



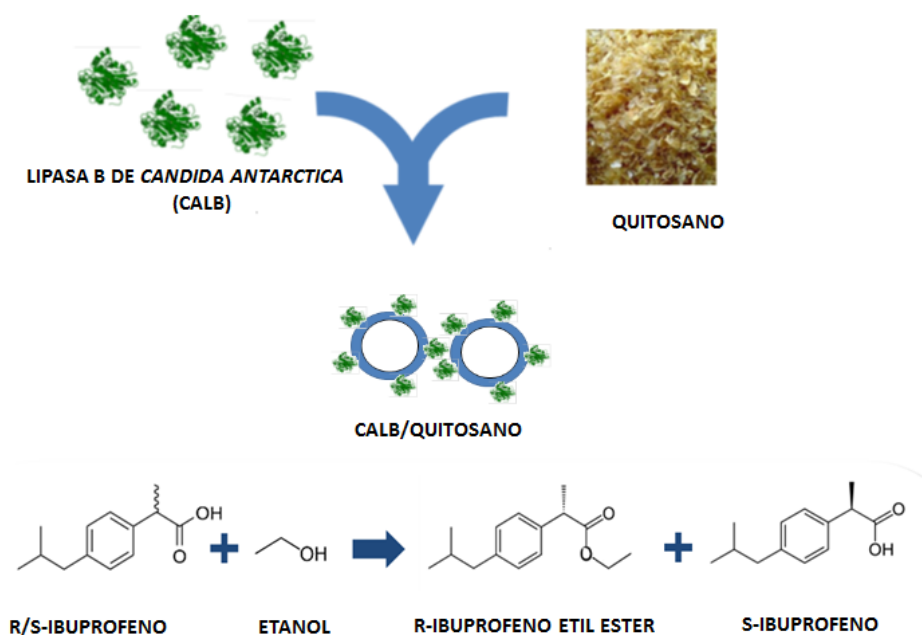
APLICACIÓN DE LA LIPASA B DE CANDIDA ANTARCTICA INMOVILIZADA SOBRE QUITOSANO A LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DE R/S-IBUPROFENO

Carla José^{1*}, Laura E. Briand¹

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas-Dr. Jorge J. Ronco, Universidad Nacional de La Plata, CONICET, CCT La Plata, Calle 47 No 257, B1900AJK La Plata, Buenos Aires, Argentina

*Autor Corresponsal: carlajose@quimica.unlp.edu.ar

Resumen Gráfico



Resumen

La presente investigación evaluó la performance catalítica de la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en quitosano aplicada a la esterificación de rac-ibuprofeno con alcoholes de cadena corta, con y sin co-solvente agregado. Se evidencia que la adsorción de CALB sobre quitosano permite obtener un catalizador activo en la resolución cinética de rac-ibuprofeno, resultando actividades específicas iguales o levemente superiores a las obtenidas con el catalizador de referencia Novozym®4345. Las mejores performances catalíticas fueron obtenidas al emplear etanol como agente nucleofílico para ambos catalizadores. Respecto a la enantioselectividad, CALB adsorbida en quitosano resultó poco selectiva en las condiciones estudiadas, aumentando la discriminación de enantiómeros en presencia de acetonitrilo, condición en la cual el S-ibuprofeno es esterificado a

mayor velocidad. Sin embargo, la actividad observada para este nuevo catalizador plantea la optimización de variables en la resolución cinética y su potencial aplicación en síntesis de prodrugs de rac-ibuprofeno.

Abstract

The present investigation evaluated the catalytic performance of the lipase B of *Candida antarctica* immobilized in chitosan applied to the esterification of rac-ibuprofen with short chain alcohols, with and without added co-solvent. It is evident that the adsorption of CALB on chitosan allows to obtain an active catalyst in the kinetic resolution of rac-ibuprofen, resulting in specific activities equal or slightly higher than those obtained with the reference catalyst Novozym®4345. The best catalytic performances were obtained by using ethanol as a nucleophilic agent for both catalysts. Regarding the enantioselectivity, CALB adsorbed on chitosan was not selective in the conditions studied, increasing the discrimination of enantiomers in the presence of acetonitrile, a condition in which S-ibuprofen is esterified at a higher rate. However, the activity observed for this new catalyst raises the optimization of variables in the kinetic resolution and potential application in synthesis of rac-ibuprofen prodrugs.

Palabras Clave: biocatálisis, enantiómeros, profenos, lipasas, enzimas inmovilizadas.
Keywords: biocatalysis, enantiomers, profens, lipases, immobilized enzymes.

1. Introducción

El ibuprofeno, ácido (RS)-2-(p-isobutilfenil) propiónico, se caracteriza por su actividad anti-inflamatoria, antipirética y analgésica. El uso farmacológico de este compuesto está muy difundido en nuestro país y en el mundo debido a su efectividad en las dosis recomendadas [1]. La actividad farmacológica de los derivados del ácido 2-arilpropiónico está directamente relacionada con la quiralidad del compuesto. En el caso específico del ibuprofeno, el enantiómero S(+) es 100 veces más activo que el R(-) [2]. Por otro lado, las ingestas recurrentes de la mezcla racémica causan efectos colaterales como hemorragias y úlceras gastrointestinales debido a la acidez combinada de ambos isómeros [3].

Actualmente la tendencia de la industria farmacéutica se orienta hacia el uso de los enantiómeros puros ya que estos presentan algunas ventajas como reducción de la carga metabólica, renal o hepática, menores interacciones con otras drogas y probabilidad de efectos laterales. Por lo dicho, la obtención del isómero farmacológicamente activo es un aspecto de creciente interés en las áreas de desarrollo y manufactura de medicamentos.

Investigaciones reportadas por nuestro grupo de investigación evidencian que la lipasa comercial Novozym®435 (lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) adsorbida sobre polimetilmetacrilato) cataliza selectivamente la esterificación del R(-)-ibuprofeno favoreciendo la concentración del enantiómero deseado, S(+)-ibuprofeno, no-esterificado [4,5]. Más aún, se ha demostrado que es posible la esterificación del fármaco con etanol en un medio libre de co-solvente (convencionalmente se utilizan isooctano, heptano y hexano como co-solventes) alcanzándose una conversión de 62 % y un exceso enantiomérico del S(+)-ibuprofeno remanente de 54 %. Estudios más recientes demostraron que el etanol provoca disgregación del biocatalizador comercial [6-8]. Frente al hallazgo de los efectos del etanol

sobre Novozym®435, se decidió abordar distintas estrategias como el reemplazo del etanol por otro alcohol de cadena corta (1-propanol o 2-propanol), y disminuir el volumen de etanol incorporando un co-solvente al sistema. Sin embargo, el biocatalizador comercial mostró su mejor performance en cuanto al avance de reacción y resolución enantiomérica al emplear etanol como sustrato y solvente [9-11]. En este contexto, la síntesis de nuevos materiales biocatalíticos resistentes a los alcoholes se plantea como una alternativa que permitiría reemplazar el biocatalizador comercial importado por uno nacional.

Es bien conocido que cualquier material que se considere para su uso como soporte de enzimas debe contar con ciertas características tales como: alta afinidad por proteínas, grupos funcionales disponibles para interactuar con las enzimas o para su modificación química, estabilidad mecánica y rigidez, factibilidad de ser regenerado, y al menos en principio, tener alta área superficial. En función de su aplicación podría requerirse que el material no resulte tóxico (biocompatible) y biodegradable. Asimismo, el material debería ser de bajo costo para que su aplicación resulte económicamente atractiva [12,13]. En nuestro caso particular, se busca un soporte insoluble en alcoholes de cadena corta ya que como se discutió anteriormente, se busca mejorar la estabilidad química de Novozym®435.

El quitosano es un amino polisacárido (1-4)-2-amino-2-deoxi- β -Dglucano obtenido por D-acetilación alcalina de la quitina (1-4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucano, polisacárido duro, inelástico y nitrogenado que se encuentra en las paredes de algunos hongos y en el exoesqueleto de artrópodos tales como insectos, escarabajos y crustáceos. Se reportan múltiples aplicaciones de quitosano con diferentes propósitos en la industria farmacéutica, médica, alimentaria, de síntesis orgánica y biológica [14, 15]. Este soporte proporciona ventajas como su versatilidad y disponibilidad en diferentes formas (hojuelas, lechos porosos, geles, fibras y membranas), baja biodegradabilidad, bajo costo, fácil manejo, alta afinidad con proteínas y no toxicidad [16], además presenta propiedades físicas, químicas y biológicas muy particulares debido a sus iones catiónicos. Esta condición singular permite aplicarla en un extenso abanico de aplicaciones [16, 17].

En este contexto, la presente investigación evalúa la performance de un nuevo biocatalizador, basado en la lipasa B de *Candida antarctica* adsorbida en quitosano (C/Q) en una reacción de interés industrial como la resolución cinética de rac-ibuprofeno. Se estudió la esterificación de rac-ibuprofeno con alcoholes de cadena corta (etanol, 1-propanol y 2-propanol) sin co-solvente agregado. Adicionalmente se investigó el efecto del agregado de un co-solvente orgánico hidrofóbico (isooctano) e hidrofílico (acetonitrilo).

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

La lipasa B de *Candida antarctica* de grado técnico (CALB L, batch LCN02102 y LCN02103) y el biocatalizador comercial Novozym® 435 (batch LC200217) fueron obtenidos como regalo de Novozymes Brasil (Paraná, Brazil). La lipasa B *Candida antarctica* pura (35,500 g/mol) fue comprada a Sigma Aldrich Argentina (10,9 U/mg). El nuevo catalizador C/Q (CALB adsorbida en Quitosano) fue provisto por la Dra. María Luján Ferreira (PLAPIQUI, Bahía Blanca, Argentina) en el marco de un proyecto de colaboración científica, detalles de síntesis del catalizador fueron reportados [17]. Quitosano (Q) polvo de cáscaras de crustáceos (Primex Ingredients ASA Noruega batch TM 369) posee 3-5 m²g⁻¹ de área superficial; 70 000-80 000 g/mol y grado de desacetilación de 85,2 %. Etanol absoluto (Carlo Erba 99,8%). 1-propanol (Sigma Aldrich ≥ 99,5 %). 2-propanol (J.T. Baker ≥ 99,93%). rac-ibuprofeno (Parafarm, 99,23%). Isooctano (99,5% Carlo Erba). Acetonitrilo (Carlo Erba 99,9%). Hidróxido de potasio en etanol 1M (Riedel-de Haen).

2.2. Cuantificación de lipasa inmovilizada mediante espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado por inducción de alta resolución (ICP-AES)

La concentración de proteína en el biocatalizador se determinó midiendo el contenido de azufre a través de ICP-AES de alta resolución (Shimadzu ICPE 9000) en combinación con el método Bradford modificado [18]. La cantidad de lipasa se calculó considerando que una molécula de CALB (peso molecular igual a 33 kDa) posee diez aminoácidos con azufre en la estructura [19].

Los biocatalizadores fueron digeridos con agua regia en caliente. Posteriormente, se cuantificó azufre por ICP-AES en el líquido resultante, siendo la única fuente de azufre la proteína.

2.3. Reacciones de esterificación

2.3.1 Esterificación de rac-ibuprofeno con alcoholes de cadena corta, sin co-solvente.

Se investigó la esterificación de rac-ibuprofeno con alcoholes de cadena corta: etanol, 1-propanol y 2-propanol. La esterificación de 0,5000 g (2,42 mmol) de rac-ibuprofeno se realizó en viales herméticamente cerrados empleando alcohol como reactivo y solvente (1 mL) en relación molar alcohol : profeno de 7,08. El contenido de agua inicial fue 4,76 % v/v. La esterificación se llevó a cabo a 45 °C y agitación constante (200 rpm) en un baño de agua (Julabo SW22, Alemania). Las reacciones se iniciaron con el agregado del biocatalizador

correspondiente (Novozym® 435, C/Q), el cual se empleó en relación 160 mg de catalizador por cada mL de alcohol. Las condiciones de reacción corresponden a las previamente halladas como óptimas para Novozym® 435 al emplear etanol como agente nucleófilo y disolvente [5].

Además, se realizaron los blancos de reacción para determinar el grado de avance y la enantioselectividad de la reacción no catalizada. En estos ensayos se utilizó una relación molar de alcohol: ácido igual a 7,08: 1 en ausencia de biocatalizador.

2.3.2. Esterificación de ibuprofeno con etanol en presencia de co-solvente.

La evaluación de diferentes co-solventes orgánicos consistió en llevar a cabo la esterificación disminuyendo el volumen de etanol y por lo tanto variando la relación molar entre reactivos (ibuprofeno y etanol). En todos los casos, se hicieron reaccionar 0,5000 g (2,42 mmol) de rac-ibuprofeno con un volumen definido de etanol absoluto en presencia de un disolvente orgánico (acetonitrilo, isooctano). Los volúmenes empleados de co-solvente corresponden a los volúmenes mínimos necesarios para disolver 0,5 g de ibuprofeno, requiriéndose 20,00 mL de isooctano y 2,00 mL de acetonitrilo respectivamente. Se añadió agua destilada en un 4,76 % v/v solo en aquellos sistemas de reacción en los que el disolvente era miscible en agua. Las reacciones fueron iniciadas por adición del biocatalizador, el cual se utilizó en una relación correspondiente a 160 mg por mL de alcohol. Los volúmenes de etanol absoluto (0,14-0,20-0,35-0,60-0,80 y 1,00 mL) correspondieron a las siguientes proporciones molares de alcohol: ácido: 1: 1; 1,42: 1; 2,47: 1; 4,25: 1; 5,70: 1 y 7,08 : 1, respectivamente.

2.4. Análisis de las muestras

La conversión (X%) y el exceso enantiomérico de sustrato (eeS%) se determinaron luego de 48 horas de reacción, tiempo previamente determinado como óptimo para el biocatalizador comercial de referencia [5]. El análisis de ambos enantiómeros se realizó por cromatografía líquida de alta resolución en una columna quiral Nucleodex beta-PM (Macherey-Nagel, Alemania) con detector UV a 230 nm. La fase móvil (metanol: 0,1% TEAA pH 4,0 60:40 v/v) operó a 0,700 mL/min.

El exceso enantiomérico referido al S-ibuprofeno remanente se calculó de acuerdo a la ecuación (1), donde [S] y [R] representan las concentraciones de los enantiómeros S y R respectivamente.

$$eeS \% = \frac{[S] - [R]}{[S] + [R]} * 100 \quad (1)$$

La conversión de profeno también se verificó por titulación de la mezcla de reacción final con una solución básica de KOH en etanol de concentración conocida [5]. La actividad específica se calculó como la cantidad de profeno convertido a etiléster (μmol) por cantidad de enzima (mg) y tiempo (hora).

3. Resultados

3.1. Efecto de la naturaleza del alcohol

La Figura 1 muestra los valores de conversión, actividad específica (1 A) y exceso enantiomérico hacia el enantiómero S (+) (1 B) obtenidos en la esterificación de rac-ibuprofeno con diferentes alcoholes de cadena corta, sin co-solvente agregado. Los resultados muestran claramente que el alcohol secundario posee un impacto negativo en el rendimiento y selectividad biocatalítica, muy probablemente debido a impedimento estérico del alcohol en el sitio activo como se demostró previamente para la esterificación con ketoprofeno [9].

3.2. Efecto de la relación molar de sustratos en solventes orgánicos de polaridad opuesta: isooctano y acetonitrilo

La Figura 2 muestra los valores de actividad específica (Figura 2 A) y exceso enantiomérico hacia la especie S (+)-ibuprofeno (Figura 2 B) obtenidos en la esterificación de rac-ibuprofeno con etanol catalizada por C/Q. En estos ensayos se emplea un co-solvente orgánico, específicamente se evaluó el efecto de isooctano (solvente orgánico hidrófobo) y acetonitrilo (disolvente orgánico hidrófilo). Se usaron diversas relaciones molares, variando el volumen de etanol añadido al sistema como se describe en la sección experimental.

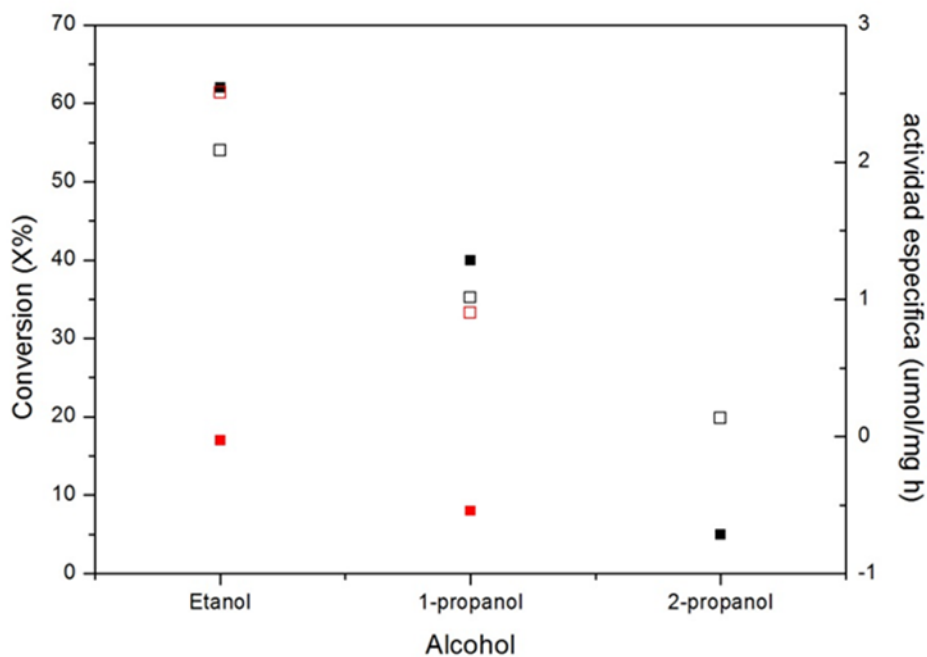


Figura 1 A. Efecto de la naturaleza del alcohol sobre la conversión y actividad específica de C/Q en la esterificación de rac-ibuprofeno. Relación molar alcohol: rac ibuprofeno 7,08:1. Los símbolos negros corresponden a Novozym®435 y los rojos a C/Q. Conversión (cuadrados llenos) y actividad específica (cuadrados vacíos).

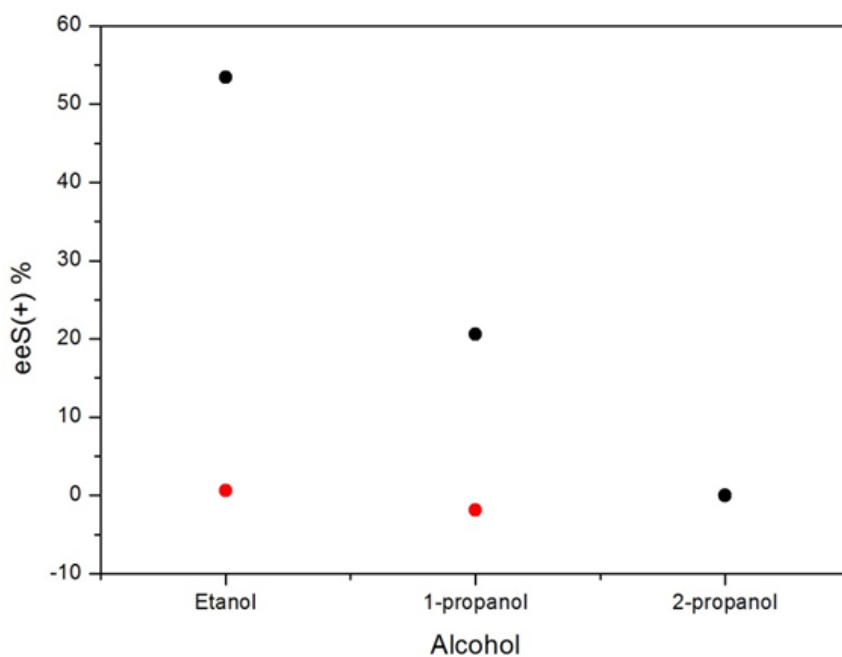


Figura 1 B. Efecto de la naturaleza del alcohol sobre la enantioselectividad de C/Q en la esterificación de rac-ibuprofeno. Relación molar alcohol: rac ibuprofeno 7,08:1. Los símbolos negros corresponden a Novozym® 435 y los rojos a C/Q.

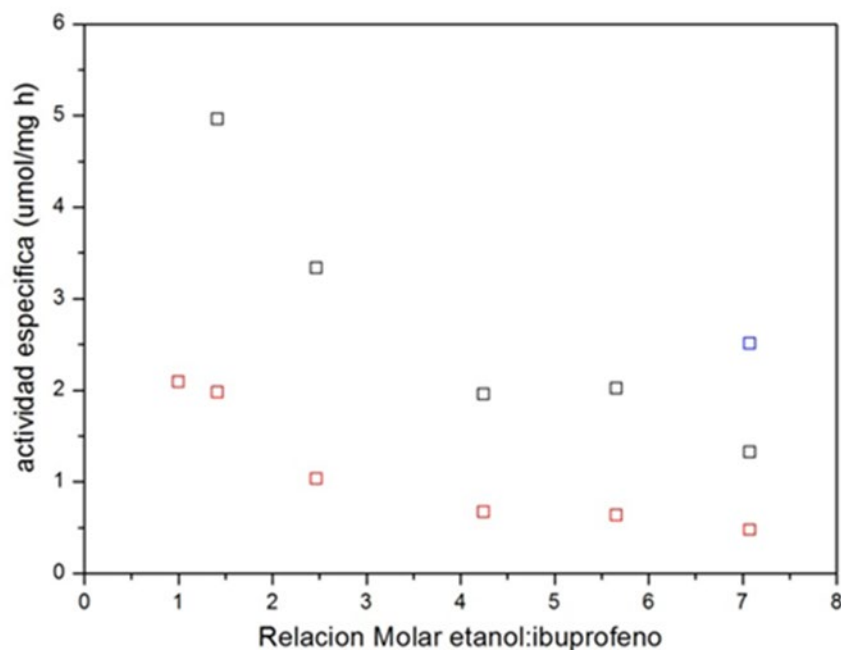


Figura 2 A. Efecto de la relación molar alcohol/ácido en la actividad específica de C/Q. aplicado a la esterificación de rac-ibuprofeno con etanol en presencia de co-solvente. Se muestran adicionalmente los valores de actividad específica obtenidos con etanol sin co-solvente agregado en iguales condiciones de reacción. Rojo: isooctano, negro: acetonitrilo y azul: sin co-solvente.

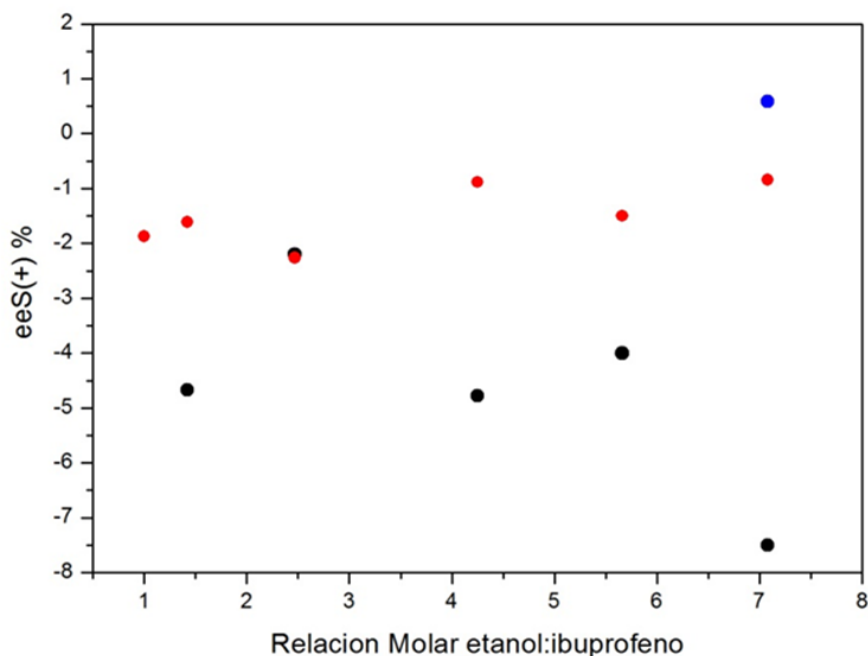


Figura 2 B. Efecto de la relación molar alcohol/ácido sobre la enantioselectividad de C/Q aplicado a la esterificación de rac-ibuprofeno con etanol en presencia de co-solvente (isooctano y acetonitrilo). Se muestran comparativamente los valores de ee S (+) % obtenidos con etanol como reactivo y solvente. Rojo: isooctano, negro: acetonitrilo y azul: sin co-solvente.

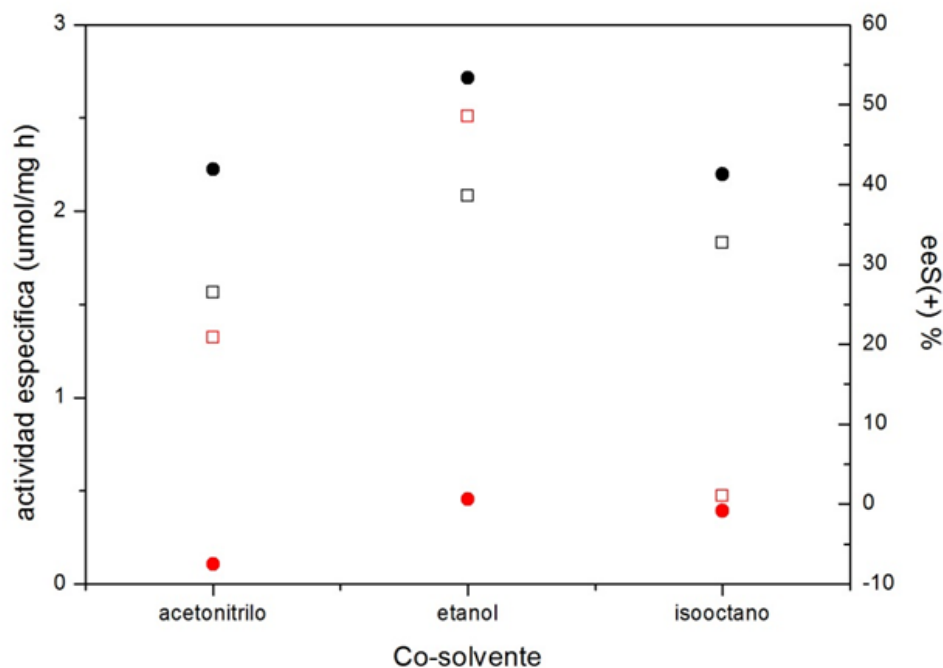


Figura 3. Efecto del co-solvente en la performance biocatalítica de C/Q y Novozym®435. Actividad específica (cuadrados vacíos) y exceso enantiomérico eeS% (círculos llenos) obtenidos en la esterificación de rac-ibuprofeno con etanol en presencia y ausencia de co-solvente. Catalizadores: C/Q (símbolos rojos) y Novozym®435 (símbolos negros). Condiciones de reacción: relación molar etanol:rac-ibuprofeno 7,08:1, 48 hs, 45 °C, 200 rpm, 160 mg catalizador por mL etanol.

4. Discusión

El efecto de la naturaleza del alcohol en las resoluciones enzimáticas de profenos ha sido ampliamente reportado en la literatura [20-26]. En este sentido, resulta una tendencia generalizada la obtención de mayores conversiones y actividades específicas al emplear alcoholes primarios en esterificaciones catalizadas por lipasas, resultando bajas actividades al emplear alcoholes secundarios y nulas cuando se emplean alcoholes o polioles terciarios. Es bien sabido que la formación del complejo acil-enzima es el paso clave en este tipo de reacciones; por lo tanto, la conversión del profeno depende de la accesibilidad del acil-aceptor (el alcohol en este caso) al complejo.

El comportamiento observado en la esterificación de rac-ibuprofeno con alcoholes primarios y secundarios utilizando el catalizador comercial Novozym® 435 y el catalizador propio, C/Q, está de acuerdo con la investigación reportada por Arroyo et al. [23,24]. Evidenciándose mayor actividad enzimática al emplear alcoholes primarios (etanol y 1-propanol) respecto del uso de un alcohol secundario (2-propanol). Adicionalmente, se observa que un aumento en la longitud del alcohol posee efecto negativo sobre actividad y selectividad enzimática, efecto observado para ambos catalizadores pero mucho más marcado para Novozym®435,

concordando esto con reportes acerca del efecto de los alcoholes primarios lineales en la esterificación enzimática de profenos. Sin embargo, pocos informes abordan el uso de etanol [20, 22, 25-27]. El efecto sobre el progreso de la reacción se atribuye a las diferencias en la velocidad de difusión hacia la lipasa inmovilizada y las diferencias en la nucleofilia del alcohol, la cual disminuye al aumentar la longitud de la cadena carbonada.

Respecto a la comparación del catalizador propio y el comercial, es muy importante el hallazgo de actividades específicas (actividad enzimática) similares para ambos, atribuyéndose las diferencias observadas en la conversión a la carga enzimática de cada catalizador. En este sentido, Novozym®435 posee 9,68 % p/p de lipasa inmovilizada mientras que C/Q posee solo un 2,14 % p/p. Sin embargo el nuevo catalizador no resultó selectivo a diferencia de Novozym®435. Estos resultados muestran que un soporte hidrofílico puede utilizarse para inmovilizar a CALB en conformación activa, tan activa como un soporte hidrofóbico.

La investigación de la esterificación de rac-ibuprofeno con etanol catalizada con C/Q usando dos solventes de propiedades opuestas como, isooctano ($\log P = 4.5$, constante dieléctrica $\epsilon = 1.94$) y acetonitrilo ($\log P = -0.33$ y $\epsilon = 36,6$) evidencia que independientemente de la relación molar de sustratos, se obtienen mayores actividades específicas al emplear acetonitrilo respecto al uso de isooctano, como se muestra en la figura 2 A. Hemos reportado previamente un comportamiento diferente para Novozym®435 en ensayos análogos [10].

Para Novozym®435 se observó influencia de la naturaleza del co-solvente en condiciones estequiométricas de sustratos o de bajo exceso de etanol, más específicamente a relaciones molares alcohol:ácido menores a 2,47:1. En tales condiciones la presencia de isooctano favoreció por mucho la actividad y enantioselectividad del catalizador comercial respecto del acetonitrilo. Por el contrario a mayores relaciones molares de sustratos (de 2,47:1 a 7,08:1) la actividad y enantioselectividad resultó independiente de la naturaleza del co-solvente, siendo el gran exceso de etanol el determinante del comportamiento catalítico. [10]. Tales diferencias pueden atribuirse a la naturaleza del soporte. El quitosano es de naturaleza hidrofílica puede atraer moléculas de agua a su superficie. Un entorno acuoso para una lipasa favorece la hidrólisis en vez de la esterificación, causando disminución en los valores de conversión obtenidos. Además la flexibilidad de las enzimas se relaciona con la cantidad de agua presente en su entorno reportándose una relación inversa entre flexibilidad y enantioselectividad. La presencia de un co-solvente hidrofílico favorece la remoción de agua desde la superficie del soporte hacia el *bulk*, disminuyendo el efecto de reversibilidad y

favoreciendo la esterificación. El efecto en la selectividad también era esperado si bien requiere de estudios de optimización.

Por otro lado, Novozym®435 posee un soporte hidrofóbico (polimetilmetacrilato entrecruzado con divinilbenceno) y los resultados obtenidos indican que la presencia de solvente hidrofóbico favorece la actividad de la CALB en este sistema, estando de acuerdo con reportes bibliográficos sobre lipasas inmovilizadas en este tipo de soportes, que han sido los más estudiados. Esto se debe al conocido efecto de activación superficial de la mayoría de las lipasas. En este sentido, un soporte hidrofóbico favorece la inmovilización de lipasas en conformación abierta por favorecer la apertura de la lid o en el caso particular de CALB, de su lid incompleta (hélices móviles cercanas al sitio activo $\alpha 5$ y $\alpha 10$) [28]

Adicionalmente, la figura 2A evidencia disminución de la actividad específica con el aumento de volumen de etanol (aumento de relación molar) en presencia de co-solvente, tanto hidrofóbico como hidrofílico.

Respecto a la enantioselectividad, la figura 2B evidencia que el catalizador C/Q no resulta enantioselectivo en ninguna de las condiciones estudiadas. Si bien debe destacarse que el acetonitrilo mejora la discriminación de enantiómeros y sorprendentemente con S-preferencia, obteniéndose valores negativos de eeS%. Estas observaciones pueden atribuirse a la rigidez-flexibilidad de CALB en este sistema de soporte y co-solvente hidrofílicos como se indicó anteriormente.

La figura 3 permite comparar y discutir más fácilmente las performances de los catalizadores (propio y comercial) con y sin co-solvente agregado. Para una relación molar etanol:Profeno 7,08:1, la cual es la menor relación molar posible sin agregado de co-solvente (límite dado por la solubilidad del ibuprofeno) ambos biocatalizadores resultan más activos en ausencia de co-solvente. Así, el desempeño de C/Q depende de las características fisicoquímicas de la mezcla etanol-co-solvente, aún en presencia de un importante exceso de etanol, a diferencia de lo observado para Novozym®435 [10]. El agregado de isooctano provocó una importante pérdida de actividad desde 2,51 a 0,47 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ enzima hora para C/Q. Por otro lado, el catalizador comercial mostró leve disminución de actividad y selectividad por el agregado de co-solvente, ya sea hidrofóbico o hidrofílico.

Se observa buena enantioselectividad para el catalizador de referencia Novozym®435, obteniéndose la mejor performance tanto de actividad como enantioselectividad en el sistema sin co-solvente agregado. Respecto al catalizador sintetizado C/Q, la actividad resultó muy buena y semejante al catalizador comercial, pero la enantioselectividad resultó pobre en las

condiciones estudiadas. Se observó que la presencia de acetonitrilo mejora la selectividad acelerando la esterificación del S-ibuprofeno.

La presente investigación evidencia que un soporte hidrofílico y económico como Quitosano puede utilizarse para inmovilizar lipasas y generar un biocatalizador activo. En este sentido, la actividad específica en la esterificación de rac-ibuprofeno con alcoholes primarios de cadena corta resultó tan buena como la reportada para el renombrado Novozym®435 (soporte hidrofóbico de polimetilmetacrilato). Resultando importante la evidencia de buena actividad de C/Q en etanol, reactivo eco-compatible y de bajo costo, existiendo pocos reportes de su uso por atribuirle actividad deshidratante de proteínas.

En base a los resultados discutidos, que corresponden a un screening del catalizador obtenido por nuestro grupo de trabajo, seguimos optimizando condiciones de reacción para este sistema catalítico, buscando principalmente una mejora de enantioselectividad. Sin embargo, la actividad observada lo hace importante como potencial catalizador para la obtención de prodrogas de profenos.

5. Conclusiones

El catalizador sintetizado, C/Q, basado en CALB adsorbida en quitosano demostró actividades enzimáticas similares a las observadas para el catalizador comercial de referencia Novozym®435 al aplicarse a la esterificación de rac-ibuprofeno con alcoholes de cadena corta. Esta investigación demuestra que un soporte hidrofílico puede ser empleado para obtener un catalizador activo por inmovilización de lipasas. Adicionalmente se evidenció el efecto negativo de alcoholes secundarios sobre la actividad de CALB, atribuido esto a impedimento estérico en el sitio activo y la disminución de actividad enzimática con un aumento del volumen de alcohol en el sistema. Respecto a la selectividad, el nuevo catalizador mostró baja enantioselectividad a diferencia de Novozym®435.

Resulta importante destacar que se evalúa la actividad en etanol, reactivo atractivo desde un punto de vista económico y eco-compatible, poco aplicado en catálisis enzimática. Considerando que el quitosano es atractivo desde el punto de vista de disponibilidad y bajo costo los resultados obtenidos resultan relevantes.

Agradecimientos

Los autores agradecen el soporte financiero provisto por FONCyT (PICT 0544), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas CONICET de Argentina (proyecto PIP 11220130100171 CO) y Universidad Nacional de La Plata (proyecto 11X-745); y a la Dra. María Luján Ferreira (PLAPIQUI, Bahía Blanca, Buenos Aires Argentina).

Referencias

- [1] G. H. Marín, M. Cañas, C. Homar, M. Perrotta; *Lat. Am. J. of Pharmacy*, **2008**, 27, 532-542.
- [2] [2] P. K. Halen, P. R. Murumkar, R. Giridhar, M. R. Yadav; *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2009**, 9, 124-139.
- [3] J. Flórez J., *Farmacología Humana*, 4^oed. **2003**, ISBN: 9788445812907, editorial Masson, Barcelona, España.
- [4] C. José, L. E. Briand, 238th American Chemical Society National Meeting, Division of Catalysis Science and Technology, Washington D.C., USA, **2009**, CATL014, 137.
- [5] M. L. Foresti, M. Galle, M.L. Ferreira, L.E. Briand, *J. Chem. Technol. Biot.*, **2009**, 84, 1461-1473.
- [6] C. José, L. E. Briand, *React. Kinet. Mech. Catal.*, **2010**, 99, 17-22.
- [7] C. José, R. D. Bonetto, L. A. Gambaro, M. P. Guauque Torres, M. L. Foresti, M. L. Ferreira, L. E. Briand, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **2011**, 71, 95-107.
- [8] C. José, G. B. Austic, R. D. Bonetto, R. M. Burton, L. E. Briand, *Catal. Today*, **2013**, 213, 73-80.
- [9] M. V. Toledo, C. José, S. E. Collins, R. D. Bonetto, M. L. Ferreira, L. E. Briand, *J. Mol. Catal B: Enz.*, **2012**, 83, 108-119.
- [10] C. José, M. V. Toledo, J. Osorio Grisales, L. E. Briand, *Current Catalysis*, 3 (2014) 131-138.
- [11] M. V. Toledo, C. José, S. E. Collins, M. L. Ferreira, L. E. Briand, *J. Mol. Catal B: Enzym.* 118 (2015) 52-61.
- [12] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernández-Lorente., J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enz. Microb. Technol.*, **2007**, 40, 1451-1463.
- [13] Linqiu Cao, *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*. **2005**, ISBN: 3-527-31232-3, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania.
- [14] V. M. Balcao, A. L. Paiva, F. X. Malcata, *Enzyme Microb Technol.*, **1996**, 18, 392-416.
- [15] C. V. Valenzuela, J. I. Arias, *Avances en Ciencias Veterinarias*, **2012**, 27, 33-47.
- [16] Mamoru Iso, Baoxue Chen, Masashi Eguchi, Takashi Kudo, Surekha Shrestha, *J. Mol. Catal B: Enzym.*, **2001**, 16, 53-58.
- [17] M.L. Foresti, M. L. Ferreira, *Enzyme Microb. Tech.* **2007**, 40, 769-777.
- [18] P. Nicolas, V. Lassalle, M. L. Ferreira, *Enzyme Microb. Tech.*, **2017**, 97, 97-103.
- [19] J. Uppenberg, M.T. Hansen, S. Patkar, T.A. Jones, *Structure*, **1994**, 2, 293-308.
- [20] Y. Liu, F. Wang, T. W. Tan, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **2009**, 56,126-130.
- [21] M. T. López-Belmonte, A. R. Alcántara, J. V. Sinisterra, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 1831-1840.
- [22] J. Ceynowa, M. Rauchfleisz, *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **2003**, 23, 43-51.
- [23] M. Arroyo, J. V. Sinisterra., *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 4410-4417.
- [24] M. Arroyo Sánchez, *Síntesis de ácidos 2-aril-propiónicos homoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas*. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid, España. **1995**.

-
- [25] D-t Zhao., X. Er-na, W. Jia-xin, W. Ren, W. Xiao-fei, W. Lei, W. Zhi, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **2011**, 16, 638-644.
- [26] A. L. Ong, A. H. Kamaruddin, S. Bhatia, W. S. Long, S. T. Lim, R. Kumari, *Enz. Microb. Technol.*, **2006**, 39, 924–929.
- [27] N. D’Antona, P. Lombardi, G. Nicolosi, G. Salvo, *Process Biochem.*, **2002**, 38, 373-377.
- [28] T. Zisis, P.L. Freddolino, P. Turunen, M.C.F. van Teeseling, A.E. Rowan, K.G.Blank, *Biochem.*, **2015**, 24, 5969-5979.