



ACADEMIA DE CIENCIAS
de la
REGIÓN DE MURCIA

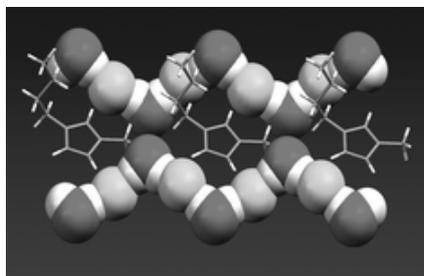
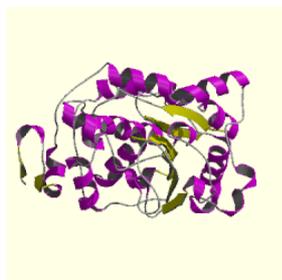
SESIÓN INAUGURAL DEL DÍA 5 DE MARZO DE 2004

DISCURSO

del

Prof. Dr. D. José Luis Iborra Pastor

Biocatalizadores y Solventes Neotéricos



Excmo. Sr. Presidente,
Excmas. e Illtmas. Autoridades,
Illtmos. Sres. Académicos,
Señoras y Señores:

Para mí es un gran honor y compromiso el ocupar hoy este lugar para leer el discurso que me corresponde como Académico Numerario, siguiendo el turno riguroso de antigüedad, según establece el Art. 44 de los Estatutos.

Antes de empezar deseo expresar mis excusas hacia la parte de esta distinguida audiencia que hoy ha querido estar presente en este acto, y que dedicados a actividades lejanas a las Ciencias y más aún a la Bioquímica, han de hacer acopio de paciencia para escuchar a un profesor tratar sobre un tema especializado. Pero, por otra parte, creo que la dignidad de esta Academia me obliga al mínimo esfuerzo científico de intentar exponerles un tema que sirva de ejemplo de las íntimas conexiones entre los conocimientos bioquímicos básicos de las enzimas y las derivaciones hacia el uso de las mismas, en sus aplicaciones de interés industrial, médico-farmacéuticas y analíticas. La elección de este tema surge de la tendencia natural de tomar en consideración algunos de los aspectos relacionados con líneas de investigación en las que nuestro Departamento de Bioquímica y Biología Molecular "B" e Inmunología de la Universidad de Murcia viene realizando en áreas tales como la Biotecnología. Por ello, trataré de ser claro y breve.

También quiero expresar mis agradecimientos, en primer lugar, a todos mis compañeros profesores y en especial al grupo de colaboradores de la Facultad de Química, que con su dedicación, honestidad y seriedad, así como con su lealtad, constancia, sacrificio y profundo sentido universitario han contribuido a incrementar mi saber docente e investigador. Termino esta introducción para expresar mi gratitud y servicio a esta Academia y a todos sus miembros, por formar parte de ella, y enriquecerme con el prestigio y conocimientos de sus componentes.

Biocatalizadores y Solventes Neotéricos

Por
JOSÉ LUIS IBORRA PASTOR

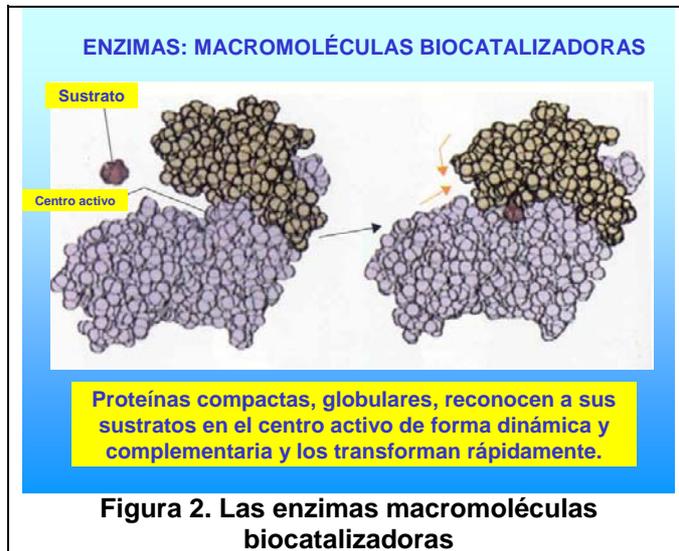
LOS BIOCATALIZADORES.

Los catalizadores son sustancias que aceleran una reacción y al final de la misma se regeneran. Pueden ser de origen mineral y orgánico. El Prof. Núñez de Castro, en su libro de Enzimología, indica que en el libro del Génesis (9, 24) se narra cómo Noé logró la fermentación de la uva. En la Iliada de Homero se menciona la utilización de un estómago de cabrito para hacer queso. Es conocida que la aplicación de los catalizadores biológicos tiene sus raíces en las civilizaciones china y japonesa para la fabricación de alimentos y bebidas alcohólicas. Pero tuvieron que pasar muchos años para que Louis Pasteur, en la segunda mitad del siglo XIX, comenzara a aclarar el “misterio” de la fermentación con la propuesta de que los cambios operados a lo largo de la transformación del jugo de uva en vino, dependían de fuerzas “vitales”, ejercidas por seres vivos y, en concreto, por las levaduras.

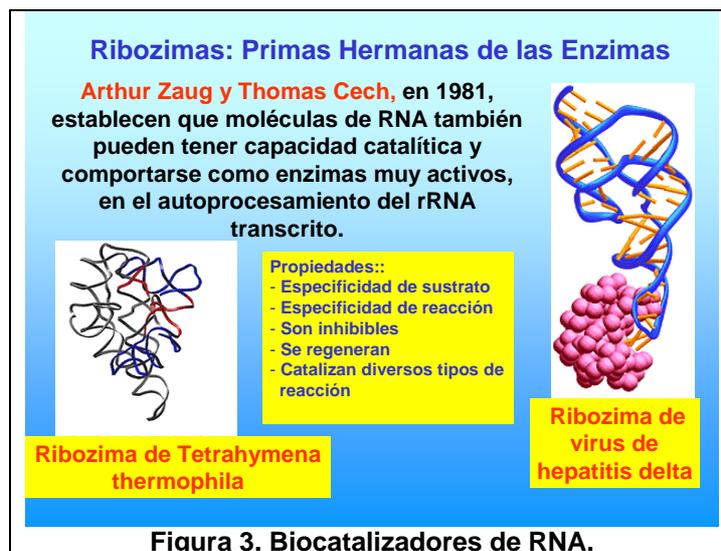
Fue Friedrich Wilhelm Kühne, profesor de Fisiología en la Universidad de Heidelberg, el que acuñó en 1876, el término alemán *enzyme* (derivado del griego, *ενζυμη*, en la levadura) para designar aquellas sustancias activas de origen biológico que tenían capacidad catalítica. La referencia más antigua que se posee sobre una acción catalítica por enzimas, se debe a Payen y Persoz, cuando, en 1833, observaron que un extracto de granos de centeno en germinación era capaz de transformar el almidón en glucosa; al concentrar el principio activo del extracto obtuvieron un polvo blanco al que llamaron *diastasa*, que se inactivaba por el calor y que actuando a concentraciones muy pequeñas transformaba gran cantidad de almidón.



La naturaleza proteica de las enzimas no llegó a establecerse hasta que Sumner cristalizó la ureasa de soja en 1926 y pudo demostrar que se trataba de una proteína pura. Desde entonces se han logrado cristalizar otras muchas enzimas obtenidas de líquidos fisiológicos y cuya misión es fundamentalmente hidrolítica (pepsina, tripsina, lisozima, ribonucleasa, etcétera), confirmando la naturaleza proteica de las mismas. Por tanto, una *enzima es una proteína con capacidad catalítica*.



Este paradigma universalmente admitido fue desmontado cuando Arthur Zaug y Thomas Cech de la Universidad de Colorado en Boulder, publicaron en la revista *Science*, en 1981, que moléculas de RNA también pueden tener capacidad catalítica y comportarse como enzimas muy activos, en el autoprosesamiento del rRNA transcrito. Así, el RNA es no solamente capaz de servir de transmisor de la información, sino de catalizar reacciones químicas como lo hacen las enzimas clásicas. De ahí el nombre que se le ha dado a estos compuestos: *ribozimas*.



Cuando se profundizó en el estudio del mecanismo de acción de las enzimas, como complementarias del *estado de transición* de los sustratos, llevó a varios investigadores en la década de los ochenta a producir *anticuerpos monoclonales* frente a *haptenos*, análogos estructurales al estado de transición de algunos sustratos. Estos anticuerpos que tienen propiedades catalíticas reciben el nombre de *abzimas* y son, a su vez, fuertemente inhibidos por los haptenos.



Las *abzimas* junto con las *ribozimas* han ampliado el paradigma del estudio de las enzimas. Por tanto, en una aproximación actual, se puede definir ahora a las *enzimas* como *macromoléculas biocatalizadoras*.

¿Qué propiedades más sobresalientes poseen las enzimas?

Además de mostrar las que son inherentes a los catalizadores químicos cabe destacar: a) su *eficacia*, pues aumentan la velocidad de las reacciones químicas específicas hasta un factor de 10^8 - 10^{10} veces superior a la reacción no catalizada, lo que implica que se necesita una menor concentración de catalizador para llevar a cabo el proceso, entre tres a cuatro órdenes de magnitud menos; b) su *aceptabilidad medioambiental*, ya que al ser compuestos biológicos se degradan completamente en el medio; c) que *actúan bajo condiciones suaves*, un pH típico alrededor de 7,0, y una temperatura entre 20 y 40 °C; d) que *catalizan un amplio espectro* de los tipos de reacciones orgánicas existentes, a excepción del reordenamiento de Cope; e) su *especificidad de acción*, al reconocer un sustrato de forma quimo-, regio-, diastereo- y enantioselectiva, y poder realizar la transformación química selectiva del mismo; f) son *compatibles con otras enzimas* al funcionar bajo similares condiciones, lo que permite realizar reacciones en cascada; y g) algunas toleran trabajar con otros sustratos que no son los naturales y en otros medios que no son los acuosos.

Por el contrario, cuando un químico utiliza una enzima también debe de tener presente una serie de desventajas: a) su desactivación cuando se les saca de

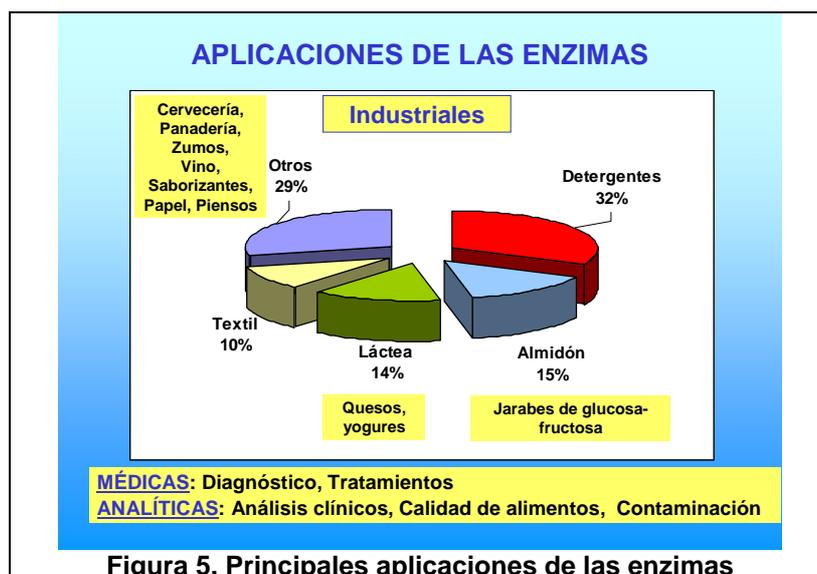
las condiciones naturales; b) la posibilidad que se inhiban por la presencia de sustancias inhibitoras, exceso de productos o de sustratos; c) algunas enzimas necesitan para su actuación de la presencia de cofactores naturales; y d) son alérgenos, por lo que en su manejo se debe de ser prudente.

¿En qué se emplean las enzimas?

El empleo de las enzimas en medios acuosos se extiende a campos muy diversos, desde la producción de edulcorantes o la decoloración de los pantalones tejanos al diagnóstico de enfermedades infecciosas o genéticas. Mediante procesos biocatalíticos se fabrican entre otros los jarabes de glucosa-fructosa, el edulcorante aspartame, los zumos clarificados, la fabricación de quesos y la síntesis de compuestos de interés farmacéutico como el ácido 6-aminopenicilánico, el ácido ascórbico, ciertos aminoácidos o esteroides.

Se conocen más de 2.000 enzimas, pero sólo se explotan unas 400. En su mayoría se trata de enzimas extracelulares y de origen microbiano. Las aplicaciones industriales son las que consumen el mayor porcentaje de biocatalizadores. La industria de detergentes consume el 32% del volumen total de enzimas producidos, la del almidón (15%), la industria láctea (14%) y la textil (10%). El resto se distribuye entre alimentación (cervecería, panadería, zumos, vino, sabores, grasas y aceites, piensos para animales y otros), curtidos, papel, combustibles, eliminación de residuos y diversas biotransformaciones.

Como aplicaciones médicas, además de la utilización tradicional, por vía oral, de los extractos de páncreas como ayuda a la digestión, también se emplean enzimas puras como medicamentos. Cabe citar algunos ejemplos, como el empleo de hialuronidasa o L-asparaginasa en tratamientos antineoplásicos, y la ADNasa I para disminuir la viscosidad de las secreciones bronquiales en pacientes con fibrosis quística.



También las enzimas encuentran una aplicación analítica. Como ejemplo cabe citar los *biosensores* de enzimas que se utilizan en la determinación de la calidad de los alimentos, la detección de contaminantes y en análisis clínicos.

¿Pueden trabajar las enzimas en ambientes no naturales?

Tras el descubrimiento, en los años ochenta, de la capacidad de algunas enzimas para actuar en medios orgánicos miscibles o no miscibles con agua, se han desarrollado procesos para la obtención de compuestos orgánicos no solubles en agua, como la producción de antibióticos semisintéticos, la resolución de mezclas racémicas o la síntesis de triglicéridos estructurados. El uso de enzimas, para lograr reacciones muy específicas en dichos medios, es ya en la actualidad de una gran utilidad en la industria farmacéutica. La mayoría de los procesos industriales se llevan a cabo en reactores bajo condiciones extremas de reacción, muy distintas de las que se dan en el ambiente natural de las enzimas. Cuando las enzimas se utilizan en solución bajo estas condiciones, se presentan una serie de dificultades a la hora de realizar y rentabilizar el proceso desde el punto de vista industrial:

a) La presencia de factores físicos, como la presión y la temperatura, de factores químicos de pH y fuerza iónica extremas y en especial de solventes orgánicos, y de factores biológicos como proteólisis y degradación enzimática, pueden provocar una alteración de la integridad estructural de las proteínas, que redundaría en las propiedades esenciales de las enzimas, su actividad y estabilidad catalíticas; una pérdida de la mismas significaría un incremento de los costes de producción del proceso industrial. Las estrategias más empleadas para contrarrestar este efecto es la de intentar aumentar la *estabilidad de las enzimas*.

b) La enzima es un catalizador natural cuyo proceso de obtención es normalmente costoso; su recuperación del medio de reacción es esencial para que de nuevo puedan ser utilizadas. El tener la enzima unida a una matriz sólida (*enzima inmovilizada*), insoluble en el medio de reacción, facilita que al final de la reacción pueda ser fácilmente recuperada y sometida a repetidos usos, lo que permite, además, que la solución final no contenga la proteína indicada. Muchas veces, la simple unión a la citada matriz puede también aumentar la estabilidad de la enzima.

c) La utilización de solventes orgánicos en la manufacturación de productos farmacéuticos como medios de reacción de las biotransformaciones específicas lleva implícitos unos riesgos de toxicidad inherente, inflamabilidad, explosión, disminución de las concentraciones de ozono de la estratosfera y de la atmósfera, etcétera. Los investigadores de la academia y la industria teniendo en cuenta los principios de la Química Verde, han desarrollado solventes o sistemas de *solventes neotéricos* (del latín *neoterīcus*, y este del griego νεωτερικός, que significa nuevo, reciente, moderno), que reducen los riesgos intrínsecos que están asociados a los solventes tradicionales.

¿De qué depende la estabilidad de una enzima?

Las enzimas como proteínas son estructuras lábiles, inestables. La estabilidad de una enzima depende del mantenimiento de su estructura nativa, con la cual muestra su actividad catalítica. La *estructura o conformación nativa* de una proteína es la disposición espacial ordenada que adquieren todos sus átomos cuando se sintetiza en el medio biológico. Viene condicionada por el orden o secuencia en que se encuentran unidos sus aminoácidos por medio de *enlaces peptídicos (estructura primaria)*. La conformación que adopta la proteína (*estructura terciaria*) es una suma de unos ordenamientos espaciales específicos de tipo helicoidal, de hojas plegadas y giros (*estructura secundaria*).

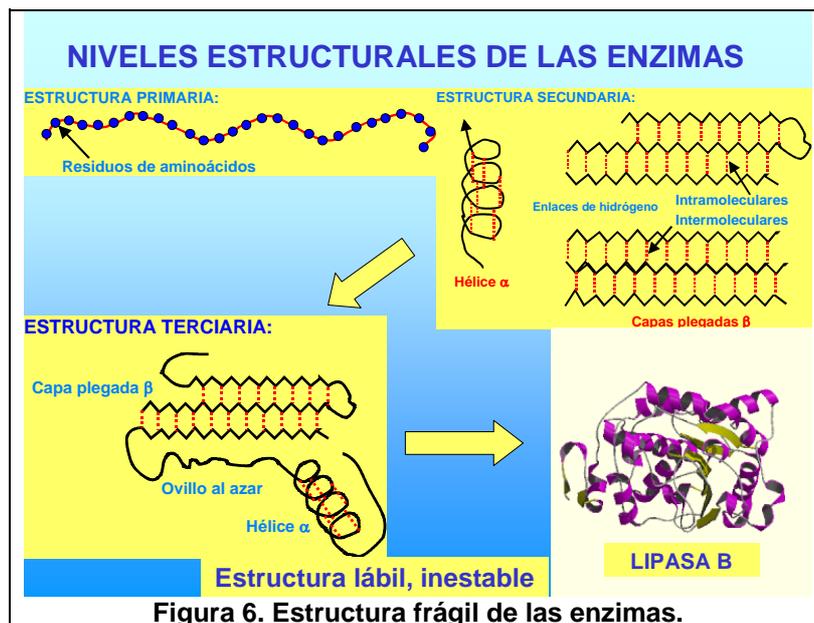
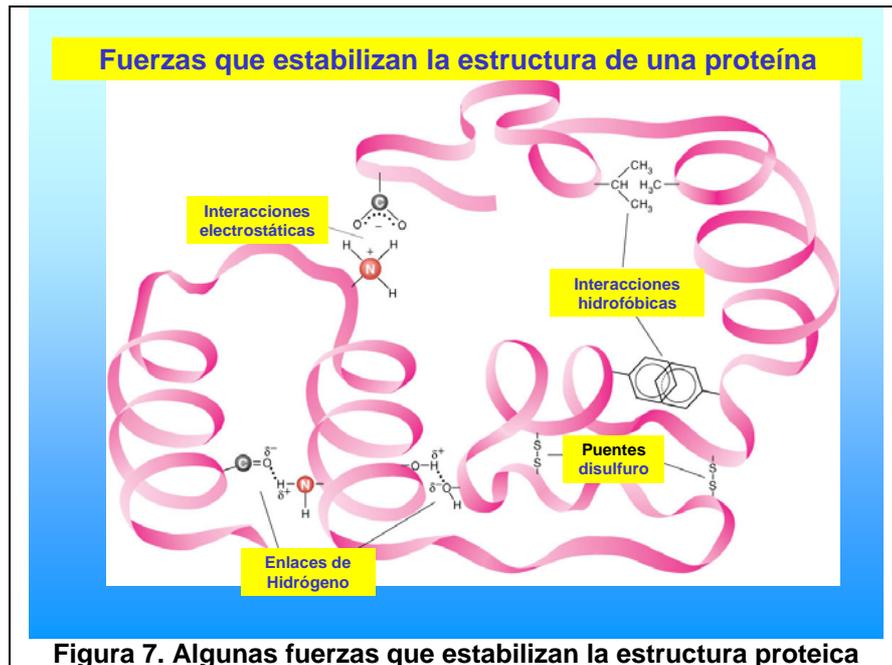


Figura 6. Estructura frágil de las enzimas.

Estas estructuras se establecen mediante la formación de enlaces de hidrógeno intra- e inter-catenarios entre los átomos de los enlaces peptídicos y de toda una serie de fuerzas, unas de naturaleza covalente como los enlaces por puentes disulfuro, y otras, las más importantes desde el punto de vista de su estabilidad, por enlaces de naturaleza no covalente, tales como los enlaces por puente de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals, las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas.

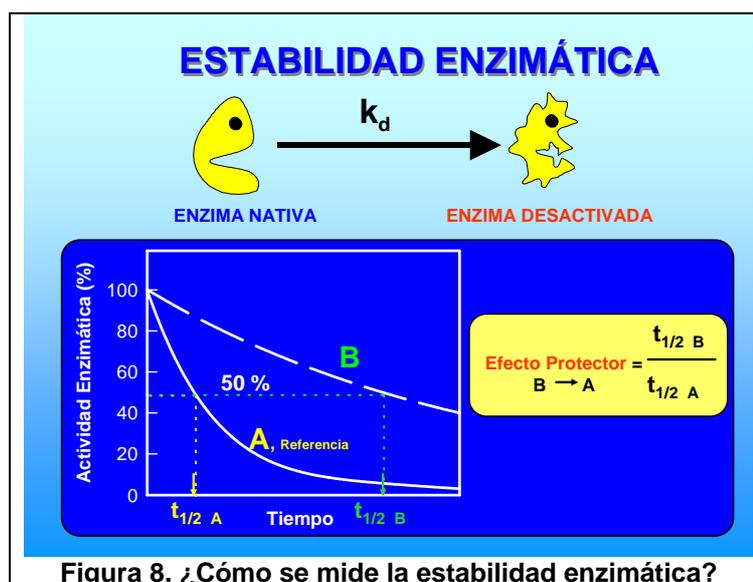
Todas estas últimas fuerzas se dan tanto entre los propios grupos funcionales de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos de su estructura, como con las moléculas de agua que los rodean.

Cuando una enzima se desestabiliza por alteración de las condiciones físicas o químicas del medio que la rodea, pierde su estructura ordenada; se rompen muchas de las interacciones anteriormente relacionadas, y se forman nuevos enlaces con las moléculas del solvente que envuelve a la estructura proteica. Se dice que la enzima se desnatura, pierde su estructura nativa, se desordena y deja de ser activa.



Existen enzimas que pueden recuperar su estructura nativa, cuando se elimina el agente que ha provocado su inactivación. En otras en cambio, el proceso es irreversible y no la pueden recuperar, normalmente porque su estabilidad la han perdido fundamentalmente por cambios en su estructura primaria, por autólisis, digestión microbiana, acción de oxidantes y reductores, fenómenos de eliminación de cofactores, de agregación-precipitación, etc.

Desde el punto de vista termodinámico, las diferencias de energía libre del sistema o energía de Gibbs, entre el estado nativo, ordenado, y el desnaturalizado, desordenado, son del orden de 5-15 kcal/mol. La determinación de la estabilidad termodinámica de una proteína se mide, sin embargo, para el proceso inverso.



El cambio del estado nativo al desplegado también se puede seguir cinéticamente a través de la medida de las constantes cinéticas y de los *tiempos de vida media* de los procesos de desactivación en unas condiciones determinadas. La pérdida de actividad catalítica se cuantifica con el tiempo de incubación de la enzima en dichas condiciones. El tiempo de vida media, definido como el tiempo necesario para que la enzima pierda un 50% de su actividad inicial, sirve para poder comparar el grado de estabilización que posee una enzima bajo diferentes condiciones a través del parámetro llamado *efecto protector*, definido como la relación que existe entre el tiempo de vida media mostrado por la enzima en un medio, respecto al mostrado en otro medio tomado como referencia.

¿Cómo se estabilizan las enzimas?

Son numerosos los procedimientos que se han ensayado para lograr una mayor estabilización de las enzimas, aunque se pueden agrupar fundamentalmente en las siguientes categorías denominadas.

- a) Modificación química.
- b) Inmovilización.
- c) Ingeniería proteica por mutagénesis dirigida.
- d) Ingeniería del medio de reacción.

Estabilización de enzimas por modificación química

La *modificación química* consiste en la unión química de moléculas o macromoléculas sintéticas o naturales sobre la superficie de la enzima, con tal de mejorar su estabilidad estructural, pero también se pueden dar otros efectos como la variación de su solubilidad, el cambio en su especificidad o en el pH óptimo. Las estrategias que se siguen son, las de incrementar la superficie hidrofílica de la proteína para reducir los contactos hidrofóbicos desfavorables con el agua, el aumentar la hidrofobicidad superficial para mejorar la interacción con los medios no polares, el fortalecer diversas interacciones para mejorar la compactidad de la proteína, o bien para incrementar la insolubilidad o para disminuir su antigenicidad.

Un ejemplo de modificación química de una enzima es la de unirle covalentemente cadenas cortas de hidratos de carbono, por imitación de lo que sucede en la célula cuando se sintetizan las proteínas glicosiladas. La finalidad es la de aumentar la hidrofiliidad de la superficie proteica para reducir los contactos hidrofóbicos desfavorables, que puedan establecerse entre la proteína y el agua. En el ser humano es conocido que la presencia de cadenas de oligosacáridos confiere a las proteínas que las contienen, una mayor resistencia a la proteólisis, lo que se traduce en mayores vidas medias de las enzimas glicosiladas en el torrente sanguíneo. Las enzimas modificadas con derivados de polietilenglicol (PEG), un compuesto polihidroxilado, se utilizan en terapéutica dado el incremento de su vida media que se observa cuando se inyectan en sangre y a su baja inmunogenicidad. Tal es el caso de la adenosina desaminasa modificada con PEG.

Estabilización de enzimas por inmovilización

Como ya se ha establecido anteriormente, el confinamiento de una enzima en un determinado espacio por métodos físicos o químicos en soportes sólidos insolubles en agua, es un sistema de estabilización de enzimas denominado *inmovilización*, pero además posibilita su uso continuo en un proceso industrial de síntesis de un determinado producto. El hecho racional de la inmovilización es la facilidad de separación del producto del biocatalizador. Más del 20% de las enzimas se comercializan inmovilizadas, lo que resalta la importancia de la técnica.

Las estrategias de inmovilización se agrupan en los siguientes bloques: *unión a un soporte*, *atrapamiento* y *entrecruzamiento intermolecular*, aunque no son excluyentes, pues también se puede adsorber una enzima a un soporte y luego entrecruzarla para fortalecer la unión al soporte.



Figura 9. Formas de inmovilizar enzimas

La unión a soportes puede conseguirse por *adsorción*, en la que participan interacciones iónicas, fuerzas hidrofóbicas, de van der Waals, o mediante *enlaces covalentes* a grupos activados de la matriz sólida. Bajo ciertas condiciones, ciertos polímeros naturales, celulosa, colágeno y otros, forman geles, en cuya estructura tridimensional la enzima puede quedar ocluida o confinada en microcápsulas de un polímero orgánico, nylon, o retenida en las fibras huecas de una membrana polimérica. El entrecruzamiento intermolecular de la enzima mediante reactivos bifuncionales puede dar lugar a incrementar la insolubilidad del catalizador en el medio de reacción.

La inmovilización puede aportar a la enzima un aumento de la estabilidad, tanto mayor en cuanto la unión entre la enzima y el soporte sea multipuntual, es decir, por varios enlaces; también por un incremento de la rigidez de su estructura, por una protección frente a la inactivación originada por cambios de pH, o una disminución de la autólisis en las proteasas, o bien por un efecto protector frente al ataque de microorganismos o agentes desestabilizantes.

Estabilización de enzimas por ingeniería proteica

La incorporación a la Biología Molecular de las técnicas del DNA recombinante, han hecho posible la sustitución de un aminoácido en una proteína, por medio del reemplazamiento artificial de un nucleótido en el gen que codifica la proteína. El procedimiento se denomina como *mutagénesis dirigida*, desarrollada por M. Smith Premio Nobel de Química en 1993. La estrategia de modificar la función de la proteína por medio de la mutagénesis dirigida se llama *ingeniería proteica*. Para ello, se necesita: a) conocer: la estructura tridimensional de la proteína, lo que implica el cristalizarla y obtener una imagen refinada del cristal por difracción de rayos X; b) también es necesario disponer de la información necesaria sobre la relación estructura-función de la enzima; c) saber utilizar herramientas informáticas de cálculo y simulación para determinar el tipo de modificaciones que se desean realizar; y d) conocer las distintas variantes de la técnica de mutagénesis dirigida.

Con todos estas herramientas, hoy en día, se puede realizar, no solamente la sustitución de un aminoácido de la estructura de la proteína, sino también el llevar a cabo el diseño de elementos de estructura secundaria y supersecundaria, hélices alfa, giros beta, láminas betas, etcétera, así como diseñar de *novo* proteínas y rediseñar las proteínas naturales ya existentes. A través de la ingeniería proteica se modifican distintas propiedades de las enzimas tales como su actividad, especificidad de sustrato y estabilidad, que pueden mejorar su utilización industrial y médica, pero también es posible diseñar proteínas con una determinada conformación para un reconocimiento molecular, y en un futuro próximo se conseguirán proteínas que sean capaces de interactuar con otras previamente escogidas, modulando su función.

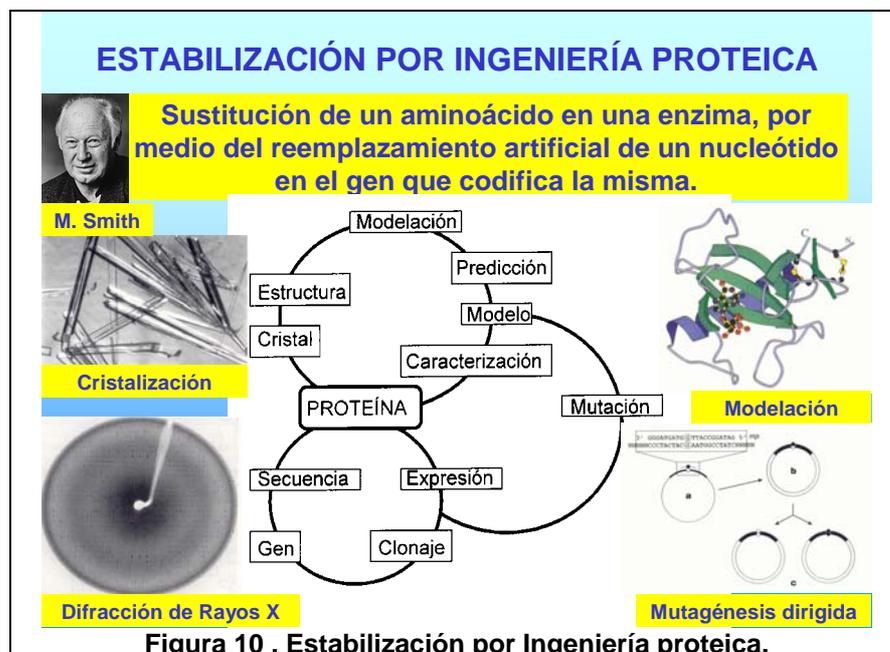


Figura 10 . Estabilización por Ingeniería proteica.

Estabilización de enzimas por ingeniería del medio de reacción

El medio de reacción predominante en las células vivientes es el agua. Pero también alrededor de las enzimas están presentes altas concentraciones de otras proteínas, biopolímeros diferentes y compuestos de bajo molecular, sin olvidar que existen enzimas asociadas con estructuras de membrana que contienen lípidos principalmente hidrofóbicos. Por eso, *la ingeniería del medio de reacción* se define como el conjunto de herramientas que diseñan las condiciones adecuadas para que una enzima pueda catalizar una reacción química en cualquier medio, ya sea el convencional (agua), o no convencional (solventes orgánicos, neotéricos, sin solvente), en sus niveles de máxima actividad y estabilidad.

La utilización de los medios no convencionales puede aportar una serie de ventajas, tanto catalíticas como operacionales. La mayoría de las enzimas son capaces de catalizar una reacción en ambas direcciones. Las enzimas como catalizadores que son, no son las que determinan en qué dirección tiene que transcurrir la reacción, cuestión que solamente se establece por las condiciones de reacción y la posición del equilibrio. De ahí que enzimas como las hidrolasas, que en medio acuoso catalizan reacciones de hidrólisis, cuando se colocan en medios no convencionales pueden catalizar las reacciones inversas a la hidrólisis y de transferencia de grupos, es decir, “nuevas actividades enzimáticas, con elevadas actividades y enantioselectividades.

Otras ventajas adicionales que aportan muchos medios no convencionales es la solubilización de los compuestos hidrofóbicos que son poco solubles en agua, o la disminución del riesgo de contaminación microbiana, e incluso el incremento de la estabilidad enzimática, respecto al medio acuoso, bajo condiciones optimizadas. Cada una de las citadas ventajas se conseguirá siempre que se mantenga íntegra la estructura de la enzima.

MEDIOS NO CONVENCIONALES Y SISTEMAS		
PARÁMETRO	CONVENCIONAL	NO CONVENCIONAL
SOLVENTE	H ₂ O	SOLVENTES ORGÁNICOS <input checked="" type="checkbox"/> Líquidos miscibles con H ₂ O (Acetonitrilo) <input checked="" type="checkbox"/> Líquidos inmiscibles con H ₂ O (Hexano)
[H ₂ O]	≈ 100 % (v/v) ≈ 55.5 M Aw ≈ 1	SISTEMAS MONOFÁSICOS <input checked="" type="checkbox"/> Miscibles con H ₂ O (10 - 50 % H ₂ O) <input checked="" type="checkbox"/> Inmiscibles con H ₂ O (< 5% H ₂ O) SISTEMAS BIFÁSICOS <input checked="" type="checkbox"/> Inmiscibles con H ₂ O (> 5% H ₂ O) <input checked="" type="checkbox"/> Mezclas de Solventes Aw < 1 (0.7 - 0.95)
TEMPERATURA	10 - 50 °C	<input checked="" type="checkbox"/> Subcero (-30 a -5 °C) <input checked="" type="checkbox"/> Extrema (> 70 °C)
PRESIÓN	1 bar	<input checked="" type="checkbox"/> Solventes Líquidos ⇒ hasta 10.000 bar <input checked="" type="checkbox"/> Solventes supercríticos ⇒ 40- 1.000 bar

Figura 11. Sistemas y condiciones de actuación de los medios no convencionales.

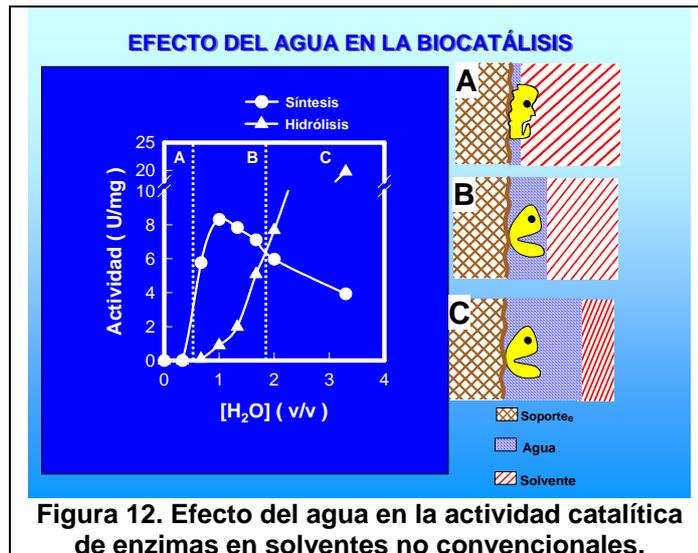
Bajo la denominación de *medios no convencionales* se agrupan a los solventes orgánicos miscibles con agua (alcoholes, acetona, dimetilsulfóxido) o inmiscibles en ella (hidrocarburos, éteres y ésteres). De acuerdo con la concentración de agua que exista en el medio y la naturaleza del solvente orgánico, las reacciones enzimáticas pueden transcurrir en sistemas *monofásicos* o *bifásicos*. En éstos últimos, los reactivos y productos se distribuyen entre dos fases, por lo que es necesario, para que transcurra la reacción de conversión de sustratos a productos, que se faciliten los *procesos de transporte* entre la enzima presente en la fase acuosa y los sustratos y productos localizados en la fase orgánica, mediante diferentes estrategias, de aumento del área interfacial, cambios de pH, etc.

También el diseño del medio de reacción incluye la variación de condiciones diferentes a las de la propia naturaleza del solvente, como la presión, la temperatura y de diversos aditivos. Algunas de las condiciones puede incluso estar relacionada con las propiedades del solvente, por ejemplo las de la presión y la temperatura. Pero para mantener la actividad enzimática parece ser que se necesita de una mínima cantidad de agua. Esta cantidad es a veces considerablemente menor que una monocapa de agua alrededor de las moléculas de enzima; el resto del medio puede ser el solvente no convencional.

¿Qué efectos tiene el agua en la biocatálisis en medios no convencionales?

La cantidad de agua en el sistema catalizador/medio de reacción influye en la actividad catalítica de la enzima en una gran extensión. El agua se distribuye entre las distintas fases presentes en el sistema. Parte del agua se une a la enzima, otra parte se disuelve en el solvente y una tercera en el soporte, polímeros u otras sustancias. El *grado de hidratación* de la enzima es el parámetro clave. Si el contenido en agua se mantiene tan bajo como sea posible, la actividad enzimática suele ser muy baja. Normalmente, la actividad enzimática aumenta con el incremento de la hidratación de la enzima, lo que se explica por la acción “lubricante” del agua sobre la flexibilidad interna de la proteína. A una determinada cantidad de agua existe un máximo en la actividad enzimática. Una razón posible para explicar la disminución de actividad son las limitaciones de transferencia de masa debidas al transporte del sustrato a través de la fase acuosa o a la agregación de las partículas de catalizador.

La estabilidad enzimática disminuye con el incremento del contenido en agua en los solventes no convencionales. Los mecanismos de esta inactivación producida por el agua son muy diversos. También, el agua actúa como sustrato en las reacciones catalizadas por las enzimas hidrolíticas y por tanto, disminuye los rendimientos de las reacciones inversas y de transferencia.



Hemos mencionado, que la utilización de solventes orgánicos como medios de reacción en la manufacturación de productos farmacéuticos de las biotransformaciones específicas, lleva implícito unos riesgos, que se pueden resolver con los solventes neotéricos. Veamos qué son este tipo de solventes, cuáles son sus propiedades y cómo se comportan en los procesos enzimáticos integrados en reactores de interés industrial.

LOS SOLVENTES NEOTÉRICOS.

Como ya se ha mencionado, la Real Academia Española de la Lengua define el término *neotérico* como nuevo, reciente, moderno. La aplicación del término en el caso de los solventes se utiliza en aquellos solventes que poseen unas nuevas y excepcionales propiedades para las aplicaciones industriales, fuera de las que tienen los que vienen utilizándose normalmente, como son su reciclado y reutilización, con la posibilidad de realizar procesos sin que produzcan un deterioro medioambiental.

La Unión Europea estima que en la Comunidad se emiten cada año alrededor de 10 millones de toneladas de compuestos orgánicos volátiles procedentes de los carburantes y disolventes. En marzo de 1.999 se aprobó la Directiva (99/13) relativa a la "limitación de las emisiones de compuestos orgánicos volátiles debidas al uso de disolventes orgánicos en determinadas actividades e instalaciones". En esta directiva se prevé reducir en dos tercios el uso de compuestos orgánicos volátiles liberados en la atmósfera por el uso de disolventes industriales. Una forma de reducir este uso de compuestos es el empleo de los solventes neotéricos.

El interés en el uso y las aplicaciones de los solventes neotéricos constituye ya una alternativa a los disolventes orgánicos volátiles, porque permite el desarrollo de procesos industriales limpios, puesto que tanto los fluidos supercríticos como los líquidos iónicos se pueden recuperar y reutilizar y junto a

las enzimas que actúan como catalizadores en procesos químicos de interés farmacéutico, pueden convertir la industria de Química Fina en una industria de Química Verde.

Entre dichos solventes cabe destacar, en primer lugar, los *fluidos supercríticos*, cuya aplicación en procesos enzimáticos se inició a principios de los noventa, aunque su empleo en procesos de extracción como el de la cafeína del café o la nicotina del tabaco, se viene realizando desde los años setenta.

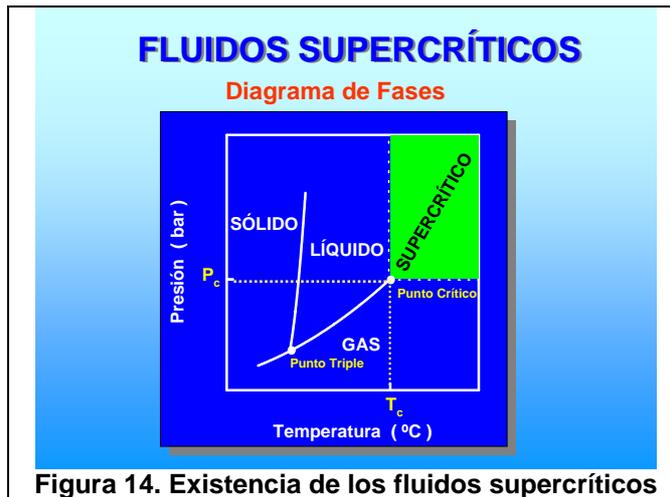
Los otros solventes neotéricos son los *líquidos iónicos*. Una revisión en la ISI Web of Science de las publicaciones que contienen el término "ionic liquid" en el título, resumen o palabras clave en los últimos ocho años, indica un crecimiento exponencial de las mismas. Es en el año 2.000, cuando se publica el primer artículo de utilización de los líquidos iónicos como medios de reacción en las biotransformaciones enzimáticas.



Vamos a presentar, en primer lugar las características y propiedades de estos fluidos, para después detallar sus aplicaciones en procesos biocatalíticos.

¿Qué es un fluido supercrítico?

El concepto de *fluido supercrítico* hace referencia a un estado de la materia en el cual el compuesto se comporta como un fluido, no es gas, ni es líquido, sino todo lo contrario, ambas cosas, pues muestra propiedades de ser al mismo tiempo un gas y un líquido. En un diagrama de fases de un compuesto se representan las condiciones de presión y de temperatura por las cuales el compuesto está en cada uno de los tres estados, sólido, líquido y gaseoso. Todos los materiales tienen *puntos críticos* que determinan su comportamiento de fases. Si el punto crítico representa aquel valor de presión y temperatura en el cual no existe una clara diferenciación entre los estados líquido y gaseoso, las condiciones supercríticas hacen referencia a condiciones de presión y temperatura superiores al punto crítico, en las que tienen existencia los fluidos supercríticos.

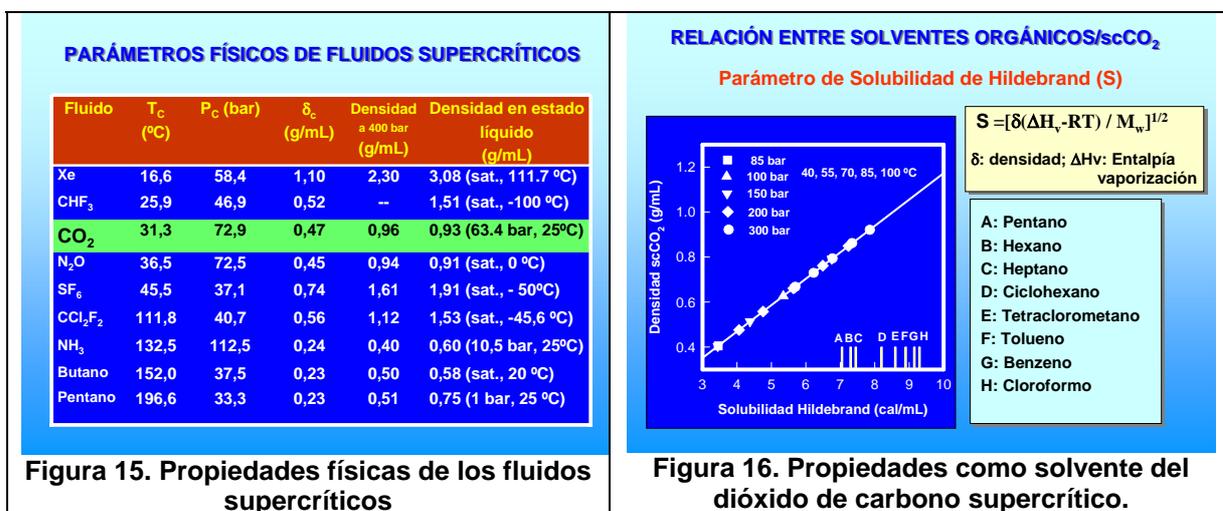


En estas condiciones, los fluidos presentan unas propiedades muy interesantes para su aplicación en procesos de reacción y extracción, entre las que cabe destacar:

- a) Permiten unas elevadas velocidades de transferencia de masa, puesto que difunden como los gases y poseen unos valores de densidad correspondientes a los líquidos.
- b) Sus capacidades como solventes son modulables, es decir, se puede modificar su carácter polar o apolar, en función de las condiciones de presión y temperatura a las que se sometan, propiedad que también varía con la adición de otros posibles solventes (cosolventes) al fluido, para ayudar a solubilizar un determinado compuesto.
- c) Como consecuencia de las dos propiedades anteriores, los fluidos supercríticos adquieren una alta capacidad extractiva, por lo que sus principales aplicaciones van desde la extracción de principios activos de materiales naturales a los procesos de oxidación de aguas residuales industriales.
- d) Gran facilidad para la recuperación de los productos extraídos, ya que con solo cambiar la presión, el fluido pierde su condición supercrítica y precipitan los productos disueltos en el mismo.
- e) Los fluidos son totalmente reutilizables con la simple presurización del sistema para volver a las condiciones supercríticas.
- f) Se puede seleccionar un determinado fluido que sea inocuo frente al deterioro medioambiental y utilizable con los biocatalizadores, como es el caso del dióxido de carbono.
- g) Sin embargo, el inconveniente del uso de los fluidos en condiciones supercríticas es el elevado coste de los equipos, ya que se necesitan instalaciones de alta presión adecuadas, con sistemas de control, que garanticen las condiciones de seguridad exigidas.

La elección de un fluido supercrítico para realizar un proceso en el que intervienen enzimas, viene impuesta, en primer lugar, por las condiciones de presión y temperatura críticas del propio fluido, de manera que sean compatibles con la actividad de los catalizadores biológicos. Asimismo, que el fluido no inactive la enzima por reacción química con la misma. Desde el punto de vista industrial, la selección del fluido también viene determinada por criterios económicos y por criterios de seguridad. De entre todos ellos, es el dióxido de

carbono el fluido más empleado en reacciones enzimáticas debido a su coste, a sus adecuados parámetros críticos para las enzimas y a su inocuidad frente al medioambiente.



Además, el dióxido de carbono supercrítico se comporta como un solvente eminentemente hidrofóbico, pues existe una relación directa entre la densidad del fluido a diferentes condiciones de presión y temperatura y el parámetro de solubilidad de Hildebrand, un parámetro usualmente utilizado para evaluar la hidrofobicidad de un solvente orgánico, tales como el hexano, tolueno o cloroformo.

¿Qué son los líquidos iónicos?

Los líquidos iónicos son sustancias líquidas formadas exclusivamente por iones. El ejemplo más común es la sal, cloruro sódico, que a temperatura ambiente es sólida, pero si se calienta por encima de su punto de fusión, 800°C, se fundirá y se convierte en un líquido que sigue teniendo su carácter iónico. Sin embargo, cuando se disuelve un cristal de sal en agua se obtiene una solución iónica, es decir iones que se rodean por un número determinado de moléculas de agua.

Los líquidos iónicos son sales que permanecen en estado líquido en un amplio rango de temperaturas, incluida la temperatura ambiente. Obviamente, estos líquidos iónicos están constituidos por un catión y un anión, por lo que las combinaciones posibles son muy elevadas. Una estimación realizada indica una cifra de un trillón de posibilidades. Las propiedades físicas y químicas que posean estos líquidos son función de la naturaleza del tipo del catión y del anión, lo cual permite seleccionarlos de acuerdo con las aplicaciones.

¿Y cuáles son estas propiedades que los hacen interesantes para su aplicación industrial? Pues en primer lugar, poseen una alta conductividad iónica y una amplia ventana electroquímica, propiedades que son lógicamente consecuencia de su naturaleza iónica, lo que hace que se empleen en baterías de última generación. Pero además poseen una tensión de vapor prácticamente

nula, es decir, no se evaporan y no son inflamables, se mantienen en estado líquido en un amplio rango de temperatura, con una alta estabilidad térmica, que en muchos casos supera los 300 °C. Por encima de esta temperatura suelen descomponerse. Estas propiedades los han convertido especialmente útiles para su empleo como líquidos refrigerantes en motores de alta precisión de la industria militar y aeroespacial. Sin embargo, la propiedad más relevante es la de poseer un alto poder disolvente con distintas materias orgánicas e inorgánicas, dentro de un amplio espectro de sustancias, desde carbón hasta plásticos, muchos metales e incluso, rocas.

Composición y propiedades de los líquidos iónicos

Los líquidos iónicos suelen estar constituidos por iones muy asimétricos y de gran tamaño; los cationes suelen ser orgánicos con un átomo de N o P, mientras que los aniones son orgánicos e inorgánicos. Entre los cationes destacan los derivados del imidazol, de la piridina y de los iones amonio o del fosonio, con uno a cuatro sustituyentes alquílicos. Entre los aniones más usuales en la actualidad están el tetrafluoroborato (BF_4^-), hexafluorofosfato (PF_6^-) o hexafluoroarseniato, el trifluoroacetato, el trifluorosulfonato o triflato y la bis-trifluorosulfonilimida o más comúnmente llamada bistriflimida

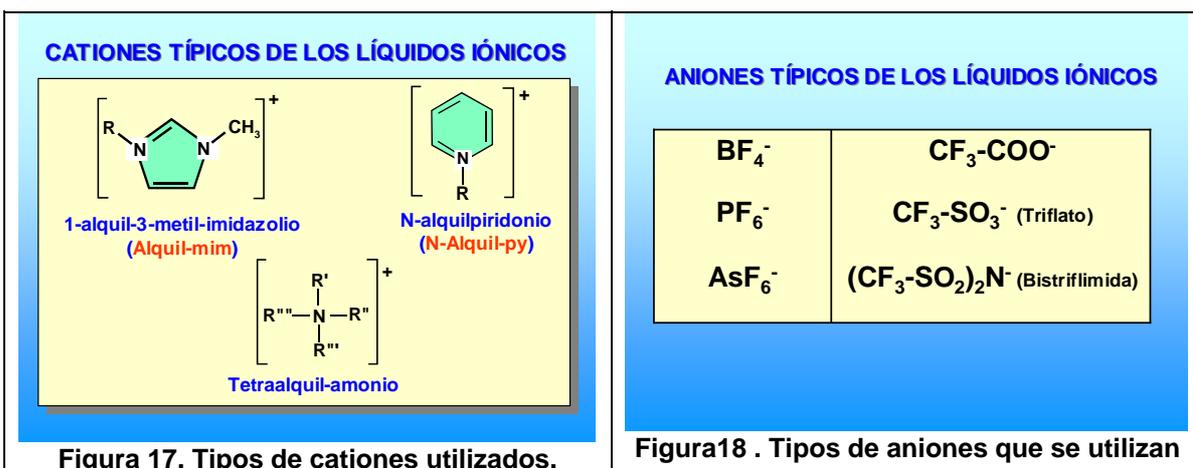


Figura 17. Tipos de cationes utilizados.

Figura18 . Tipos de aniones que se utilizan

Tanto los aniones como los cationes tienen la carga eléctrica muy deslocalizada. Este hecho determina que las interacciones iónicas entre el catión y el anión sean más débiles, sin que se dé la fuerte asociación entre los iones de una sal sólida. Además, la naturaleza química de los sustituyentes impone la naturaleza de las interacciones de naturaleza no covalente, del tipo hidrofóbico, de van der Waals, etc, que se pueden establecer entre soluto y solvente.

En la bibliografía se publican continuamente la síntesis de nuevos líquidos iónicos, con novedosas y seleccionadas propiedades, razón por la que anteriormente se ha indicado que la estimación más optimista apunta a una posible cifra de un trillón de líquidos iónicos diferentes que se pueden sintetizar, una cantidad inmensa comparada con los menos de 300 solventes más usados en la industria química.

La síntesis de estos solventes se pueden diseñar con distintas características de solubilidad. Así, independientemente del catión, los líquidos iónicos con aniones de carga más concentrada, como el tetrafluoroborato o el triflato son totalmente miscibles con agua, mientras que los de carga más deslocalizada, como hexafluorofosfato o bistriflimida, el agua presenta una solubilidad en ellos inferior al 3%, que es similar a la que posee con solventes orgánicos inmiscibles, como el hexano o tolueno.

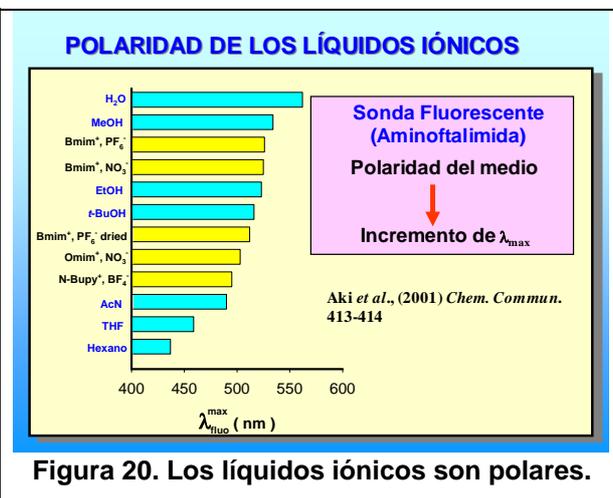
**SOLUBILIDAD DEL H₂O EN LÍQUIDOS IÓNICOS
A 20 °C (% w/w)**

CATIÓN	ANIÓN	
	Triflato	Bistriflimida
1-Me-3-Me-Im ⁺ (Mmim ⁺)	Miscible	2,5
1-Et-3-Me-Im ⁺ (Emim ⁺)	Miscible	1,4
1-Bu-3-Me-Im ⁺ (Bmim ⁺)	Miscible	1,3
1-Et-3-Et-Im ⁺ (Eeim ⁺)	Miscible	2,0
1-Bu-3-Et-Im ⁺ (Beim ⁺)	–	1,3

Bonhôte *et al.*, (1996). *Inorg. Chem.*, 35, 1168-1178

<http://pb.merck.de/servlet/PB/menu/1130200/index.html>

Figura 19. Los líquidos iónicos son solubles e insolubles en agua



En base a este comportamiento frente al agua, cabe pensar que se trata de solventes muy poco polares. Sin embargo, cuando se analiza su polaridad en base a la medida del desplazamiento hacia el rojo de la longitud de onda de emisión de una sonda fluorescente, que aumenta con el incremento de la polaridad del medio, se obtienen unos resultados opuestos, es decir, los líquidos iónicos son compuestos bastante polares, con una polaridad similar a la que presentan los solventes orgánicos polares, como metanol, etanol o acetonitrilo.

LOS SOLVENTES NEOTÉRICOS EN BIOCATALÍISIS.

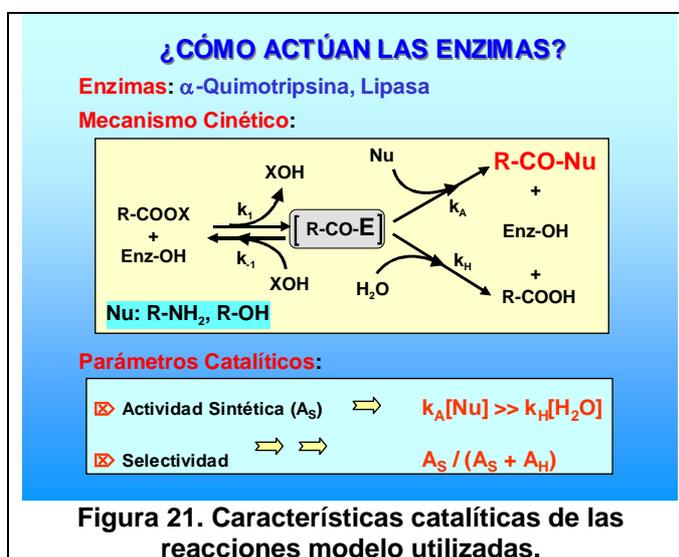
El grupo de Biotecnología del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular “B” e Inmunología de la Universidad de Murcia posee una amplia experiencia en tecnología enzimática e ingeniería de bioprocesos. El grupo ha desarrollado distintas aplicaciones en el área agroalimentaria, medio ambiental y de química fina, con diferentes biocatalizadores en medios acuosos y no convencionales, puestos a operar en diferentes configuraciones de biorreactores, en procesos compatibles con el medio ambiente, con tal de obtener productos de interés industrial con bajos costes de producción. A continuación, se presenta un resumen de la experiencia habida, durante los últimos años, por el grupo en el tema objeto de este discurso inaugural.

Aplicaciones biocatalíticas en líquidos iónicos.

La viabilidad de los solventes neotéricos como medios de reacción para realizar biotransformaciones enzimáticas de interés para el sector de la Química

Fina o Farmacéutica, viene determinado por los niveles de actividad, estero-selectividad y estabilidad que muestra la enzima para la biotransformación propuesta.

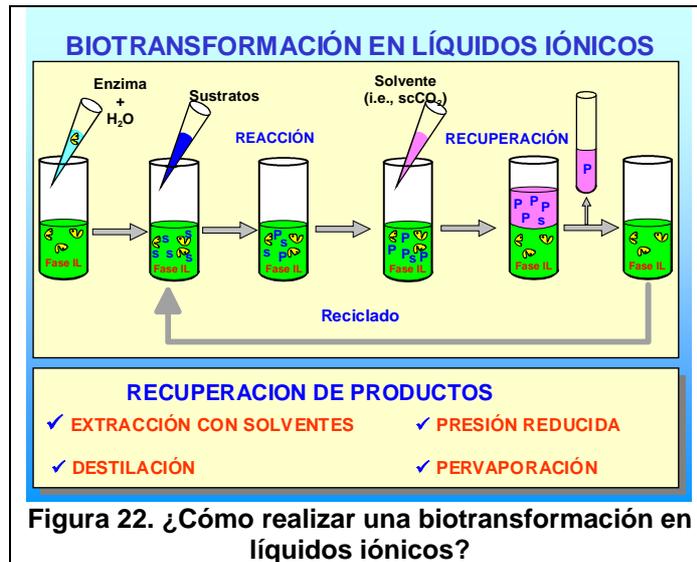
Las enzimas que en la actualidad se recogen en la bibliografía son fundamentalmente las que nuestro grupo de investigación ha estudiado, la α -quimotripsina y las lipasas de origen microbiano, que pertenecen al grupo de las hidrolasas. Ambas enzimas trabajan bajo un mecanismo de acción catalítica basado en la formación de un *intermedio covalente acil-enzima*, que pierde el grupo acilo por el ataque de un *nucleófilo*. Si el nucleófilo es el agua, la acción enzimática rendirá un producto de hidrólisis, hecho que es lo normal que ocurre cuando las mismas enzimas se encuentran en su medio biológico. Sin embargo, en un medio con baja o muy baja concentración de agua, y con la ayuda de otro nucleófilo presente, el producto de la catálisis enzimática es un producto de síntesis.



Los parámetros usualmente empleados para cuantificar la eficacia de los procesos sintéticos catalizados por hidrolasas en medios no acuosos son, la propia *actividad enzimática de síntesis*, que se incrementa siempre que la concentración del nucleófilo y su facilidad para dar el producto de reacción sean muchísimo mayores que las correspondientes debida al agua para hidrolizarse ($k_A[\text{Nu}] \gg k_H[\text{H}_2\text{O}]$), y la *selectividad*, que relaciona la actividad sintética mostrada por la enzima en relación a la actividad total, sintética e hidrolítica, que muestra la enzima.

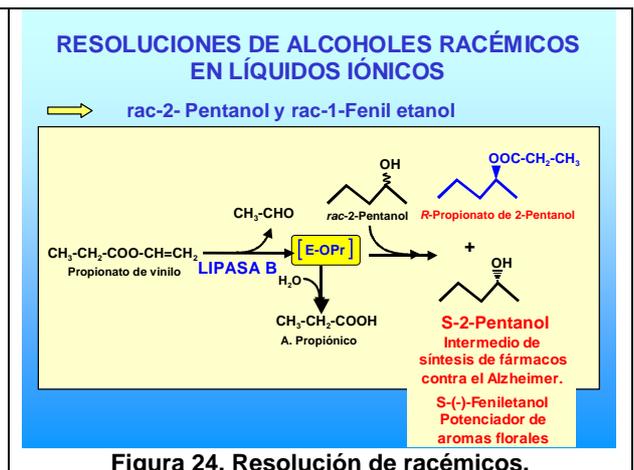
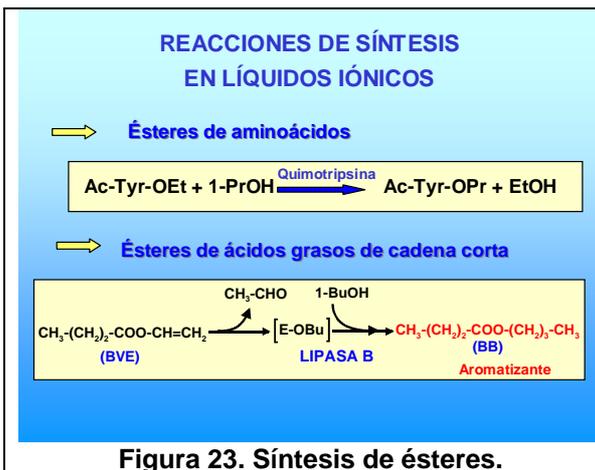
Los ensayos necesarios para analizar si una enzima es capaz de realizar una biotransformación en un líquido iónico se pueden realizar por suspensión de la enzima soluble o inmovilizada en el líquido iónico, para a continuación, adicionar los sustratos. La mezcla de reacción se incubaba a la temperatura de ensayo y se deja transcurrir el tiempo necesario para que ocurra la biotransformación. El análisis de los productos de la reacción se realiza previa extracción, bien con un disolvente no miscible con el líquido iónico pero capaz de solubilizar los productos o bien, por presión reducida, por destilación, o por

pervaporación, técnica de separación a través de membrana con presión reducida.



El hecho más sorprendente es que las enzimas analizadas tanto en forma soluble como inmovilizadas no se extraen, se quedan retenidas en la fase del líquido iónico. *El líquido iónico actúa como un solvente de inmovilización.* Pero además, la retención de la enzima por el líquido iónico permite la reutilización del sistema en un nuevo ciclo de biotransformación.

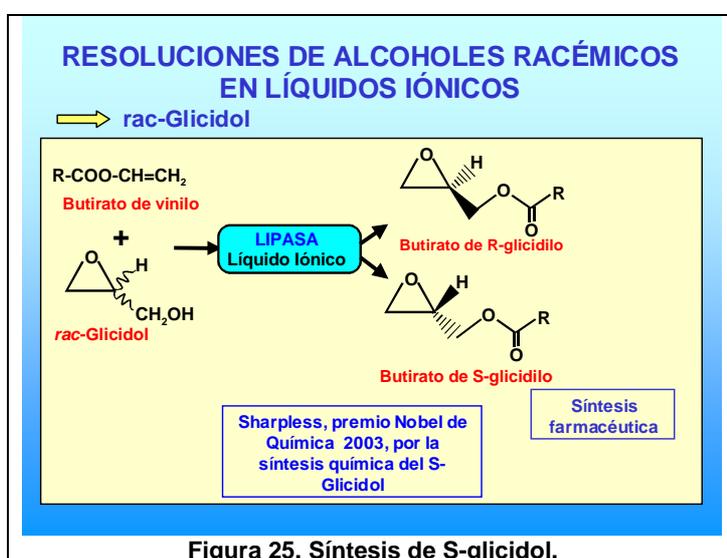
Las reacciones que se utilizan como modelos, cuando se emplean las enzimas hidrolíticas, como quimotripsina y lipasa, son las de *síntesis de ésteres por transesterificación*, ya sea de aminoácidos o de ácidos grasos de cadena corta, y las de *resolución de mezclas racémicas* de alcoholes alifáticos secundarios, para el caso de la lipasa.



Ambas enzimas son activas en todos los medios no convencionales ensayados en las reacciones de síntesis de ésteres, y muestran unos niveles de actividad muy superiores en los líquidos iónicos que en los solventes orgánicos, aún a pesar de la superior viscosidad de los líquidos iónicos. Este hecho indica la importancia del control del grado de hidratación de los sustratos por el líquido

iónico. Además, la selectividad con la que se expresa la actividad enzimática es, en todos los casos, muy próxima al 100%, es decir, en presencia del líquido iónico no existe prácticamente reacción de hidrólisis.

Una de las cualidades más importantes de las enzimas como catalizadores de interés industrial es su capacidad para catalizar reacciones *estereoespecíficas*, como es el caso de la separación de compuestos asimétricos, tales como el S-2- pentanol, uno de los precursores en la síntesis química de fármacos contra la enfermedad de Alzheimer, y del S-(-)-feniletanol, un potenciador de aromas verdes y florales en perfumería. Ambos productos se obtienen con valores de *exceso enantiomérico* superior al 99,9%. El mecanismo de reacción es similar al caso anterior, si bien, tras la formación del complejo acil enzima, la enzima ha de realizar un reconocimiento estereoespecífico del aceptor nucleofílico, para rendir el éster de sólo uno de los estereoisómeros.

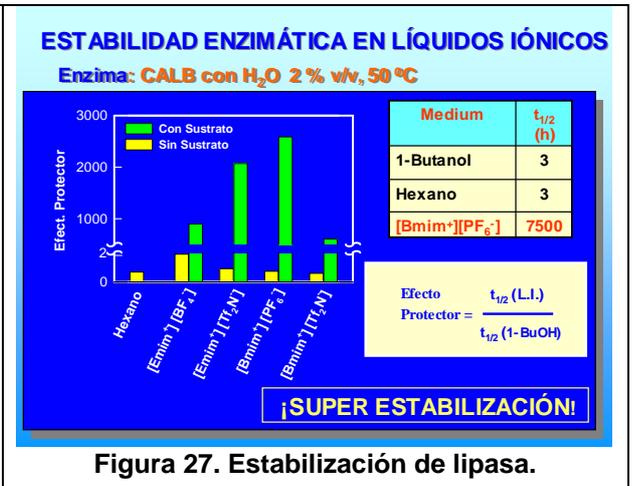
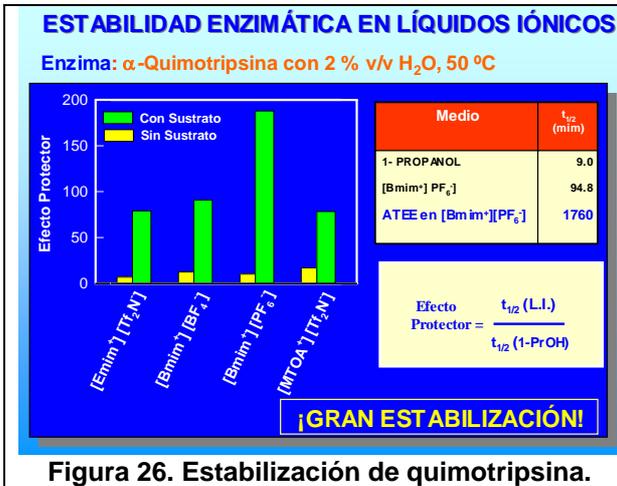


La resolución cinética del *rac*-1-glicidol para la obtención del isómero S- del alcohol, tiene importantísimas aplicaciones en síntesis farmacéutica, de hecho, por su obtención mediante síntesis química estereoespecífica, Sharpless obtuvo el premio Nobel de Química en 2003. En este caso, los resultados obtenidos reflejaron un notable incremento de la actividad enzimática con el uso de los líquidos iónicos como medio de reacción, en comparación con el tolueno, aunque la estereoselectividad de la reacción depende del tipo de lipasa utilizada, siendo la lipasa B la selectiva para el S-glicidol.

Estabilización de biocatalizadores en líquidos iónicos.

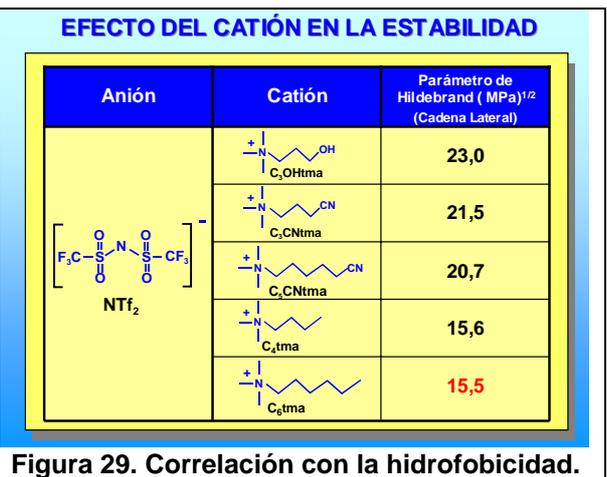
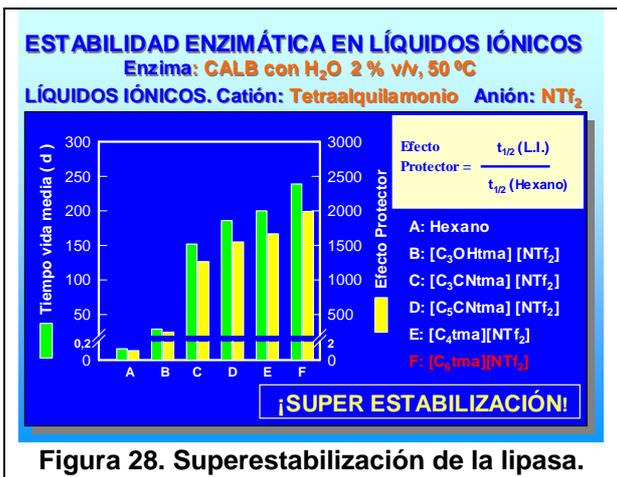
¿Cómo afectan los líquidos iónicos a la estabilidad de las enzimas? Cuando se analiza la estabilidad de las enzimas frente a la temperatura y en operación continua en presencia de líquidos iónicos se obtienen resultados espectaculares. Tanto en el caso de la quimotripsina como en el de la lipasa, los líquidos iónicos como medios de reacción incrementan grandemente los valores del parámetro *efecto protector*, en comparación con los obtenidos frente a los solventes orgánicos, como propanol o hexano. En el caso de la quimotripsina unas 200

veces y para la lipasa se observa un efecto protector excepcionalmente elevado, próximo a las 2.500 veces y con un tiempo de vida media determinado en torno a los 310 días, siempre en presencia de sustrato.



Estos resultados, publicados en el año 2.001 pusieron de manifiesto, por primera vez, el potente efecto estabilizador de estos solventes sobre la actividad de una enzima, en condiciones de muy bajo contenido en agua.

Una primera explicación de la naturaleza de este efecto se encuentra por la vía del análisis de la correlación entre las propiedades del líquido iónico y el efecto estabilizador provocado. Cuando se varía la naturaleza hidrofóbica del catión, manteniendo el mismo anión, se observa un incremento de la hidrofobicidad, medida por el parámetro de Hildebrand de la cadena lateral del líquido iónico, lo que supone un mayor efecto protector del líquido iónico sobre la enzima.



Estos resultados se pueden explicar en función del nivel de organización estructural de los líquidos iónicos, pues según algunos autores, son como compuestos supramoleculares que ayudarían a mantener la estructura tridimensional de la enzima, efecto que se vería incrementado por la presencia del sustrato en los correspondientes centros de unión. Tampoco se podría descartar el efecto de la naturaleza hidrofóbica de estos líquidos iónicos

utilizados, que permitiría que las proteínas mantuvieran el nivel de hidratación necesario para su estabilidad. Y en efecto, estas enzimas liofilizadas, secas, en polvo, puestas en un líquido iónico son inactivas.

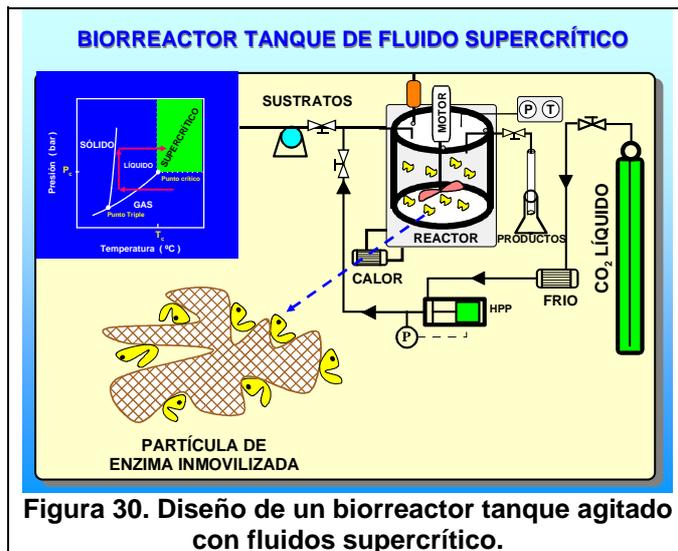
Como ya se ha mencionado anteriormente, las enzimas necesitan de una hidratación previa determinada para que sean activas en el líquido iónico. Y más aún, estas enzimas no son o son muy poco activas en líquidos iónicos miscibles con agua, fenómeno que ha sido atribuido a que estos líquidos iónicos parecen actuar produciendo un fenómeno de “*water-stripping*”, eliminando de la superficie externa de la proteína las moléculas de agua, lo que provocaría su desnaturalización y desactivación

La segunda vía de análisis, la más realista, es analizar la estructura de la proteína en presencia del líquido iónico. El inicio del análisis comienza por tener información de la estructura secundaria y de la conformación de la proteína por medio de las técnicas de dicroísmo circular y de espectroscopia de fluorescencia, para, a continuación, determinar mediante difracción de rayos X, las alteraciones que sufre la proteína en su estructura tridimensional, cuando está presente el líquido iónico. El análisis simultáneo, por medio de las técnicas instrumentales adecuadas, del proceso de pérdida de la actividad de la proteína con su actuación continua, también puede aportar información sobre las razones por la que una enzima mantiene su estabilidad en los líquidos iónicos.

Diseño de procesos en fluidos supercríticos.

La aplicación del segundo tipo de solventes neotéricos anteriormente indicados, los fluidos supercríticos, a las biotransformaciones enzimáticas, resulta un poco más compleja, dada la necesidad de utilizar equipos especiales, mediante los que se pueda conseguir que el medio de reacción alcance y mantenga las condiciones supercríticas específicas. Otro hecho que limita la aplicabilidad de los fluidos supercríticos es la solubilidad de los sustratos y productos de la biotransformación en el propio fluido. La experiencia conseguida en el laboratorio ha conducido al diseño de tres tipos de reactores, que se consideran los más adecuados para los fines que se persiguen: el reactor de tanque agitado, el reactor de membrana con recirculación y el reactor de lecho fijo.

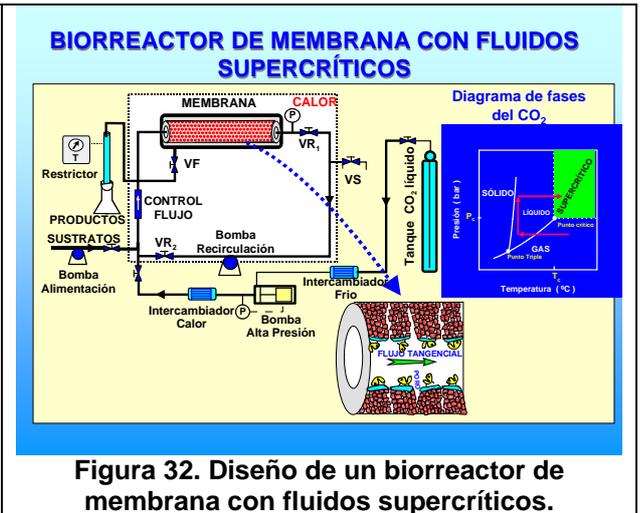
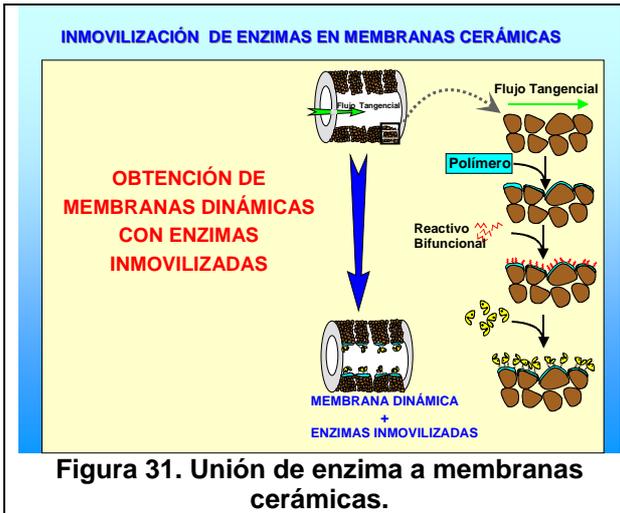
El *reactor de tanque agitado* para su uso con fluidos supercríticos opera con partículas de enzima inmovilizada, por ejemplo, enzima adsorbida sobre tierra de diatomeas. Para ello, el reactor se llena, mediante una bomba de alta presión, con dióxido de carbono líquido enfriado previamente. A continuación, el reactor se presuriza y se termostatiza a las condiciones necesarias para situar el fluido en la condición supercrítica determinada, de acuerdo con el diagrama de fases correspondiente. Una vez alcanzadas las condiciones, seguidamente se introducen los sustratos con una segunda bomba de alta presión, con lo que se inicia la reacción. Una vez terminada la misma, el reactor se despresuriza y los productos de la reacción se recogen, mediante un restrictor termostatizado, sobre un solvente adecuado. El fluido supercrítico pasa a fase gaseosa, que o bien se recicla, o se expulsa a la atmósfera.



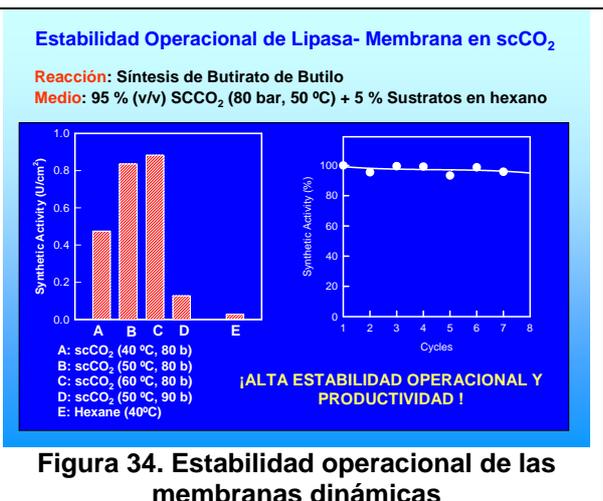
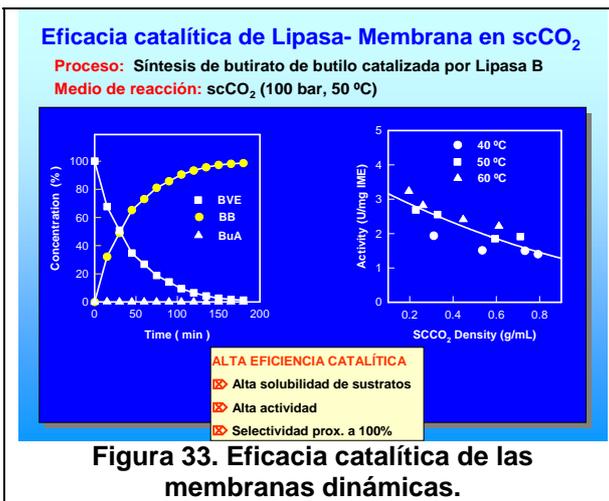
La síntesis del éster butirato de butilo en dióxido de carbono supercrítico, catalizada por una preparación comercial de lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada, es factible realizarla con esta configuración de reactor, y está caracterizada por una ausencia total de actividad hidrolítica de la enzima debido a las condiciones anhidras del medio. La actividad de síntesis se incrementa con la disminución de la densidad del dióxido de carbono supercrítico.

El *biorreactor de membrana con recirculación* es, hoy en día, una de las configuraciones más adecuada, desde el punto de vista industrial por la eficacia que muestra en realizar una conversión, al poner en contacto íntimo el sustrato con el biocatalizador, haciéndolo pasar a través de la membrana. Para ello es necesario disponer de membranas en las que se pueda inmovilizar la enzima. La obtención de *membranas dinámicas de nanofiltración* con enzimas inmovilizadas es la herramienta más idónea para conseguir dicho fin, puesto que la superficie filtrante a través de la cual ha de pasar el sustrato a transformar, está constituida por una membrana cerámica de microfiltración sobre la que se ha adherido un polímero hidrosoluble y al que se le acopla la enzima. Con este recubrimiento la membrana reduce su tamaño de poro hasta la escala de la nanofiltración. El polímero se puede eliminar fácilmente de la membrana cerámica cuando la enzima se inactive, haciendo posible su reutilización.

La membrana con la enzima inmovilizada se coloca en el interior del dispositivo adecuado instalado en el equipo de experimentación de fluidos supercríticos, y se procede a operarlo de la misma forma descrita anteriormente. La única diferencia estriba en que la recirculación del fluido está realizada con una bomba de alta presión y hace el mismo papel que la agitación en el reactor tanque.



Las membranas enzimáticas muestran una eficacia catalítica y una estabilidad operacional en el reactor de recirculación, para la síntesis de butirato de butilo en dióxido de carbono supercrítico, muy elevadas y excepcionales, más en cuanto se comparan con su comportamiento en medios orgánicos anhidros, tales como hexano y acetonitrilo.



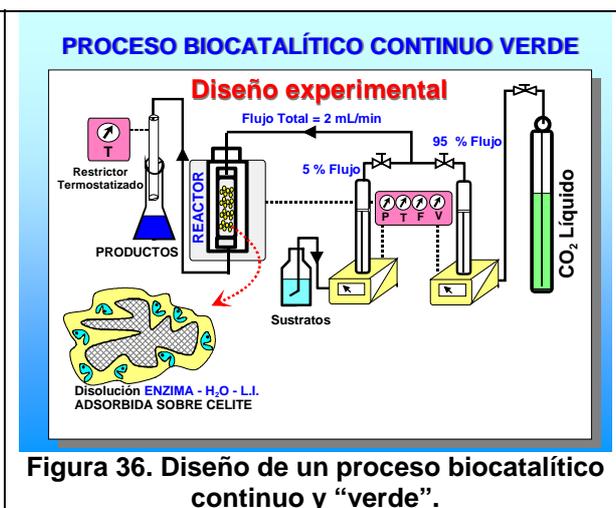
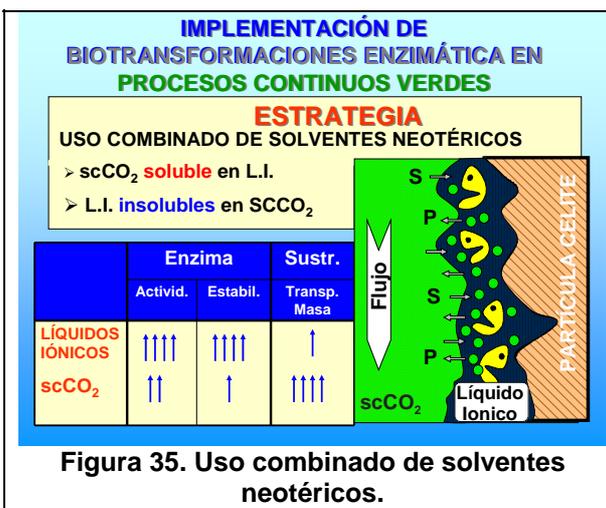
Diseño de procesos biocatalíticos en sistemas bifásicos líquido iónico/fluido supercrítico.

El tercer tipo de reactor gira entorno al diseño de procesos continuos combinando los tres elementos, enzimas, líquidos iónicos y fluidos supercríticos. La configuración del reactor ensayado es el reactor de lecho fijo.

La estrategia empleada para combinar ambos tipos de solventes neotéricos, se basa en la propiedad de que el dióxido de carbono supercrítico es muy soluble en los líquidos iónicos, pero sin embargo, los líquidos iónicos son insolubles en el dióxido de carbono. Este hecho implica la existencia de dos fases, una fase líquida, la catalítica, constituida por el líquido iónico en donde se encuentra inmovilizada la enzima y otra fase, la supercrítica, formada por el

fluido supercrítico, que con su alta difusividad y baja densidad, transporta los sustratos hasta el centro activo de la enzima y elimina continuamente los productos del mismo.

El biorreactor de lecho fijo aloja a la enzima hidratada con el adecuado grado de hidratación, y al líquido iónico, ambos adsorbidos sobre partículas de tierra de diatomeas. La alimentación de sustratos y dióxido de carbono se realiza mediante dos bombas de pistón de alta presión, cuyos flujos se regulan de forma que el del sustrato represente un 5% del flujo del dióxido de carbono supercrítico. Ambos líquidos se mezclan a la salida de las bombas antes de entrar al reactor. Los productos sintetizados son continuamente recogidos a la salida del reactor tras la despresurización controlada a través de un restrictor termostatzado.



Mediante este sistema, se pueden diseñar procesos cien por ciento "verdes", habida cuenta de que no se emplean solventes orgánicos volátiles, los líquidos iónicos no son volátiles y se reutilizan, los productos se obtienen puros siempre que la reacción se realice a plena conversión, y el dióxido de carbono puede reciclarse si a la salida del reactor se coloca un tanque de descompresión para el fraccionamiento de los productos y un sistema de compresión para volverlo a licuar y almacenarlo a la presión de 55 bar.

Cuando se aplica este sistema experimental a los procesos de síntesis de ésteres y de resolución de racémicos, catalizadas por la lipasa se obtienen unos resultados muy llamativos. En el primer tipo de reacción, además de obtener unas actividades y selectividades óptimas, la enzima es activa a 100°C, aunque diez veces menos que la reacción realizada solo en presencia de líquido iónico. Sin embargo, posee una estabilidad operacional, a dicha temperatura superior que la mostrada por la enzima en presencia de solamente el líquido iónico a 50°C.

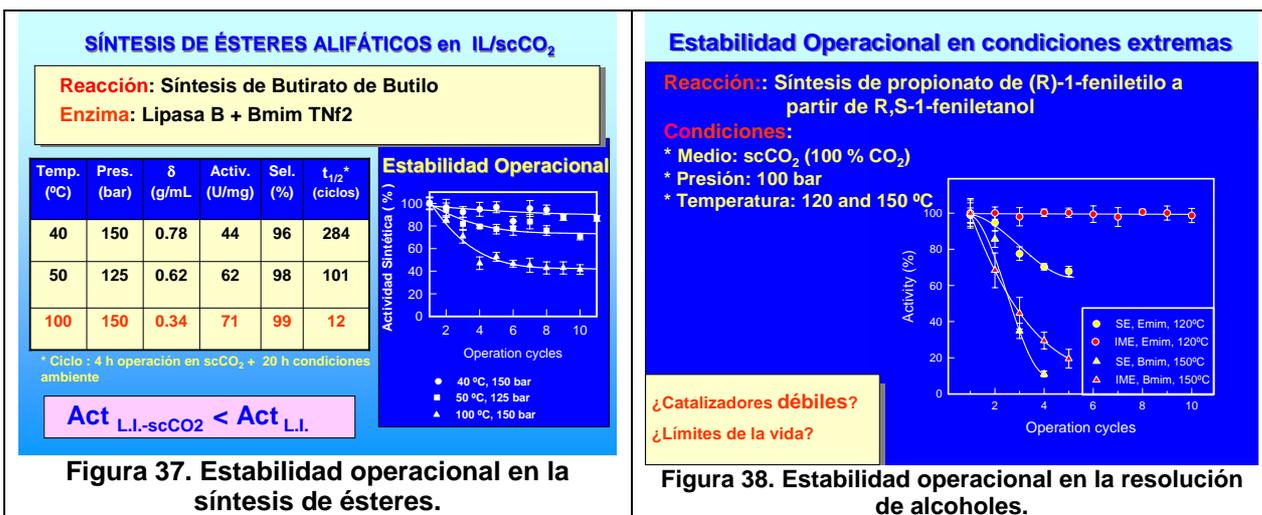


Figura 37. Estabilidad operacional en la síntesis de ésteres.

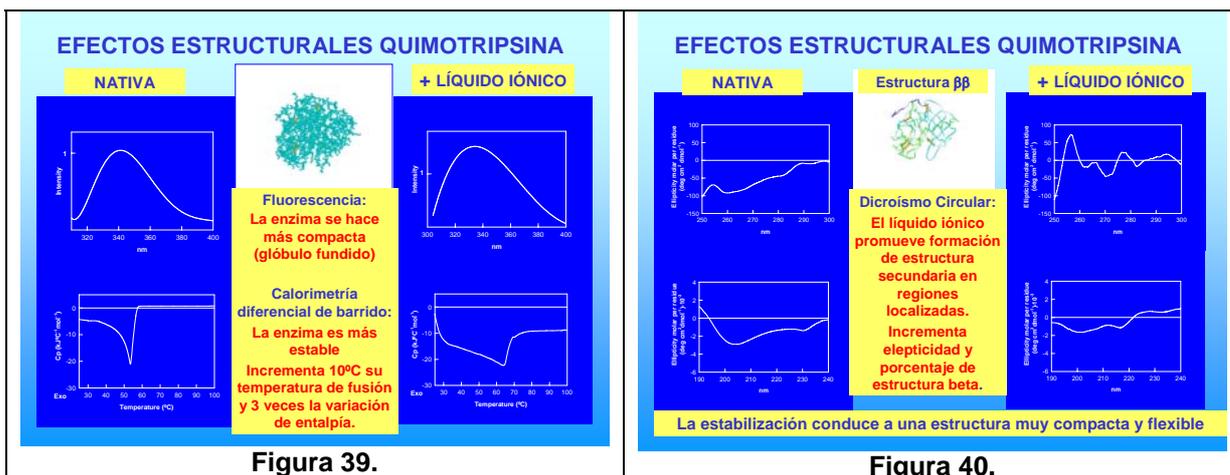
Figura 38. Estabilidad operacional en la resolución de alcoholes.

El sistema lipasa/líquido iónico/dióxido de carbono supercrítico es capaz de realizar también la resolución cinética de rac-1-feniletanol de forma activa y estable en un rango de temperatura de 120 a 150°C y 100 bares de presión, sin pérdida alguna de enantioselectividad.

¿Cómo una enzima de origen mesófilo, es capaz de mantener su capacidad catalítica en condiciones tan extremas de 150 °C de temperatura y una presión de 100 bares de dióxido de carbono?

Las respuestas sustentadas con razones científicas todavía no están dilucidadas. Pero experiencias realizadas en un principio indican, que un adecuado diseño del medio de reacción que permita el mantenimiento de la estructura tridimensional de la proteína en una conformación catalíticamente activa, y de las condiciones de operación del sistema que faciliten los fenómenos de transferencia de materia, son los responsables de la estabilidad de la enzima.

No obstante, como ya se ha establecido anteriormente, empezamos a encontrar algunas evidencias experimentales que comienzan a dar respuesta al incremento de estabilización observado. Las técnicas de *dicromismo circular*, de *espectroscopía de fluorescencia* y de *calorimetría diferencial de barrido*, indican que el líquido iónico estabiliza la enzima a través de la formación de una estructura compacta y flexible, probablemente debido a un incremento del grado de organización de las moléculas de agua que solvatan la proteína. La capa de solvatación alrededor de los grupos no polares expuestos de la enzima está afirmada por la naturaleza del anión del líquido iónico. Además, el líquido iónico disminuye la repulsión electrostática entre los grupos cargados de la molécula proteica, mediante un efecto de apantallamiento, lo que conduce a la manifestación de otras fuerzas estabilizadoras de la conformación proteica con la formación de contenidos de estructura secundaria en regiones localizadas de la proteína.



Muchos más esfuerzos hay que realizar para conseguir información sobre la propia estructura de los líquidos iónicos, su interacción con los sustratos, con las enzimas, y las reacciones que catalizan, mediante diversas técnicas estructurales como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear y la difracción de rayos X, de forma que puedan dar respuesta a una serie de preguntas como, ¿Es posible mejorar la eficacia catalítica de las enzimas en estos sistemas bifásicos líquido iónico/fluido supercrítico? ¿Qué criterios se pueden establecer para seleccionar el líquido iónico adecuado para realizar una determinada biotransformación? ¿Son todas las enzimas activas y estables en los citados sistemas? ¿Qué efectos fisiológicos y de toxicidad tienen los líquidos iónicos? ¿Se podrán desarrollar sistemas catalíticos de flujo continuo en los que el líquido iónico/catalizador y el dióxido de carbono se puedan reciclar con vistas a las aplicaciones comerciales en gran escala?

CONCLUSIÓN.

Hemos comprobado, a lo largo de esta exposición, el papel tan importante que los solventes neotéricos, líquidos iónicos y dióxido de carbono supercrítico, desempeñan en los procesos catalizados por enzimas, lo cual abre nuevas perspectivas y un futuro esperanzador en su investigación. Los nuevos horizontes van dirigidos hacia una “Química Verde” de diseño, manufactura y uso de sustancias químicas y procesos que reduzcan o eliminen el uso o la regeneración de residuos y productos nocivos para el medio ambiente o la salud humana.

Por último, desearía terminar citando unos datos que el Premio Nobel de Economía en 1987, Robert Merton Solow, artífice de la teoría del crecimiento económico, que analiza la contribución del factor trabajo y del capital al crecimiento económico, así como del efecto debido al cambio técnico, y en la que concluye que “el producto ha crecido en los últimos decenios en los países occidentales desarrollados a una tasa media del 3,2%; de ella, el 1,1% se debe al crecimiento cuantitativo de los factores de producción mientras que el restante 2,1% se debe a los aumentos en la productividad de estos factores, es decir, a las mejoras en la educación y en el saber humano”.

BIBLIOGRAFÍA.

- Adlercreutz, P. (2000) "Biocatalysis in non-conventional media" en *Applied Biocatalysis. Second Edition*, Straathof, A.J.J. y Adlercreutz, P. (eds.), pp. 295-316. Harwood academic publishers. Australia.
- Anastas, P. T. (2002) "Green Chemistry as Applied to Solvents", en *Clean Solvents. Alternative Media for Chemical Reactions and Processing*. Abraham, M.A and Moens, L., (Eds.). ACS symposium series 819. pp. 1-9. American Chemical Society, Washington, DC.
- Beckman, E.J. (2004) "Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing". *The Journal of Supercritical Fluids*, **28**, 121-191
- Brennecke, J.F. y Magín, E.J. (2001) "Ionic Liquids: Innovative Fluids for Chemical Processing". *AIChE Journal*, **47**, 2384-2388.
- Dzyuba, S. V. y Bartsch, R. A. (2003) "Recent Advances in Applications of Room-Temperature Ionic Liquid/Supercritical CO₂ Systems". *Angewandte Chemie*, **42**, 148-150.
- Gómez-Moreno, C. y Sancho, J. (2003) *Estructura de proteínas*. Ariel. Barcelona.
- Kragl, U., Eckstein, M. y Kaftzik, N. (2002) "Enzyme catalysis in ionic liquids". *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 565-571.
- Lozano, P., De Diego, T., Guegan, J-P., Vaultier, M. e Iborra, J. L. (2001) "Stabilization of α -Chymotrypsin by Ionic Liquids in Transesterification Reactions". *Biotechnology and Bioengineering*, **75**, 563-569.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M. e Iborra, J. L. (2001) "Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis". *Biotechnology Letters*, **23**, 1529-1533.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M. e Iborra, J. L. (2002) "Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide". *Chemical Communications*, **7**, 692-693
- Lozano, P., Pérez-Marín, A. B., De Diego, T., Gómez, D., Paolucci-Jeanjean, D., Belleville, M. P., Rios, G.M., e Iborra, J.L. (2002) "Active membranes with immobilized *Candida antarctica* lipase B: preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media". *Journal of Membrane Science*, **201**, 55 – 64.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M. e Iborra, J. L. (2003) "Enzymatic ester synthesis in ionic liquids". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **21**, 9-13.

- Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M. e Iborra, J. L. (2003) "Lipase Catalysis in Ionic Liquids and Supercritical Carbon Dioxide at 150 °C". *Biotechnology Progress*, **19**, 380-382.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M. e Iborra, J. L. (2003). "Enzymatic Catalysis in Ionic Liquids and Supercritical Carbon Dioxide", en *Ionic Liquids as Green Solvents: Progress & Prospects* (Eds. R.D. Rogers y K.R. Seddon). ACS SYMPOSIUM SERIES **856**, pp. 239 - 250. American Chemical Society, Washington, DC.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M. e Iborra, J. L. (2004) "Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide". *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* (En prensa).
- Lozano, P., De Diego, T., Gmouh, S., Vaultier, M. e Iborra, J. L. (2004) "Criteria to Design Green Enzymatic Processes in Ionic Liquid/Supercritical Carbon Dioxide Systems". *Biotechnology Progress* (En prensa).
- Lozano, P., Villora, G., Gómez, D., Gayo, A.B., Sánchez-Conesa, J. A., Rubio, M. e Iborra, J. L. (2004) "Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide". *Journal of Supercritical Fluids* (En prensa).
- Mediano, A. J., Beckman, E. J. y Russell, A. J. (1999) "Supercritical Biocatalysis". *Chemical Reviews*, **99**, 623-633.
- Nöel, M., Lozano, P., Vaultier, M. e Iborra, J.L. (2004) "Kinetic resolution of rac-2-pentanol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide". *Biotechnology Letters* **26**, 301-306.
- Nosoh, Y y Sekiguchi, T. (1991) *Protein Stability and Stabilization through Protein Engineering*. Ellis Horwood. New York.
- Núñez de Castro, I. (2001) *Enzimología*. Ediciones Pirámide. Madrid.
- Plou, F. J., Alcalde, M. L. y Ballesteros, A. (1999) "Estabilidad de los biocatalizadores", *Investigación y Ciencia*, junio, pp. 46-55.
- Rogers, R. D. y Seddon, K. R. (2003) *Ionic Liquids as Green Solvents. Progress and Prospects*. ACS symposium series 856. American Chemical Society, Washington, DC.
- Sheldon, R. A., Madeira Lau, R., Sorgedraeger, M. J., van Rantwijk, F. y Seddon, K.R. (2002) "Biocatalysis in ionic liquids". *Green Chemistry*, **4**, 147-151.
- Van Rantwijk, F., Madeira Lau, R. y Sheldon, R.A. (2003) "Biocatalytic transformations in ionic liquids". *Trends in Biotechnology*, **21**, 131-138.

Wasserscheid, P. y Welton, T (Eds.) (2002) *Ionic Liquids in Synthesis*. Wiley-VCH. Berlin.

Wilkes, J.S. (2002) "A short history of ionic liquids-from molten salts to neoteric solvents". *Green Chemistry*, **4**, 73-80.

Wrede, P. y Schneider, G. (1994) *Concepts in Protein Engineering and Design*. Walter de Gruyter, Berlin.