèric menys reactiu es pot obtenir fàcilment amb un excés enantiomèric elevat sigui quina sigui l'enantioselectivitat de la reacció. Ara bé, si aquesta és baixa, s'haurà de deixar transcórrer la reacció fins un valor de conversió elevat, la qual cosa va en detriment del rendiment. En canvi, el producte de la reacció només pot obtenir-se amb un bon rendiment i un elevat excés enantiomèric si la reacció té una enantioselectivitat de 100 unitats o superior.

Per a reaccions reversibles:

$$E = \frac{\ln[1 - (1+K) c (1 + ee_P)]}{\ln[1 - (1+K) c (1 - ee_P)]} \quad (1.3.5)$$

$$E = \frac{\ln\{1 - (1+K) [c + ee_S (1 - c)]\}}{\ln\{1 - (1+K) [c - ee_S (1 - c)]\}} \quad (1.3.6)$$

on  $c$ ,  $ee_P$  i  $ee_S$  són els mateixos que en les equacions anteriors,  $K = (1 - c_{eq}) / c_{eq}$  i  $c_{eq}$  és la conversió quan la reacció arriba a l'estat d'equilibri ( $ee_P = ee_S = 0\%$ ).

En les reaccions reversibles, ni el producte ni el substrat menys reactiu poden obtenir-se amb un excés enantiomèric molt alt. Així, a diferència de les reaccions irreversibles, l' $ee_S$  disminueix per a  $c \geq 50\%$ .

Per tant, per calcular el valor d' $E$  s'han de tenir en compte les següents situacions:

- a) Quan el biocatalitzador és una mescla d'enzims i tots actuen sobre el substrat, el valor d' $E$  és una mitjana de tots els enzims (Chen *et al.*, 1982), però quan aquests enzims presenten diferent afinitat pel substrat, per mesurar el valor real d' $E$  cal purificar els enzims i mesurar l' $E$  per a cadascun d'ells.
- b) Quan el producte inhibeix la reacció, l' $E$  pot canviar. Per incloure la inhibició pel producte en l'anàlisi quantitatiu, s'utilitzen equacions que tenen en compte el mecanisme de les reaccions catalitzades per lipases (Anthonsen, Hoff i Anthonsen, 1995).
- c) Quan la reacció és reversible, s'ha d'incloure la constant d'equilibri de la reacció ( $K$ ) (Chen *et al.*, 1987). Quan no es disposa del valor de  $K$  i  $c \leq 50\%$ , la reacció pot tractar-se com a irreversible (Kanerva, 1996; Högberg, 2008).

### 1.3.4.1.3. Assajos per a lipases

Una *unitat d'activitat lipàsica* es defineix com la quantitat d'enzim que allibera 1  $\mu\text{mol}$  d'àcid gras per minut en les condicions d'assaig. Els mètodes més habituals per a la determinació de l'activitat lipàsica es basen en assajos de valoració (per exemple, pH-stat) i d'espectrofotometria (per exemple, hidròlisi d'èsters del *p*-nitrofenil). Aquests mètodes són molt útils quan s'han de caracteritzar pocs enzims; però no poden aplicar-se en el cribratge de molts biocatalitzadors ni en el cribratge automatitzat (*high-throughput screening*, HTS) de llibreries d'enzims derivades d'experiments d'evolució dirigida (Schmidt i Bornscheuer, 2005). Com fins a la data no s'ha definit cap protocol estàndard, cada grup de recerca utilitza un procediment diferent. S'ha d'anar en compte quan es comparen lipases comercials ja que poden contenir diferents enzims hidrolítics o inclús isoenzims (Soumanou *et al.*, 1997).

Alguns dels procediments més representatius per a la determinació de l'activitat lipàsica són els següents:

### a) Assaig del pH-stat

L'assaig consisteix a addicionar 20 mL d'una emulsió de TAG (5% v/v) i goma aràbiga (2% p/v) en aigua a la cambra de reacció del pH-stat que es troba a 37 °C i ajustar el pH a 7. A continuació, s'afegeix una quantitat coneguda de lipasa (sòlida o dissolta en una solució amortidora) a l'emulsió en agitació i el pH es manté constant afegint continuament una solució de NaOH. L'activitat específica es calcula a partir del consum inicial de NaOH. Si no es disposa d'un pH-stat, després de 10-20 minuts es pot afegir una solució (EtOH:acetona, 1:1, v/v) i valorar amb NaOH la quantitat d'àcids grassos alliberats. Aquest segon mètode és menys precís com a conseqüència de la caiguda del pH causada pels àcids grassos alliberats durant la hidròlisi, produint, així, la inactivació i la inhibició de la lipasa (Beisson *et al.*, 2000).

### b) Assajos espectrofotomètrics

Un dels assajos consisteix a mesclar en una cubeta 100 µL d'una solució de palmitat de *p*-nitrofenil (*p*NPP) (10 mM dissolts en dimetilsulfòxid o isopropanol) i 900 µL de solució lipàsica i la quantitat de *p*-nitrofenol alliberat es determina mesurant l'absorbància a 410 nm i 25 °C utilitzant un espectrofotòmetre. Una *unitat d'activitat lipàsica* es defineix com la quantitat de lipasa que allibera 1 µmol de *p*-nitrofenol per minut en les condicions d'assaig. Altres assajos permeten determinar la regioespecificitat de les lipases (Farias, Torres i Canela, 1997) o mesurar directament l'enantioselectivitat (Janes, Löwendahl i Kazlauskas, 1998; Janes i Kazlauskas, 1997).

### c) *Quick E*

Aquest mètode, descrit per a la determinació de l'enantioselectivitat de les lipases, requereix temps de mesura d'un minut i molt poca quantitat d'enzim; però les solucions han de ser transparents, els substrats cromogènics i els seus enantiòmers purs. Janes i Kazlauskas (1997) van seguir la hidròlisi enzimàtica del 2-fenilpropanoat de 4-nitrofenil o del 2-(4-isobutilfenil)propanoat de 4-nitrofenil en presència d'un compost aquiral de referència (tetradecanoat de resorufina) i un indicador de pH. Més tard, aquest mètode es va aplicar al *p*-nitrofenol, el qual a la vegada feia d'indicador de pH (Janes, Löwendahl i Kazlauskas, 1998).

### d) Assaig de l'àcid acètic

Aquest assaig parteix de la hidròlisi d'un acetat (per exemple, d'un alcohol secundari) catalitzada per una lipasa. L'àcid acètic alliberat és convertit, en presència d'ATP i coenzim A (CoA), per l'acetil CoA-sintetasa (ACS), en acetil CoA. Aquest últim, reacciona amb oxalacetat i a través d'una citrat-sintasa (CS), és convertit en citrat. L'oxalacetat es produeix per una L-malat-deshidrogenasa (L-MDH) que catalitza l'oxidació del L-malat amb un consum estequiomètric de NAD<sup>+</sup>, donant NADH. Aquest assaig és molt fiable, ràpid i permet determinar l'enantioselectivitat si s'utilitzen els enantiòmers de l'acetat quiral. (Baumann, Stürmer i Bornscheuer, 2001).

### e) Assajos fluorimètrics

Els assajos de fluorescència tenen l'avantatge de ser molt sensibles i menys susceptibles als compostos que produeixen senyals de fons; però s'han d'utilitzar substrats no naturals dissolts en solucions aquoses, els quals són inestables a pH alts o baixos i/o temperatures elevades. A més, el grup cromofòric pot donar resultats erronis (Demirjian, Shah i Morís, 1999).

Reymond i Wahler (2002) van utilitzar un alcohol secundari quiral unit a l'umbeliferona a través d'un enllaç èster. L'oxidació de la corresponent cetona per una alcohol-deshidrogenasa, seguida pel tractament amb albúmina de sèrum boví (BSA), va donar un fluorofor a través d'una  $\beta$ -eliminació. Més tard, aquest mètode va ser modificat per a una gran varietat de substrats (l'intermedi era tractat amb per-iodat sòdic abans d'afegir BSA). El gran avantatge d'aquesta modificació és que els substrats són molt estables a elevades temperatures i per a un ampli rang de valors de pH (Badalassi *et al.*, 2000).

### f) Prova de l'adrenalina

Reymond i Wahler (2002) van descriure la prova de l'adrenalina per a enzims. Un substrat resistent al per-iodat sòdic (per exemple, triacilglicerol (lipases), epòxid (epòxid-hidrolases), tributirina (esterases), etc.) és transformat enzimàticament en un producte sensible (1,2-diol) que reacciona amb el per-iodat sòdic. El per-iodat sòdic sobrant es valora per retrocés afegint un excés d'adrenalina, la qual reacciona de forma instantània i quantitativa amb el per-iodat sòdic per formar un adrenocrom intensament vermell (figura 1.3.9). L'extensió de la reacció enzimàtica és proporcional a la disminució de la intensitat de la coloració vermella de l'adrenocrom, format per oxidació de la L-adrenalina amb per-iodat sòdic.

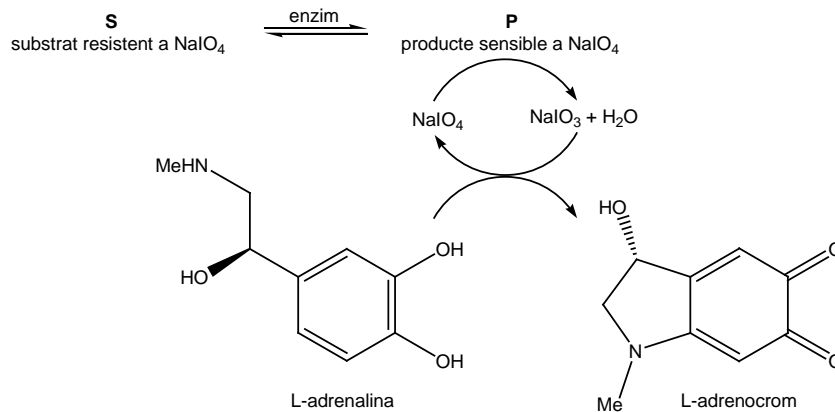


FIGURA 1.3.9. Prova de l'adrenalina (Reymond i Wahler, 2002).

### g) Assaig basat en l'espectrometria de masses

Reetz *et al.* (1999) van dur a terme la hidròlisi enzimàtica d'un èster *pseudo-racèmic* (un dels enantiòmers era deuterat i l'altre no) i van analitzar els productes per espectrometria de masses amb ionització per electroesprai o electropulverització (ESI-MS). Amb aquest mètode, l'enantioselectivitat podia calcular-se amb gran exactitud; però requeria la síntesi dels enantiòmers deuterats.

### h) Assaig per determinar l'activitat sintètica

Konarzycka i Bornscheuer (2003) van dur a terme la transesterificació de diferents alcohols amb l'acetat de vinil. L'acetaldehid generat es va fer reaccionar amb hidrazina, donant la corresponent hidrazona fluorescent. Aquest mètode ha estat aplicat en microplaques a un gran nombre d'hidrolases i no s'han observat interferències entre la hidrazina i la reacció enzimàtica.

### i) Assaig en plaques d'agar

Aquest assaig acostuma a utilitzar-se per al cribratge de noves lipases o esterases microbianes i consisteix a addicionar tributirina (1% v/v) a un medi nutritiu amb agar. Els microorganismes productors de lipases o esterases formen zones clares al voltant de les colònies per la presència d'àcids grassos lliures. Aquest assaig és més sensible si s'afegeix rodamina B, la qual crea un complex fluorescent (Beisson *et al.*, 2000).

### 1.3.4.2. Epòxid-hidrolases

Les epòxid-hidrolases (EHs) (EC 3.3.2.3) catalitzen l'addició enantio- i regioselectiva d'una molècula d'aigua a l'anell d'oxirà d'un epòxid, resultant el corresponent 1,2-diol òpticament actiu i l'epòxid enantiomèric menys reactiu. En una resolució cinètica convencional catalitzada per EHs, l'aigua actua com a nucleòfil, obrint l'anell d'oxirà i donant un 1,2-diol (Hasnaoui *et al.*, 2008; Janssen *et al.*, 2006).

L'aplicació d'EHs per a la hidròlisi d'epòxids racèmics té un gran interès perquè: a) se sap que es troben en mamífers (Bellucci *et al.*, 1989), plantes (Blée i Schuber, 1995), insectes (Linderman *et al.*, 1995), llevats (Weijers, 1997), fongs filamentosos (Grogan, Roberts i Willetts, 1996; Pedragosa *et al.*, 1996), bacteris (Mischitz *et al.*, 1995; Osprian *et al.*, 1997) i peixos (Kim *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007); b) no requereixen cofactors; c) en alguns casos, inclús es mantenen actives en dissolvents orgànics, permetent l'ús de substrats insolubles en aigua; d) sovint presenten elevada regio- i estereoselectivitat, i e) és possible obtenir diols quirals, els quals es poden utilitzar com a tals o es poden tornar a convertir en epòxids enantiopurs (Archelas i Furstoss, 2001; Choi i Choi, 2005; Vries i Janssen, 2003; Weijers i Bont, 1999).

En eucariotes, les EHs representen un paper important en el metabolisme dels xenobiòtics i en procarïotes, hidrolitzen els epòxids per acció de les P450-monooxigenases a partir d'alquens, proporcionant als organismes l'accés a aquestes fonts de carboni (Swaving i Bont, 1998).

Durant la producció industrial d'epòxids enantiopurs amb EHs pot tenir lloc una reducció de l'estabilitat i/o de l'activitat de l'enzim causada per les elevades concentracions de substrat o de producte (Krieg *et al.*, 2001; Manoj *et al.*, 2001). La pèrdua d'activitat enzimàtica durant la resolució cinètica d'epòxids racèmics s'atribueix generalment a la inhibició pel diol produït (Genzel *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2001).

### 1.3.4.2.1. Mecanisme d'obertura de l'anell d'oxirà

Un dels mecanismes proposats per a l'obertura de l'anell d'oxirà implica: l'atac nucleofílic d'un residu carboxilat sobre un dels extrems de l'epòxid, donant lloc a un intermedi  $\alpha$ -hidroxièster unit covalentment al centre actiu de l'enzim, la hidròlisi d'aquest intermedi per una molècula d'aigua, l'alliberament del diol i la regeneració de l'enzim (Lacourciere i Armstrong, 1993) (figura 1.3.10).

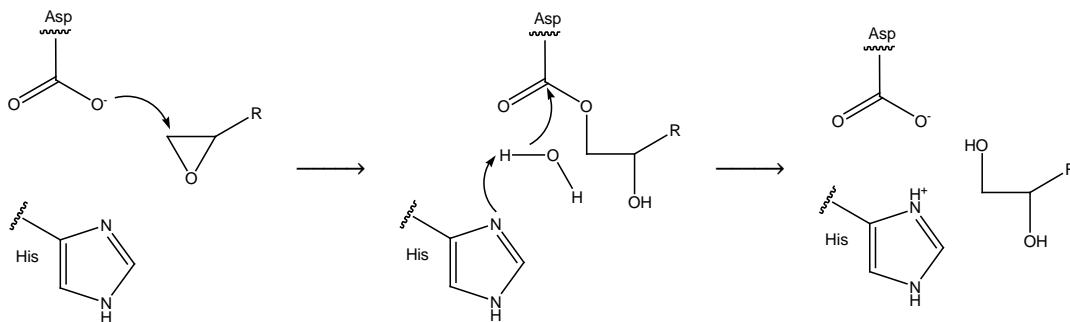


FIGURA 1.3.10. Mecanisme proposat per a EHs de mamífers (Lacourciere i Armstrong, 1993).

L'estudi de l'estructura de l'EH d'*Agrobacterium radiobacter* AD1 mitjançant raigs X, ha permès saber que els responsables de l'activació del substrat i també de l'estabilització de l'estat de transició són dos residus de tirosina (Tyr<sub>152</sub> i Tyr<sub>215</sub>) (Nardini *et al.*, 2001) i que la molècula d'aigua necessària per al segon pas és activada per un parell histidina-asparagina (His<sub>275</sub>-Asp<sub>246</sub>). L'EH d'*A. niger* té una estructura i un mecanisme similar (Zou *et al.*, 2000).

Algunes EHs poden seguir un mecanisme diferent i la molècula d'aigua atacar directament l'epòxid (Tholander *et al.*, 2005). Altres experiments suggereixen un mecanisme que implica la protonació de l'anell d'oxirà per l'Asp<sub>101</sub> i l'atac directe d'un dels carbonis de l'anell per part d'una molècula d'aigua (Arand *et al.*, 2003). Aquest mecanisme permetria, a diferència de les EHs que utilitzen el nucleòfil aspartat, l'acceptació d'altres nucleòfils a més de l'aigua.



### 1.3.4.2.2. Estereoquímica

A diferència de la hidròlisi amb lipases, esterases o proteases, on la configuració del centre estereogènic sempre és la mateixa al llarg de la reacció, la hidròlisi d'epòxids terminals amb EHs pot tenir lloc mitjançant l'atac de qualsevol dels dos carbonis de l'anell d'oxirà i és l'estructura del substrat i la naturalesa de l'enzim el que determina la regioselectivitat de l'atac, el qual pot tenir lloc amb retenció i inversió de la configuració. Per tant, la configuració del producte i del substrat menys reactiu, obtingudes a partir de la resolució cinètica d'un epòxid racèmic, serviran per esbrinar la via estereoquímica que s'ha seguit.

La hidròlisi d'epòxids terminals catalitzada per EHs pot tenir lloc amb retenció de la configuració, mitjançant l'atac del carboni de l'anell d'oxirà menys substituït (el més habitual) i amb inversió de la configuració, mitjançant l'atac del centre estereogènic (Faber, Mischitz i Kroutil, 1996). Com es veu en l'exemple de la figura 1.3.11, si l'EH hidrolitza preferentment el (S)-epòxid amb retenció de la configuració (a), la resolució cinètica dóna el (S)-diol i el (R)-epòxid. En canvi, si l'enzim actua amb inversió de la configuració (b), s'obté el (R)-diol i el (R)-epòxid.

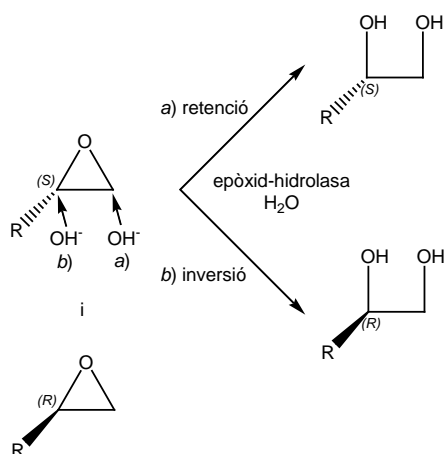


FIGURA 1.3.11. Hidròlisi d'epòxids terminals amb retenció o inversió de la configuració (Faber, Mischitz i Kroutil, 1996).

### 1.3.4.2.3. Enantioselectivitat i coeficients de regioselectivitat

L'enantioselectivitat d'una reacció podrà obtenir-se a partir de l'equació de Chen *et al.* (1982) sempre i quan els dos enantiòmers d'un substrat racèmic siguin transformats a través de vies estereoquímiques idèntiques, és a dir, quan la reacció només tingui lloc amb retenció o inversió de la configuració del centre estereogènic (Bottalla *et al.*, 2007). Aquest prerequisit el compleixen les reaccions catalitzades per lipases, esterases i proteases; però existeixen enzims com ara les glucosidases, deshalogenases, sulfatases i epòxid-hidrolases que poden actuar a través de dues vies estereoquímiques diferents, és a dir, amb retenció i inversió de la configuració del centre estereogènic durant el curs de la reacció, donant lloc a dos productes enantiomèrics oposats (Mischitz *et al.*, 1996).

Per tant, el càlcul de l'enantioselectivitat es complica quan es tracta d'hidròlisis catalitzades per EHs ja que aquests enzims poden atacar qualsevol dels dos carbonis de l'anell d'oxirà. A més, la regioselectivitat d'aquest atac pot ser diferent per a cada enantiòmer. Així, mentre l'excés enantiomèric de l'epòxid menys reactiu ( $ee_s$ ) (obtingut per a una determinada conversió) depèn exclusivament del valor de l'enantioselectivitat, l'excés enantiomèric del diol format ( $ee_p$ ) depèn de dos factors convinguts, és a dir, de l'enantioselectivitat i de la regioselectivitat de l'obertura de l'anell d'oxirà (Pedragosa, Archelas i Furstoss, 1996). Aquesta observació porta a la conclusió que les equacions de Chen *et al.* (1982, 1987) on intervé l' $ee_p$ , només es podran aplicar en el cas de regioselectivitat total sobre el mateix carboni (Mischitz *et al.*, 1996; Moussou *et al.*, 1998a).

S'ha observat en nombroses ocasions que per a epòxids monosubstituïts, la regioselectivitat de la hidròlisi depèn en gran mesura de l'enzim i del tipus de substituent. Per a epòxids disubstituïts, la regioselectivitat pot ser diferent per a cada enantiòmer i depèn de la configuració *cis* o *trans* dels substituents, donant lloc a diferents casos d'enantioconvergència (Kroutil *et al.*, 1996). Per a epòxids *gem*-disubstituïts i trisubstituïts, normalment, la regioselectivitat és total sobre el carboni menys substituït (Chen, Archelas i Furstoss, 1993). A causa d'aquests fets, en les reaccions catalitzades per EHs és necessari determinar, a més de l'enantioselectivitat, la regioselectivitat de la reacció.

La regioselectivitat es pot determinar utilitzant substrats o aigua marcada amb  $^{18}\text{O}$  (Kroutil *et al.*, 1996) o realitzant, de forma separada, la biohidròlisi dels dos enantiòmers purs (Kotik, Brichac i Kyslík, 2005).

Aquest segon mètode permet deduir la regioselectivitat de la hidròlisi a partir de l'excés enantiomèric i de la configuració absoluta del diol format; però requereix la síntesi preliminar dels dos enantiòmers purs, la qual cosa, depenent del substrat, pot resultar difícil o inclús impossible. Per a aquests casos, Moussou *et al.* (1998a) han descrit un mètode que permet determinar la regioselectivitat partint de l'epòxid racèmic.

En la figura 1.3.12 es mostra la formació dels dos diols enantiomèrics a partir de la hidròlisi de cadascun dels enantiòmers de l'epòxid. En aquest cas, l'anell d'oxirà s'ha numerat suposant que el carboni  $\text{C}_1$  és el que conté el substituent més voluminos.

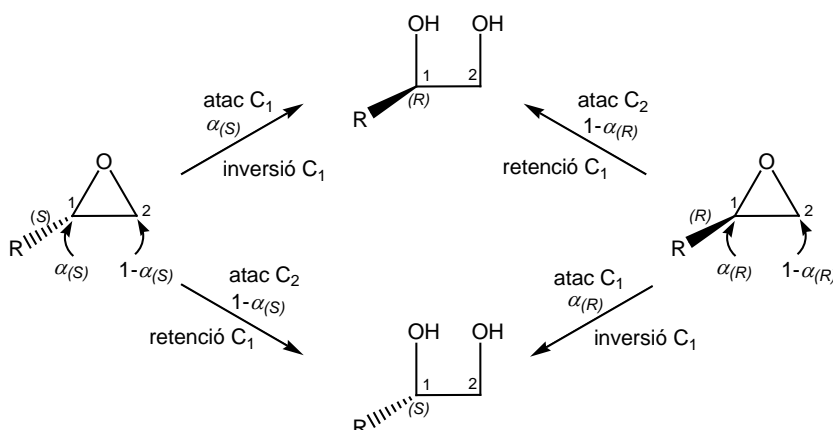


FIGURA 1.3.12. Atac del carboni  $\text{C}_1$  (atac  $\alpha$ ), resultant el diol amb inversió de la configuració o atac del carboni terminal  $\text{C}_2$  (atac  $1-\alpha$ ), resultant el diol amb retenció de la configuració (Lee, 2008; Moussou *et al.*, 1998a).

La regioselectivitat de la hidròlisi pot venir definida pels coeficients de regioselectivitat  $\alpha_S$  (proporció de (S)-epòxid atacat en el C<sub>1</sub> i, per tant, proporció de (R)-diol format per hidròlisi del (S)-epòxid) i  $\alpha_R$  (proporció de (R)-epòxid atacat en el C<sub>1</sub> i, per tant, proporció de (S)-diol format per hidròlisi del (R)-epòxid). Així, mentre un valor de  $\alpha = 0,5$  significa que no s'observa regioselectivitat, un valor de  $\alpha = 0$  o  $\alpha = 1$  indica que la regioselectivitat és total. L'enantioselectivitat ( $E$ ) juntament amb els coeficients de regioselectivitat ( $\alpha_S$  i  $\alpha_R$ ) poden determinar-se utilitzant les equacions 1.3.7 i 1.3.8.

$$c = 1 - [(1 - ee_S) \cdot (1 + ee_S)^{-E}]^{1/(E-1)} \quad (1.3.7)$$

$$ee_P = \alpha_S - \alpha_R + (1 - \alpha_S - \alpha_R) \cdot ee_S \cdot (1 - c) \cdot c^{-1} \quad (1.3.8)$$

L'equació 1.3.7 deriva de l'equació de Chen *et al.* (1982, 1987), la qual expressa la relació entre l'enantioselectivitat ( $E$ ), l'extensió de la conversió ( $c$ ) i l'excés enantiomèric de l'epòxid menys reactiu ( $ee_S$ ).

L'equació 1.3.8 defineix la relació entre els coeficients de regioselectivitat ( $\alpha_S$  i  $\alpha_R$ ), l'extensió de la conversió ( $c$ ) i l'excés enantiomèric del diol format ( $ee_P$ ) i de l'epòxid menys reactiu ( $ee_S$ ) (Moussou *et al.*, 1998a).

Quan es parteix d'un epòxid racèmic es poden observar tres situacions: a) regioselectivitat total sobre el mateix carboni; b) regioselectivitat parcial, i c) regioselectivitat total, però oposada, és a dir, atac d'un dels carbonis d'un dels enantiòmers i atac de l'altre carboni de l'altre l'enantiòmer.

### 1.3.4.2.4. Assajos per a epòxid-hidrolases

El descobriment d'activitat epòxid-hidrolàsica normalment consisteix a fer un seguiment (mitjançant GC o HPLC) de la disminució de l'epòxid i/o de la formació de l'1,2-diol. Encara que aquest mètode també permet determinar l'excés enantiomèric, requereix molt temps i no és útil per a grans col·leccions de microorganismes. Per tant, s'han buscat alternatives per dur a terme un cribratge ràpid de l'activitat epòxid-hidrolàsica.

#### a) Prova de l'adrenalina

Aquest mètode ja ha estat descrit en el cas de les lipases i és igualment aplicable en el cas de les epòxid-hidrolases. El per-iodat actua trencant enllaços carboni-carboni i oxidant els grups funcionals units a ells. Per a què un compost sigui oxidable per per-iodat, requereix tenir en carbonis adjacents grups susceptibles d'oxidació, com ara alcohols, aldehids, cetones, amines primàries o àcids carboxílics. Així, el per-iodat pot actuar sobre 1,2-diols, 1,2-aminoalcohols, 1,2-diamines,  $\alpha$ -hidroxicetones, aldehids,  $\alpha$ -aminoaldehids, 1,2-dicetones,  $\alpha$ -hidroxiàcids i  $\alpha$ -cetoàcids. Simultàniament amb la ruptura d'un enllaç carboni-carboni i l'oxidació dels grups funcionals adjacents, es redueix una molècula de per-iodat a iodat. La reacció no es produeix quan qualsevol dels grups oxidables es troba blocat per un èter, un èster o un acetal (Reymond i Wahler, 2002).

#### b) Assaig amb 4-(*p*-nitrobenzil)piridina (NBP)

La NBP s'ha utilitzat per a la identificació d'agents alquilants. Pot aplicar-se a compostos halogenats, clorurs d'àcid, compostos organofosforats, aziridines i epòxids, els quals, després de reaccionar amb NBP en presència d'una solució potàssica alcalina, formen un colorant blau. En aquest cas, es detecta el substrat i no el producte. L'assaig es pot dur a terme directament en microplaques o bé utilitzant paper de filtre per realitzar el cribratge sobre plaques d'agar (Zocher *et al.*, 1999).

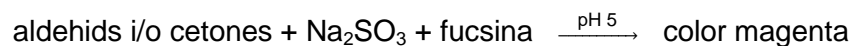
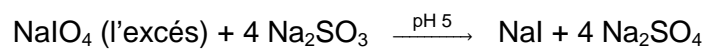
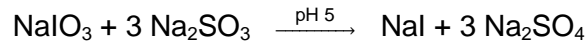
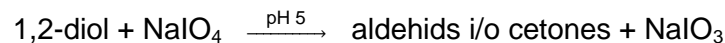
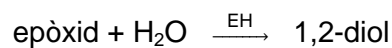
c) Assaig de fluorescència

Badalassi *et al.* (2004) van realitzar un assaig, el qual va incloure els següents punts: a) hidròlisi d'un epòxid marcat amb umbeliferona, b) oxidació de l'1,2-diol resultant amb per-iodat sòdic, c)  $\beta$ -eliminació de l'aldehid intermedi utilitzant BSA i d) alliberament de l'umbeliferona. Aquest assaig només és útil si les EHs accepten el substrat marcat amb l'umbeliferona.

d) Reactiu de Schiff (fucsina)

L'activitat epòxid-hidrolàsica també es pot determinar amb un mètode colorimètric basat en la detecció d'aldehids i cetones (Doderer *et al.*, 2003).

Les reaccions que tenen lloc durant el procés són:



Els aldehids i/o cetones es generen per reacció dels 1,2-diols amb per-iodat sòdic i el sulfit sòdic s'afegeix per evitar que l'excés de per-iodat reaccioni amb la fucsina.

### 1.3.4.2.5. Epòxid-hidrolases de bacteris

Allen i Jakoby (1969) van dur a terme la primera aplicació d'una EH (aïllada de *Pseudomonas putida*) en la síntesi del L- i del meso-àcid tartàric a partir d'un epòxid. Anys després s'ha demostrat que una gran varietat de bacteris produeixen EHs, les quals sovint presenten una enantioselectivitat bona-excel·lent. Les tècniques convencionals de fermentació permeten la producció d'EHs a partir de bacteris en quantitats suficients per dur a terme biotransformacions a gran escala.

Mischitz i Faber (1994) van descobrir que l'EH de *Rhodococcus* sp. SP409, prèviament utilitzada per a la hidròlisi de nitrils, era capaç d'hidrolitzar una gran varietat d'epòxids mono- i 1,1-disubstituïts amb una enantioselectivitat baixa-moderada. A més, també podia acceptar altres nucleòfils (per exemple, les azides) a més de l'aigua. Quan es va utilitzar una azida com a nucleòfil per a l'obertura asimètrica del *rac*-2-metil-1,2-epoxiheptà, es va hidrolitzar el (*S*)-epòxid (com en absència de l'azida) i el (*R*)-epòxid es va transformar en el corresponent azido alcohol.

Mischitz *et al.* (1995) van trobar activitat epòxid-hidrolàsica en quatre soques bacterianes (*Rhodococcus* sp. NCIMB11216, *Rhodococcus* sp. NCIMB11215, *Rhodococcus* sp. NCIMB11540 i *Corynebacterium* sp. UPT9). Les EHs de *Rhodococcus* sp. NCIMB11216 i de *Corynebacterium* sp. UPT9 van hidrolitzar preferentment el (*R*)-1,2-epoxioctà, resultant el (*R*)-1,2-dihidroxiocetà. Les EHs de *Rhodococcus* sp. NCIMB11216, amb enantioselectivitats elevades per als epòxids metil-alquil-substituïts (Mischitz *et al.*, 1995; Osprian *et al.*, 1997) i baixes per als epòxids etil-alquil-substituïts (Wandel *et al.*, 1995), es va utilitzar per a separar una mescla diastereoisomèrica de l'acetat de 2,3-epoxinalil (Mischitz *et al.*, 1996).

Una altra EH molt enantioselectiva és la produïda per *Mycobacterium paraffinicum* NCIMB10420 (Faber, Mischitz i Kroutil, 1996). Botes *et al.* (1998) van descriure una EH produïda pel bacteri *Chryseomonas luteola*, la qual convertia els epòxids alifàtics de cadena lineal amb una enantioselectivitat moderada-excel·lent. No van observar enantioselectivitat per als epòxids 2,2-disubstituïts, el benzil glicidil èter o el 2-metil-1,2-epoxiheptà.

També s'han aconseguit elevades enantioselectivitats en la hidròlisi d'epòxids 2,2-disubstituïts amb l'EH de *Nocardia* sp. Actualment, moltes EHs es poden obtenir per recombinació. El primer cas va ser *A. radiobacter* AD1, sobreexpressat en *Escherichia coli* (Rink *et al.*, 1997), el qual acceptava derivats de l'òxid d'estirè i del fenil glicidil èter i els convertia amb una enantioselectivitat excel·lent (Spelberg *et al.*, 1998).

#### 1.3.4.2.6. Epòxid-hidrolases de fongs i llevats

Suzuki i Marumo (1972) van ser els primers a utilitzar EHs fúngiques per a la síntesi de compostos òpticament enriquits. Van trobar que l'EH de *Helminthosporum sativum* catalitzava la hidròlisi asimètrica del terpenoide racèmic 10,11-epoxifarnesol. Els dos enantiòmers van ser hidrolitzats amb idèntica estereoquímica (atac del C<sub>10</sub>), donant el (S)-diol. Per tant, el (R)-epòxid es va transformar amb inversió de la configuració del C<sub>10</sub>.

El primer exemple d'hidròlisi d'epòxids enantioselectiva/diastereoselectiva fúngica a escala preparativa va tenir lloc amb *A. niger* LCP521, el qual va hidrolitzar enantioselectivament el *rac*-N-fenilcarbamat de geranil (Archelas i Furstoss, 2001). També l'EH d'*A. niger* LCP521 va hidrolitzar l'òxid d'estirè amb elevada enantioselectivitat, donant el (S)-epòxid amb un 96% ee (Pedragosa, Archelas i Furstoss, 1996). Curiosament es va veure que l'EH de *Beauveria bassiana* ATCC7159 també hidrolitzava l'oxid d'estirè amb elevada enantioselectivitat; però donant el (R)-epòxid amb un 98% ee (Pedragosa, Archelas i Furstoss, 1996).

Investigadors de Merck van trobar que l'EH de *Diplodia gossipina* ATCC16391 i la de *Lasioidiplodia theobromae* MF5215 podien resoldre l'òxid d'indè amb una enantioselectivitat excel·lent, donant exclusivament el (1S,2R)-epòxid. L'EH de *Gilmaniella humicola* MF5363 i la d'*Alternaria enius* MF4352 van mostrar enantiopreferència oposada, donant el (1R,2S)-epòxid (Zhang *et al.*, 1995).

Una altra EH útil és la del llevat *Rhodotorula glutinis*, la qual converteix els epòxids fenil-substituïts (Weijers, 1997; Weijers *et al.*, 1998).



### 1.3.4.2.7. Producció de MAGs a través de reaccions catalitzades per epòxid-hidrolases

Els MAGs són derivats del glicerol amb un grup hidroxil substituït per un àcid gras a través d'un enllaç èster. Són excel·lents emulsionants amb propietats antimicrobianes, àmpliament utilitzats en la indústria alimentària, cosmètica i farmacèutica en diferent grau de puresa (Deng, Nakano i Iwasaki, 2007; Růžička *et al.*, 2003). Els isòmers purs dels MAGs, especialment els (*R*)- i els (*S*)-MAGs, tenen un gran interès com a C<sub>3</sub>-sintons quirals per a la preparació de fàrmacs, agroquímics i cristalls líquids enantiopurs (Xu, Kato i Asano, 2001). El problema més gran quan es volen obtenir MAGs purs és la facilitat amb què els grups acil migren des de l'oxigen al qual estan lligats fins al grup hidroxil lliure més proper. Per tant, quan interessen MAGs purs amb l'àcid gras en una posició específica, és habitual l'ús de derivats del glicerol com per exemple el glicidol. L'addició nucleofílica d'aigua amb obertura de l'anell d'oxirà, catalitzada per EHS, de qualsevol dels enantiòmers del glicidol protegit en forma d'èster, permet obtenir (*R*)- i (*S*)-MAGs enantioenriquits o purs. La regioselectivitat d'aquestes reaccions sovint està regida per l'impediment estèric (té lloc l'atac del carboni de l'anell d'oxirà menys impedit estèricament, és a dir, menys substituït). En la figura 1.3.13 es pot veure un esquema en què es parteix del (*S*)- i del (*R*)-glicidol.

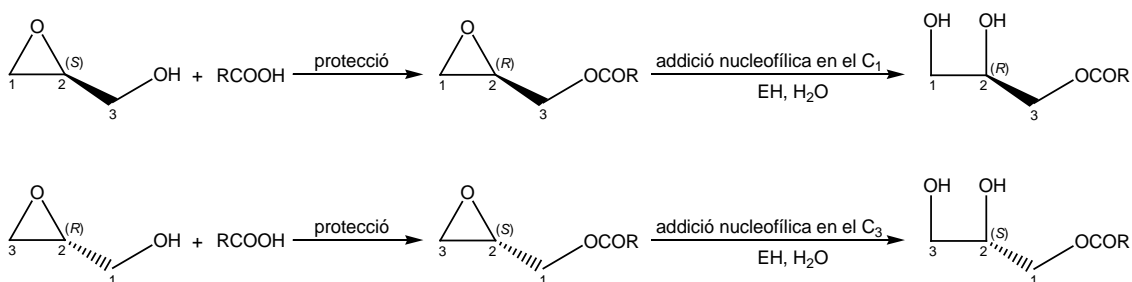


FIGURA 1.3.13. Obtenció de (*R*)- i de (*S*)-MAGs purs a partir del (*S*)- i del (*R*)-glicidol, respectivament.

Donat l'interès actual d'aquests compostos, al llarg d'aquesta tesi s'intentarà obtenir-los en forma pura o enantioenriquida, fent ús de dos derivats del glicerol (el solketal i el glicidol) i, aprofitant les propietats de les lipases i de les epòxid-hidrolases.

## **2. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL**

---



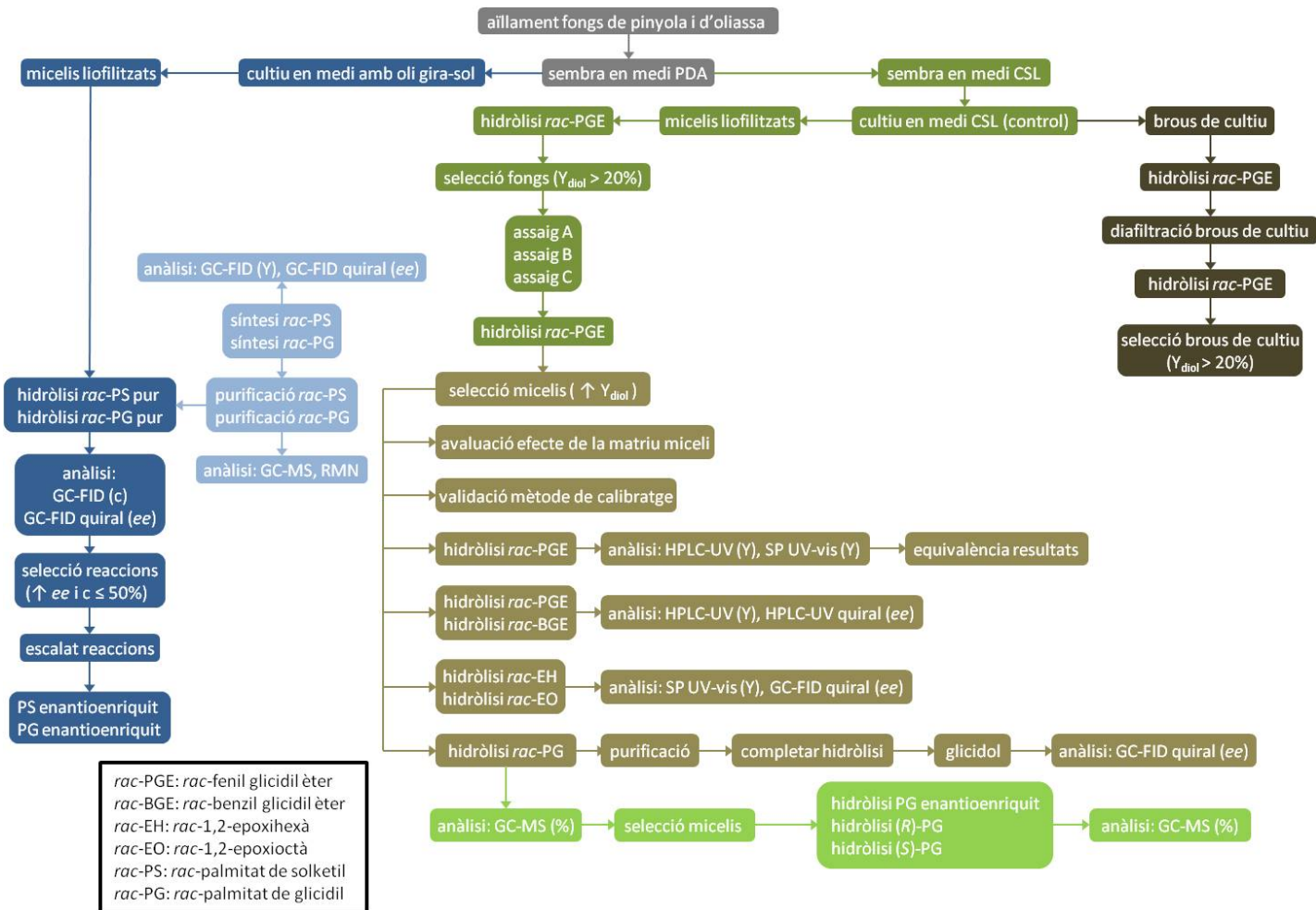
### 2.1. Objectius

En la present tesi es pretén, a partir de reaccions que utilitzen derivats del glicerol racèmics i que són catalitzades per enzims fúngics, obtenir monoacilglicerols enantiomèricament purs, els quals tenen gran aplicació com a C<sub>3</sub>-sintons quirals.

Aquest objectiu general inclou:

- 1) Aïllar soques fúngiques a partir de pinyola i d'oliassa.
- 2) Buscar biocatalitzadors amb capacitat per hidrolitzar el grup epòxid present en el fenil glicidil èter, el benzil glicidil èter, l'1,2-epoxihexà i l'1,2-epoxioctà.
- 3) Preparar palmitat de solketil i palmitat de glicidil racèmics per via enzimàtica com a reactius model.
- 4) Obtenir biocatalitzadors amb capacitat per resoldre cinèticament els reactius anteriors.
- 5) Preparar monoacilglicerols a partir dels biocatalitzadors amb activitat epòxid-hidrolàsica i dels reactius resolts cinèticament.

2.2. Pla de treball



### **3. MATERIALS I MÈTODES**

---



### 3.1. Productes comercials

Els epòxids racèmics (fenil glicidil èter; benzil glicidil èter; 1,2-epoxihexà i 1,2-epoxioctà), els diols racèmics (3-fenoxi-1,2-propandiòl; 3-benziloxi-1,2-propandiòl; 1,2-hexandiòl i 1,2-octandiòl), l'adrenalina, el per-iodat sòdic, el iode, l'àcid acètic, el licor de blat de moro, el sulfat sòdic, el *rac*-, el (*R*)- i el (*S*)-glicidol, el *rac*-, el (*R*)- i el (*S*)-solketal es van obtenir de Sigma-Aldrich (Madrid). L'acetonitril, l'hexà, el 2-propanol, l'isooctà i l'acetat d'etil es van comprar a Thermo Fisher (Madrid). Els components dels medis de cultiu i de les solucions amortidores es van adquirir a Thermo Fisher i Panreac (Barcelona).

### 3.2. Mètodes

#### 3.2.1. Aïllament de fongs a partir de pinyola i d'oliassa

Per obtenir fongs a partir de pinyola, es van afegir 10 g de substrat dins una botella que contenia 90 mL d'aigua destil·lada amb *tween*-80 (0,02%, v/v) estèrils. Un cop ben agitat el contingut, es va deixar reposar i 100 µL de sobrenedant es van estendre uniformement amb una nansa de Drigalski estèril sobre medi sòlid preparat amb 5 g de peptona micològica, 3 g d'extracte de llevat i 15 g d'agar per litre d'aigua destil·lada, ajustat a pH 5,5.

Per obtenir fongs a partir d'oliassa, al·lquotes de 100 µL es van estendre directament sobre el medi descrit anteriorment. Tant les plaques amb pinyola diluïda com amb oliassa, es van preparar per quintuplicat i incubar a 25 °C durant 5-7 dies fins l'aparició de colònies fúngiques les quals, un cop assegurada la seva puresa, es van sembrar en medi PDA (*potato dextrose agar*) obtingut amb 20 g de glucosa, 200 mL d'extracte de patata i 15 g d'agar per litre d'aigua destil·lada, ajustat a pH 5,5 i, després, en medi CSL (*corn steep liquor*) obtingut amb 15 g de licor de blat de moro, 10 g de fructosa, 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g de KCl, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O i 15 g d'agar per litre d'aigua destil·lada, ajustat a pH 5. Totes les plaques es van incubar a 25 °C durant 5-7 dies.



### 3.2.2. Avaluació de l'activitat epòxid-hidrolàsica

Per avaluar l'activitat epòxid-hidrolàsica es va triar el *rac*-fenil glicidil èter com a substrat i es van utilitzar dues fonts de biocatalitzadors, miceli liofilitzat i brou de cultiu, obtinguts a partir dels fongs sembrats en plaques amb medi CSL. Per al seu cultiu es van preparar matrassos Erlenmeyer de 500 mL amb 100 mL de medi (15 g de licor de blat de moro, 10 g de fructosa, 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de KCl, 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i 0,01 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  per litre d'aigua destil·lada) amb el pH ajustat a 3 o 5; tapats amb cotó i paper d'alumini i, esterilitzats en autoclau 15 min a 121 °C. Dos discs d'inòcul d'aproximadament 0,5 cm de diàmetre es van transferir asèpticament des de les plaques a cadascun dels matrassos, els quals es van deixar en un agitador orbital a 100 rpm i 27 °C durant 8 dies. A continuació, la massa miceliana es va filtrar al buit i rentar dues vegades amb solució salina amortidora de fosfat (PBS) i dues vegades més amb aigua destil·lada. Aquesta biomassa es va liofilitzar 24 h, triturar i guardar a -20 °C.

Les primeres reaccions d'hidròlisi es van realitzar amb els micelis i els brous de cultiu dels fongs crescuts a pH 5 i es van dur a terme en tubs Eppendorf de 2 mL amb baixa afinat per les proteïnes, els quals contenien 10 mg de miceli liofilitzat i 980 µL de PBS a pH 7,4 o 980 µL de brou de cultiu centrifugat 5 min a 9000 rpm i ajustat a un valor de pH proper a 7 amb una solució amortidora de fosfat de pH 7,4 (2 M). Els tubs es van preincubar 5 min en un *thermo-mixer* a 30 °C i 1400 rpm. A continuació, es van afegir 20 µL d'una solució 5 mg/mL de *rac*-fenil glicidil èter dissolt en dimetilsulfòxid (DMSO). Les reaccions van tenir lloc durant 1 h en les condicions anteriors (figura 3.2.1). Transcorregut aquest temps, primer, es va extreure l'epòxid romanent amb hexà (2 × 1 mL) i, després, el diol amb acetat d'etil (2 × 1 mL). Per realitzar les extraccions, després d'afegir el dissolvent, els tubs es van agitar en un vòrtex durant 15 s i, a continuació, es van centrifugar a 9000 rpm durant 5 min a 4 °C. Els extractes d'acetat d'etil es van evaporar sota un corrent de nitrogen i els residus secs es van redissoldre en 1 mL d'aigua Milli-Q/acetoneitril (ACN) (30:10, v/v). Totes les reaccions es van realitzar per duplicat i l'activitat epòxid-hidrolàsica es va determinar a partir del rendiment de diol (apartat 3.2.24, equació 3.2.5) per unitat de temps.

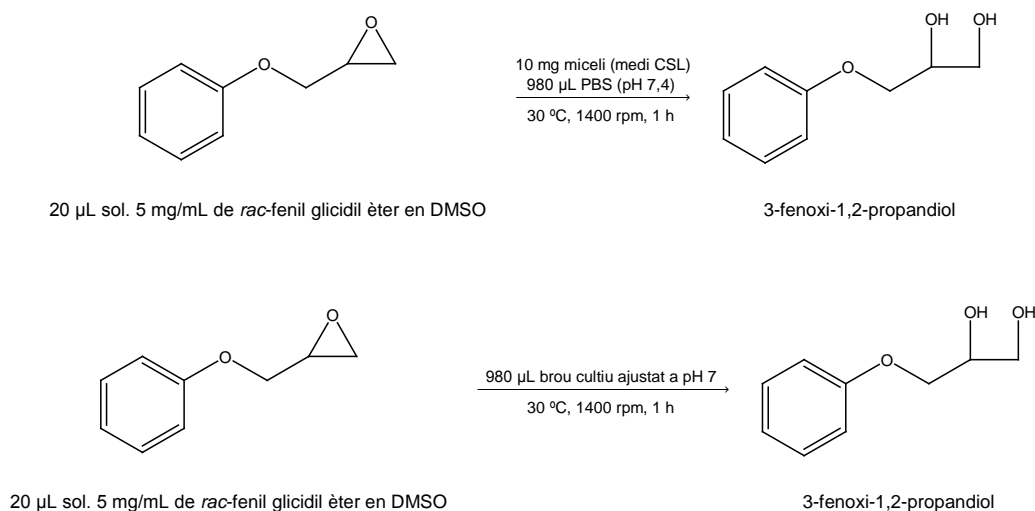


FIGURA 3.2.1. Hidròlisi del *rac*-fenil glicidil èter catalitzada pels enzims presents en els micelis i en els brous de cultiu dels fongs crescuts en el medi CSL.

Les concentracions de 3-fenoxi-1,2-propandiol es van determinar per HPLC-UV. Els patrons de calibratge es van preparar en el rang 0,001-0,1 mg/mL per dilució parcial amb aigua Milli-Q/ACN (30:10, v/v) a partir d'una solució d'1 mg/mL de diol en aigua Milli-Q/ACN (30:10, v/v).

### 3.2.3. Detecció de proteases extracel·lulars en els brous de cultiu

La detecció de proteases extracel·lulars es va realitzar de forma qualitativa en plaques de Petri. El medi de detecció es va preparar amb 5 g de peptona de caseïna; 2,5 g d'extracte de llevat; 1 g de llet desnatada en pols; 1 g de glucosa i 15 g d'agar per litre d'aigua destil·lada; ajustar a pH 7 i esterilitzar en autoclau 15 min a 121 °C. En cadascuna de les plaques es van perforar dos pouets de 0,5 cm de diàmetre; els quals es van emplenar amb 20 µL de brou de cultiu prèviament centrifugat a 9000 rpm durant 5 min a 4 °C. Les plaques es van incubar a 37 °C durant 2-3 dies. Per observar la zona d'hidròlisi es van afegir unes gotes d'una solució d'àcid tànnic en aigua (10%, p/v).

### 3.2.4. Diafiltració dels brous de cultiu amb activitat epòxid-hidrolàsica

El procés de diafiltració es va realitzar amb filtres per a centrífuga Amicon Ultra-4 3K. Abans d'iniciar el procés es van considerar alguns passos previs. Primer, aquestes membranes d'ultrafiltració contenen restes de glicerol. Si aquest material pot interferir en les anàlisis, cal rentar prèviament els filtres amb aigua Milli-Q. Segon, la membrana dels filtres no es pot assecar un cop s'ha mullat. Per tant, si els filtres no s'han d'utilitzar immediatament, és millor deixar líquid en la membrana fins al moment del seu ús. Finalment, per millorar la recuperació de proteïna en mostres diluïdes, és important cobrir la membrana dels filtres amb una solució de passivació, per exemple, una solució de BSA en PBS (1%, p/v). Passades 2 h, la membrana ja es pot rentar amb aigua Milli-Q.

Per dur a terme la diafiltració dels brous de cultiu, prèviament centrifugats a 9000 rpm durant 5 min a 4 °C, es van seguir els següents passos:

- a) Omplir la membrana amb 4 mL de brou de cultiu i centrifugar a 6000 rpm durant 45 min.
- b) Afegir 1 mL de brou de cultiu i centrifugar a 6000 rpm durant 1 h 45 min.
- c) Afegir 4 mL de PBS (pH 7,4) i centrifugar a 6000 rpm durant 1 h 30 min.
- d) Recuperar els concentrats introduint la punta (de baixa retenció) de la micropipeta fins al fons del filtre. Afegir 1 mL de PBS (pH 7,4), agitar suaument i tornar a extreure la mostra fent un moviment d'escombrat d'un costat a l'altre.

Tant els ultrafiltrats com els concentrats es van conservar en tubs Eppendorf amb baixa afinitat per les proteïnes i l'activitat epòxid-hidrolàsica es va determinar a partir del rendiment de diol tal i com s'ha explicat en l'apartat 3.2.2. Totes les reaccions es van realitzar per duplicat.

### 3.2.5. Influència de l'òxid d'estirè en la producció de biomassa fúngica i en l'activitat epòxid-hidrolàsica

Per avaluar l'efecte de l'òxid d'estirè en la producció de biomassa (g de miceli liofilitzat / 100 mL de medi de cultiu) i en l'activitat epòxid-hidrolàsica dels enzims presents en la biomassa, es van realitzar tres assajos (A, B i C) amb els fongs que van donar millors rendiments de diol durant l'avaluació inicial de l'activitat epòxid-hidrolàsica descrita en l'apartat 3.2.2.

Es va afegir asèpticament dins el medi de cultiu un 0,4% (v/v) d'òxid d'estirè, filtrat a través de filtres estèrils de 0,22 µm per a xeringa, immediatament després (assaig A), 24 h després (assaig B) i 24 h abans (assaig C) d'afegir l'inòcul. L'activitat obtinguda en aquests tres assajos es va determinar a partir del rendiment de diol per unitat de temps tal i com s'ha explicat en l'apartat 3.2.2. Totes les reaccions es van realitzar per triplicat.

Els resultats dels tres assajos i dels controls (assajos realitzats amb els micelis dels fongs crescuts sense òxid d'estirè) es van sotmetre a una anàlisi de variància (STATGRAPHICS Plus 5.1). Quan per a una significació del 95%, els valors experimentals de  $F$  superin el valor crític  $F_{1-\alpha, k-1, (n \times k) - k}$ , essent  $k$  el nombre d'assajos i  $n$  el nombre de repeticions per assaig, es conclourà que existeixen diferències estadísticament significatives entre les mitjanes d'almenys dos dels assajos. Tenint en compte que es volien comparar tots els assajos entre ells i no cadascun dels assajos amb el control, es van realitzar comparacions múltiples amb el mètode de Bonferroni.

### 3.2.6. Funcions de calibratge i avaluació de l'efecte de la matriu miceli

En el procés d'extracció de les mostres, els micelis poden aportar compostos d'estructura similar a la de l'anàlit (interferents) o bé retenir part del producte. En qualsevol cas, la quantificació de l'anàlit d'interès es pot veure afectada.

Aquests fenòmens van ser avaluats comparant simultàniament els pendents i les ordenades a l'origen de tres funcions de calibratge obtingudes amb patrons sense la matriu miceli (*solvent calibration*, SC), patrons amb la matriu miceli i addició de l'anàlit prèvia a l'extracció (*pre-extraction spiked matrix-matched calibration*, pre-MMC) i, patrons amb la matriu miceli i addició de l'anàlit posterior a l'extracció (*post-extraction spiked matrix-matched calibration*, post-MMC).

Els patrons per a les funcions de calibratge SC i post-MMC es van preparar a partir d'una solució 9 mM de *rac*-3-fenoxi-1,2-propandiòl en aigua Milli-Q/ACN (30:10, v/v). Els patrons per a les funcions de calibratge pre-MMC es van preparar a partir de cinc solucions de *rac*-3-fenoxi-1,2-propandiòl en DMSO (67,5 mM; 135 mM; 202,5 mM; 270 mM i 405 mM). Per als patrons SC, es van diluir alíquotes de la solució 9 mM amb aigua Milli-Q/ACN (30:10, v/v) per obtenir concentracions finals de 1,5; 3; 4,5; 6 i 9 mM.

Per als patrons post-MMC, primer es van realitzar les extraccions dels blancs (10 mg de miceli liofilitzat, 880 µL de PBS (pH 7,4) i 20 µL de DMSO) tal com s'ha explicat en l'apartat 3.2.2 i, a continuació, es van afegir alíquotes de la solució 9 mM, les quals es van diluir amb aigua Milli-Q/ACN (30:10, v/v) per obtenir concentracions finals de 1,5; 3; 4,5; 6 i 9 mM. Per als patrons pre-MMC, primer es van afegir 20 µL de les solucions 67,5-405 mM a tubs Eppendorf que contenien 10 mg de miceli liofilitzat i 880 µL de PBS (pH 7,4) per obtenir concentracions finals de 1,5; 3; 4,5; 6 i 9 mM. A continuació, es van realitzar les extraccions tal com s'ha explicat en l'apartat 3.2.2. Els extractes secs es van redissoldre en 900 µL d'aigua Milli-Q/ACN (30:10, v/v). Tots els patrons es van preparar per duplicat. Es van diluir 1,5 vegades per a les anàlisis per espectrofotometria UV-vis (300 µL solució + 150 µL d'aigua Milli-Q/ACN (30:10, v/v)) i 30 vegades per a les anàlisis per HPLC-UV (30 µL solució + 870 µL d'aigua Milli-Q/ACN (30:10, v/v)). Abans de la seva anàlisi, es van filtrar a través de filtres de 0,22 µm per xeringa.

Un cop verificada la normalitat i homoscedasticitat de totes les respostes, es van representar gràficament les àrees cromatogràfiques obtingudes per HPLC-UV i les absorbàncies obtingudes per espectrofotometria UV-vis enfront les concentracions. Les funcions de calibratge es van ajustar als punts mitjançant regressió lineal simple utilitzant el mètode dels mínims quadrats (Souza i Junqueira, 2005).

La hipòtesi nul·la que el pendent era zero; és a dir, que no existia relació lineal entre la variable dependent i la independent es va comprovar calculant la  $F$  de Snedecor experimental a partir de la següent equació (Araujo, 2009):

$$F_{\text{exp}} = \frac{SQ_{\text{reg}}/k}{SQ_{\text{res}}/(n-1)-k} \quad (3.2.1)$$

on,

a)  $SQ_{\text{reg}}$ : suma dels quadrats de la regressió:  $\sum_{i=1}^n (\hat{Y}_i - \bar{Y}_i)^2$ .

b)  $SQ_{\text{res}}$ : suma dels quadrats dels residus:  $\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2$ .

c)  $k$ : nombre de variables independents.

d)  $(n - 1) - k$ : nombre total de graus de llibertat menys el nombre de variables independents.

Quan els valors experimentals de  $F$  superin el valor crític  $F_{1-\alpha, k, n-1-k}$ , generalment per a una significació del 95%, es conclourà que existeix relació lineal entre la variable dependent i la independent i, per tant, es rebutjarà la hipòtesi nul·la.

La coextracció d'interferents es va avaluar amb les funcions de calibratge SC i post-MMC i, la retenció del 3-fenoxi-1,2-propandiol dins els micelis, amb les funcions de calibratge post-MMC i pre-MMC.

En l'apèndix C es mostren les equacions emprades per al procés d'avaluació de l'efecte de la matriu miceli utilitzant fulls de càlcul.

### 3.2.7. Validació del mètode de calibratge

Per validar el mètode de calibratge emprat per a la quantificació del 3-fenoxi-1,2-propandiol en els extractes de les mostres, es va tenir en compte si l'exactitud (veracitat i precisió) dels resultats era acceptable. La veracitat es va expressar a través de la recuperació i la precisió a través de la desviació estàndard relativa (RSD).

Els valors de les recuperacions es van determinar fortificant les matrius abans de l'extracció amb tres concentracions conegudes de 3-fenoxi-1,2-propandiol. Per a cadascuna de les concentracions es van realitzar tres repeticions independents.

La recuperació es va definir amb l'equació 3.2.2 com el quocient entre la concentració estimada a partir de la funció de calibratge pre-MMC ( $\hat{C}_{\text{pre-MMC}}$ ) i la concentració afegida abans de l'extracció ( $C_{\text{pre-afegida}}$ ) (Cuadros *et al.*, 2003, 2005; Gámiz *et al.*, 2006).

$$R (\%) = \frac{\hat{C}_{\text{pre-MMC}}}{C_{\text{pre-afegida}}} \times 100 \quad (3.2.2)$$

La RSD es va definir amb l'equació 3.2.3 com el quocient entre la desviació estàndard de la recuperació ( $SD_R$ ) i la recuperació mitjana ( $\bar{R}$ ) de les tres repeticions realitzades per a cadascuna de les concentracions.

$$RSD (\%) = \frac{SD_R}{\bar{R}} \times 100 \quad (3.2.3)$$

L'exactitud es va estimar a través del càlcul de l'interval de tolerància definit per l'equació 3.2.4 (Rozet *et al.*, 2011):

$$\beta\text{-ETI} (\%) = \bar{R} (\%) \pm t [1 + (1/n)]^{1/2} RSD (\%) \quad (3.2.4)$$

on  $n$  és el nombre de repeticions per concentració i  $t$  és el  $\beta$  quantil de la distribució  $t$  de Student amb  $n - 1$  graus de llibertat.

Sempre que aquests intervals de tolerància es trobin dins d'uns límits d'acceptació ( $\pm\lambda$ ), l'exactitud es considerarà acceptable (Boulanger *et al.*, 2003; Feinberg 2007). Segons l'Administració d'Aliments i de Fàrmacs dels Estats Units (FDA), el valor de  $\lambda$  es va fixar en  $\pm 15\%$  i  $\beta$  en 95% (Tiwari i Tiwari, 2010).

El límit de quantificació (LOQ) per a cadascuna de les matrius es va definir com la concentració mínima calculada amb una exactitud acceptable.

### 3.2.8. Prova d'equivalència

Una alíquota de cadascun dels extractes redissolts en aigua Milli-Q/ACN (30:10, v/v) es va analitzar per HPLC-UV i espectrofotometria UV-vis i, l'equivalència dels resultats aconseguits per ambdós mètodes d'anàlisi es va avaluar mitjançant dues proves *t* de Student d'una cua (*two one-sided t-test*, TOST) (Dewé, 2009; Feng *et al.*, 2006; Meyners, 2012). L'interval d'acceptació es va fixar entre 0,85 i 1,15.

### 3.2.9. Hidròlisi del *rac*-fenil glicidil èter, del *rac*-benzil glicidil èter, del *rac*-1,2-epoxihexà i del *rac*-1,2-epoxioctà

La hidròlisi d'aquests aril i alquil glicidil èters, mitjançant les EHs presents en el miceli dels fongs seleccionats prèviament en l'apartat 3.2.5, va tenir lloc en tubs Eppendorf de 2 mL i baixa afinitat per les proteïnes; els quals contenien, per als epòxids *rac*-fenil glicidil èter i *rac*-benzil glicidil èter, 10 mg de miceli liofilitzat preincubat a 30 °C durant 5 min en 880 µL de PBS (pH 7,4) i 20 µL d'una solució 270 mM d'epòxid racèmic en DMSO i, per als epòxids *rac*-1,2-epoxihexà i *rac*-1,2-epoxioctà, 10 mg de miceli liofilitzat preincubat a 30 °C durant 5 min en 880 µL de PBS (pH 7,4) i 20 µL d'una solució 405 mM d'epòxid racèmic en DMSO. Totes les reaccions es van realitzar per duplicat i van tenir lloc a 30 °C i 1400 rpm en un *thermo-mixer* el temps necessari per assolir el diol amb un rendiment al voltant del 50% (figura 3.2.2).



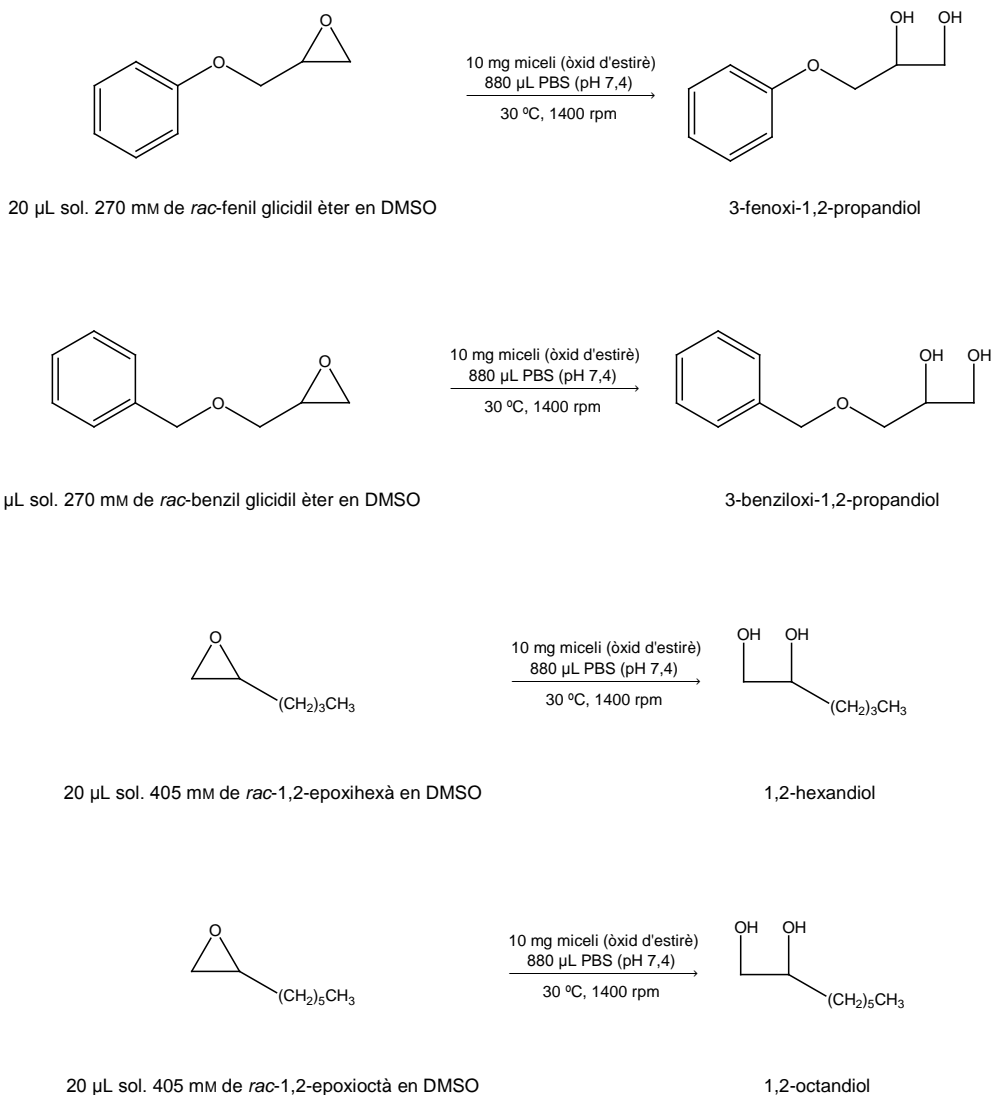


FIGURA 3.2.2. Hidròlisi del *rac*-fenil glicidil èter, del *rac*-benzil glicidil èter, del *rac*-1,2-epoxihexà i del *rac*-1,2-epoxioctà.

Les mostres es van filtrar a través de frites de polipropilè de 20  $\mu\text{m}$  de diàmetre de porus situades dins de tubs de 3 mL. Els micelis es van rentar amb 2 mL d'hexà i 2 mL d'acetat d'etil, aplicant pressió a l'entrada dels tubs. Després d'extreure els epòxids presents en les mesclades de reacció amb hexà (3  $\times$  1 mL), els diols formats es van extreure amb acetat d'etil (3  $\times$  1 mL). Per realitzar les extraccions, els tubs es van agitar en un vòrtex durant 15 s i, a continuació, centrifugar a 9000 rpm durant 5 min a 4  $^\circ\text{C}$ . Les fraccions d'acetat d'etil procedents de les mesclades de reacció i dels micelis es van ajuntar i evaporar sota un corrent de nitrogen.

Els patrons de calibratge es van preparar a partir de cinc solucions de diol racèmic en DMSO (67,5-405 mM) seguint un procés idèntic al de les mostres. Vint microlitres d'aquestes solucions es van afegir a tubs Eppendorf que contenien 10 mg de miceli liofilitzat i 880 µL de PBS (pH 7,4). A continuació, es van realitzar les extraccions tal com s'ha explicat anteriorment i el dissolvent es va evaporar sota un corrent de nitrogen.

Els extractes secs es van redissoldre en 900 µL d'aigua Milli-Q/ACN (30:10, v/v) per a les anàlisis per HPLC-UV i espectrofotometria UV-vis, en 900 µL d'hexà/2-propanol (85:15, v/v) per a les anàlisis per cromatografia líquida d'alta resolució amb detector d'ultraviolat amb columna quiral (HPLC-UV quiral) i en 900 µL d'acetat d'etil per a les anàlisis per cromatografia de gasos amb detector d'ionització de flama i columna quiral (GC-FID quiral). Els diols 3-fenoxi-1,2-propandiol i 3-benziloxi-1,2-propandiol es van quantificar per HPLC-UV i els seus excessos enantiomèrics es van determinar per HPLC-UV quiral. Els diols 1,2-hexandiol i 1,2-octandiol es van quantificar per espectrofotometria UV-vis i els excessos enantiomèrics, obtinguts a partir dels seus corresponents 1,2-diacetats, es van analitzar per GC-FID quiral. Les mostres i patrons de calibratge es van diluir 1,5 vegades per a les anàlisis per espectrofotometria UV-vis (300 µL solució + 150 µL d'aigua Milli-Q/ACN (30:10, v/v)) i 30 vegades per a les anàlisis per HPLC-UV (30 µL solució + 870 µL d'aigua Milli-Q/ACN (30:10, v/v)). Abans de la seva anàlisi, totes les mostres es van filtrar a través de filtres de 0,22 µm per xeringa.

### **3.2.10. Síntesi del *rac*-palmitat de solketil catalitzada per la lipasa B de *C. antarctica***

Per a la síntesi del *rac*-palmitat de solketil es va preparar un matràs amb 1 mmol (256,4 mg) d'àcid palmític, 2 mmol (264,3 mg) de *rac*-solketal i 20 mg de lipasa B de *C. antarctica* (CAL-B). La reacció va tenir lloc sense dissolvent a 40 °C i 1400 rpm durant 24 h. Passat aquest temps, es van afegir 3 mL de *t*-BuOMe i es va filtrar la mescla de reacció per eliminar el biocatalitzador. La reacció també es va dur a terme a 50 °C, 60 °C i 70 °C (figura 3.2.3). Totes les reaccions es van realitzar per duplicat.

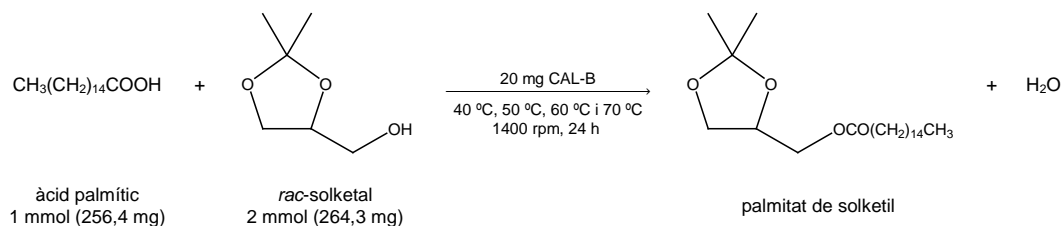


FIGURA 3.2.3. Síntesi del *rac*-palmitat de solketal catalitzada per CAL-B.

### 3.2.11. Síntesi del *rac*-, del (*R*)- i del (*S*)-palmitat de glicidil catalitzada per la lipasa B de *C. antarctica*

Inicialment, la síntesi del *rac*-palmitat de glicidil es va realitzar en les mateixes condicions que les del *rac*-palmitat de solketal i, a continuació, a 40 °C amb 3,5 mL de *t*-BuOMe (figura 3.2.4). Totes les reaccions es van realitzar per duplicat.

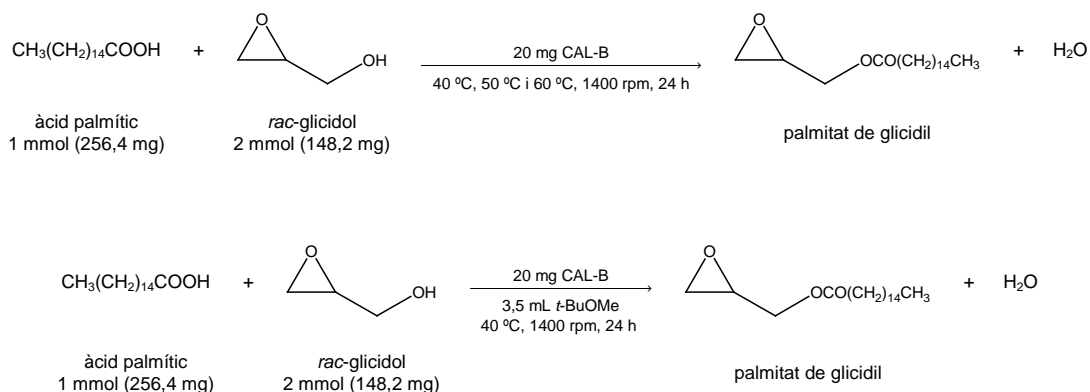


FIGURA 3.2.4. Síntesi del *rac*-palmitat de glicidil catalitzada per CAL-B.

La síntesi del (*R*)- i del (*S*)-palmitat de glicidil es va dur a terme seguint un procés idèntic al del *rac*-palmitat de glicidil. És a dir, es va partir d'1 mmol (256,4 mg) d'àcid palmític, 2 mmol (148,2 mg) de (*R*)- o de (*S*)-glicidol i 20 mg de CAL-B. Les reaccions van tenir lloc en 3,5 mL de *t*-BuOMe a 40 °C i 1400 rpm durant 24 h (figura 3.2.5). Totes les reaccions es van realitzar per duplicat.

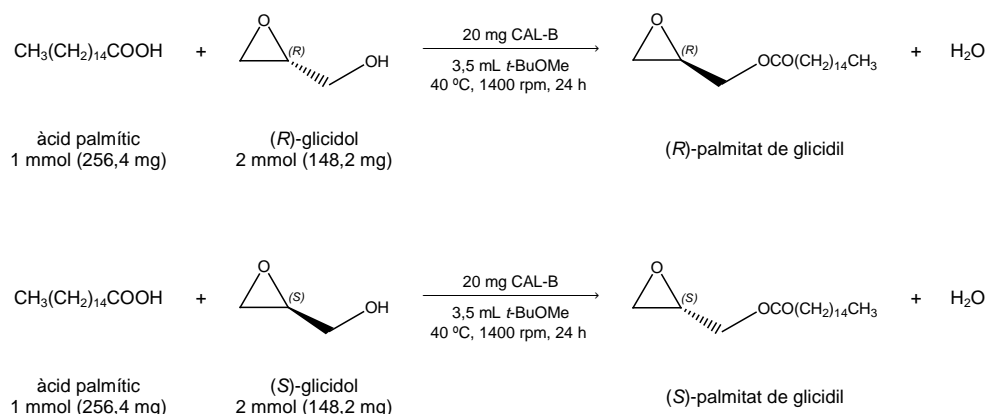


FIGURA 3.2.5. Síntesi del (R)- i del (S)-palmitat de glicidil catalitzada per CAL-B.

En tots els casos es va afegir tridecà com a patró intern. Un cop filtrat el biocatalitzador, els crus de reacció representats en les figures 3.2.3, 3.2.4 i 3.2.5 es van analitzar per GC-FID per calcular els rendiments i també per GC-FID quiral per veure si s'havia format l'èster racèmic o CAL-B tenia preferència per algun dels enantiòmers dels alcohols. Finalment, es va eliminar l'àcid i l'alcohol que no havien reaccionat. Per dur a terme el procés, es va evaporar el *t*-BuOMe i el residu sec redissolt en 100 mL d'hexà es va afegir a 100 mL d'una solució saturada de bicarbonat sòdic. Per afavorir la reacció de l'àcid palmític amb el bicarbonat sòdic, les solucions es van mantenir en agitació durant 24 h a temperatura ambient. Posteriorment, es van centrifugar a 2000 rpm durant 5 min, es van recuperar les fases superiors (producte dissolt en hexà), es van deixar durant 1 h amb sulfat magnèsic anhidre i es va evaporar el dissolvent. A continuació, els productes es van redissoldre en isooctà i rentar dues vegades amb acetonitril per acabar d'eliminar l'alcohol que no havia reaccionat. Un cop evaporat l'isooctà, els productes es van assecar al buit, redissoldre en acetat d'etil i analitzar per cromatografia de gasos amb espectrometria de masses (GC-MS) i per RMN.

### 3.2.12. Hidròlisi del grup epòxid del *rac*-, del (*R*)- i del (*S*)-palmitat de glicidil

Per dur a terme les reaccions d'hidròlisi del grup epòxid del *rac*-, del (*R*)- i del (*S*)-palmitat de glicidil es van preparar tubs Eppendorf amb 980  $\mu\text{L}$  de PBS (pH 7,4), 20  $\mu\text{L}$  de solució d'èster en DMSO i 10 mg de miceli liofilitzat. Els tubs es van agitar en un *thermo-mixer* a 40°C durant 3 h, 6 h i 18 h. Com a font de biocatalitzadors es van utilitzar els micelis dels fongs seleccionats prèviament en l'apartat 3.2.5, crescuts a pH 3 i 5 (figura 3.2.6). Els productes es van extreure amb èter dietílic i després d'evaporar el dissolvent, es van redissoldre en 400  $\mu\text{L}$  d'acetat d'etil i analitzar per GC-MS. Totes les reaccions es van realitzar per duplicat.

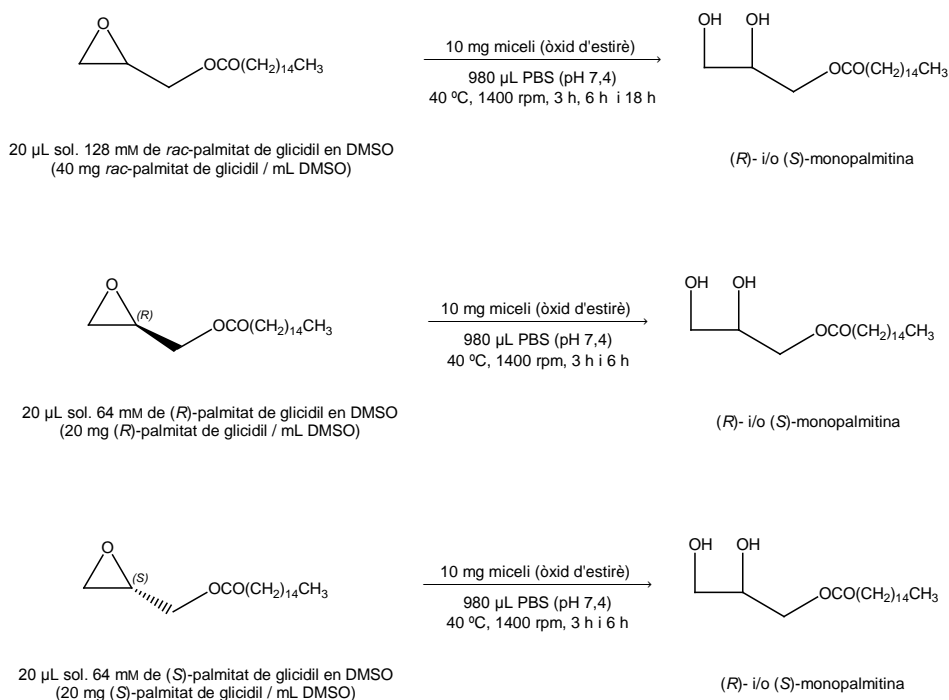


FIGURA 3.2.6. Hidròlisi del grup epòxid del *rac*-, del (*R*)- i del (*S*)-palmitat de glicidil.

Les proporcions dels productes de les reaccions es van establir mitjançant la normalització de les àrees dels pics dels cromatogrames. Es van mesurar les àrees de cada pic, sumar i, en base al total, calcular les proporcions de cada producte en la mescla. Aquestes àrees no es van corregir pels factor de resposta de cada component. La identificació de cada pic es va fer comparant el seu espectre de massa amb el del patró.

### 3.2.13. Enantiopreferència de les epòxid-hidrolases

L'enantiopreferència de les EHs es va determinar a partir de l'excés enantiomèric del glicidol resultant de la hidròlisi completa de l'èster que no va reaccionar inicialment. Això es va dur a terme després de filtrar els micelis que contenien les EHs i d'eliminar l'acid palmític i l'alcohol obtinguts durant la reacció d'hidròlisi del grup epòxid del *rac*-palmitat de glicidil com a conseqüència de la hidròlisi simultània del grup èster. L'èster romanent es va acabar d'hidrolitzar amb lipasa comercial de *R. miehei* en 1 mL de *t*-BuOMe i 5 µL d'aigua destil·lada a 40 °C i 1400 rpm. El glicidol es va analitzar per GC-FID quiral.

### 3.2.14. Hidròlisi del grup èster del *rac*-palmitat de solketil i del *rac*-palmitat de glicidil

En primer lloc es van preparar quatre solucions de 10 mg d'èster / mL: a) solució 27 mM de *rac*-palmitat de solketil en *t*-BuOMe, b) solució 27 mM de *rac*-palmitat de solketil en alcohol *terc*-butílic (*t*-BuOH), c) solució 32 mM de *rac*-palmitat de glicidil en *t*-BuOMe i d) solució 32 mM de *rac*-palmitat de glicidil en *t*-BuOH. Com a font de biocatalitzadors es van utilitzar els micelis dels fongs sembrats en plaques amb medi PDA. El seu cultiu va tenir lloc en matrassos Erlenmeyer de 500 mL amb 100 mL de medi preparat amb 2 g d'asparagina, 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>, 5 mg de clorohidrat de tiamina, 145 mg de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O, 88 mg de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O i 23,5 mg de MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O per litre d'aigua destil·lada i, ajustat a pH 5,5. Els matrassos es van tapar amb cotó i paper d'alumini i, esterilitzar en autoclau 15 min a 121 °C. En condicions d'asèpsia, dos discs d'inòcul d'aproximadament 0,5 cm de diàmetre es van transferir des de les plaques a cadascun dels matrassos i es va afegir un 1% (v/v) d'oli de gira-sol. Posteriorment, els matrassos es van deixar en un agitador orbital a 200 rpm i 28 °C durant 5 dies. A continuació, la massa miceliana es va filtrar al buit i rentar dues vegades amb aigua destil·lada i dues vegades més amb acetona. Aquesta biomassa es va liofilitzar 24 h, triturar i guardar a -20 °C.

Tot seguit, es van dur a terme les reaccions d'hidròlisi per duplicat. En tubs Eppendorf es van afegir 10 mg de miceli liofilitzat, 5  $\mu$ L d'aigua destil·lada i 0,5 mL o 1 mL de solució d'èster, depenent dels resultats obtinguts. En tots els casos es va afegir tridecà com a patró intern. Els tubs es van agitar en un *thermo-mixer* a 40°C durant diferents temps (5 min, 15 min, 2 h, 4 h, 6 h i 24 h), per poder escollir el temps que proporcionava una conversió al més propera possible al 50% (figures 3.2.7 i 3.2.8). El pas següent va consistir a filtrar els micelis, analitzar les reaccions per GC-FID i calcular les conversions en funció de l'èster sense hidrolitzar. Finalment, les reaccions també es van analitzar per GC-FID quiral i es van calcular els excessos enantiomèrics dels alcohols.

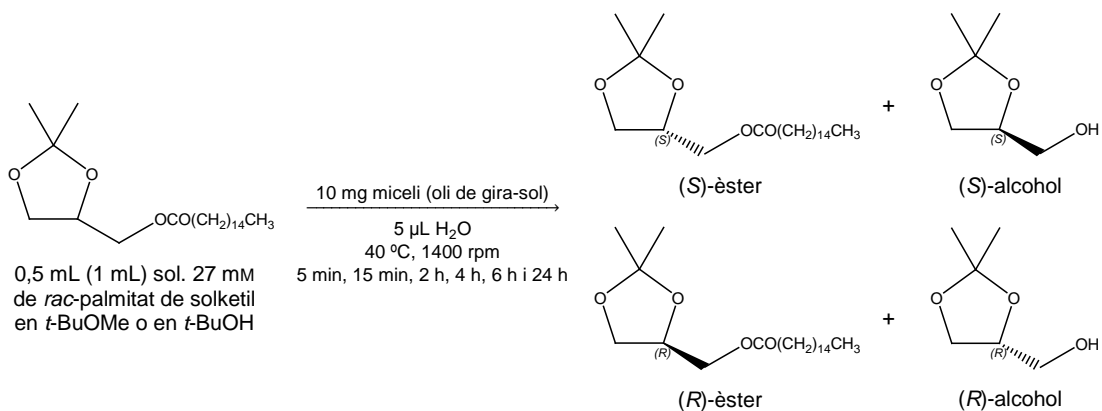


FIGURA 3.2.7. Hidròlisi del *rac*-palmitat de solketal catalitzada pels micelis dels fongs crescuts amb oli de gira-sol.

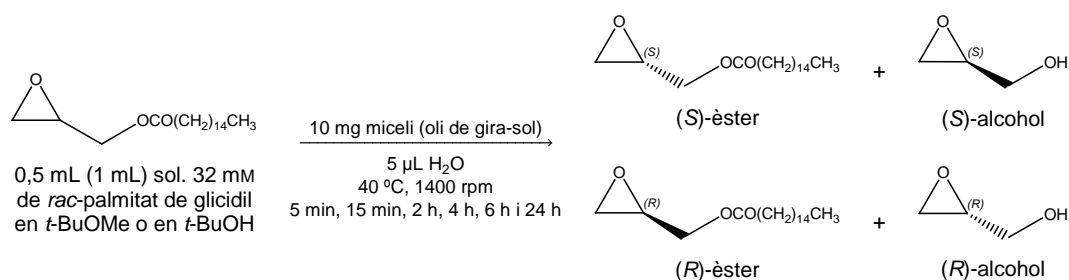


FIGURA 3.2.8. Hidròlisi del *rac*-palmitat de glicidil catalitzada pels micelis dels fongs crescuts amb oli de gira-sol.

Les reaccions d'hidròlisi que van donar millors excessos enantiomèrics (sense superar una conversió del 50%), es van repetir amb 20 mg de miceli liofilitzat, 10 µL d'aigua destil·lada i 1 mL de solució d'èster (50 mg d'èster / mL). A més, es va comprovar que els biocatalitzadors utilitzats en aquestes reaccions no poguessin esterificar els alcohols de partida i, per tant, reduir l'excés enantiomèric. Totes les reaccions es van realitzar per duplicat.

### 3.2.15. Hidròlisi del grup epòxid del palmitat de glicidil enantioenriquit

Per dur a terme les reaccions d'hidròlisi del grup epòxid del palmitat de glicidil enantioenriquit es van preparar tubs Eppendorf amb 980 µL de PBS (pH 7,4), 20 µL de solució 64 mM d'èster en DMSO i 10 mg de miceli de *Penicillium* sp. crescut a pH 3. Els tubs es van agitar en un *thermo-mixer* a 40 °C i 1400 rpm durant 9 h fins la hidròlisi total del substrat.

### 3.2.16. Blancs de les reaccions

Per realitzar els blancs es van dur a terme cadascuna de les reaccions d'interès, en les mateixes condicions que les assajades, però sense miceli fúngic o enzim.

### 3.2.17. Anàlisi per HPLC-UV

Les anàlisis per HPLC-UV es van realitzar amb un cromatògraf de líquids Alliance 2695 equipat amb un detector d'ultraviolat (Waters, Milford, USA). L'adquisició i tractament de les dades es va fer amb el programari MassLynx (versió 4.1). Per a les anàlisis del 3-fenoxi-1,2-propandiol i del 3-benziloxi-1,2-propandiol es va utilitzar una columna Atlantis dC<sub>18</sub> (150 mm × 2,1 mm; 5 µm) (Waters, Milford, USA). El volum d'injecció va ser 10 µL i l'absorbància es va enregistrar a 210 nm. La fase mòbil va consistir en aigua Milli-Q (A) i acetonitril (B). Els dissolvents, filtrats i desgasificats just abans del seu ús, es van mesclar seguint el gradient: 0 min–90% A i 10% B, 4 min–80% A i 20% B, 8 min–70% A i 30% B, 12-14 min–0% A i 100% B, 14,1-16 min–90% A i 10% B. El flux es va fixar a 0,5 mL/min. Les mostres es van analitzar a 35 °C i el temps total d'anàlisi va ser 16 min. Els temps de retenció d'aquests diols van ser 4,6 min i 5,1 min, respectivament.



### 3.2.18. Anàlisi per HPLC-UV quiral

Les anàlisis per HPLC-UV quiral es van realitzar amb un cromatògraf de líquids Alliance 2695 equipat amb un detector d'ultraviolat (Waters, Milford, USA). L'adquisició i tractament de les dades es va fer amb el programari Empower. Per a les anàlisis del 3-fenoxi-1,2-propandiol i del 3-benziloxi-1,2-propandiol es va utilitzar una columna Chiralcel OD (250 mm × 4,6 mm; 10 µm) (Chiral Technologies Europe, Illkirch Cedex, França). El volum d'injecció va ser 10 µL i l'absorbància es va enregistrar des de 200 nm fins a 300 nm. La fase mòbil va consistir en hexà/2-propanol (85:15, v/v), filtrats i desgasificats just abans del seu ús. El flux es va fixar a 1 mL/min. Les mostres es van analitzar a 35 °C i el temps total d'anàlisi va ser 20 min. 3-Fenoxi-1,2-propandiol:  $\lambda = 219$  nm, (*R*)-3-fenoxi-1,2-propandiol,  $t_r = 9,9$  min; (*S*)-3-fenoxi-1,2-propandiol,  $t_r = 16,4$  min. 3-Benziloxi-1,2-propandiol:  $\lambda = 210$  nm, (*R*)-3-benziloxi-1,2-propandiol,  $t_r = 8,5$  min; (*S*)-3-benziloxi-1,2-propandiol,  $t_r = 9,5$  min.

### 3.2.19. Anàlisi per GC-FID quiral

La separació dels enantiòmers de l'1,2-hexandiol i de l'1,2-octandiol es va dur a terme a través dels seus corresponents 1,2-diacetats (Oromí, Torres i Canela, 2012). Les anàlisis es van realitzar amb un cromatògraf de gasos Agilent 7890A equipat amb un detector d'ionització de flama i una columna quiral Chrompack Chirasil-Dex CB de  $\beta$ -cyclodextrines modificades lligades a dimetilpolisiloxà (25 m × 0,25 mm; 0,25 µm). Es va utilitzar hidrogen com a gas portador (2 mL/min) i split 50:1. La temperatura de la columna es va mantenir inicialment a 100 °C durant 1 min, després es va augmentar fins a 135 °C amb un gradient de 5 °C/min i es va mantenir a aquesta temperatura durant 7 min. La temperatura de l'injector i del detector es va mantenir a 250 °C. 1,2-Hexandiol 1,2-diacetat: (*R*)-1,2-hexandiol 1,2-diacetat,  $t_r = 6,1$  min; (*S*)-1,2-hexandiol 1,2-diacetat,  $t_r = 6,3$  min. 1,2-Octandiol 1,2-diacetat: (*R*)-1,2-octandiol 1,2-diacetat,  $t_r = 10,2$  min; (*S*)-1,2-octandiol 1,2-diacetat,  $t_r = 10,4$  min.

Per a l'anàlisi dels enantiòmers del solketal i del glicidol es va utilitzar hidrogen com a gas portador (2,7 mL/min) i split 20:1. La temperatura de la columna es va mantenir inicialment a 60 °C durant 10 min, després es va augmentar fins a 180 °C amb un gradient de 15 °C/min i es va mantenir a aquesta temperatura durant 2 min. La temperatura de l'injector i del detector es va mantenir a 250 °C. Solketal: (*R*)-solketal,  $t_r = 14,40$  min; (*S*)-solketal,  $t_r = 14,44$  min. Glicidol: (*R*)-glicidol,  $t_r = 4,30$  min; (*S*)-glicidol,  $t_r = 4,47$  min.

### 3.2.20. Anàlisi per espectrofotometria UV-vis

Les concentracions d'1,2-hexandiòl i d'1,2-octandiòl es van determinar amb el test de l'adrenalina per a enzims (Fluxá, Wahler i Reymond, 2008). Per dur a terme el test, alíquotes de 25 µL es van transferir a microplaques de polipropilè de 96 pouets de fons en F (Eppendorf, Madrid). Llavors, 125 µL de per-iodat sòdic (1,3 mM) en solució amortidora d'acetat sòdic de pH 5,5 (0,1 M) es van afegir a cada pouet utilitzant una micropipeta multicanal. Les microplaques es van segellar i incubar en l'espectrofotòmetre (Thermo Scientific Multiskan GO controlat pel programari SkanIt) durant 75 min a 25 °C. A continuació, es van treure les tapetes i es van afegir 50 µL d'adrenalina (4 mM) en HCl (0,02 M) a cada pouet utilitzant una micropipeta multicanal. Les microplaques es van agitar durant 5 min i l'absorbància es va llegir immediatament a 490 nm. La mitjana aritmètica de l'absorbància dels blancs es va sotrestar dels valors d'absorbància llegits.

### 3.2.21. Anàlisi per GC-FID

Les anàlisis per cromatografia de gasos es van realitzar amb un cromatògraf de gasos Fisons GC8000 equipat amb un detector d'ionització de flama i una columna DB-5 (30 m × 0,25 mm; 0,25 µm). Es va utilitzar hidrogen (1 mL/min) com a gas portador. Temperatura de l'injector: 250 °C. Temperatura del detector: 300 °C. La temperatura de la columna es va mantenir inicialment a 70 °C durant 1 min, després es va augmentar fins a 280°C amb un gradient de 15 °C/min i es va mantenir a aquesta temperatura durant 10 min. Palmitat de solketal:  $t_r = 15,5$  min; palmitat de glicidil:  $t_r = 14,2$  min.

### 3.2.22. Anàlisi per GC-MS

Les anàlisis per cromatografia de gasos i espectrometria de masses es van realitzar amb un cromatògraf de gasos Agilent 6890N equipat amb un detector de masses 5073 MSD i una columna DB-5 (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm). Es va utilitzar heli com a gas portador i split 10:1. Temperatura de l'injector: 280 °C. La temperatura de la columna es va mantenir inicialment a 100 °C durant 1 min, després es va augmentar fins a 280 °C amb un gradient de 15 °C/min i es va mantenir en aquesta temperatura durant 10 min. Palmitat de solketil:  $t_r = 13,20$  min; palmitat de glicidil:  $t_r = 12,50$  min; monopalmitina:  $t_r = 13,75$  min.

### 3.2.23. Anàlisi per RMN

La composició de les mescles de les reaccions d'acetilació de l'1,2-hexandiol i de l'1,2-octandiol es van determinar per espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear de  $^1\text{H}$  i, la caracterització del *rac*-palmitat de solketil i del *rac*-palmitat de glicidil, per espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear de  $^1\text{H}$  i de  $^{13}\text{C}$  (MERCURYplus AS400 MHz, Varian). Els residus secs (20 mg) es van dissoldre en 0,7 mL de cloroform deuterat. Els paràmetres d'adquisició van ser: amplada d'espectre (6398 Hz), temps de relaxació (1 s), nombre de scans (64), temps d'adquisició (2562 s), amplada de pols ( $45^\circ$ ) i temps total d'adquisició (3 min 54 s).

### 3.2.24. Rendiment, conversió, excés enantiomèric del producte i del substrat i, proporció de l'isòmer majoritari

Rendiment en les reaccions d'hidròlisi dels epòxids:

$$Y (\%) = \frac{C_{\text{producte}}}{C_{\text{substrat inicial}}} \times 100 \quad (3.2.5)$$

on  $C_{\text{producte}}$  és la concentració del diol format (estimada a partir de la funció de calibratge) i  $C_{\text{substrat inicial}}$  és la concentració inicial de l'epòxid.

Rendiment en les reaccions de síntesi del palmitat de solketil i del palmitat de glicidil:

$$Y (\%) = \frac{C_{\text{producte}}}{C_{\text{producte màxima}}} \times 100 \quad (3.2.6)$$

on  $C_{\text{producte}}$  és la concentració de l'èster format (estimada a partir de la funció de calibratge) i  $C_{\text{producte màxima}}$  és la concentració màxima d'èster que podria formar-se a partir del reactiu limitant (l'àcid palmític).

Conversió en les reaccions d'hidròlisi del palmitat de solketil i del palmitat de glicidil:

$$c (\%) = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100 \quad (3.2.7)$$

on  $C_i$  i  $C_f$  són la concentració inicial i final de l'èster, respectivament.

Excés enantiomèric del producte:

$$ee_P (\%) = \frac{\text{àrea d'A} - \text{àrea de B}}{\text{àrea d'A} + \text{àrea de B}} \times 100 \quad (3.2.8)$$

on A i B són els productes enantiomèrics, essent A l'isòmer majoritari.

Excés enantiomèric del substrat:

$$ee_S (\%) = \frac{c \cdot ee_P (\%)}{1 - c} \quad (3.2.9)$$

Proporció de l'isòmer majoritari:

$$A (\%) = \frac{ee (\%) + 100}{2} \quad (3.2.10)$$



## **4. RESULTATS I DISCUSSIÓ**

---



#### 4.1. Aïllament de fongs a partir de pinyola i d'oliassa

L'extracció d'oli d'oliva genera un residu sòlid anomenat *pinyola* (*orujo* en castellà), que és una combinació de polpa, pell i os, i un residu líquid anomenat *oliassa* (*alpechín* en castellà), el qual prové de l'aigua de vegetació i dels teixits tous de l'oliva. Cada vegada hi ha més interès en la bioconversió d'aquests residus en productes d'alt valor afegit o en el seu ús com a font de microorganismes productors d'enzims, sobre tot hidrolítics, els quals són els primers colonitzadors durant el seu emmagatzematge (Morillo *et al.*, 2009). Per tant, es va procedir a utilitzar aquests substrats per obtenir soques fúngiques amb enzims hidrolítics en la seva massa miceliana. En total es van aïllar 19 soques.

La taula 4.1.1 mostra el nombre de soques aconseguïdes durant l'etapa d'aïllament, 12 a partir de pinyola i 7 a partir d'oliassa.

TAULA 4.1.1. Fongs aïllats de pinyola i d'oliassa

<i>Fong</i>	<i>Origen</i>	<i>Fong</i>	<i>Origen</i>	<i>Fong</i>	<i>Origen</i>
1	pinyola	8	oliassa	15	oliassa
2	pinyola	9	oliassa	16	pinyola
3	pinyola	10	oliassa	17	pinyola
4	pinyola	11	pinyola	18	pinyola
5	oliassa	12	pinyola	19	oliassa
6	pinyola	13	pinyola		
7	pinyola	14	oliassa		

#### 4.2. Avaluació de l'activitat epòxid-hidrolàsica dels micelis

L'ús d'enzims immobilitzats de forma natural sobre el miceli d'espècies fúngiques, ofereix la possibilitat d'utilitzar aquesta biomassa directament com a biocatalitzador, evitant així, processos d'aïllament, purificació i immobilització (Huang *et al.*, 2009).



## Resultats i Discussió

En un principi, utilitzant el *rac*-fenil glicidil èter com a substrat, es va avaluar l'activitat epòxid-hidrolàsica dels micelis dels fongs aïllats de pinyola i d'oliassa (fongs 1-19), dels micelis de dos fongs aïllats prèviament pel nostre grup a partir de pipes de gira-sol, *A. niger* (fong 20) i *Aspergillus tubingensis* (fong 21) i, del miceli de *R. oryzae* (fong 22), aïllat de *Foeniculum vulgare* (Torres et al., 2003).

Per tractar-se d'una etapa prèvia en la qual només interessava fer un cribatge, les reaccions es van realitzar per duplicat. En aquest cas, enlloc de realitzar una anàlisi estadística, es va preferir escollir aquelles reaccions amb un rendiment de diol per sobre d'un valor determinat. Com es pot veure en la figura 4.2.1, en les condicions assajades, es van obtenir rendiments de 3-fenoxi-1,2-propandiol inferiors al 20% amb la majoria de soques; per tant, agafant aquest valor com a referència, només es van seleccionar els fongs amb rendiments superiors: fongs 5 i 12 (20-30% diol), fong 17 (50-60% diol) i, *A. niger* i *A. tubingensis* (80-90% diol). Els fongs 5, 12 i 17 es van identificar com *Penicillium* sp., *Aspergillus terreus* i *Penicillium aurantiogriseum*, respectivament. En la taula A.1 (apèndix A) es poden consultar els resultats obtinguts en la seva identificació amb tècniques de biologia molecular.

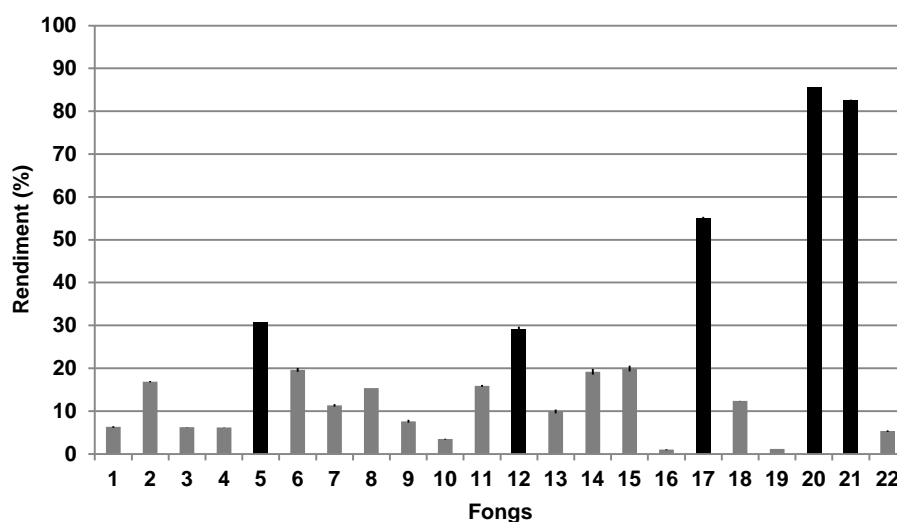


FIGURA 4.2.1. Hidròlisi del *rac*-fenil glicidil èter per EAs immobilitzades sobre els micelis dels fongs 1-22. Condicions de reacció: 980  $\mu$ L PBS (pH 7,4), 20  $\mu$ L d'una solució de *rac*-fenil glicidil èter en DMSO (5 mg/mL), 10 mg de miceli del fong crescut a pH 5, 30  $^{\circ}$ C, 1400 rpm i 1 h. Cadascuna de les barres representa la mitjana de dues repeticions independents.

### 4.3. Avaluació de l'activitat epòxid-hidrolàsica dels brous de cultiu

Després d'avaluar l'activitat epòxid-hidrolàsica dels micelis, també es va avaluar la dels brous de cultiu. Només els corresponents als fongs 7 i 19 van mostrar activitat, essent els rendiments de 3-fenoxi-1,2-propandiol del 7,1 ( $\pm 0,3$ )% i del 6,3 ( $\pm 0,3$ )%, respectivament. En els brous de cultiu d'aquests dos fongs no es van detectar proteases extracel·lulars, tal i com es pot observar en la figura 4.3.1 i, per tant, es va procedir a la seva diafiltració. Els rendiments en els concentrats dels brous de cultiu dels fongs 7 i 19 va augmentar fins 11,4 ( $\pm 0,7$ )% i 10,1 ( $\pm 0,5$ )%, respectivament. No obstant això, aquests resultats van ser inferiors al 20%, valor escollit com a referència en les reaccions amb miceli i, per tant, es va decidir seguir els estudis únicament amb els micelis.

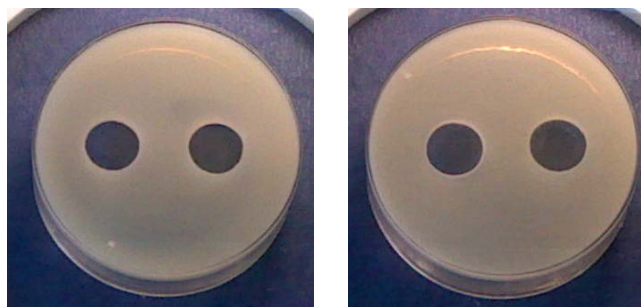


FIGURA 4.3.1. Absència de proteases extracel·lulars en els brous de cultiu dels fongs 7 (esquerra) i 19 (dreta) indicat per l'absència d'halo al voltant dels pouets. Els pouets es van emplenar amb 20  $\mu$ L de brou de cultiu prèviament centrifugat. Les plaques es van incubar a 37 °C durant 2-3 dies.

### 4.4. Influència de l'òxid d'estirè en la producció de biomassa fúngica i en l'activitat epòxid-hidrolàsica

Un cop verificada la normalitat i homoscedasticitat de les mitjanes de tots els assajos, es va procedir a l'anàlisi dels resultats. L'addició d'òxid d'estirè en el medi de cultiu va tenir un efecte significatiu en la producció de biomassa i en l'activitat epòxid-hidrolàsica dels cinc fongs ( $F_{\text{exp}} > F_{\text{crit}}$ ) i depenent del moment en què el precursor es va afegir al medi de cultiu es van obtenir diferents respostes. En general, quan l'òxid d'estirè es va afegir immediatament després (assaig A) o 24 h després (assaig B) d'afegir l'inòcul, es va observar una reducció significativa en la producció de biomassa i, en alguns casos, inclús la inhibició del creixement. L'addició del precursor 24 h abans d'afegir l'inòcul (assaig C) va produir un augment significatiu de l'activitat epòxid-hidrolàsica, encara que en alguns casos també una reducció significativa en la producció de biomassa. Això coincideix amb els resultats obtinguts per Liu *et al.* (2007), els quals van veure que l'addició de *cis*-epoxisuccinat abans d'afegir l'inòcul va augmentar tant la producció de biomassa com l'activitat epòxid-hidrolàsica de *Rhodococcus* sp. ML-0004. Wei *et al.* (2012), en canvi, van trobar que afegir *rac*-benzil glicidil èter abans d'afegir l'inòcul no millorava l'activitat epòxid-hidrolàsica de *Talaromyces flavus* ZJUTZQ159.

La figura 4.4.1 mostra com l'assaig C amb *A. niger* i *A. tubingensis* va produir un augment significatiu en la producció de biomassa. Amb *A. terreus*, en canvi, no es van observar diferències significatives en la producció de biomassa entre el control i l'assaig C. Amb *A. tubingensis*, tampoc es van observar diferències significatives en la producció de biomassa entre el control i l'assaig B. Els assajos A i B duts a terme amb *P. aurantiogriseum* i *Penicillium* sp. van inhibir el seu creixement i la quantitat de biomassa obtinguda en l'assaig C va ser significativament inferior a la del control.

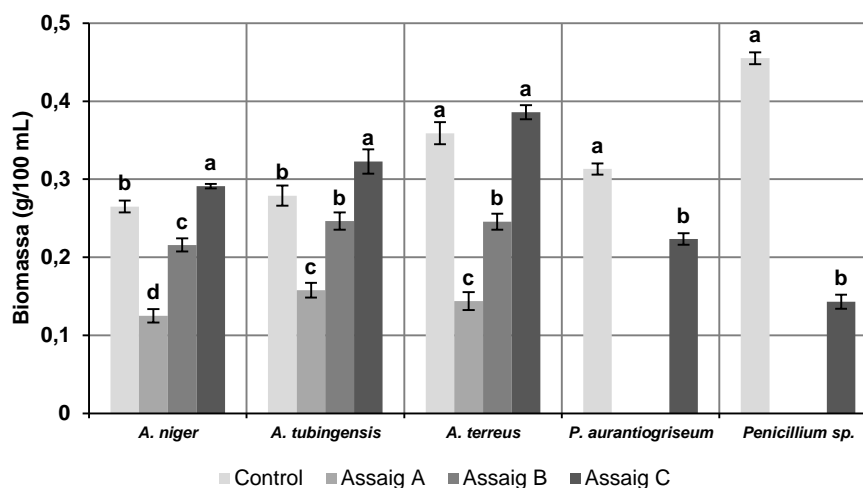


FIGURA 4.4.1. Efecte de l'òxid d'estirè en la producció de biomassa (g de miceli liofilitzat / 100 mL de medi de cultiu) durant el cultiu d'*A. niger*, d'*A. tubingensis*, d'*A. terreus*, de *P. aurantiogriseum* i de *Penicillium sp.* Control: sense òxid d'estirè, assaig A: òxid d'estirè afegit immediatament després de l'inòcul, assaig B: òxid d'estirè afegit 24 h després de l'inòcul i assaig C: òxid d'estirè afegit 24 h abans de l'inòcul. Cadascuna de les barres representa la mitjana de tres repeticions independents. Per a cada fong, segons el mètode de Bonferroni, no existeixen diferències significatives entre els assajos amb la mateixa lletra.

La figura 4.4.2 mostra com en l'assaig C es va obtenir un augment significatiu del rendiment de diol per als cinc fongs. Els rendiments obtinguts en els assajos A i B duts a terme amb *A. niger* i *A. tubingensis* no van presentar diferències significatives entre ells, però amb *A. terreus*, en canvi, sí.

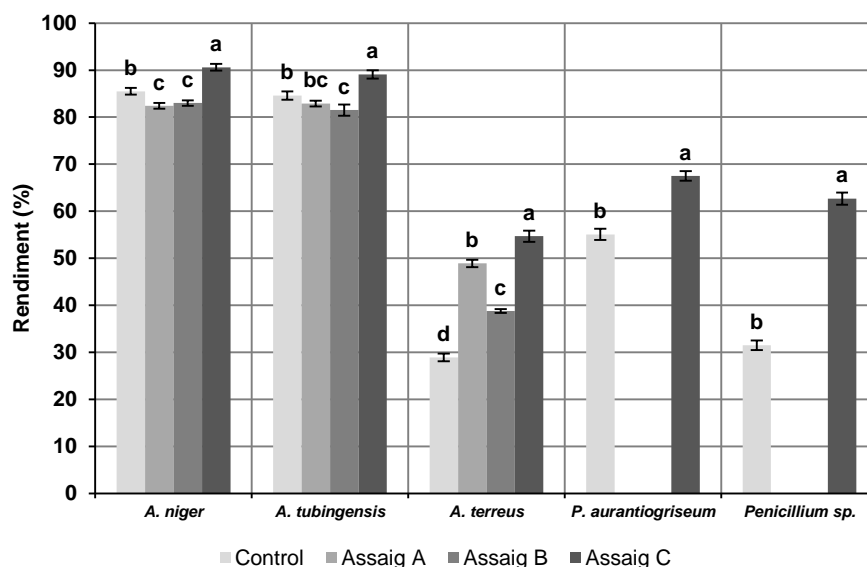


FIGURA 4.4.2. Efecte de l'òxid d'estirè en l'activitat epòxid-hidrolàsica d'*A. niger*, d'*A. tubingensis*, d'*A. terreus*, de *P. aurantiogriseum* i de *Penicillium sp.*, determinada a partir del rendiment de diol ( $C_{\text{diol format}}/C_{\text{epòxid inicial}} \times 100$ ). Control: sense òxid d'estirè, assaig A: òxid d'estirè afegit immediatament després de l'inòcul, assaig B: òxid d'estirè afegit 24 h després de l'inòcul i assaig C: òxid d'estirè afegit 24 h abans de l'inòcul. Condicions de reacció: 980  $\mu\text{L}$  PBS (pH 7,4), 20  $\mu\text{L}$  d'una solució de *rac*-fenil glicidil èter en DMSO (5 mg/mL), 10 mg de miceli del fong crescut a pH 5, 30  $^{\circ}\text{C}$ , 1400 rpm i 1 h. Cadascuna de les barres representa la mitjana de tres repeticions independents. Per a cada fong, segons el mètode de Bonferroni, no existeixen diferències significatives entre els assajos amb la mateixa lletra.

En base als rendiments de diol obtinguts, es va decidir continuar els assajos amb els micelis dels fongs crescuts en els medis amb addició d'òxid d'estirè 24 h abans d'afegir l'inòcul, tot i que en alguns casos la producció de biomassa en aquestes condicions era menor.

#### 4.5. Linealitat de les funcions de calibratge

Les funcions de calibratge (SC, post-MMC i pre-MMC) obtingudes seguint un model de regressió lineal simple es mostren en la taula B.1 (apèndix B). Els valors crítics de  $F$  (10,1 per a HPLC-UV i 7,7 per a espectrofotometria UV-vis) van ser inferiors als valors experimentals. Per tant, no es va acceptar la hipòtesi nul·la ( $H_0$ : el pendent és zero; és a dir, no existeix relació lineal entre les variables) i totes les equacions de l'esmentada taula es van considerar adequades per descriure la relació entre les àrees cromatogràfiques o les absorbàncies i les concentracions.

#### 4.6. Efecte de la matriu miceli

Quan el procés d'extracció aporta components de la matriu que afecten la resposta de l'anàlit, existeixen diferències significatives entre les funcions de calibratge SC i post-MMC. De la mateixa manera, quan una part de l'anàlit queda retingut en la matriu, es poden observar diferències significatives entre les funcions de calibratge post-MMC i pre-MMC. En aquest cas, ambdues funcions de calibratge presenten els mateixos components i qualsevol diferència en les respostes estarà causada pel procés d'extracció.

Dues línies rectes coincideixen quan els seus pendents i les seves ordenades a l'origen són iguals, la qual cosa ens indicaria que els components de la matriu o qualsevol diferència en les recuperacions no afecta les respostes. A partir de les equacions C.2 i C.3 de l'apèndix C es pot concloure que la hipòtesi nul·la de coincidència equival a  $H_0: \hat{\beta}_2 = \hat{\beta}_3 = 0$ .

La hipòtesi nul·la de coincidència es va acceptar per a les funcions de calibratge SC i post-MMC ja que els valors experimentals de  $F$  van ser inferiors al valor crític ( $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$ ). En canvi, no es va poder acceptar per a les funcions de calibratge post-MMC i pre-MMC amb valors experimentals de  $F$  superiors al valor crític ( $F_{\text{exp}} > F_{\text{crit}}$ ) (taula 4.6.1).

TAULA 4.6.1. Comparació estadística dels pendents i de les ordenades a l'origen de les funcions de calibratge

Fong	SC <sup>a</sup> vs post-MMC <sup>b</sup>				post-MMC vs pre-MMC <sup>c</sup>			
	HPLC-UV		espectrofotometria		HPLC-UV		espectrofotometria	
	$F_{exp}$	$F_{crit}$	$F_{exp}$	$F_{crit}$	$F_{exp}$	$F_{crit}$	$F_{exp}$	$F_{crit}$
<i>A. niger</i>	1,1	5,1	2,2	4,5	22,2	5,1	5,6	4,5
<i>A. tubingensis</i>	0,1	5,1	1,1	4,5	35,6	5,1	7,8	4,5
<i>P. aurantiogriseum</i>	0,7	5,1	0,5	4,5	195,5	5,1	9,6	4,5
<i>Penicillium</i> sp.	2,5	5,1	1,5	4,5	26,3	5,1	22,1	4,5
<i>A. terreus</i>	1,9	5,1	0,7	4,5	125,6	5,1	41,3	4,5

<sup>a</sup>SC: calibratge sense la matriu miceli.

<sup>b</sup>Post-MMC: calibratge amb la matriu miceli i addició del diol posterior a l'extracció.

<sup>c</sup>Pre-MMC: calibratge amb la matriu miceli i addició del diol prèvia a l'extracció.

Les figures 4.6.1 i 4.6.2 mostren les corbes de calibratge. Totes les matrius van presentar les corbes de calibratge SC i post-MMC superposades una sobre l'altra. Per tant, la quantificació del 3-fenoxi-1,2-propandiol per HPLC-UV o espectrofotometria UV-vis no es va veure afectada per la presència de components de les matrius. En canvi, els pendents de les corbes de calibratge pre-MMC van ser menors que els de les corbes de calibratge post-MMC. Per tant, la quantificació del 3-fenoxi-1,2-propandiol s'hauria de fer amb les funcions de calibratge pre-MMC per compensar la retenció de diol en les matrius després de les extraccions.

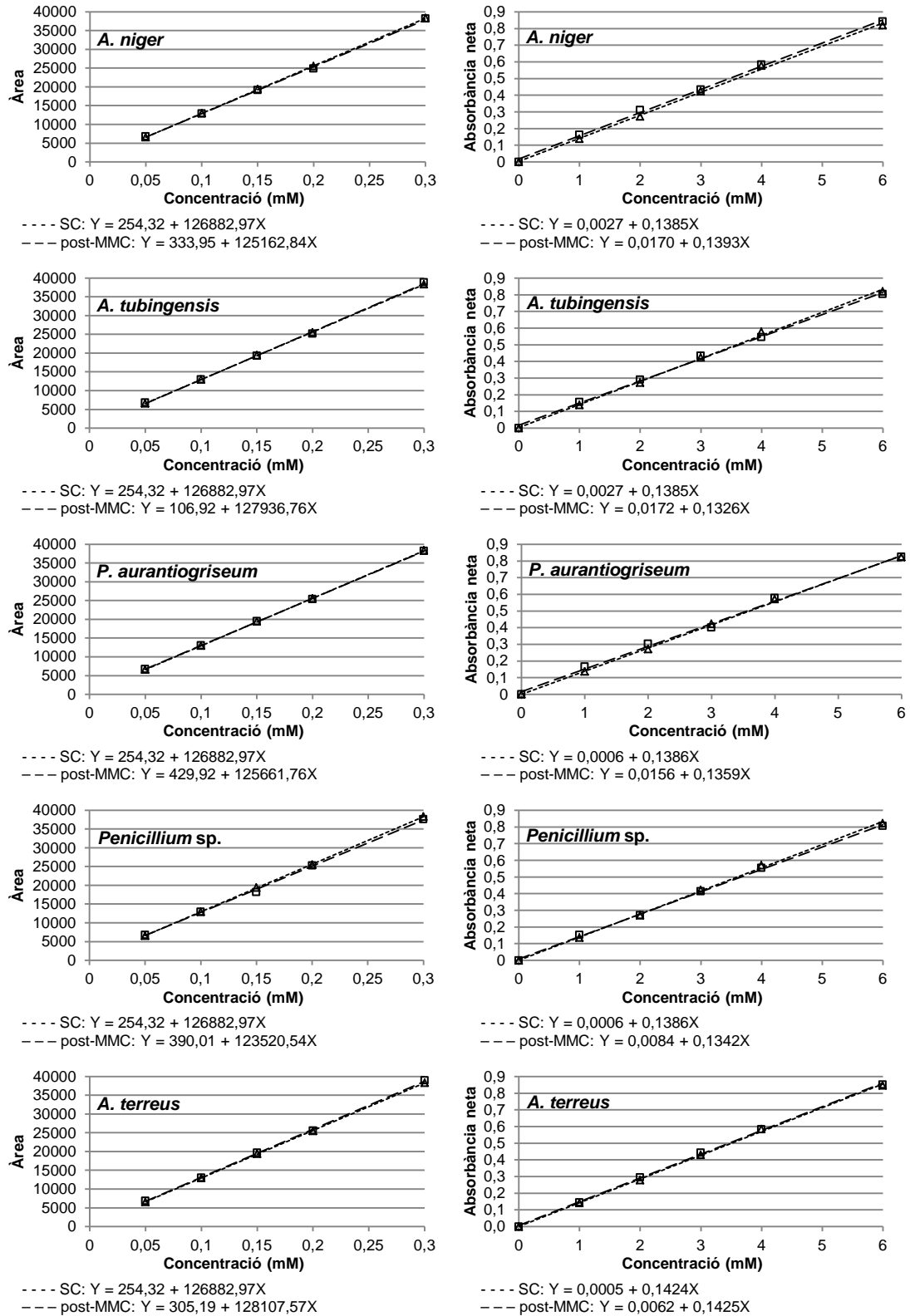


FIGURA 4.6.1. Comparació entre les corbes de calibratge SC i post-MMC obtingudes per HPLC-UV (a l'esquerra) i espectrofotometria UV-vis (a la dreta).



## Resultats i Discussió

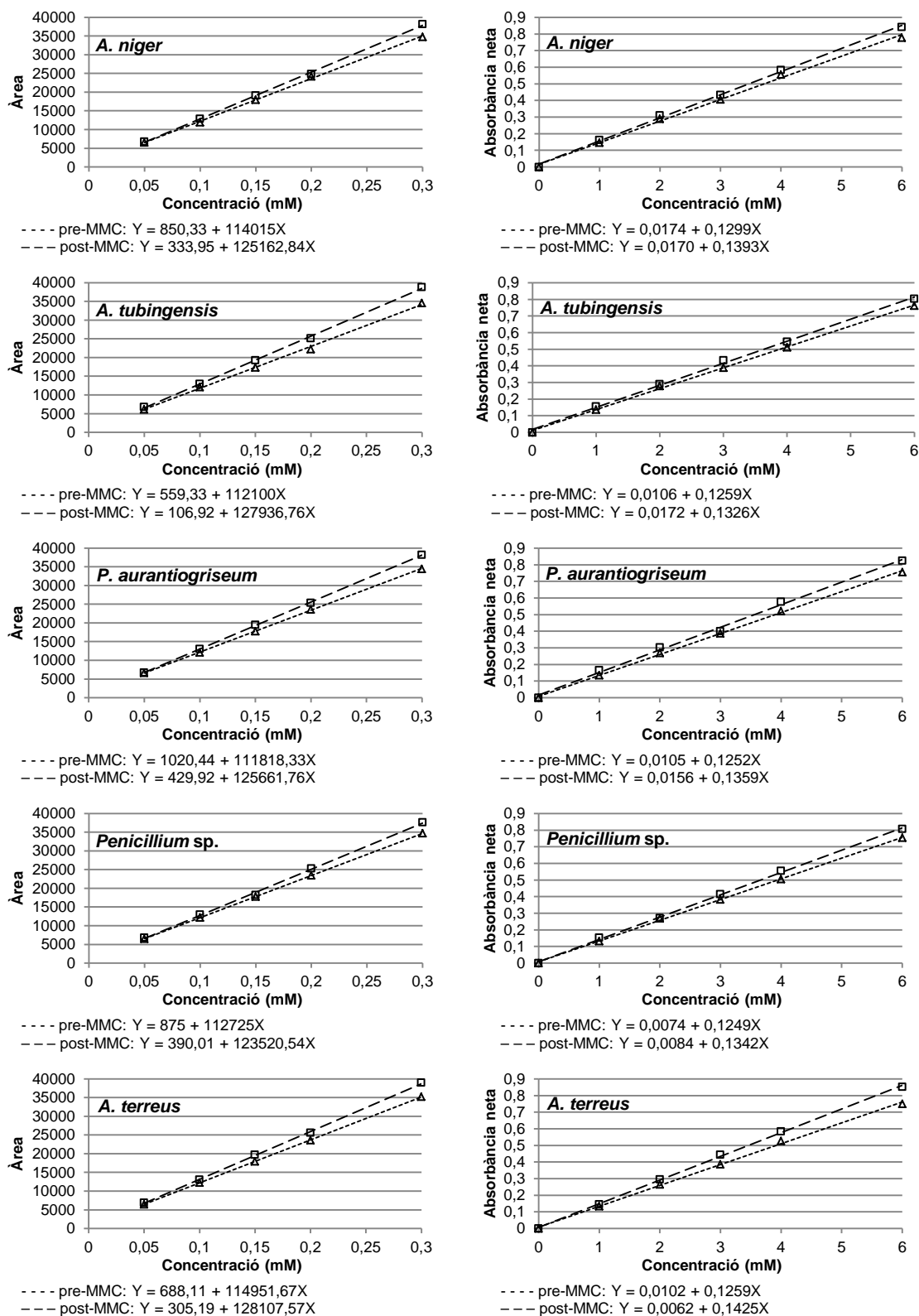


FIGURA 4.6.2. Comparació entre les corbes de calibratge post-MMC i pre-MMC obtingudes per HPLC-UV (a l'esquerra) i espectrofotometria UV-vis (a la dreta).

#### 4.7. Assajos de recuperació del 3-fenoxi-1,2-propandiol

Per validar les funcions de calibratge pre-MMC es van tenir en compte els valors de la recuperació del 3-fenoxi-1,2-propandiol. Els valors mitjans de recuperació van variar des de 96,8% fins a 103,2% (HPLC-UV) i des de 98,0% fins a 108,0% (espectrofotometria UV-vis). La RDS va ser inferior a  $8,6 \times 10^{-1}\%$  (taula 4.7.1).

TAULA 4.7.1. Exactitud dels resultats amb les funcions de calibratge pre-MMC

Fong	$C_{afegida}$ (mM)	HPLC-UV			espectrofotometria UV-vis		
		$\bar{R}^a$ (%)	$RSD^b$ (%)	$\beta\text{-ETI}^c$ (%)	$\bar{R}^a$ (%)	$RSD^b$ (%)	$\beta\text{-ETI}^c$ (%)
<i>A. niger</i>	3	97,5	$2,6 \times 10^{-1}$	[96,6; 98,3]	107,5	$6,5 \times 10^{-1}$	[105,3; 109,7]
	6	102,5	$2,0 \times 10^{-1}$	[101,8; 103,2]	103,8	$8,0 \times 10^{-1}$	[101,1; 106,5]
	9	99,2	$9,7 \times 10^{-2}$	[98,8; 99,5]	98,0	$8,9 \times 10^{-2}$	[95,1; 101,0]
<i>A. tubingensis</i>	3	103,2	$2,4 \times 10^{-1}$	[102,4; 104,0]	108,0	$3,4 \times 10^{-1}$	[106,9; 109,2]
	6	96,8	$1,2 \times 10^{-1}$	[96,4; 97,2]	99,6	$7,4 \times 10^{-1}$	[97,1; 102,1]
	9	101,1	$8,7 \times 10^{-2}$	[100,8; 101,4]	99,4	$9,1 \times 10^{-2}$	[96,4; 102,5]
<i>P. aurantiogriseum</i>	3	99,0	$1,9 \times 10^{-1}$	[98,4; 99,6]	103,0	$7,4 \times 10^{-1}$	[100,5; 105,5]
	6	101,0	$1,9 \times 10^{-1}$	[100,4; 101,7]	101,9	$8,6 \times 10^{-1}$	[99,0; 104,8]
	9	99,7	$4,9 \times 10^{-2}$	[99,5; 99,8]	98,7	$9,1 \times 10^{-2}$	[95,6; 101,7]
<i>Penicillium</i> sp.	3	99,9	$2,6 \times 10^{-1}$	[99,0; 100,8]	103,4	1,2	[99,4; 107,5]
	6	100,1	$4,7 \times 10^{-2}$	[100,0; 100,3]	99,7	$2,0 \cdot 10^{-1}$	[99,1; 100,4]
	9	100,0	$1,3 \cdot 10^{-1}$	[99,5; 100,4]	99,6	1,1	[96,0; 103,2]
<i>A. terreus</i>	3	100,5	$8,0 \times 10^{-2}$	[100,2; 100,8]	103,7	$8,4 \times 10^{-1}$	[100,9; 106,6]
	6	99,5	$1,8 \times 10^{-1}$	[98,9; 100,1]	102,4	1,2	[98,2; 106,6]
	9	100,2	$2,8 \times 10^{-2}$	[100,1; 100,3]	98,5	$5,0 \times 10^{-1}$	[96,9; 100,2]

$^a\bar{R}$  (%): mitjana de les tres recuperacions =  $(\bar{C}_{\text{pre-MMC}}/C_{\text{pre-afegida}} \times 100)/3$ .

$^bRSD$  (%): desviació estàndard relativa =  $(SD_R/\bar{R} \times 100)$ .

$^c\beta\text{-ETI}$  (%): interval de tolerància =  $(\bar{R} (\%) \pm t [1 + (1/n)]^{1/2} RSD (\%))$ .

Per a tots els micelis es van complir els requeriments establerts per la FDA; es a dir, els intervals de tolerància es van situar dins dels límits d'acceptació (85%-115%), confirmant així, que les funcions de calibratge pre-MMC podien compensar l'efecte de la matriu miceli.

Com per als tres nivells de fortificació investigats, l'exactitud estimada es va situar dins els límits d'acceptació, els nivells més baixos van determinar els LOQ, és a dir; 0,1 mM per HPLC-UV (concentració 3 mM diluïda 30 vegades) i 2 mM per espectrofotometria UV-vis (concentració 3 mM diluïda 1,5 vegades).

### 4.8. Quantificació per HPLC-UV i per espectrofotometria UV-vis del 3-fenoxi-1,2-propandiòl format en els assajos enzimàtics

Per demostrar l'aplicabilitat del mètode de calibratge validat, es van dur a terme assajos enzimàtics basats en la hidròlisi del *rac*-fenil glicidil èter catalitzada pels micelis d'*A. niger*, d'*A. tubingensis*, de *P. aurantiogriseum*, de *Penicillium* sp. i d'*A. terreus*. Els rendiments es van determinar utilitzant les funcions de calibratge pre-MMC. La taula 4.8.1 mostra els rendiments de les reaccions d'hidròlisi obtinguts per ambdós mètodes d'anàlisi a partir de les mateixes mostres.

TAULA 4.8.1. Rendiments del diòl assolits en la hidròlisi del *rac*-fenil glicidil èter catalitzada pels micelis d'*A. niger*, d'*A. tubingensis*, de *P. aurantiogriseum*, de *Penicillium* sp. i d'*A. terreus*

Fong	t	HPLC-UV	espectrofotometria UV-vis
		( $Y_{diol}^a \pm SD^b$ )%	( $Y_{diol}^a \pm SD^b$ )%
<i>A. niger</i>	15 min	45,1 ± 0,1	47,9 ± 2,0
<i>A. tubingensis</i>	2 h	59,2 ± 0,1	62,1 ± 1,5
<i>P. aurantiogriseum</i>	1 h 30 min	51,3 ± 0,2	51,8 ± 1,2
<i>Penicillium</i> sp.	3 h	48,3 ± 0,1	50,0 ± 0,5
<i>A. terreus</i>	24 h	33,2 ± 0,0	34,5 ± 1,5

<sup>a</sup>Y: rendiment del diòl =  $(C_{diol\ format} / C_{epòxid\ inicial} \times 100)$ .

<sup>b</sup>SD: desviació estàndard.

Una vegada confirmada la normalitat i homocedasticitat dels resultats es van calcular: a) els quocients entre els rendiments obtinguts per ambdues metodologies, b) la mitjana d'aquests quocients i, c) les mitjanes dels rendiments obtinguts per ambdues metodologies.

A continuació, es van representar els quocients entre els rendiments enfront les seves mitjanes (figura 4.8.1). Per a una significació  $\alpha = 0,025$ ; el 95% interval de confiança de la mitjana dels quocients entre els rendiments, es va situar dins dels límits d'acceptació 0,85 i 1,15; amb la qual cosa es va demostrar que els resultats assolits pels dos mètodes analítics es podien considerar equivalents.

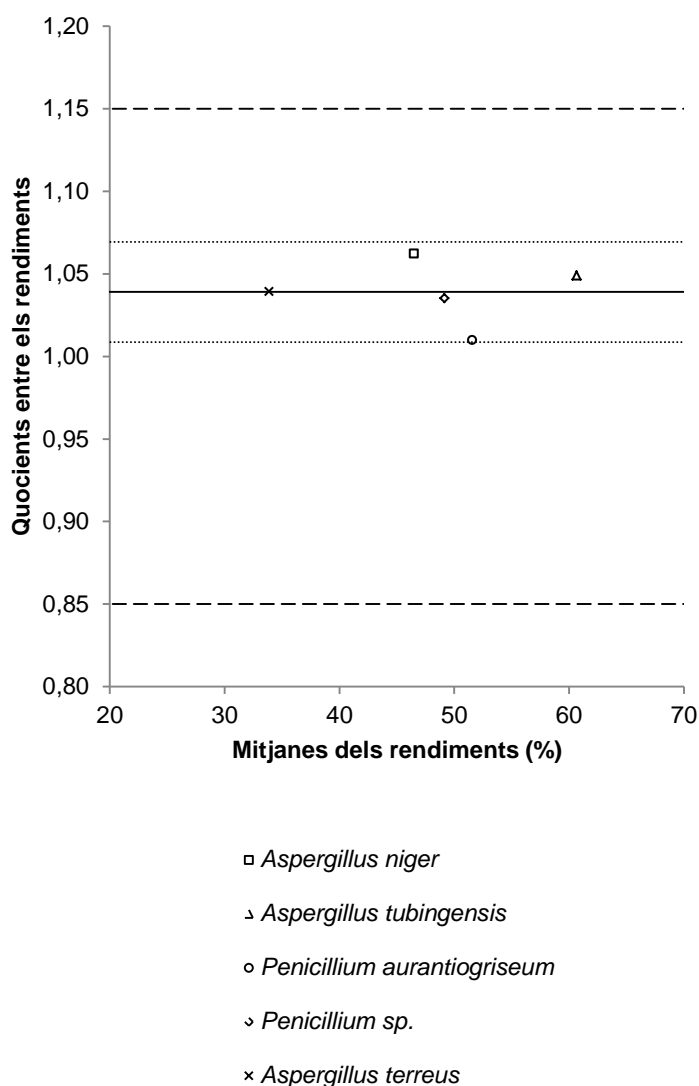


FIGURA 4.8.1. Representació dels quocients i de les mitjanes dels rendiments de les reaccions d'hidròlisi obtinguts per HPLC-UV i per espectrofotometria UV-vis, corresponents a *A. niger*, *A. tubingensis*, *P. aurantiogriseum*, *Penicillium sp.* i *A. terreus*. La línia contínua és la mitjana dels quocients, les línies de punts són els límits de l'interval de confiança i les línies discontinües són els límits d'acceptació.

### 4.9. Hidròlisi del *rac*-fenil glicidil èter, del *rac*-benzil glicidil èter, del *rac*-1,2-epoxihexà i del *rac*-1,2-epoxioctà

La taula 4.9.1 mostra els excessos enantiomèrics obtinguts quan els micelis d'*A. niger*, d'*A. tubingensis*, de *P. aurantiogriseum*, de *Penicillium* sp. i d'*A. terreus* es van utilitzar com a biocatalitzadors en la hidròlisi del *rac*-fenil glicidil èter; del *rac*-benzil glicidil èter; del *rac*-1,2-epoxihexà i del *rac*-1,2-epoxioctà. Els temps de reacció (t) corresponen als rendiments més propers al 50%, els quals es van determinar utilitzant les funcions de calibratge pre-MMC.

En l'apèndix D es mostra el procés que es va seguir per determinar els excessos enantiomèrics de l'1,2-hexandiòl i de l'1,2-octandiòl a partir dels seus derivats acetilats.

TAULA 4.9.1. Hidròlisi del *rac*-fenil glicidil èter, del *rac*-benzil glicidil èter; del *rac*-1,2-epoxihexà i del *rac*-1,2-epoxioctà catalitzada pels micelis d'*A. niger*, d'*A. tubingensis*, de *P. aurantiogriseum*, de *Penicillium* sp. i d'*A. terreus* crescuts a un pH inicial de 5 o de 3

Fong	Entrada	Epòxid	t	pH 5		pH 3	
				$ee_{diol}^a$ (%) / c. a. <sup>b</sup>	$(Y_{diol}^c \pm SD^d)\%$	$ee_{diol}^a$ (%) / c. a. <sup>b</sup>	$(Y_{diol}^c \pm SD^d)\%$
<i>A. niger</i>	1	<i>rac</i> -fenil glicidil èter	15 min	51,4/(S)	45,1 ± 0,1	33,5/(S)	74,6 ± 0,2
	2	<i>rac</i> -benzil glicidil èter	15 min	34,9/(S)	49,5 ± 0,0	25,3/(S)	67,0 ± 0,1
	3	<i>rac</i> -1,2-epoxihexà	1 h	8,5/(R)	45,4 ± 2,2	10,2/(R)	55,2 ± 0,3
	4	<i>rac</i> -1,2-epoxioctà	1 h	5,3/(R)	93,7 ± 1,7	7,6/(R)	93,6 ± 1,3
<i>A. tubingensis</i>	5	<i>rac</i> -fenil glicidil èter	1 h	36,9/(S)	59,2 ± 0,1	33,3/(S)	56,2 ± 0,1
	6	<i>rac</i> -benzil glicidil èter	2 h	29,4/(S)	54,9 ± 0,1	30,5/(S)	55,3 ± 0,1
	7	<i>rac</i> -1,2-epoxihexà	4 h	24,4/(R)	70,4 ± 0,7	38,1/(R)	88,7 ± 3,3
	8	<i>rac</i> -1,2-epoxioctà	4 h	13,7/(R)	49,7 ± 1,5	21,8/(R)	36,6 ± 1,9
<i>P. aurantiogriseum</i>	9	<i>rac</i> -fenil glicidil èter	1 h	28,5/(S)	51,3 ± 0,2	11,4/(S)	42,1 ± 0,0
	10	<i>rac</i> -benzil glicidil èter	1 h 30 min	43,3/(R)	40,8 ± 0,1	46,1/(S)	34,2 ± 0,1
	11	<i>rac</i> -1,2-epoxihexà	4 h	17,9/(R)	19,1 ± 0,7	25,1/(R)	7,5 ± 1,5
	12	<i>rac</i> -1,2-epoxioctà	4 h	8,8/(R)	32,4 ± 1,4	6,8/(R)	18,2 ± 2,4
<i>Penicillium</i> sp.	13	<i>rac</i> -fenil glicidil èter	2 h	30,7/(S)	48,3 ± 0,1	35,6/(S)	44,7 ± 0,0
	14	<i>rac</i> -benzil glicidil èter	3 h	14,4/(S)	46,8 ± 0,2	19,0/(S)	46,4 ± 0,1
	15	<i>rac</i> -1,2-epoxihexà	4 h	10,8/(R)	14,9 ± 0,9	13,5/(R)	21,1 ± 1,1
	16	<i>rac</i> -1,2-epoxioctà	4 h	9,4/(R)	29,6 ± 3,1	9,1/(R)	25,8 ± 1,3
<i>A. terreus</i>	17	<i>rac</i> -fenil glicidil èter	24 h	11,6/(S)	33,2 ± 0,0	26,8/(S)	21,1 ± 0,2
	18	<i>rac</i> -benzil glicidil èter	24 h	45,6/(S)	45,4 ± 0,6	64,5/(S)	30,2 ± 0,4
	19	<i>rac</i> -1,2-epoxihexà	6 h	19,5/(R)	5,5 ± 0,2	18,8/(R)	21,3 ± 0,5
	20	<i>rac</i> -1,2-epoxioctà	6 h	27,5/(R)	21,4 ± 0,2	27,5/(R)	5,8 ± 0,3

<sup>a</sup> $ee_{diol}$ : excés enantiomèric del diol, <sup>b</sup>c. a.: configuració absoluta, <sup>c</sup> $Y_{diol}$ : rendiment del diol =  $(C_{diol\ format}/C_{epòxid\ inicial} \times 100)$ , <sup>d</sup>SD: desviació estàndard.

Amb les EHs d'*A. niger*, d'*A. tubingensis*, de *P. aurantiogriseum*, de *Penicillium* sp. i d'*A. terreus*, crescuts a un pH inicial de 5 i de 3, els diols dels epòxids amb un anell aromàtic es van obtenir amb excessos enantiomèrics del 11%-51% i del 11%-64%, respectivament. L'enantioselectivitat de les EHs d'*A. niger*, d'*A. tubingensis* i de *Penicillium* sp. va disminuir amb la presència del CH<sub>2</sub> entre els anells fenil i oxirà (entrades 2, 6 i 14). En canvi, les EHs de *P. aurantiogriseum* i d'*A. terreus* van ser més enantioselectives (entrades 10 i 18). Amb les EHs d'*A. niger*, d'*A. tubingensis* i de *Penicillium* sp., els diols dels epòxids alifàtics es van obtenir amb excessos enantiomèrics més baixos, del 5%-27% (fongs crescuts a un pH inicial de 5) i del 6%-38% (fongs crescuts a un pH inicial de 3).

La configuració absoluta dels diols va dependre de l'estructura del substrat ((*S*)-diol a partir dels epòxids amb un anell aromàtic i (*R*)-diol a partir dels epòxids alifàtics). L'única excepció la van protagonitzar les EHs de *P. aurantiogriseum*, amb les quals es va aconseguir el (*R*)-3-benziloxi-1,2-propandiòl a partir del *rac*-benzil glicidil èter (entrada 10).

En els últims anys s'han donat a conèixer diferents soques d'*Aspergillus* sp. productores d'EHs. Entre elles poden incloure's *Aspergillus oryzae* IAM2750, *Aspergillus sojae* IAM2631, *Aspergillus wentii* (Moussou *et al.*, 1998c), *A. niger* LCP521 (Reetz *et al.*, 2004), *A. terreus* CBS116-46 (Moussou *et al.*, 1998c; Moussou *et al.*, 1998b), *A. niger* M200 (Kotik, Brichac i Kyslík, 2005), *Aspergillus sydowii* Gc12 (Martins *et al.*, 2011) i *Aspergillus brasiliensis* CCT1435 (Beloti *et al.*, 2013). En canvi, només s'han donat a conèixer les EHs de quatre soques de *Penicillium* sp., *Penicillium lilacinum* ATCC10114, *Penicillium simplicissimum* VKMF16 (Moussou *et al.*, 1998a), *Penicillium raistrickii* Ce16 i *Penicillium miczynskii* Gc5 (Martins *et al.*, 2011). Els rendiments i excessos enantiomèrics obtinguts amb aquestes EHs fúngiques es van comparar amb els assolits amb les EHs d'*A. niger*, d'*A. tubingensis*, de *P. aurantiogriseum*, de *Penicillium* sp. i d'*A. terreus*.

Les EHs d'aquests cinc fongs, de la mateixa manera que altres EHs fúngiques prèviament estudiades per altres grups, van hidrolitzar els epòxids alifàtics amb excessos enantiomèrics bastant baixos. Molt poques EHs, entre elles les d'*A. niger* LCP521, d'*A. oryzae* IAM2750, d'*A. sojae* IAM2631, d'*A. terreus* CBS116-46, d'*A. wentii* i de *P. lilacinum* van donar el (*R*)-1,2-hexandiol amb un 24%-62% ee (Moussou *et al.*, 1998a).

La hidròlisi del *rac*-1,2-epoxioctà per les EHs de *Diplodia gossypina* ATCC 10936, de *F. solani* DSM62416, de *Glomerella cingulate* ATC10534 (Mischitz *et al.*, 1995), de *Ulocladium atrum* CMC3280, de *Zopfiella karachiensis* CMC3284 (Grogan, Roberts i Willetts, 1996), d'*A. niger* LCP521, d'*A. terreus* CBS116-46, de *Chaetomium globosum* LCP679, de *Cunninghamella elegans* LCP 1543, de *Syncephalastrum racemosum* MUCL28766 (Moussou *et al.*, 1998c), i de *B. bassiana* ATCC7149 (Moussou *et al.*, 2000) van donar el (*R*)-1,2-octandiol amb un ee molt baix. Únicament les EHs d'*A. niger* CCT2760, d'*A. niger* CCT3086 i d'*A. niger* CCT4846 van donar el (*R*)-1,2-octandiol amb un 27%, 45% i 56% ee, respectivament (Cagnon, Porto i Marsaioli, 1999).

Quan les EHs es van avaluar amb els epòxids alifàtics, com ja s'ha vist en altres EHs fúngiques (Cagnon, Porto i Marsaioli, 1999; Moussou *et al.*, 2000; Moussou *et al.*, 1998a; Moussou *et al.*, 1998c), la configuració absoluta del diol majoritari va ser (*R*). A més, l'activitat de les EHs va millorar en augmentar la longitud de la cadena alquíllica, deixant clar que la solubilitat de l'epòxid en la mescla de reacció i, per tant, la seva accessibilitat, podien jugar un paper important en l'activitat enzimàtica.

L'excés enantiomèric del (*S*)-3-fenoxi-1,2-propandiol que es va aconseguir amb les EHs d'*A. niger* (entrada 1: pH 5 inicial de creixement, 45% rdt., 51% ee) va ser similar a l'obtingut per Reetz *et al.* (2004) amb les EHs d'*A. niger* LCP521 (rendiment no publicat, 56% ee). Els excessos enantiomèrics del (*R*)- i del (*S*)-3-benziloxi-1,2-propandiol assolits amb les EHs de *P. aurantiogriseum* (entrada 10: pH 5 inicial de creixement, 41% rdt., 43% ee; pH 3 inicial de creixement, 34% rdt., 46% ee) i d'*A. terreus* (entrada 18: pH 5 inicial de creixement, 45% rdt., 46% ee; pH 3 inicial de creixement, 64% rdt., 30% ee), respectivament; són els valors més alts aconseguits fins al moment amb EHs d'origen fúngic.



Altres EHs com ara les de *Fusarium solani* DSM62416 (Mischitz *et al.*, 1995), d'*A. niger* M200 (Kotik, Brichac i Kyslík, 2005), d'*A. sydowii* Gc12, de *P. raistrickii* Ce16, de *P. miczynskii* Gc5, de *Trichoderma* sp. Gc1 (Martins *et al.*, 2011) i de *T. flavus* ZJUTZQ159 (Wei *et al.*, 2012) s'han utilitzat en la hidròlisi del *rac*-benzil glicidil èter, però els excessos enantiomèrics del diol van ser molt baixos o no es van determinar. Cal remarcar que per primera vegada, *A. tubingensis* i *P. aurantiogriseum* poden ser descrits com a productors d'EHs.

Així, les EHs d'*A. niger* i d'*A. tubingensis* poden resultar útils per a l'obtenció del (S)-3-fenoxi-1,2-propandiòl el qual, per exemple, intervé en la síntesi de l'expectorant *guaifenesina*; del relaxant muscular *mefenesina* o de l'agent antifúngic *clorofenesina* (Sareen i Kumar, 2011). Les EHs de *P. aurantiogriseum* i d'*A. terreus*, en canvi, poden ser interessants per obtenir el (R)- i el (S)-3-benziloxi-1,2-propandiòl, respectivament, els quals intervenen en la síntesi de l'agent antiherpesvirus *cidofovir*, de l'anàleg del *migrastatin*, utilitzat en el tractament del càncer de colon i/o d'ovari, i d'un antagonista selectiu del receptor LPA3 (Jia, Xu i Li, 2011).

### 4.10. Síntesi del *rac*-palmitat de solketil i del *rac*-palmitat de glicidil

Un dels mètodes més utilitzats per obtenir un èster consisteix en l'esterificació d'un alcohol amb un àcid catalitzada per una lipasa. Com la reacció és reversible, és possible desplaçar l'equilibri cap a la formació de producte afegint un dels reactius en excés o eliminant continuament l'èster format o l'aigua (Yadav i Thathagar, 2002). Entre les lipases comercials més utilitzades, CAL-B destaca per la seva elevada activitat i estabilitat. El fet d'escollir-la com a biocatalitzador per a la síntesi del palmitat de solketil i del palmitat de glicidil *rac*èmics es va basar en l'existència de referències sobre l'enantioselectivitat molt baixa o nul·la d'aquesta lipasa vers els alcohols primaris i la possibilitat de mantenir la seva activitat en sistemes orgànics anhidres o sense dissolvent (Irimescu, Saito i Kato, 2004). Tenint en compte aquests fets es va decidir: a) afegir els dos alcohols en excés, així podrien actuar com a substrats i dissolvents i, b) suposar que l'aigua formada durant les reaccions d'esterificació podria ser suficient per mantenir la conformació del centre actiu de l'enzim i, per tant, no afegir aigua en el medi ja que CAL-B no presenta activació interfacial i no requereix la presència d'una interfase oli-aigua (Ghanem, 2007).

En la reacció de síntesi del palmitat de solketal es van obtenir rendiments del 67 ( $\pm$  0,8)%, 79 ( $\pm$  1,3)%, 90 ( $\pm$  2,4)% i 83 ( $\pm$  0,6)% a 40 °C, 50 °C, 60 °C i 70 °C, respectivament. Per tant, el grau d'esterificació va anar augmentant progressivament fins assolir un valor màxim a 60 °C, a partir del qual es va observar un descens causat probablement per la desnaturalització de l'enzim. En base als resultats obtinguts, es va triar la temperatura de 60 °C (figura 4.10.1). Altres estudis d'esterificació realitzats amb CAL-B han demostrat la capacitat d'aquest enzim d'actuar a altes temperatures (García *et al.*, 1999; Mat *et al.*, 2005; Trubiano, Borio i Errazu, 2007).

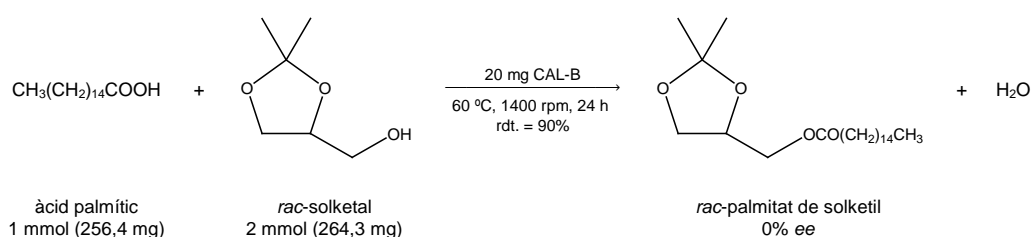


FIGURA 4.10.1. Síntesi del palmitat de solketal catalitzada per CAL-B. Condicions de reacció: 1 mmol (256,4 mg) d'àcid palmític, 2 mmol (264,3 mg) de *rac*-solketal, 20 mg de CAL-B, sense dissolvent, 60 °C, 1400 rpm i 24 h.

Abans de purificar l'èster, es va analitzar el solketal que no havia reaccionat. La figura 4.10.2 mostra les àrees cromatogràfiques dels dos enantiòmers del solketal. El fet d'obtenir valors tan similars (49,93% per al (*R*)-solketal i 50,07% per al (*S*)-solketal) va deixar clar que l'èster sintetitzat era bàsicament una mescla racèmica.

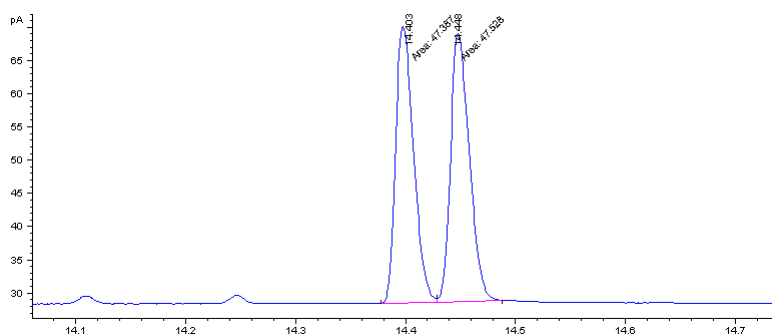


FIGURA 4.10.2. Cromatograma de gasos del solketal que va quedar per reaccionar durant la síntesi del palmitat de solketal catalitzada per CAL-B. Temps de retenció: 14,40 min ((*R*)-solketal) i 14,44 min ((*S*)-solketal).

Akok (1993) també va veure que CAL-B no presentava preferència per cap dels enantiòmers del *rac*-solketal durant l'esterificació amb l'àcid oleic en absència de dissolvent. Adamczak (2003) va aconseguir una conversió del 100% en l'esterificació del *rac*-solketal amb l'àcid oleic (relació molar 1:1) catalitzada per CAL-B immobilitzada sobre Celite 545. La reacció va tenir lloc a 35 °C durant 24 h i va afegir tamisos moleculars de 4 Å per eliminar l'aigua formada durant la reacció.

Hess *et al.* (1995) van observar preferència pel (*R*)-solketal durant la transesterificació del *rac*-solketal amb diferents èsters alquílics catalitzada per la lipasa de *P. cepacia*. Omar *et al.* (1989) van dur a terme l'esterificació del *rac*-solketal (utilitzat també com a medi de reacció) amb diferents àcids grassos catalitzada per la lipasa de *R. miehei* a 70 °C. Amb un contingut inicial d'aigua del 0,1% (v/v) i l'addició de tamisos moleculars van aconseguir conversions del 85%-90%. Lai, Hattori i O'Connor (1999) van dur a terme l'esterificació del *rac*-solketal amb l'àcid caproic catalitzada per lipases en condicions gairebé anhidres (concentració d'aigua inferior al 0,01% (p/p)). Els millors resultats els van obtenir en isoocetà i no van detectar activitat en èter dietílic, *t*-BuOMe, dioxà o acetonitril.

La síntesi del palmitat de glicidil es va realitzar inicialment a 40 °C, 50 °C i 60 °C durant 24 h amb una relació molar 2:1 (alcohol:àcid palmític) i absència de dissolvent. El rendiment va ser negligible ( $\leq 10\%$ ) a 40 °C i nul a 50 °C i 60 °C, possiblement a causa de l'efecte inhibitor del *rac*-glicidol, més reactiu i hidrofílic que el *rac*-solketal i, per tant, amb més capacitat per deshidratar l'enzim i eliminar la capa d'aigua essencial que l'envolta. És del tot conegut que alguns alcohols de baix pes molecular tenen un efecte advers sobre CAL-B (García i Gotor 1998; Janssen *et al.*, 1999).

Per evitar que el *rac*-glicidol quedés adsorbit sobre la superfície de la lipasa immobilitzada i, per tant, pugués inactivar l'enzim, es va decidir, tenint en compte que tant l'àcid palmític com el *rac*-glicidol eren solubles en èters i, a més, existien referències sobre la inactivació de CAL-B causada per dissolvents hidrofílics (Plou *et al.*, 2002), dissoldre els dos substrats en *t*-BuOMe (dissolvent hidrofòbic) i treballar amb diferents relacions molars alcohol:àcid palmític.

En la taula 4.10.1 es pot veure com el rendiment va anar augmentant progressivament a mesura que ho feia la relació molar, però a partir de la relació 2:1, es va apreciar un lleuger descens.

TAULA 4.10.1. Síntesi del palmitat de glicidil amb diferents relacions molars alcohol:àcid

<i>rac</i> -glicidol	Àcid palmític	( $Y_{\text{èster}}^a \pm SD^b$ )%
1	1	65,2 ± 1,1
1,5	1	79,7 ± 0,6
2	1	85,4 ± 1,4
2,5	1	80,9 ± 0,4
3	1	78,1 ± 1,7
4	1	76,6 ± 0,9

<sup>a</sup> $Y_{\text{èster}}$ : rendiment de l'èster =  $(C_{\text{èster format}}/C_{\text{èster màxima}} \times 100)$ .

<sup>b</sup>SD: desviació estàndard.

En alguns casos, l'excés d'alcohol pot deshidratar l'enzim o inhibir-lo i, per tant, disminuir la seva activitat i reduir el rendiment de producte (Erbeldinger i Halling, 1998; Trubiano, Borio i Errazu, 2007). Tot i que l'addició de dissolvent va millorar la tolerància de CAL-B al *rac*-glicidol, els rendiments van ser inferiors als obtinguts amb el *rac*-solketal. Molts autors estan d'acord en què la hidrofobicitat del dissolvent (expressada com a  $\log P$ , logaritme del coeficient de repartició entre l'octanol i l'aigua) pot afectar algunes reaccions enzimàtiques (Laane *et al.*, 1987; Skouridou, Stamatis i Kolisis, 2003). En base als resultats obtinguts es va decidir realitzar la reacció esquematitzada en la figura 4.10.3.

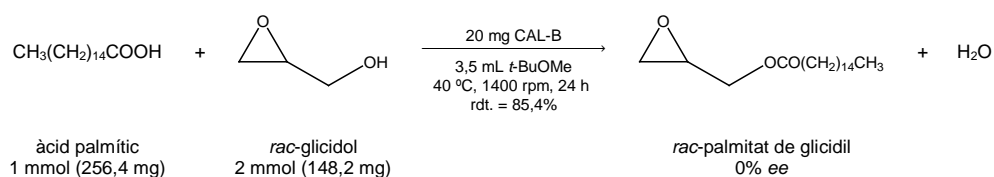


FIGURA 4.10.3. Síntesi del palmitat de glicidil catalitzada per CAL-B. Condicions de reacció: 1 mmol (256,4 mg) d'àcid palmític, 2 mmol (148,2 mg) de *rac*-glicidol, 20 mg de CAL-B, 3,5 mL de *t*-BuOMe, 40 °C, 1400 rpm i 24 h.

## Resultats i Discussió

En la figura 4.10.4 es poden veure les àrees cromatogràfiques dels dos enantiòmers del glicidol que van quedar per reaccionar. Igual que en el cas anterior, el fet d'obtenir valors similars (50,3% per al (*R*)-glicidol i 49,7% per al (*S*)-glicidol) va portar a la conclusió que l'èster sintetitzat era pràcticament una mescla racèmica.

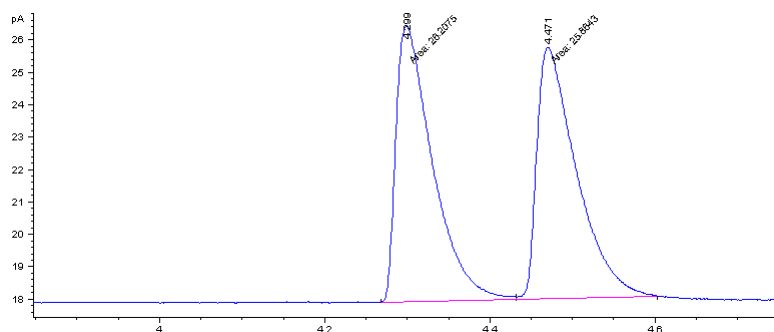


FIGURA 4.10.4. Cromatograma de gasos del glicidol que va quedar per reaccionar durant la síntesi del palmitat de glicidil catalitzada per CAL-B. Temps de retenció: 4,30 min ((*R*)-glicidol) i 4,47 min ((*S*)-glicidol).

Cardenas *et al.* (2001) van dur a terme la transesterificació del (*R*)- i del (*S*)-glicidol amb l'acetat de vinil en *i*-Pr<sub>2</sub>O catalitzada per diferents lipases. Les lipases de *Penicillium chrysogenum*, *Arthroderma ciferri*, *Monascus sp.*, *Achremonium murorum*, *Monascus mucoroides* i *Rhodotorula araucariae* no van mostrar preferència per cap dels enantiòmers del glicidol i els rendiments obtinguts van ser molt baixos.

Lozano *et al.* (2004) van utilitzar CAL-B en la transesterificació del *rac*-glicidol amb l'acetat o el butirat de vinil en diferents medis (toluè, líquid iònic i líquid iònic / CO<sub>2</sub>sc) i van obtenir majoritàriament el (*S*)-èster.

#### 4.11. GC-MS i RMN del *rac*-palmitat de solketil i del *rac*-palmitat de glicidil purs

En la figura 4.11.1 es pot veure l'espectre de masses del *rac*-palmitat de solketil i en la figura 4.11.2, la interpretació dels seus fragments iònics. L'ió molecular ( $m/z = 370$ ) no es detecta, però el pes molecular està clarament indicat pel pic base  $[M - 15]^+$  ( $m/z = 355$ , pèrdua d'un grup metil del grup isopropilidè). Un altre pic molt intens es troba a  $m/z = 101$  i representa l'escissió entre els carbonis 1 i 2 del glicerol, quedant la càrrega retinguda pel fragment que conté el grup isopropilidè. La pèrdua de 58 uma implica l'eliminació d'acetona i, per tant, l'obtenció de l'ió epòxid  $[M - 58]^+$  ( $m/z = 312$ ). Altres fragmentacions que tenen lloc són la fragmentació en  $\alpha$  (fisió d'un enllaç  $\alpha$  respecte d'un heteroàtom) i la transposició de McLafferty (requereix un àtom d'hidrogen en posició  $\gamma$  respecte d'un doble enllaç, estant la posició  $\alpha$  unida al doble enllaç). En els èsters dels àcids de cadena llarga apareix un fragment situat a +13 uma de l'ió de la transposició de McLafferty (Hesse, Meier i Zeeh, 2005). També es troben els ions  $[C_nH_{2n+1}]^+$  ( $m/z 57$ ) i  $[C_nH_{2n-1}]^+$  ( $m/z 83$ ) dels grups alquil units a l'oxigen de l'èster.

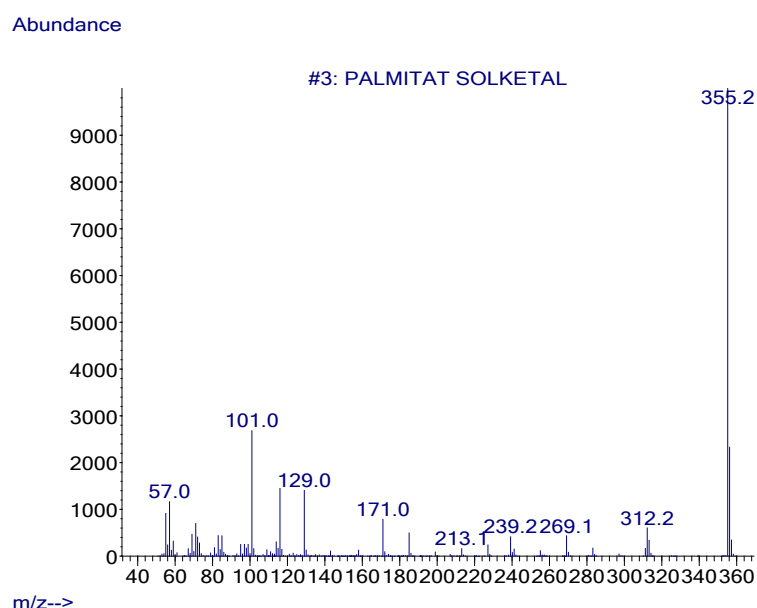


FIGURA 4.11.1. Espectre de masses del *rac*-palmitat de solketil pur obtingut a partir de l'esterificació no enantioselectiva del *rac*-solketal amb l'àcid palmític catalitzada per CAL-B. Condicions de reacció: 1 mmol (256,4 mg) d'àcid palmític, 2 mmol (264,3 mg) de *rac*-solketal, 20 mg de CAL-B, sense dissolvent, 60 °C, 1400 rpm i 24 h.

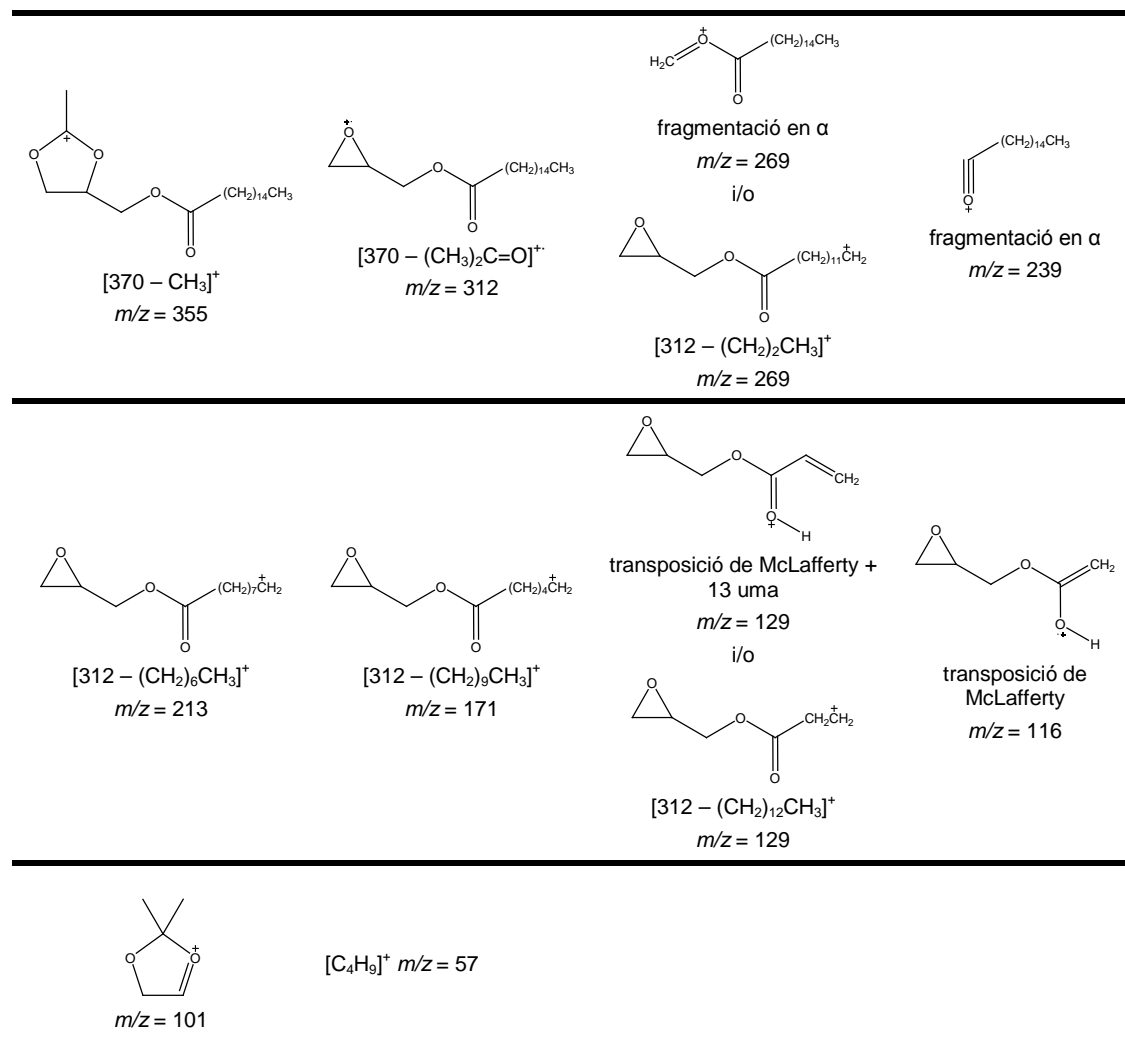


FIGURA 4.11.2. Interpretació dels fragments iònics de l'espectre de masses del *rac*-palmitat de solketil pur.

Els valors obtinguts en la RMN del *rac*-palmitat de solketil pur van ser els següents:

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  0,83-0,91 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,21-1,30 (m, 24H,  $12\text{CH}_2$ ); 1,36 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,43 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,56-1,67 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,30-2,36 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3,70-3,76 (dd, 1H,  $\text{CH}_2$ ); 4,04-4,11 (m, 3H, 1H  $\text{CH}_2$  i 2H  $\text{CH}_2$ ); 4,27-4,35 (m, 1H, CH).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  14,1 (1C,  $\text{CH}_3$ ); 22,7 (1C,  $\text{CH}_2$ ); 24,9 (1C,  $\text{CH}_2$ ); 25,4 (1C,  $\text{CH}_3$ ); 26,7 (1C,  $\text{CH}_3$ ); 29,03-29,7 (10C,  $10\text{CH}_2$ ); 31,9 (1C,  $\text{CH}_2$ ); 34,1 (1C,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ); 64,5 (1C,  $\text{CH}_2\text{OCO}$ ); 66,3 (1C,  $\text{CH}_2$ ); 73,6 (1C, CH); 109,8 (1C, C); 173,6 (1C, CO).

En la figura 4.11.3 es mostra l'espectre de masses del *rac*-palmitat de glicidil, el qual segueix un patró de fragmentació (figura 4.11.4) molt similar al del *rac*-palmitat de solketil.

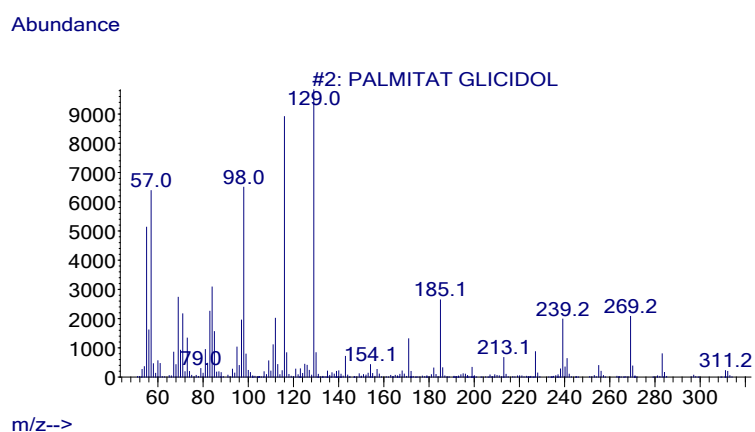


Figura 4.11.3. Espectre de masses del pic del *rac*-palmitat de glicidil pur obtingut a partir de l'esterificació no enantioselectiva del *rac*-glicidol amb l'àcid palmític catalitzada per CAL-B. Condicions de reacció: 1 mmol (256,4 mg) d'àcid palmític, 2 mmol (148,2 mg) de *rac*-glicidol, 20 mg de CAL-B, 3,5 mL de *t*-BuOMe, 40 °C, 1400 rpm i 24 h.



## Resultats i Discussió

En aquest cas tampoc es va detectar l'ió molecular ( $m/z = 312$ ), però va aparèixer  $[M - 1]^+$  ( $m/z = 311$ ). El pic base ( $m/z = 129$ ) podria correspondre a l'ió  $[M - (CH_2)_{12}CH_3]^+$  o al fragment iònic obtingut per transposició de McLafferty + 13 uma.

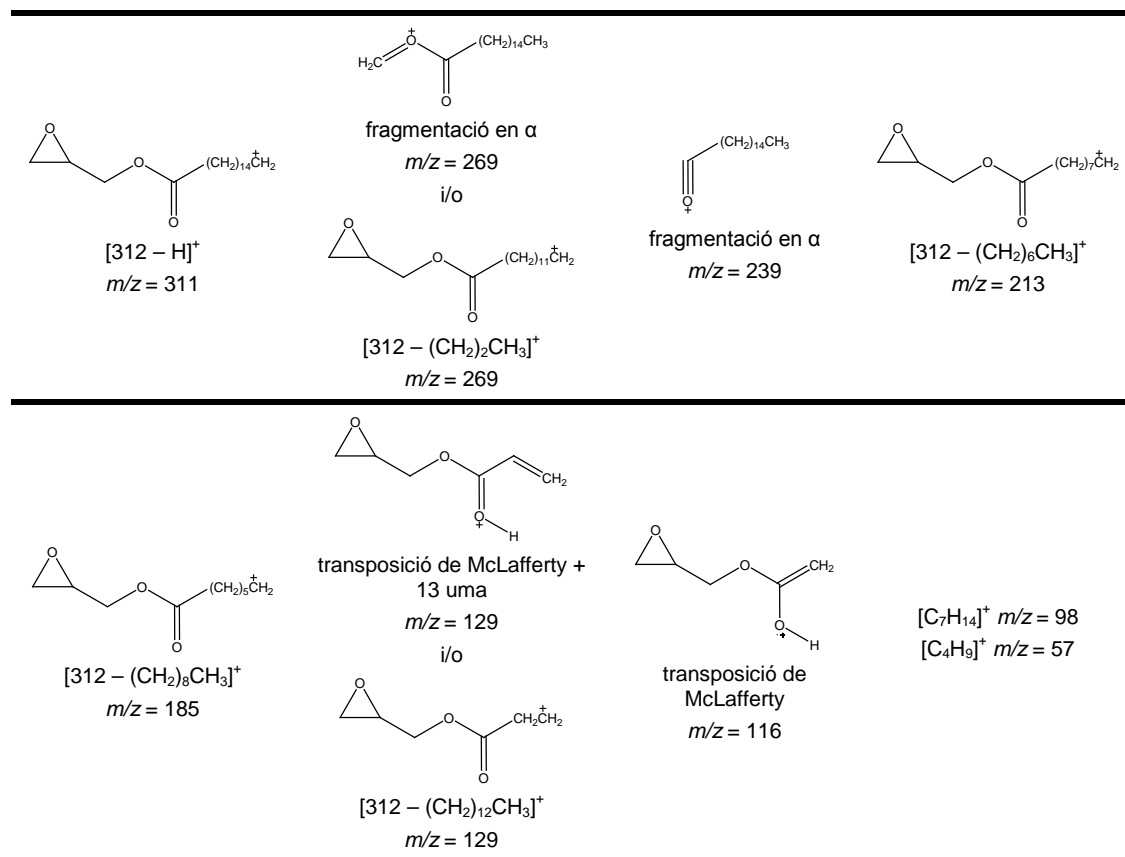


FIGURA 4.11.4. Interpretació dels fragments iònics de l'espectre de masses del *rac*-palmitat de glicidil pur.

Els valors obtinguts en la RMN del *rac*-palmitat de glicidil van ser els següents:

$^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  0,85-0,90 (t, 3H,  $CH_3$ ); 1,23-1,27 (m, 24H,  $12CH_2$ ); 1,57-1,67 (m, 2H,  $CH_2$ ); 2,31-2,37 (t, 2H,  $CH_2$ ); 2,63-2,66 (dd, 1H,  $CH_2$ ); 2,82-2,86 (dd, 1H,  $CH_2$ ); 3,18-3,23 (m, 1H, CH); 3,88-3,94 (dd, 1H,  $CH_2$ ); 4,38-4,43 (dd, 1H,  $CH_2$ ).

$^{13}C$ -RMN ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  14,1 (1C,  $CH_3$ ); 22,7 (1C,  $CH_2$ ); 24,9 (1C,  $CH_2$ ); 29-29,7 (10C,  $10CH_2$ ); 31,9 (1C,  $CH_2$ ); 33,9 (1C,  $CH_2CO$ ); 44,7 (1C,  $CH_2$ ); 49,4 (1C, CH); 64,7 (1C,  $CH_2OCO$ ); 173,6 (1C, CO).

## 4.12. Síntesi de monopalmitina enantioenriquida

### 4.12.1. A partir de l'obertura de l'anell d'oxirà del *rac*-palmitat de glicidil

Una primera aproximació a la síntesi de monopalmitina enantioenriquida es va dur a terme amb el *rac*-palmitat de glicidil. Una vegada assegurada l'estabilitat del substrat, és a dir, que no tingués lloc la hidròlisi espontània de l'èster en les condicions assajades, es van iniciar les reaccions amb els micelis d'*A. niger*, d'*A. tubingensis*, de *P. aurantiogriseum*, de *Penicillium* sp. i d'*A. terreus* crescuts amb òxid d'estirè a pH 3 i 5. Un cop analitzades les mostres, únicament es va observar formació de monopalmitina amb el miceli de *Penicillium* sp. crescut a pH 3, ja que amb la resta de micelis va predominar la hidròlisi parcial dels èsters presents. En el cas de *Penicillium* sp. crescut a pH 3, aquesta hidròlisi va ser del 33% a les 18 h de reacció (taula 4.12.1).

En la figura 4.12.1 es pot veure el cromatograma de gasos de la hidròlisi del grup epòxid del *rac*-palmitat de glicidil catalitzada pel miceli de *Penicillium* sp. crescut a pH 3.

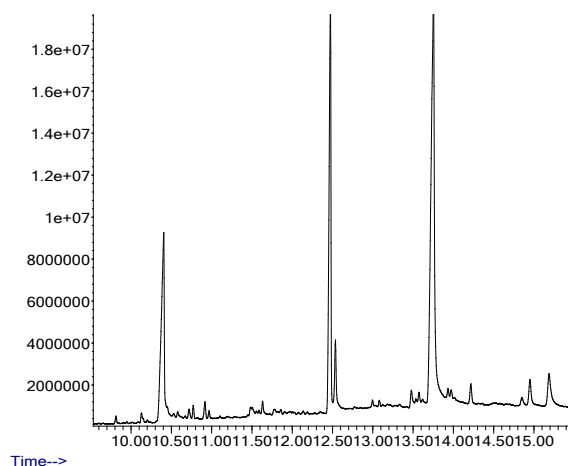


FIGURA 4.12.1. Cromatograma de gasos de la hidròlisi del grup epòxid del *rac*-palmitat de glicidil catalitzada pel miceli de *Penicillium* sp. crescut a pH 3. Condicions de reacció: 980  $\mu$ L PBS (pH 7,4), 20  $\mu$ L d'una solució de *rac*-palmitat de glicidil en DMSO (40 mg/mL), 10 mg de miceli de *Penicillium* sp. crescut a pH 3, 40°C, 1400 rpm i 3 h. Temps de retenció: 10,40 min (àcid palmític); 12,50 min (*rac*-palmitat de glicidil); 13,75 min (monopalmitina).

La presència de monopalmitina es va confirmar amb els fragments iònics del seu espectre de masses (figura 4.12.2):

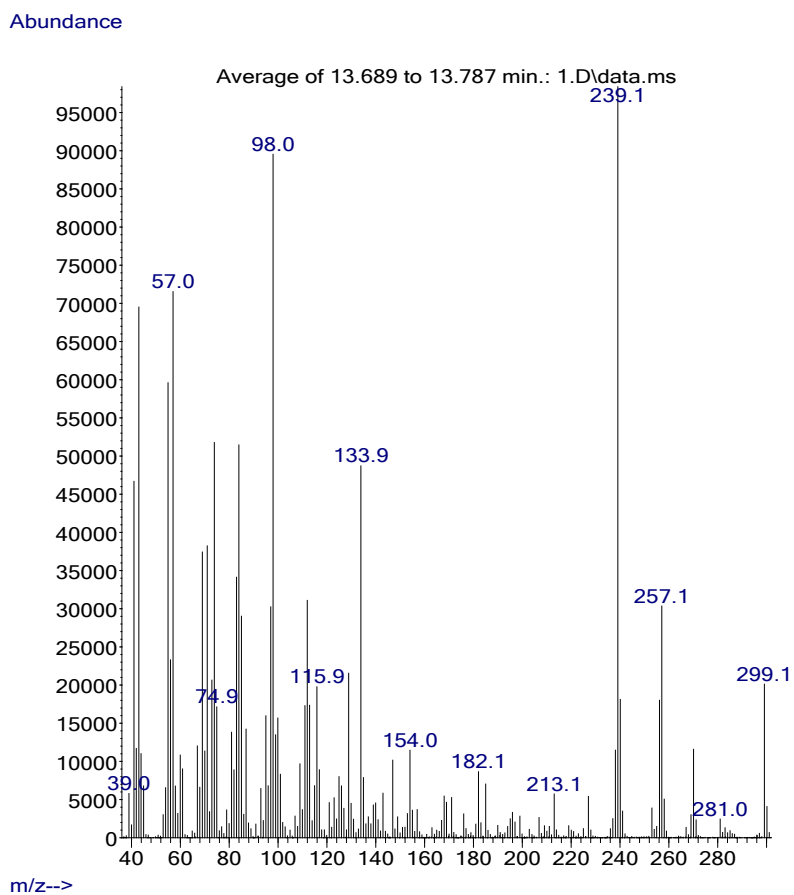


FIGURA 4.12.2. Espectre de masses del pic de la monopalmitina obtinguda a partir de la hidròlisi del *rac*-palmitat de glicidil catalitzada pel miceli de *Penicillium* sp. crescut a pH 3. Condicions de reacció: 980  $\mu$ L PBS (pH 7,4), 20  $\mu$ L d'una solució de *rac*-palmitat de glicidil en DMSO (40 mg/mL), 10 mg de miceli de *Penicillium* sp. crescut a pH 3, 40°C, 1400 rpm i 3 h.

L'ió molecular ( $m/z = 330$ ) no es detecta i predomina la fisió dels enllaços units al carboni que porta l'OH (fragmentació en  $\alpha$ ). Quan es trenca l'enllaç C-C entre els dos oxigens, la càrrega roman en el fragment de més massa, resultant l'ió  $[M - 31]^+$  ( $m/z = 299$ ). També es produeix l'eliminació d'aigua a partir d'alguns fragments. Apareixen els fragments iònics  $[C_nH_{2n+1}]^+$  ( $m/z = 57$ ) i  $[C_nH_{2n}]^+$  ( $m/z = 98$ ) dels grups alquil units a l'oxigen de l'èster (figura 4.12.3).

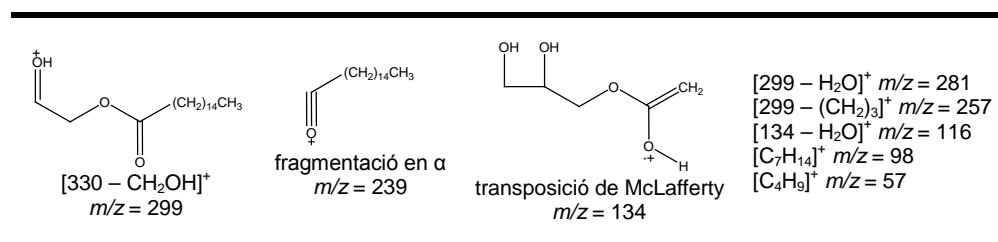


FIGURA 4.12.3. Interpretació dels fragments iònics dels espectres de masses de la monopalmitina.

A causa de la dificultat de seguir cromatogràficament l'enantioselectivitat de la reacció, es va estudiar el progrés de la hidròlisi del (*R*)- i del (*S*)-palmitat de glicidil.

La taula 4.12.1 mostra les proporcions d'àcid palmític, palmitat de glicidil i monopalmitina quan el miceli de *Penicillium* sp. crescut a pH 3 es va utilitzar com a biocatalitzador en la hidròlisi del (*R*)- i del (*S*)-palmitat de glicidil. A les 3 h de reacció es va observar un 48% i un 46% de monopalmitina provinent del (*R*) i del (*S*)-palmitat de glicidil, respectivament; valors els quals van resultar pràcticament iguals a les 6 h de reacció, amb un creixement evident de l'àcid palmític, confirmant, per tant, el procés d'hidròlisi de l'enllaç èster que acompanya la hidròlisi del grup epòxid.

## Resultats i Discussió

TAULA 4.12.1. Hidròlisi del grup epòxid del *rac*- del (*R*)- i del (*S*)-palmitat de glicidil catalitzada pel miceli de *Penicillium* sp. crescut a pH 3

Substrat	t (h)	Àcid palmític (% <sup>a</sup> )	Palmitat de glicidil (% <sup>a</sup> )	Monopalmitina (% <sup>a</sup> )
<i>rac</i> -palmitat de glicidil	3	19,7	26,6	53,7
<i>rac</i> -palmitat de glicidil	6	27,5	16,1	56,4
<i>rac</i> -palmitat de glicidil	18	33,4	3,7	63,0
( <i>R</i> )-palmitat de glicidil	3	37,2	14,7	48,1
( <i>R</i> )-palmitat de glicidil	6	42,0	9,6	48,7
( <i>S</i> )-palmitat de glicidil	3	36,4	17,2	46,4
( <i>S</i> )-palmitat de glicidil	6	42,6	8,7	48,7

<sup>a</sup>% producte i =  $(A_i / \sum A_i) \times 100$  ( $A_i$ : àrea del pic cromatogràfic de cada producte).

Per poder confirmar que la reacció amb el miceli de *Penicillium* sp. crescut a pH 3 no presentava preferència per cap dels enantiòmers del *rac*-palmitat de glicidil, es va procedir a la hidròlisi completa, utilitzant lipasa comercial de *R. miehei*, de l'èster no transformat inicialment pel miceli de *Penicillium* sp. Les àrees cromatogràfiques del (*R*)- i del (*S*)-glicidol van ser del 48% i 52%, respectivament, indicant una enantiopreferència molt baixa. Així, si aquestes àrees eren pràcticament iguals, també ho haurien de ser les del (*R*)- i del (*S*)-palmitat de glicidil i, per tant, les de la (*R*)- i de la (*S*)-monopalmitina obtinguda durant la hidròlisi parcial del *rac*-palmitat de glicidil.

En la figura 4.12.4 es pot veure aquest procés esquematitzat.

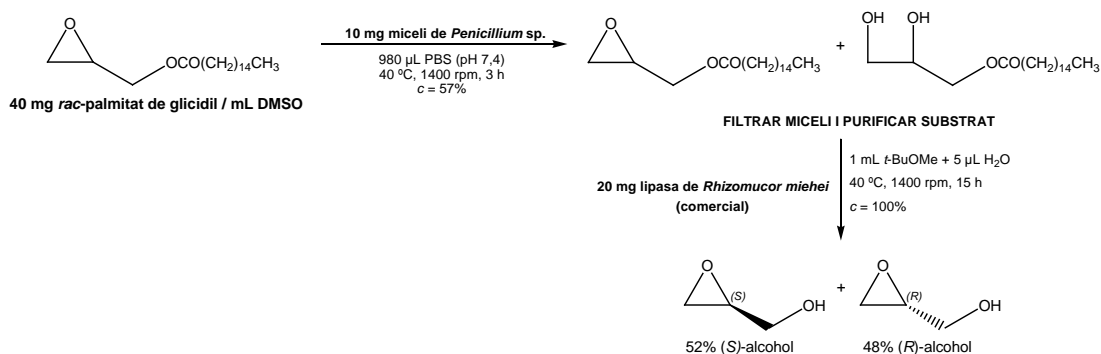


FIGURA 4.12.4. Hidròlisi completa, catalitzada per la lipasa comercial de *R. miehei*, del palmitat de glicidil que no va reaccionar durant la hidròlisi del grup epòxid del *rac*-palmitat de glicidil catalitzada pel miceli de *Penicillium* sp.

Tenint en compte que les EHs de *Penicillium* sp. gairebé no presentaven preferència per cap dels enantiòmers del *rac*-palmitat de glicidil i la progressiva aparició d'àcid palmític, ens vam plantejar una via alternativa basada en la hidròlisi enantiopreferent d'èsters precursors de la monopalmitina.

#### 4.12.2. A partir de la hidròlisi enantiopreferent d'èsters precursors de la monopalmitina

Diferents investigadors han basat els seus treballs en la resolució cinètica d'èsters de solketil i de glicidil racèmics catalitzada per microorganismes; però a diferència de la present tesi, cap d'aquestes reaccions ha estat realitzada amb àcid palmític, sinó amb àcids de cadena més curta i, a més, la majoria d'elles han tingut lloc en solucions amortidores amb diferents continguts de codissolvent.

Bosetti *et al.* (1994) van realitzar la hidròlisi del *rac*-benzoat de solketil catalitzada per la lipasa de *P. cepacia* en una solució amortidora de pH 7 amb un 25% (v/v) de DMSO. La reacció es va aturar quan es va assolir una  $c = 70\%$  i van obtenir el (S)-benzoat de solketil amb un 97% ee.

Molinari *et al.* (2004) van aconseguir el (R)-acetat de solketil amb un 69% ee ( $c = 57\%$ ) i Dröge *et al.* (2005), el (R)-heptanoat de solketil amb un >99,9% ee.

## Resultats i Discussió

Altres autors (Mezzetti, Keith i Kazlauskas, 2003; Molinari *et al.*, 2005; Romano *et al.*, 2005) van obtenir èsters de solketil amb excessos enantiomèrics més baixos.

Palomo *et al.* (2006) van obtenir el (S)-butirat de glicidil amb un 91% ee ( $c = 64\%$ ) mitjançant la resolució hidrolítica de l'èster racèmic catalitzada per CAL-B. Molinari *et al.* (2005), Pregnolato *et al.* (2001) i Yu *et al.* (2007) van realitzar la hidròlisi del *rac*-butirat de glicidil catalitzada per la lipasa pancreàtica porcina C8 i van obtenir el (R)-butirat de glicidil amb un 96% ee ( $c = 55\%$ ), un 96% ee ( $c = 55\%$ ) i un 98% ee ( $c = 60\%$ ), respectivament.

El mètode convencional per a la resolució cinètica d'un èster és la hidròlisi enzimàtica en un sistema aquós. En aquest medi, a causa de l'elevada concentració d'aigua (55,6 M), les reaccions tenen lloc fins a completar-se, però la solubilitat del substrat és generalment baixa i en alguns casos, és difícil aïllar el producte de la reacció. Un medi alternatiu és un sistema bifàsic orgànic-aquós, però l'àcid i l'alcohol generats durant la hidròlisi d'un èster poden acumular-se en la interfase on es troba la lipasa, provocant que l'àcid competeixi amb l'èster per l'enzim o que l'alcohol competeixi amb l'aigua per l'acil-enzim i es formi l'èster una altra vegada (figura 4.12.5). En tots dos casos, el resultat és una disminució de l'excés enantiomèric del producte.

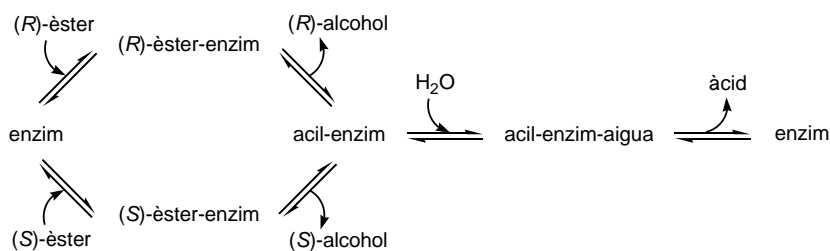


FIGURA 4.12.5. Hidròlisi d'un èster racèmic catalitzada per lipases en un sistema bifàsic orgànic-aquós (Tol, Jongejan i Duine, 1995).

La reducció del contingut d'aigua fins a un punt que la reacció es consideri una hidròlisi en un dissolvent orgànic, a més d'augmentar la solubilitat dels substrats hidrofòbics, pot millorar l'excés enantiomèric del producte (Tsuzuki, Ue i Nagao, 2003). En els sistemes orgànics anhidres (amb un contingut d'aigua  $\leq 1\%$ ), els millors dissolvents són els més hidrofòbics ja que els menys hidrofòbics poden eliminar la capa d'aigua essencial que envolta l'enzim, produint la seva inactivació (Camacho *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2007).

En la resolució del *rac*-palmitat de solketil i del *rac*-palmitat de glicidil es va avaluar la influència del medi de reacció realitzant la resolució cinètica hidrolítica dels èsters en un dissolvent poc soluble amb l'aigua —el *t*-BuOMe— (2,6% a 20 °C) i en un dissolvent força miscible amb l'aigua —el *t*-BuOH. Inicialment, es va comprovar que no tingués lloc la hidròlisi espontània dels èsters sense biocatalitzadors.

En la taula 4.12.2 es mostren els valors de l'excés enantiomèric de l'alcohol obtingut durant la hidròlisi de 0,5 mL (1 mL\*) de solució 27 mM de *rac*-palmitat de solketil i 32 mM de *rac*-palmitat de glicidil, catalitzada per diferents biocatalitzadors (10 mg de miceli liofilitzat i hidratat amb 5  $\mu$ L d'aigua destil·lada). Les reaccions es van realitzar en *t*-BuOMe i en *t*-BuOH a 40 °C i 1400 rpm. Els temps de reacció (t) corresponen a les conversions més properes al 50%.



TAULA 4.12.2. Hidròlisi del *rac*-palmitat de solketil i del *rac*-palmitat de glicidil en *t*-BuOMe i en *t*-BuOH

Fong	<i>rac</i> -palmitat de solketil en <i>t</i> -BuOMe			<i>rac</i> -palmitat de solketil en <i>t</i> -BuOH			<i>rac</i> -palmitat de glicidil en <i>t</i> -BuOMe			<i>rac</i> -palmitat de glicidil en <i>t</i> -BuOH		
	<i>t</i>	<i>ee<sub>p</sub><sup>a</sup></i> (%) / <i>c. a.</i> <sup>b</sup>	( <i>c</i> <sup>c</sup> ± <i>SD</i> <sup>d</sup> )%	<i>t</i>	<i>ee<sub>p</sub><sup>a</sup></i> (%) / <i>c. a.</i> <sup>b</sup>	( <i>c</i> <sup>c</sup> ± <i>SD</i> <sup>d</sup> )%	<i>t</i>	<i>ee<sub>p</sub><sup>a</sup></i> (%) / <i>c. a.</i> <sup>b</sup>	( <i>c</i> <sup>c</sup> ± <i>SD</i> <sup>d</sup> )%	<i>t</i>	<i>ee<sub>p</sub><sup>a</sup></i> (%) / <i>c. a.</i> <sup>b</sup>	( <i>c</i> <sup>c</sup> ± <i>SD</i> <sup>d</sup> )%
1	5 min*	44,3/(R)	37,5 ± 0,2	15 min	4,1/(S)	40,7 ± 0,4	5 min*	46,5/(R)	21,6 ± 0,7	5 min*	48,1/(R)	2,8 ± 0,9
2	15 min	36,6/(R)	42,5 ± 0,9	15 min	5,8/(S)	46,8 ± 0,5	5 min	56,9/(R)	35,0 ± 0,1	5 min	40,0/(R)	32,2 ± 0,2
3	5 min	55,1/(R)	54,9 ± 1,1	5 min	22,5/(R)	35,5 ± 0,1	5 min*	42,3/(R)	31,9 ± 0,8	5 min*	40,2/(R)	19,3 ± 0,3
4	6 h	40,2/(R)	32,9 ± 0,5	6 h	22,7/(R)	33,0 ± 0,3	2 h	29,5/(R)	44,5 ± 0,6	2 h	43,6/(R)	35,7 ± 0,5
5 ( <i>Penicillium</i> sp.)	15 min	30,6/(R)	42,0 ± 0,4	15 min	31,9/(R)	46,3 ± 0,7	5 min	50,3/(R)	45,6 ± 1,5	5 min	27,3/(R)	50,5 ± 1,0
6	15 min	29,1/(R)	51,8 ± 0,7	15 min	4,7/(R)	30,9 ± 1,3	5 min*	43,4/(R)	21,0 ± 0,4	5 min*	22,7/(R)	24,3 ± 0,9
7	6 h	28,1/(R)	20,7 ± 0,6	6 h	58,6/(R)	24,2 ± 0,6	2 h	20,2/(R)	10,8 ± 0,5	4 h	46,0/(R)	24,5 ± 0,4
8	15 min	13,8/(R)	50,0 ± 0,3	15 min	15,7/(R)	40,2 ± 0,8	5 min*	40,3/(R)	60,0 ± 0,3	5 min	22,9/(R)	85,0 ± 0,3
9	5 min	50,0/(R)	40,5 ± 0,1	5 min	25,2/(R)	35,3 ± 0,1	5 min*	42,9/(R)	17,1 ± 0,7	5 min*	37,2/(R)	3,7 ± 0,2
10	15 min	30,7/(S)	37,0 ± 1,2	15 min	21,4/(S)	38,7 ± 0,6	15 min	77,0/(R)	37,1 ± 0,8	15 min	71,6/(R)	49,7 ± 0,5
11	15 min	23,9/(R)	52,4 ± 0,3	15 min	9,9/(R)	36,4 ± 0,8	5 min*	43,0/(R)	15,4 ± 1,2	5 min*	17,9/(R)	24,4 ± 0,6
12 ( <i>A. terreus</i> )	15 min	23,8/(R)	52,1 ± 0,7	15 min	4,7/(R)	43,7 ± 0,2	5 min*	36,2/(R)	32,8 ± 0,5	5 min*	27,5/(R)	24,2 ± 0,1
13	15 min	24,1/(R)	48,2 ± 0,4	15 min	7,9/(R)	40,7 ± 0,8	5 min*	42,2/(R)	5,3 ± 0,6	5 min*	27,3/(R)	8,2 ± 0,4
14	15 min	28,3/(R)	45,4 ± 0,5	15 min	21,5/(R)	34,9 ± 0,5	5 min*	26,5/(R)	31,8 ± 0,3	5 min*	25,5/(R)	16,9 ± 0,1
15	15 min	25,4/(R)	44,7 ± 0,8	15 min	1,1/(R)	22,9 ± 0,9	5 min*	31,2/(R)	44,8 ± 0,2	5 min*	33,3/(R)	17,9 ± 0,5
16	6 h	36,8/(R)	40,0 ± 1,5	6 h	4,2/(R)	27,4 ± 0,4	2 h	57,3/(R)	33,2 ± 0,6	4 h	46,3/(R)	33,8 ± 0,2
17 ( <i>P. aurantiogriseum</i> )	2 h	14,3/(R)	42,0 ± 0,4	6 h	1,0/(R)	44,3 ± 0,3	2 h	63,0/(R)	29,1 ± 0,3	4 h	44,3/(R)	30,2 ± 0,6
18	15 min	21,1/(R)	50,2 ± 0,6	15 min	11,5/(R)	52,0 ± 0,1	5 min*	38,6/(R)	36,0 ± 0,6	5 min*	21,8/(R)	25,1 ± 0,7
19	24 h	73,1/(S)	42,4 ± 0,1	6 h	12,4/(S)	21,1 ± 0,5	2 h	21,0/(R)	31,3 ± 0,8	4 h	20,4/(R)	35,0 ± 0,1
20 ( <i>A. niger</i> )	2 h	19,4/(R)	60,8 ± 0,7	2 h	20,0/(R)	49,2 ± 0,5	5 min	60,5/(R)	28,9 ± 1,0	15 min	58,3/(R)	45,2 ± 0,4
21 ( <i>A. tubingensis</i> )	15 min	24,1/(R)	29,0 ± 0,4	15 min	24,8/(R)	41,2 ± 0,4	15 min	63,2/(R)	30,4 ± 0,4	15 min	32,1/(R)	39,1 ± 1,3
22 ( <i>R. oryzae</i> )	5 min*	49,6/(S)	45,2 ± 1,0	5 min*	39,7/(S)	61 ± 0,9	5 min*	42,3/(R)	>80 ± 0,6	5 min*	37,0/(R)	66,4 ± 0,6

<sup>a</sup>*ee<sub>p</sub>*: excés enantiomèric del producte, <sup>b</sup>*c. a.*: configuració absoluta, <sup>c</sup>*c*: conversió =  $((C_i - C_j)/C_i \times 100)$ , <sup>d</sup>*SD*: desviació estàndard.

Quant al palmitat de solketil, el millor valor d' $ee_p$  es va aconseguir amb el miceli del fong 19 en *t*-BuOMe amb preferència pel (S)-èster. Pel que fa al *rac*-palmitat de glicidil, tots els biocatalitzadors van mostrar preferència pel (R)-èster. Altres investigadors també han observat preferència pel (R)-enantiòmer en la resolució d'èsters de glicidil amb lipases (Mateos *et al.*, 2007; Palomo *et al.*, 2006). Els millors valors d' $ee_p$  es van obtenir amb el miceli del fong 10, tant en *t*-BuOMe com en *t*-BuOH; però, per raons pràctiques, es va escollir el primer dels dissolvents per continuar els assajos. En general, la hidrofobicitat del dissolvent no va afectar l' $ee_p$ , la qual cosa està d'acord amb altres estudis (Bosetti *et al.*, 1994; Carrea, Ottolina i Riva, 1995; Overbeeke, Jongejan i Heijnen, 2000).

Els fongs 10 i 19 es van identificar com *Mucor fragilis* i *Talaromyces minioluteus* (*Penicillium minioluteus*), respectivament. En la taula A.1 (apèndix A) es poden consultar els resultats obtinguts en la seva identificació amb tècniques de biologia molecular.

En les figures 4.12.6 i 4.12.7 es poden veure representades les reaccions d'hidròlisi escollides per realitzar més endavant el seu escalat.

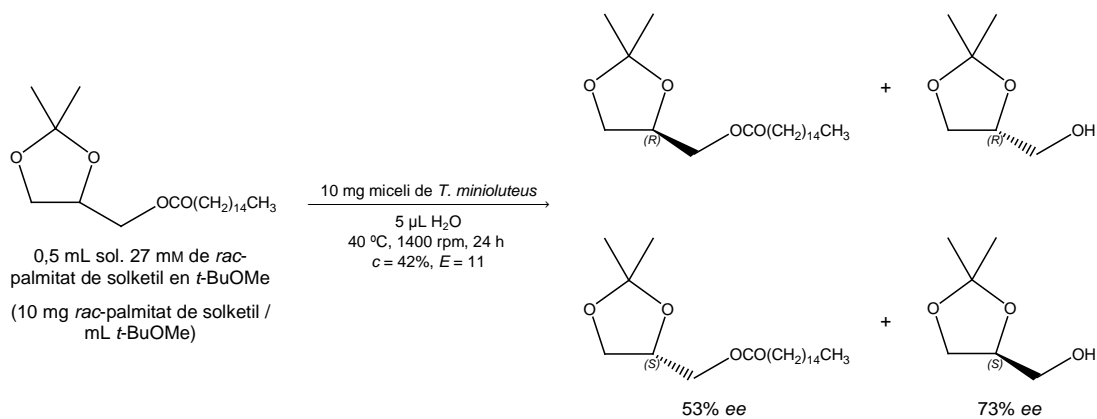


FIGURA 4.12.6. Hidròlisi del *rac*-palmitat de solketal catalitzada pel miceli de *T. minioluteus*. Condicions de reacció: 0,5 mL de solució 27 mM de *rac*-palmitat de solketal en *t*-BuOMe, 5 µL d'H<sub>2</sub>O, 10 mg de miceli de *T. minioluteus*, 40 °C, 1400 rpm i 24 h.

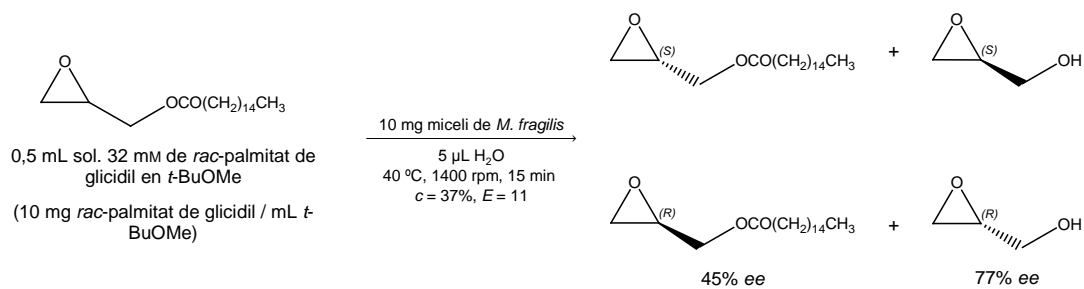


FIGURA 4.12.7. Hidròlisi del *rac*-palmitat de glicidil catalitzada pel miceli de *M. fragilis*. Condicions de reacció: 0,5 mL de solució 32 mM de *rac*-palmitat de glicidil en *t*-BuOMe, 5 µL d'H<sub>2</sub>O, 10 mg de miceli de *M. fragilis*, 40 °C, 1400 rpm i 15 min.

Quan es va realitzar l'escalat de la hidròlisi del *rac*-palmitat de solketil, la conversió va disminuir amb el temps (10% a les 4 h i 7% a les 24 h). Com es pot veure en la figura 4.12.8, a causa de la baixa conversió, el (*S*)-èster es va aconseguir amb un excés enantiomèric molt baix (4% ee, valor calculat amb l'equació 3.2.9).

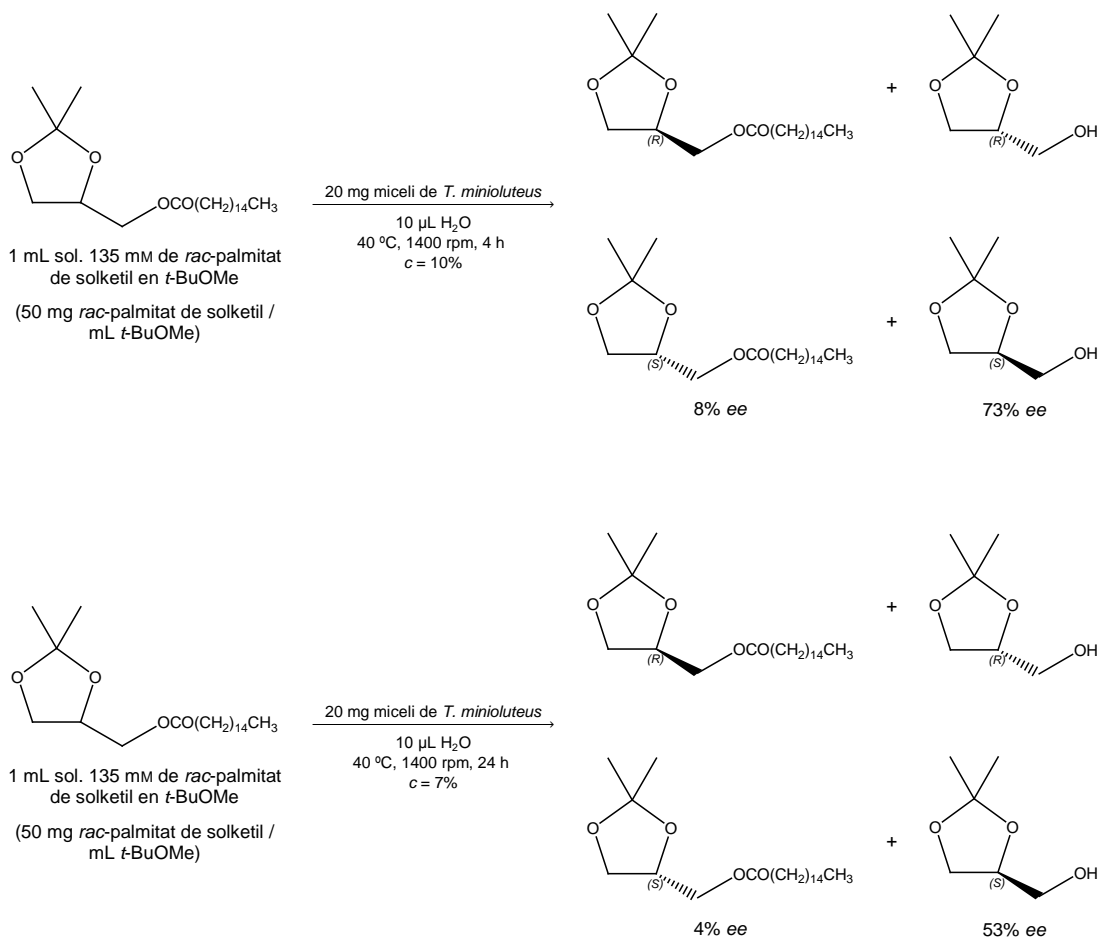


FIGURA 4.12.8. Escalat de la hidròlisi del *rac*-palmitat de solketil catalitzada pel miceli de *T. minioluteus*. Condicions de reacció: 1 mL de solució 135 mM de *rac*-palmitat de solketil en *t*-BuOMe, 10  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O, 20 mg de miceli de *T. minioluteus*, 40 °C, 1400 rpm i, 4 h i 24 h.

En l'escalat de la hidròlisi del *rac*-palmitat de glicidil es va produir un augment de la conversió amb el temps (31% als 15 min i 49% a les 2 h). Com es pot veure en la figura 4.12.9, es va aconseguir el (*R*)-èster amb un excés enantiomèric del 70% (valor calculat a partir de l'equació 3.2.9). Per tant, tenint en compte la dificultat d'aconseguir un  $ee_S$  prou elevat amb el palmitat de solketil per obtenir posteriorment monopalmitina enantioenriquida, es va decidir continuar únicament amb el palmitat de glicidil.

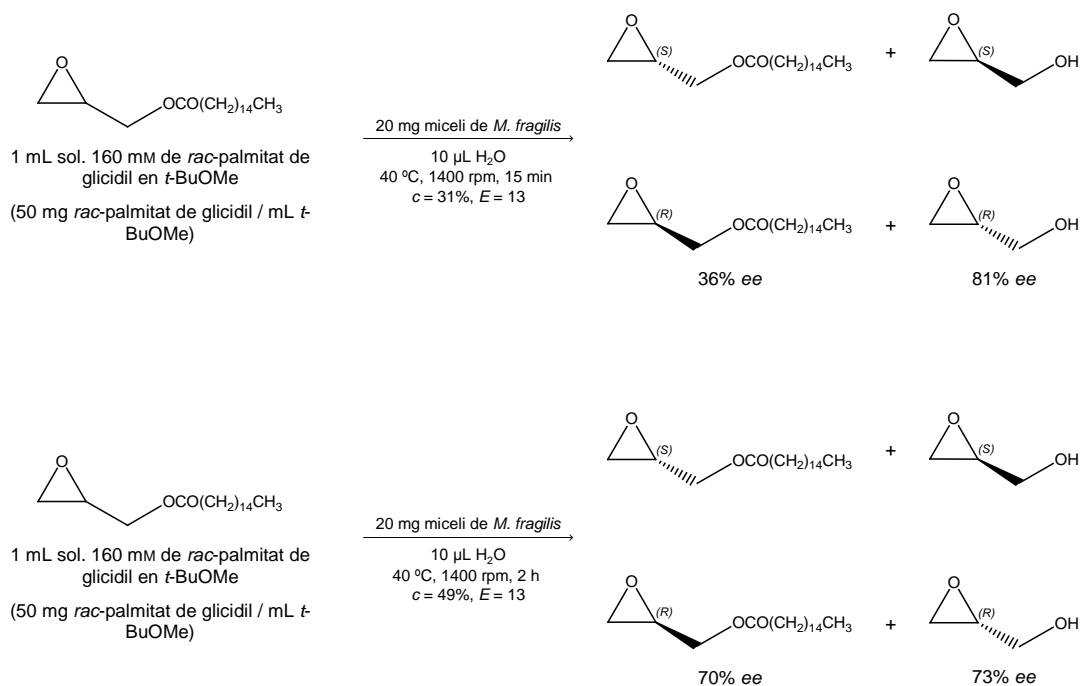


FIGURA 4.12.9. Escalat de la hidròlisi del *rac*-palmitat de glicidil catalitzada pel miceli de *M. fragilis*. Condicions de reacció: 1 mL de solució 160 mM de *rac*-palmitat de glicidil en *t*-BuOMe, 10  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O, 20 mg de miceli de *M. fragilis*, 40 °C, 1400 rpm i, 15 min i 2 h.

### 4.12.3. A partir de l'obertura de l'anell d'oxirà del palmitat de glicidil enantioenriquit

Per transformar en monopalmitina el palmitat de glicidil obtingut en la hidròlisi catalitzada pel miceli de *M. fragilis* es va utilitzar el miceli de *Penicillium* sp. crescut a pH 3. Com es pretenia transformar tot el palmitat de glicidil enantioenriquit en monopalmitina, la conversió del substrat es va portar fins al 100%, no aconseguint recuperar monopalmitina a causa de la hidròlisi total del grup èster. En la figura 4.12.10 es pot veure un esquema de tot el procés.

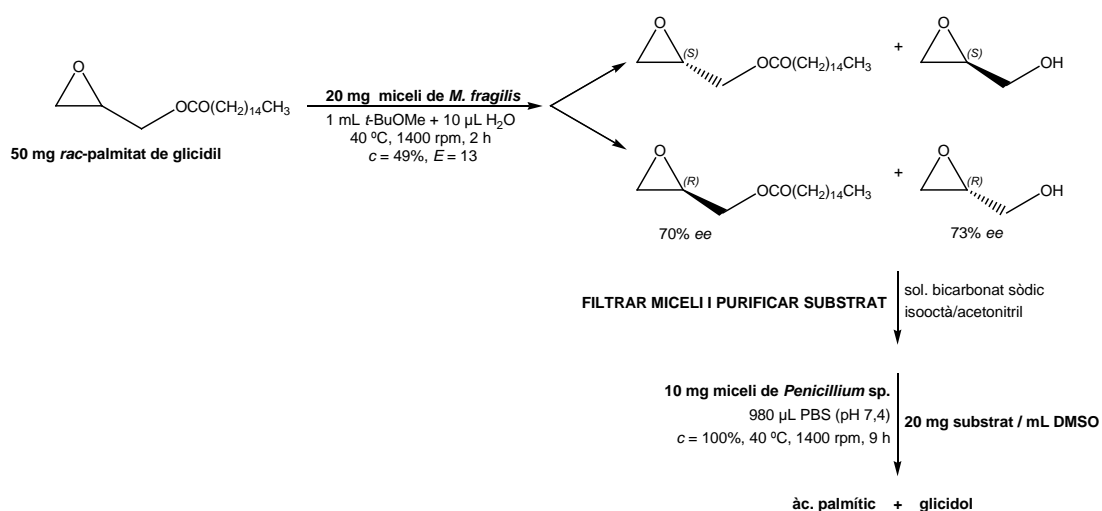


FIGURA 4.12.10. Hidròlisi del grup epòxid del palmitat de glicidil enantioenriquit catalitzada pel miceli de *Penicillium* sp. crescut a pH 3. Condicions de reacció: 980 µL PBS (pH 7,4), 20 mg de palmitat de glicidil enantioenriquit / mL DMSO, 10 mg de miceli de *Penicillium* sp. crescut a pH 3, 40°C, 1400 rpm i 9 h.

Així com la producció de MAGs utilitzant lipases, ja sigui a través de la hidròlisi de TAGs (Bornscheuer, 2000; Holmberg i Osterberg, 1988; Plou *et al.*, 1996), l'esterificació del glicerol amb àcids grassos (Andrews *et al.*, 1988; Bornscheuer, 2000; Deng, Nakano i Iwasaki, 2007; Huang *et al.*, 2009; Macrae, Visicchio i Lanot, 1998; Monteiro, Nascimento i Ninow, 2003; Weiss, 1990; Yamaguchi i Mase, 1991), l'esterificació del glicerol immobilitzat amb àcids grassos (Bellot *et al.*, 2001; Berger, Laumen i Schneider, 1992; Castillo *et al.*, 1997), l'esterificació del glicerol amb àcids grassos a baixa temperatura (Nagao *et al.*, 2005; Pinsiroadom *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005; Yamaguchi i Mase, 1991), l'esterificació del glicerol amb anhídrids d'àcid (Batovska *et al.*, 2004; Xu, Kato i Asano, 2001), l'esterificació de derivats del glicerol (Bornscheuer, 1995; Hess *et al.*, 1995; Okazaki *et al.*, 1997; Steffen *et al.*, 1992, 1995; Romano *et al.*, 2006), la gliceròlisi de TAGs (McNeill, Shimizu i Yamane, 1990, 1991; Pinsiroadom *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2002, 2003), la gliceròlisi d'èsters etílics i vinílics d'àcids grassos (Berger i Schneider, 1992; Kato, Fujiwara i Asano, 2000; Rosu *et al.*, 1998; Waldinger i Schneider, 1996), la transesterificació de derivats del glicerol (Bornscheuer, Gaziola i Schmid, 1996; Cardenas *et al.*, 2001; Kawanami *et al.*, 2005; Lozano *et al.*, 2004; Sakai, 2004; Vanttinen i Kanerva, 1997) i l'etanòlisi de TAGs (Pfeffer *et al.*, 2007), ha estat activament estudiada des de 1990, no s'han trobat referències sobre la producció de MAGs amb EHs i molt menys a partir d'èsters de glicidil.

En canvi, sí són freqüents les reaccions químiques d'obtenció de MAGs a partir de derivats del glicerol. S'han aconseguit bons resultats utilitzant com a catalitzadors amines terciàries, sals d'amoni quaternari, alquil guanidines, alcòxids metàl·lics (entre els quals destaca el tetrakisopropòxid de titani), clorur fèrric suportat sobre polímers, metal·loporfirines, acetat o etanoat de crom (III), complexos de salen de cobalt (III) quirals i materials mesoporosos ordenats (Bukowska i Bukowski, 2002; Bukowski, 2004; Hérault *et al.*, 2002; Schaus *et al.*, 2002).

Schaus *et al.* (2002) van realitzar la hidròlisi del *rac*-butirat de glicidil catalitzada pel (*R,R*)-salen Co(III)(OAc) i van obtenir el (*S*)-èster amb un >99% ee i el (*R*)-diol amb un 43% ee. Cauvel, Renard i Brunel (1997) van dur a terme la preparació de monolaurines a través de l'addició d'àcid làuric al *rac*-glicidol en toluè catalitzada per MCM-41 funcionalitzat amb grups amino primaris i terciaris, essent més actius i selectius els primers amb rendiments propers al 90%. En la síntesi d'aquests materials és necessària la sililació dels grups silanol lliures per evitar la reacció

d'aquests amb el glicidol i, per tant, un menor rendiment de MAGs (la selectivitat augmenta quan no queden grups silanol lliures). Stamatov i Stawinski (2005a, 2005b, 2007) van realitzar la síntesi de *sn*-2-MAGs a través de l'obertura regioselectiva de l'anell d'oxirà de diferents èsters de glicidil amb anhídrid trifluoroacètic. L'ió trifluoroacetat va atacar el carboni primari de l'epòxid. També els mateixos autors van realitzar un procés similar per a la síntesi de *sn*-1(3)-MAGs. Lin, Chuah i Jaenicke (1999) van obtenir monolaurines amb rendiments del 80-95% utilitzant MCM-41 funcionalitzat amb grups piperidina, aminopropil i guanidina. Mouloungui *et al.* (2009) van dur a terme la condensació del *rac*-glicidol amb l'àcid oleic en medi aquós a 70 °C, en presència d'una resina de bescanvi aniònic com a catalitzador i van aconseguir la *sn*-1(3)-monooleïna amb un rendiment del 97%. Burgos, Ayer i Johnson (1987) van realitzar l'obertura regioselectiva del (S)-glicidol amb l'àcid esteàric en presència de tetrakisopropòxid de titani a 0 °C i van obtenir (S)-monoestearina. Stamatov i Stawinski (2007) van aconseguir l'obertura regioselectiva del (*R*)- i del (S)-glicidol amb l'àcid oleic en presència d'anhídrid trifluoroacètic.

Es pot dir, doncs, que la síntesi de monopalmitina enantioenriquida a partir de l'obertura del cicle amb EHs del palmitat de glicidil enantioenriquit, tot i que no s'ha acabat d'aconseguir durant el desenvolupament d'aquesta tesi, esdevé una alternativa de gran interès quan es volen obtenir MAGs enantiopurs (Kato, Fujiwara i Asano, 2000) i, per tant, un camp en el qual encara queda molt per investigar.





## **5. CONCLUSIONS**

---



- 1) Durant l'etapa d'aïllament de fongs a partir de pinyola i d'oliassa es van aconseguir 19 soques fúngiques, les quals, junt amb *A. niger*, *A. tubingensis* i *R. oryzae*, es van utilitzar com a biocatalitzadors. Durant l'avaluació de l'activitat epòxid-hidrolàsica, utilitzant el *rac*-fenil glicidil èter com a substrat, els micelis dels fongs 5 (*Penicillium* sp.), 12 (*A. terreus*), 17 (*P. aurantiogriseum*), 20 (*A. niger*) i 21 (*A. tubingensis*) van proporcionar rendiments de diol superiors al 20%. Amb els brous de cultiu, els rendiments de diol van ser inferiors que amb els micelis.
- 2) L'addició d'òxid d'estirè en el medi de cultiu va tenir un efecte significatiu en la producció de biomassa i en l'activitat epòxid-hidrolàsica. La seva addició 24 h abans d'afegir l'inòcul va produir augments del rendiment de diol que van oscil·lar entre el 4% i el 31% respecte el control. No obstant això, el creixement d'algunes de les floridures es va veure afectat; com és el cas de *Penicillium* sp. i de *P. aurantiogriseum*.
- 3) No es van observar diferències significatives entre les funcions de calibratge sense la matriu miceli i les funcions de calibratge amb la matriu miceli i extracció prèvia a l'addició de diol. Per tant, els components de la matriu aportats durant el procés d'extracció no van afectar la resposta.
- 4) Es van observar diferències significatives entre les funcions de calibratge amb la matriu miceli i extracció posterior o prèvia a l'addició de diol ja que una part d'aquest va quedar retinguda en la matriu, afectant la resposta.
- 5) Els intervals de tolerància dels valors mitjans de recuperació del 3-fenoxi-1,2-propandiòl es van situar dins dels límits d'acceptació fixats, cofirmant així, que les funcions de calibratge amb la matriu miceli i extracció posterior a l'addició de diol podien compensar l'efecte causat per la retenció de diol en els micelis.
- 6) Els resultats de les anàlisis del 3-fenoxi-1,2-propandiòl per HPLC-UV i espectrofotometria UV-vis es van considerar equivalents.

## Conclusions

---

- 7) Els excessos enantiomèrics del (*R*)- i del (*S*)-3-benziloxi-1,2-propandiol assolits amb els micelis de *P. aurantiogriseum* i d'*A. terreus*, respectivament, són fins al moment, els valors més alts aconseguits amb EHS d'origen fúngic. Els micelis d'*A. niger* i d'*A. tubingensis* poden resultar útils com a biocatalitzadors en l'obtenció del (*S*)-3-fenoxi-1,2-propandiol.
- 8) La síntesi del *rac*-palmitat de solketil catalitzada per la lipasa B de *C. antarctica* va tenir lloc amb un rendiment del 90% a 60 °C i sense dissolvent. La del *rac*-palmitat de glicidil, en canvi, amb un rendiment del 85,4% a 40 °C i en *t*-BuOMe.
- 9) La hidròlisi del *rac*-palmitat de solketil catalitzada pel miceli de *T. minioluteus* va permetre obtenir el (*S*)-solketal i el (*S*)-palmitat de solketil amb un excés enantiomèric del 73% i del 53%, respectivament. Durant el seu escalat, no es va aconseguir el substrat amb un excés enantiomèric prou elevat per obtenir posteriorment monopalmitina enantioenriquida.
- 10) La hidròlisi del *rac*-palmitat de glicidil, catalitzada pel miceli de *M. fragilis*, va proporcionar el (*R*)-glicidol i el (*R*)-palmitat de glicidil amb un excés enantiomèric del 77% i del 45%, respectivament. Amb l'escalat de la reacció i una conversió del 49%, es va aconseguir el (*R*)-alcohol i el (*R*)-èster amb un excés enantiomèric del 73% i del 70%, respectivament.
- 11) A partir de la hidròlisi del grup epòxid del palmitat de glicidil catalitzada pel miceli de *Penicillium* sp. es va obtenir monopalmitina. No obstant això, no es va observar preferència per cap dels enantiòmers.
- 12) La hidròlisi del grup èster, causada per la presència d'altres enzims hidrolítics en la biomassa de *Penicillium* sp., va dificultar la preparació de monopalmitina enantioenriquida a partir del palmitat de glicidil enantioenriquit.

## **6. BIBLIOGRAFIA**

---



- ADAMCZAK, M. (2003). «Synthesis, properties, and application of lipase from *Candida antarctica* for high yield monoacylglycerol biosynthesis». *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, vol. 12, núm. 4, p. 3-8.
- ADER, U.; SCHNEIDER, M. P. (1992a). «Enzyme assisted preparation of enantiomerically pure  $\beta$ -adrenergic blockers I. A facile screening method for suitable biocatalysts». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 3, núm. 2, p. 201-204.
- ADER, U.; SCHNEIDER, M. P. (1992b). «Enzyme assisted preparation of enantiomerically pure  $\beta$ -adrenergic blockers II. Building blocks of high optical purity and their synthetic conversion». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 3, núm. 2, p. 205-208.
- ADER, U.; SCHNEIDER, M. P. (1992c). «Enzyme assisted preparation of enantiomerically pure  $\beta$ -adrenergic blockers III. Optically active chlorohydrin derivatives and their conversion». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 3, núm. 4, p. 521-524.
- ADLERCREUTZ, P. (1991). «On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity». *European Journal of Biochemistry*, vol. 199, núm. 3, p. 609-614.
- AKOK, C. C. (1993). «Lipase-catalyzed synthesis of partial glyceride». *Biotechnology Letters*, vol. 15, núm. 9, p. 949-954.
- ALLEN, R. H.; JAKOBY, W. B. (1969). «Tartaric acid metabolism: IX. Synthesis with tartrate epoxidase». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 244, núm. 8, p. 2078-2084.
- ANDREWS, D. L.; BEAMES, B.; SUMMERS, M. D.; PARK, W. D. (1988). «Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector». *Journal of Biochemistry*, vol. 252, núm. 1, p. 199-206.
- ANTHONSEN, H. W.; HOFF, B. H.; ANTHONSEN, T. (1995). «A simple method for calculating enantiomer ratio and equilibrium constants in biocatalytic resolutions». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 6, núm. 12, p. 3015-3022.
- ARAND, M.; HALLBERG, B. M.; ZOU, J.; BERGFORS, T.; OESCH, F.; WERF, M. J. VAN DER; BONT, J. A. M. DE; JONES, T. A.; MOWBRAY, S. L. (2003). «Structure of



- Rhodococcus erythropolis* limonene-1,2-epoxide hydrolase reveals a novel active site». *The EMBO Journal*, vol. 22, núm. 11, p. 2583-2592.
- ARAUJO, P. (2009). «Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation». *Journal of Chromatography B*, vol. 877, núm. 23, p. 2224-2234.
- ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R. (2001). «Synthetic applications of epoxide hydrolases». *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 5, núm. 2, p. 112-119.
- BADALASSI, F.; WAHLER, D.; KLEIN, G.; CROTTI, P.; REYMOND, J. L. (2004). «Fluorescence assay and screening of epoxide opening by nucleophiles». *European Journal of Organic Chemistry*, vol. 2004, núm. 12, p. 2557-2566.
- BADALASSI, F.; WAHLER, D.; KLEIN, G.; CROTTI, P.; REYMOND, J. L. (2000). «A versatile periodate-coupled fluorogenic assay for hydrolytic enzymes». *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 39, núm. 22, p. 4067-4070.
- BATOVSKA, D. I.; TSUBOTA, S.; KATO, Y.; ASANO, Y.; UBUKATA, M. (2004). «Lipase-mediated desymmetrization of glycerol with aromatic and aliphatic anhydrides». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 15, núm. 22, p. 3551-3559.
- BAUMANN, M.; STÜRMER, R.; BORNSCHEUER, U. T. (2001). «A high-throughput screening method for the identification of active and enantioselective hydrolases». *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 40, núm. 22, p. 4201-4204.
- BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. (2000). «Methods for lipase detection and assay: A critical review». *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 102, núm. 2, p. 133-153.
- BELLOT, J. C.; CHOISNARD, L.; CASTILLO, E.; MARTY, A. (2001). «Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 28, núm. 4-5, p. 362-369.
- BELLUCCI, G.; CHIAPPE, C.; CONTI, L.; MARIONI, F.; PIERINI, G. (1989). «Substrate enantioselection in the microsomal epoxide hydrolase catalyzed hydrolysis of monosubstituted oxiranes: Effects of branching of alkyl chains». *Journal of Organic Chemistry*, vol. 54, núm. 25, p. 5978-5983.
- BELOTI, L.; COSTA, B. Z.; TOLEDO, M. A. S.; SANTOS, C. A.; CRUCELLO, A.; FÁVARO, M. T. P.; SANTIAGO, A. S.; MENDES, J. S.; MARSAIOLI, A. J.; SOUZA, A. P. (2013). «A

- novel and enantioselective epoxide hydrolase from *Aspergillus brasiliensis* CCT 1435: Purification and characterization». *Protein Expression and Purification*, vol. 91, núm. 2, p. 175-183.
- BERGER, M.; LAUMEN, K.; SCHNEIDER, M. P. (1992). «Enzymatic esterification of glycerol: I: Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1,3-*sn*-diacylglycerols». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 69, núm. 10, p. 955-960.
- BERGER, M.; SCHNEIDER, M. P. (1992). «Enzymatic esterification of glycerol: II: Lipase catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1(3)-*rac*-monoacylglycerols». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 69, núm. 10, p. 961-965.
- BIANCHI, D.; BOSETTI, A.; GOLINI, P.; CESTI, P.; PINA, C. (1997). «Resolution of isopropylidene-glycerol benzoate by sequential enzymatic hydrolysis and preferential crystallization». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 8, núm. 6, p. 817-819.
- BLÉE, E.; SCHUBER, F. (1995). «Stereocontrolled hydrolysis of the linoleic acid monoepoxide regioisomers catalyzed by soybean epoxide hydrolase». *European Journal of Biochemistry*, vol. 230, núm. 1, p. 229-234.
- BORGDORF, R.; WARWEL, S. (1999). «Substrate selectivity of various lipases in the esterification of *cis*- and *trans*-9-octadecenoic acid». *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 51, núm. 4, p. 480-485.
- BORNSCHEUER, U. T. (1995). «Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerols». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 17, núm. 7, p. 578-586.
- BORNSCHEUER, U. T. (2000). *Enzymes in Lipid Modification*. Weinheim (Alemania): Wiley-VCH.
- BORNSCHEUER, U. T.; GAZIOLA, L.; SCHMID, R. D. (1996). «Application of vinyl esters for the lipase-catalyzed high-yield synthesis of monoacylglycerols». *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 799, p. 757-761.
- BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. (2006). *Hydrolases in organic synthesis: Regio- and stereoselective biotransformations*. 2a ed. Weinheim (Alemania): Wiley-VCH.

- BOSETTI, A.; BIANCHI, D.; CESTI, P.; GOLINI, P. (1994). «Lipase-catalyzed resolution of isopropylidene glycerol: Effect of co-solvents on enantioselectivity». *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 9, núm. 1-4, p. 71-78.
- BOTES, A. L.; STEENKAMP, J. A.; LETLOENYANE, M. Z.; DYK, M. S. VAN (1998). «Epoxide hydrolase activity of *Chryseomonas luteola* for the asymmetric hydrolysis of aliphatic mono-substituted epoxides». *Biotechnology Letters*, vol. 20, núm. 4, p. 427-430.
- BOTTALLA, A. L.; IBRAHIM-OUALI, M.; SANTELLI, M.; FURSTOSS, R.; ARCHELAS, A. (2007). «Epoxide hydrolase-catalysed kinetic resolution of a spiroepoxide, a key building block of various 11-heterosteroids». *Advanced Synthesis & Catalysis*, vol. 349, núm. 7, p. 1102-1110.
- BOULANGER, B.; CHIAP, P.; DEWE, W.; CROMMEN, J.; HUBERT, P. (2003). «An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progresses and limitations». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 32, núm. 4-5, p. 753-765.
- BUKOWSKA, A.; BUKOWSKI, W. (2002). «Reactivity of some carboxylic acids in reactions with some epoxides in the presence chromium (III) ethanoate». *Organic Process Research & Development*, vol. 6, núm. 3, p. 234-237.
- BUKOWSKI, W. (2004). «Reactivity of some carboxylic acids in the addition to epichlorohydrin in the presence of chromium (III) acetate: The effect of some organic solvents». *Journal of Molecular Liquids*, vol. 111, núm. 1-3, p. 47-52.
- BURGOS, C. E.; AYER, D. E.; JOHNSON, R. A. (1987). «A new, asymmetric synthesis of lipids and phospholipids». *Journal of Organic Chemistry*, vol. 52, núm. 22, p. 4973-4977.
- CAGNON, J. R.; PORTO, L. M.; MARSIAOLI, A. J. (1999). «First evaluation of the Brazilian microorganisms biocatalytic potential». *Chemosphere*, vol. 38, núm. 10, p. 2237-2242.
- CAMACHO, B.; ROBLES, A.; CAMACHO, F.; GONZÁLEZ, P.; MOLINA, E. (2003). «Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 33, núm. 6, p. 845-853.

- CAMPO, C.; LLAMA, E. F.; BERMÚDEZ, J. L.; SINISTERRA, J. V. (2001). «Methodologies for the stereoselective synthesis of adrenergic  $\beta$ -blockers: An overview». *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 19, núm. 3, p. 163-180.
- CARDENAS, F.; ÁLVAREZ, E.; CASTRO, M. S. DE; SÁNCHEZ, J. M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; SINISTERRA, J. V. (2001). «Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 14, núm. 4-6, p. 111-123.
- CARREA, G.; OTTOLINA, G.; RIVA, S. (1995). «Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media». *Trends in Biotechnology*, vol. 13, núm. 2, p. 63-70.
- CARREA, G.; RIVA S. (2000). «Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents». *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 39, núm. 13, p. 2226-2254.
- CASTILLO, E.; DOSSAT, V.; MARTY, A.; CONDORET, J. S.; COMBES, D. (1997). «The role of silica gel in lipase-catalyzed esterification reactions of high-polar substrates». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 74, núm. 2, p. 77-85.
- CASTILLO, F. (2005). *Biotecnología ambiental*. Madrid: Tebar, p. 293-319.
- CAUVEL, A.; RENARD, G.; BRUNEL, D. (1997). «Monoglyceride synthesis by heterogeneous catalysis using MCM-41 type silicas functionalized with amino groups». *Journal of Organic Chemistry*, vol. 62, núm. 3, p. 749-751.
- CHEN, C. S.; FUJIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G.; SIH, C. J. (1982). «Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers». *Journal of the American Chemical Society*, vol. 104, núm. 25, p. 7294-7299.
- CHEN, C. S.; WU, S. H.; GIRDAUKAS, G.; SIH, C. J. (1987). «Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. 2. Enzyme-catalyzed esterification in water-organic solvent biphasic systems». *Journal of the American Chemical Society*, vol. 109, núm. 9, p. 2812-2817.
- CHEN, L.; COOLBEAR, T.; DANIEL, R. M. (2004). «Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines». *International Dairy Journal*, vol. 14, núm. 6, p. 495-504.
- CHEN, X. J.; ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R. (1993). «Microbiological transformations. 27. The first examples for preparative-scale enantioselective or

- diastereoselective epoxide hydrolyses using microorganisms. An unequivocal access to all four bisabolol stereoisomers». *Journal of Organic Chemistry*, vol. 58, núm. 20, p. 5528-5532.
- CHOI, W. J.; CHOI, C. Y. (2005). «Production of chiral epoxides: Epoxide hydrolase-catalyzed enantioselective hydrolysis». *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 10, núm. 3, p. 167-179.
- COHEN, S. G.; KHEDOURI, E. (1961). «Requirements for stereospecificity in hydrolysis by  $\alpha$ -chymotrypsin. Diethyl  $\beta$ -acetamidoglutarate». *Journal of the American Chemical Society*, vol. 83, núm. 5, p. 1093-1096.
- CUADROS, L.; ALMANSA, E. M.; GARCÍA, A. M.; GONZÁLEZ, A.; EGEA, F. J.; GARRIDO, A.; MARTÍNEZ, J. L. (2005). «Setting up of recovery profiles: A tool to perform the compliance with recovery requirements for residue analysis». *Talanta*, vol. 66, núm. 4, p. 1063-1072.
- CUADROS, L.; GARCÍA, A. M.; ALMANSA, E. M.; EGEA, F. J.; CASTRO, M. L.; GARRIDO, A.; MARTÍNEZ, J. L. (2003). «Correction function on biased results due to matrix effects: Application to the routine analysis of pesticide residues». *Analytica Chimica Acta*, vol. 478, núm. 2, p. 281-301.
- DELGADO, A.; MINGUILLÓN, C.; JOGLAR, J. (2002). *Introducción a la síntesis de fármacos*. Madrid: Síntesis.
- DEMIRJIAN, D. C.; SHAH, P. C.; MORÍS, F. (1999). «Screening for novel enzymes». A: FESSNER, W. D. [ed.]. *Biocatalysis: From Discovery to Application*. Berlin; Heidelberg (Alemania): Springer, p. 1-29.
- DENG, L.; NAKANO, H.; IWASAKI, Y. (2007). «Direct separation of regioisomers and enantiomers of monoacylglycerols by tandem column high-performance liquid chromatography». *Journal of Chromatography A*, vol. 1165, núm. 1-2, p. 93-99.
- DEWÉ, W. (2009). «Review of statistical methodologies used to compare (bio)assays». *Journal of Chromatography B*, vol. 877, núm. 23, p. 2208-2213.
- DODERER, K.; LUTZ, S.; HAUER, B.; SCHMID, R. D. (2003). «Spectrophotometric assay for epoxide hydrolase activity toward any epoxide». *Analytical Biochemistry*, vol. 321, núm. 1, p. 131-134.
- DRÖGE, M. J.; BOS, R.; BOERSMA, Y. L.; QUAX, W. J. (2005). «Comparison and functional characterisation of three homologous intracellular carboxylesterases

- of *Bacillus subtilis*». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 32, núm. 5-6, p. 261-270.
- DUDDECK, H.; DÍAZ, E. (2009). «Chiral recognition of ethers by NMR spectroscopy». *Chirality*, vol. 21, núm. 1, p. 51-68.
- ERBELDINGER, M.; NI, X.; HALLING, P. (1998). «Enzymatic synthesis with mainly undissolved substrates at very high concentrations». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 23, núm. 1-2, p. 141-148.
- ESTEVEZ, J.; VILANOVA, E. (2009). «Model equations for the kinetics of covalent irreversible enzyme inhibition and spontaneous reactivation: Esterases and organophosphorus compounds». *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 39, núm. 5, p. 427-448.
- FABER, K.; KROUTIL, W. (2002). «Stereoselectivity in biocatalytic enantioconvergent reactions and a computer program for its determination». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 13, núm. 4, p. 377-382.
- FABER, K.; MISCHITZ, M.; KROUTIL, W. (1996). «Microbial epoxide hydrolases». *Acta Chemica Scandinavica*, vol. 50, p. 249-258.
- FARIAS, R. N.; TORRES, M.; CANELA, R. (1997). «Spectrophotometric determination of the positional specificity of nonspecific and 1,3-specific lipases». *Analytical Biochemistry*, vol. 252, núm. 1, p. 186-189.
- FEINBERG, M. (2007). «Validation of analytical methods based on accuracy profiles». *Journal of Chromatography A*, vol. 1158, núm. 1-2, p. 174-183.
- FENG, S.; LIANG, Q.; KINSER, R. D.; NEWLAND, K.; GUILBAUD, R. (2006). «Testing equivalence between two laboratories or two methods using paired-sample analysis and interval hypothesis testing». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 385, núm. 5, p. 975-981.
- FLUXÁ, V. S.; WAHLER, D.; REYMOND, J. L. (2008). «Enzyme assay and activity fingerprinting of hydrolases with the red-chromogenic adrenaline test». *Nature Protocols*, vol. 3, núm. 8, p. 1270-1277.
- GÁMIZ, L.; CUADROS, L.; SOTO, J. J.; HUERTAS, J. F.; GONZÁLEZ, A.; GARCÍA, A. M. (2006). «Establishment of signal-recovery functions for calculation of recovery factor. Application to monitoring of contaminant residues in vegetables by chemiluminescence detection». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 384, núm. 1, p. 295-301.

- GARCÍA, L. F.; GOTOR, V. (1998). «Alcohol inhibition and specificity studies of lipase B from *Candida antarctica* in organic solvents». *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 59, núm. 2, p. 163-170.
- GARCÍA, T.; SÁNCHEZ, N.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. (1999). «Enzymatic synthesis of fatty esters: Part I: Kinetic approach». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 25, núm. 7, p. 584-590.
- GENZEL, Y.; ARCHELAS, A.; SPELBERG, J. H. L.; JANSSEN, D. B.; FURSTOSS, R. (2001). «Microbiological transformations. Part 48: Enantioselective biohydrolysis of 2-, 3- and 4- pyridyloxirane at high substrate concentration using *Agrobacterium radiobacter* AD1 epoxide hydrolase and its Tyr215Phe mutant». *Tetrahedron*, vol. 57, núm. 14, p. 2775-2779.
- GHANEM, A. (2007). «Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds». *Tetrahedron*, vol. 63, núm. 8, p. 1721-1754.
- GOTOR, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. (2006). «Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 40, núm. 3-4, p. 111-120.
- GROGAN, G.; ROBERTS, S. M.; WILLETTS, A. J. (1996). «Novel aliphatic epoxide hydrolase activities from dematiaceous fungi». *FEMS Microbiology Letters*, vol. 141, núm. 2-3, p. 239-243.
- GRUBER, C. C.; LAVANDERA, I.; FABER, K.; KROUTIL, W. (2006). «From a racemate to a single enantiomer: Deracemization by stereoinversion». *Advanced Synthesis & Catalysis*, vol. 348, núm. 14, p. 1789-1805.
- GRUNDWALD, P. (2009). «Biocatalysis: Biochemical fundamentals and applications». London: Imperial Press.
- GÜBITZ, G.; SCHMID, M. G. (2001). «Chiral separation by chromatographic and electromigration techniques: A review». *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, vol. 22, núm. 7-8, p. 291-336.
- HALLING, P. J. (1994). «Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests and recommendations for experimental design and analysis». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 16, núm. 3, p. 178-206.

- HAMAGUCHI, S.; OHASHI, T.; WATANABE, K. (1986a). «Lipase-catalyzed stereoselective hydrolysis of 2-acyl and 1-p-tolylsulfonyl substituted propanediol and butanediol». *Agricultural and Biological Chemistry*, vol. 50, núm. 6, p. 1629-1632.
- HAMAGUCHI, S.; OHASHI, T.; WATANABE, K. (1986b). «Lipase-catalyzed stereoselective hydrolysis of 2-acyloxy-3-chloropropyl *p*-toluenesulfonate». *Agricultural and Biological Chemistry*, vol. 50, núm. 2, p. 375-380.
- HANSON, R. M. (1991). «The synthetic methodology of nonracemic glycidol and related 2,3-epoxy alcohols». *Chemical Reviews*, vol. 91, núm. 4, p. 437-475.
- HASNAOUI, G.; MAJERIC, M.; SPELBERG, J. H. L.; HAUER, B.; JANSSEN, D. B. (2008). «Catalytic promiscuity of halohydrin dehalogenase and its application in enantioselective epoxide ring opening». *ChemBioChem*, vol. 9, núm. 7, p. 1048-1051.
- HASSAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. (2006). «Industrial applications of microbial lipases». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, núm. 2, p. 235-251.
- HÉRAULT, D.; SALUZZO, C.; DUVAL, R.; LEMAIRE, M. (2002). «Enantiopure beads: A tool for asymmetric heterogeneous catalysis». *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, vol. 182-183, p. 249-256.
- HESS, R.; BORNSCHEUER, U.; CAPEWELL, A.; SCHEPER, T. (1995). «Lipase-catalyzed sintesis of monostearoylglycerol in organic solvents from 1,2-O-isopropylidene glycerol». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 17, núm. 8, p. 725-728.
- HESSE, M.; MEIER, H.; ZEEH, B. (2005). *Métodos espectroscópicos en química orgánica*. 2a ed. Madrid: Síntesis.
- HÖGBERG, H. E. (2008). «Exploiting enantioselectivity of hydrolases in organic solvents». A: CARREA, G.; RIVA, S. [ed.]. *Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media*. Weinheim (Alemania): Wiley-VCH, p. 75-112.
- HOLMBERG, K.; OSTERBERG, E. (1988). «Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 65, núm. 9, p. 1544-1548.
- HUANG, J. Y.; WANG, T. H.; SU, N. W.; LEE, M. H. (2009). «A strategy for screening microbial strains with lipolytic specificity toward monoacylglycerols». *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 25, núm. 9, p. 1651-1658.



- ILLANES, A.; CAUERHFF, A.; WILSON, L.; CASTRO, G. R. (2012). «Recent trends in biocatalysis engineering». *Bioresource Technology*, vol. 115, p. 48-57.
- IRIMESCU, R.; SAITO, T.; KATO, K. (2004). «Enzymatic resolution of primary alcohols by direct esterification in solvent-free system». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 27, núm. 2-3, p. 69-73.
- IRIUCHIJIMA, S.; KEIYU, A.; KOJIMA, N. (1982). «Asymmetric hydrolysis of ( $\pm$ )-1-acetoxy-2,3-dichloropropane with enzyme and microorganisms». *Agricultural and Biological Chemistry*, vol. 46, núm. 6, p. 1593-1597.
- IRIUCHIJIMA, S.; KOJIMA, N. (1982). «Asymmetric hydrolysis of ( $\pm$ )-1,2-diacetoxy-3-chloropropane and its related compounds with lipase: Synthesis of optically pure (S)-propranolol». *Agricultural and Biological Chemistry*, vol. 46, núm. 5, p.1153-1157.
- IWASAKI, Y.; YAMANE, T. (2000). «Enzymatic synthesis of structured lipids». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 10, núm. 1-3, p. 129-140.
- JANES, L. E.; KAZLAUSKAS, R. J. (1997). «Quick E: A fast spectrophotometric method to measure the enantioselectivity of hydrolases». *Journal of Organic Chemistry*, vol. 62, núm. 14, p. 4560-4561.
- JANES, L. E.; LÖWENDAHL, A. C.; KAZLAUSKAS, R. J. (1998). «Quantitative screening of hydrolase libraries using pH indicators: Identifying active and enantioselective hydrolases». *Chemistry - A European Journal*, vol. 4, núm. 11, p. 2324-2331.
- JANSSEN, A. E. M.; SJURSNES, B. J.; VAKUROV, A. V.; HALLING, P. J. (1999). «Kinetics of lipase-catalyzed esterification in organic media: Correct model and solvent effects on parameters». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 24, núm. 8-9, p. 463-470.
- JANSSEN, D. B.; MAJERIĆ, M.; HASNAOUI, G.; HAUER, B.; SPELBERG, J. H. L. (2006). «Enantioselective formation and ring-opening of epoxides catalysed by halohydrin dehalogenases». *Biochemical Society Transactions*, vol. 34, p. 291-295.
- JIA, S. Y.; XU, J. H.; LI, Q. S.; YU, J. T. (2003). «Isolation of lipase producer and its performance in enantioselective hydrolysis of glycidyl butyrate». *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 104, núm. 1, p. 69-79.

- JIA, X., XU, Y., LI, Z. (2011). «Regio- and stereoselective concurrent oxidations with whole cell biocatalyst: Simple and green syntheses of enantiopure 1,2-diols via oxidative kinetic resolution». *ACS Catalysis*, vol. 1, núm. 6, p. 591-596.
- JONGEJAN, A.; MACHADO, S. S.; JONGEJAN, J. A. (2000). «The enantioselectivity of quinoxaemoprotein alcohol dehydrogenases: Mechanistic and structural aspects». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 8, núm 1-3, p. 121-163.
- KAMBOUROVA, M.; KIRILOVA, N.; MANDEVA, R.; DEREKOVA, A. (2003). «Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 22, núm. 5-6, p. 307-313.
- KANERVA, L. T. (1996). «Hydrolase-catalysed asymmetric and other transformations of synthetic interest». A: KOSKINEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M. [ed.]. *Enzymatic reactions in organic media*. Londres [etc.]: Blackie Academic & Professional, p. 170-223.
- KATO, Y.; FUJIWARA, I.; ASANO, Y. (2000). «Synthesis of optically active  $\alpha$ -monobenzoyl glycerol by asymmetric transesterification of glycerol». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 9, núm. 4-6, p. 193-200.
- KAWANAMI, Y.; HONNMA, A.; OHTA, K.; MATSUMOTO, N. (2005). «Effect of substituent on the enantioselectivity for lipase-catalyzed kinetic resolution of glycerol derivatives». *Tetrahedron*, vol. 61, núm. 3, p. 693-697.
- KIM, H. S.; LEE, S. J.; LEE, E. J.; HWANG, J. W.; PARK, S.; KIM, S. J.; LEE, E. Y. (2005). «Cloning and characterization of a fish microsomal epoxide hydrolase of *Danio rerio* and application to kinetic resolution of racemic styrene oxide». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 37, núm. 1-6, p. 30-35.
- KLOOSTERMAN, M.; ELFERINK, V. H. M.; IERSEL, J. VAN; ROSKAM, J. H.; MEIJER, E. M.; HULSHOF, L. A.; SHELDON, R. A. (1988). «Lipases in the preparation of  $\beta$ -blockers». *Trends in Biotechnology*, vol. 6, núm. 10, p. 251-256.
- KLUNDER, J. M.; ONAMI, T.; SHARPLESS, K. B. (1989). «Arenesulfonate derivatives of homochiral glycidol: Versatile chiral building blocks for organic synthesis». *Journal of Organic Chemistry*, vol. 54, núm. 6, p. 1295-1304.

- KONARZYCKA, M.; BORNSCHEUER, U. T. (2003). «A high-throughput-screening method for determining the synthetic activity of hydrolases». *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 42, núm. 12, p. 1418-1420.
- KOTIK, M.; BRICHAC, J.; KYSLÍK, P. (2005). «Novel microbial epoxide hydrolases for bihydrolysis of glycidyl derivatives». *Journal of Biotechnology*, vol. 120, núm. 4, p. 364-375.
- KOVAC, A.; SCHEIB, H.; PLEISS, J.; SCHMID, R. D.; PALTAUF, F. (2000). «Molecular basis of lipase stereoselectivity». *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 102, núm. 1, p. 61-77.
- KRIEG, H. M.; BOTES, A. L.; SMIT, M. S.; BREYTENBACH, J. C.; KEIZER, K. (2001). «The enantioselective catalytic hydrolysis of racemic 1,2-epoxyoctane in a batch and a continuous process». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 13, núm. 1-3, p. 37-47.
- KROUTIL, W.; KLEWEIN, A.; FABER, K. (1997). «A computer program for analysis, simulation and optimization of asymmetric catalytic processes proceeding through two consecutive steps. Type 1: Asymmetrization-kinetic resolutions». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 8, núm. 19, p. 3251-3261.
- KROUTIL, W.; MISCHITZ, M.; PLACHOTA, P.; FABER, K. (1996). «Deracemization of ( $\pm$ )-*cis*-2,3-epoxyheptane via enantioconvergent biocatalytic hydrolysis using *Nocardia* EH1-epoxide hydrolase». *Tetrahedron Letters*, vol. 37, núm. 46, p. 8379-8382.
- LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. (1987). «Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents». *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 30, núm. 1, p. 81-87.
- LACOURCIERE, G. M.; ARMSTRONG, R. N. (1993). «The catalytic mechanism of microsomal epoxide hydrolase involves an ester intermediate». *Journal of the American Chemical Society*, vol. 115, núm. 22, p.10466-10467.
- LADNER, W. E.; WHITESIDES, G. M. (1984). «Lipase-catalyzed hydrolysis as a route to esters of chiral epoxy alcohols». *Journal of the American Chemical Society*, vol. 106, núm. 23, p. 7250-7251.
- LAI, D. T.; HATTORI, N.; O'CONNOR, C. J. (1999). «Kinetics of enzymatic synthesis of isopropylidene glycerol esters by goat pregastric lipase». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 76, núm. 7, p. 845-851.

- LEE, D. W.; KIM, H. W.; LEE, K. W.; KIM, B. C.; CHOE, E. A.; LEE, H. S.; KIM, D. S.; PYUN, Y. R. (2001). «Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 29, núm. 6-7, p. 363-371.
- LEE, E. Y. (2008). «Epoxide hydrolase-mediated enantioconvergent bioconversions to prepare chiral epoxides and alcohols». *Biotechnology Letters*, vol. 30, núm. 9, p. 1509-1514.
- LEE, S. J.; KIM, H. S.; KIM, S. J.; PARK, S.; KIM, B. J.; SHULER, M. L.; LEE, E. Y. (2007). «Cloning, expression and enantioselective hydrolytic catalysis of a microsomal epoxide hydrolase from a marine fish, *Mugil cephalus*». *Biotechnology Letters*, vol. 29, núm. 2, p. 237-246.
- LI, C.; WANG, P.; ZHAO, D.; CHENG, Y.; WANG, L.; WANG, L.; WANG, Z. (2008). «Enantioselective enzymatic hydrolysis of racemic glycidyl butyrate by lipase from *Bacillus subtilis* with improved catalytic properties». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 55, núm. 3-4, p. 152-156.
- LIN, X.; CHUAH, G. K.; JAENICKE, S. (1999). «Base-functionalized MCM-41 as catalysts for the synthesis of monoglycerides». *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, vol. 150, núm. 1-2, p. 287-294.
- LINDERMAN, R. J.; WALKER, E. A.; HANEY, C.; ROE, R. M. (1995). «Determination of the regiochemistry of insect epoxide hydrolase catalyzed epoxide hydration of juvenile hormone by <sup>18</sup>O-labeling studies». *Tetrahedron*, vol. 51, núm. 40, p. 10845-10856.
- LIU, Z.; LI, Y.; PING, L.; XU, Y.; CUI, F.; XUE, Y.; ZHENG, Y. (2007). «Isolation and identification of a novel *Rhodococcus* sp. ML-0004 producing epoxide hydrolase and optimization of enzyme production». *Process Biochemistry*, vol. 42, núm. 5, p. 889-894.
- LOZANO, P.; DIEGO, T. DE; CARRIÉ, D.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. L. (2004). «Synthesis of glycidil esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide». *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, vol. 214, núm. 1, p. 113-119.

- MACRAE, A. R.; VISICCHIO, J. E.; LANOT, A. (1998). «Application of potato lipid acyl hydrolase for the synthesis of monoacylglycerols». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 75, núm. 11, p. 1489-1494.
- MANOJ, K. M.; ARCHELAS, A.; BARATTI, J.; FURSTOSS, R. (2001). «Microbiological transformations. Part 45: A green chemistry preparative scale synthesis of enantiopure building blocks of Eliprodiol: Elaboration of a high substrate concentration epoxide hydrolase-catalyzed hydrolytic kinetic resolution process». *Tetrahedron*, vol. 57, núm. 4, p. 695-701.
- MARTINS, M. P.; MOUAD, A. M.; BOSCHINI, L.; REGALI, M. H.; SETTE, L. D.; MELEIRO, A. L. (2011). «Marine fungi *Aspergillus sydowii* and *Trichoderma* sp. catalyze the hydrolysis of benzyl glycidyl ether». *Marine Biotechnology*, vol. 13, núm. 2, p. 314-320.
- MAT, S.; BASRI, M.; BAKAR, A.; ARIFF, A.; MOHAMMAD, R.; ABDUL, M. B.; ABDUL, R. N. Z. R. (2005). «High performance enzymatic synthesis of oleyl oleate using immobilised lipase from *Candida antarctica*». *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 8, núm. 3, p. 291-298.
- MATEOS, J. C.; RUIZ, K.; RODRÍGUEZ, J. A.; CÓRDOVA, J.; BARATTI, J. (2007). «Mapping substrate selectivity of lipases from thermophilic fungi». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 49, núm. 1-4, p. 104-112.
- MCCONNELL, O.; LI, A. B.; BALIBAR, C.; BYRNE, N.; CAI, Y.; CARTER, G.; CHLENOV, M.; DI, L.; FAN, K.; GOLJER, I.; HE, Y.; HEROLD, D.; KAGAN, M.; KERNS, E.; KOEHN, F.; KRAML, C.; MARATHIAS, V.; MÁRQUEZ, B.; MCDONALD, L.; NOGLE, L.; PETUCCI, C.; SCHLINGMANN, G.; TAWA, G.; TISCHLER, M.; WILLIAMSON, R. T.; SUTHERLAND, A.; WATTS, W.; YOUNG, M.; ZHANG, M. Y.; ZHANG, Y.; ZHOU, D.; HO, D. (2007). «Enantiomeric separation and determination of absolute stereochemistry of asymmetric molecules in drug discovery-building chiral technology toolboxes». *Chirality*, vol. 19, núm. 9, p. 658-682.
- MCNEILL, G. P.; SHIMIZU, S.; YAMANE, T. (1990). «Solid phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resulting in a high yield of monoglyceride». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 67, núm. 11, p. 779-783.
- MCNEILL, G. P.; SHIMIZU, S.; YAMANE, T. (1991). «High-yield enzymatic glycerolysis of fats and oils». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 68, núm. 1, p. 1-5.

- MEYNER, M. (2012). «Equivalence tests – A review». *Food Quality and Preference*, vol. 26, núm. 2, p. 231-245.
- MEZZETTI, A.; KEITH, C.; KAZLAUSKAS, R. J. (2003). «Highly enantioselective kinetic resolution of primary alcohols of the type Ph-X-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>OH by *Pseudomonas cepacia* lipase: Effect of acyl chain length and solvent». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 14, núm. 24, p. 3917–3924.
- MISCHITZ, M.; FABER, K. (1994). «Asymmetric opening of an epoxide by azide catalyzed by an immobilized enzyme preparation from *Rhodococcus* sp.»». *Tetrahedron Letters*, vol. 35, núm. 1, p. 81-84.
- MISCHITZ, M.; KROUTIL, W.; WANDEL, U.; FABER, K. (1995). «Asymmetric microbial hydrolysis of epoxides». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 6, núm. 6, p. 1261-1272.
- MISCHITZ, M.; MIRTIL, C.; SAF, R.; FABER, K. (1996). «Regioselectivity of *Rhodococcus* NCIMB 11216 epoxide hydrolase: Applicability of *E*-values for description of enantioselectivity depends on substrate structure». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 7, núm. 7, p. 2041-2046.
- MOLINARI, F.; ROMANO, D.; GANDOLFI, R.; KROPPENSTEDT, R. M.; MARINELLI, F. (2005). «Newly isolated *Streptomyces* spp. as enantioselective biocatalysts: Hydrolysis of 1,2-O-isopropylidene glycerol racemic esters». *Journal of Applied Microbiology*, vol. 99, núm. 4, p. 960-967.
- MOLINARI, F.; SOLANGE, K.; ROMANO, A.; ROMANO, D.; GANDOLFI, R. (2004). «Enantioselective hydrolysis of (*R,S*)-isopropylidene glycerol acetate with *Kluyveromyces marxianus*». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 15, núm. 12, p. 1945-1947.
- MONTEIRO, J. B.; NASCIMENTO, M. G.; NINOW, J. L. (2003). «Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerol in a homogeneous system». *Biotechnology Letters*, vol. 25, núm. 8, p. 641-644.
- MORILLO, J. A.; ANTIZAR, B.; MONTEOLIVA, M.; RAMOS, A.; RUSSELL, N. J. (2009). «Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes». *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 82, núm. 1, p. 25-39.
- MOULOUGUI, Z.; RAKOTONDRAZAFY, V.; VALENTIN, R.; ZEBIB, B. (2009). «Synthesis of glycerol 1-monooleate by condensation of oleic acid with glycidol catalyzed

- by anion-exchange resin in aqueous organic polymorphic system». *Industrial & Engineering Chemistry*, vol. 48, núm. 15, p. 6949-6956.
- MOUSSOU, P.; ARCHELAS, A.; BARATTI, J.; FURSTOSS, R. (1998a). «Microbiological transformations. Part 39: Determination of the regioselectivity occurring during oxirane ring opening by epoxide hydrolases: A theoretical analysis and a new method for its determination». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 9, núm. 9, p. 1539-1547.
- MOUSSOU, P.; ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R. (1998b). «Microbiological transformations 40: Use of fungal epoxide hydrolases for the synthesis of enantiopure alkyl epoxides». *Tetrahedron*, vol. 54, núm. 8, p. 1563-1572.
- MOUSSOU, P.; ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R. (1998c). «Microbiological transformations 41: Screening for novel fungal epoxide hydrolases». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 5, núm. 5-6, p. 447-458.
- MOUSSOU, P.; ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R.; BARATTI, J. C. (2000). «Clues for the existence of two different epoxide hydrolase activities in the fungus *Beauveria bassiana*». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 26, núm. 5-6, p. 414-420.
- NAGAO, T.; KOBAYASHI, T.; HIROTA, Y.; KITANO, M.; KISHIMOTO, N.; FUJITA, T.; WATANABE, Y.; SHIMADA, Y. (2005). «Improvement of a process for purification of tocopherols and sterols from soybean oil deodorizer distillate». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 37, núm. 1-6, p. 56-62.
- NARDINI, M.; RINK, R.; JANSSEN, D. B.; DIJKSTRA, B. W. (2001). «Structure and mechanism of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11, núm. 4-6, p. 1035-1042.
- NOHIRA, H.; SAKAI, K. (2004). «Optical resolution by means of crystallization». A: TODA, F. [ed.]. *Enantiomer separation: Fundamentals and practical methods*. Dordrecht (Holanda); Boston: Kluwer Academic, p. 165-191.
- OGINO, H.; NAKAGAWA, S.; SHINYA, K.; MUTO, T.; FUJIMURA, N.; YASUDA, M.; ISHIKAWA, H. (2000). «Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03». *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 89, núm. 5, p. 451-457.
- OKAZAKI, S.; KAMIYA, N.; GOTO, M.; NAKASHIO, F. (1997). «Enantioselective esterification of glycidol by surfactant-lipase complexes in organic media». *Biotechnology Letters*, vol. 19, núm. 6, p. 541-543.

- OMAR, I. C.; SAEKI, H.; NISHIO, N.; NAGAI, S. (1989). «Synthesis of acetone glycerol acyl esters by immobilized lipase of *Mucor miehei*». *Biotechnology Letters*, vol. 11, núm. 3, p. 161-166.
- OROMÍ, M.; TORRES, M.; CANELA, R. (2012). «Acylation of chiral alcohols: A simple procedure for chiral GC analysis». *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol. 2012, 452949.
- ORRU, R. V. A.; ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R.; FABER, K. (1999). «Epoxide hydrolases and their synthetic applications». A: FABER, K. [ed.]. *Biotransformations*. Berlin; Heidelberg (Alemania): Springer-Verlag, p. 145-167.
- OSPRIAN, I.; KROUTIL, W.; MISCHITZ, M.; FABER, K. (1997). «Biocatalytic resolution of 2-methyl-2-(aryl)alkyloxiranes using novel bacterial epoxide hydrolases». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 8, núm. 1, p. 65-71.
- OVERBEEKE, P. L. A.; JONGEJAN, J. A.; HEIJNEN, J. J. (2000). «Solvent effect on lipase enantioselectivity: Evidence for the presence of two thermodynamic states». *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 70, núm. 3, p. 278-290.
- PALOMO, J. M.; SEGURA, R. L.; FERNÁNDEZ, G.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ, R. (2004). «Enzymatic resolution of (±)-glycidyl butyrate in aqueous media: Strong modulation of the properties of the lipase from *Rhizopus oryzae* via immobilization techniques». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 15, núm. 7, p. 1157-1161.
- PALOMO, J. M.; SEGURA, R. L.; FUENTES, M.; ORTIZ, C. C.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ, R. (2006). «Unusual enzymatic resolution of (±)-glycidyl-butyrates for the production of (S)-glycidyl derivatives». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 38, núm. 3-4, p. 429-435.
- PALOMO, J. M.; SEGURA, R. L.; MATEO, C.; TERRENI, M.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ, R. (2005). «Synthesis of enantiomerically pure glycidol via a fully enantioselective lipase-catalyzed resolution». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 16, núm. 4, p. 869-874.
- PEDRAGOSA, S.; ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R. (1993). «Microbiological transformations. 28: Enantiocomplementary epoxide hydrolases as a preparative access to both enantiomers of styrene oxide». *Journal of Organic Chemistry*, vol. 58, núm. 20, p. 5533-5536.



- PEDRAGOSA, S.; ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R. (1996). «Microbiological transformations. 31: Synthesis of enantiopure epoxides and vicinal diols using fungal epoxide hydrolase mediated hydrolysis». *Tetrahedron Letters*, vol. 37, núm. 19, p. 3319-3322.
- PETERSSON, A. E. V.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. (2007). «A water activity control system for enzymatic reactions in organic media». *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 97, núm. 2, p. 235-241.
- PFEFFER, J.; FREUND, A.; BEL, R.; HANSEN, C. E.; REUSS, M.; SCHMID, R. D.; MAURER, S. C. (2007). «Highly efficient enzymatic synthesis of 2-monoacylglycerides and structured lipids and their production on a technical scale». *Lipids*, vol. 42, núm. 10, p. 947-953.
- PHILLIPS, A.; PRETORIUS, G. H.; RENSBURG, H. G. VAN (1995). «Molecular characterization of a *Galactomyces geotrichum* lipase, another member of the cholinesterase/lipase family». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1252, núm. 2, p. 305-311.
- PINSIRODOM, P.; WATANABE, Y.; NAGAO, T.; SUGIHARA, A.; KOBAYASHI, T.; SHIMADA, Y. (2004). «Critical temperature for production of MAG by esterification of different FA with glycerol using *Penicillium camembertii* lipase». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 81, núm. 6, p. 543-547.
- PLOU, F. J.; BARANDIARÁN, M.; CALVO, M. V.; BALLESTEROS, A.; PASTOR, E. (1996). «High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 18, núm. 1, p. 66-71.
- PLOU, F. J.; CRUCES, M. A.; FERRER, M.; FUENTES, G.; PASTOR, E.; BERNABÉ, M.; CHRISTENSEN, M.; COMELLES, F.; PARRA, J. L.; BALLESTEROS, A. (2002). «Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: Choosing the appropriate enzyme, support and solvent». *Journal of Biotechnology*, vol. 96, núm. 1, p. 55-66.
- PREGNOLATO, M.; TERRENI, M.; FUENTES, I. E. DE; ALCÁNTARA, A. R.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ, R.; GUISÁN, J. M. (2001). «Enantioselective hydrolysis of racemic glycidyl esters by using immobilized porcine páncreas lipase with improved catalytic properties». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 11, núm. 4-6, p. 757-763.

- QUIROGA, M. L. (2007). *Esterokuímica: Conceptos y aplicaciones en química orgánica*. Madrid: Síntesis.
- RANGHEARD, M. S.; LANGRAND, G.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATTI, J. (1989). «Multi-competitive enzymatic reactions in organic media: A simple test for the determination of lipase fatty acid specificity». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, vol. 1004, núm. 1, p. 20-28.
- RASHID, N.; SHIMADA, Y.; EZAKI, S.; ATOMI, H.; IMANAKA, T. (2001). «Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, núm. 9, p. 4064-4069.
- RATHI, P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. (2001). «A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation». *Process Biochemistry*, vol. 37, núm. 2, p. 187-192.
- REETZ, M. T.; BECKER, M. H.; KLEIN, H. W.; STÖCKIGT, D. (1999). «A method for high-throughput screening of enantioselective catalysts». *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 38, núm. 12, p. 1758-1761.
- REETZ, M. T.; TORRE, C.; EIPPER, A.; LOHMER, R.; HERMES, M.; BRUNNER, B.; MAICHELE, A.; BOCOLA, M.; ARAND, M.; CRONIN, A.; GENZEL, Y.; ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R. (2004). «Enhancing the enantioselectivity of an epoxide hydrolase by directed evolution». *Organic Letters*, vol. 6, núm. 2, p. 177-180.
- REYMOND, J. L.; WAHLER, D. (2002). «Substrate arrays as enzyme fingerprinting tools». *ChemBioChem*, vol. 3, núm. 8, p. 701-708.
- RINK, R.; FENNEMA, M.; SMIDS, M.; DEHMEL, U.; JANSSEN, D. B. (1997). «Primary structure and catalytic mechanism of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, núm. 23, p. 14650-14657.
- ROMANO, D.; FALCIONI, F.; MORA, D.; MOLINARI, F.; BUTHE, A.; ANSORGE, M. (2005). «Enhanced enantioselectivity of *Bacillus coagulans* in the hydrolysis of 1,2-O-isopropylidene glycerol esters by thermal knock-out of undesired enzymes». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 16, núm. 4, p. 841-845.
- ROMANO, D.; FERRARIO, V.; MOLINARI, F.; GARDOSI, L.; SÁNCHEZ, J. M.; TORRE, P.; CONVERTI, A. (2006). «Kinetic resolution of (*R,S*)-1,2-O-isopropylidene glycerol by esterification with dry mycelia of moulds». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 41, núm. 3-4, p. 71-74.

- ROMANO, D.; GANDOLFI, R.; KROPPESTEDT, R. M.; MARINELLI, F. (2005). «Newly isolated *Streptomyces* spp. as enantioselective biocatalysts: Hydrolysis of 1,2-O-isopropylidene glycerol racemic esters». *Journal of Applied Microbiology*, vol. 99, núm. 4, p. 960-967.
- ROSU, R.; IWASAKI, Y.; SHIMIDZU, N.; DOISAKI, N.; YAMANE, T. (1998). «Enzymatic synthesis of glycerides from DHA-enriched PUFA ethyl ester by glycerolysis under vacuum». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 4, núm. 4, p. 191-198.
- ROZET, E.; MARINI, R. D.; ZIEMONS, E.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. (2011). «Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 55, núm. 4, p. 848-858.
- RŮŽIČKA, J.; VELCLOVÁ, K.; JANIŠ, R.; KREJČÍ, J. (2003). «Antimicrobial effects of 1-monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids». *European Food Resource Technology*, vol. 217, núm. 4, p. 329-331.
- SAKAI, T. (2004). «Low-temperature method for a dramatic improvement in enantioselectivity in lipase-catalyzed reactions». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 15, núm. 18, p. 2749-2756.
- SAKIYAMA, T.; YOSHIMI, T.; MIYAKE, A.; UMEOKA, M.; TANAKA, A.; OZAKI, S.; NAKANISHI, K. (2001). «Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from *Pseudomonas* sp. LP7315». *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 91, núm. 1, p. 27-32.
- SARDA, L.; DESNUELLE, P. (1958). «Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion». *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 30, núm. 3, p. 513-521.
- SAREEN, D., KUMAR, R. (2011). «Prospecting for efficient enantioselective epoxide hydrolases». *Indian Journal of Biotechnology*, vol. 10, núm. 2, p. 161-177.
- SAXENA, R. K.; GHOSH, P. K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W. S.; BRADDOO, S.; GULATI, R. (1999). «Microbial lipases, potential biocatalysts for the future industry». *Current Science*, vol. 77, núm. 1, p. 101-115.
- SCHAUS, S. E.; BRANDES, B.; D.; LARROW, J. F.; TOKUNAGA, M.; HANSEN, K. B.; GOULD, A. E.; FURROW, M. E.; JACOBSEN, E. N. (2002). «Highly selective hydrolytic kinetic resolution of terminal epoxides catalyzed by chiral (salen)Co<sup>III</sup> complexes: Practical synthesis of enantioenriched terminal

- epoxides and 1,2-diols». *Journal of the American Chemical Society*, vol. 124, núm. 7, p. 1307-1315.
- SCHMIDT, M.; BORNSCHEUER, U. T. (2005). «High-throughput assays for lipases and esterases». *Biomolecular Engineering*, vol. 22, núm. 1-3, p. 51-56.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. (2001). «Production, purification, characterization, and applications of lipases». *Biotechnology Advances*, vol. 19, núm. 8, p. 627-662.
- SHELDON, R. A. (1993). *Chirotechnology: Industrial synthesis of optically active compounds*. Nova York: Marcel Dekker.
- SHIMOKAWA, Y.; HIRATA, K. I.; ISHIDA, T.; KOJIMA, Y.; INOUE, N.; QUERTERMOUS, T.; YOKOYAMA, M. (2005). «Increased expression of endothelial lipase in rat models of hypertension». *Cardiovascular Research*, vol. 66, núm. 3, p. 594-600.
- SINCHAIKUL, S.; SOOKKHEO, B.; PHUTRAKUL, S.; PAN, F. M.; CHEN, S. T. (2001). «Optimization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: Overexpression, purification and characterization». *Protein Expression and Purification*, vol. 22, núm. 3, p. 388-398.
- SKOURIDOU, V.; STAMATIS, H.; KOLISIS, F. N. (2003). «Use of essential oils as media for the enantioselective esterification of the monoterpene perillyl alcohol catalyzed by lipase». *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 105, núm. 3-4, p. 115-120.
- SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T.; MENGE, U.; SCHMID, R. D. (1997). «Synthesis of structured triglycerides from peanut oil with immobilized lipase». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 74, núm. 4, p. 427-433.
- SOUZA S. V. C. DE, JUNQUEIRA R. G. (2005). «A procedure to assess linearity by ordinary least squares method». *Analytica Chimica Acta*, vol. 552, núm. 1-2, p. 25-35.
- SPELBERG, J. H. L.; RINK, R.; KELLOGG, R. M.; JANSSEN, D. B. (1998). «Enantioselectivity of a recombinant epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 9, núm. 3, p. 459-466.
- STAMATOV, S. D.; STAWINSKI, J. (2005a). «Regioselective opening of an oxirane system with trifluoroacetic anhydride: A general method for the synthesis of 2-

- monoacyland 1,3-symmetrical triacylglycerols». *Tetrahedron*, vol. 61, núm. 15, p. 3659-3669.
- STAMATOV, S. D.; STAWINSKI, J. (2005b). «Stereospecific and regioselective opening of an oxirane system. A new efficient entry to 1- or 3-monoacyl- and 1- or 3-monoalkyl-*sn*-glycerols». *Tetrahedron Letters*, vol. 46, núm. 10, p. 1601-1605.
- STAMATOV, S. D.; STAWINSKI, J. (2007). «Regioselective and stereospecific acylation across oxirane- and silyloxy systems as a novel strategy to the synthesis of enantiomerically pure mono-, di- and triglycerides». *Organic & Biomolecular Chemistry*, vol. 5, núm. 23, p. 3787-3800.
- STEFFEN, B.; ZIEMANN, A.; LANG, S.; WAGNER, F. (1992). «Enzymatic monoacylation of trihydroxy compounds». *Biotechnology Letters*, vol. 14, núm. 9, p. 773-778.
- STEFFEN, B.; ZIEMANN, A.; LANG, S.; WAGNER, F. (1995). «Enzymatic formation and physicochemical behaviour of uncommon monoglycerides». *Fett Wissenschaft Technologie / Fat Science Technology*, vol. 97, núm. 4, p. 132-136.
- STEINREIBER, J.; FABER, K.; GRIENGL, H. (2008). «De-racemization of enantiomers versus de-epimerization of diastereomers: Classification of dynamic kinetic asymmetric transformations (DYKAT)». *Chemistry: A European Journal*, vol. 14, núm. 27, p. 8060-8072.
- STRAUSS, U. T.; FELFER, U.; FABER, K. (1999). «Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 10, núm. 1, p. 107-117.
- SUZUKI, Y.; MARUMO, S. (1972). «Fungal metabolism of ( $\pm$ )-epoxyfarnesol and its absolute stereochemistry». *Tetrahedron Letters*, vol. 13, núm. 19, p. 1887-1890.
- SWAVING, J.; BONT, J. A. M. DE (1998). «Microbial transformation of epoxides». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 22, núm. 1, p. 19-26.
- TANG, Y. F.; XU, J. H.; YE, Q.; SCHULZE, B. (2001). «Biocatalytic preparation of (S)-phenyl glycidyl ether using newly isolated *Bacillus megaterium* ECU1001». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 13, núm. 4-6, p. 61-68.
- THOLANDER, F.; KULL, F.; OHLSON, E.; SHAFQAT, J.; THUNNISSEN, M. M. G. M.; HAEGGSTRÖM, J. Z. (2005). «Leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase, insights to the molecular evolution by homology modeling and mutational analysis of enzyme

- from *Saccharomyces cerevisiae*». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, núm. 39, p. 33477-33486.
- TIWARI, G.; TIWARI, R. (2010). «Bioanalytical method validation: An updated review». *Pharmaceutical Methods*, vol. 1, núm. 1, p. 25-38.
- TOL, J. B. A. VAN; JONGEJAN, J. A.; DUINE, J. A. (1995). «Description of hydrolase-enantioselectivity must be based on the actual kinetic mechanism: Analysis of the kinetic resolution of glycidyl (2,3-epoxy-1-propyl) butyrate by pig pancreas lipase». *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 12, núm. 2, p. 99-117.
- TORRES, M.; DOLCET, M. M.; SALA, N.; CANELA, R. (2003). «Endophytic fungi associated with mediterranean plants as a source of mycelium-bound lipases». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, núm. 11, p. 3328-3333.
- TRUBIANO, G.; BORIO, D.; ERRAZU, A. (2007). «Influence of the operating conditions and the external mass transfer limitations on the synthesis of fatty acid esters using a *Candida antarctica* lipase». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 40, núm. 4, p. 716-722.
- TSUZUKI, W.; UE, A.; NAGAO, A. (2003). «Polar organic solvent added to an aqueous solution changes hydrolytic property of lipase». *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, vol. 67, núm. 8, p. 1660-1666.
- VÄNTTINEN, E.; KANERVA, L. T. (1997). «Optimized double kinetic resolution for the preparation of (S)-solketal». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 8, núm. 6, p. 923-933.
- VEDEJS, E.; JURE, M. (2005). «Efficiency in nonenzymatic kinetic resolution». *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 44, núm. 26, p. 3974-4001.
- VERGER, R. (1997). «“Interfacial activation” of lipases: Facts and artifacts». *Trends in Biotechnology*, vol. 15, núm. 1, p. 32-38.
- VILLENEUVE, P. (2003). «Plant lipases and their applications in oils and fats modification». *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 105, núm. 6, p. 308-317.
- VRIES, E. J. DE; JANSSEN, D. B. (2003). «Biocatalytic conversion of epoxides». *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 14, núm. 4, p. 414-420.
- WALDINGER, C.; SCHNEIDER, M. P. (1996). «Enzymatic esterification of glycerol: III: Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1,3-*sn*-diacylglycerols

- and 1(3)-*rac*-monoacylglycerols derived from unsaturated fatty acids». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 73, núm. 11, p. 1513-1519.
- WANDEL, U.; MISCHITZ, M.; KROUTIL, W.; FABER, K. (1995). «Highly selective asymmetric hydrolysis of 2,2-disubstituted epoxides using lyophilized cells of *Rhodococcus* sp. NCIMB11216». *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, núm. 7, p. 735-736.
- WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; YAMAUCHI, Y.; KASAI, M.; YAMAMOTO, T.; TSUTSUMI, K.; TOMINAGA, Y.; SUGIHARA, A. (2002). «Synthesis of MAG of CLA with *Penicillium camembertii* lipase». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 79, núm. 9, p. 891-896.
- WATANABE, Y.; YAMAUCHI, Y.; NAGAO, T.; NEGISHI, S.; TERAJ, T.; KOBAYASHI, T.; SHIMADA, Y. (2005). «Production of MAG of CLA by esterification with dehydration at ordinary temperature using *Penicillium camembertii* lipase». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 82, núm. 9, p. 619-623.
- WATANABE, Y.; YAMAUCHI, Y.; NAGAO, T.; YAMAMOTO, T.; OGITA, K.; SHIMADA, Y. (2004). «Production of monoacylglycerol of conjugated linoleic acid by esterification followed by dehydration at low temperature using *Penicillium camembertii* lipase». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 27, núm. 4-6, p. 249-254.
- WATANABE, Y.; YAMAUCHI, Y.; TOSHIHIRO, N.; YAMAMOTO, T.; TSUTSUMI, K.; SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y. (2003). «Production of MAG of CLA in a solvent-free system at low temperature with *Candida rugosa* lipase». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 80, núm. 9, p. 909-914.
- WEI, C.; CHEN, Y.; SHEN, H.; WANG, S.; CHEN, L.; ZHU, Q. (2012). «Biocatalytic resolution of benzyl glycidyl ether and its derivatives by *Talaromyces flavus*: Effect of phenyl ring substituents on enantioselectivity. *Biotechnology Letters*, vol. 34, núm. 8, p. 1499-1503.
- WEIJERS, C. A. G. M. (1997). «Enantioselective hydrolysis of aryl, alicyclic and aliphatic epoxides by *Rhodotorula glutinis*». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 8, núm. 4, p. 639-647.
- WEIJERS, C. A. G. M.; BONT J. A. M. DE (1999). «Epoxide hydrolases from yeasts and other sources: Versatile tools in biocatalysis». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 6, núm. 3, p. 199-214.

- WEIJERS, C. A. G. M.; BOTES, A. L.; DYK, M. S. VAN; BONT, J. A. M. DE (1998). «Enantioselective hydrolysis of unbranched aliphatic 1,2-epoxides by *Rhodotorula glutinis*». *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 9, núm. 3, p. 467-473.
- WEISS, A. (1990). «Enzymatische herstellung von festen fettsäuremonoglyceriden». *Fett Wissenschaft Technologie / Fat Science Technology*, vol. 92, núm. 10, p. 392-396.
- WELCH, C. J. (2005). «Chiral chromatography in support of pharmaceutical process research». A: COX G. B. [ed.]. *Preparative enantioselective chromatography*. Oxford: Wiley-Blackwell, p. 1-18.
- WENZEL, T. J.; WILCOX, A. D. (2003). «Chiral reagents for the determination of enantiomeric excess and absolute configuration using NMR spectroscopy». *Chirality*, vol. 15, núm. 3, p. 256-270.
- XU, J. H.; KATO, Y.; ASANO, Y. (2001). «Efficient preparation of (*R*)- $\alpha$ -monobenzoyl glycerol by lipase catalyzed asymmetric esterification: Optimization and operation in packed bed reactor». *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 73, núm. 6, p. 493-499.
- XU, X. (2000). «Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: A review». *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 102, núm. 4, p. 287-303.
- YADAV, G. D.; THATHAGAR, M. B. (2002). «Esterification of maleic acid with ethanol over cation-exchange resin catalysts». *Reactive & Functional Polymers*, vol. 52, núm. 2, p. 99-110.
- YAMAGUCHI, S.; MASE, T. (1991). «High-yield synthesis of monoglyceride by mono- and diacylglycerol lipase from *Penicillium camembertii* U-150». *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 72, núm. 3, p. 162-167.
- YAMAMOTO, C.; OKAMOTO, Y. (2004). «Practical resolution of enantiomers by high-performance liquid chromatography». A: TODA, F. [ed.]. *Enantiomer separation: Fundamentals and practical methods*. Dordrecht (Holanda); Boston: Kluwer Academic, p. 301-322.
- YU, D.; WANG, L.; GU, Q.; CHEN, P.; LI, Y.; WANG, Z.; CAO, S. (2007). «A two-step enzymatic resolution of glycidyl butyrate». *Process Biochemistry*, vol. 42, núm. 9, p. 1319-1325.



- ZHANG, J.; REDDY, J.; ROBERGE, C.; SENANAYAKE, C.; GREASHAM, R.; CHARTRAIN, M. (1995). «Chiral bio-resolution of racemic indene oxide by fungal epoxide hydrolases». *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 80, núm. 3, p. 244-246.
- ZOCHER, F.; ENZELBERGER, M. M.; BORNSCHEUER, U. T.; HAUER, B.; SCHMID, R. D. (1999). «A colorimetric assay suitable for screening epoxide hydrolase activity». *Analytica Chimica Acta*, vol. 391, núm. 3, p. 345-351.
- ZOU, J.; HALLBERG, B. M.; BERGFORS, T.; OESCH, F.; ARAND, M.; MOWBRAY, S. L.; JONES, T. A. (2000). «Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at 1,8 Å resolution: Implications for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases». *Structure*, vol. 8, núm. 2, p. 111-122.

## **APÈNDIX A: IDENTIFICACIONS MOLECULARS**

---



TAULA A.1. Identificació molecular dels fongs 5, 17, 10 i 19 mitjançant la comparació amb la base de dades del GenBank utilitzant l'eina BLAST

<i>Fong</i>	<i>Gen seqüenciat</i>	<i>Màxima identitat</i>	<i>Similitud (%)</i>	<i>Codi d'accés NCBI</i>
5	$\beta$ -tubulina	<i>Penicillium</i> sp.	<90	
17	ITS	<i>P. aurantiogriseum</i>	99	JN217241.1
10	ITS	<i>M. fragilis</i>	100	KM668158.1
19	$\beta$ -tubulina	<i>T. minioluteus</i>	100	KJ775214.1

L'espècie del fong 5 no es va poder identificar ni amb el gen  $\beta$ -tubulina ni amb el gen ITS.



## **APÈNDIX B: FUNCIONS DE CALIBRATGE**

---



TAULA B.1. Funcions de calibratge (calibratge sense la matriu miceli (SC), calibratge amb la matriu miceli i extracció prèvia a l'addició d'anàlit (post-MMC) i, calibratge amb la matriu miceli i extracció posterior a l'addició d'anàlit (pre-MMC))

Fong	Mètode de calibració	HPLC-UV				espectrofotometria UV-vis			
		ordenada a l'origen $\pm$ SD	pendent $\pm$ SD	$R^2$	$F_{exp}$	ordenada a l'origen $\pm$ SD	pendent $\pm$ SD	$R^2$	$F_{exp}$
<i>A. niger</i>	SC	254,3 $\pm$ 106,7	126883,0 $\pm$ 587,5	0,9999	46645,8	0,0027 $\pm$ 0,0092	0,1385 $\pm$ 0,0028	0,9980	2492,0
	post-MMC	333,9 $\pm$ 326,0	125162,8 $\pm$ 1794,6	0,9994	4864,1	0,0170 $\pm$ 0,0094	0,1393 $\pm$ 0,0028	0,9979	2411,0
	pre-MMC	850,3 $\pm$ 383,5	114015,0 $\pm$ 2111,3	0,9986	2916,3	0,0174 $\pm$ 0,0124	0,1299 $\pm$ 0,0037	0,9959	1210,4
<i>A. tubingensis</i>	SC	254,3 $\pm$ 106,7	126883,0 $\pm$ 587,5	0,9999	46645,8	0,0027 $\pm$ 0,0092	0,1385 $\pm$ 0,0028	0,9980	2492,0
	post-MMC	106,9 $\pm$ 396,2	127936,8 $\pm$ 2181,3	0,9991	3440,1	0,0172 $\pm$ 0,0097	0,1326 $\pm$ 0,0029	0,9976	2068,9
	pre-MMC	559,3 $\pm$ 480,4	112100,0 $\pm$ 2644,3	0,9978	1797,1	0,0106 $\pm$ 0,0070	0,1259 $\pm$ 0,0021	0,9986	3525,6
<i>P. aurantiogriseum</i>	SC	254,3 $\pm$ 106,7	126883,0 $\pm$ 587,5	0,9999	46645,8	0,0006 $\pm$ 0,0069	0,1386 $\pm$ 0,0021	0,9989	4496,3
	post-MMC	429,9 $\pm$ 154,2	125661,8 $\pm$ 849,0	0,9999	21907,3	0,0156 $\pm$ 0,0135	0,1359 $\pm$ 0,0041	0,9955	1118,9
	pre-MMC	1020,4 $\pm$ 150,0	111818,3 $\pm$ 825,5	0,9998	18348,7	0,0105 $\pm$ 0,0071	0,1252 $\pm$ 0,0021	0,9986	3460,6
<i>Penicillium</i> sp.	SC	254,3 $\pm$ 106,7	126883,0 $\pm$ 587,5	0,9999	46645,8	0,0006 $\pm$ 0,0069	0,1386 $\pm$ 0,0021	0,9989	4496,3
	post-MMC	390,0 $\pm$ 451,7	123520,5 $\pm$ 2486,4	0,9998	2467,9	0,0084 $\pm$ 0,0064	0,1342 $\pm$ 0,0019	0,9990	4884,7
	pre-MMC	875,0 $\pm$ 18,0	112725,0 $\pm$ 99,3	1,0000	1289866,3	0,0074 $\pm$ 0,0049	0,1249 $\pm$ 0,0015	0,9993	7040,7
<i>A. terreus</i>	SC	254,3 $\pm$ 106,7	126883,0 $\pm$ 587,5	0,9999	46645,8	0,0005 $\pm$ 0,0061	0,1424 $\pm$ 0,0019	0,9992	5911,9
	post-MMC	305,2 $\pm$ 263,2	128107,6 $\pm$ 1449,1	0,9996	7815,0	0,0062 $\pm$ 0,0061	0,1425 $\pm$ 0,0019	0,9992	5924,3
	pre-MMC	688,1 $\pm$ 78,0	114951,7 $\pm$ 429,3	0,9999	71705,1	0,0102 $\pm$ 0,0073	0,1259 $\pm$ 0,0022	0,9985	3243,4





**APÈNDIX C: EQUACIONS PER A L'AVAUACIÓ DE L'EFECTE DE  
LA MATRIU MICELI**

---



El model per comparar dues línies rectes ve donat per:

$$\hat{Y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 X + \hat{\beta}_2 Z + \hat{\beta}_3 XZ \quad (\text{C.1})$$

on  $Y$  és la resposta (l'àrea cromatogràfica o l'absorbància),  $X$  és la concentració i  $Z$  és una variable amb valor 1 quan hi ha efecte matriu i 0 quan no n'hi ha.

$$Z = 1: \hat{Y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 X + \hat{\beta}_2 + \hat{\beta}_3 X = (\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_2) + (\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_3) X \quad (\text{C.2})$$

$$Z = 0: \hat{Y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 X \quad (\text{C.3})$$

Quan no existeix efecte matriu, els pendents i les ordenades a l'origen d'aquestes dues rectes coincideixen. Per tant, els dos models que hauran de comparar-se seran:  $\hat{Y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 X + \hat{\beta}_2 Z + \hat{\beta}_3 XZ$  (model complet) i  $\hat{Y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 X$  (model reduït).

La hipòtesi nul·la que dues rectes coincideixen ( $H_0: \hat{\beta}_2 = \hat{\beta}_3 = 0$ ) podrà comprovar-se calculant la  $F$  de Snedecor experimental a partir de les següents equacions:

$$F_{\text{exp}} = \frac{[\text{SQ}_{\text{res}} (\text{model reduït}) - \text{SQ}_{\text{res}} (\text{model complet})]/k}{\text{MS}_{\text{res}} (\text{model complet})} \quad (\text{C.4})$$

$$F_{\text{exp}} = \frac{[\text{SQ}_{\text{res}}(X) - \text{SQ}_{\text{res}}(X, Z, XZ)]/[g_{\text{res}}(X) - g_{\text{res}}(X, Z, XZ)]}{[\text{SQ}_{\text{res}}(X, Z, XZ)/g_{\text{res}}(X, Z, XZ)]} \quad (\text{C.5})$$

on  $g_{\text{res}}(X)$  és el nombre total de graus de llibertat ( $n - 1$ ) menys el nombre de variables independents en el model reduït (és a dir, 1),  $g_{\text{res}}(X, Z, XZ)$  és el nombre total de graus de llibertat ( $n - 1$ ) menys el nombre de variables independents en el model complet (és a dir, 3) i  $g_{\text{res}}(X) - g_{\text{res}}(X, Z, XZ)$  és el nombre de coeficients de regressió amb valor 0 si es compleix la hipòtesi nul·la (és a dir, 2).

$$SQ_{\text{res}}(X) = \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \quad (\text{C.6})$$

on  $\hat{Y}_i = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 X_i$  ( $\hat{\beta}_0$  i  $\hat{\beta}_1$  són els valors estimats del pendent i de l'ordenada a l'origen de la recta de regressió que s'ajusta a tots els punts, respectivament) i  $n = n_{Z=1} + n_{Z=0}$ .

$$SQ_{\text{res}}(X, Z, XZ) = \sum_{i=1}^{n_{Z=1}} (Y_i - \hat{Y}_i)^2 + \sum_{i=1}^{n_{Z=0}} (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \quad (\text{C.7})$$

on  $\hat{Y}_i = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 X_i$  ( $\hat{\beta}_0$  i  $\hat{\beta}_1$  són els valors estimats del pendent i de l'ordenada a l'origen de cadascuna de les dues rectes de regressió, respectivament).

Els valors experimentals de  $F$  es compararan amb el valor crític  $F_{1-\alpha, k, n-1-k}$  generalment per a una significació del 95% i la hipòtesi nul·la de coincidència serà acceptada quan  $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$ .

## APÈNDIX D: DERIVATS ACETILATS

---



La reacció d'acetilació del *rac*-1,2-hexandiol (*rac*-1,2-octandiol) va donar com a producte predominant el *rac*-1,2-hexandiol 1,2-diacetat (*rac*-1,2-octandiol 1,2-diacetat) junt amb els regioisòmers *rac*-1,2-hexandiol 1-monoacetat (*rac*-1,2-octandiol 1-monoacetat) i el *rac*-1,2-hexandiol 2-monoacetat (*rac*-1,2-octandiol 2-monoacetat) (figura D.1).

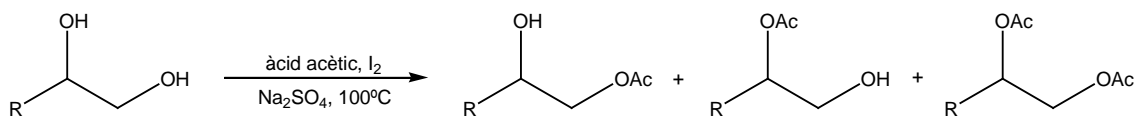


FIGURA D.1. Acetilació del *rac*-1,2-hexandiol (R: C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>) i del *rac*-1,2-octandiol (R: C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>).

La proporció de derivats mono- i diacetats es va determinar a partir de l'àrea del senyal del protó del CH secundari. Els espectres de RMN de <sup>1</sup>H expandits es mostren en les figures D.2 i D.4. Els desplaçaments químics del senyal del protó del CH secundari apareixen en les taules D.1 i D.2. Els temps de retenció dels compostos acetilats es poden veure en les figures D.3 i D.5.

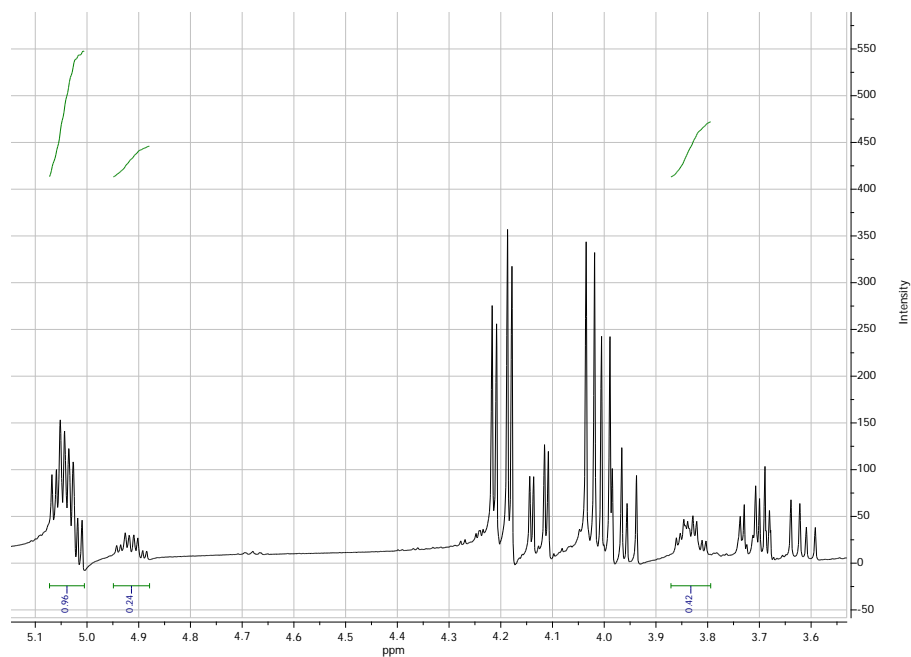


FIGURA D.2. Expansió de la regió 3,6-5,1 ppm de l'espectre de RMN de <sup>1</sup>H dels derivats acetilats del *rac*-1,2-hexandiol.



## Apèndix D

TAULA D.1. Proporció i desplaçament químic del senyal del protó del **CH** secundari dels derivats acetilats del *rac*-1,2-hexandiol

Protó	Desplaçament químic (ppm)	Àrea	Proporció (%)
$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH(OH)-CH}_2\text{(OAc)}$	3,80-3,87	0,42	25,93
$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH(OAc)-CH}_2\text{(OH)}$	4,88-4,95	0,24	14,81
$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH(OAc)-CH}_2\text{(OAc)}$	5,01-5,07	0,96	59,26

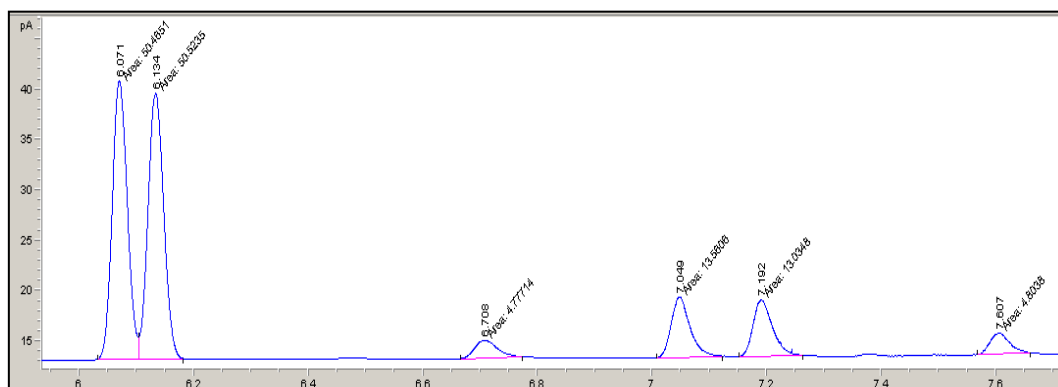


FIGURA D.3. Cromatograma de gasos (GC-FID quiral) dels derivats acetilats del *rac*-1,2-hexandiol. Els temps de retenció dels compostos presents en la mescla de reacció són: *rac*-1,2-hexandiol 1,2-diacetat (6,07 min i 6,13 min); *rac*-1,2-hexandiol 1-monoacetat (7,05 min i 7,19 min); *rac*-1,2-hexandiol 2-monoacetat (6,70 min i 7,61 min). Les condicions cromatogràfiques es poden trobar en l'apartat 3.2.19.

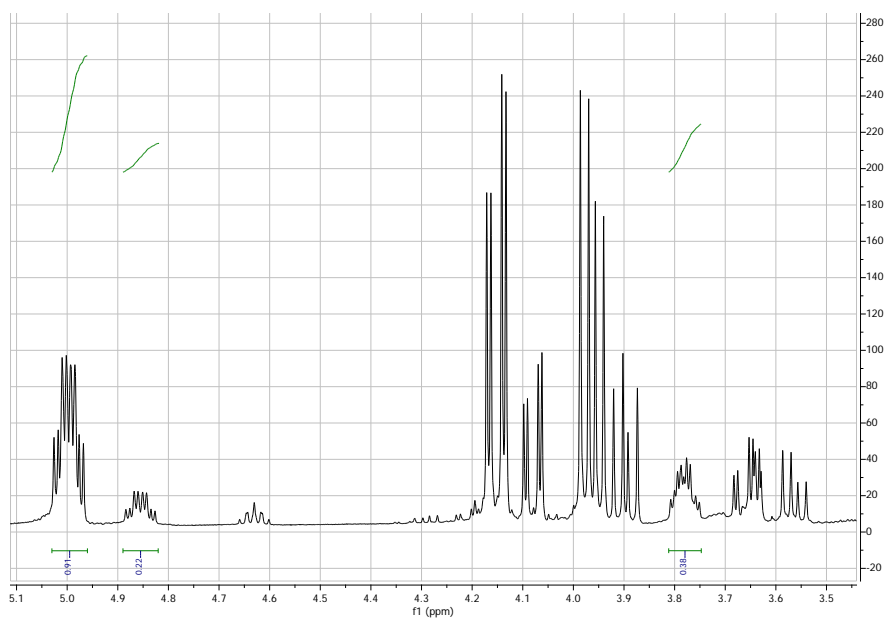


FIGURA D.4. Expansió de la regió 3,5-5,1 ppm de l'espectre de RMN de  $^1\text{H}$  dels derivats acetilats del *rac*-1,2-octandiòl.

TAULA D.2. Proporció i desplaçament químic del senyal del protó del CH secundari dels derivats acetilats del *rac*-1,2-octandiòl

Protó	Desplaçament químic (ppm)	Àrea	Proporció (%)
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5\text{-CH(OH)-CH}_2(\text{OAc})$	3,75-3,81	0,38	25,17
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5\text{-CH(OAc)-CH}_2(\text{OH})$	4,82-4,89	0,22	14,57
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5\text{-CH(OAc)-CH}_2(\text{OAc})$	4,96-5,03	0,91	60,26



## **APÈNDIX E: ARTICLES EN REVISIÓ**

---



La present Tesi Doctoral ha donat lloc, fins al moment, a dos articles els quals es troben en procés de revisió.

DOLCET, M. M.; TORRES, M; CANELA, R. (2015). «Effect of fungal mycelia on the HPLC-UV and UV-vis spectrophotometric assessment of mycelium-bound epoxide hydrolase using glycidyl phenyl ether». *New Biotechnology*.

DOLCET, M. M.; TORRES, M; CANELA, R. (2015). «Raw and waste plant materials as sources of fungi with epoxide hydrolase activity. Application to the kinetic resolution of aryl and alkyl glycidyl ethers». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

