



INSTITUTO DE
TECNOLOGÍA
QUÍMICA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Universitat Politècnica de València

Instituto de Tecnología Química

Desarrollo de procesos enzimáticos y quimioenzimáticos utilizando catalizadores heterogéneos para la síntesis de productos de química fina

Tesis Doctoral

Presentada por

JOSE MIGUEL CARCELLER CARCELLER

Dirigida por

Dra. SARA IBORRA CHORNET

Dra. MARIA JOSÉ CLIMENT OLMEDO

Septiembre 2019

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todas las personas que han hecho posible mi desarrollo tanto personal como profesional a lo largo de estos años. En primer lugar, al Prof. Avelino Corma por darme la oportunidad de trabajar en el Instituto de Tecnología Química (ITQ), ofreciendome la beca predoctoral FPI, por los consejos y la guía que me ha dado a lo largo del doctorado.

A mis directoras de Tesis la Dra. Sara Iborra y a la Dra. María José Climent por el apoyo y la ayuda que han mostrado hacia mi trabajo, agradezco enormemente todo lo que he aprendido.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, así como a todas las personas que forman parte del Instituto de Tecnología Química, desde taller a administración.

Gracias a todos los amigos que he hecho a lo largo de este periodo, gracias a Eva Romani por estar a mi lado y creer en mi.

Gracias a toda mi familia sin vosotros no podría haberlo logrado, gracias por ayudarme y apoyarme cada día.

¡Gracias a todos!

Índice general

Capítulo 1	Introducción	11
1.1.	Desarrollo Sostenible	11
1.2.	Química Verde y los doce principios	11
1.3.	Química Fina.....	14
1.4.	Catálisis.....	14
1.5.	Catálisis enzimática.....	17
1.5.1.	Estructura de las enzimas	18
1.5.2.	Cinética enzimática	21
1.5.3.	Clasificación enzimática	24
1.5.4.	Inmovilización enzimática	27
1.5.4.1	Inmovilización por Confinamiento	28
1.5.4.2	Inmovilización por formación de Agregados enzimáticos.....	29
1.5.4.3	Inmovilización sobre soportes	30
1.6.	Procesos quimioenzimáticos (Q.E).....	39
Capítulo 2	Objetivos	43
Capítulo 3	Obtención selectiva de los flavonoides cítricos Prunina y Naringina mediante hidrólisis enzimática de Naringina	45
3.1.	Introducción	45
3.2.	Resultados y discusión	49
3.2.1.	Purificación enzimática de la naringinasa proveniente del hongo Penicillium Decumbens (NgsaC).....	49
3.2.2.	Inmovilización enzimática y caracterización del derivado enzimático 52	
3.2.2.1	Inmovilización de la naringinasa sobre óxido de grafeno (OG)	52
3.2.2.2	Inmovilización de naringinasa sobre la zeolita ITQ-2 pura sílice....	58
3.2.3.	Propiedades Catalíticas de la naringinasa (C y P) soportada sobre OG y GITQ-2	65
3.2.3.1	Estudio de la influencia del pH en la actividad enzimática	65

3.2.3.2	Estudio del efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción	67
3.2.3.3	Determinación de las constantes de Michaelis-Menten (K_M)	68
3.2.3.4	Estudio de la estabilidad térmica del derivado enzimático	70
3.2.3.5	Estudio de la estabilidad temporal de la naringinasa C sobre OG y GITQ-2	71
3.2.4.	Aplicación industrial de los biocatalizadores	72
3.2.4.1	Producción de Naringenina y Prunina y estudio de estabilidad catalítica	72
3.2.4.2	Tratamiento del Zumo de pomelo para reducir el sabor amargo	76
3.3.	Conclusiones parciales	78
3.4.	Sección experimental	78
3.4.1.	Materiales	78
3.4.2.	Preparación de los soportes	79
3.4.2.1	Óxido de grafeno (OG) y óxido de grafeno reducido (OGR)	79
3.4.2.2	Preparación de los materiales ITQ-2, Beta y MCM-41	79
3.4.2.3	Funcionalización de soportes silíceos	80
3.4.3.	Purificación de la Naringinasa comercial (NgsaC)	80
3.4.4.	Inmovilización enzimática	81
3.4.5.	Experimentos catalíticos	82
3.4.5.1	Determinación de actividades enzimáticas	82
3.4.5.2	Determinación de las constantes de Michaelis-Menten (K_M)	82
3.4.5.3	Determinación de la Actividad catalítica modificando el pH y la temperatura	82
3.4.5.4	Determinación de la estabilidad térmica del derivado enzimático	83
3.4.5.5	Determinación de la Actividad recuperada tras la inmovilización	83
3.4.5.6	Estabilidad temporal de la naringinasa inmovilizada	84
3.4.5.7	Producción de Prunina y Naringenina y estabilidad del derivado enzimático	84
3.4.5.8	Proceso en continuo para reducir el amargor del zumo de pomelo	85
3.4.5.9	Determinación de la capacidad antioxidante	86
3.4.6.	Métodos analíticos para la caracterización de materiales	87

Capítulo 4 Desracemización de alcoholes mediante un proceso redox quimioenzimático en reactores en continuo de lecho fijo	89
4.1. Introducción	89
4.2. Resultados y discusión	95
4.2.1. Caracterización del soporte NITQ-2	95
4.2.2. Inmovilización enzimática y estudio de las propiedades catalíticas del biocatalizador	97
4.2.2.1 Condiciones de inmovilización y cinéticas de reacción.....	97
4.2.2.2 Influencia de la variación del pH y la Temperatura en la actividad enzimática	99
4.2.2.3 Aplicabilidad catalítica	101
4.2.2.4 Obtención de (S)-2-octanol en reactor continuo en lecho fijo. Estudio del tiempo de contacto y estabilidad temporal.....	102
4.2.3. Estudio de la etapa de oxidación.....	104
4.2.3.1 Oxidación del 2-octanol racémico en presencia de la zeolita Zr-Beta	104
4.2.3.2 Aplicabilidad catalítica de la zeolita Zr-Beta en la oxidación de alcoholes	105
4.2.3.3 Estudio de la oxidación del alcohol racémico 2-octanol en un reactor de lecho fijo. Determinación del tiempo de contacto y estabilidad temporal..	107
4.2.4. Diseño del proceso industrial mediante combinación de reactores de oxidación y reducción	109
4.3. Conclusiones parciales.....	112
4.4. Sección Experimental	112
4.4.1. Materiales.....	112
4.4.2. Síntesis de los catalizadores	113
4.4.2.1 Síntesis de la zeolita MCM-22 pura sílice y de la zeolita ITQ-2...	113
4.4.2.2 Funcionalización del soporte con grupos amino.....	113
4.4.2.3 Preparación de la zeolita Zr Beta	113
4.4.3. Determinación del punto isoeléctrico e inmovilización de la enzima alcohol deshidrogenasa.	114

4.4.4.	Experimentos catalíticos	115
4.4.4.1	Reducción de cetonas con la enzima ADH@NITQ2 en un reactor discontinuo	115
4.4.4.2	Determinación de la estabilidad enzimática a variaciones de pH y temperatura.....	115
4.4.4.3	Reducción de 2-octanona en presencia de ADH(S)@NITQ-2 en un reactor continuo de lecho fijo	115
4.4.4.4	Reacción de oxidación de 2-octanol en presencia de la zeolita Zr-Beta en reactor discontinuo	116
4.4.4.5	Oxidación de 2-octanol en reactor continuo de lecho fijo.....	116
4.4.4.6	Combinación de lechos catalíticos Oxidación de 2-octanol en reactor continuo de lecho fijo.....	117
4.4.5.	Métodos analíticos.....	118
Capítulo 5 Obtención de diésteres del 2,5-bis(hidroximetil)furano (BHMF) a partir del 5-hidroximetilfurfural a través de un proceso en cascada quimioenzimático		121
5.1.	Introducción	121
5.2.	Resultados y discusión	126
5.2.1.	Síntesis y caracterización del catalizador Co@C	126
5.2.2.	Propiedades catalíticas de las nanopartículas Co@C en la reducción de HMF a BHMF	129
5.2.2.1	Optimización de las condiciones de reacción.....	129
5.2.2.2	Estudio de distintos catalizadores en la reducción de HMF a BHMF	132
5.2.2.3	Estudio de la estabilidad y reusabilidad del catalizador Co@C en la reducción de HMF a BHMF.....	136
5.2.2.4	Generalidad del proceso de reducción en presencia de Co@C.....	138
5.2.2.5	Estudio de la influencia del disolvente en la reducción de HMF en BHMF	139
5.2.3.	Síntesis de los diésteres del BHMF en un proceso en cascada.....	140
5.2.4.	Estudio del proceso quimioenzimático en cascada de la síntesis de los diésteres del BHMF mediante reactores de lecho fijo.....	145
5.3.	Conclusiones Parciales	148
5.4.	Sección Experimental.....	149

5.4.1.	Materiales.....	149
5.4.2.	Síntesis de catalizadores.....	149
5.4.2.1	Preparación del catalizador Co@C.....	149
5.4.2.2	Preparación del catalizador Co@C a partir de la descomposición térmica de precursor metal-orgánico (MOF)	150
5.4.2.3	Preparación del catalizador Co@C/C	150
5.4.3.	Caracterización del catalizador	150
5.4.4.	Experimentos catalíticos	151
5.4.4.1	Reacción de hidrogenación del HMF	151
5.4.4.2	Reacción de esterificación/transesterificación enzimática.....	151
5.4.4.3	Reacción en cascada (hidrogenación-transesterificación) en reactor discontinuo.....	152
5.4.4.4	Reacción de reducción del HMF en reactor continuo de lecho fijo.....	152
5.4.4.5	Reacción de transesterificación del BHMF en reactor continuo de lecho fijo	153
Capítulo 6	Conclusiones	163
Capítulo 7	Resumen, Resum, Abstract	165
Capítulo 8	Bibliografía	171

Capítulo 1 Introducción

1.1. Desarrollo Sostenible

El término *Desarrollo Sostenible* fue utilizado por primera vez en 1987 en un informe realizado por la Comisión Mundial para el Medio Ambiente y Desarrollo encabezada por la exministra noruega Gro Harlem Brundtland.¹ Este informe recibió el nombre de *Nuestro Futuro Común* y tuvo el propósito de analizar las políticas de desarrollo económico. Concluyó que con el actual desarrollo económico-social se está llevando a cabo a cambio de una destrucción medioambiental severa.

“Esta Comisión cree que la humanidad puede construir un futuro que sea más próspero, más justo y más seguro”. “Vemos (...) la posibilidad de una nueva era de crecimiento económico que ha de fundarse en políticas que sostengan y amplíen la base de recursos del medio ambiente; y creemos que ese crecimiento es absolutamente indispensable para aliviar la gran pobreza que sigue acentuándose en buena parte del mundo en desarrollo”.

Posteriormente, en 1992 se celebró la Cumbre de la Tierra en Río de Janeiro.² En esta conferencia se alcanzó el acuerdo sobre la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, donde se indica: *“los seres humanos constituyen el centro de las preocupaciones relacionadas con el desarrollo sostenible. Tienen derecho a una vida saludable y productiva en armonía con la naturaleza.”*

Cabe mencionar el importante papel de la comunidad científica y, en concreto de la química en la búsqueda de la sostenibilidad. Es de suma importancia que redirijamos nuestros esfuerzos en la búsqueda del equilibrio entre el desarrollo y el cuidado medioambiental. Permitiendo de este modo que las generaciones actuales cubran sus necesidades sin comprometer el futuro de las próximas.

1.2. Química Verde y los doce principios

El término de *Química Verde* fue acuñado por los profesores P. Anastas y J.C. Warner.³ Éstos definieron que la *Química Verde* se fundamenta en 12 principios que deben ser tenidos en cuenta a la hora de desarrollar u optimizar un proceso químico para asegurar

la sostenibilidad del mismo, además de la viabilidad económica y tecnológica. Así pues, los doce principios de P. Anastas y J. C. Warner constituyen las herramientas para conseguir la sostenibilidad en un proceso químico. Estos principios son:

- 1) *Prevenir la formación de residuos.* Resulta lógico pensar que es preferible evitar la formación de un residuo que tratar de eliminarlo una vez ya ha sido producido.
- 2) *Mejorar la Economía Atómica.* Los métodos de síntesis deberán diseñarse de manera que maximicen la incorporación de los materiales utilizados en el producto final.
- 3) *Diseñar procesos químicos sin riesgo.* Los procesos químicos deben ser diseñados para utilizar y generar sustancias que sean inocuas para la salud humana, así como para el medioambiente.
- 4) *Generar productos eficaces y seguros.* Los productos químicos deben diseñarse de manera que mantengan su eficacia y al mismo tiempo deben reducir su toxicidad.
- 5) *Reducir el uso de sustancias auxiliares.* Se evitará, en la medida de lo posible, el uso de sustancias que no sean imprescindibles (disolventes, agentes de separación, etc.) y en caso de que se utilicen serán inocuas.
- 6) *Diseñar procesos con eficiencia energética.* Las necesidades energéticas de los procesos químicos serán catalogadas por su impacto medioambiental y económico reduciéndose todo lo posible, y buscando siempre que sea posible que los procesos químicos puedan llevarse a cabo a temperatura y presión ambiental.
- 7) *Uso de materias primas renovables.* Las materias primas usadas en el proceso deben ser preferiblemente renovables siempre que sea viable y no comprometa el desarrollo ambiental.
- 8) *Evitar la derivatización innecesaria.* Siempre que sea posible se evitará la formación de derivados (grupos de protección/desprotección, de bloqueo, modificación temporal de procesos físicos/químicos), puesto que tales procesos requieren reactivos y etapas adicionales que generan residuos.
- 9) *Potenciar la catálisis.* Se emplearán catalizadores eficientes y reutilizables en lugar de reactivos estequiométricos.
- 10) *Generar productos químicos biodegradables.* Los productos deben ser diseñados de manera que al final de su función se descompongan en productos de degradación inocuos y que no persistan en el medio ambiente.
- 11) *Implementar metodologías analíticas que permitan la monitorización a tiempo real.* Las metodologías analíticas serán desarrolladas para permitir un control en tiempo real del proceso y prevenir así a la formación de sustancias peligrosas.
- 12) *Minimizar el potencial de accidentes químicos.* Se elegirán las sustancias empleadas en los procesos químicos de forma que se minimice el riesgo de accidentes químicos, así como las emanaciones, explosiones e incendios.

Se puede resumir que estos principios de la *Química Verde*, son una serie de estrategias que conducen a una optimización de los procesos químicos, reduciendo de este modo los residuos generados, la toxicidad de los mismos, así como los requerimientos energéticos

del proceso. Por ejemplo, el uso de catalizadores ofrece la posibilidad de disminuir la *Energía de activación* asociada a la reacción. Todo esto finalmente se traduce en un incremento de la sostenibilidad ambiental, así como en una reducción de los costes asociados al proceso químico.

La comunidad científica se vio en la necesidad de crear parámetros para evaluar la sostenibilidad de los procesos químicos. Uno de estos parámetros es el de la *Economía Atómica (EA)*⁴ que se define como la relación entre el peso molecular del producto respecto a la suma de los pesos moleculares de todos los reactivos empleados (Ecuación 1. 1).

$$EA = \frac{\text{Peso molecular del producto}}{\text{Suma del peso molecular de los reactivos}} \cdot 100$$

Ecuación 1. 1

La *EA* de una reacción depende de la naturaleza de la misma. Por ejemplo, una reacción de *Diels-Alder* tiene una *EA* = 100 %.

Otro parámetro interesante es el de *Factor E*, propuesto por Sheldon.⁵ Éste se define como la relación en peso (kg) de subproductos generados en una reacción respecto a la cantidad de producto deseado que se ha obtenido (Ecuación 1. 2).

$$\text{Factor } E = \frac{\text{(kg) de subproductos generados}}{\text{(kg) de producto obtenido}}$$

Ecuación 1. 2

Este factor permite la clasificación de los diferentes sectores industriales según el *Factor E*, siendo la industria de la Petroquímica la que menor *Factor E* presenta, seguida de la Química Fina y, por último, se sitúa la industria Farmacéutica.⁶

Otra consideración importante, además de la cantidad de residuos generados, es el grado de toxicidad asociada tanto a los reactivos empleados como a los residuos generados. Estos parámetros se cuantifican mediante el *Factor Medioambiental (EQ)*, que se define como el resultado de multiplicar el *Factor E* por un valor arbitrario *Q*, propio del compuesto y asignado en función de la agresividad hacia el medioambiente (Ecuación 1. 3).

Por ejemplo, el NaCl tiene un valor *Q* = 1, mientras que los metales pesados presentan un valor *Q* entre 100-1000.⁶ Para asignar este factor se tiene en cuenta la ecotoxicidad, la interacción con el agua y los suelos, etc.⁷

$$EQ = \text{Factor } E \cdot Q \text{ (grado de agresividad ambiental)}$$

Ecuación 1. 3

Se ha desarrollado una serie de base de datos que permiten saber el valor de *Q*, por ejemplo EATOS (Environmental Assessment Tool for Organic Synthesis).⁸

1.3. Química Fina

La Química Fina (*QF*) engloba la producción de compuestos químicos tales como fármacos, antioxidantes, pinturas, tensioactivos, etc. Ejemplos de ellos son la Procaína, Penicilina o Nafazolina (Figura 1. 1).

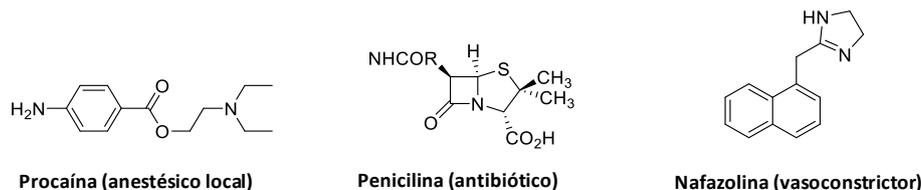


Figura 1. 1. Compuestos típicos de Química Fina.

Los compuestos de la *QF* presentan estructuras complejas, suelen contener heteroátomos (O, S, N, P, etc.) y varios grupos funcionales. Estos productos se generan en volúmenes pequeños (20-400 Tm/año), y su estabilidad es limitada.

Los procesos químicos asociados a los productos de la *QF* en general se caracterizan por sus síntesis largas con múltiples pasos (5-10 etapas). Debido a la limitada estabilidad térmica que presentan estos compuestos, las reacciones se suelen realizar a presión y temperaturas moderadas, en reactores discontinuos con volúmenes bajos (0,5-10) m³ y los productos obtenidos deben presentar alta pureza para su comercialización. Todo ello hace que los compuestos de *QF* presenten un elevado valor añadido, pero su producción genera una gran cantidad de subproductos, como se observa en la clasificación industrial según el *Factor E*.

1.4. Catálisis

Cuando estudiamos una reacción química existen dos consideraciones importantes para entender la transformación en su totalidad, una de ellas viene dada por la termodinámica del proceso y otra por la velocidad de reacción. Al producirse una reacción química hay un cambio en la composición del sistema, pero siempre llega a un punto donde la composición no varía, este punto se define como equilibrio de la reacción y corresponde con el valor de energía libre mínimo del sistema. El estudio termodinámico del proceso nos informa de la posición del equilibrio químico y de la espontaneidad de la transformación de los reactivos a productos.

Por otro lado, aunque una reacción sea espontánea, esto no garantiza que la transformación ocurra en un tiempo determinado, puede ocurrir que una reacción sea termodinámicamente favorable presentando una constante de equilibrio elevada, pero muestre una velocidad de reacción pequeña, lo que la hace inviable para su aplicación industrial, problema que ha sido ampliamente estudiado por los especialistas en catálisis.

Un catalizador se define como una sustancia que aumenta la velocidad de una reacción química sin experimentar un cambio global al producirse la reacción. Por lo tanto, el catalizador se utiliza en una de las etapas de la reacción y se recupera completamente después de esta, lo que hace que no aparezca en la ecuación estequiométrica de la reacción. Los catalizadores proporcionan a los reactivos un camino alternativo por el que transformarse en productos, de manera que el requerimiento energético (*Energía de activación* o E_a), para producirse la reacción se ve altamente disminuido y ello implica el aumento en la velocidad de reacción. Como se observa en la Figura 1. 2, la *Energía de activación* (E_{a2}) que corresponde a la reacción catalizada es menor que la (E_{a1}) que corresponde a la *Energía de activación* del proceso sin catalizador.

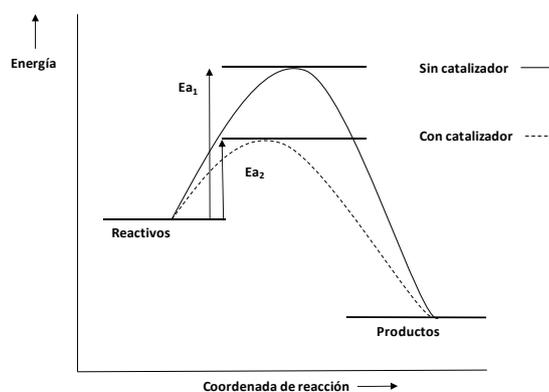


Figura 1. 2. Cambio en la energía del sistema usando un catalizador.

Como se ha comentado previamente en los doce principios de la *Química Verde*, la catálisis se considera una de las herramientas más importantes para la obtención de procesos químicos más sostenibles, esto se debe a que la catálisis logra alcanzar dos puntos de la *Química Verde*: disminuye el consumo energético, y reduce la cantidad de residuos producidos en la reacción. Se puede diferenciar entre catálisis homogénea y heterogénea, según las condiciones en las que se realice la reacción. Cuando el catalizador está en la misma fase (generalmente líquida) que los reactivos se define como catálisis homogénea, mientras que cuando el catalizador y el reactivo están en distinta fase se la conoce como catálisis heterogénea. Cada tipo de catálisis presenta unas ventajas y desventajas claras que se resumen en la Tabla 1. 1.

Tabla 1. 1. Tipos de catálisis.

Catálisis	Ventajas	Desventajas
Homogénea	<p>Gran actividad catalítica</p> <p>Condiciones de reacción suaves</p> <p>Precio del catalizador bajo</p>	<p>Gran cantidad de residuos generados</p> <p>Varias etapas del proceso</p> <p>Imposibilidad de reutilizar el catalizador</p> <p>Posible contaminación del producto</p> <p>Problemas en el manejo y en la seguridad, problemas de corrosión</p>
Heterogénea	<p>Pequeña cantidad de residuos generados y etapas del proceso</p> <p>Fácil separación del catalizador y posibilidad de reutilización, así como el uso de reactores en continuo</p> <p>Sin problemas de contaminación del producto</p> <p>Alta pureza del producto</p> <p>Fácil manejo y aumento en la seguridad, sin problemas de corrosión</p> <p>Posibilidad de diseñar catalizadores específicos para cada reacción</p>	<p>Actividad catalítica variable</p> <p>Condiciones de reacción severas</p> <p>Precio medio/alto</p>

En general, los catalizadores homogéneos al estar en la misma fase que el reactivo presentan mayor actividad catalítica que los catalizadores heterogéneos, y eso permite utilizar condiciones de reacción más suaves. Esto sumado al menor precio de los catalizadores homogéneos provoca que en las industrias de la *QF*, generalmente se use la catálisis homogénea, por ejemplo, empleando compuestos inorgánicos como ácidos minerales. Sin embargo, el uso de estos compuestos presenta una serie de claras desventajas (Tabla 1. 1) respecto al uso de catalizadores heterogéneos como son la corrosión, la necesidad de neutralización, etc.

Por otro lado, la legislación medioambiental cada vez está siendo más exigente forzando a las industrias a la búsqueda de catalizadores más sostenibles. Teniendo en cuenta las ventajas descritas en la Tabla 1. 1, como son la fácil separación y la posibilidad de reutilizar el catalizador abaratando el precio del mismo, hace que el interés industrial por los catalizadores heterogéneos este aumentando. Por ejemplo, comparativamente el proceso

catalítico de la alquilación del benceno en un sistema heterogéneo presenta un *Factor E*, 30 veces menor que en un sistema homogéneo.

1.5. Catálisis enzimática

Dentro de la clasificación catalítica otro tipo de catalizadores importantes son las enzimas. Las enzimas son mayoritariamente catalizadores de naturaleza proteica que se forman en las células a partir de la traducción del ácido ribonucleico (ARN). Su función es catalizar un inmenso conjunto de reacciones químicas necesarias para la vida. Como son, la transducción de señales catalizada por las *Fostasas*⁹ que permite a los organismos multicelulares responder a los estímulos del medio que les rodea o como es el caso de la *Miosina*¹⁰ que al hidrolizar el trifosfato de adenosina (ATP), es capaz de generar la contracción muscular.

Una enzima puede necesitar otras sustancias denominadas cofactores para ejercer su poder catalítico. Según la naturaleza orgánica o inorgánica del cofactor reciben el nombre de coenzima o activadores respectivamente. Cuando el cofactor se encuentra unido a la estructura proteica, éste se denomina grupo prostético y la parte de la proteína sin cofactor recibe el nombre de apoenzima mientras que el complejo enzima-cofactor recibe el nombre de holoenzima.

La catálisis enzimática podría incluirse dentro de la catálisis homogénea siempre que el catalizador se encuentre en la misma fase que el reactivo. Sin embargo, cabe mencionar que la catálisis enzimática presenta una serie de características que la diferencian de la catálisis homogénea realizada con catalizadores químicos tradicionales (Tabla 1. 2).

Como se puede observar en la Tabla 1. 2, la catálisis enzimática presenta una serie de características únicas, entre ellas destacamos que las enzimas son prácticamente inocuas pues son biodegradables y altamente específicas por lo que generalmente no producen residuos o subproductos de reacción, por otro lado, son capaces de actuar en condiciones muy suaves de reacción por lo que el requerimiento energético es mínimo.

Tabla 1. 2. Catálisis enzimática.

Catálisis	Ventajas	Desventajas
Enzimática	Alta actividad catalítica	Precio del catalizador
	Condiciones de reacción <i>muy suaves</i> (presión, temperatura ambiente, pH neutros generalmente trabajan en disoluciones acuosas)	Posibilidad de desactivación enzimática
	Alta selectividad al producto deseado	Poca versatilidad tanto en la variedad de reactivos como en condiciones de reacción
	Se pueden inmovilizar y reutilizar permitiendo el uso de reactores en continuo	Necesidad de cofactores
	Posibilidad de modificar biotecnológicamente enzimas según las necesidades del proceso	
	Son biodegradables no se esperan residuos después de la reacción	

1.5.1. Estructura de las enzimas

La estructura de las proteínas se desglosa en una estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. La estructura primaria es la sucesión lineal de los aminoácidos que forman la cadena polipeptídica. La estructura lineal no existe de forma natural pero su estudio resulta de gran importancia para conocer cuáles son los aminoácidos que forman la proteína, su secuencia o posición de los posibles grupos prostéticos.

Se puede imaginar como una larga cadena en zigzag en la que los planos de los enlaces peptídicos van quedando enlazados por los carbonos alpha (C_α), y los sustituyentes de cada aminoácido se disponen por encima y por debajo del plano (Figura 1. 3). Es en el C_α donde pueden producirse los movimientos en el espacio que conduzcan a una conformación superior, ya que los otros componentes presentan limitaciones debido al plano del enlace peptídico.

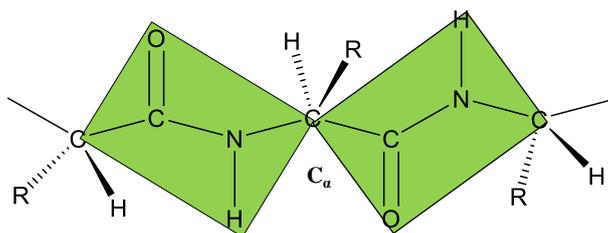


Figura 1. 3. Enlace peptídico.

La estructura secundaria es el resultado de la rotación que sufren en el espacio los planos peptídicos con respecto al C_α . Teóricamente existen una gran variedad de rotaciones

posibles, pero solo algunas de ellas son estables termodinámicamente. Estas son la α -hélice, la hélice de colágeno y la hoja plegada β , que presentan 4, 3, y 2 aminoácidos por vuelta respectivamente (Figura 1. 4).

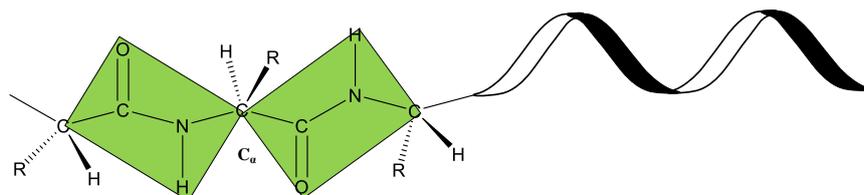


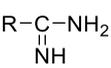
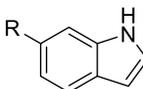
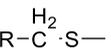
Figura 1. 4. Transición de la estructura primaria de la proteína a la secundaria.

La estructura terciaria se obtiene tras el plegamiento de la estructura secundaria y es característica de cada proteína, pues su estructura depende de los enlaces formados entre los residuos de los aminoácidos presentes en la cadena polipeptídica. Estos enlaces pueden ser puentes de H, fuerzas de Van de Waals, interacciones electrostáticas, hidrofóbicas e iónicas o incluso enlaces covalentes como puentes disulfuro. Este nivel estructural es el que determina la actividad catalítica de la enzima.

Por último, la estructura cuaternaria es el resultado de la asociación de dos o más cadenas polipeptídicas con estructura terciaria para formar un complejo molecular mantenido generalmente por enlaces no covalentes, esta estructura no la presentan todas las proteínas.¹¹

Desde un punto de vista químico podemos imaginar las proteínas como grandes complejos orgánicos que presentan grupos funcionales externos e internos asociados a los aminoácidos de la estructura. Estos grupos nos permitirán más adelante hablar de la inmovilización enzimática por ello vamos a presentar algunos de los más comunes en la Tabla 1. 3.

Tabla 1. 3. Grupos funcionales de los aminoácidos, abundancia y exposición.

Grupo funcional	Aminoácido	Abundancia	Exposición
	Lisina	++	++
R-S-H	Cisteína	-	+/-
	Aspartato	+	++
R-OH	Tirosina	+	-
	Arginina	+	++
	Histidina	+/-	++
R-S-S-R	Cisteína	-	+/-
	Triptófano	-	-
	Metionina	-	-
R-CH ₂ OH	Serina Treonina	++ ++	+ +/-

(++ Mucha cantidad, + Cantidad normal, +/- Cantidad baja, - Cantidad muy baja)

Como se puede observar en la Tabla 1. 3 los grupos reactivos más abundantes y de mayor exposición suelen ser grupos amino y grupos ácido.¹²

El resultado final de estas estructuras complejas es que las enzimas presentan una gran especificidad por el sustrato, que las hacen la envidia de la química catalítica. Cada proteína presenta una cavidad llamada centro activo, donde los aminoácidos de la cadena polipeptídica crean una estructura 3D que complementa a la del sustrato. Esta teoría recibe el nombre del *modelo de ajuste inducido*. Tras la unión del sustrato con la enzima se forma el complejo enzima-sustrato donde el centro activo modifica ligeramente su

estructura y lo que reduce la *Energía de activación* del estado de transición y se produce la transformación a producto, finalmente se libera la enzima y el producto.

1.5.2. Cinética enzimática

La velocidad de una reacción catalizada por una enzima depende de la concentración de sustrato, la temperatura, la presencia de inhibidores y el pH de reacción. Experimentalmente se observa que la velocidad inicial de reacción (v_0) aumenta al aumentar la concentración de sustrato $[S]_0$ hasta un máximo a partir del cual la velocidad no se modifica (Figura 1. 5). El mecanismo más sencillo para explicar la reacción enzimática es el modelo de Michaelis y Menten.

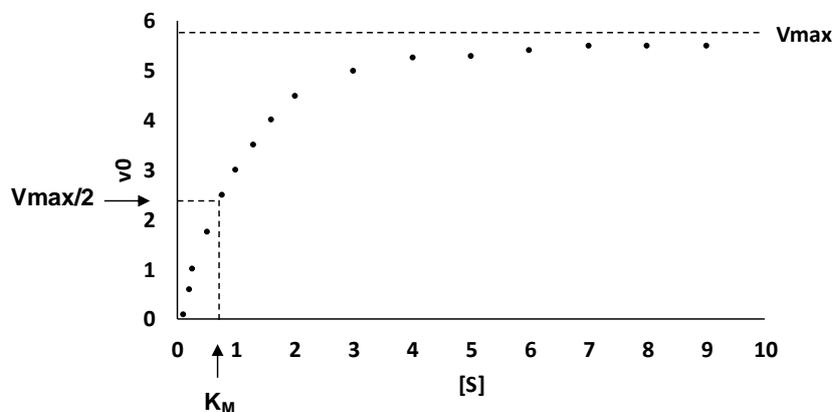
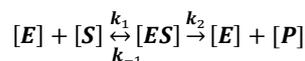


Figura 1. 5. Cinética enzimática.

En este modelo las reacciones enzimáticas ocurren en dos pasos (Ecuación 1. 4). Primero a partir de la enzima $[E]$ y el sustrato $[S]$ se forma el complejo enzima-sustrato $[ES]$ y posteriormente, este complejo da lugar a la formación del producto $[P]$, liberando la enzima libre.



Ecuación 1. 4

En este esquema k_1 , k_{-1} y k_2 son las constantes cinéticas individuales de cada paso. Según esto las velocidades de cada etapa serán:

$$v_1 = k_1 \cdot [E] \cdot [S]$$

Ecuación 1. 5

$$v_{-1} = k_{-1} \cdot [ES]$$

Ecuación 1. 6

$$v_2 = k_2 \cdot [ES]$$

Ecuación 1. 7

Por otra parte, la concentración total del enzima $[E]_t$ es constante e igual a:

$$[E]_t = [E] + [ES]$$

Ecuación 1. 8

De manera que la concentración de enzima libre $[E]$ será igual a la cantidad de enzima total $[E]_t$ menos la cantidad de enzima que este formando parte del complejo enzima-sustrato $[ES]$:

$$[E] = [E]_t - [ES]$$

Ecuación 1. 9

A partir de la Ecuación 1.5 sustituyendo la Ecuación 1. 9 resulta que:

$$v_1 = k_1 \cdot [S] \cdot [E]_t - k_1 \cdot [S] \cdot [ES]$$

Ecuación 1. 10

Assumiendo la hipótesis del estado estacionario, según la cual la concentración del complejo enzima-sustrato es pequeña y constante a lo largo de la reacción, se puede decir que la velocidad de formación de $[ES]$ (v_1) es igual a la de su disociación ($v_{-1}+v_2$). Como $[ES]$ es constante, la velocidad de formación del producto debe ser constante:

$$v_2 = k_2 \cdot [ES] = \textit{constante}$$

Ecuación 1. 11

A su vez como:

$$v_{-1} + v_2 = v_1$$

Ecuación 1. 12

Así a partir de la Ecuación 1. 10 sustituyendo términos obtenemos la Ecuación 1. 13:

$$k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES] = k_1 \cdot [S] \cdot [E]_t - k_1 \cdot [S] \cdot [ES]$$

Ecuación 1. 13

Despejando $[ES]$ en la Ecuación 1. 13 obtenemos la Ecuación 1. 14:

$$[ES] = \frac{[E]_t \cdot [S]}{(K_M + [S])}$$

Ecuación 1. 14

Donde la K_M se define como:

$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{(k_1)}$$

Ecuación 1. 15

Por lo tanto, en el estado estacionario la velocidad de formación del producto es:

$$v_2 = k_2 \cdot [ES] = k_2 \cdot \frac{[E]_t \cdot [S]}{(K_M + [S])}$$

Ecuación 1. 16

A concentraciones elevadas de sustrato $[S] \gg K_M$ la Ecuación 1. 16 se transforma en la Ecuación 1. 17:

$$v_2 = k_2 \cdot [E]_t = v_{max}$$

Ecuación 1. 17

Lo que nos permite definir un nuevo parámetro, la velocidad máxima de reacción (v_{max}) que es la velocidad máxima que se alcanza cuando todo el enzima disponible se encuentra unido al sustrato. Si se introduce v_{max} en la Ecuación 1. 16 obtenemos la Ecuación 1. 18.

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{(K_M + [S])}$$

Ecuación 1. 18

Esta Ecuación 1. 18 es la expresión más conocida de la ecuación de Michaelis-Menten. La representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten (v_0 frente a $[S]_0$) (Figura 1. 5) es una hipérbola, donde la v_{max} corresponde al valor máximo al que tiende la curva experimental y la K_M corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la v_{max} según la siguiente ecuación:

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{([S] + [S])} = \frac{v_{max} \cdot [S]}{(2[S])} = \frac{v_{max}}{2}$$

Ecuación 1. 19

Esto significa que, a menor K_M , la $[S]$ necesaria para que la enzima alcance la mitad de la v_{max} será menor y por lo tanto la afinidad del enzima por el sustrato será mayor.

El método más sencillo para determinar gráficamente el valor de K_M y v_{max} es la representación de Lineweaver-Burk. Este método se basa en que invirtiendo la Ecuación 1. 18 es posible obtener la Ecuación 1. 20.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{v_{max} \cdot [S]} = \frac{K_M}{v_{max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{v_{max} \cdot [S]} = \frac{K_M}{v_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

Ecuación 1. 20

Como se observa en la Figura 1. 6, mediante la realización de unos pocos experimentos cinéticos en los que se determina la velocidad inicial de la reacción respecto a cantidades variables de sustrato (bajo las mismas condiciones de enzima, temperatura, pH, etc.) es posible determinar la K_M y la v_{max} de una enzima usando la Ecuación 1. 20.

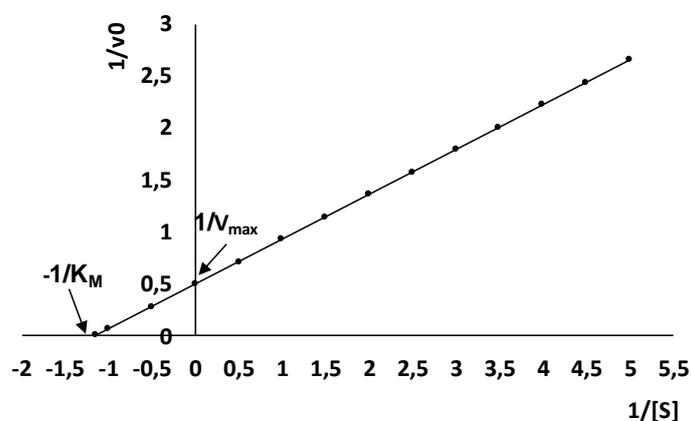


Figura 1. 6. Modelo de Lineweaver-Burk.

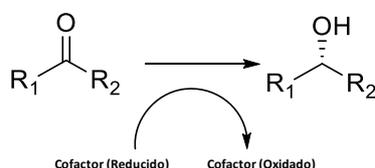
1.5.3. Clasificación enzimática

Existen más de 75000 enzimas solo en el cuerpo humano, por lo que se hace necesario clasificarlas para facilitar su estudio. Generalmente se añade el sufijo (-asa) al sustrato o a la reacción que catalizan. Sin embargo, debido a la gran cantidad de enzimas que existen, la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular ha desarrollado una nomenclatura sistemática basada en los numero EC, siendo el primer número la clasificación de la enzima según el tipo de reacción que cataliza, Tabla 1. 4.

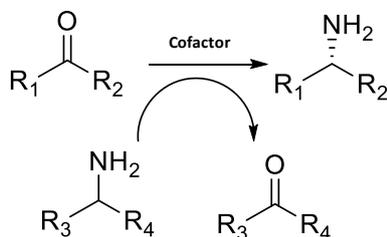
Tabla 1. 4. Clasificación de las enzimas.

Número EC	Clase de enzima
EC.1	Oxidoreductasas
EC.2	Transferasas
EC.3	Hidrolasas
EC.4	Liasas
EC.5	Isomerasas
EC.6	Ligasas

EC.1.-Oxidoreductasas. Son un grupo de enzimas que catalizan reacciones de oxidación-reducción, en las que un agente reductor (donante) transfiere electrones a un agente oxidante (aceptor). Generalmente requieren coenzimas, como son los pares dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH/NAD⁺), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH/NADP⁺), flavín adenín dinucleótido (FAD/FADH₂) o flavin mononucleótido (FMN/FMNH₂). Estos cofactores quedan modificados en su forma oxidada o reducida de manera que deben utilizarse cantidades estequiométricas (sustrato/cofactor) o bien deben ser reciclados durante la reacción. Un ejemplo de estas enzimas es la alcohol deshidrogenasa (ADH) con código (EC 1.1.1.1) que es capaz de reducir grupos cetona o aldehídos a grupos alcohol (Esquema 1. 1).

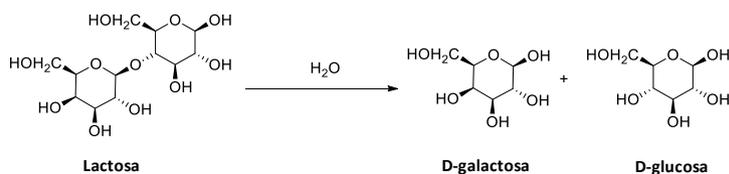
**Esquema 1. 1.** Reacción de reducción de grupos carbonilos catalizada por la enzima ADH.

EC.2.-Transferasas. Estas enzimas son capaces de transferir grupos (metilo, aldehído, cetona, grupos con nitrógeno, etc.) de unas moléculas a otras. Un ejemplo de ellas son las transaminasas, capaces de transferir un grupo amino de una molécula a otra (Esquema 1. 2). Un ejemplo de estas enzimas es la aspartato transaminasa (EC 2.6.1.1).



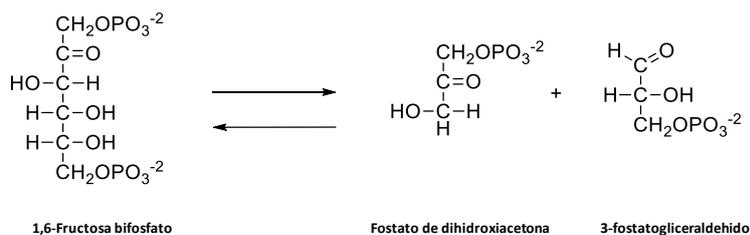
Esquema 1. 2. Reacción catalizada por la enzima transaminasa.

EC.3.-Hidrolasas. Estas enzimas son capaces de romper enlaces químicos introduciendo una molécula de H₂O, obteniendo de ese modo monómeros a partir de dímeros o polímeros. Un ejemplo de ellas lo constituye la lactasa (EC 3.2.1.23), capaz de hidrolizar la lactosa para formar glucosa y galactosa (Esquema 1. 3).



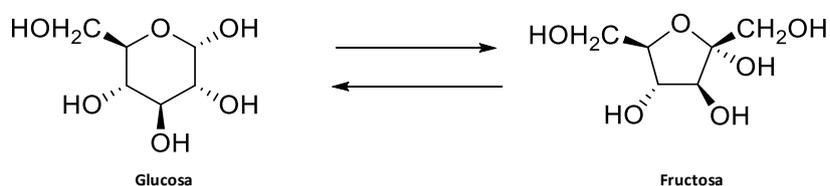
Esquema 1. 3. Reacción de hidrólisis de la lactosa catalizada por la enzima lactasa.

EC.4.-Liasas. Este grupo de enzimas son capaces de catalizar reacciones en las que se rompen enlaces químicos en compuestos orgánicos por mecanismos distintos de la oxidación o la hidrólisis. De esta manera se eliminan grupos como (H₂O, CO₂ o NH₃). La enzima aldolasa es un ejemplo de ellas, cataliza la reacción retroaldólica del 1,6-fructosa bifosfato (Esquema 1. 4).



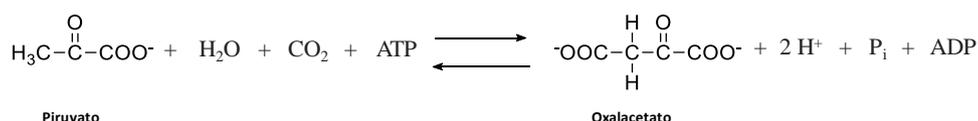
Esquema 1. 4. Reacción retroaldólica de la 1,6-fructosa bifosfato catalizada por la enzima aldolasa.

EC.5.-Isomerasas. Estas enzimas son capaces de catalizar reacciones de isomerización de moléculas, mediante la racemización y transposición de un grupo en una molécula. Un ejemplo de ellas es la glucosa isomerasa, que interviene en la isomerización glucosa-fructosa (Esquema 1. 5).



Esquema 1. 5. Reacción de isomerización de la Glucosa-Fructosa catalizada por la enzima glucosa isomerasa.

EC.6.-Ligasas. Estas enzimas catalizan la ruptura o síntesis de enlaces (C-C, C-N, etc.) mediante el acoplamiento a moléculas de alto valor energético como el ATP. Un ejemplo de ellas es la enzima piruvato carboxilasa (PC) (EC 6.4.1.1) que cataliza la conversión de piruvato en oxalacetato de forma dependiente de adenosín trifosfato (ATP) y biotina (Esquema 1. 6).



Esquema 1. 6. Reacción de conversión del sustrato Piruvato en Oxalacetato catalizada por la enzima piruvato carboxilasa.

1.5.4. Inmovilización enzimática

La especificidad enzimática es la característica más interesante para los procesos de Química Fina y particularmente en el área de la Química Farmacéutica.¹³ Esta puede dividirse en distintas clases, destacamos la *especificidad absoluta*, como es por ejemplo la que presenta la glucosa oxidasa que solo es capaz de actuar sobre un sustrato (la glucosa) y no es capaz de actuar sobre ningún otro. La *especificidad relativa*, como es la que presentan las lipasas que son capaces de reconocer un grupo de sustratos con características similares o grupos funcionales similares. También se conoce la *especificidad estereoquímica*, donde la enzima solo es capaz de actuar sobre un estereoisómero y no es capaz de reconocer a otro, como es el caso de la enzima alcohol deshidrogenasa.¹¹

Por otro lado, cabe destacar que las enzimas son biodegradables, y además son capaces de actuar en condiciones suaves de reacción, por ejemplo: (presión, temperatura ambiente y a valores de pH neutros).^{14,15}

Estas características las convierten en catalizadores ideales para los procesos de Química Fina. Sin embargo, las aplicaciones de las enzimas se ven supeditadas a los problemas que presentan cuando se quieren adaptar los procesos a nivel industrial, como son la baja estabilidad que pueden presentar en ciertas condiciones de reacción, su solubilidad y la dificultad de recuperarlas tras la reacción. Además, su precio, que oscila por ejemplo para las enzimas más útiles en biotransformaciones entre 500-20000 \$/Kg, también es un factor que limita su uso.¹⁶

Para solucionar estos problemas se han desarrollado diferentes metodologías para inmovilizar las enzimas. La inmovilización de enzimas se define como aquellas enzimas que están físicamente confinadas o localizadas.^{14,17}

No existe ninguna metodología definitiva para la inmovilización enzimática, por lo que es necesario optimizar la inmovilización según las características de cada enzima. Las condiciones de inmovilización deben favorecer la reactividad entre la enzima y el soporte y además en una inmovilización ideal la enzima preservará su actividad completa en forma heterogénea.¹⁸ A continuación, se resumen las estrategias más utilizadas: el confinamiento, la formación de agregados y la inmovilización sobre soportes (Figura 1. 7).

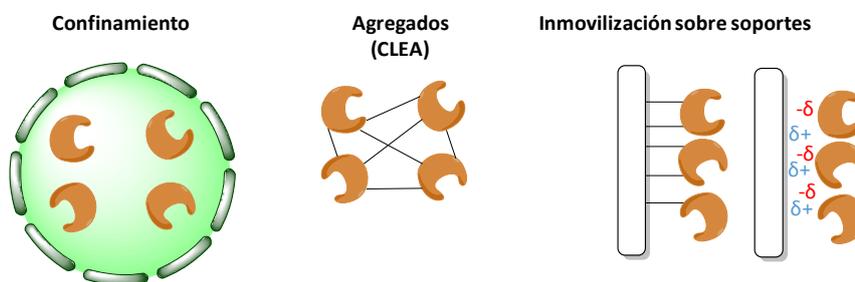


Figura 1. 7. Estrategias de inmovilización de enzimas.

1.5.4.1 Inmovilización por Confinamiento

En esta estrategia la enzima se retiene en el interior de una red polimérica, que generalmente se forma *in situ*. Se crea así una barrera física que separa la enzima del entorno, pero permite la interacción con los sustratos o productos de reacción. La principal característica de este método de inmovilización es que no existe interacción entre la enzima y el soporte que la retiene. La naturaleza de la red polimérica puede ser sintética, de origen natural, así como orgánica o inorgánica.¹⁸⁻²³

Por ejemplo, un método de inmovilización muy utilizado, siguiendo esta estrategia es la formación de geles de alginato (Figura 1. 8). En esta estrategia se pone en contacto la enzima con una disolución de alginato, y posteriormente esta mezcla se introduce gota a gota en una disolución de CaCl_2 o MgCl_2 lo que provoca la formación del gel y el consecuente confinamiento de la enzima.

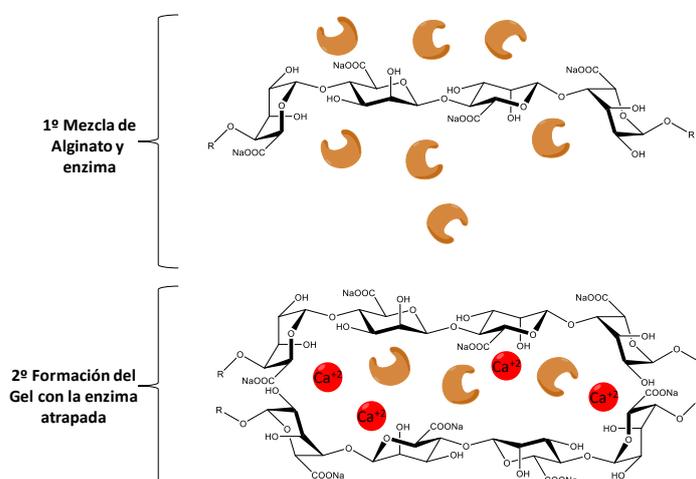


Figura 1. 8. Estrategia de inmovilización enzimática mediante confinamiento de la enzima formando geles de alginato de calcio.

1.5.4.2 Inmovilización por formación de Agregados enzimáticos

En esta estrategia de inmovilización no se requiere de soporte, y consiste en la formación de agregados enzimáticos entrecruzados que se conocen con el nombre de CLEAs, (siglas de Cross-Linking Enzyme Agregates). Esta estrategia implica la precipitación de la enzima generalmente mediante sulfato de amonio y el posterior entrecruzamiento de este precipitado usando compuestos orgánicos bifuncionales.^{24–28} La característica fundamental de esta estrategia es que al no existir soporte la heterogenización se realiza por la interconexión de la enzima. Los compuestos bifuncionales utilizados para el entrecruzamiento interaccionan con los grupos funcionales presentes en la proteína logrando la formación del agregado. El agente bifuncional más utilizado es el glutaraldehído, que es capaz de reaccionar con los grupos amino superficiales de la proteína (Figura 1. 9).

Sin embargo, se ha demostrado que la proteína puede desactivarse irreversiblemente, generalmente debido a cambios conformacionales de la estructura proteica o a la interacción de los grupos del agente de entrecruzamiento con el centro activo de la enzima. Por ello, se han estudiado agentes de entrecruzamiento de mayor tamaño como el dextrano aldehído, que no modifica los residuos de los centros activos (Mateo y col).²⁹

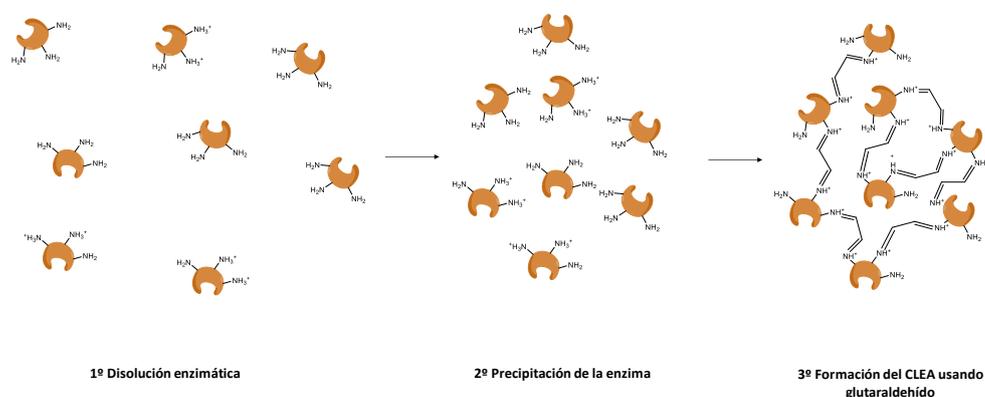


Figura 1. 9. Formación de agregados enzimáticos (CLEAs) mediante precipitación y glutaraldehído.

1.5.4.3 Inmovilización sobre soportes

Los métodos conocidos de inmovilización sobre soportes pueden ser de tres tipos dependiendo del tipo de interacción existente entre la enzima y el soporte:

a) Adsorción física. Este es uno de los métodos más conocidos para la inmovilización de enzimas, donde se utilizan generalmente soportes porosos. Este método está gobernado principalmente por la interacción de grupos funcionales de las enzimas con la superficie del sólido mediante interacciones débiles como son las fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o una combinación de las mismas. Este tipo de inmovilización se caracteriza por que no se requieren modificaciones previas ni de la enzima ni del soporte. Su principal desventaja es que bajo determinadas condiciones de reacción se puede producir una desorción enzimática.¹⁸

Un ejemplo de esta estrategia que ha recibido gran interés por la comunidad científica es el de la inmovilización de la enzima lipasa sobre soportes mediante interacciones hidrofóbicas.³⁰⁻³⁴

La razón de seleccionar este tipo de inmovilización para la enzima lipasa es que esta enzima presenta un equilibrio de estructuras entre la forma activa e inactiva, siendo la forma activa beneficiada por la inmovilización sobre soportes hidrofóbicos.³⁵ Por ello, se han hecho muy populares las lipasas inmovilizadas sobre polímeros macroporosos hidrofóbicos. Este es el caso de la Novozym 435³⁶ inmovilizada sobre un soporte formado por ésteres de metil y butil metacrilato unidos mediante polivinil benzeno. Se ha demostrado que su inmovilización posibilita la reutilización de la enzima sin pérdida de actividad en un amplio rango de reacciones como son la resolución de cianidrinás o alcoholes.³⁷

b) Interacciones iónicas. Esta estrategia se basa en la interacción electrostática de los grupos funcionales residuales de la proteína con los grupos del soporte sólido. Como se ha explicado previamente las proteínas presentan una gran cantidad de grupos

funcionales que permiten esta interacción, siendo los más abundantes los grupos amino y ácido,³⁸ (Tabla 1. 3).

Dependiendo del valor de pH de la disolución, estos grupos funcionales pueden alojar una carga positiva o negativa, pudiendo así, interactuar con la superficie del soporte. Para este tipo de inmovilización se ha de considerar el punto isoeléctrico de la enzima (pI), es decir aquel en el que la carga neta de la enzima es igual a cero. A valores de pH por debajo del pI la enzima estará cargada positivamente y a pH superiores al pI estará cargada negativamente. Para permitir la inmovilización enzimática se debe tener en cuenta la carga eléctrica del soporte, que debe ser complementaria al de la enzima. Una consideración importante en esta estrategia es que debe tenerse en cuenta el valor del pH óptimo de la enzima, pues es posible que esta se inmovilice con éxito, pero a su vez se provoque una desnaturalización irreversible de la enzima en el proceso.^{18,23}

Un ejemplo del éxito de esta estrategia fue realizado con la enzima cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*, esta enzima fue inmovilizada sobre distintos soportes mesoporosos modificados con grupos amino. En este estudio se observó que la mejor inmovilización era a pH = 6 donde el soporte presentaría una carga positiva y la enzima una carga negativa (pI = 4). Esta enzima fue reutilizada sin perder actividad durante 5 ciclos de reacción.^{39,40} Otro tipo de inmovilización electrostática se basa en el uso de iones metálicos como por ejemplo Cu⁺, Co⁺² o Ni⁺² depositados en la superficie del soporte que son capaces de interaccionar con los grupos histidina de la enzima.⁴¹

c) Inmovilización covalente. Esta estrategia de inmovilización se produce mediante la unión enzima-soporte a través de enlaces covalentes. Los grupos funcionales de la superficie del soporte pueden reaccionar covalentemente con algunos grupos funcionales libres de la superficie de la enzima. La fuerte interacción del enlace entre el soporte y la enzima evita las posibles pérdidas de biocatalizador durante su uso y, en la mayoría de los casos, se mejora notablemente la estabilidad enzimática. Sin embargo, en este tipo de inmovilización, ciertos aminoácidos necesarios para la catálisis pueden verse modificados lo que provoca pérdidas irreversibles de actividad.^{18,23}

Como se ha comentado previamente las enzimas tienen distintos grupos funcionales en su superficie, los más comunes son los grupos amino y los grupos carboxílicos. Por ello en la bibliografía se han estudiado diferentes estrategias para realizar interacciones covalentes con estos grupos funcionales, entre ellas destacamos:

Inmovilización mediante reacción química entre grupos amino de la enzima y grupos epóxido del soporte. Un ejemplo de este tipo de inmovilización fue estudiado por Wheatley y col.⁴² donde usaron soportes acrílicos activados con grupos epóxido (Figura 1. 10).

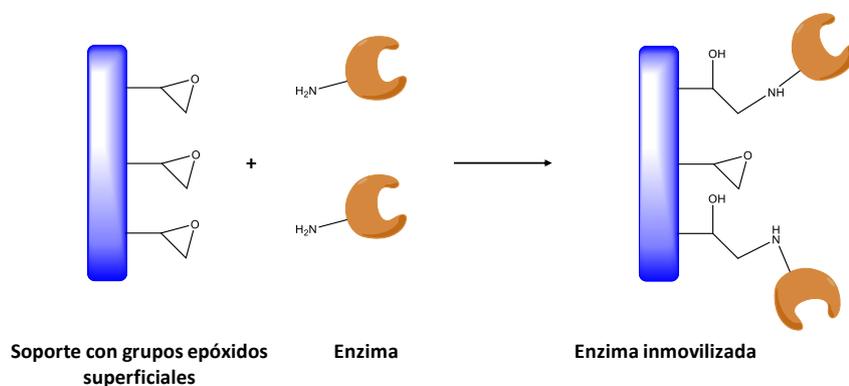


Figura 1. 10. Inmovilización enzimática covalente vía grupos epóxido.

Inmovilización mediante reacción química entre grupos amino de la enzima y grupos aldehído del soporte. Este tipo de interacción ha sido ampliamente utilizada en la bibliografía. Generalmente la superficie del soporte se modifica usando glutaraldehído y posteriormente se introduce la enzima (Figura 1. 11).⁴³⁻⁴⁹

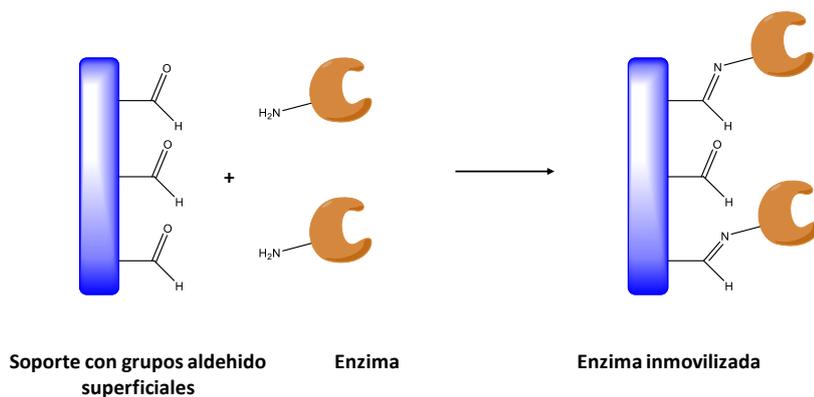


Figura 1. 11. Inmovilización covalente sobre soporte con grupos aldehído.

En este caso los grupos amino de la enzima interaccionan con los grupos aldehído del soporte formando un enlace imina. Este enlace imina es estable, pero depende de las condiciones en las que se encuentre, por ejemplo, si el pH de la reacción es ácido puede ocurrir que este enlace se rompa y se libere la enzima inmovilizada. Una modificación a este protocolo es el uso de un agente reductor (NaBH_4), una vez ya se ha formado el enlace imina, que reduciría el enlace produciendo un enlace covalente irreversible a los cambios de pH. Una desventaja es que el agente reductor podría reaccionar con la enzima y reducir la actividad de la misma. Por ello, es necesario realizar un estudio de las condiciones de reacción enzimática, así como de la posible desorción de la enzima y las

diferentes opciones que se podrían abordar para solucionar este problema. Por ejemplo, si la reacción enzimática se realiza a valores de pH ácido, pero se trata de una reacción rápida puede ocurrir que el tiempo que el biocatalizador se encuentra a un valor de pH ácido no fuera suficiente para provocar la desorción enzimática, siendo por ello innecesario el uso del agente reductor (NaBH_4) y posible reutilizar con éxito el biocatalizador mediante un lavado previo con una disolución tampón a valores de pH neutro. Una variante de esta estrategia consiste en utilizar los grupos ácido del enzima como puntos de anclaje. Esta estrategia se utiliza cuando la enzima a inmovilizar presenta pocos grupos lisina y gran cantidad de grupos ácido o bien cuando los grupos lisina se encuentran cercanos al centro activo de la enzima y el uso de la estrategia anterior provocaría la desactivación enzimática.

Para solucionar este problema, se realiza la activación de los grupos ácido de la proteína haciéndolos reaccionar con (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) (Figura 1. 12a). Una vez, el reactivo EDAC ha reaccionado con los grupos ácido superficiales de la enzima se introduce un segundo reactivo generalmente la etilendiamina (EDA) que reacciona con los grupos carboxílicos activados dando lugar a enlaces amida que contienen grupos amina terminales (Figura 1. 12). Finalmente estos grupos amino terminales se hacen reaccionar con grupos aldehído del soporte quedando la enzima inmovilizada covalentemente a través de grupos imina.⁵⁰

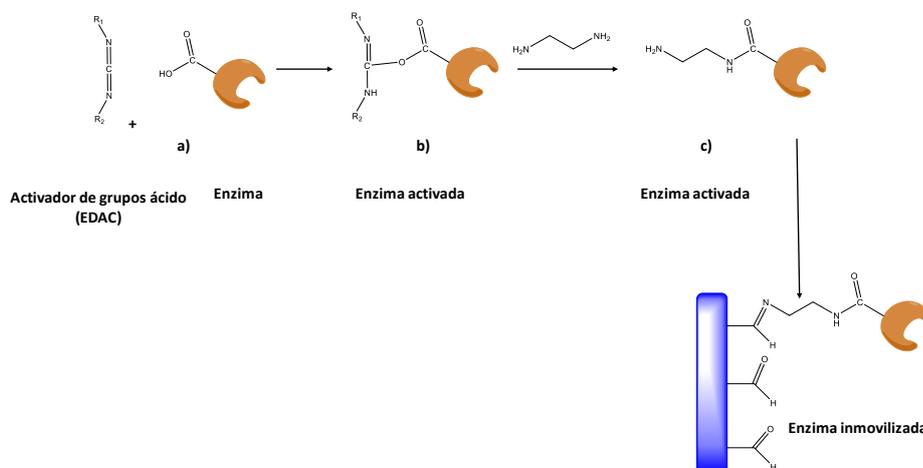


Figura 1. 12. Inmovilización covalente vía activación de los grupos carboxilo.

En esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la inmovilización enzimática tanto covalente como electrostática sobre distintos soportes silíceos como la zeolita deslamina ITQ-2, la zeolita Beta nanocristalina, el material mesoporoso MCM-41 y sobre un soporte orgánico como el óxido de grafeno. A continuación, describiremos brevemente las características de este tipo de materiales.

Soportes silíceos:

Zeolitas. Las zeolitas son aluminosilicatos cristalinos de composición variable. Los átomos de silíceo, aluminio y oxígeno forman estructuras tetraédricas que comparten sus vértices. Estos tetraedros forman unidades estructurales que al unirse forman distintos poliedros cuya combinación da lugar a una gran variedad de estructuras diferentes. La repetición en el espacio de estas unidades estructurales forma una serie de cavidades y canales, generando estructuras cristalinas (multi- o mono-) dimensionales. Como se observa en la Tabla 1. 5, las zeolitas se pueden clasificar según el tamaño de sus poros que van desde poro pequeño a poro extragrande, siendo esta clasificación correspondiente a su vez a la cantidad de átomos de oxígeno que forman sus poros, de 8 a 18 respectivamente.

Tabla 1. 5. Clasificación de las zeolitas.

Clasificación de zeolitas	Número de átomos de oxígeno	Tamaño de poro (Å)	Ejemplos de zeolitas
Poro pequeño	8	4	Ferrierita
Poro medio	10	5-5,5	ZSM-5
Poro grande	12	7-8	Beta
Poro extragrande	18	9	ITQ-54

La sustitución isomórfica de un átomo de silicio por un átomo de aluminio crea un exceso de carga negativa en la red, que se compensa con un protón generándose así centros activos de carácter ácido de Brønsted. Por ello una de sus aplicaciones más importantes de las zeolitas ha sido su utilización como catalizadores ácidos heterogéneos, mayoritariamente en los procesos de refinado del petróleo y en menor proporción en la industria de la Química Fina. La importancia de las zeolitas en diferentes procesos catalíticos radica en sus propiedades en la Tabla 1. 6 se resumen algunas de sus propiedades más importantes.

Tabla 1. 6. Propiedades de las zeolitas.

Nº	Propiedades
1	Gran área superficial y capacidad de adsorción elevada
2	Posibilidad de ajustar propiedades de hidrofobicidad e hidrofiliidad
3	Capacidad de incorporar distintas especies metálicas
4	Buena estabilidad térmica, química y mecánica
5	Capacidad para regenerarse y reutilizarse en los procesos catalíticos
6	Posibilidad de modificar la química superficial

La relación Si/Al de una zeolita es un parámetro muy importante ya que determina no sólo el número de centros ácidos y su fuerza, sino también sus propiedades de adsorción lo que condiciona su actividad catalítica en reacciones catalizadas por ácidos. Sin embargo, en algunas estructuras el contenido de aluminio puede ser regulado en un amplio rango por síntesis directa, de manera que incluso se pueden obtener materiales con muy bajo contenido de Al, es decir prácticamente silíceos. Este tipo de materiales, contienen en su superficie grupos silanol (Si-OH) distribuidos regularmente a través de los cuales se puede modificar la superficie del material con grupos reactivos. En la Figura 1. 13 se presentan algunas de estas modificaciones.

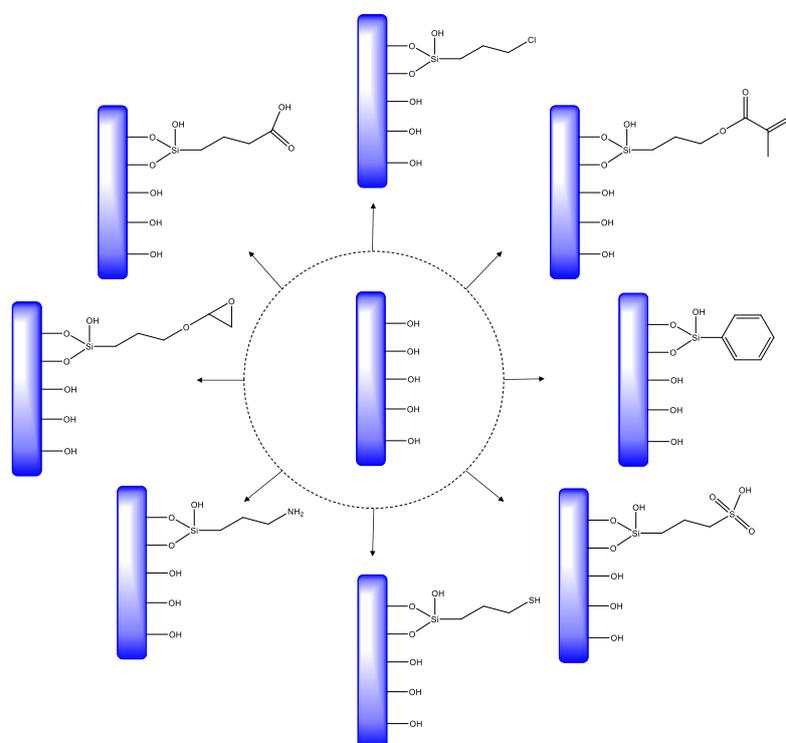


Figura 1. 13. Posibles modificaciones superficiales de las zeolitas.

Esta característica es especialmente importante en el caso de la inmovilización de enzimas, ya que a través de estos grupos se puede anclar las enzimas sobre la superficie del material a través de interacciones enzima-soporte electrostáticas o covalentes.

A continuación, pasaremos a describir los materiales silíceos que se han utilizado como soportes enzimáticos en esta Tesis Doctoral.

La Zeolita Beta. Esta zeolita fue sintetizada por primera vez en 1967 por parte de la compañía MOBIL. Presenta una estructura tipo BEA (Figura 1. 14) que se caracteriza por presentar tres sistemas de canales interconectados por anillos de 12 miembros.^{51,52}

Las dimensiones de los poros de una zeolita Beta son $6,5 \times 7,6 \text{ \AA}$, y los canales de mayor tamaño se encuentran en una dirección del espacio, mientras que los más pequeños en las otras dos dimensiones.⁵³ Existe la posibilidad de sintetizar las zeolitas Beta en ausencia prácticamente de aluminio. De esta forma se obtienen materiales con una relación Si/Al extremadamente alta que puede alcanzar valores superiores a 1000.⁵⁴

Además, cabe mencionar que es posible incorporar otros metales en la red de la zeolita, tales como Vanadio, Boro, Estaño o Zirconio que les confieren acidez tipo Lewis. Por ejemplo, las zeolitas Sn-Beta y Zr-Beta que fueron sintetizadas por primera vez en el instituto de tecnología química (ITQ) se han empleado como catalizadores heterogéneos en las reacciones orgánicas que requieren centros ácidos de Lewis, como oxidaciones de Baeyer-Villiger,^{55,56} en la ciclación de citronelal a isopulegol⁵⁷ y en las reacciones redox de Meerwein-Ponndorf-Verley-Oppenauer.^{58,59}

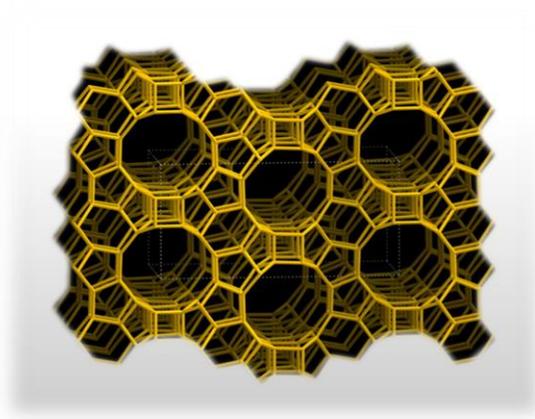


Figura 1. 14. Zeolita tipo Beta.

Zeolita ITQ-2. La zeolita bidimensional (2D) ITQ-2 se puede preparar por síntesis directa,⁶⁰ o a por deslaminación de la zeolita precursora MCM-22.^{61,62} En el proceso de deslaminación se somete al precursor a una etapa de hinchamiento usando hexadeciltrimetilamonio (CTMA^+) o tetrabutilamonio en forma de hidróxido. Una vez el material se ha hinchado es sometido a un proceso de deslaminación vía ultrasonidos o agitación mecánica,^{63,64} Figura 1. 15.

El resultado es una zeolita con láminas de un grosor $\sim (2,5 \text{ nm})$, dispuestas de manera aleatoria en el espacio, lo que le otorga una gran superficie externa $\sim (600 \text{ m}^2\text{g}^{-1})$. Cada lámina está formada por un conjunto hexagonal de copas que se extiende de lado a lado

de la lámina. Cada copa se compone de 2 semicavidades formadas por anillos de 12 miembros (0,7 nm x 0,7 nm), conectadas a las otras copas a través de un doble anillo de 6 miembros que las une en la base.

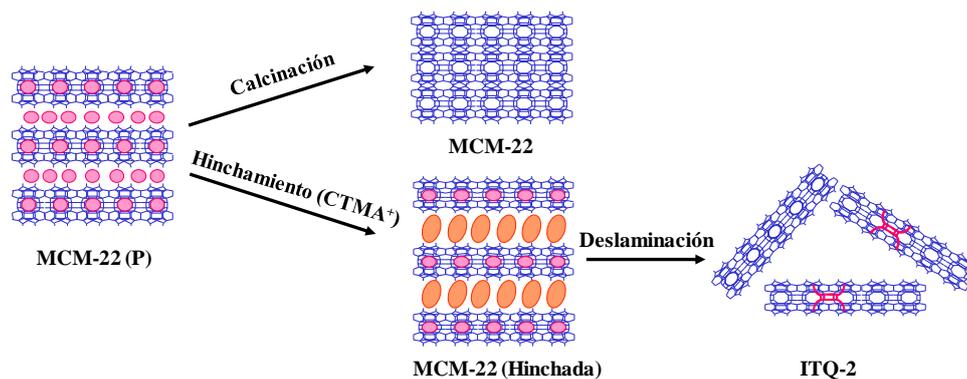


Figura 1. 15. Esquema de síntesis de la zeolita ITQ-2.

Esta zeolita combina las características típicas de las zeolitas (estabilidad térmica, química, fuertes centros ácidos) y a su vez presenta gran accesibilidad a los centros catalíticos.⁶⁵ Además, esta zeolita se puede preparar también sin Al, de manera que este material contiene grupos silanol distribuidos regularmente que permiten una fácil modificación de su superficie.

El material mesoporoso MCM-41. Este material fue sintetizado por primera vez en por la empresa Mobil (MCM = Mobile Crystalline Material) en la década de los noventa. Perteneció al grupo de materiales mesoporosos denominados M41S.^{66,67}

Se trata de un material que presenta un sistema de poros ordenados, uniformes, que no están conectados entre sí, con una simetría hexagonal y una distribución unidireccional, (Figura 1. 16). Este material presenta gran estabilidad térmica y permite controlar en su síntesis la relación Si/Al, así como el tamaño de sus canales que puede variar entre 20-100 Å, y presentan una gran área superficial (~1000 m²/g). Todas estas características hacen que este material sea de gran interés para procesos catalíticos que involucran moléculas voluminosas.^{68,69}

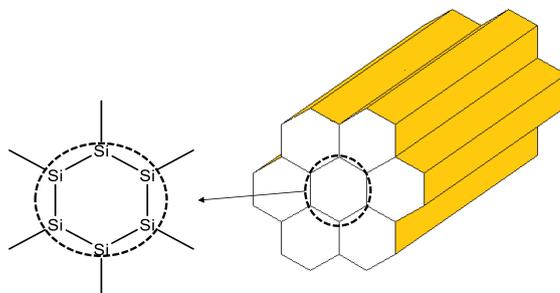


Figura 1. 16. Material mesoporoso MCM-41.

Además, la posibilidad de incorporar metales como titanio o vanadio en posiciones tetraédricas de la estructura de MCM-41 ha promovido la aplicación de estos materiales como catalizadores en los procesos de oxidación-reducción (epoxidación, oxidación de Bayer-Villiger) y como soporte de complejos organometálicos de metales de transición.⁷⁰

Soportes orgánicos:

El óxido de grafeno. Este material tiene una estructura laminar formada mayoritariamente por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno. Los átomos de carbono están unidos en un patrón hexagonal similar al grafito, y presentan una hibridación de enlaces carbono sp^2 y sp^3 , además de defectos en su estructura. A su vez, posee grupos oxigenados en su superficie tales como epóxidos, ácidos, hidroxilos, fenol, carbonilo, etc. enlazados por ambos lados, como se puede observar en la Figura 1. 17.

Por ello se dice que el óxido de grafeno es un material anfifílico, con un plano basal hidrofóbico y cuya naturaleza hidrófila se debe a la gran cantidad de grupos oxigenados que presenta su estructura.

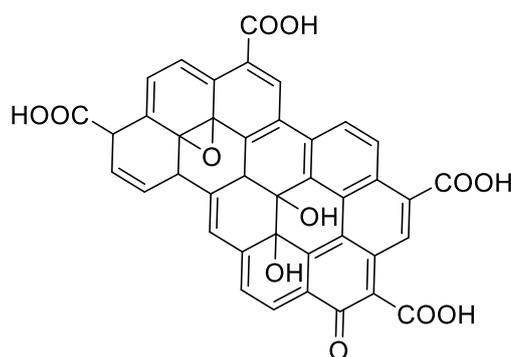


Figura 1. 17. Estructura del óxido de grafeno.

Su síntesis generalmente se realiza a través de la oxidación química del grafito. Para ello se han desarrollado gran variedad de técnicas como son las de Brodie (1859), Staudemaler (1898), Hofmann (1937), Hummers (1958).⁷¹ También existen otros métodos como es la oxidación electroquímica.

Cabe mencionar que las propuestas estructurales para el OG han sido motivo de debate en las últimas décadas debido a la inestabilidad térmica del OG y a que la estequiometría del OG depende del método de síntesis. En 1939 Lerf-Klinowski, desarrollo un modelo para el óxido de grafeno, que actualmente es el más aceptado y en el que supuso que durante el proceso de oxidación el 50 % de los carbonos se mantienen con hibridación sp^3 . De esta manera los grupos epóxido e hidroxilo estarían situados en el plano basal del OG y en los bordes de las láminas los grupos carbonilo y ácidos carboxilos.

El óxido de grafeno reducido. Este material presenta una estructura similar al grafeno y al óxido de grafeno. Está formado por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, pero tiene menor cantidad de grupos oxigenados en su estructura. Su síntesis se realiza a través de la reducción del óxido de grafeno. Durante esta etapa la mayor parte de grupos oxigenados son eliminados del material, y la mayor parte de los enlaces carbono-carbono con hibridación sp^2 se restablece a sp^3 , sin embargo, este material sigue conteniendo oxígeno, así como heteroátomos o defectos estructurales. El proceso de reducción puede llevarse a cabo mediante reducción química, térmica u otros métodos como la fotoreducción. Los más utilizados son la reducción química y la térmica.

Los materiales óxido de grafeno y el óxido de grafeno reducido han sido ampliamente utilizados en la inmovilización enzimática, se ha demostrado que es posible inmovilizar directamente enzima sobre su superficie sin usar ningún reactivo externo debido a la naturaleza de estos materiales que permite un conjunto de interacciones enzima-soporte como son puentes de hidrógeno, van der Waals, interacciones electrostáticas, π - π o incluso covalentes.^{72,73} Por ello una variedad de enzimas como la peroxidasa del rábano (HRP), oxalato oxidasa, α -quimiotripsina, albumina, proteasa alcalina, glucosa oxidasa y esterasa han sido inmovilizadas sobre estos soportes.⁷⁴⁻⁷⁹

Cabe mencionar que tanto la actividad enzimática, como la estabilidad catalítica al usar este tipo de soportes, depende del tipo de interacción producida entre la enzima y el soporte, así como de las características de la enzima. De hecho, es posible encontrar en la bibliografía casos de inhibición enzimática al usar esta clase de soportes, como en el caso de las enzimas oxalato oxidasa o la quimiotripsina.

1.6. Procesos quimioenzimáticos (Q.E)

Actualmente, en el campo de la catálisis parece haber consenso en la necesidad de integrar la catálisis enzimática y los catalizadores químicos.⁸⁰ Debido a la necesidad incipiente de lidiar con una serie de reacciones complejas para obtener productos de alto valor añadido, la comunidad científica ha empezado a movilizarse en esta dirección. La estrategia en la que se combinan varios catalizadores en reacciones acopladas se conoce

como catálisis en cascada, y actualmente ha recibido la atención de la comunidad científica, describiéndola como una forma de imitar a la naturaleza en la síntesis de los productos deseados.⁸¹

En esta estrategia, utilizando catalizadores mono o multifuncionales las reacciones se combinan sin necesidad de aislar el producto intermedio en cada paso, lo que proporciona una ventaja tanto desde el punto de vista económico como medioambiental.

Mientras el diseño y utilización de catalizadores mono o multifuncionales (principalmente heterogéneos) para llevar a cabo procesos en cascada en un mismo sistema de reacción han sido ampliamente desarrollados en los últimos años,^{82,83} la combinación de los catalizadores químicos y biológicos (tanto homogéneos como heterogéneos) en procesos en cascada esta mucho menos estudiada.

Esto es debido a que desgraciadamente, estos catalizadores suelen trabajar bajo condiciones de reacción antagónicas. A continuación, se comenta con más detalle los parámetros de reacción más limitantes:

Temperatura. La mayoría de las reacciones enzimáticas se desarrollan a temperaturas entre 25-60 °C, siendo perjudicial para los biocatalizadores el uso de temperaturas más elevadas.⁸⁴ Sin embargo, la mayoría de los procesos industriales, trabajan en un rango de temperaturas mucho más elevado. Aunque existen catalizadores heterogéneos (TS-1 o Sn-β) que son capaces de funcionar en un rango de temperaturas bajo ($T < 100$ °C), en reacciones como: la hidroxilación aromática,⁸⁵ la epoxidación de olefinas⁸⁶ y las oxidaciones de Baeyer-villiger,⁵⁶ en general la temperatura de reacción es un factor altamente limitante para la combinación de procesos quimioenzimáticos en un único sistema de reacción.

Medio de reacción. Generalmente este suele ser otro de los mayores problemas a la hora de combinar los dos grupos de catalizadores, debido a que la gran mayoría de las enzimas funcionan en medios acuosos, presentando poca estabilidad cuando se modifica este medio o incluso puede ocurrir la completa desnaturalización cuando el pH de reacción sale del pH óptimo de la enzima. Aun así, el desarrollo de la biotecnología y la inmovilización enzimática está aumentando la posibilidad de utilizar enzimas en medios orgánicos.^{87,88} Por otro lado, se están investigando gran cantidad de catalizadores químicos heterogéneos para permitir la catálisis en condiciones acuosas.^{89,90}

Presión. Algunas enzimas como las enzimas glucolíticas y proteolíticas⁹¹ han demostrado no verse afectadas por altas presiones. Esto permitiría acoplar reacciones usando catalizadores químicos heterogéneos que necesiten altas presiones de trabajo con sistemas biocatalíticos. Aun así, se debería tener en cuenta que tipo de gas se va a presurizar dentro del reactor y realizar un estudio adecuado para cada sistema. Por ejemplo, el uso de monóxido de carbono (CO) podría disminuir la actividad catalítica de la enzima, si esta presenta átomos de Fe⁺² en su centro activo. Por otro lado, enzimas como la naringinasa han demostrado presentar mayor actividad bajo altas presiones.⁹²

Velocidad de reacción. Existe la creencia de que las enzimas son catalizadores que presentan altas velocidades de reacción, esto es cierto siempre y cuando los sustratos de la reacción sean específicos para la enzima. Cuando se emplean sustratos “extraños” para la enzima, la velocidad de reacción puede ser realmente baja. Así pues, dependiendo de la reacción y las condiciones, el sistema catalítico debe diseñarse de manera que se eviten altas concentraciones de reactivos o productos intermedios que podrían desactivar la enzima.

Reusabilidad. Los catalizadores heterogéneos químicos son generalmente muy robustos y se pueden reusar durante varios ciclos de reacción. Por otro lado, la reusabilidad de las enzimas depende de diversos factores, como son la inmovilización enzimática, las condiciones de reacción y el mecanismo catalítico a través del cual actúa la enzima. Por ejemplo, se ha estudiado el mecanismo de reacción de la enzima alcohol oxidasa, y se ha demostrado que durante la reacción esta enzima libera peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que provoca su desactivación.

Pese a la dificultad de combinar en un mismo reactor catalizadores químicos y enzimáticos en la bibliografía podemos encontrar algunos ejemplos de procesos quimioenzimáticos realizados en un mismo reactor, que demuestran el gran potencial de estos procesos. Por ejemplo, Caiazza y col.⁹³ propusieron un proceso en cascada para la producción de *bifenilamidas*, en la que se combinaba una amidación enzimática catalizada por la enzima lipasa, con una reacción de formación de enlaces C-N conocida como acoplamiento de Buchwald–Hartwig catalizada por paladio. Los autores encontraron que fue posible combinar ambas reacciones en un proceso en cascada con altos rendimientos y selectividades. Sin embargo, no estudiaron el efecto de la temperatura de reacción (100 °C) en la enzima lipasa, que seguramente produciría la desactivación enzimática e impediría la reusabilidad del biocatalizador.

Otro ejemplo, ampliamente estudiado por la comunidad científica, está orientado en la resolución de alcoholes racémicos usando la enzima lipasa acoplada con un catalizador metálico (homogéneo o heterogéneo). En este sistema la lipasa esterifica uno de los enantiómeros mientras el catalizador metálico racemiza el enantiómero restante⁹⁴ y es lo que se conoce como resolución cinética dinámica (Figura 1. 18).

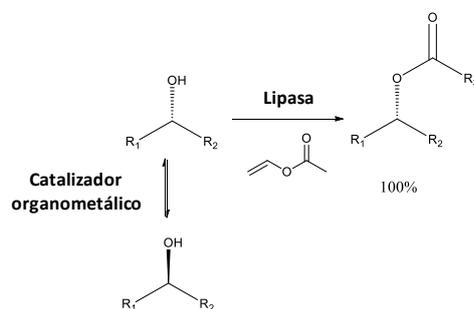


Figura 1. 18. Esquema de una resolución cinética dinámica.

En estos sistemas la compatibilidad de la enzima y del catalizador químico es un parámetro crucial ya que en muchos casos tiene lugar la desactivación recíproca de la enzima y del catalizador químico.

Debido a las dificultades anteriormente señaladas, una estrategia para llevar a cabo procesos quimioenzimáticos en cascada, es llevar a cabo las diferentes etapas en sistemas de reacción separados. De esta manera es posible combinar ambos procesos (químico y enzimático) ofreciendo a cada catalizador las condiciones de reacción óptimas. Así, se amplía considerablemente el rango de condiciones de reacción compatibles para el proceso en cascada, Figura 1. 19.



Figura 1. 19. Reacciones quimioenzimáticas consecutivas en reactores separados.

Un ejemplo de esta estrategia la utilizaron Grande y col.⁹⁵ para la producción de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) (una molécula plataforma que proviene de la biomasa, con gran cantidad de aplicaciones) a partir de la glucosa. Los autores combinaron la enzima glucosa isomerasa, para transformar glucosa en fructosa en un reactor semicontinuo (SCR) y posteriormente el producto (fructosa) se sometió a deshidratación en un segundo reactor (SCR) utilizando ácido oxálico como catalizador, obteniéndose así el 5-HMF.

Siguiendo esta estrategia, en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la preparación de productos de Química Fina de alto valor añadido con elevada quimio y estereoselectividad mediante procesos en cascada donde se combina una etapa quimio catalizada con una biocatalizada que ocurren en reactores separados utilizando catalizadores heterogéneos y enzimas inmovilizadas respectivamente. Además, estos procesos se han implementado con éxito mediante la combinación de reactores de lecho fijo que permite la producción automatizada en continuo del proceso deseado.

Capítulo 2 Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral radica en la obtención de productos químicos de alto interés para la industria de la Química Fina, bajo los principios de la Química Verde, empleando como herramienta principal biocatalizadores y catalizadores químicos heterogéneos. Conforme al objetivo principal se plantean los siguientes objetivos específicos:

- i) El primer objetivo se basa en la obtención de los flavonoides de alto valor añadido (prunina y naringenina) a partir del flavonoide naringina mediante la hidrólisis enzimática de la naringinasa. Para ello se estudiará la purificación de la naringinasa comercial y la inmovilización covalente sobre dos soportes: el óxido de grafeno y la zeolita ITQ-2. Se comparará la actividad de los derivados enzimáticos obtenidos, así como su selectividad y reusabilidad. Por último, se estudiará la posibilidad de realizar el tratamiento enzimático del zumo de pomelo para eliminar el sabor amargo en un reactor de lecho fijo continuo.
- ii) El segundo objetivo es el desarrollo de una nueva ruta sintética para la obtención de alcoholes quirales a partir de la mezcla racémica, mediante un proceso quimioenzimático en cascada. Para ello se estudiará inicialmente la oxidación de Oppenauer del alcohol racémico en presencia de la zeolita Zr-Beta. A continuación, se inmovilizará electrostáticamente la enzima alcohol deshidrogenasa sobre la zeolita ITQ-2 y se estudiará la etapa de reducción enantioselectiva de la cetona proquiral obtenida en la primera etapa. Por último, se procederá al estudio del proceso quimioenzimático mediante el acoplamiento de dos reactores en continuo de lecho fijo consecutivos el primero conteniendo la zeolita Zr-Beta y el segundo la enzima inmovilizada.
- iii) El tercer objetivo es el diseño de una nueva ruta sintética para la obtención de diésteres del 2,5-bis(hidroximetil)furano útiles como agentes plastificantes mediante un proceso quimioenzimático en cascada. Para ello se estudiará la reducción quimioselectiva del 5-hidroximetilfurfural a 2,5-bis(hidroximetil)furano en presencia de un catalizador de cobalto. A continuación, se estudiará la trans(esterificación) del 2,5-bis(hidroximetil)furano en presencia de una lipasa comercial soportada (Novozym 435).

Finalmente, se estudiará el proceso quimioenzimático utilizando dos reactores en continuo de lecho fijo consecutivos el primero conteniendo el catalizador de Co y el segundo la lipasa inmovilizada.

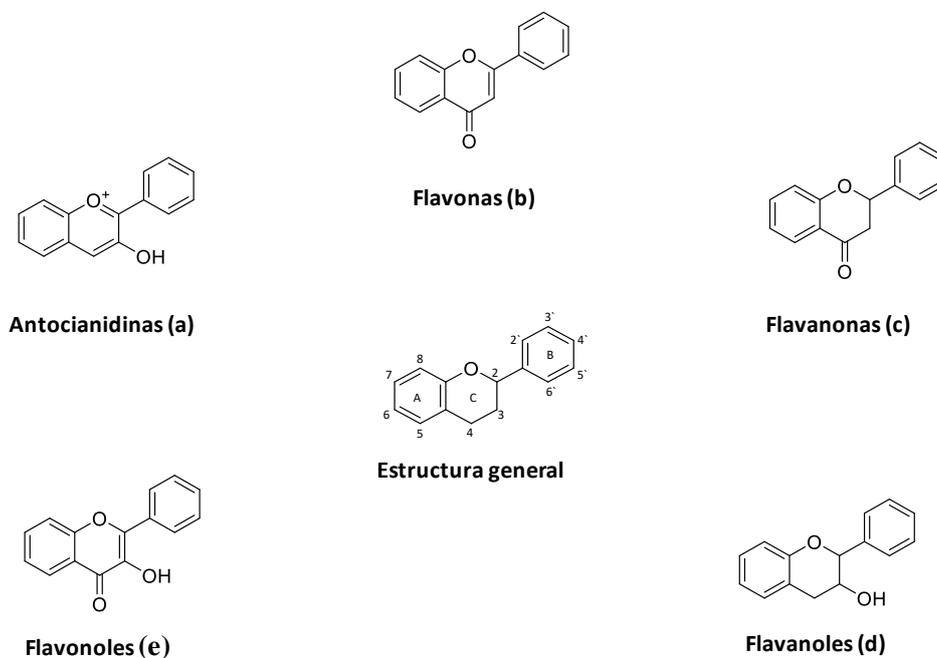
Capítulo 3 Obtención selectiva de los flavonoides cítricos Prunina y Naringina mediante hidrólisis enzimática de Naringina

3.1. Introducción

Los flavonoides son compuestos polifenólicos presentes en vegetales, plantas y frutas, que tienen importantes efectos para la salud pues protegen al organismo del daño oxidativo, debido a que su estructura química les permite la quelación con el hierro y otros metales. A su vez presentan efectos terapéuticos en diferentes patologías como el cáncer o la aterosclerosis.⁹⁶⁻⁹⁹ Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György (1930) quien consiguió aislar la citrina de la cascara del limón, compuesto que al ser consumido es capaz de regular la permeabilidad capilar.⁹⁶

Los flavonoides comparten una estructura típica C₁₅ (Esquema 3. 1) y en función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

- a) Antocianidinas, compuestos que presentan un grupo (-OH) en la posición 3 del anillo C y un doble enlace entre las posiciones C3-C4, el anillo fenólico (flavilio) funciona como un catión, se pueden encontrar en la col lombarda (*Brassica oleracea*).
- b) Flavonas, se caracterizan por presentar un carbonilo en la posición 4 y un doble enlace entre las posiciones C2-C3 del anillo C y se encuentran en las uvas o la miel.
- c) Flavanonas, compuestos que poseen un carbonilo en la posición C4 del anillo C y se pueden encontrar en cítricos como el pomelo.
- d) Flavanoles, se caracterizan por presentar un grupo (-OH) en la posición 3 del anillo C y pueden encontrarse en la familia de plantas catechu (*Terra japonica*).
- e) Flavonoles, poseen un grupo (-OH) en la posición 3 y un carbonilo en la posición 4 del anillo C y se pueden encontrar en árboles como las acacias (*Acacia greggii*).



Esquema 3. 1. Estructura química de los flavonoides.

Los flavonoles y las flavonas se encuentran comúnmente como agliconas formando enlaces O-glicosídicos donde los azúcares se encuentran unidos, preferentemente a la posición C3 del anillo C o en la posición C7 del anillo A. El organismo humano no es capaz de producir estos compuestos así que deben ser adquiridos en la alimentación.

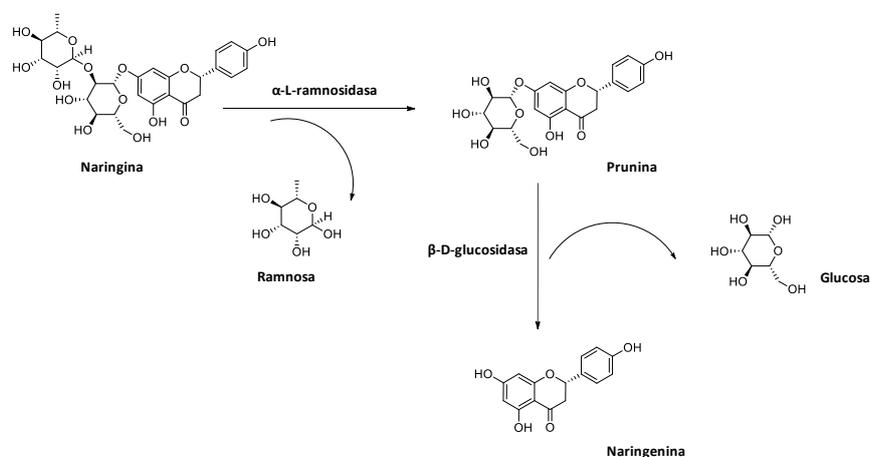
La naringina es una flavanona glicosilada abundante en la piel, la membrana o en las semillas de los cítricos como el pomelo,¹⁰⁰ siendo además uno de los compuestos más amargos del zumo de pomelo. Cuando la naringina se hidroliza libera la aglicona y monosacáridos reduciéndose considerablemente la sensación de amargor. La hidrólisis total de naringina genera la aglicona naringenina y los azúcares ramnosa y glucosa. Sin embargo, mediante una hidrólisis parcial se obtiene el flavonoide glicosilado prunina (Esquema 3. 2). La prunina y naringenina son compuestos con un amplio rango de actividades biológicas como antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antivirales y neuroprotectores,^{101,102} por ello son compuestos muy valiosos en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.

Sin embargo, la síntesis de la naringenina y en particular del flavonoide monoglicosilado, prunina, es complicada y normalmente produce reacciones secundarias dando lugar a una baja selectividad al compuesto deseado. Por ello, se recurre a la hidrólisis de la naringina, la cual puede obtenerse fácilmente a partir de residuos de cítricos. Una opción

para hidrolizar la naringina es utilizar ácidos minerales,¹⁰³ sin embargo el control del grado de hidrólisis es difícil y la selectividad a prunina o naringenina resultan ser bajas.

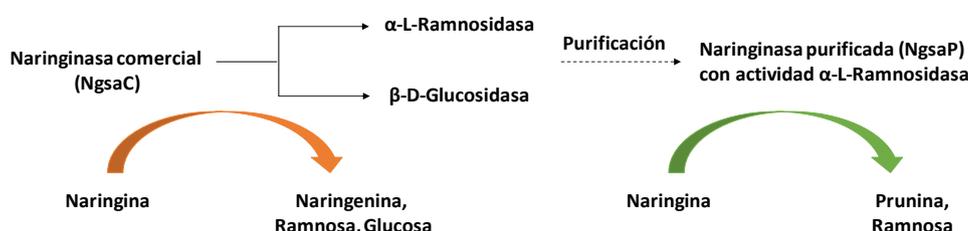
Debido al amplio rango de actividades de estos flavonoides abundantes en cítricos, su demanda se ha incrementado en los últimos años. Sin embargo, la falta de procesos selectivos y respetuosos con el medioambiente ha impedido su progreso a nivel comercial. Una alternativa para la producción selectiva de prunina y naringenina es la hidrólisis enzimática de naringina mediante la enzima naringinasa. La naringinasa (Ngsa) es un complejo proteico que contiene dos actividades enzimáticas una α -L-ramnosidasa y otra β -D-glucosidasa, siendo el código de clasificación enzimática EC 3.2.1.40 y EC 3.2.1.21 respectivamente (Introducción). Esta enzima tiene importantes aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica debido a la habilidad de la misma de hidrolizar flavonoides glicosidos como la naringina, hesperidina y rutina,^{104,105} empleándose por ejemplo en la biosíntesis de antibióticos, esteroides¹⁰⁶ y en la disminución del sabor amargo en los zumos de cítricos.¹⁰⁷

La naringinasa (Ngsa) cataliza la hidrólisis total de la naringina en ramnosa, glucosa y naringenina en dos pasos. En la primera etapa y debido a la actividad ramnosidasa, la naringina se hidroliza en ramnosa y prunina. En la segunda etapa, debido a su actividad glucosidasa, la naringinasa hidroliza la prunina en glucosa y naringenina¹⁰⁴ (Esquema 3.2).



Esquema 3. 2. Hidrólisis de la naringina en dos pasos en presencia de la naringinasa.

Cabe mencionar que para producir la prunina selectivamente mediante la hidrólisis de naringina, la actividad glucosidasa debe ser suprimida. Esto puede realizarse mediante la desactivación térmica de la actividad glucosidasa o mediante la purificación de la fracción enzimática con actividad α -L-ramnosidasa.^{108,109}



Esquema 3. 3. Hidrólisis de la naringina en dos pasos en presencia de la naringinasa.

Como se observa en el Esquema 3. 3, la naringinasa comercial (NgsaC) presenta las dos actividades α -L-ramnosidasa (EC 3.2.1.40) y otra β -D-glucosidasa (EC 3.2.1.21). Mientras que la naringinasa purificada (NgsaP) presenta la actividad α -L-ramnosidasa (EC 3.2.1.40).

Por otra parte, y tal como se ha comentado en la introducción general de esta tesis, las enzimas inmovilizadas sobre soportes presentan una serie de ventajas frente a las enzimas libres como son su fácil separación del medio de reacción, la posibilidad de reutilizar el biocatalizador, y en muchos casos su mayor estabilidad térmica. Todo ello es de gran importancia para la aplicación de los biocatalizadores a gran escala.

Debido al interés industrial que presenta la naringinasa, existen en la literatura numerosos estudios sobre la inmovilización de esta enzima. Por ejemplo, la naringinasa ha sido inmovilizada en soportes tales como tanin-aminohexilcelulosa,¹¹⁰ quitina,¹¹¹ films de triacetato de celulosa (CTA),¹¹² virutas de madera modificadas con glutaraldehído,¹¹³ MCM-41,¹¹⁴ geles de alcohol polivinílico (PVA),^{115,116} grafeno¹¹⁷ y atrapada con alginato.²⁰⁻²²

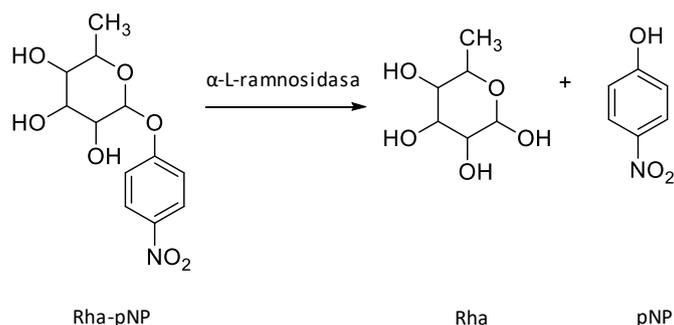
Siguiendo con los objetivos de esta Tesis en este capítulo se presenta en primer lugar el estudio de la purificación de la naringinasa comercial (NgsaC), para obtener una naringinasa purificada (NgsaP) capaz de realizar la síntesis selectiva de la prunina. En segundo lugar, se presenta el estudio de la inmovilización de la naringinasa (P y C) a través de enlaces covalentes sobre soportes de alta área superficial como son el óxido de grafeno (OG) y una zeolita laminar (2D), la zeolita ITQ-2 pura sílice. Se presentan los resultados de la actividad catalítica de la enzima soportada bajo distintas temperaturas y valores de pH utilizando el sustrato específico p-nitrofenil- α -L-Ramnopiranosido (RhapNP), y su posible aplicación industrial para la obtención selectiva de prunina y naringenina. Finalmente, se presenta el estudio del procesamiento para la disminución del sabor amargo de un zumo de pomelo natural, en un sistema de reacción en continuo en lecho fijo utilizando la naringinasa soportada sobre la zeolita ITQ-2.

3.2. Resultados y discusión

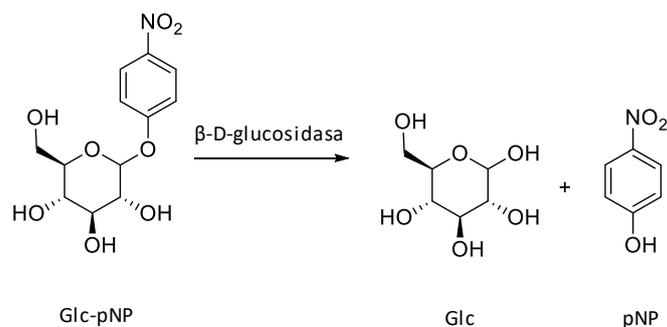
3.2.1. Purificación enzimática de la naringinasa proveniente del hongo *Penicillium Decumbens* (NgsaC)

Como se ha comentado anteriormente, una manera de producir selectivamente la prunina mediante hidrólisis enzimática de naringina es mediante la utilización de una naringinasa con alta actividad α -L-ramnosidasa, lo cual se puede conseguir mediante la purificación de la enzima comercial (NgsaC). Dado el interés de la actividad ramnosidasa se han utilizado una variedad de métodos de purificación. La estrategia más común para la purificación de la naringinasa (NgsaC) es a través de dos cromatografías en columna consecutivas. En la primera, el crudo enzimático se pasa a través de una columna de intercambio iónico que atrapa la enzima en su totalidad. Posteriormente usando una disolución de NaCl con un gradiente de concentración creciente, las fracciones enzimáticas son recolectadas y dializadas. Por último, estas fracciones son purificadas mediante una segunda cromatografía de exclusión.¹¹⁸⁻¹²³

Los principales problemas de esta metodología son los largos tiempos necesarios para realizar las separaciones cromatográficas y en muchos casos la pérdida de actividad enzimática durante la purificación. En este trabajo la naringinasa comercial (NgsaC) ha sido purificada a través de un solo paso utilizando una resina de intercambio iónico. Para ello, tal y como se describe en la sección experimental, la enzima se pone en contacto con la resina de intercambio iónico, la proteína queda atrapada en la resina y posteriormente se desorbe mediante el uso de una disolución acuosa de NaCl con un gradiente creciente (25-1000 mM). La actividad α -L-ramnosidasa y β -D-glucosidasa de cada fracción desorbida se evaluó usando los sustratos específicos p-Nitrofenil- α -L-Ramnopiranosido (Rha-pNP) y p-Nitrofenil- β -D-Glucósido (Glc-pNP) Esquema (3. 4) y (3. 5) respectivamente.



Esquema 3. 4. Hidrólisis de p-Nitrofenil- α -L-Ramnopiranosido (Rha-pNP).



Esquema 3. 5. Hidrólisis de p-Nitrofenil-β-D-Glucósido (Glc-pNP).

Como se puede observar en la Figura 3. 1, la fracción enzimática con mayor actividad α-L-ramnosidasa fue selectivamente desorbida con una disolución acuosa de NaCl 50 mM.

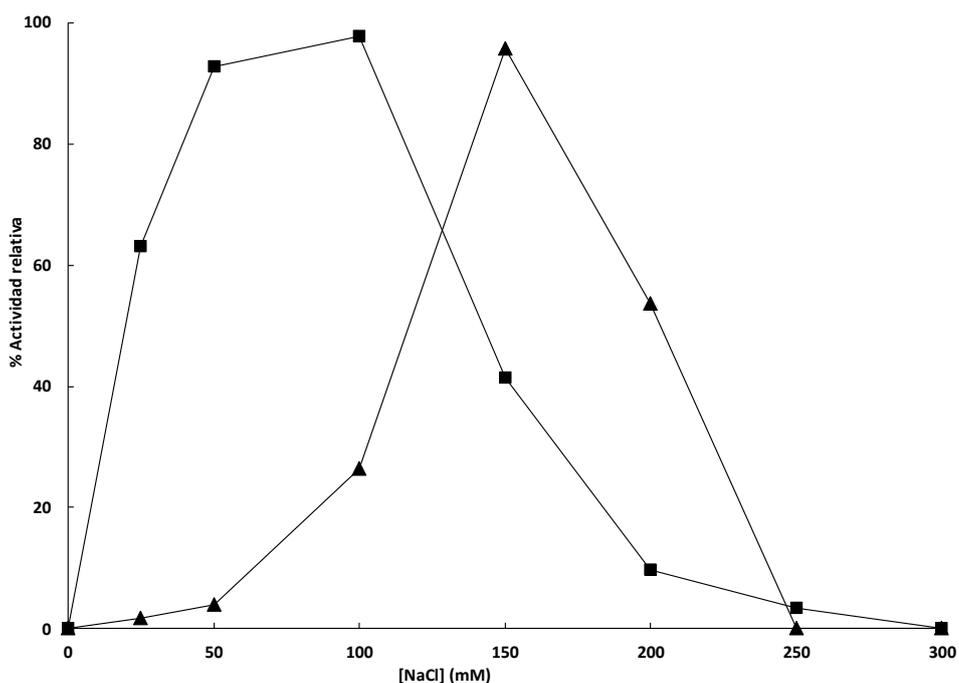


Figura 3. 1. Estudio de desorción en la purificación de la naringinasa (NgsaC). (■) Actividad ramnosidasa (usando el sustrato p-Nitrofenil-α-L-Ramnopiranosido), (▲) Actividad glucosidasa (usando como sustrato el p-Nitrofenil-β-D-Glucósido).

Para determinar la actividad enzimática una alícuota de la disolución enzimática (50 μL) se añadió a 0,7 mL de tampón citrato 50 mM (50 °C; pH = 4,5) conteniendo 50 μL (Rha-

pNP) o (Glc-pNP) 5 mM. Después de 5 minutos, se añaden 0,8 mL de Na_2CO_3 (1 M) para detener la reacción y se mide la absorbancia a una longitud de onda $\lambda = 405$ nm usando un espectrofotómetro Uv-Vis, posteriormente se determina la cantidad de p-nitrofenol liberada usando la ley de Lamber Beer (sección experimental).

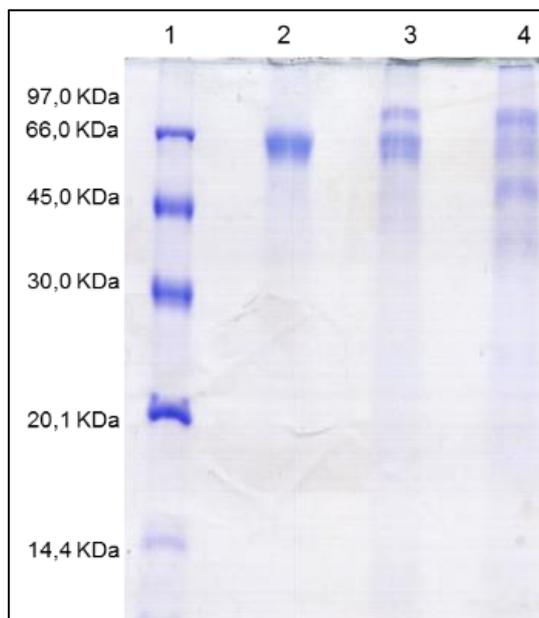


Figura 3. 2. Electroforesis de la enzima naringinasa. Línea 1- Patrones de peso molecular (KDa); Línea 2-Enzima purificada desorbida a 50 mM (Ngsa-P); Línea 3- Enzima desorbida a 100 mM; Línea 4- Enzima desorbida a 150 mM.

La fracción proteica desorbida utilizando una disolución acuosa de NaCl 50 mM fue liofilizada y analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico o (SDS-PAGE) (Figura 3. 2).

Como puede observarse en la Figura 3. 2, se logró una fracción purificada del extracto comercial (NgsaC) con alta actividad ramnosidasa y un peso molecular de ~66 kDa que concuerda con el peso molecular descrito previamente para la α -L-ramnosidasa (NgsaP).¹⁰⁹ Las actividades α -L-ramnosidasa y β -D-glucosidasa se compararon con los obtenidos utilizando la naringinasa comercial (NgsaC). Como se observa en la Tabla 3. 1, la NgsaC antes y después de la diálisis presenta actividades α -L-ramnosidasa y β -D-glucosidasa similares, lo que concuerda con lo descrito en la bibliografía.¹²⁴ Sin embargo, la enzima NgsaP presenta mayor actividad α -L-ramnosidasa siendo aproximadamente dos veces superior a la actividad de la enzima NgsaC.

Tabla 3. 1. Actividades alfa-L-ramnosidasa y beta-D-glucosidasa de la naringinasa utilizando los reactivos (Rha-pNP) y (Glc-pNP) respectivamente.

	Proteína (mg/mL)	Actividad Ramnosidasa (mU/mg)*	Actividad Glucosidasa (mU/mg)*
NgsaC	0,181	237,10	263,63
NgsaC	0,196	224,37	245,20
(dializada)			
NgsaP	0,098	422,32	47,53
(50 mM)			

*mU: miliunidades

Estos resultados nos indican que, siguiendo esta metodología de purificación sencilla, es posible aislar una fracción enzimática de la enzima NgsaC con alta actividad α -L-ramnosidasa NgsaP, que nos permitiría obtener selectivamente prunina mediante la hidrólisis de naringina. Por lo tanto, siguiendo con nuestro objetivo se procedió a la inmovilización de la naringinasa (NgsaC y NgsaP) sobre distintos soportes.

3.2.2. Inmovilización enzimática y caracterización del derivado enzimático

3.2.2.1 Inmovilización de la naringinasa sobre óxido de grafeno (OG)

La inmovilización de la naringinasa comercial (NgsaC) de *Penicillium decumbens* y la naringinasa purificada (NgsaP) con alta actividad α -L-ramnosidasa sobre OG se realizó incubando una disolución enzimática (3 mg de enzima, 1 mg/mL) con el soporte en una disolución tampón de fosfato a pH = 7 (sección experimental). Para determinar la cantidad de la enzima inmovilizada se tomaron distintas alícuotas con el tiempo y la cantidad de proteína presente en disolución se determinó mediante la prueba de ácido bicinónico.¹²⁵ Por último, se retiró el sobrenadante, y se lavó el sólido con la disolución tampón de fosfato pH = 7 hasta que no se observó proteína en la disolución de lavado. Los resultados mostraron (Tabla 3. 2) que después de 3 h, la cantidad de enzima (NgsaC) inmovilizada sobre OG fue de ~66 %, que corresponde a 40 mg de enzima/g de OG, mientras que después de 24 h, la cantidad de enzima inmovilizada fue de ~100 %, que corresponde a 60 mg de enzima/g de OG (Tabla 3. 2). En el caso de la enzima NgsaP, los resultados fueron similares.

Tabla 3. 2. Porcentaje de la naringinasa (NgsaC) inmovilizada sobre OG y OGR en función del tiempo.

Tiempo (h)	OG (%) ^a	OGR (%) ^a
0	0	0
3	66	n.d.
24	100	65

^a) Los datos de NgsaC y NgsaP son similares; n.d: no determinado.

El soporte OG, se caracterizó por análisis elemental (Tabla 3. 3) y espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). El análisis elemental mostró que el soporte (OG) está altamente oxigenado.

Tabla 3. 3. Análisis químico de los soportes OG y OGR.

Soporte	N%	C%	H%
OG	-	45,60	2,50
OGR	-	79,30	1,30

En el análisis espectroscópico (FTIR) (Figura 3. 3(a)) se observan las bandas de vibración del OG correspondientes a las vibraciones de los grupos -OH (3370 cm^{-1}), $\text{-C}=\text{O}$ (1725 cm^{-1}) y -CO (1360 cm^{-1}), junto con una banda a 1575 cm^{-1} asociada a $\text{C}=\text{C}$ de anillos aromáticos. Además, la presencia de los grupos epóxido se confirma por las bandas características a 1230 cm^{-1} , 1056 cm^{-1} y 845 cm^{-1} asociadas con las vibraciones simétricas y asimétricas de estiramiento, respectivamente. Estos resultados indican la existencia de grupos funcionales que contienen oxígeno en las nano-láminas del OG, al menos ácidos y epóxidos, a través de los cuales la enzima podría ser inmovilizada covalentemente.

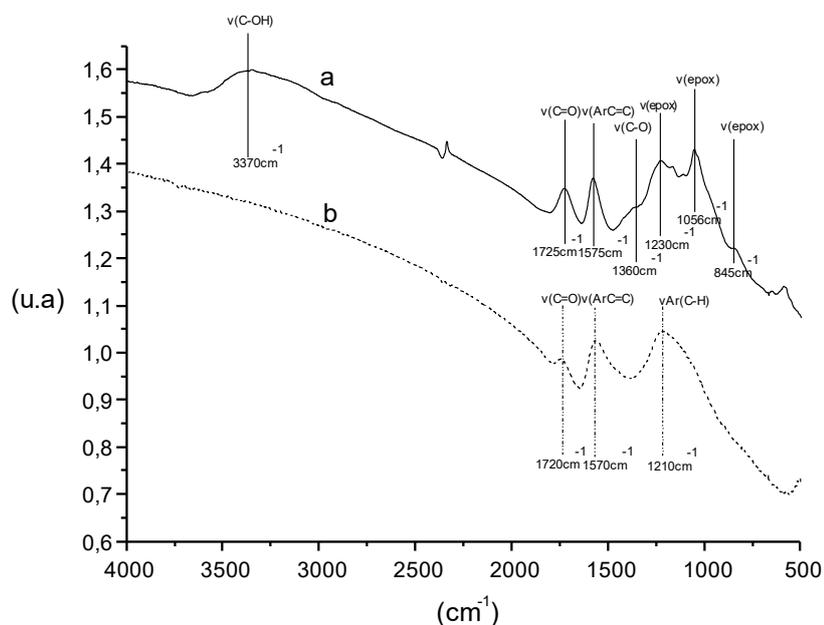


Figura 3. 3. FTIR del OG(a) y OGR (b) a 80 °C.

Además, la morfología del OG se caracterizó por imágenes de microscopio de fuerza atómica (AFM) y de microscopía electrónica de transmisión (TEM). La imagen en sección transversal del AFM indica que el grosor del OG está comprendido entre 0,6 y 1,1 nm (Figura 3. 4A y 3. 4C), mientras que la imagen de TEM (Figura 3. 4B) confirma la estructura de nano-láminas de OG.

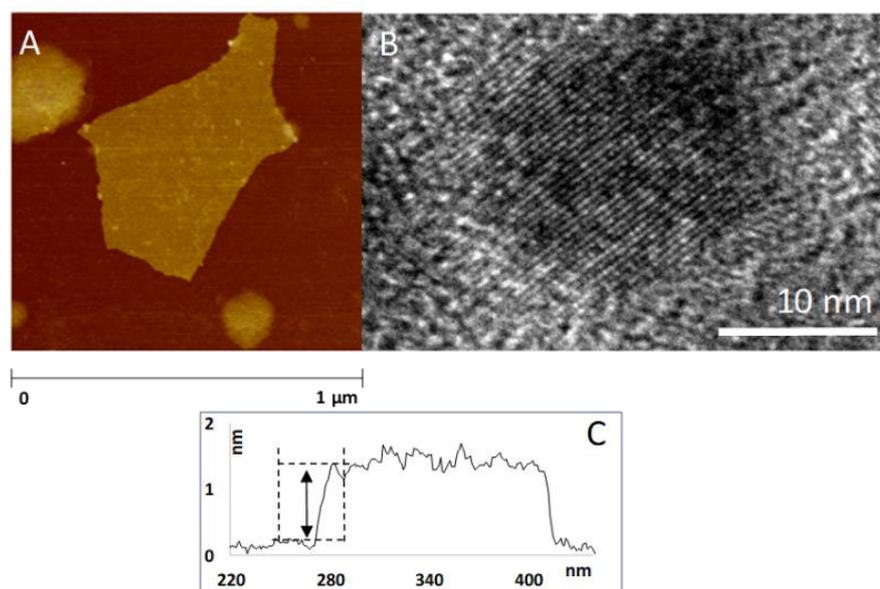


Figura 3. 4. A) Imagen de AFM OG; B) Imagen de TEM OG; C) Altura de la imagen de AFM.

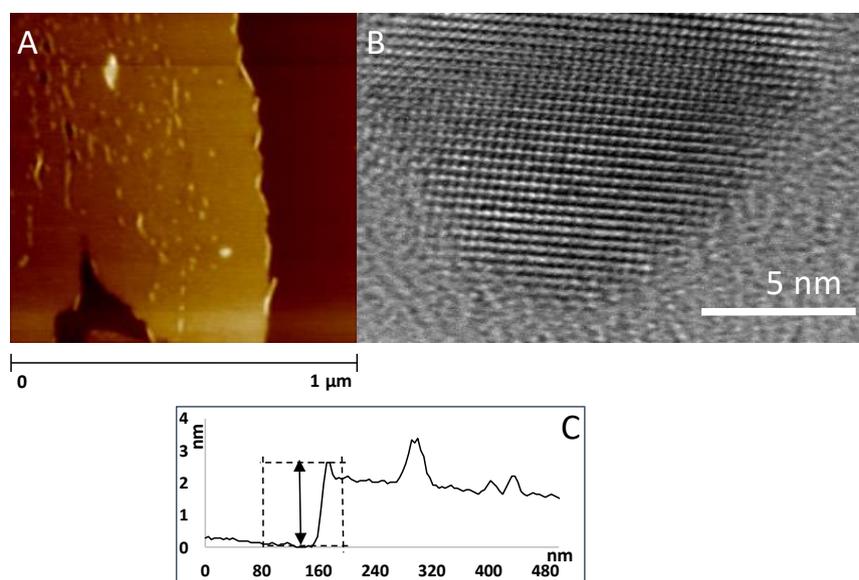


Figura 3. 5. A) Imagen de AFM NgsC@OG; B) Imagen de TEM NgsC@OG; C) Altura de AFM.

Tras la inmovilización de la naringinasa comercial (NgsaC@OG) (60 mg/g) en las imágenes de (AFM) se observan manchas brillantes en la superficie del OG correspondientes a la enzima inmovilizada. Además, se observa que el grosor de la nano-lamina correspondiente a NgsaC@OG es de aproximadamente (3-5,5 nm) (Figura 3. 5C) lo que es sustancialmente mayor al correspondiente al del OG (~ 0,6-1,1 nm) (Figura 3. 4C), lo que confirma la inmovilización de la naringinasa en la superficie de OG. El radio mínimo de las proteínas se puede estimar teóricamente a partir del peso molecular.¹²⁶ Según el análisis de SDS-PAGE (Figura 3. 2), la NgsaC es un complejo enzimático con un peso molecular en el rango de 33 a 97 KDa. A partir de estos valores, se puede estimar un radio mínimo de 2,12 a 3,03 nm, lo que concuerda con el espesor determinado por AFM. Por otro lado, las imágenes de (TEM) mostraron que la estructura del óxido de grafeno se mantiene después del proceso de inmovilización (Figura 3. 5B).

Según lo descrito en literatura la inmovilización de enzimas sobre OG puede ser el resultado de diferentes interacciones, incluidas las interacciones electrostáticas, hidrofóbicas e interacciones π - π .⁷² Sin embargo, la presencia de grupos funcionales oxigenados reactivos en el OG como son los grupos carbonilo, carboxilo y epóxido, también brinda la posibilidad de formar enlaces covalentes, probablemente por reacción con los grupos nucleofílicos de la enzima. Sin embargo, esta interacción covalente de las enzimas con OG generalmente ocurre a una velocidad de reacción lenta.⁷³ Por ello es razonable suponer que en nuestro caso después de 24 h de incubación, la enzima se ha unido principalmente de manera covalente al OG. De hecho, se pueden descartar las interacciones electrostáticas debido a que el punto isoeléctrico de la naringinasa está a un pH de ~ 5. Eso significa que tiene una carga neta positiva a un pH inferior a 5 y una carga neta negativa a un pH superior a 5. La determinación del potencial zeta del OG indicó que las láminas están cargadas negativamente a pH = 7. Este resultado concuerda con el estudio de Zhang y col.⁷³ donde se indica que las láminas de OG se cargan negativamente en disoluciones acuosas con un rango de pH entre 4 y 11. Por lo tanto, no se espera que ocurran interacciones electrostáticas entre la enzima y el OG al pH de inmovilización (pH = 7). Sin embargo, para descartar este tipo de interacciones, la NgsaC se inmovilizó sobre OG (NgsaC@OG) a diferentes valores de pH (4,5, 7 y 10). Posteriormente las tres muestras fueron tratadas con una disolución acuosa de NaCl con un gradiente creciente, primero 0,5 M y posteriormente con una concentración de 1 M durante 2 horas (cada etapa) para determinar el grado de desorción de la enzima. Como se observa en la Tabla 3. 4 cuando la inmovilización fue realizada a pH < 5 se observó desorción de la proteína. Mientras que no se observó desorción cuando la NgsaC fue inmovilizada a mayores valores de pH. Estos resultados estarían indicando una inmovilización covalente de la NgsaC@OG.

Tabla 3. 4. Efecto de la fuerza iónica en la desorción de la NgsaC inmovilizada sobre OG (NgsaC@OG).

pH inmovilización	^a Proteína desorbida (0,5 M NaCl)	^a Proteína desorbida (1 M NaCl)	% Proteína total desorbida
4,5	0,8	3,2	2,7
7	0	0	0
10	0	0	0

^a (µg enzima/mL).

Por otra parte, y con fines comparativos se inmovilizó la naringinasa comercial sobre óxido de grafeno reducido (NgsaC@OGR) bajo las mismas condiciones. El soporte OGR, se caracterizó por análisis elemental (Tabla 3. 3) y espectroscopia FTIR. El análisis elemental mostró que el soporte OGR contiene menor cantidad de oxígeno con respecto al OG, lo que está de acuerdo con las bandas de absorción observadas por espectroscopia FTIR (Figura 3. 3b). La inmovilización de la NgsaC se llevó a cabo en las mismas condiciones que para el OG y tal como se observa en la Tabla 3. 2, el porcentaje de inmovilización sobre el OGR después de 24 h es muy inferior al observado con OG correspondiendo aproximadamente a 40 mg de enzima/g soporte.

A continuación, se llevaron a cabo unos experimentos preliminares sobre la actividad catalítica de la NgsaC@OG y NgsaC@OGR con una carga de enzima similar (40 mg de enzima/g de soporte) utilizando naringina como sustrato. Como se puede observar en la Figura 3. 6 la conversión obtenida con la enzima NgsC@OG(3h) fue considerablemente superior (74 %) a la obtenida cuando el soporte fue OGR (24 %). Aunque ambos derivados enzimáticos fueron estables durante 3 ciclos de reacción consecutivos.

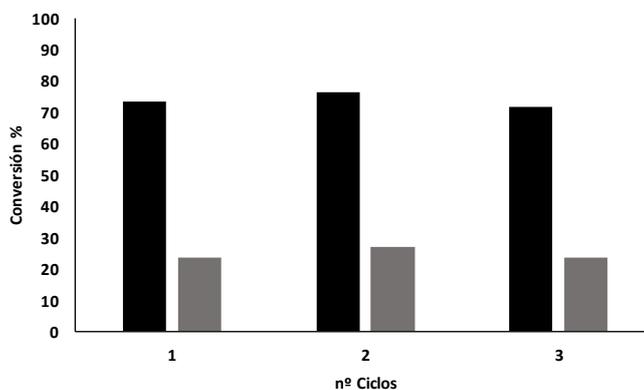


Figura 3. 6. Estudio de la conversión catalítica en la hidrólisis de la naringina en presencia de NgsC@OG(3h) y NgsC@OGR(24h). Conversión NgsC@OG(3h) (■) y NgsC@OGR(24h) (■). Condiciones de reacción: (50 mg de NgsC@OG(3h) o NgsaC@OGR(24h) con 8,6 mM del sustrato naringina, en 3 mL de disolución tampón de citrato 50 mM (pH = 4,5) a 50 °C durante 30 minutos.

Esta diferencia de actividad de ambos derivados enzimáticos se puede atribuir a la mayor hidrofobicidad del OGR, que le confiere menor dispersabilidad en agua, y por lo tanto menor interacción entre el biocatalizador y el sustrato naringina. De hecho, estos resultados estarían de acuerdo con lo descrito en bibliografía donde se encuentra que la NgsC@OGR aumenta considerablemente su actividad cuando se aumenta la dispersabilidad de OGR en agua mediante la adición de surfactantes en el medio de reacción.¹¹⁷

3.2.2.2 Inmovilización de naringinasa sobre la zeolita ITQ-2 pura sílice

La elevada área superficial de los materiales silíceos nanoestructurados junto con la posibilidad de modificar su superficie con distintos grupos funcionales los convierten en excelentes soportes para la inmovilización enzimática. Sin embargo, los tamices moleculares mesoporosos con diámetro de poro grande tales como MCM-41 y SBA-15, que tienen un gran potencial como soportes para la inmovilización de enzimas, poseen limitaciones asociadas a su limitada estabilidad en medios acuosos y al hecho de que el gran volumen estérico de muchos enzimas puede producir el bloqueo de los mesoporos.

Comparativamente, la zeolita deslaminada ITQ-2 posee importantes ventajas con respecto a los materiales mesoporosos para la inmovilización de enzimas como son su elevada superficie externa (aproximadamente $600 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) con grupos silanoles regularmente distribuidos¹²⁷ y su alta estabilidad en medios acuosos. Estas características confieren a este material un gran potencial como soporte enzimático, superando los problemas asociados con el uso de los tamices moleculares mesoporosos.

Por ello se realizó un estudio de la inmovilización de la naringinasa (C y P) sobre la zeolita ITQ-2 pura sílice. Para ello en primer lugar, la superficie de la zeolita ITQ-2 pura sílice se funcionalizó con grupos amino mediante el tratamiento del material primero con 3-(aminopropil)trióxosilano (NITQ-2) y posteriormente con glutaraldehído obteniéndose así, una zeolita ITQ-2 modificada con grupos aldehído sobre su superficie (GITQ-2) capaces de reaccionar con los grupos amino de la enzima generando enlaces covalentes.¹²⁸ De esta manera se genera una capa estable de enzima con excelente accesibilidad al sustrato, y además, limita la lixiviación de la enzima en el medio de reacción.

La zeolita ITQ-2, y las zeolitas modificadas NITQ-2 y GITQ-2 se caracterizaron por espectroscopia FTIR (Figura 3. 7). En la Figura 3. 7(A)(a) se observa las bandas de vibración correspondientes a los grupos Si-OH, de la zeolita ITQ-2 pura sílice a 3741 cm^{-1} . Después de la modificación química con (3-aminopropil)trióxosilano, se observa la aparición de las bandas de vibración de estiramiento de los grupos amino a 3425 , 1660 cm^{-1} junto con las bandas de vibración de los grupos $-\text{CH}_2$ (2977 cm^{-1} , 2931 cm^{-1} y 2865 cm^{-1}) asociadas a la cadena de (3-aminopropil)trióxosilano (Figura 3. 7(B)(b)). La presencia de nitrógeno en esta muestra (NITQ-2) también se confirmó mediante el análisis elemental (Tabla 3. 5). Después del tratamiento con glutaraldehído es posible observar el aumento en la intensidad de la vibración del grupo $-\text{CH}_2$ (Figura 3. 7(B)(c)). Además, la aparición de bandas de vibración a 2842 cm^{-1} y 1725 cm^{-1} asociadas a C-H y C = O

respectivamente, confirma la presencia de grupos aldehído en la superficie de GITQ-2 a través de los cuales la enzima podría inmovilizarse covalentemente.

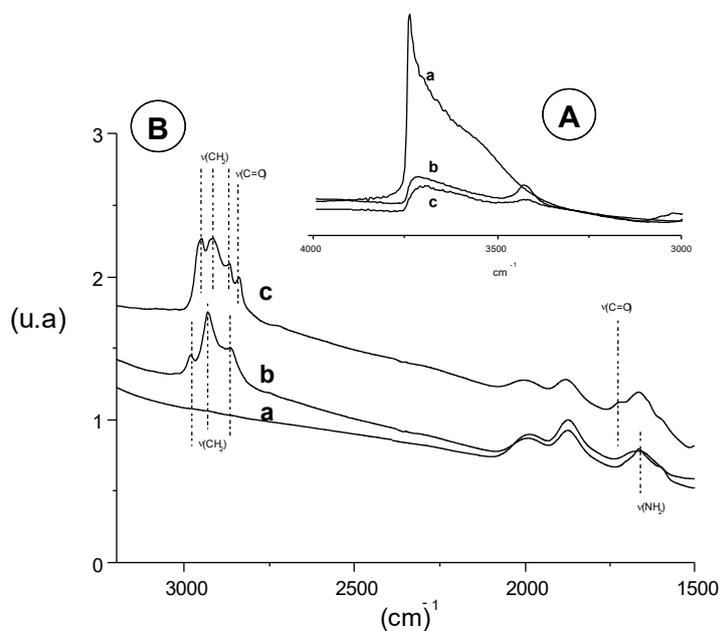


Figura 3. 7. Espectroscopía FTIR de (a) ITQ-2, (b) NITQ-2 y (c) GITQ-2 a 200 °C.

Tabla 3. 5. Análisis químico de los soportes de silicio.

Soporte	N%	C%	H%
ITQ-2	-	0,15	0,33
NITQ-2	1,55	8,54	1,63
GITQ-2	1,19	10,18	1,84
Beta	-	0,21	0,34
NBeta	1,02	8,48	1,41
GBeta	0,73	12,58	1,83
MCM-41	-	0,08	0,37
NMCM-41	2,07	8,97	2,29
GMCM-41	1,45	21,53	3,49

El material GITQ-2 fue caracterizado por microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM), y mostró las láminas características del material, así como irregularidades y cavidades de distintos tamaños (Figura 3. 8).

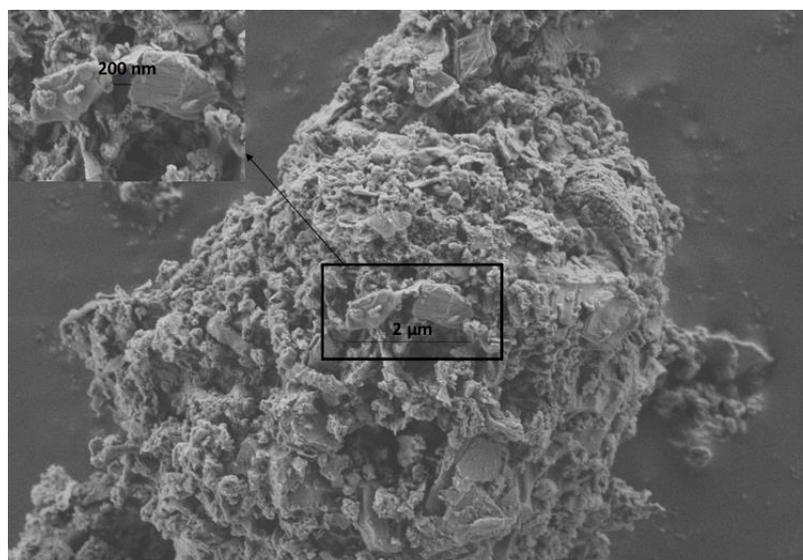


Figura 3. 8. Imagen de FSEM del material GITQ-2.

La inmovilización de la NgsaC (3 mg) sobre GITQ-2 se realizó incubando 100 mg de soporte con la disolución enzimática (1 mg/mL) en una disolución tampón fosfato a pH = 7 (sección experimental). Para determinar la cantidad de la enzima inmovilizada se tomaron distintas alícuotas del sobrenadante a distintos tiempos y la cantidad de proteína presente en disolución se determinó mediante la prueba de ácido bicinónico.¹²⁵ Por último, se retiró el sobrenadante, y se lavó el sólido con la disolución tampón de fosfato pH = 7 (100 mM) hasta que no se observó proteína en disolución. Como se observa en la Figura 3. 9 y Figura 3. 10, después de 24 h, la cantidad de enzima inmovilizada fue de aproximadamente 100 %, que corresponde a 30 mg / g de GITQ-2, en ambos materiales NgsaC@GITQ-2 y NgsaP@GITQ-2.

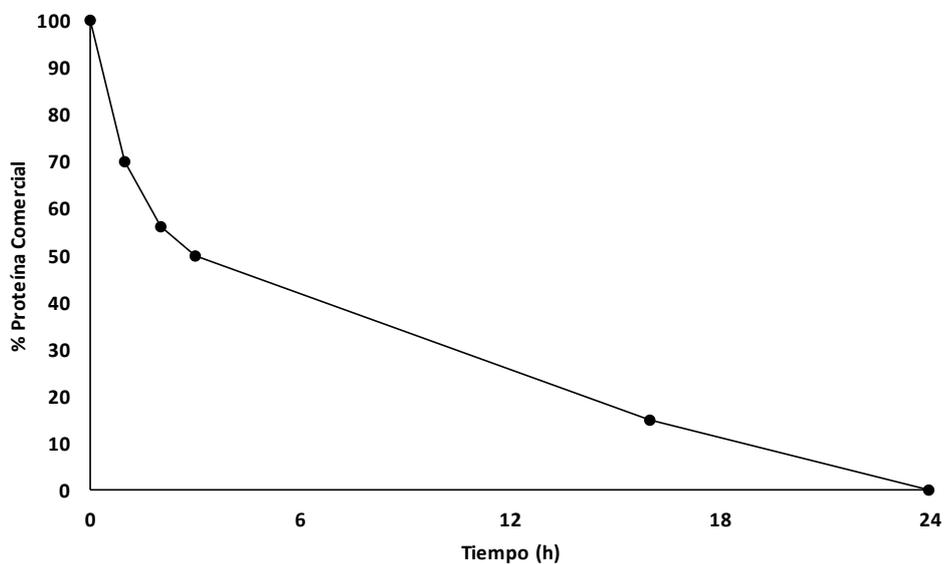


Figura 3. 9. Cinética de inmovilización de la (NgsaC) sobre la zeolita GITQ-2 (NgsaC@GITQ-2).

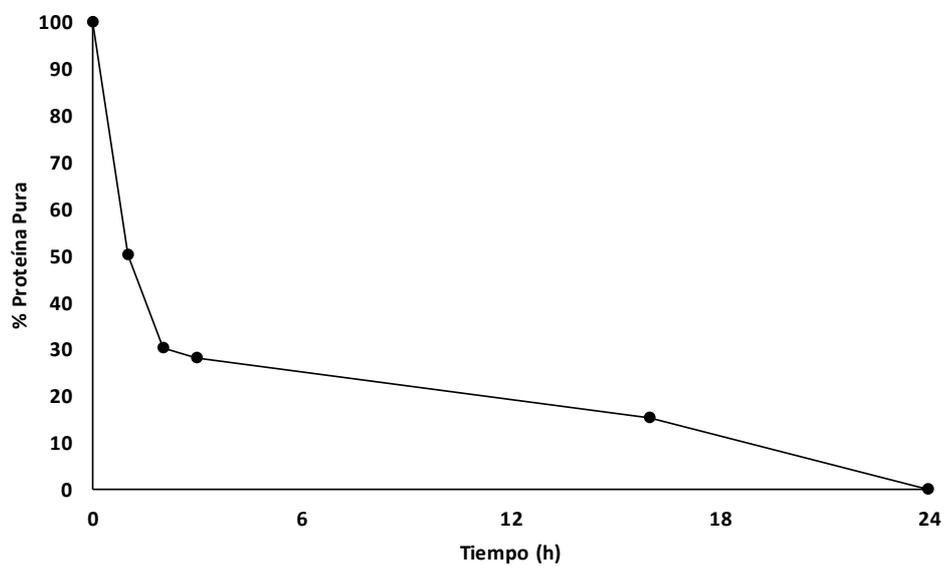


Figura 3. 10. Cinética de inmovilización de la NgsaP sobre la zeolita GITQ-2 (NgsaP@GITQ-2).

Con fines comparativos, la NgsaC también se inmovilizó sobre dos materiales silíceos nanoestructurados, el tamiz molecular mesoporoso MCM-41 y una zeolita Beta nanocristalina. La caracterización de los soportes modificados mediante espectroscopia FTIR (Figuras 3. 11 y 3. 12), indicaron, al igual que en el caso de la zeolita ITQ-2, la aparición de las bandas características después de cada modificación del soporte, mientras que en la Tabla 3. 5 se incluye el análisis químico de los distintos materiales.

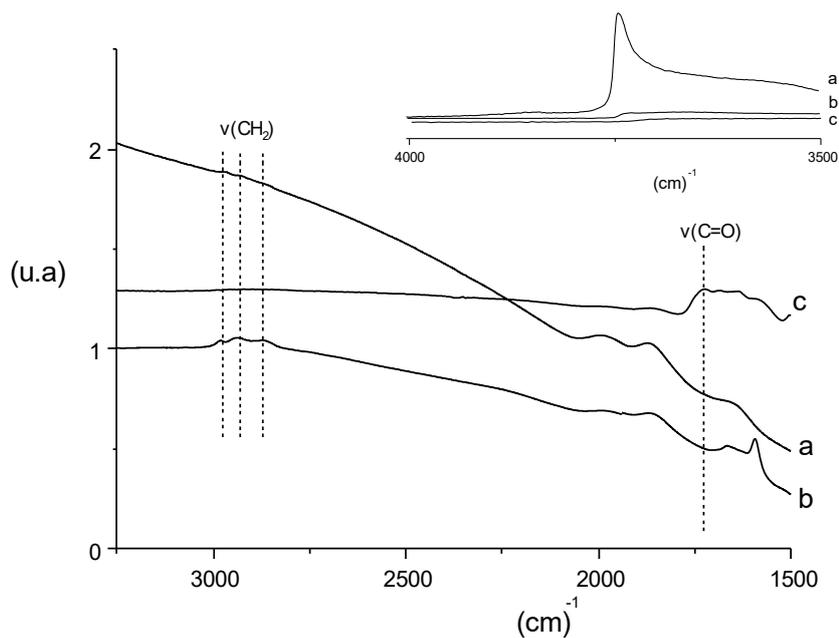


Figura 3. 11. Espectroscopía FTIR de (a) MCM-41, (b) NMCM-41 y (c) GMCM-41 a 200 °C.

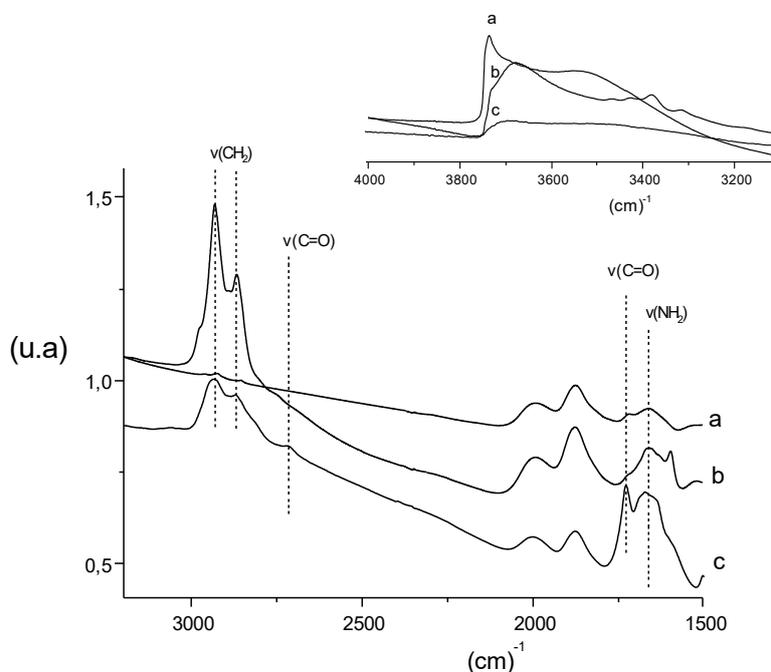


Figura 3. 12. Espectroscopía FTIR de la zeolita (a) Beta, (b) NBeta y (c) GBeta a 200 °C.

La cantidad de la enzima inmovilizada fue en ambos casos considerablemente más baja que la observada en el caso de GITQ-2 (Tabla 3. 6), siendo el orden en el grado de inmovilización: GITQ-2 > GBeta > GMCM-41.

Tabla 3. 6. Inmovilización de NgsaC sobre diferentes materiales.

Soporte	NgsaC inmovilizada (%)
GMCM-41	36
GBeta	65
GITQ-2	99

Condiciones de reacción: La inmovilización de la enzima (NgsaC) se realizó a partir de una mezcla de 100 mg de soporte dispersados en 3 mL de disolución tampón de fosfato (PBS) pH = 7 (100 mM) y se le agregaron 3 mg de NgsaC (1 mg/mL), 24 horas.

Estos resultados pueden explicarse considerando la variación del área superficial de estos materiales después de la modificación con glutaraldehído (Tabla 3. 7). Como se puede observar, en el caso de la zeolita Beta tanto la superficie externa como el área de la superficie interna disminuyen considerablemente. El área de la superficie interna se reduce de 406 a 110 m²g⁻¹, lo que indica un bloqueo de los microporos del soporte después

del tratamiento con glutaraldehído. En el caso del material mesoporoso (MCM-41), que se caracteriza por su alta área de mesoporo ($1198 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$), después de la modificación con glutaraldehído, el área del mesoporo se reduce drásticamente a $49 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ debido al bloqueo del mesoporo durante la funcionalización del material. Por lo tanto, esta superficie interna apenas contribuye a la inmovilización de la enzima. Sin embargo, en el caso de la zeolita ITQ-2, después de la modificación con glutaraldehído, el área de la superficie externa se mantiene muy alta ($236 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$), lo que ofrece una superficie funcionalizada altamente expuesta donde la enzima puede interactuar. Esto debería reflejarse en la actividad catalítica que debería ser directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en la superficie del sólido. Como se puede observar en la Tabla 3. 8, donde se presenta la conversión catalítica (conversión de naringina después de 30 min) para los diferentes derivados enzimáticos, la conversión está claramente relacionada con la cantidad de enzima inmovilizada, esto es NgsaC@GITQ-2> NgsaC@GBeta>NgsaC@GMCM-41.

Tabla 3. 7. Área (BET) de los materiales utilizados

Material	BET (m^2/g)	Área interna (m^2/g)	Área externa (m^2/g)
ITQ-2	512	59	453
GITQ-2	273	37	236
NgsaC@GITQ-2	121	23	98
Beta	580	406	174
GBeta	270	110	160
NgsaC@GBeta	97	5	92
MCM-41	1198	-	-
GMCM-41	49	-	-
NgsaC@GMCM-41	8	-	-

Tabla 3. 8. Conversión de la naringina en presencia de NgsaC inmovilizada sobre soportes de silicio

Biocatalizador	Conversión de naringina (%)
NgsaC@GMCM-41	63
NgsaC@GBeta	73
NgsaC@GITQ-2	88

Condiciones de reacción: 100 mg de biocatalizador, 8,6 mM del sustrato naringina, en 3 mL de tampón de citrato 50 mM (pH = 4,5) a 50 °C durante 30 minutos.

3.2.3. Propiedades Catalíticas de la naringinasa (C y P) soportada sobre OG y GITQ-2

3.2.3.1 Estudio de la influencia del pH en la actividad enzimática

Un parámetro importante que controla la actividad catalítica y estabilidad de un enzima es el pH del medio de reacción. Particularmente, en el caso de la naringinasa, donde una de sus aplicaciones es la reducción del sabor amargo de los zumos de cítricos, y donde el valor de pH del zumo puede tener un impacto importante en la actividad y estabilidad de la enzima. Por ello, se determinó la actividad catalítica de la naringinasa inmovilizada (Ngsa(C y P)@OG) y (Ngsa(C y P)@GITQ-2) en función del pH en la hidrólisis del compuesto p-Nitrofenil- α -L-Ramnopiranosido (Rha-pNP) en un rango de pH de 3 a 8 (sección experimental). En la Figura 3. 13 y 3. 14 se presenta la actividad relativa, de los biocatalizadores Ngsa(C y P)@OG y (Ngsa(C y P)@GITQ-2 en función del pH y se compara con la actividad de la enzima libre Ngsa(C y P). La actividad relativa se define como la actividad enzimática (μ mol de p-nitrofenol por minuto) de la muestra de interés frente a la actividad enzimática de la enzima libre en las mismas condiciones, expresada en forma porcentual.

Como se puede observar, el pH óptimo (4,5) es el mismo para la enzima inmovilizada y la enzima libre. Estos resultados indican que la distribución de protones entre la fase acuosa y el centro activo de la enzima no se ve modificado por el soporte.^{72,116}

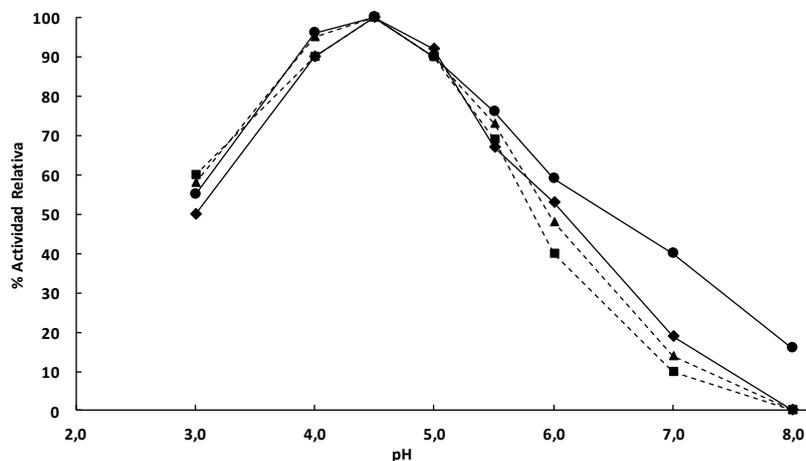


Figura 3. 13. Actividad relativa en función del pH en la hidrólisis de Rha-pNP para la naringinasa libre e inmovilizada sobre OG: (◆) NgsaC, (■) NgsaP, (●) NgsaC@OG y (▲) NgsaP@OG.

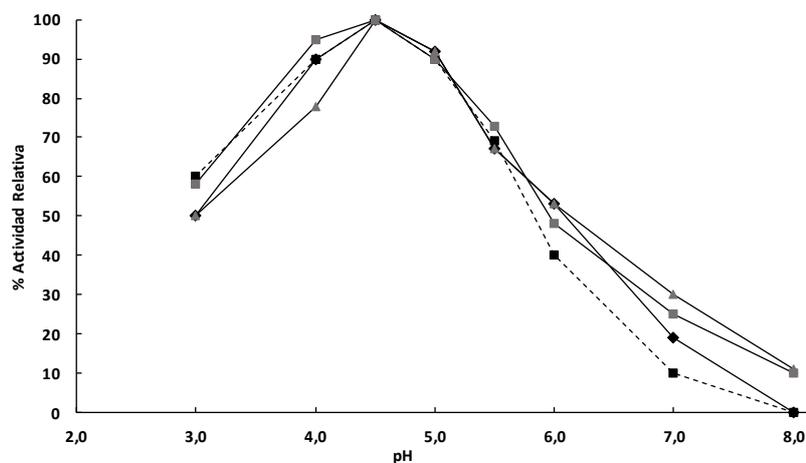


Figura 3. 14. Actividad relativa en función del pH en la hidrólisis de Rha-pNP para la naringinasa libre e inmovilizada sobre GITQ-2: (◆) NgsaC, (■) NgsaP, (◆) NgsaC@GITQ-2 y (▲) NgsaP@GITQ-2.

Este resultado concuerda con resultados previos donde la naringinasa fue inmovilizada sobre tanin-aminohexilcelulosa¹¹⁰ y geles de alcohol polivinílico (PVA)¹¹⁶ respectivamente. Así, el hecho de que la naringinasa inmovilizada sobre OG y GITQ-2 pueda operar con alta actividad a niveles de pH similares a los de los zumos cítricos (inferiores a 5) es una característica muy importante para su aplicación en el tratamiento de los zumos a gran escala.

3.2.3.2 Estudio del efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción

La determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica del derivado enzimático es también un parámetro importante, ya que el equilibrio entre el efecto de la temperatura sobre la velocidad de la reacción enzimática y la velocidad de degradación de la enzima establece la existencia de una temperatura óptima de operación.¹²⁹

Así, la actividad ramnosidasa de la enzima Ngsa (C y P) en su forma libre e inmovilizada sobre OG y GITQ-2 en función de la temperatura, se determinó mediante la hidrólisis de p-nitrofenil- α -L-ramnopiranosido (Rha-pNP). Como se observa en la Figura 3. 15, la temperatura óptima para la enzima NgsaC en la forma libre e inmovilizada sobre OG se encuentra entre 70-75 °C, mientras que la temperatura óptima para la enzima NgsaP en la forma libre e inmovilizada sobre OG es entre 60-65 °C. Resultados similares se obtuvieron para las enzimas Ngsa(C y P)@GITQ-2 siendo el óptimo entre 55-70 °C ver (Figura 3. 16).

Por lo tanto, los resultados indican que la enzima NgsaC es ligeramente más estable que la enzima NgsaP, y ambas enzimas inmovilizadas presentan una actividad similar con la temperatura. Además, se observó que la actividad de las enzimas inmovilizadas se vio menos afectada por la temperatura que la enzima libre, lo que indica que la inmovilización estabiliza la estructura de la enzima frente a la desnaturalización, tal y como se comprueba más adelante con los experimentos de estabilidad térmica de estos biocatalizadores.

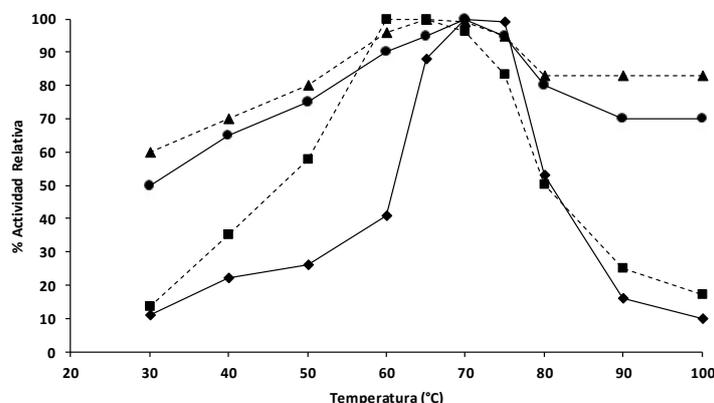


Figura 3. 15. Actividad relativa determinada mediante la hidrólisis de Rha-pNP en función de la temperatura para la naringinasa libre e inmovilizada sobre OG: (◆) NgsaC, (■) NgsaP, (●) NgsaC@OG y (▲) NgsaP@OG.

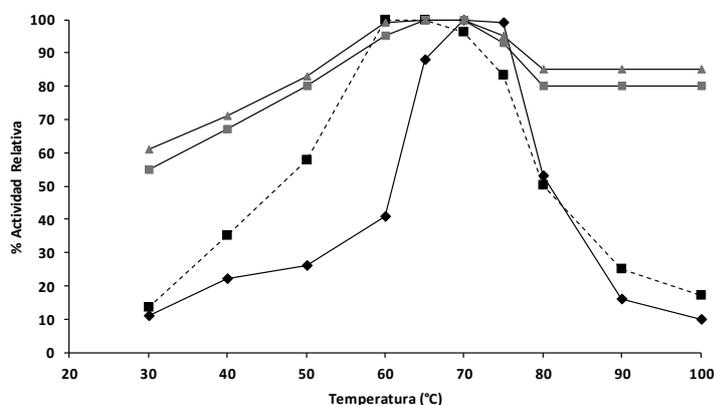


Figura 3. 16. Actividad relativa determinada mediante la hidrólisis de Rha-pNP en función de la temperatura para la naringinasa libre e inmovilizada sobre GITQ-2: (◆) NgsaC, (■) NgsaP, (◼) NgsaC@GITQ-2 y (▲) NgsaP@GITQ-2.

3.2.3.3 Determinación de las constantes de Michaelis-Menten (K_M)

La velocidad de una reacción catalizada por una enzima depende de la concentración de sustrato, la temperatura, la presencia de inhibidores y el valor de pH de la reacción. La constante (K_M) es un parámetro que en condiciones de concentración de enzima, pH y temperatura constantes, nos informa de la afinidad que tiene la enzima por el sustrato, (Introducción).

Con objeto de determinar las constantes de Michaelis-Menten, el efecto de la concentración de sustrato en la actividad de la enzima Ngsa (C y P) e inmovilizadas se determinó midiendo las velocidades iniciales de reacción. Para ello se usó el sustrato Rha-pNP en un rango de concentraciones entre 0,006 y 0,312 mM manteniendo constante el tiempo de reacción (10 min). Los valores de las constantes de Michaelis (K_M) fueron determinadas mediante los diagramas de Lineweaver-Burk (Figura 3. 17 y 3. 18). Los valores de las constantes K_M fueron 1,87 y 1,80 mM para la enzima NgsaC y NgsaP respectivamente. Estos resultados son similares a los publicados por Romero y col.¹³⁰ que encontraron un valor de K_M de 1,52 utilizando el mismo sustrato (p-nitrofenil- α -L-rhamnopyranósido). Para los biocatalizadores Ngsa (C y P)@OG se observó que los valores de K_M fueron 0,80 y 0,61 mM respectivamente, considerablemente más bajos que la enzima en forma libre (Figura 3. 17 y 3. 18), lo que indica una mayor afinidad por el sustrato cuando la enzima se inmoviliza sobre OG. Cuando se utilizaron los biocatalizadores Ngsa (C y P)@GITQ-2, se observó una disminución aún mayor en los valores de K_M siendo de 0,32 y 0,16 mM para la NgsaC@GITQ-2 y NgsaP@GITQ-2 respectivamente (Figuras 3. 17 y 3. 18). Estos resultados deben ser atribuidos a una mayor exposición de los centros activos de la enzima como consecuencia de la inmovilización covalente sobre los soportes, siendo este efecto mayor en la enzima inmovilizada sobre GITQ-2 que sobre OG.

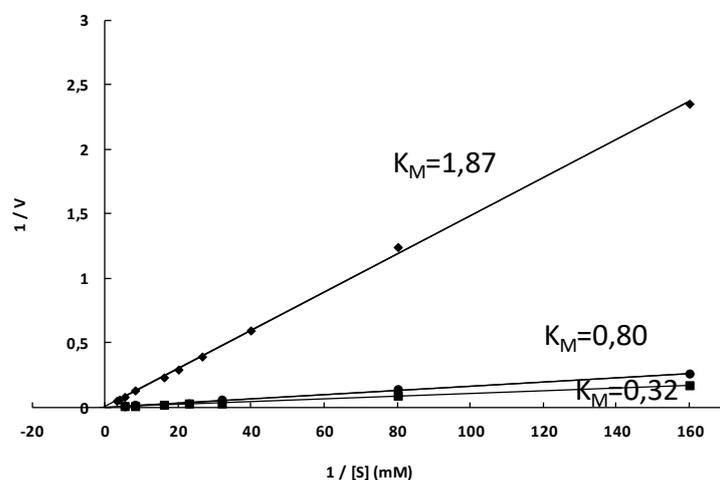


Figura 3. 17. Representación de Lineweaver-Burk de la enzima NgsaC e inmovilizada: (—●—) NgsaC@OG, (—◆—) NgsaC, (—■—) NgsaC@ GITQ-2.

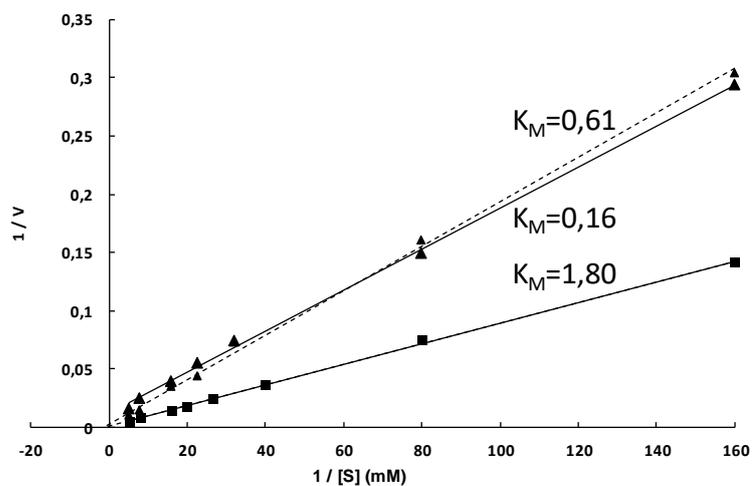


Figura 3. 18. Representación de Lineweaver-Burk de la enzima NgsaP e inmovilizada. (---▲---) NgsaP@OG, (—■—) NgsaP y (—▲—) NgsaP @GITQ-2.

En la Tabla 3. 9 se resumen los valores de K_M obtenidos para la naringinasa libre e inmovilizada sobre OG y GITQ-2 y se comparan con los descritos en la bibliografía con diferentes soportes. Con fines comparativos, se han calculado los valores de CK_M (que

es el cociente entre la K_M de la enzima libre dividida por el K_M de la naringinasa inmovilizada) para los diferentes biocatalizadores. Como se puede observar, el valor de CK_M encontrado en este trabajo se encuentra entre los más altos de los descritos en la bibliografía, mostrando un incremento de la afinidad del sustrato por la enzima tras su inmovilización sobre OG y GITQ-2.

Tabla 3. 9. Valores de K_M para la naringinasa en su forma libre e inmovilizada.

Enzima	K_M (mM)		CK_M	Soporte	Ref.
	Libre	Inmovilizada			
Naringinasa <i>Penicillium sp.</i>	3,60	2,10	1,71	(CTA)	112
Naringinasa <i>Penicillium decubens</i>	0,23	0,35	0,67	Alcohol polivinílico (PVA)	115
Naringinasa <i>Penicillium sp.</i>	8,40	10,00	0,84	Camas de alginato	20
Naringinasa <i>Penicillium sp.</i>	5,00	2,00	2,50	Virutas de madera	113
Naringinasa <i>A.niger</i>	0,64	0,53	1,21	Tanin celulosa	110
	1,87	0,80	2,33	NgsaC@OG	
		0,32	5,84	NgsaC@GITQ2	
Naringinasa <i>Penicillium decumbens</i>					ETD
	1,80	0,61	2,95	NgsaP@OG	
		0,16	11,69	NgsaP@GITQ2	

CTA: Films de Celulosa; PVA: alcohol polivinílico; CK_M : K_M Naringinasa libre/ K_M Naringinasa inmovilizada; ETD: Esta Tesis Doctoral.

3.2.3.4 Estudio de la estabilidad térmica del derivado enzimático

La estabilidad térmica de la enzima inmovilizada es un parámetro muy importante para las aplicaciones industriales a gran escala ya que ésta determinará la estabilidad operativa del biocatalizador. Para determinar la estabilidad térmica de Ngsa (C y P) e inmovilizada se expusieron por separado a temperaturas crecientes entre 30 y 100 °C durante 1 h. Después, se le añadió el sustrato Rha-pNP y se llevó a cabo el ensayo para determinar la actividad catalítica residual. Como se puede observar en la Figura 3. 19 y 3. 20, la actividad de las enzimas libres e inmovilizadas permanece constante hasta 70 °C. Sin embargo, a temperaturas superiores, la actividad de las enzimas Ngsa(C y P)@OG y Ngsa(C

y P)@GITQ-2 es considerablemente mayor que las enzimas libres Ngsa(C y P). Cuando se sometieron a 85 °C, las enzimas inmovilizadas retuvieron su actividad enzimática por encima del 80-90 %. Sin embargo, las enzimas libres solo retuvieron el 40 %. Estos resultados indican que la inmovilización genera un aumento considerable en la estabilidad térmica de la enzima. Aparentemente, la inmovilización de la naringinasa sobre OG y GITQ-2 genera una mejor estabilización frente a la desnaturalización térmica en comparación con la naringinasa libre. En la siguiente sección se mostrará cómo la alta estabilidad de la naringinasa inmovilizada sobre OG y GITQ-2 permite realizar varios reusos consecutivos sin pérdida de actividad.

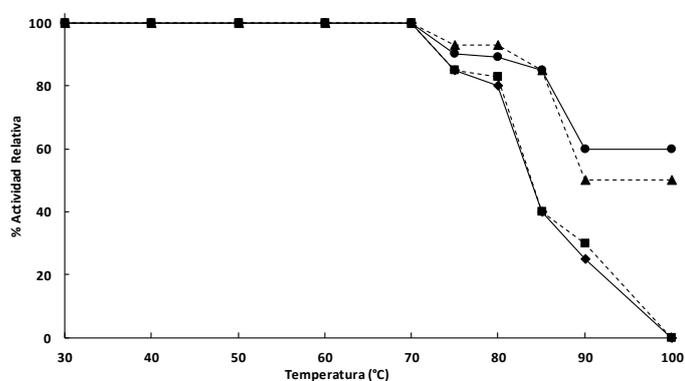


Figura 3. 19. Resultados de estabilidad térmica de la naringinasa libre e inmovilizada utilizando como sustrato Rha-pNP: (♦) NgsaC, (■) NgsaP, (●) NgsaC@OG y (▲) NgsaP@OG.

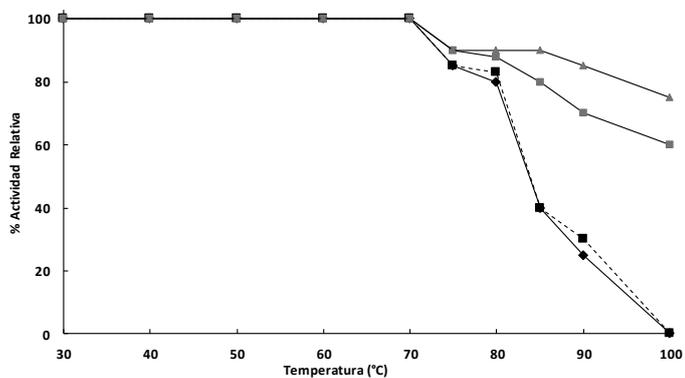


Figura 3. 20. Estudio de la estabilidad térmica de la naringinasa libre e inmovilizada utilizando como sustrato Rha-pNP: (♦) NgsaC, (■) NgsaP, (■) NgsaC@GITQ-2 y (▲) NgsaP@GITQ-2.

3.2.3.5 Estudio de la estabilidad temporal de la naringinasa C sobre OG y GITQ-2

Para estudiar la estabilidad de la naringinasa inmovilizada con el tiempo de almacenamiento, la hidrólisis de la naringina fue comprobada después de 10 y 20 días de almacenamiento. Como se puede ver en la Figura 3. 21, la conversión catalítica de la naringina, se mantuvo intacta después de 20 días de almacenamiento, mostrando la alta estabilidad en el tiempo de las enzimas inmovilizadas NgsaC@OG y NgsaC@GITQ-2.

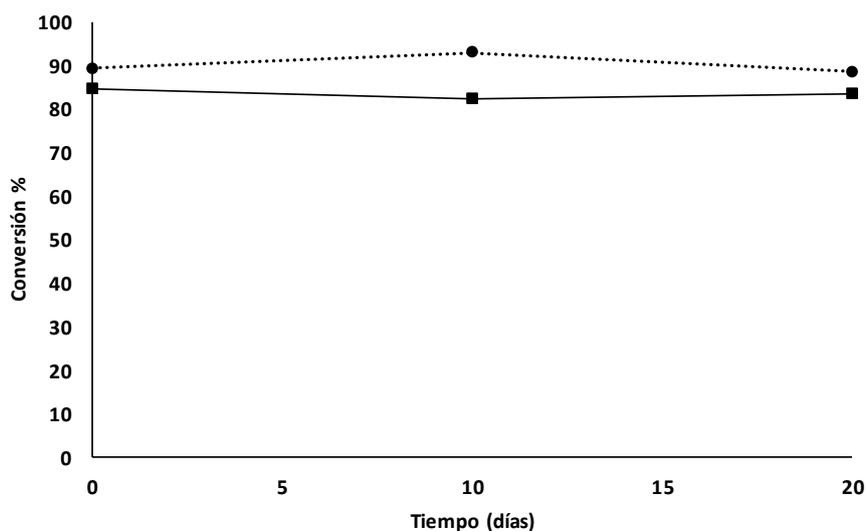


Figura 3. 21. Conversión de naringina después de diferentes tiempos de almacenaje utilizando NgsaC@OG (●) y NgsaC@GITQ-2 (■).

3.2.4. Aplicación industrial de los biocatalizadores

3.2.4.1 Producción de Naringenina y Prunina y estudio de estabilidad catalítica

Como se ha comentado, una ventaja importante de la enzima inmovilizada es que se puede separar fácilmente de los medios de reacción, y también permite la utilización de reactores en continuo. Estas características pueden reducir significativamente el coste del proceso industrial siempre que el derivado enzimático sea estable y mantenga su actividad catalítica. De esta manera, para estudiar la estabilidad y capacidad de producción de prunina y naringenina se llevó a cabo la hidrólisis de la naringina como sustrato utilizando los biocatalizadores Ngsa(C y P) inmovilizados sobre OG y GITQ-2.

En primer lugar, se determinó lo que se conoce como actividad recuperada de la enzima tras la inmovilización. Para ello se comparó la actividad de una cierta cantidad de enzima libre en la hidrólisis de la naringina, con la actividad de la cantidad total de enzima inmovilizada (sección experimental). Los resultados mostraron que la actividad recuperada de los biocatalizadores NgsaP@OG y NgsaC@OG fue de 91 % y 86 % respectivamente. Mientras que para los biocatalizadores NgsaP@GITQ-2 y NgsaC@GITQ-2 fue de 90 %

y 91 % respectivamente, lo que indica una alta actividad de ambas enzimas inmovilizadas con respecto a la enzima libre.

Para determinar la estabilidad catalítica de las enzimas inmovilizadas se realizaron varios ciclos de reacción consecutivos con el mismo biocatalizador. Así, después del primer ciclo, la mezcla de reacción se centrifugó para eliminar el sobrenadante y la naringinasa inmovilizada se lavó repetidamente, y posteriormente la conversión se ensayó de nuevo. Los ciclos catalíticos de la naringinasa (P y C) inmovilizada sobre OG y GITQ-2 se presentan en las Figuras 3. 22 y 3. 23 respectivamente.

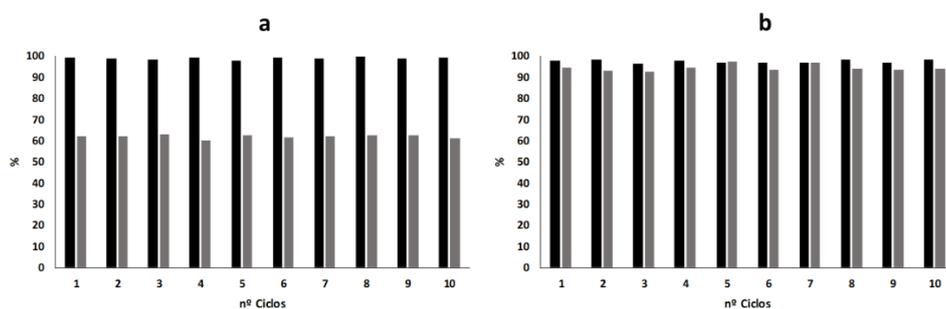


Figura 3. 22. Resultados de la hidrólisis de naringina tras varios ciclos consecutivos utilizando: a) NgsaC@OG, b) NgsaP@OG. (■) Conversión (■) Selectividad a Naringenina(a) o Prunina(b) a 50 °C durante 30 min.

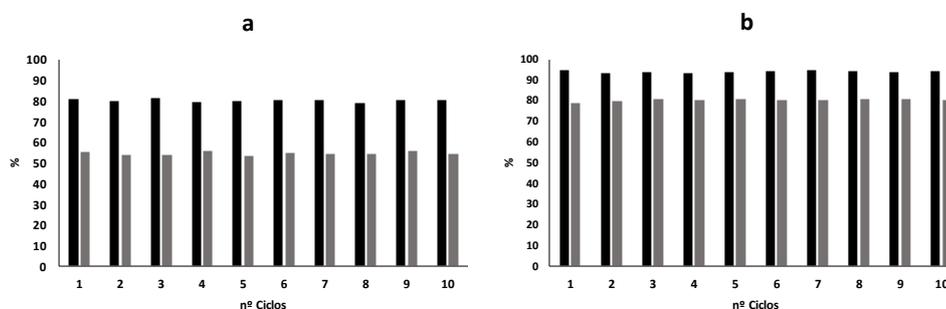


Figura 3. 23. Resultados de la hidrólisis de naringina tras varios ciclos consecutivos utilizando a) NgsaC@GITQ-2 y b) NgsaP@GITQ-2: (■) Conversión, (■) Selectividad a Naringenina(a) o Prunina(b) a 50 °C durante 30 min.

Como se puede observar, la conversión de naringina se mantiene durante 10 ciclos consecutivos, así como la selectividad a naringenina (Figura 3. 22a y 3. 23a) o a prunina (Figura 3. 22b y 3. 23b), lo que indica la alta estabilidad de las enzimas inmovilizadas.

En términos de la capacidad de producción de prunina después de diez ciclos (Tabla 3. 10), se pudieron obtener 34,6 mg de prunina/mg de NgsaP y 28,2 mg de prunina/mg de

NgsaP inmovilizadas sobre OG y GITQ-2 respectivamente. Respecto a la Naringenina se pudieron obtener 14,4 mg de naringenina/mg de NgsaC y 10,2 mg de naringenina/mg de NgsaC inmovilizadas sobre OG y GITQ-2 respectivamente. Los ciclos catalíticos de la naringinasa pura se continuaron y, después de 25 ciclos, se obtuvieron 86,5 mg de prunina/mg de NgsaP y 70,3 mg de prunina/mg de NgsaP inmovilizadas sobre OG y GITQ-2 respectivamente. Estos resultados nos permiten concluir que la capacidad de producción de prunina y naringenina de ambos derivados enzimáticos es muy similar.

Tabla 3. 10. Producción de prunina y naringenina mediante la hidrólisis de naringina utilizando naringinasa inmovilizada

Soporte	Nº Ciclos	Prunina(mg)/Enzima NgsaP(mg)	Naringenina(mg)/Enzima NgsaC(mg)
OG	10	34,6	14,4
	25	86,5	-
GITQ-2	10	28,2	10,2
	25	70,3	-

Por otra parte, la estabilidad a largo plazo, así como la productividad (TON), definida como los mg de naringina hidrolizada por mg de derivado enzimático, de Ngsa(P y C)@OG y Ngsa(P y C)@GITQ-2, fueron comparados con los descritos en la bibliografía que usan naringinasa inmovilizada en diferentes soportes (Tabla 3. 11). Como se puede observar en la mayoría de los ejemplos que se presentan el biocatalizador no es estable y los que se declaran estables poseen un TON más bajo, demostrando que nuestros biocatalizadores presentan una productividad superior a la observada en la literatura. Esto es de especial relevancia desde el punto de vista de la producción a gran escala de prunina y naringenina a través de un método ecológico y económicamente viable. Por lo tanto, este puede ser un método competitivo para producir estos flavonoides.

Tabla 3. 11. Comparación de la estabilidad a largo plazo y la capacidad de producción de la naringinasa inmovilizada sobre distintos materiales.

Soporte	Tiempo (min)	Conversión Naringina(%)	Perdida de actividad (%) (n° Ciclo)	TON ^a	Referencia
Celite	15	35	31,6(2) 39,2(3)	0,22	131
K-carrageenan	120	70	35(2) 62(5)	2,00	19
Ca-alginato	30	70	50(2) 66(5)	1,80	92
PVA Hidrogel	1440	34	26,5(2) 52,9(6)	0,01	116
Quitina Crosslinking	36	60	Estable ^d	0,02	111
Grafeno reducido	60	90	7,61(10) ^b 45,66(15)	0,62	117
Virutas de madera	60	76	Estable(7)	1,09	113
Alginato de calcio	1440	56	50(12)	-	20
Films de triacetato de celulosa	30	31	Estable ^d	0,14	132
Films de triacetato	60	80	Estable ^d	0,08	133
Óxido de grafeno	30	99	Estable(10)	2,83(NgsaC@OG)	Esta Tesis
			Estable(25)	7,07(NgsaP@OG)	
				1,17(NgsaC@GITQ-2)	
				3,42(NgsaP@GITQ-2)	
GITQ2	30		Estable(10) Estable(25)		

^a TON se define como mg naringina hidrolizados / mg de derivado enzimático. ^b mg rutina hidrolizados / mg derivado enzimático. ^c número de ciclos. ^d proceso en continuo.

3.2.4.2 Tratamiento del Zumo de pomelo para reducir el sabor amargo

Los zumos cítricos son ricos en vitamina C y flavonoides cuyos efectos beneficiosos para la salud están reconocidos, sin embargo, en muchos casos, el sabor amargo de los zumos debe ser ajustado antes de su comercialización para ser aceptados por los consumidores. Con este objetivo se han utilizado una gran variedad de métodos fisicoquímicos, que incluyen métodos de absorción, tratamientos químicos y enzimáticos.¹³⁴ Sin embargo, los métodos fisicoquímicos presentan el problema de la pérdida de propiedades organolépticas intrínsecas de los zumos, siendo los métodos enzimáticos los que presentan mayor potencial en la industria alimentaria.

Los excelentes resultados en términos de actividad y estabilidad mostrados por la naringinasa inmovilizada sobre GITQ-2 nos llevaron a estudiar su aplicabilidad para reducir el sabor amargo del zumo de pomelo en un proceso en continuo. Para ello, se seleccionó la naringinasa comercial y se soportó sobre GITQ-2 (NgsaC@GITQ-2). Así, a un reactor tubular de acero inoxidable de lecho fijo se le introdujo 200 mg de NgsaC@GITQ-2 y se mantuvo a una temperatura de 50 °C. El reactor se alimentó con zumo de pomelo mediante una bomba perfusora. Las muestras se recolectadas y la cantidad de azúcares liberados se determinó mediante el método de Miller.¹³⁵ La influencia del tiempo de contacto en la conversión se evaluó modificando el caudal. En la Figura 3. 24, se presenta el efecto del tiempo de contacto sobre la actividad catalítica. Como se puede observar, y desde un punto de vista de diseño del proceso a nivel industrial es posible obtener altos rendimientos de azúcares para tiempos de contacto muy razonables de 0,83 h (que corresponde a un flujo de 0,25 mL/h).

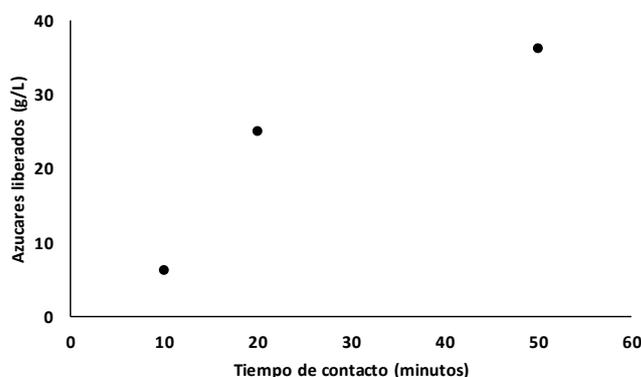


Figura 3. 24. Evaluación del tiempo de contacto en un reactor de lecho fijo durante la hidrólisis del zumo de pomelo. Azúcares liberados (g/L) utilizando NgsaC@GITQ-2.

En la Figura 3. 25 se muestra la concentración total (g/L) de azúcares en el zumo de pomelo, así como la cantidad de azúcares liberados tras el tratamiento de hidrólisis utilizando el flujo optimizado (0,25 mL/h). Como se puede observar (Figura 3. 25), la concentración inicial de azúcares en el zumo de pomelo que era del 61 %, aumenta a 94 %

después de reaccionar a través del reactor de lecho fijo. El aumento observado representa un aumento del 52 % en el contenido del total de azúcares. Además, no se observó una desactivación de la enzima soportada NgsaC@GITQ-2 durante 300 h de operación. Estos resultados evidencian claramente el alto potencial de la NgsaC@GITQ-2 para reducir el sabor amargo en los zumos de pomelo.

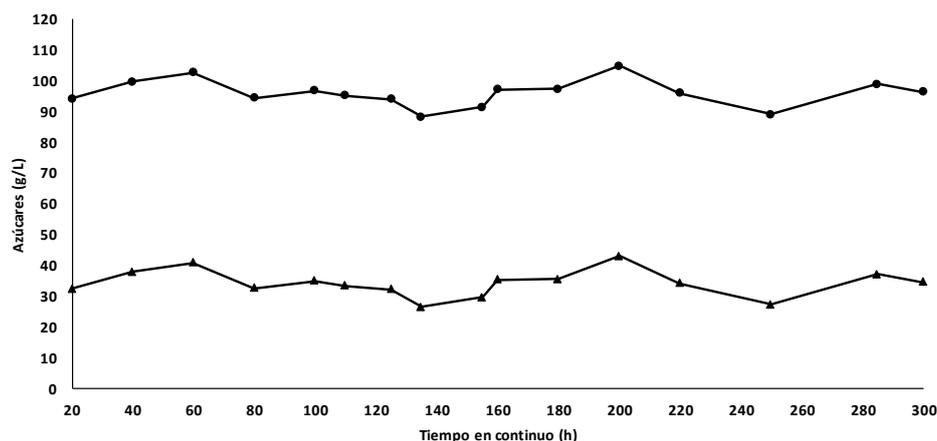


Figura 3. 25. Resultados de la hidrólisis del zumo de pomelo en un reactor en continuo en presencia de NgsaC@GITQ-2. Cantidad total de azúcares en el zumo (●), cantidad de azúcares liberados (▲).

Finalmente, debido a que la actividad antioxidante del zumo es altamente beneficiosa para la salud, la actividad antioxidante del zumo se determinó antes y después de la hidrólisis siguiendo el procedimiento descrito en la sección experimental. Los resultados mostraron (Figura 3. 26) que el zumo de pomelo hidrolizado tiene una actividad antioxidante un 24 % más alta que el zumo inicial, que debe atribuirse al aumento de la concentración de flavonoides (principalmente naringenina) en el zumo después de la hidrólisis.

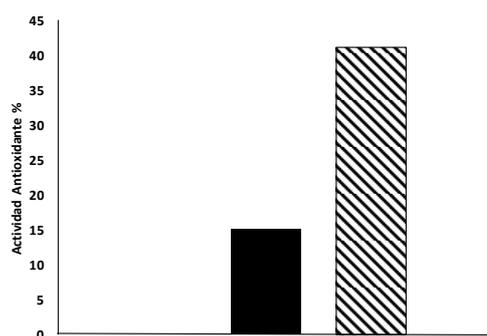


Figura 3. 26. Capacidad antioxidante. Zumo de pomelo inicial (■), Zumo de pomelo después de la hidrólisis utilizando NgsaC@GITQ-2(▨).

3.3. Conclusiones parciales

La naringina y la prunina, dos flavonoides cítricos de alto valor añadido, se han producido con éxito a través de un proceso sostenible mediante hidrólisis enzimática de la naringina, un flavonoide glicosilado muy abundante en los residuos de cítricos.

Para ello, se ha purificado la naringinasa comercial de *Penicillium decumbens* mediante un método simple obteniéndose una enzima purificada (NgsaP) con una alta actividad α -L-ramnosidasa, que hidroliza selectivamente la naringina a prunina.

La naringinasa C y P, se han inmovilizado covalentemente sobre óxido de grafeno y la zeolita laminar previamente modificada en la superficie con grupos glutaraldehído (GITQ-2). Se ha mostrado que ambas enzimas inmovilizadas Ngsa(C y P)@OG y Ngsa(C y P)@GITQ-2 se vieron menos afectadas por la temperatura de reacción y poseen mayor afinidad por el sustrato respecto a la naringinasa libre Ngsa(C y P), además de presentar una gran capacidad de producción de flavonoides de alto valor añadido (naringina y prunina).

Los biocatalizadores diseñados tienen un alto potencial para una producción sostenible a gran escala de flavonoides cítricos como la naringina y la prunina. Este procedimiento supera claramente los métodos de hidrólisis con ácidos minerales,¹⁰³ así como los métodos de síntesis química,¹³⁶ donde se requieren varios pasos y se logra una menor selectividad a los flavonoides deseados.

Finalmente, la naringinasa comercial soportada sobre GITQ-2, (NgsaC@GITQ-2) se ha utilizado con gran éxito en la disminución del sabor amargo del zumo de pomelo mediante un proceso en continuo en reactor de lecho fijo. La actividad catalítica se ha mantenido durante al menos 300 h mostrando el alto potencial de este biocatalizador para reducir el sabor amargo en los zumos de cítricos y aumentar la capacidad antioxidante del mismo.

3.4. Sección experimental

3.4.1. Materiales

La naringinasa procedente de *Penicillium decumbens*, naringina, prunina, naringina, p-nitrofenil- α -L-ramnopiranosido (Rha-pNP), p-nitrofenil- β -D-glucósido (Glc-pNP), tartrato de sodio potasio tetrahidratado, α -D-Glucosa, L-Rhamnosa monohidratada, D-(-)-Fructosa, kit de ácido Bicinconínico para determinación de proteínas, grafito < 20 μ m y ácido 3,5-dinitrosalicílico fueron suministrados por Sigma-Aldrich y DEAE-Sep-hacel por Pharmacia, Suecia.

3.4.2. Preparación de los soportes

3.4.2.1 Óxido de grafeno (OG) y óxido de grafeno reducido (OGR)

El material OG fue preparado a partir de grafito mediante el método modificado de Hummer.¹³⁷ Así en un vaso de precipitados que contenía una mezcla de grafito (7,5 g) y NaNO₃ (7,5 g) se le añadió H₂SO₄ concentrado (360 mL) y la mezcla se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. Posteriormente, se añadió lentamente KMnO₄ (45 g) en pequeñas dosis para mantener la temperatura por debajo de 20 °C. Terminada la adición, la disolución se calentó a 35 °C bajo agitación magnética durante 3 h. A continuación, se añadió H₂O₂ (1,5 L, al 3 %) y la mezcla se agitó durante 30 min. Finalmente, el sólido se separó por centrifugación, se lavó con 600 mL de agua y fue centrifugado de nuevo. Este proceso fue repetido hasta que el pH del lavado con agua fue neutro. La síntesis de óxido de grafeno reducido (OGR) se realizó agregando 100 mg de OG a un reactor vertical y tubular de cuarzo, la reducción de este material se realizó con un tratamiento térmico 5 °C/min a 400 °C (manteniendo 15 minutos) bajo N₂. Después del ciclo de reducción, el material se mantuvo bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 90 minutos. El material resultante se caracterizó por espectroscopia FTIR y análisis elemental.

3.4.2.2 Preparación de los materiales ITQ-2, Beta y MCM-41

La zeolita MWW (MCM-22) pura sílice fue sintetizada de acuerdo con Cambor y col.^{61,62} para ello 0,95 g de NaCl se disolvieron en 50,7 g de una disolución acuosa de hidróxido de N,N,N-trimetil-1-adamantamonio (0,42 M) previamente diluida con 21,33 g de agua. Posteriormente, se añadieron 2,62 g de hexametilamina y 4,88 g de sílice (Aerosil 200, Degussa), manteniendo el gel resultante en agitación. Finalmente, el gel se transfirió a un autoclave con funda de teflón, y se calentó a una temperatura de 150 °C durante 5 días en dinámico (60 rpm). El sólido obtenido tras la cristalización hidrotérmica se filtró y lavó con abundante agua hasta que el valor de pH fue menor de 9, y finalmente se secó a 100 °C.

Posteriormente la zeolita ITQ-2 pura sílice se preparó de acuerdo con Corma y col.^{63,64} dispersando 5 g de la zeolita MWW pura sílice sintetizada anteriormente, en 20 g de agua. A continuación, se añadieron 100 g de una disolución acuosa de hidróxido de hexadeciltrimetilamonio C₁₆TMAOH (25% en peso, 50% de intercambio Br/OH), y 30 g de otra disolución acuosa de tetrapropilamonio (40% en peso, 30% de intercambio Br/OH). La mezcla resultante (pH = 12,5) se calentó a 55 °C y se agitó vigorosamente durante 16 h para facilitar el hinchamiento entre las láminas zeolíticas. A continuación, la suspensión se trató en un baño de ultrasonidos (50 W, 50 Hz) durante 1 h para dispersar las láminas zeolíticas. Mediante la adición de HCl (6 M), se disminuyó el pH hasta aproximadamente 3, para facilitar la floculación del sólido deslaminado, el cual fue recuperado por centrifugación. Una vez lavado con agua destilada y, posteriormente, secado a 60 °C durante 12 h, el sólido se trató a 540 °C, primero en atmósfera de N₂ durante 3 h, y después en aire durante 6 h.⁶³

La síntesis de zeolita Beta nanocrystalina pura sílice se llevó a cabo de acuerdo con un método descrito en la bibliografía.⁵¹ Un gel de composición molar SiO₂: 0.04 Al: 0.5 TEAOH: 6.5 H₂O se cristalizó a 140 °C durante 72 h, produciendo una zeolita Beta nanocrystalina con un tamaño de cristal promedio de 50 nm y una relación de Si/Al de 21. La zeolita fue desaluminizada mediante tratamiento con HNO₃ (60 %) en una relación de líquido/sólido de 60 a una temperatura de 80 °C durante 24 h.⁵⁴ La relación Si/Al del material obtenido fue superior a 1000.

El material mesoporoso MCM-41 pura sílice se preparó a partir de un gel cuya composición molar era 1 SiO₂: 0,15 C₁₆TMABr: 0,26 TMAOH: 24,3 H₂O, donde C₁₆TMABr es bromuro de hexadeciltrimetilamonio (98% en peso, Aldrich), TMAOH es tetrametilamonio (25 % en peso), SiO₂ (Aerosil, Degussa 200). Se disolvieron 2,8 g de C₁₆TMABr en 18 g de agua milliQ a 40 °C hasta que se obtuvo una disolución clara, que se enfrió a temperatura ambiente. A continuación, se le agregaron 4,7 g de disolución de TMAOH, y la mezcla resultante se agitó (5 minutos), y se le añadieron 3 g de SiO₂. La mezcla homogénea resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, la mezcla se calentó a 135 °C durante 24 horas a la presión autógena, en un autoclave de acero inoxidable con funda de teflón. El material MCM-41 pura sílice se recuperó por filtración, se lavó con agua destilada y se secó a 60 °C durante toda la noche. Finalmente, el surfactante ocluido se eliminó por calcinación de la muestra a 540 °C bajo un flujo continuo de N₂ durante 1 h, seguido de un flujo de aire a la misma temperatura durante 6 h.^{68,69}

3.4.2.3 Funcionalización de soportes silíceos

La funcionalización de los soportes (ITQ-2, MCM-41 y Beta nanocrystalina) con glutaraldehído se realizó siguiendo el mismo procedimiento. Inicialmente el soporte (500 mg) se activó a 200 °C en vacío durante 2 h. Cuando alcanzó la temperatura ambiente se le añadió 50 mL de tolueno anhidro y 240 µL de (3-aminopropil)trióxido de silicio y se mantuvo a reflujo a 120 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, el sólido se filtró a vacío y se lavó con tolueno y n-hexano, obteniéndose el material funcionalizado con grupos amino (N-ITQ-2, N-MCM-41 y N-Beta). Para la funcionalización posterior con grupos aldehído, el material (0,5 g) se puso en contacto con 20 mL de una disolución acuosa formada por un tampón NaH₂PO₄ 200 mM, pH = 7 y de glutaraldehído (10 % v/v). Esta se mantuvo bajo agitación magnética durante 24 h. Transcurrido este tiempo el sólido se filtró y se lavó con una disolución tampón de NaH₂PO₄ (25 mM) a pH = 7. Posteriormente el material se secó a la temperatura de 25 °C, obteniéndose el material GITQ-2, GMCM-41 o GBeta, funcionalizado con grupos aldehído.¹²⁸

3.4.3. Purificación de la Naringinasa comercial (NgsaC)

Inicialmente la naringinasa comercial (500 mg) disueltos en 50 mL de agua miliQ fueron dializados a una temperatura de 5 °C durante 24 h. A continuación, se incorporó a una resina de intercambio iónico (DEAE-Sephacel) equilibrada con una disolución 5 mM de

tampón fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) de $\text{pH} = 6,8$. La mezcla se dejó en agitación con rodillos en un frasco cerrado durante una hora. Las proteínas ligadas al gel se eluyeron con una disolución acuosa de NaCl de concentración creciente. Se observó que una disolución de 50 mL de NaCl 0,05 M desorbe selectivamente una fracción proteica de naringinasa con alta actividad ramnosidasa (denominada naringinasa pura) (NgsaP). Para determinar la actividad enzimática de la naringinasa comercial y pura se utilizaron sustratos específicos: p-Nitrofenil- α -L-Ramnopiranosido (Rha-pNP) y p-Nitrofenil- β -D-glucósido (Glc-pNP). Generalmente para determinar la actividad catalítica de la enzima, una alícuota de la disolución enzimática (50 μL) se le añade a una mezcla que contenía 0,7 mL de tampón citrato 50 mM ($\text{pH} = 4,5$) y 50 μL de (Rha-pNP) o (Glc-pNP) 5 mM. La temperatura de la experiencia fue 50 °C. Después de 5 minutos, se añaden 0,8 mL de Na_2CO_3 (1 M) para detener la reacción y se mide la absorbancia a una longitud de onda de $\lambda = 405$ nm usando un espectrofotómetro Uv-Vis, y se calcula la concentración de p-nitrofenol mediante la ley de Lambert Beer (Ecuación 3. 1). Donde (ϵ) es el coeficiente de extinción molar, (l) la longitud de la cubeta empleada y (c) la concentración.

$$\text{Absorbancia} = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Ecuación 3. 1

La enzima se analizó utilizando SDS-PAGE (10%) de acuerdo con Laemmli.¹³⁸ Los patrones de peso molecular (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia) consistieron en fosforilasa B (97 kDa), albúmina de suero bovino (66 kDa), ovalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y α -lactoalbúmina (14,4 kDa). Los geles se tiñeron con plata, según Heukeshoven y Dernick.¹³⁹

3.4.4. Inmovilización enzimática

La inmovilización de la enzima (NgsaC y NgsaP) sobre OG se realizó de la siguiente manera: Se tomaron 50 mg de OG dispersados en 3 mL de disolución tampón de fosfato (PBS) $\text{pH} = 7$ (100 mM) y se sometieron a ultrasonido durante 5 o 10 minutos. A continuación, se agregaron 3 mg del enzima (1 mg/mL) y se dejaron en un matraz cerrado bajo agitación suave usando un agitador de rodillos durante 24 horas. La inmovilización de la enzima (NgsaC y NgsaP) sobre GITQ-2 se realizó de la siguiente manera: 100 mg de GITQ-2 dispersos en 3 mL de una disolución tampón de fosfato (PBS) $\text{pH} = 7$ (100 mM) se agregaron 3 mg de enzima (1 mg/mL) y se dejaron en un matraz cerrado bajo agitación suave usando un agitador de rodillos durante 24 horas. Finalmente, el derivado enzimático Ngsa(C y P)@GITQ-2 se recuperó por centrifugación, se lavó completamente con una disolución tampón fosfato (100 mM) a $\text{pH} = 7$ y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Para determinar el rendimiento de la inmovilización, se tomaron alícuotas del sobrenadante a diferentes tiempos que se analizaron mediante la prueba del ácido bicinonínico. Para ello, la disolución de ácido bicinonínico (2 mL) se añadió a 0,1 mL del

sobrenadante y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después de este tiempo, la densidad óptica del sobrenadante se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de $\lambda = 562$ nm y se calculó la concentración mediante la ley de Lambert Beer. El calibrado previo se realizó con la misma NgsaC (0-1 mg/mL).

3.4.5. Experimentos catalíticos

3.4.5.1 Determinación de actividades enzimáticas

Las actividades de la naringinasa se determinaron incubando la enzima (0,05 mL de disolución Ngsa(C y P) o Ngsa(C y P)@OG o Ngsa(C y P)@GITQ-2 (1 mg proteína/mL) con 0,05 mL (0,5 mM) del sustrato específico Rha-pNP y Glc-pNP según el caso, en 0,7 mL de tampón citrato 50 mM (pH = 4,5) a 50 °C durante 5 minutos. Después de este tiempo, se agregó 0,8 mL de Na₂CO₃ (1 M) para detener la reacción y se midió la absorbancia a $\lambda = 405$ nm usando un espectrómetro UV-Vis (Varian Cary 50 conc Spectrophotometer UV-Vis) y se calculó la concentración de p-nitrofenol mediante la ley de Lambert Beer. Una unidad de enzima (U) se consideró la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto en las condiciones de reacción descritas. La cuantificación de p-nitrofenol se determinó según lo descrito por Romero y col,¹³⁰ siendo el coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{405\text{nm}} = 17,791 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La actividad relativa se define como la actividad enzimática de la muestra de interés (NgsaC o P)@OG o GITQ-2 frente a la actividad enzimática de la enzima libre (NgsaC o P) en las mismas condiciones expresada en forma porcentual.

3.4.5.2 Determinación de las constantes de Michaelis-Menten (K_M)

Los parámetros cinéticos para la enzima NgsaC y NgsaP en forma libre e inmovilizada se determinaron midiendo las velocidades de reacción (en las condiciones mencionadas anteriormente) a concentraciones de sustrato de Rha-pNP que varían de 0,006 a 0,312 mM manteniendo constante el tiempo de reacción (10 min). Las constantes de Michaelis (K_M) se determinaron mediante los gráficos de Lineweaver-Burk, donde se representa en el eje de ordenadas ($1/v_0$) y en el eje abscisas ($1/[S]$).

3.4.5.3 Determinación de la Actividad catalítica modificando el pH y la temperatura

El efecto del pH sobre la actividad catalítica de la enzima pura y comercial en forma libre e inmovilizada se determinó incubando la enzima en presencia del sustrato (Rha-pNP) en un tampón universal (McIlvaine) cuyo valor de pH varía de 3 a 8. Las actividades de la naringinasa se determinaron incubando la enzima 0,05 mL de disolución Ngsa(C y P) o Ngsa(C y P)@OG o Ngsa(C y P)@GITQ-2 (1 mg proteína/mL) con 0,05 mL (0,5 mM) del sustrato específico Rha-pNP, en 0,7 mL de tampón universal (McIlvaine) 50 mM (pH = 3-8) a 50 °C durante 5 minutos. Después de este tiempo, se agregó 0,8 mL de Na₂CO₃ (1 M) para detener la reacción y se midió la absorbancia a una longitud de onda de $\lambda = 405$ nm usando un espectrómetro UV-Vis (Varian Cary 50 conc

Spectrophotometer UV-Vis) y se calculó la concentración de p-nitrofenol mediante la ley de Lambert Beer.

La temperatura óptima para la hidrólisis de Rha-pNP se determinó midiendo la actividad enzimática de la Ngsa(C y P) en forma libre e inmovilizada, a diferentes temperaturas que variaron entre 25 °C y 100 °C. Las actividades de la naringinasa se determinaron incubando la enzima 0,05 mL de disolución Ngsa(C y P) o Ngsa(C y P)@OG o Ngsa(C y P)@GITQ-2 (1 mg proteína/mL) con 0,05 mL (0,5 mM) del sustrato específico Rha-pNP, en 0,7 mL de tampón citrato 50 mM (pH = 4,5) en un rango de temperaturas entre 25-100 °C durante 5 minutos. Después de este tiempo, se agregó 0,8 mL de Na₂CO₃ (1 M) para detener la reacción y se midió la absorbancia a $\lambda = 405$ nm usando un espectrómetro UV-Vis (Varian Cary 50 conc Spectrophotometer UV-Vis) y se calculó la concentración de p-nitrofenol mediante la ley de Lambert Beer.

3.4.5.4 Determinación de la estabilidad térmica del derivado enzimático

La estabilidad térmica se determinó calentando la enzima 0,05 mL de disolución Ngsa(C y P) o Ngsa(C y P)@OG o Ngsa(C y P)@GITQ-2 (1 mg proteína/mL) en 0,7 de tampón citrato 50 mM (pH = 4,5) en un rango de temperaturas entre 30 y 100 °C durante una hora. Posteriormente, se añadió el sustrato Rha-pNP 0,05 mL (0,5 mM) y se determinó la actividad de la enzima a 50 °C durante 5 minutos, Después de este tiempo, se agregó 0,8 mL de Na₂CO₃ (1 M) para detener la reacción y se midió la absorbancia a $\lambda = 405$ nm usando un espectrómetro UV-Vis (Varian Cary 50 conc Spectrophotometer UV-Vis) y se calculó la concentración de p-nitrofenol mediante la ley de Lambert Beer.

3.4.5.5 Determinación de la Actividad recuperada tras la inmovilización

La actividad recuperada fue determinada de acuerdo con Sheldon.¹⁴⁰ Para ello se determinó la actividad catalítica de la enzima Ngsa(P y C) usando como sustrato naringina. Así a una muestra de 12 mL de tampón citrato de pH = 4,5 (50 mM), que contenía naringina 8,6 mM, se le añadió 3 mg de Ngsa(P o C), la reacción se mantuvo bajo agitación y a la temperatura de 50 °C durante 1,5 h. Posteriormente, se tomaron 3 mg de enzima Ngsa(P y C), se inmovilizaron sobre el soporte OG y GITQ-2 durante 24 h como ha sido explicado previamente (apartado 3.4.4) y se determinó la actividad catalítica de la misma manera. Para ello, se tomaron muestras a diferentes tiempos y se determinaron las velocidades de reacción iniciales (mM)·min⁻¹, expresadas como azúcares liberados por minuto. La actividad recuperada fue expresada como un porcentaje: (actividad de la enzima inmovilizada / actividad de la enzima libre) x 100. La cantidad de azúcares liberados se determinaron utilizando el método Miller.¹³⁵ Este consiste en poner en contacto 250 μ L de una disolución de ácido 3,5-dinitrosalicílico, con 250 μ L de muestra y se calientan 100 °C durante 5 min, y tras enfriar se añaden 2,5 mL de agua MilliQ. Por último, se mide la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm, la concentración de azúcares liberados se calculó mediante la ley de Lambert Beer. El calibrado previo se realizó con glucosa 0-20 mM.

3.4.5.6 Estabilidad temporal de la naringinasa inmovilizada

Para determinar la estabilidad de la naringinasa comercial inmovilizada con el tiempo de almacenamiento, se determinó la actividad catalítica después de 10 y 20 días de almacenamiento utilizando naringina como sustrato. Después de cada prueba, el biocatalizador se lavó con una disolución tampón fosfato pH = 7 (100 mM), y se mantuvo a 4 °C hasta el nuevo uso. La hidrólisis de la naringina se midió mediante el método de Miller.¹³⁵ Este consiste en poner en contacto 250 µL de una disolución de ácido 3,5-dinitrosalicílico, con 250 µL de muestra y se calientan a 100 °C durante 5 min, y tras enfriar se añaden 2,5 mL de agua MilliQ. Por último, se mide la absorbancia a una longitud de onda de $\lambda = 540$ nm, la concentración de azúcares liberados se calculó mediante la ley de Lambert Beer. El calibrado previo se realizó con glucosa 0-20 mM.

3.4.5.7 Producción de Prunina y Naringenina y estabilidad del derivado enzimático

Las conversiones de la naringina se determinaron incubando la enzima soportada Ngsa(C y P)@OG o Ngsa(C y P) en 3 mL de tampón de citrato 50 mM (pH = 4,5) con 8,6 mM de naringina durante 30 minutos. La reacción se llevó a cabo a 50 °C. Después de un primer ciclo de reacción, la mezcla se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos, el biocatalizador se retiró y se lavó con una disolución tampón fosfato pH = 7 100 mM, posteriormente se usó en el siguiente ciclo de reacción.

El análisis de los productos se realizó por HPLC (Shimadzu LC-20ADXR) provisto de un detector Diode Array (Detector SPD-M20 A), y de una columna Mediterranean SEA18 (5 µm 25x0.46 cm), utilizando como fase móvil un gradiente de agua-acetonitrilo (flujo 0,8 mL/min). La concentración de naringina, prunina y naringenina se ha estimado utilizando muestras patrón de los compuestos puros. Las muestras patrón de los flavonoides se diluyeron en etanol y se filtraron con filtros de Nylon (0,22 µm), las curvas de calibración absoluta de naringina, prunina y naringenina se realizaron utilizando disoluciones de 0 a 1 mM a una longitud de onda de 280 nm. Los azúcares liberados en la reacción (glucosa y ramnosa) se determinaron usando un detector Refractive Index Detector RID-20A, con una columna (ICE-COREGEL 87H3) termostaticada a 75 °C, en modo isocrático usando H₂SO₄ 4 mM como fase móvil, a un flujo de 0,6 mL/min y fructosa como patrón interno. Las curvas de calibración de las muestras de azúcares glucosa y ramnosa se realizaron en un rango de 0 a 10 mM. La combinación de los dos métodos nos permite determinar todos los productos generados durante la hidrólisis de la naringina. Los azúcares también se determinaron por el método de Miller.¹³⁵ Este consiste en poner en contacto 250 µL de una disolución de ácido 3,5-dinitrosalicílico, con 250 µL de muestra y se calientan a 100 °C durante 5 min, y tras enfriar se añaden 2,5 mL de agua MilliQ. Por último, se mide la absorbancia a una longitud de onda de $\lambda = 540$ nm, la concentración de azúcares liberados se calculó mediante la ley de Lambert Beer. El calibrado previo se realizó con glucosa 0-20 mM.

3.4.5.8 Proceso en continuo para reducir el amargor del zumo de pomelo

Para llevar a cabo el proceso en continuo, se preparó una muestra de zumo de pomelo natural. Se eligieron, 4 pomelos variedad Mars, categoría I, calibre 4 de un peso de 0,955 kg se exprimieron, centrifugaron y finalmente se filtraron con filtros Ashless Filters 125 mm. El zumo se homogeneizó y se ajustó el pH de 2,5 a 4,5 usando NaOH 0,2 M. En un reactor de acero inoxidable de 35 mm de longitud y 1 mm de diámetro, se introdujeron 200 mg de NgsaC@GITQ-2 que se diluyeron con dióxido de silicio ($\text{SiO}_2 \geq 0.25 \mu\text{m}$). El reactor se calentó con una manta calefactora externa y el zumo se alimentó mediante una bomba perfusora. La temperatura se fijó a 50 °C para todos los experimentos, mientras que el tiempo de contacto se optimizó variando el caudal. Finalmente, el caudal se ajustó a 0,25 mL/h. Las muestras se extrajeron periódicamente y la cantidad de azúcares liberados se determinó mediante el método de Miller, este consiste en poner en contacto 250 μL de una disolución de ácido 3,5-dinitrosalicílico, con 250 μL de muestra y se calientan a 100 °C durante 5 min, y tras enfriar se añaden 2,5 mL de agua MilliQ. Por último, se mide la absorbancia a una longitud de onda de $\lambda = 540 \text{ nm}$, la concentración de azúcares liberados se calculó mediante la ley de Lambert Beer. El calibrado previo se realizó con glucosa 0-20 mM. Para medir adecuadamente la cantidad de azúcares reductores presentes en el zumo, se realizó un estudio en el que el zumo natural de partida fue diluido en agua MilliQ hasta que se encontraron las condiciones óptimas de análisis, en este caso (100 μL de zumo se diluyen en 2900 μL de agua MilliQ), posteriormente esta disolución es analizada según el método de Miller.

Los parámetros del reactor en continuo se determinaron aplicando la Ecuación 3. 2 para obtener la velocidad espacial y a continuación la Ecuación 3. 3 para obtener los valores de tiempo de contacto (h).

$$\text{Velocidad espacial} \left(\frac{1}{h} \right) = \frac{g_{\text{reactivo limitante}}}{g_{\text{catalizador}}}$$

Ecuación 3. 2

$$\text{Tiempo de contacto (h)} = \frac{1}{\text{velocidad espacial}}$$

Ecuación 3. 3

Una vez calculada la velocidad espacial del proceso en continuo, la inversa de este valor nos da el tiempo de contacto (h) correspondiente, a cada flujo estudiado para el reactor, Figura 3. 24.

3.4.5.9 Determinación de la capacidad antioxidante.

La determinación de la actividad antioxidante del zumo de pomelo antes y después del tratamiento enzimático se realizó siguiendo el método descrito según Dumbrava y col.¹⁴¹ Para ello, 2 mL de una disolución de 2,2-difenil-1-picrilhidilo (DPPH) en metanol al 80 % (0,1 mM) se mezcló con 1 mL de zumo (diluido 1 : 40 con agua). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se midió la absorbancia a una longitud de onda $\lambda = 517$ nm en un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 50 conc, utilizando agua como blanco. El ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) se utilizó como estándar para la calibración del método (0-120 μ M). Los valores de actividad antioxidante se expresaron como un % de inhibición por equivalente de Trolox (μ M).

En esta metodología el oxidante es el DPPH que presenta una absorbancia inicial a la longitud de onda de $\lambda = 517$ nm mientras que el Trolox actúa de agente antioxidante de manera que al aumentar la concentración de Trolox se obtiene una recta de calibración como muestra la Figura 3. 27.

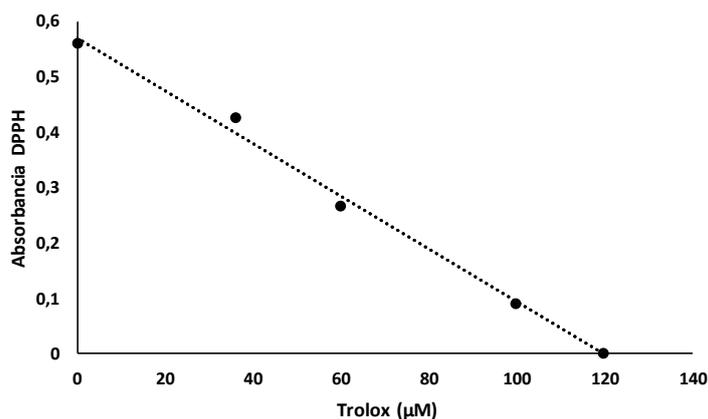


Figura 3. 27. Absorbancia del DPPH frente a distintas concentraciones de Trolox.

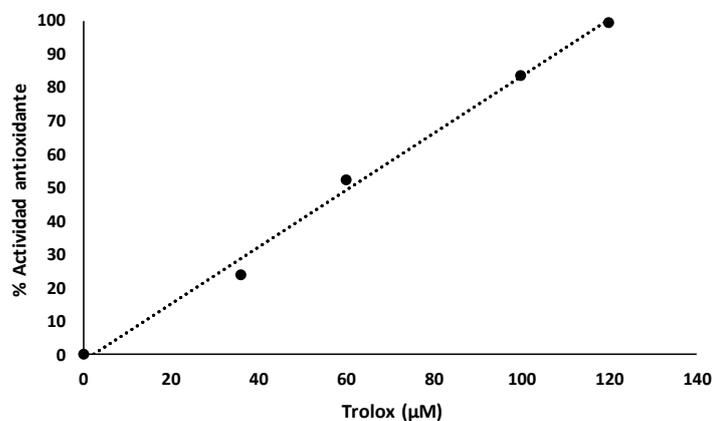


Figura 3. 28. Capacidad antioxidante frente distintas concentraciones de Trolox.

Posteriormente se realiza una recta de calibración en la que representamos la capacidad antioxidante (%) respecto a la cantidad de Trolox (Figura 3. 28). Esto permite realizar la curva de calibración que posteriormente se usa con la muestra problema de zumo.

3.4.6. Métodos analíticos para la caracterización de materiales.

El análisis de FTIR se registró con un IR Vertex Burker DTGS (Detector) y una celda de cuarzo convencional Quartz KR55 con las ventanas conectadas a un sistema de dosificación de vacío. Se prepararon pastillas autoconsistentes de las muestras de OG y OGR y se trataron a vacío (10^{-4} a 10^{-5} Pa) a 80 °C durante 45 min. Las muestras de ITQ-2, Beta nanocristalina y MCM-41 así como los materiales derivatizados con grupos amino y grupos aldehídos se trataron a vacío (10^{-4} a 10^{-5} Pa) a 200 °C durante 45 min.

Las imágenes de (AFM) se tomaron en un sistema MultiMode Nano-scope VIII (Veeco) con sonda de barrido. Las muestras para AFM se prepararon dejando caer una suspensión acuosa $\sim 0,04$ mg/mL de soporte sobre una superficie de mica fresca, el disolvente se evapora antes de la medida. Las imágenes TEM se obtuvieron utilizando un microscopio JEOL 2100F que operaba a 200 kV. Las muestras para microscopio electrónico de transmisión (TEM) se dispersaron por ultrasonidos en agua MilliQ y se transfirieron a rejillas de cobre recubiertas de carbono. Las imágenes de FESEM del soporte GITQ-2 se obtuvieron usando un FESEM Zeiss ultra 55. Las muestras se prepararon depositando el material sobre una cinta de carbono doble adhesiva y las imágenes se tomaron con el detector de electrones secundario utilizando una tensión de 1 kV.

Las áreas superficiales de los soportes se calcularon mediante el método de Brunauer-Emmet-Teller (BET) por medio de la adsorción de nitrógeno a -196 °C, utilizando un

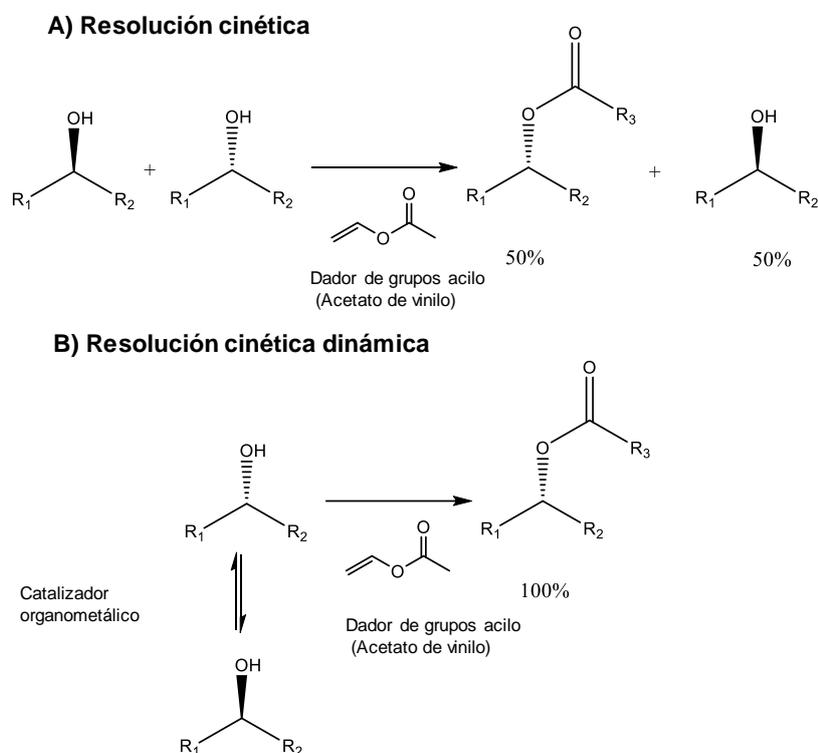
ASAP 2420 (V2.09 J). El análisis elemental se realizó en un Euro EA3000 Elemental Analyzer (EuroVector), utilizando sulfanilamida como referencia.

El potencial zeta de los soportes se midió mediante el análisis de 5 ppm de OG y OGR dispersados en una disolución de PBS (pH = 7, 100 mM) utilizando el Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., GB). Antes de las medidas del potencial, las muestras se sonicaron durante 5 minutos. El potencial zeta se obtuvo a partir de la movilidad electroforética mediante la ecuación de Smoluchowski, que fue de -8,96 mV y -7,89 mV para OG y OGR respectivamente.

Capítulo 4 Desracemización de alcoholes mediante un proceso redox quimioenzimático en reactores en continuo de lecho fijo

4.1. Introducción

Actualmente, uno de los mayores retos a los que se enfrenta la comunidad científica es la obtención de compuestos quirales de alta pureza. Esto se debe a que los compuestos ópticamente puros son de gran importancia para la industria farmacéutica y agroquímica.¹⁴² Particularmente los alcoholes quirales son intermedios valiosos en la industria farmacéutica. Por ejemplo, el (S) y (R)-2-octanol presentan gran cantidad de aplicaciones como precursores para la preparación de fármacos, agroquímicos, feromonas, etc.¹⁴³⁻¹⁴⁵ Otro ejemplo de estos compuestos lo constituye el (S)-2-pentanol que es un importante precursor para la síntesis de un gran número de medicamentos relacionados con el tratamiento del Alzheimer. Así pues, debido a la gran cantidad de aplicaciones que presentan estos compuestos se han desarrollado diversas estrategias para su síntesis¹⁴³⁻¹⁴⁷ (Esquema 4. 1).



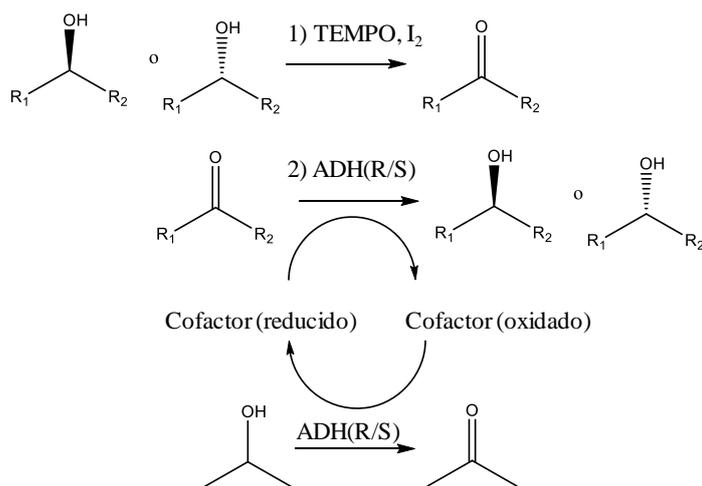
Esquema 4. 1. Estrategias para la síntesis de alcoholes quirales: (A) resolución cinética; (B) resolución cinética dinámica.

Una de las estrategias más utilizadas es la resolución cinética (RC) enzimática (Esquema 4. 1A). Esta consiste en la transesterificación enantioselectiva de uno de los alcoholes racémicos mediante el uso de una enzima, generalmente lipasas.^{148,149} Esta estrategia es muy eficiente en términos de selectividad, pero presenta una serie de problemas asociados como son la existencia de un rendimiento teórico máximo del 50 % debido al consumo de solo uno de los enantiómeros, y consecuentemente se requieren etapas de separación laboriosas para obtener el producto deseado.^{150,151}

Otra estrategia que mejora las limitaciones de la RC es la resolución cinética dinámica (RCD) (Esquema 4. 1B). En esta estrategia el enantiómero deseado es esterificado de la misma forma que en la estrategia anterior (mediante transesterificación enzimática), mientras que el enantiómero no deseado es racemizado mediante el uso de un catalizador metálico en forma homogénea o heterogénea que presenta centros activos de rutenio, rodio, iridio, aluminio o vanadio.^{152,153} Bajo esta estrategia el rendimiento teórico máximo de la reacción puede ser incrementado hasta el 100 %. Sin embargo, como se ha comentado en la introducción, la combinación de catalizadores químicos (orgánicos o inorgánicos) y enzimáticos no siempre es fácil. En este caso la temperatura necesaria

para producir la racemización, puede desactivar la enzima, mientras que la presencia de un grupo dador de acilo puede desactivar el catalizador químico. A su vez, la presencia de O_2 en el medio, generalmente desactiva la especie metálica, por lo tanto, es necesario trabajar en condiciones anaerobias.

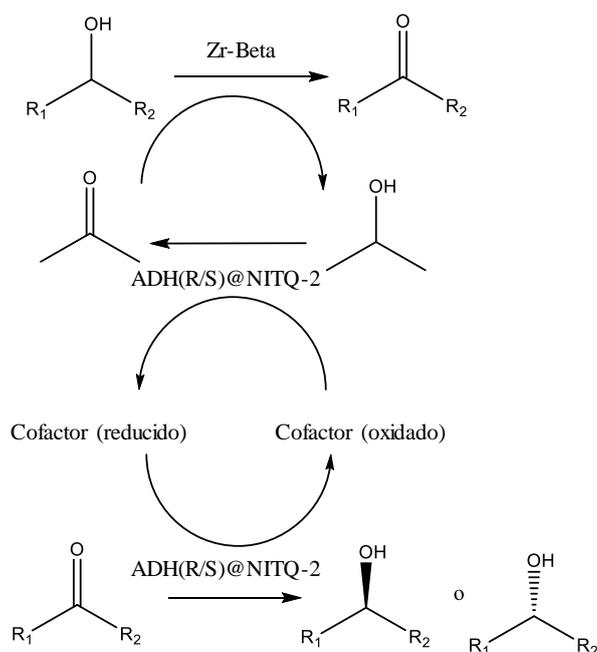
Otra estrategia para la síntesis de alcoholes quirales secundarios a partir de la mezcla racémica que ha atraído mucha atención se basa en la combinación de dos etapas una de oxidación del alcohol racémico con otra de reducción que usualmente se consiguen mediante combinaciones multienzimáticas.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Sin embargo, también es posible lograr una desracemización combinando una etapa de oxidación no selectiva (catalizador químico) de los alcoholes racémicos, con una reducción estereoselectiva (enzimática) de la cetona proquiral (Esquema 4. 2). Este protocolo ha sido comparativamente menos explorado, y generalmente se realiza utilizando sistemas catalíticos quimioenzimáticos homogéneos basados en la combinación de un oxidante como TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) o AZADO (2-azaadamantano N-oxilo) con biocatalizadores redox como las enzimas alcohol deshidrogenasas (ADH).¹⁵⁷⁻¹⁶⁰



Esquema 4. 2. Estrategia redox para la síntesis de alcoholes quirales mediante un sistema de oxidación-reducción.

Basado en el protocolo redox, y siguiendo con los objetivos de esta Tesis se ha desarrollado un proceso eficiente para obtener alcoholes quirales a partir de mezclas racémicas utilizando la combinación de un catalizador químico y uno enzimático. Para ello se han acoplado dos etapas en un proceso en continuo: la primera etapa consiste en la oxidación de una mezcla racémica de alcoholes secundarios en una cetona proquiral a través de la oxidación de Oppenauer usando zeolitas con centros ácidos de Lewis (zeolita Zr-Beta) como catalizador y acetona como aceptor de hidruros, seguida de la reducción estereoselectiva de la cetona proquiral al alcohol utilizando la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) inmovilizada en una zeolita bidimensional (ITQ-2) (Esquema 4. 3). Finalmente,

el alcohol que se forma como subproducto en la reacción de Oppenauer (isopropanol) reduce el cofactor cerrando el sistema con 100 % de economía atómica.



Esquema 4. 3. Estrategia propuesta para la síntesis de alcoholes quirales mediante un sistema de oxidación-reducción usando la zeolita Zr-Beta y la enzima ADH inmovilizada sobre una zeolita deslamada.

Esta estrategia permitiría obtener alcoholes ópticamente puros sin tener que aislar y purificar intermedios, reduciendo el número de pasos de separación con el consiguiente beneficio tanto medioambiental como económico.^{17,31}

La reducción Meerwein-Ponndorf-Verley (MPV) de aldehídos y cetonas y la reacción inversa de oxidación de alcoholes reacción de Oppenauer (MPVO) son herramientas valiosas en la síntesis orgánica, ya que son reacciones quimioselectivas que pueden realizarse bajo condiciones suaves de reacción. Básicamente, en la reacción de MPVO, un compuesto carbonílico se reduce a alcohol mientras que un alcohol se oxida al compuesto carbonílico correspondiente a través de un proceso de transferencia de hidruro. Tradicionalmente, los catalizadores utilizados en las reacciones de MPVO han sido los alcóxidos de aluminio. Sin embargo, la cantidad estequiométrica requerida del alcóxido, su sensibilidad al agua, junto con la necesidad de una etapa de neutralización al final de la reacción con generación de gran cantidad de residuos son desventajas importantes.

Por ello, en las últimas décadas se han desarrollado una variedad de catalizadores heterogéneos que se han aplicado con éxito en este proceso. Entre ellos, las zeolitas de Al y

Ti-Beta han mostrado ser excelentes catalizadores para esta reacción, demostrándose que los centros activos del catalizador son los ácidos de Lewis.¹⁶¹⁻¹⁶⁴ Posteriormente Corma y col. demostraron que las zeolitas Beta conteniendo centros Lewis de Sn y Zr-Beta eran catalizadores más activos que las zeolitas de Al y Ti-Beta para las reacciones de MPVO. Esto se atribuyó a una acidez de Lewis de los centros de Sn y Zr más adecuada para catalizar la reacción.^{58,59,165,166}

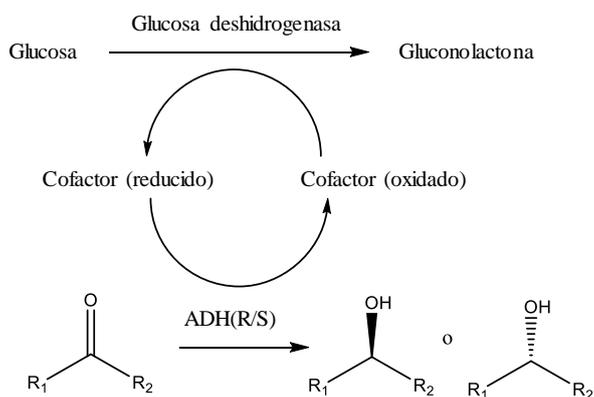
Un estudio computacional indica que el mecanismo de los catalizadores Sn-Beta y Zr-Beta es similar y consta de tres pasos: adsorción de la cetona y el alcohol en el centro Lewis, desprotonación del alcohol, transferencia de hidruro de carbono a carbono, transferencia de protones desde el catalizador y cambio de producto.

Las características excepcionales de las zeolitas Sn-Beta y Zr-Beta como catalizadores altamente activos y estables para la reacción de MPVO, nos llevaron a seleccionar la zeolita Zr-Beta como catalizador para llevar a cabo la oxidación de alcoholes racémicos en cetonas proquirales como el primer paso del proceso propuesto.

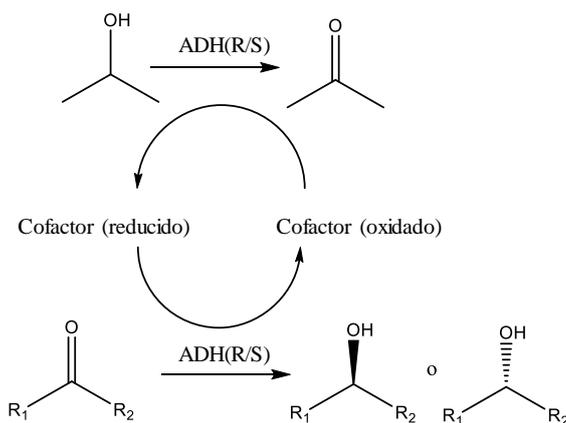
Por otro lado, para la segunda etapa del proceso se ha seleccionado una enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). Estas enzimas catalizan de forma reversible la reducción de aldehídos o cetonas a alcoholes primarios o secundarios, respectivamente. Actualmente se observa un creciente interés en el uso de estas enzimas en la producción de alcoholes quirales, hidroxilácidos o aminoácidos.^{167,168} Sin embargo, comparadas con las enzimas hidrolíticas como las lipasas, las enzimas ADH han sido considerablemente menos utilizadas en la producción de compuestos ópticamente activos. Esto se debe a que las enzimas ADH presentan una serie de limitaciones como son, la necesidad de cantidades estequiométricas de cofactores (NADH o NADPH) y su susceptibilidad a los disolventes orgánicos, lo que limita el uso de sustratos lipófilos poco solubles en medios acuosos. Por estas razones, las reducciones con enzimas ADH resultan solo económicamente factibles si es posible una regeneración eficiente del cofactor reducido.

Por lo tanto, en los últimos años se han investigado diversas estrategias para regenerar los cofactores y permitir el abaratamiento del proceso. Una de estas estrategias es el uso de ADH en combinación con otro sistema sustrato/enzima, en el que el cofactor es regenerado por otra enzima como por ejemplo la glucosa deshidrogenasa que actúa sobre glucosa como sustrato (Esquema 4. 4A). Sin embargo, actualmente uno de los métodos más económicos y accesibles para la regeneración del cofactor es mediante el uso de isopropanol como sustrato de la ADH (Esquema 4. 4B). Además, el uso de isopropanol presenta la ventaja que puede usarse como cosolvente para formar disoluciones homogéneas de sustratos orgánicos.¹⁶⁹⁻¹⁷¹

A) Regeneración del cofactor usando sistema bienzimático



B) Regeneración del cofactor usando isopropanol



Esquema 4. 4. Estrategias para la síntesis de alcoholes quirales mediante oxidoreductasas: (A) regeneración del cofactor usando un sistema bienzimático; (B) regeneración del cofactor usando isopropanol.

Por otro lado, la inmovilización de enzimas sobre soportes sólidos puede ser adaptada para aumentar su estabilidad y la cinética de la reacción enzimática,^{17,31} pero lo más importante desde el punto de vista industrial es que la inmovilización de la enzima permite su fácil separación de la mezcla de reacción, su reciclabilidad y la posibilidad de ser utilizada en procesos en continuo. Debido al gran interés de las enzimas ADH, estas han sido inmovilizadas sobre una variedad de soportes como glioxilagarosa,¹⁷² nanotubos de sílice,¹⁴⁷ nanopartículas magnéticas,^{173,174} nanopartículas de plata recubiertas de polianilina,¹⁷⁵ óxido de grafeno magnético¹⁷⁶ y más recientemente sobre soportes mesoporosos de sílice.¹⁷⁷

Como se ha comentado anteriormente en el Capítulo 3. Obtención selectiva de los flavonoides cítricos Prunina y Naringenina mediante hidrólisis enzimática de Naringina de esta Tesis Doctoral, cuando se realiza la inmovilización enzimática sobre materiales mesoporosos y dependiendo del tamaño de la enzima, se pueden producir problemas de difusión del cofactor y/o del sustrato a través del sistema de poros del soporte, lo que limita el transporte de masa y afecta a la actividad catalítica. Por ello, en este estudio se ha seleccionado como soporte para la inmovilización de la enzima ADH, la zeolita laminar pura sílice (ITQ-2). Como se ha descrito en la introducción de esta Tesis la zeolita ITQ-2 es un material cristalino altamente estable en medios acuosos que está formada por finas láminas que contienen grupos de silanoles distribuidos regularmente y una alta área de superficie externa ($\sim 600 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$). En las láminas de la zeolita ITQ-2, la enzima podría interactuar fácilmente y no se esperarían problemas de difusión entre el cofactor y el sustrato. La gran superficie externa de la zeolita ITQ-2 junto con su alta estabilidad en medios acuosos, convierte este material en un posible soporte enzimático excelente y estable para biotransformaciones industriales.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, en este estudio se propone un proceso en cascada para producir alcoholes quirales secundarios a partir de mezclas racémicas mediante un proceso en continuo. En este proceso, en un primer reactor de lecho fijo, la mezcla racémica de alcohol se oxida a una cetona proquiral a través de una reacción de transferencia de hidruro, la oxidación de Oppenauer, utilizando acetona como aceptor de hidruro y zeolita Zr-Beta como catalizador ácido de Lewis. En esta reacción, el isopropanol se produce como subproducto. La mezcla de la cetona proquiral y el isopropanol, tras ajustar la cantidad de isopropanol y cofactor (NADH o NADPH), se introduce en un segundo reactor de lecho fijo que contiene la enzima ADH (R o S) inmovilizada electrostáticamente sobre la zeolita ITQ-2, donde se produciría la reducción estereoselectiva de la cetona.

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Caracterización del soporte NITQ-2

La estrategia de inmovilización enzimática elegida en este capítulo, fue la inmovilización electrostática. Para ello se seleccionó la zeolita bidimensional ITQ-2 pura sílice, que fue derivatizada mediante un tratamiento con 3-aminopropiltrióxido de silano (3-APS), obteniéndose un material con grupos amino en la superficie. Como puede observarse en el Figura 4. 1 la superficie de la zeolita queda recubierta de grupos amino primarios a través de los cuales puede inmovilizarse la enzima ADH mediante interacciones electrostáticas.

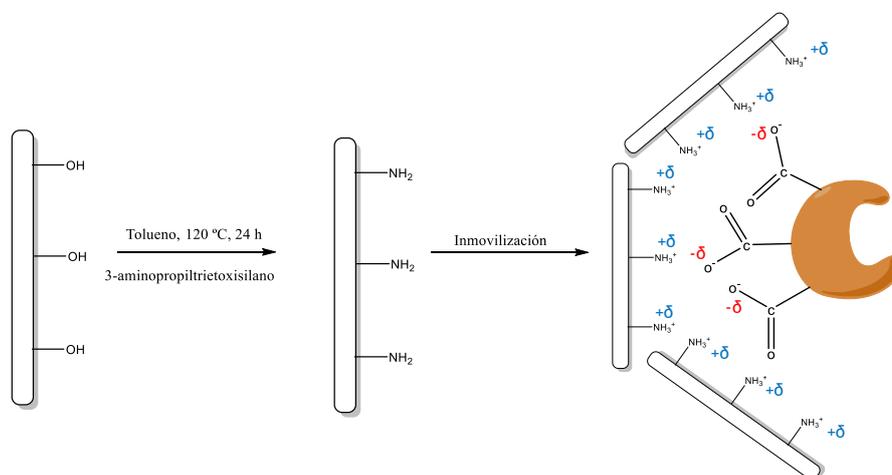


Figura 4. 1. Estrategia de inmovilización electrostática.

El material empleado para la inmovilización enzimática fue caracterizado por análisis químico (Tabla 4. 1) y espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR), (Figura 4. 2). El análisis químico mostró que después de la derivatización, el material NITQ-2 presenta una cantidad de nitrógeno de aproximadamente (2,5 % en peso), que corresponde con a 1,8 mmol de nitrógeno/g NITQ-2, así como mayor cantidad de carbono asociado a los grupos alquilo de la cadena de 3-APS.

Tabla 4. 1. Análisis elemental del soporte.

Material	N (%)	H (%)	C (%)
ITQ-2	-	0,92	0,31
N-ITQ2	2,5	2,21	9,96

Mientras que en el análisis espectroscópico FTIR (Figura 4. 2) y tal como se ha mostrado en el Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral, se puede observar como las bandas de vibración características de los grupos silanol (Si-OH) a 3741 cm^{-1} , presentes en la zeolita ITQ-2 se ven disminuidas después del proceso de derivatización con 3-APS. A su vez, las bandas de vibración asociadas a los grupos amino primarios en la superficie del material NITQ-2 son observables a 1660 cm^{-1} , y a 3425 cm^{-1} . También se observan, las bandas de vibración asociadas a los grupos alquilo de la estructura del 3-APS a 2977 , 2931 y 2865 cm^{-1} . De esta manera queda demostrada la presencia de grupos amino primarios en la superficie del material NITQ-2.

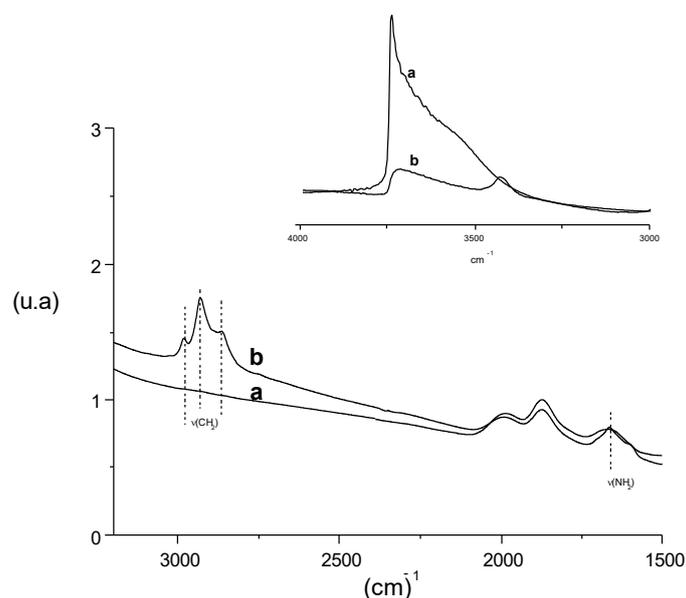


Figura 4. 2. Espectroscopia de infrarrojos (FTIR) de la zeolita: (a) ITQ-2 pura sílice; (b) NITQ-2.

La variación del área superficial del material tras la modificación se determinó mediante absorción de nitrógeno (BET). Inicialmente el material ITQ-2 presenta un área superficial de $756 \text{ m}^2/\text{g}$ y tras su derivatización el material resultante NITQ-2, presenta un área superficial de $387 \text{ m}^2/\text{g}$, demostrando que el material todavía presenta una alta área superficial donde la enzima puede ser anclada.

4.2.2. Inmovilización enzimática y estudio de las propiedades catalíticas del biocatalizador

4.2.2.1 Condiciones de inmovilización y cinéticas de reacción

Como se ha explicado en la introducción, para realizar una inmovilización electrostática de una enzima sobre un soporte se requiere conocer el punto isoeléctrico (PI) de la proteína y del material. De esta manera se puede seleccionar el valor de pH de inmovilización adecuado en el que la carga eléctrica de la proteína y del soporte serán complementarias.

Con este objetivo se realizó la determinación del punto isoeléctrico de la proteína de acuerdo con la metodología empleada por Serpa y col.¹⁷⁸ (Sección experimental). Esta metodología se basa en que la solubilidad de la proteína será mínima cuando el valor de pH sea el mismo que el punto isoeléctrico de la misma. Así pues, se sometió a la enzima ADH(S) a valores de pH entre 3 a 7, durante 1 hora a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. A continuación, se centrifugó se retiró el sobrenadante y por último se secó la proteína precipitada a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24

h. El punto isoeléctrico se determinó por pesada de la proteína precipitada y se observó que la cantidad de proteína máxima precipitaba a un pH aproximado de 4,5 indicando que este era el PI de la ADH.

Por otro lado, y de acuerdo con la bibliografía existente¹⁷⁷ los soportes silíceos amino-propilados tienen un PI en la zona de pH básico, por lo que se seleccionó un pH=5,5 para llevar a cabo la inmovilización electrostática.

Una vez seleccionado el valor de pH adecuado para realizar la inmovilización electrostática esta se llevó a cabo poniendo en contacto la enzima ADH(S o R) con el material (NITQ-2) en un tampón fosfato pH = 5,5 (100 mM), durante 24 h bajo agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, el biocatalizador obtenido se lavó hasta que no se observó proteína en el lavado. La cantidad de enzima presente en disolución y en los lavados se determinó mediante la prueba del ácido bicinconínico (Sección experimental). Para determinar las propiedades catalíticas de la enzima ADH inmovilizada sobre NITQ-2, se seleccionó como reacción modelo la reducción de 2-octanona a (S)-2-octanol.

En primer lugar, se estudió el efecto de la carga de enzima sobre la actividad catalítica variando la relación enzima/soporte (Tabla 4. 2). Como se puede observar cuando la relación enzima/soporte (mg/mg) se duplica (entrada A y B), la cantidad de enzima inmovilizada disminuye desde 86 % (entrada A) hasta 75 % (entrada B). Cuando la relación enzima/soporte (entrada C) se reduce la cantidad de enzima inmovilizada es del 100 %.

Tabla 4. 2. Condiciones de inmovilización de la enzima ADH(S) en la zeolita NITQ-2 y actividad catalítica en la reducción de 2-octanona.

Condiciones	Enzima(mg)	NITQ2 (mg)	Enzima inmovilizada (mg)	Velocidad de reacción (μmol/min)
A	10	200	8,6	33,5
B	10	100	7,5	29,1
C	2,5	100	2,5	11,4

Condiciones de inmovilización: (A) 200 mg NITQ-2, 10 mg ADH(S), 5 mL tampón fosfato pH = 5,5 (100 mM); (B) 100 mg NITQ-2, 10 mg ADH(S), 5 mL tampón fosfato pH = 5,5 (100 mM); (C) 100 mg NITQ-2, 2,5 mg ADH(S), 5 mL tampón fosfato pH = 5,5 (100 mM).

Cuando se estudió la actividad catalítica de estos materiales en la reducción de 2-octanona (Figura 4. 3) se observó que con las muestras A y B se obtienen resultados similares, alcanzándose una conversión total de la cetona en 30 min de reacción. Estos resultados indican que existe un intervalo de carga de enzima (entre 0,05 y 0,1 g de enzima por gramo de soporte) para el cual el derivado enzimático mantiene una excelente actividad. Cuando la relación enzima/soporte se disminuyó aún más, y tal como se esperaba, (condiciones C) la velocidad de reacción disminuyó, pero la conversión fue

prácticamente completa después de 90 min de reacción. De acuerdo con estos resultados se seleccionó la muestra preparada en las condiciones (A), es decir preparada con 10 mg de ADH y 200 mg NITQ-2 para llevar a cabo los siguientes experimentos.

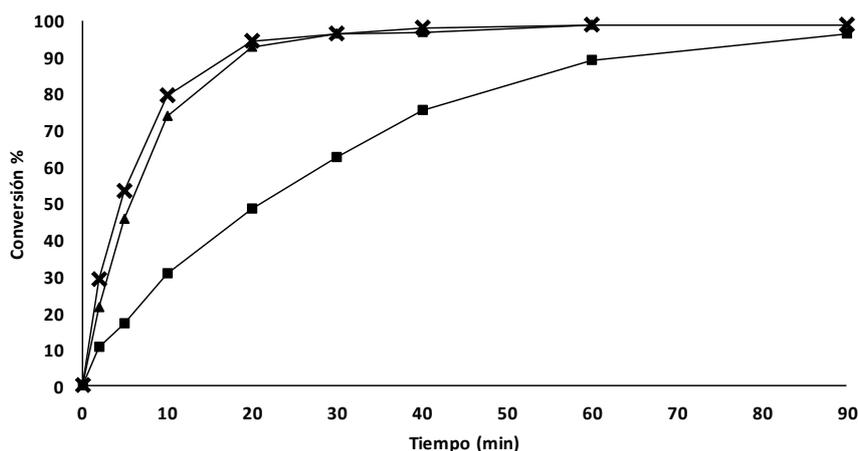


Figura 4. 3. Reducción de 2-octanona en (S)-2-octanol: (▲) ADH(S)7,5mg@NITQ-2, (■) ADH(S)2,5mg@NITQ-2 y (✕) ADH(S)8,6mg@NITQ-2. Condiciones de reacción: 2-octanona (0,3 mmol), 10 mL de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v), NAD⁺ (0,03 mmol).

La actividad recuperada del derivado enzimático obtenido bajo las condiciones A (ADH(S)@NITQ-2), se determinó de acuerdo con los estudios realizados por Sheldon y col.¹⁴⁰ La actividad recuperada se define como la relación entre la totalidad de la enzima utilizada en la inmovilización (enzima libre) y la actividad del derivado enzimático (ADH(S)@NITQ-2), después del proceso de inmovilización.

La actividad recuperada para el derivado enzimático fue del 80 % lo que está de acuerdo con la cantidad calculada de enzima inmovilizada que fue del 86 %.

4.2.2.2 Influencia de la variación del pH y la Temperatura en la actividad enzimática

Para determinar las propiedades catalíticas del derivado enzimático ADH(S)@NITQ-2 obtenido bajo las condiciones A de inmovilización (Tabla 4. 2), la reacción de reducción de la 2-octanona fue estudiada bajo diferentes valores de pH y temperatura.

El efecto del pH en la conversión de la 2-octanona, fue estudiado en presencia de la enzima libre e inmovilizada llevando a cabo la reacción en un intervalo de valores de pH entre 5,5 y 10.

Como se observa en la Figura 4. 4, la conversión de la 2-octanona fue mayor tanto en la forma libre como en la inmovilizada cuando el valor de pH de reacción fue 7, mientras que tanto a valores más ácidos (5,5) como básicos (10), la conversión fue menor. Sin

embargo, el biocatalizador ADH(S)@NITQ-2 mostró mayor resistencia a los cambios de pH que la enzima en forma libre. Esto indica que la distribución de protones que rodea el centro activo de la proteína debe haberse modificado tras la inmovilización, protegiendo a la enzima de la desactivación enzimática.

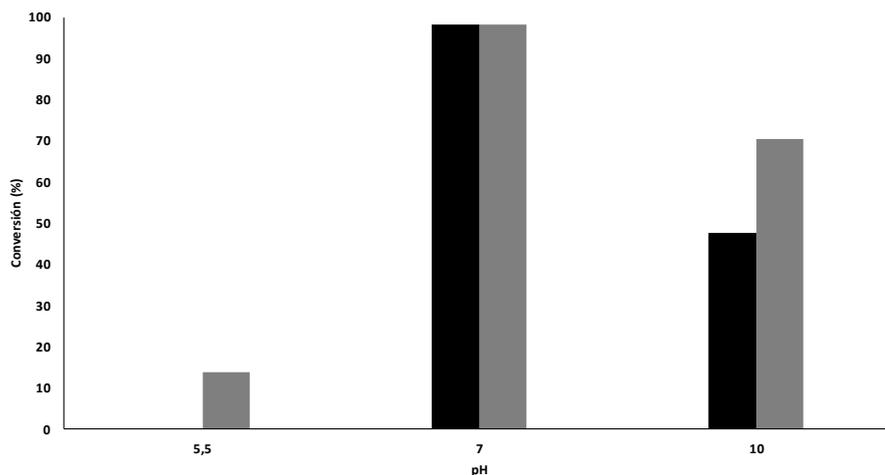


Figura 4. 4. Efecto del pH en la conversión de 2-octanona en (S)-2-octanol utilizando: (■) ADH(S) libre y (▒) ADH(S)@NITQ-2. Condiciones de reacción: 2-octanona (0,3 mmol), 10 mL de tampón fosfato pH = 5,5-10 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v), NAD⁺ (0,03 mmol), ADH(S)@NITQ-2 o ADH(S).

Por otro lado, la estabilidad térmica de la ADH(S) en forma libre e inmovilizada fue determinada en un rango de temperaturas de 25-55 °C. Para ello el derivado enzimático ADH(S)@NITQ-2 o la enzima ADH(S) en su forma libre, se sometió a un rango de temperaturas de 25 a 55 °C durante 1 h, a pH = 7 y a continuación se llevó a cabo la reducción de 2-octanona durante 1 h. Como puede observarse en la Figura 4. 5, la conversión enzimática de 2-octanona se ve claramente disminuida con el aumento de la temperatura. Sin embargo, el biocatalizador ADH(S)@NITQ-2 mostró mayor resistencia a la temperatura que la enzima libre tanto a 35 °C como a 55 °C, observándose que la enzima en forma libre se desactiva completamente a 55 °C. Así pues, se muestra que la inmovilización enzimática utilizando el soporte NITQ-2 mejora la estabilidad térmica de la enzima ADH(S).¹⁷⁶ Sin embargo, estos resultados muestran que para el uso práctico de ADH(S)@NITQ-2 la temperatura del proceso no debe sobrepasar los 25 °C.

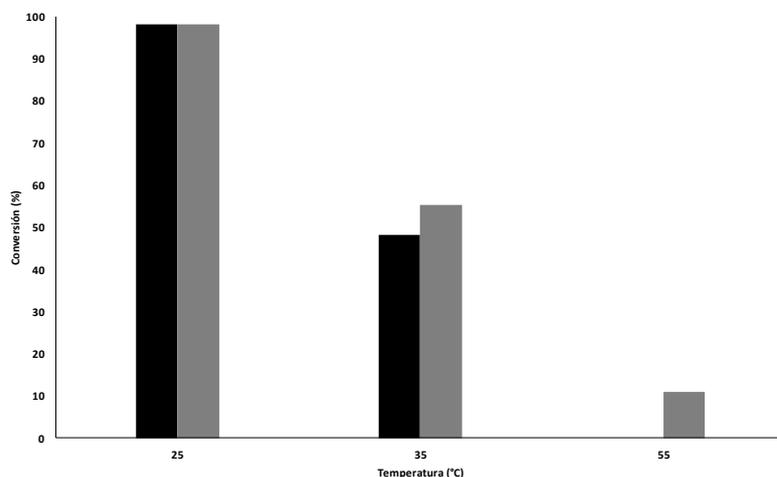
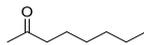
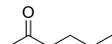
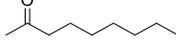
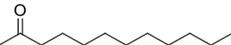
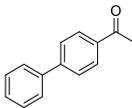


Figura 4. 5. Efecto de la temperatura en la conversión de 2-octanona a (S)-2-octanol en presencia de: (■) ADH(S) libre y (▒) ADH(S)@NITQ-2. Condiciones de reacción: 2-octanona (0,3 mmol), 10 mL de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v), NAD⁺ (0,03 mmol), ADH(S)@NITQ-2 o ADH(S).

4.2.2.3 Aplicabilidad catalítica

La generalidad del proceso se estudió utilizando diferentes metilcetonas lineales con cadenas hidrocarbonadas entre 5 y 12 carbonos (entradas 1-5, Tabla 4. 3), con sustituyentes ciclohexilo (entrada 6, Tabla 4. 3) y con anillos aromáticos (entrada 7, Tabla 4. 3) en las condiciones descritas previamente. Como se puede observar en la Tabla 4. 3 se obtuvieron en todos los casos excelentes rendimientos a los correspondientes alcoholes quirales (S) o (R) con excesos enantioméricos > 99 %, mostrando la generalidad del catalizador ADH@NITQ-2.

Tabla 4. 3. Aplicabilidad de ADH(S o R)@NITQ-2 en la reducción enzimática de distintas cetonas.

Entrada	Reactivo	ADH	tiempo (h)	Conversión (Selectividad) (%)	ee (%)
1		S	1	99 (100)	>99
			6,5	98 (100)	>99
2		S	1,5	89 (100)	>99
			2	99 (100)	>99
3		S	1	99 (100)	>99
4		S	1,5	99 (100)	>99
5		S	1,5	99 (100)	>99
6		S	2	56 (100)	>99
			4	98 (100)	>99
7		S	2	89 (100)	>99
			4	95 (100)	>99

Condiciones: ADH(S)@NITQ-2 (209 mg), cetona (0,3 mmol), 10 mL de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v), NAD⁺ (0,03 mmol); ^a Cuando se utilizó ADH(R)@NITQ-2 (209 mg), cetona (0,3 mmol), 10 mL tampón fosfato pH = 7 (100 mM) (1 mM MgCl₂)/Isopropanol (50/50 v/v), NADP⁺ (0,03 mmol).

Teniendo en cuenta los excelentes resultados obtenidos en el reactor discontinuo, y siguiendo los objetivos de esta Tesis se continuó con el estudio de la reducción de 2-octanona en reactor de lecho fijo utilizando el biocatalizador ADH(S)@NITQ-2.

4.2.2.4 Obtención de (S)-2-octanol en reactor continuo en lecho fijo. Estudio del tiempo de contacto y estabilidad temporal

Los experimentos en continuo se llevaron a cabo en un reactor de lecho fijo que contenía 209 mg del biocatalizador ADH(S)@NITQ-2 diluido con aproximadamente 1,8 g de dióxido de silicio. El reactor se alimentó con 2-octanona y el cofactor en una relación molar sustrato/cofactor = 10, utilizando como disolvente una mezcla de 10 mL de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v). La temperatura se fijó a

temperatura ambiente y se evaluó el tiempo de contacto variando la concentración de sustrato y manteniendo el flujo constante a 0,55 mL/h. Como se puede observar en la Tabla 4. 4 y Figura 4. 6 la conversión fue del 90 % utilizando un tiempo de contacto entre 4-1,3 h. Sin embargo, cuando el tiempo de contacto se disminuyó por debajo de 1 h, la conversión disminuyó hasta un 54 %. Como se puede observar, en todos los experimentos la selectividad a (S)-2-octanol fue del 100 %.

Tabla 4. 4. Resultados del estudio del tiempo de contacto en la obtención del (S)-2-octanol en presencia de ADH(S)@NITQ-2.

2-octanona mmol/L	TC (h)	(%) Conversión (Selectividad)
30	4,0	97 (100)
60	2,0	96 (100)
94	1,3	90 (100)
114	1,1	85 (100)
160	0,8	54 (100)

Condiciones de reacción: ADH(S)@NITQ-2 (209 mg), 10 mL de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v), relación molar cetona/(NAD⁺) = 10, flujo 0,55 mL/h.

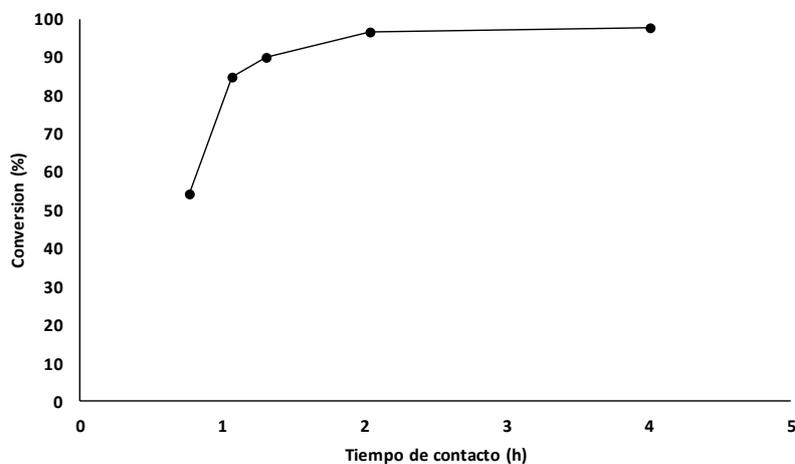


Figura 4. 6. Estudio del tiempo de contacto en un reactor de lecho fijo para la obtención de S-2-octanol; Condiciones de reacción: ADH(S)@NITQ-2 (209 mg), 10 mL de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v), relación molar cetona/(NAD⁺) = 10, flujo 0,55 mL/h.

Para estudiar la estabilidad del catalizador se seleccionó un tiempo de contacto de 4 h. Como se puede observar en la Figura 4. 7, la conversión de 2-octanona (98 %) se

mantuvo durante 100 h de operación manteniéndose también la enantioselectividad a (S)-2-octanol en un 99 %. Estos resultados muestran que la desactivación del catalizador no tiene lugar o es muy lenta. De hecho, el reactor se mantuvo operando durante 16 días sin observarse desactivación del sistema catalítico ni pérdida de selectividad mostrando el gran potencial que presenta este biocatalizador. Señalar que se obtuvieron resultados similares en la reducción de la 2-octanona utilizando el biocatalizador ADH(R)@NITQ-2 dando lugar al (R)-2-octanol con excelente enantioselectividad > 99 %.

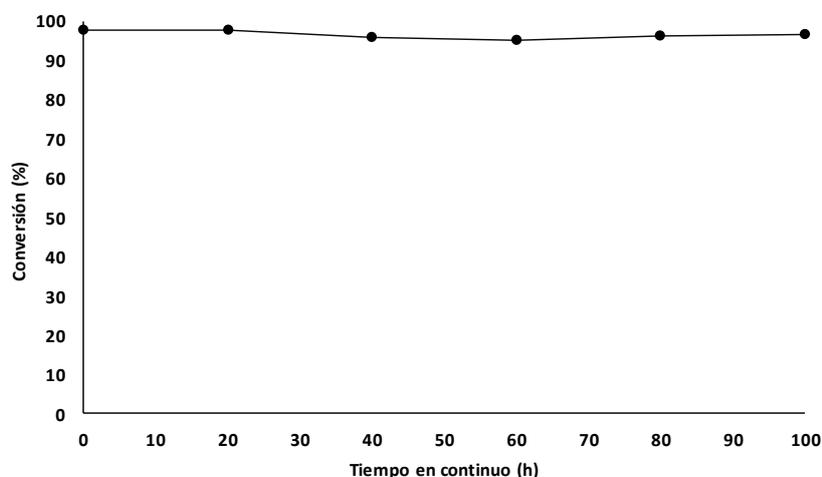


Figura 4. 7. Estudio de la estabilidad temporal del biocatalizador en la conversión de la 2-octanona a (S)-2-octanol en presencia de ADH(S)@NITQ-2. Condiciones de reacción: ADH(S)@NITQ-2 (209 mg), 10 mL de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v), 2-octanona 30 mmol/L, relación molar cetona/(NAD⁺) = 10, flujo 0,55 mL/h.

4.2.3. Estudio de la etapa de oxidación

4.2.3.1 Oxidación del 2-octanol racémico en presencia de la zeolita Zr-Beta

Hasta ahora se ha mostrado que la enzima ADH inmovilizada sobre NITQ-2 es un biocatalizador activo y estable para llevar a cabo la reducción enantioselectiva de cetonas proquirales en los correspondientes alcoholes enantioméricamente puros. Por ello, y siguiendo los objetivos de esta Tesis, el siguiente paso fue estudiar la posibilidad de oxidar mezclas racémicas de alcoholes en cetonas proquirales mediante la oxidación de Oppenauer utilizando la zeolita Zr-Beta como catalizador ácido de Lewis. Para ello se seleccionó primero la oxidación de 2-octanol utilizando un exceso de acetona como aceptor de hidruro como reacción modelo.

La reacción se llevó a cabo en un reactor discontinuo a 50 °C en presencia de la zeolita Zr-Beta como catalizador. Como se puede observar en la Figura 4. 8, el catalizador es

activo y capaz de llevar a cabo la oxidación selectivamente alcanzándose prácticamente una conversión total del 2-octanol racémico con una selectividad del 100 % a 2-octanona.

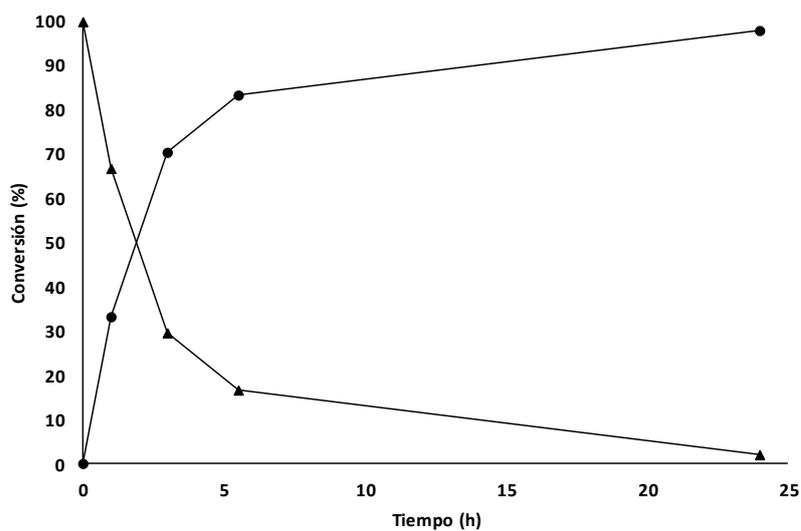
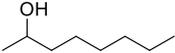
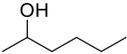
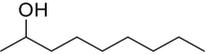
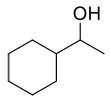
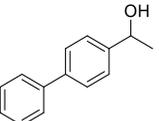


Figura 4. 8. Oxidación de 2-octanol racémico en 2-octanona en presencia de la zeolita Zr-Beta; (▲) 2-octanol y (●) 2-octanona. Condiciones de reacción: Zr-Beta (32 mg), 2-octanol (0,4 mmol), acetona (1,5 mL, 20,4 mmol), 50 °C.

4.2.3.2 Aplicabilidad catalítica de la zeolita Zr-Beta en la oxidación de alcoholes

Con el objetivo de mostrar la aplicabilidad de este sistema catalítico, se llevó a cabo la etapa de oxidación con diferentes alcoholes racémicos utilizando la zeolita Zr-Beta como catalizador.

Tabla 4. 5. Estudio de la oxidación en distintos alcoholes racémicos en presencia de la zeolita Zr-Beta

Entrada	Reactivo	Conversión (Selectividad) (%)
1		99 (100) ^a
2		98 (100) ^b
3		94 (100) ^b
4		99 (100) ^a
5		99 (100) ^a
6		96 (100) ^b
7		99 (100) ^b

Condiciones de reacción: ^a Zr-Beta (32 mg), alcohol (0,4 mmol), acetona (1,5 mL, 20,4 mmol), 50 °C, 20 h; ^b 80 °C.

Como se observa en la Tabla 4. 5, todos los alcoholes seleccionados fueron oxidados con éxito en presencia de Zr-Beta, obteniendo más de un 90 % de conversión del alcohol y 100 % de selectividad a las cetonas correspondientes.

Sin embargo, y dependiendo de la estructura del alcohol racémico, fue necesario ajustar la temperatura de reacción con objeto de alcanzar una conversión completa del alcohol.

Dados los excelentes resultados obtenidos en la oxidación de 2-octanol en reactor discontinuo a continuación se prosiguió con el estudio de la oxidación del alcohol racémico en un reactor de lecho fijo en continuo.

4.2.3.3 Estudio de la oxidación del alcohol racémico 2-octanol en un reactor de lecho fijo. Determinación del tiempo de contacto y estabilidad temporal

Para los experimentos en lecho fijo se introdujo una mezcla del catalizador Zr-Beta (304 mg) diluido con aproximadamente 1,7 g de dióxido de silicio. El reactor se alimentó con una mezcla de 2-octanol racémico disuelto en acetona mediante una bomba peristáltica con un flujo de 0,5 mL/h y la temperatura se fijó a 50 °C. En estas condiciones se evaluó el tiempo de contacto variando la concentración del alcohol en la alimentación. Como se puede observar en la Tabla 4. 6 y en la Figura 4. 9, cuando el tiempo de contacto fue de 25 h, la conversión del 2-octanol fue aproximadamente de 98 % y la selectividad a 2-octanona se mantuvo constante en un 100 % . Sin embargo, cuando el tiempo de contacto se disminuyó a 5 h, la conversión del 2-octanol descendió a 86 %.

Tabla 4. 6. Estudio del tiempo de contacto (h) en la oxidación de 2-octanol utilizando Zr-Beta a 50 °C.

2-octanol (mmol/L)	TC (h)	Conversión (%) (Selectividad)
93	50	98 (100)
191	25	98 (100)
294	16	97 (100)
392	12	95 (100)
915	5	86 (100)

Para evaluar la estabilidad del catalizador, y utilizando un tiempo de contacto de 25 h, el reactor se mantuvo trabajando en continuo durante 100 h de reacción. Como se observa en la Figura 4. 10, el catalizador Zr-Beta se mantuvo estable durante las 100 h de reacción que duró la experiencia, siendo la conversión del 2-octanol 98 %, manteniéndose la selectividad a 2-octanona en el 100 %.

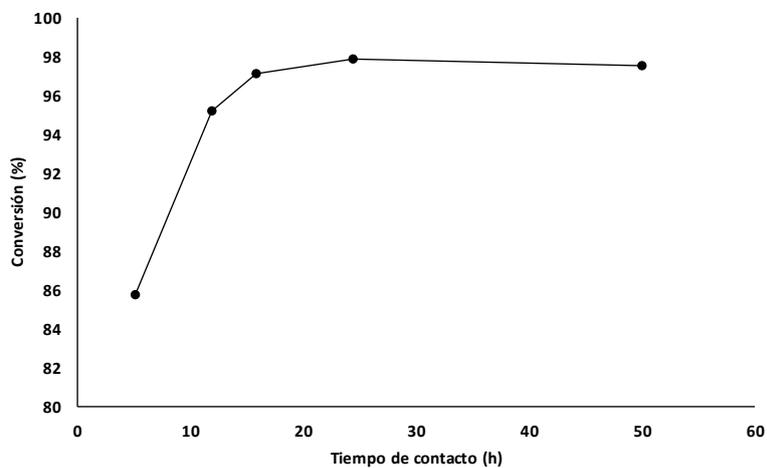


Figura 4. 9. Estudio del tiempo de contacto en la oxidación del alcohol racémico 2-octanol; Condiciones de reacción: Zr-Beta (304 mg), 2-octanol, acetona (10 mL, 136 mmol), 50 °C, flujo 0,5 mL/h.

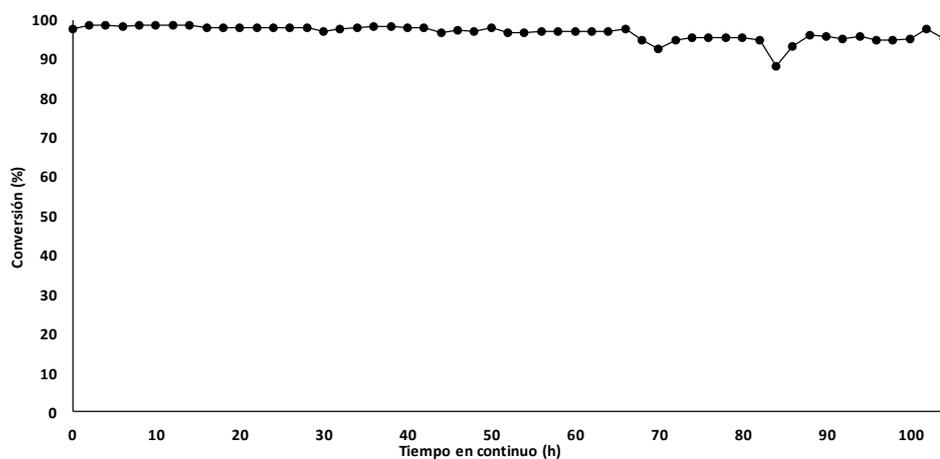


Figura 4. 10. Estudio de la estabilidad temporal de la zeolita Zr-Beta en la oxidación de 2-octanol; Condiciones de reacción: Zr-Beta (304 mg), 2-octanol (191 mmol/L), 50 °C, flujo 0,5 mL/h.

4.2.4. Diseño del proceso industrial mediante combinación de reactores de oxidación y reducción

Una vez optimizadas las condiciones de reacción por separado para ambos reactores de lecho fijo, a continuación, se procedió a acoplar ambas etapas con el objetivo de obtener el proceso quimioenzimático en continuo con dos lechos catalíticos (Esquema 4. 3).

Para ello, en un primer reactor que contenía la zeolita Zr-Beta se alimentó con una solución de 2-octanol racémico (191 mmol/L) utilizando el tiempo de contacto de 25 h, y manteniendo la temperatura a 50 °C. A la disolución obtenida a la salida del primer reactor, conteniendo la 2-octanona e isopropanol, se le ajustó la cantidad necesaria de cofactor y disolvente tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v) y se alimentó el segundo reactor que contenía el biocatalizador ADH(S)@NITQ-2. El segundo reactor se mantuvo a 25 °C y el tiempo de contacto fue de 4 h. Sin embargo, bajo estas condiciones la reducción de 2-octanona fue de 70 % (Tabla 4. 7, entrada C). Este resultado fue atribuido al exceso de acetona en la alimentación, cuya reducción compite con la reducción de 2-octanona. Con objeto de comprobar esta hipótesis, se realizaron experimentos adicionales donde la acetona fue parcialmente o totalmente extraída de la alimentación antes de ser introducida en el segundo reactor. Como se puede observar en la Tabla 4. 7, cuando se reduce la cantidad de acetona o se elimina totalmente de la alimentación pudo alcanzarse hasta un 96 % de conversión con un 99 % de selectividad al (S)-2-octanol. Además, y de acuerdo con los resultados presentados anteriormente (Figura 4. 7), la actividad catalítica se mantuvo al menos 40 h sin observarse desactivación del catalizador.

Tabla 4. 7. Efecto de la cantidad de acetona en la etapa de reducción.

Condiciones	Acetona (% volumen)	Conversión (%)
A	-	96
B	8	79
C	16	70

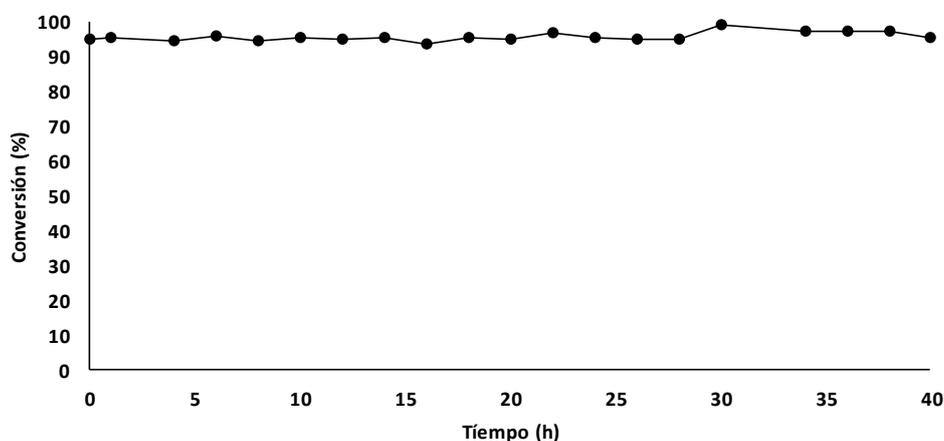


Figura 4. 11. Combinación de los reactores de oxidación de 2-octanol y reducción de la 2-octanona para la obtención de (S)-2-octanol.

Estos resultados muestran que es posible acoplar ambas etapas (oxidación de alcoholes racémicos con la reducción de la cetona proquiral intermedia) en un proceso continuo. Ya que la eliminación del exceso de acetona después de la primera etapa es necesaria se propone la utilización de un sistema de evaporación instantánea (flash evaporation) después del primer reactor de oxidación. Esto puede ser factible sin pérdida del isopropanol producido en la etapa de oxidación, ya que la acetona tiene un punto de ebullición (56 °C) muy inferior al del isopropanol (82,5 °C). Además, la acetona podría ser reutilizada de nuevo en la primera etapa del proceso. El sistema de reacción integrado se esquematiza en la Figura 4. 12.

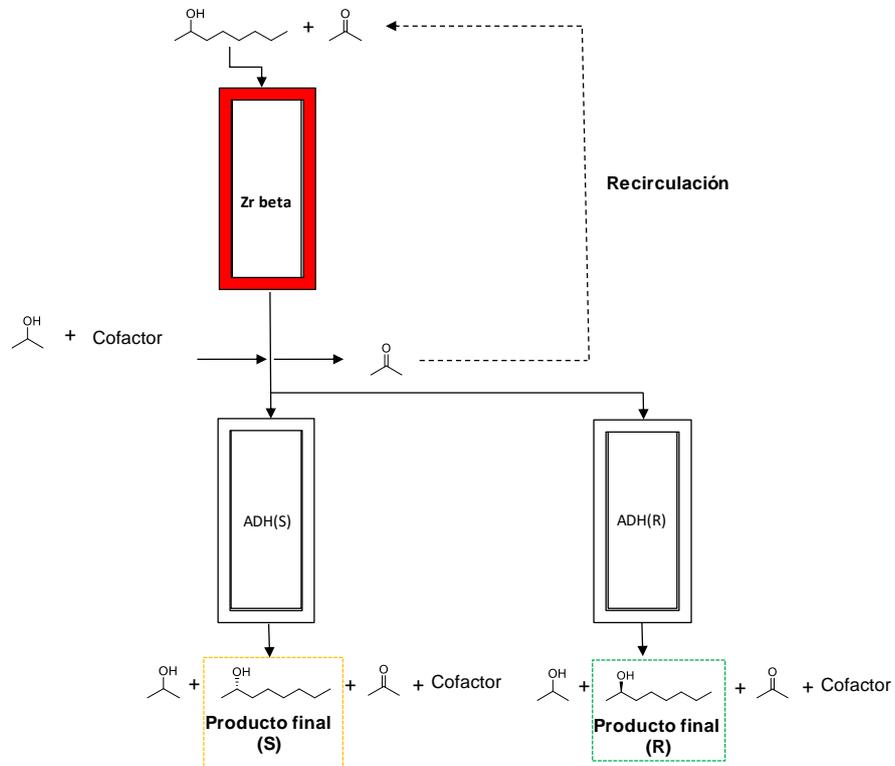


Figura 4. 12. Esquema de la síntesis a escala industrial propuesta para la obtención de alcoholes quirales mediante un proceso quimioenzimático.

4.3. Conclusiones parciales

Se ha llevado a cabo con éxito la desracemización de alcoholes secundarios mediante un proceso redox quimioenzimático que combina una primera etapa de oxidación del alcohol racémico mediante la reacción de Oppenauer catalizada por zeolitas con centros ácidos de Lewis, y una segunda etapa de reducción enantioselectiva de la cetona proquiral intermedia catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) inmovilizada sobre la zeolita laminar ITQ-2.

Se ha optimizado la primera etapa de oxidación de Oppenauer de alcoholes racémicos y se ha mostrado que utilizando la zeolita Zr-Beta como catalizador y acetona como agente dador de hidruros, se pueden obtener cetonas proquirales con excelentes resultados e isopropanol como subproducto.

Para llevar a cabo la etapa de reducción enantioselectiva se ha inmovilizado electrostáticamente con éxito la enzima alcohol deshidrogenasa sobre la zeolita laminar ITQ-2 previamente modificada con grupos amino.

La enzima ADH inmovilizada (ADH(S o R)@NITQ-2) ha mostrado excelente actividad y selectividad en la reducción de diferentes cetonas proquirales utilizando NAD^+ o NADP^+ como cofactor respectivamente e isopropanol como regenerador del cofactor y disolvente.

Ambas etapas se han estudiado y optimizado por separado en reactores en continuo de lecho fijo, para posteriormente acoplar ambas etapas en un proceso quimioenzimático en continuo donde parte del isopropanol producido en la primera etapa de oxidación se utiliza para regenerar el cofactor en la segunda etapa, cerrando el sistema con 100 % de economía atómica.

4.4. Sección Experimental

4.4.1. Materiales

La alcohol deshidrogenasa ADH(030) (S) y la ADH270 (R) fueron obtenidas por Evocatal. Los compuestos 2-octanol, 2-octanona, 1-ciclohexiletanol, 1-ciclohexiletanona, 2-pentanol, 2-pentanona, 2-hexanol, 2-hexanona, 2-nonanol, 2-nonanona, 2-dodecanol, 2-dodecanona, 4-bifenilmetilcarbinol, 4-acetilbifenil, los compuestos quirales puros R y S del 2-octanol, 2-pentanol, 2-hexanol, 2-nonanol y los cofactores NADP^+ , NAD^+ fueron suministrados por Sigma Aldrich. Mientras que los compuestos quirales (R y S) 2-dodecanol fueron suministrados por Boc Sciences, mientras que los compuestos (R y S) 4-bifenilmetilcarbinol y (R y S) 1-ciclohexiletanol fueron suministrados por Enamine Store.

4.4.2. Síntesis de los catalizadores

4.4.2.1 Síntesis de la zeolita MCM-22 pura sílice y de la zeolita ITQ-2

La zeolita MWW (MCM-22) pura sílice fue sintetizada de acuerdo con Cambor y col.^{61,62} para ello 0,95 g de NaCl se disolvieron en 50,7 g de una disolución acuosa de hidróxido de N,N,N-trimetil-1-adamantamonio (0,42 M) previamente diluida con 21,33 g de agua. Posteriormente, se añadieron 2,62 g de hexametilamina y 4,88 g de sílice (Aerosil 200, Degussa), manteniendo el gel resultante en agitación. Finalmente, el gel se transfirió a un autoclave con funda de teflón, y se calentó a una temperatura de 150 °C durante 5 días en dinámico (60 rpm). El sólido obtenido tras la cristalización hidrotermal se filtró y lavó con abundante agua hasta que el valor de pH fue menor de 9, y finalmente se secó a 100 °C.

Posteriormente la zeolita ITQ-2 pura sílice se preparó de acuerdo con Corma y col.^{63,64} dispersando 5 g de la zeolita MWW pura sílice sintetizada anteriormente, en 20 g de agua. A continuación, se añadieron 100 g de una disolución acuosa de hidróxido de hexadeciltrimetilamonio C₁₆TMAOH (25% en peso, 50% de intercambio Br/OH), y 30 g de otra disolución acuosa de tetrapropilamonio (40% en peso, 30% de intercambio Br/OH). La mezcla resultante (pH = 12,5) se calentó a 55 °C y se agitó vigorosamente durante 16 h para facilitar el hinchamiento entre las láminas zeolíticas. A continuación, la suspensión se trató en un baño de ultrasonidos (50 W, 50 Hz) durante 1 h para dispersar las láminas zeolíticas. Mediante la adición de HCl (6 M), se disminuyó el pH hasta aproximadamente 3, para facilitar la floculación del sólido deslaminado, el cual fue recuperado por centrifugación. Una vez lavado con agua destilada y, posteriormente, secado a 60 °C durante 12 h, el sólido se trató a 540 °C, primero en atmósfera de N₂ durante 3 h, y después en aire durante 6 h.⁶³

4.4.2.2 Funcionalización del soporte con grupos amino

La funcionalización del soporte con grupos amino se realizó como se detalla a continuación. Inicialmente (500 mg) del soporte (ITQ-2) se activaron a 200 °C en vacío durante 2 h. Cuando el sólido alcanzó la temperatura ambiente, se le añadió una mezcla de 50 mL de tolueno anhidro y 240 µL de (3-aminopropil)triétoxosilano. La mezcla se mantuvo a reflujo (N₂) durante 24 h a 120 °C. Transcurrido este tiempo, el sólido se filtró a vacío y se lavó con tolueno y n-hexano, obteniéndose el material funcionalizado con grupos amino (NITQ-2).¹²⁸

4.4.2.3 Preparación de la zeolita Zr Beta

La zeolita Beta nanocristalina fue obtenida de acuerdo con el estudio de Cambor y col.¹⁷⁹ En un autoclave de acero inoxidable revestido con una funda de teflón se introdujo un gel de síntesis de composición molar 1,0 SiO₂: 0,56 TEOH: 0,02 Al₂O₃: 6,5 H₂O. La síntesis hidrotermal se realizó a 140 °C durante 72 h y el sólido formado se separó por centrifugación, se lavó con agua desionizada y se secó al aire a 100 °C. Para eliminar el aluminio de la zeolita 1 g se trató con 50 mL de HNO₃ 6 M a 80 °C durante 24 h. El

sólido se recuperó por filtración, se lavó con agua desionizada y se secó a 100 °C. La síntesis de la zeolita Zr-Beta se realizó de acuerdo con Zhu y col.¹⁸⁰

En un procedimiento típico la zeolita Zr-Beta sin aluminio, se sintetizó en medio acuoso, para ello una disolución acuosa de tetraetilortosilicato (TEOS) fue hidrolizada en una disolución acuosa de 35 % de hidróxido de tetraetilamonio, bajo agitación. A continuación, se añadió $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ en agua y la mezcla se agitó hasta que se evaporó el etanol formado por la hidrólisis de TEOS, una vez la solución se vuelve transparente se añade HF formándose una pasta espesa. Por último, se añadió una suspensión acuosa de la zeolita beta desaluminizada sintetizada en la etapa anterior. La composición final del gel fue 1,0 SiO₂: 0,008 ZrO₂: 0,54 TEAOH: 7,5 H₂O: 0,54 HF.

La cristalización se llevó a cabo en un autoclave de acero inoxidable revestido con una funda de teflón a 140 °C durante 14 días. El producto sólido obtenido se filtró y lavó con agua desionizada, se secó a 100 °C y se calcinó a 580 °C durante 3 h. El contenido de metal se determinó mediante espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP) y se observó que el porcentaje en peso de metal fue del 1 %. Por otro lado, se determinó el área superficial del material y esta fue de 475 m²/g, presentando un volumen de microporo de 0,22 cm³/g lo que concuerda con la bibliografía.¹⁸¹

4.4.3. Determinación del punto isoeléctrico e inmovilización de la enzima alcohol deshidrogenasa.

Para la determinación del punto isoeléctrico de la enzima ADH(S) se colocaron en un matraz 10 mg de ADH(S) disueltos en 5 mL de tampón fosfato con un intervalo de valores de pH entre 3 a 7 (100 mM), y se agitaron bajo agitación magnética durante 1 hora a 50 °C. Las muestras obtenidas por separado con distintos valores de pH, se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 min y se retiró el sobrenadante. Por último, la proteína precipitada se secó a 60 °C durante 24 h. La cantidad de proteína precipitada se determinó pesando con una balanza analítica y el valor del punto isoeléctrico se relacionó a partir de la mayor cantidad de proteína precipitada comparada con los distintos valores de pH utilizados en esta experiencia, se observó que el PI para la enzima ADH(S) es de aproximadamente 4,5.

Inicialmente las condiciones de inmovilización enzimática fueron optimizadas (Tabla 4.2). A partir de ese momento la metodología empleada en la inmovilización enzimática se realiza del siguiente modo: 10 mg de enzima ADH(S) o ADH(R) disueltos en 5 mL de disolución tampón fosfato pH = 5,5 (100 mM). A continuación, se añadió 200 mg de NITQ-2 se dejó bajo agitación suave en un agitador de rodillos durante 24 horas. Después de ese tiempo, el biocatalizador ADH(S)@NITQ-2 o ADH(R)@NITQ-2 se recuperó por centrifugación, se lavó y se almacenó a 4 °C. Para determinar la cantidad de proteína inmovilizada, se analizaron diferentes alícuotas del sobrenadante mediante la prueba del ácido bicinconínico (BCA) suministrado por Sigma Aldrich. Para ello, se agregaron 2 mL de la disolución de ácido bicinconínico a una muestra de 0,1 mL, y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos y se midió la absorbancia a una longitud de onda

$\lambda = 562$ nm. La cantidad de proteína se determinó mediante la ley de Lambert-Beer, realizándose un calibrado previo con la enzima ADH(S).¹²⁵

4.4.4. Experimentos catalíticos

4.4.4.1 Reducción de cetonas con la enzima ADH@NITQ2 en un reactor discontinuo

La reducción de la 2-octanona a (S)-2-octanol se realizó con el biocatalizador obtenido en la inmovilización bajo las condiciones A (Tabla 4. 2): Así el biocatalizador ADH(S)@NITQ-2 (209 mg), se introdujo en un reactor discontinuo que contenía una disolución de 10 mL de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v), 0,3 mmol de 2-octanona y 0,03 mmol de cofactor NAD⁺.

Las reacciones de reducción de 2-octanona a (R)-2-octanol con la enzima ADH(R) se realizaron de manera ligeramente distinta pues esta enzima necesita otro coenzima (NADP⁺) así como un activador Mg⁺²: Así el biocatalizador ADH(R)@NITQ-2 (209 mg) se introdujo en un reactor discontinuo que contenía una disolución de 10 mL tampón fosfato pH = 7 (100 mM) (1 mM MgCl₂)/Isopropanol (50/50 v/v), 0,3 mmol de 2-octanona y 0,03 mmol de cofactor NADP⁺. Durante el proceso la agitación se mantuvo constante (250 rpm) y a temperatura ambiente. Durante la reacción se tomaron distintas muestras y se extrajeron con n-hexano para posteriormente ser analizadas por CG y CG-MS.

4.4.4.2 Determinación de la estabilidad enzimática a variaciones de pH y temperatura

El efecto del pH sobre la conversión catalítica de la enzima ADH(S)@NITQ-2 y ADH(S) se determinó incubando las muestras en un intervalo de valores de pH de 5,5 a 10. Para ello se incubaron 209 mg de ADH(S)@NITQ-2 o 9 mg ADH(S) dispersos en una disolución de 10 mL de tampón fosfato pH = 5,5-10 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v), en presencia de 0,3 mmoles de 2-octanona y 0,03 mmoles de cofactor NAD⁺, durante 1 h bajo agitación magnética.

La estabilidad térmica de la enzima se determinó calentando durante 1 hora la ADH(S) libre e inmovilizada en un rango de temperaturas entre 25 y 55 °C. Para ello 209 mg de ADH(S)@NITQ-2 o 9 mg ADH(S) dispersos en una disolución de 10 mL de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v) se calentaron en un rango de temperaturas entre 25 y 55 °C. A continuación, el cofactor NAD⁺ (0,03 mmol) y el sustrato 2-octanona (0,3 mmol), se agregaron y la reacción se llevó a cabo durante 1 hora.

4.4.4.3 Reducción de 2-octanona en presencia de ADH(S)@NITQ-2 en un reactor continuo de lecho fijo

Los experimentos en reactor de lecho fijo en continuo se llevaron a cabo de la siguiente manera: Una mezcla de 209 mg del biocatalizador ADH(S)@NITQ-2 y aproximadamente 1,8 g de dióxido de silicio (SiO₂ ≥ 0.25 μm), se introdujeron en un reactor de acero inoxidable (diámetro 1 mm y 35 mm de longitud). El reactor se alimentó con una mezcla

que contenía 10 mL de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v), 0,3 mmol de 2-octanona y 0,03 mmol de cofactor NAD⁺, mediante una bomba peristáltica y la temperatura se fijó a temperatura ambiente para todos los experimentos. Las muestras fueron recogidas en tiempos regulares y se analizaron por cromatógrafo de gases (CG) y CG-MS. A continuación, se evaluó la velocidad espacial (Ecuación 4. 1) y el tiempo de contacto (Ecuación 4. 2) óptimos del reactor, para ello se aumentó la cantidad de cetona, manteniendo constante el volumen de la alimentación, la relación molar entre cetona/cofactor (10/1), el flujo del reactor y la temperatura.

$$\text{Velocidad espacial } \left(\frac{1}{h}\right) = \frac{g_{\text{reactivo limitante}}}{g_{\text{catalizador}}}$$

Ecuación 4. 1

$$\text{Tiempo de contacto } (h) = \frac{1}{\text{Velocidad espacial}}$$

Ecuación 4. 2

4.4.4.4 Reacción de oxidación de 2-octanol en presencia de la zeolita Zr-Beta en reactor discontinuo

Las reacciones de oxidación de 2-octanol se realizaron en un reactor discontinuo, así en un matraz que contenía Zr-Beta (32 mg), alcohol (0,4 mmol), acetona grado HPLC (1,5 mL, 20,4 mmol), la experiencia se realizó a 50 °C y 750 rpm. Durante la reacción se tomaron muestras que fueron analizadas por CG y CG-MS.

4.4.4.5 Oxidación de 2-octanol en reactor continuo de lecho fijo

Los experimentos de oxidación en reactor de lecho fijo se llevaron a cabo de la siguiente manera: en un reactor de acero inoxidable (diámetro 1 mm y 35 mm de longitud) que contenía la zeolita Zr-Beta (0,2-0,4 μm) (304 mg), diluida con aproximadamente 1,7 g dióxido de silicio (SiO₂ ≥ 0.25 μm). Se introdujo una alimentación formada por 2-octanol (0,93 mmol) disuelta en acetona grado HPLC (10 mL, 136 mmol) mediante una bomba peristáltica (0,5 mL/h) y la temperatura se fijó a 50 °C, mediante una manta calefactora externa. Se tomaron muestras a tiempos regulares y se analizaron por cromatografía de gases (CG) y CG-MS. A continuación, se evaluó la velocidad espacial (Ecuación 4. 1) y el tiempo de contacto (Ecuación 4. 2) óptimos del reactor, para ello se aumentó la cantidad de alcohol racémico, manteniendo constante el volumen de la alimentación, el flujo del reactor y la temperatura.

4.4.4.6 Combinación de lechos catalíticos Oxidación de 2-octanol en reactor continuo de lecho fijo

Los experimentos de combinación de los dos reactores de lecho fijo se realizaron del siguiente modo: la oxidación en reactor de lecho fijo se llevó a cabo en un reactor de acero inoxidable (diámetro 1 mm y 35 mm de longitud) que contenía la zeolita Zr-Beta (0,2-0,4 μm) (304 mg), diluida con aproximadamente 1,7 g dióxido de silicio ($\text{SiO}_2 \geq 0,25 \mu\text{m}$). Se introdujo una alimentación formada por 2-octanol (191 mmol/L) disuelta en acetona grado HPLC (10 mL, 136 mmol) mediante una bomba peristáltica (flujo 0,5 mL/h) que corresponde con un tiempo de contacto de 25 h, y la temperatura se fijó a 50 °C, mediante una manta calefactora externa.

A continuación, la mezcla resultante de la primera etapa (10 mL) se diluyó con una disolución de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v) hasta un volumen de 62 mL (% v/v de acetona en esta disolución 16 %), se le ajustó la cantidad necesaria de cofactor hasta alcanzar la relación 10/1 cetona/ NAD^+ (3 mM) y esta disolución que contenía 30 mM de 2-octanona (formada en la primera etapa) se alimentó en el segundo reactor donde se encontraba el biocatalizador ADH(S)@NITQ-2 a un flujo de 0,55 mL/h, correspondiente a un tiempo de contacto de 4 h (entrada C, Tabla 4. 7), esta experiencia se continuó durante 20 h, se recolectaron las muestras y se analizaron por CG y CG-MS.

En la siguiente experiencia (entrada B, Tabla 4. 7) la etapa de oxidación se realizó de la misma manera que la anterior. Por otro lado, el producto obtenido tras la primera etapa fue evaporado hasta reducir la cantidad de acetona a 5 mL, y fue diluida con una disolución de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v) hasta un volumen de 62 mL (% v/v de acetona en esta disolución 8 %), se le ajustó la cantidad necesaria de cofactor hasta alcanzar la relación 10/1 cetona/ NAD^+ (3 mM) y esta disolución que contenía 30 mM de 2-octanona se alimentó en el segundo reactor donde se encontraba el biocatalizador ADH(S)@NITQ-2 a un flujo de 0,55 mL/h. Esta experiencia se continuó durante 20 h, se recolectaron las muestras y se analizaron por CG y CG-MS.

Finalmente, en la última experiencia (entrada A, Tabla 4. 7) la etapa de oxidación se realizó de la misma manera que la anterior. Por otro lado, el producto obtenido tras la primera etapa fue evaporado hasta eliminar la acetona completamente, y a continuación se añadió una disolución de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v) hasta un volumen de 62 mL (% v/v de acetona en esta disolución 0 %), se le ajustó la cantidad necesaria de cofactor hasta alcanzar la relación 10/1 cetona/ NAD^+ (3 mM) y esta disolución que contenía 30 mM de 2-octanona se alimentó en el segundo reactor donde se encontraba el biocatalizador ADH(S)@NITQ-2 a un flujo de 0,55 mL/h, correspondiente a un tiempo de contacto de 4 h, esta experiencia se desarrolló durante 40 h. Se tomaron muestras a tiempos regulares y se analizaron por cromatografía de gases (CG) y CG-MS.

4.4.5. Métodos analíticos

El análisis de las cetonas y los alcoholes racémicos se realizó por cromatografía de gases (CG) utilizando una columna HP-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) y detector FID. Los estándares para cetonas y alcoholes racémicos se diluyeron en n-hexano y las curvas de calibración se realizaron usando dodecano como patrón estándar. El balance molar fue superior al 97 % en todos los casos. La identificación de los productos fue llevada a cabo usando un CG-MS Agilent 5973 Network Mass selective Detector equipado con una columna capilar HP5-MS Ultrainert (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) y un detector FID. El tiempo de retención y el espectro de masas fue utilizado para identificar las cetonas y los alcoholes producidos, y comparados con los compuestos comerciales.

El exceso enantiomérico de los alcoholes secundarios se determinó utilizando un cromatógrafo de gases Variant 3900 gas chromatograph equipado con una columna (Supelco β-Dex225 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) y un detector FID. La derivatización previa de los alcoholes fue necesaria para conseguir una separación óptima de los enantiómeros. En un procedimiento típico a una disolución de alcohol (5 mmol), trietilamina (6 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (0,5 mmol) disueltos en 5 mL de CH₂Cl₂, se le añadió ácido trifluoroacético anhidro (6,2 mmol) a 0 °C. A continuación, la mezcla se agito durante 2 h manteniendo la temperatura a 0 °C, y después durante 2 h adicionales a temperatura ambiente. A continuación, se añadió agua destilada a la disolución y se separó la fase orgánica. Por último, la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ 4 veces y las fases orgánicas se combinaron y se secaron con MgSO₄. Por último, el producto obtenido fue analizado por cromatografía de gases utilizando un Variant 3900 gas chromatograph. La identificación de los productos quirales fue verificada por comparación del tiempo de retención de los alcoholes quirales puros, bajo la misma metodología de derivatización.¹⁸²

El análisis de FTIR se registró con un IR Vertex Bruker DTGS (Detector) y una celda de cuarzo de infrarrojo convencional Quartz KR55 con las ventanas conectadas a un sistema de dosificación de vacío se prepararon pastillas autoconsistentes de las muestras de ITQ-2 y NITQ-2 se trataron a vacío (10⁻⁴ a 10⁻⁵ Pa) a 400 °C durante 45 min.

Las áreas superficiales de los soportes se calcularon mediante el método de Brunauer-Emmet-Teller (BET) por medio de la adsorción de nitrógeno a -196 °C, utilizando un ASAP 2420 (V2.09 J). El análisis elemental se realizó en un Euro EA3000 Elemental Analyzer (EuroVector), utilizando sulfanilamida como referencia.

El contenido de metal en las muestras fue analizado mediante (Espectrometría de emisión atómica con Plasma Acoplado Inductivamente) usando un equipo Varian 715-ES.

Los productos fueron caracterizados por CG-MS:

2-octanona: EIMS (70 eV) m/z (%) 128 [M]⁺ (10), 71 (21), 58 (96), 44 (100); 2-pentanona: EIMS (70 eV) m/z (%) 86 [M]⁺ (30), 71 (13), 58 (100), 41 (15); 2-hexanona: EIMS (70 eV) m/z (%) 100 [M]⁺ (20), 58 (67), 43 (100), 57 (34); 2-nonanona: EIMS (70 eV) m/z (%) 142 [M]⁺ (14), 71 (27), 58 (100), 43 (32); 2-dodecanona: EIMS (70 eV) m/z (%) 184 [M]⁺ (13), 71 (41), 58 (100), 43 (74); 1-ciclohexiletanona: EIMS (70 eV)

m/z (%) 126 [M]⁺ (51), 83 (79), 55 (100), 43 (60); 4-acetilbifenil: EIMS (70 eV) m/z (%) 196 [M]⁺ (50), 181 (100), 153 (35), 152 (61);

2-octanol: EIMS (70 eV) m/z (%) 130 [M]⁺ (1), 55 (26), 45 (100), 39 (18); 2-pentanol: EIMS (70 eV) m/z (%) 88 [M]⁺ (1), 73 (16), 55 (29), 45 (100); 2-hexanol: EIMS (70 eV) m/z (%) 102 [M]⁺ (1), 69 (30), 45 (100), 43 (18); 2-nonanol: EIMS (70 eV) m/z (%) 144 [M]⁺ (1), 69 (32), 45 (100), 43 (23); 2-dodecanol: EIMS (70 eV) m/z (%) 186 [M]⁺ (1), 57 (32), 45 (100), 43 (27); 1-ciclohexiletanol: EIMS (70 eV) m/z (%) 127 [M]⁺ (1), 82 (97), 55 (78), 45 (100); 4-bifenilmetilcarbinol: EIMS (70 eV) m/z (%) 198 [M]⁺ (41), 183 (96), 155 (100), 152 (53).

Capítulo 5 Obtención de diésteres del 2,5-bis(hidroximetil)furano (BHMF) a partir del 5-hidroximetilfurfural a través de un proceso en cascada quimioenzimático

5.1. Introducción

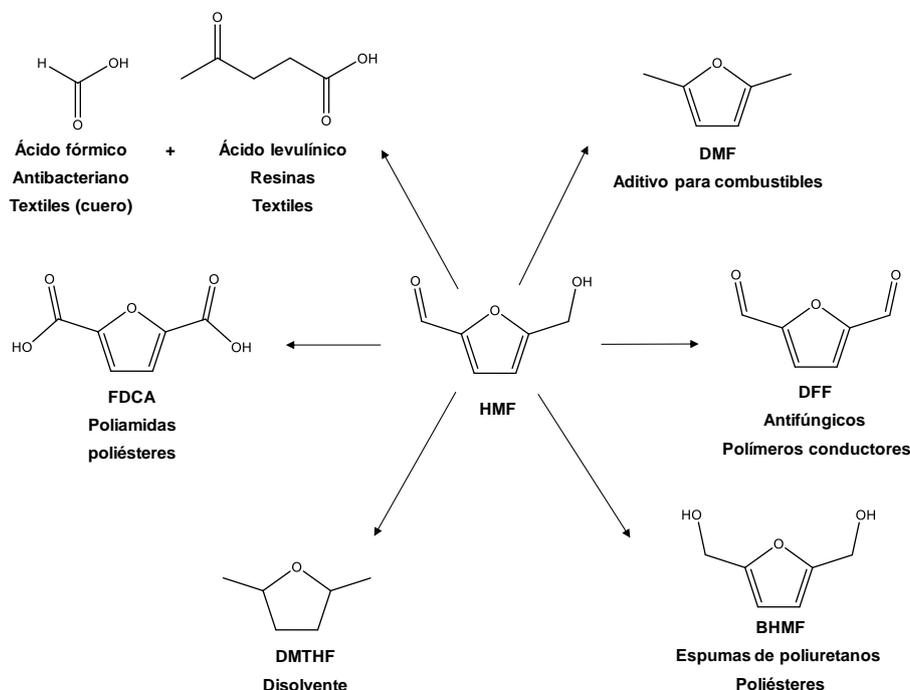
La mayor parte de los combustibles y de los compuestos químicos necesarios para el desarrollo de nuestra sociedad provienen de recursos fósiles no renovables. Desgraciadamente, la alta demanda unido a las reservas limitadas, y a la gran contaminación producida por la combustión y la extracción de estos recursos, ha llevado a los investigadores a centrar sus esfuerzos en la búsqueda de nuevas fuentes de energía y de productos químicos.

En este sentido, la biomasa constituye una fuente de carbono renovable que proviene de la naturaleza y esto ha provocado que gran parte de los esfuerzos se focalicen en obtener biocombustibles y productos químicos de alto valor añadido a partir de biomasa de origen lignocelulósico. De esta manera, no compite directamente con la industria alimentaria y permite suplir las necesidades de biocombustibles y productos químicos.

Una manera de valorizar la biomasa en productos químicos y combustibles es a través de la transformación de las denominadas *moléculas plataforma*, que son compuestos que se obtienen a través de tratamientos primarios del material lignocelulósico.

Entre ellas destaca el 5-hidroximetilfurfural (HMF) (Esquema 5. 1). Este compuesto se obtiene a partir de la deshidratación en medio ácido de hexosas o pentosas y constituye una de las moléculas plataforma más versátiles debido a su gran cantidad de aplicaciones en la industria, tales como biocombustibles, fármacos, antifúngicos, surfactantes, polímeros, etc.¹⁸³

En los últimos años se han investigado una gran cantidad de transformaciones del HMF, como por ejemplo oxidaciones, reducciones, alquilaciones, condensaciones, acetalizaciones, etc.¹⁸⁴⁻¹⁸⁸ para obtener distintos derivados (Esquema 5. 1) que muestran numerosas aplicaciones.



Esquema 5. 1. Derivados del HMF y sus aplicaciones.

Entre estas transformaciones, la reducción del HMF en 2,5-bis(hidroximetil)furano (BHMF), ha recibido gran atención por parte de los investigadores¹⁸⁹ debido a que el BHMF presenta una amplia variedad de aplicaciones entre las que cabe resaltar la síntesis de polímeros, espumas, intermedios de productos farmacéuticos,^{190,191} y aditivos para biodiesel.¹⁹²

Tradicionalmente la conversión de HMF en BHMF se realiza mediante el uso de sales de hidruros metálicos, por ejemplo (LiAlH_4), en cantidades estequiométricas. Sin embargo, el coste de estos reactivos metálicos y la gran cantidad de residuos generados son desventajas importantes de este proceso. Por ello, la comunidad científica ha propuesto diversas estrategias catalíticas para la obtención de BHMF a partir de HMF, entre las que se encuentran la hidrogenación clásica, las reacciones de transferencia de hidrógeno, así como reducciones fotocatalíticas y electrocatalíticas.¹⁹³

Cabe mencionar que la síntesis quimioselectiva de BHMF a partir de HMF usando hidrógeno como agente reductor y catalizadores metálicos no es tarea fácil. La estructura química del HMF (Esquema 5. 1) presenta diferentes funcionalidades susceptibles de reaccionar, disminuyendo la selectividad al producto deseado. Por ejemplo, otros procesos como la hidrogenación del anillo furánico, la eliminación del grupo hidroxilo o

carbonilo y la apertura del anillo furánico pueden competir con la hidrogenación del grupo formilo.

En la bibliografía, podemos encontrar ejemplos de la hidrogenación catalítica del HMF en BHMF, generalmente mediante el uso de catalizadores basados en nanopartículas de metales nobles¹⁹³ como Au, Pd, Pt, Ru e Ir (Tabla 5. 1). En estos casos la selectividad al BHMF está controlada principalmente por el catalizador y las condiciones de reacción. Sin embargo, en la actualidad existe un gran interés en sustituir estas nanopartículas de metales nobles por nanopartículas de metales no nobles (MNN). Esto se debe a dos razones, la primera de ellas es la económica ya que el uso de MNN permitiría abaratar el proceso industrial y por ello el precio del producto final. La segunda razón, es que el uso de catalizadores basados en nanopartículas de MNN representa un enfoque prometedor para una química más sostenible de acuerdo con los principios de la *Química Verde*.

Por otro lado, los catalizadores basados en nanopartículas de MNN presentan una serie de claras desventajas, como son que para lograr rendimientos similares a los obtenidos con los metales nobles se necesitan condiciones de reacción severas (particularmente altas presiones de H₂ y altas temperaturas), y además este tipo de catalizadores son más propensos a la desactivación debido a la aglomeración del metal y a los procesos de lixiviado.

Como se puede observar en la Tabla 5. 1, existe una gran variedad de catalizadores basados en nanopartículas de MNN como Cu, Ni y Co (mono o bimetalicas), que se han utilizado con éxito en la reducción de HMF a BHMF, sin embargo, generalmente requieren de altas presiones de hidrógeno (30-70 bar). Por lo tanto, el desarrollo de nuevos catalizadores basados en nanopartículas de MNN que funcionen de manera eficiente en condiciones de reacción similares a las requeridas para los metales nobles es un reto necesario para el desarrollo de la *Química Sostenible*.

Tabla 5. 1. Resultados de la hidrogenación de HMF en BHMF en presencia de catalizadores heterogéneos de metales nobles y no nobles descritos en la bibliografía.

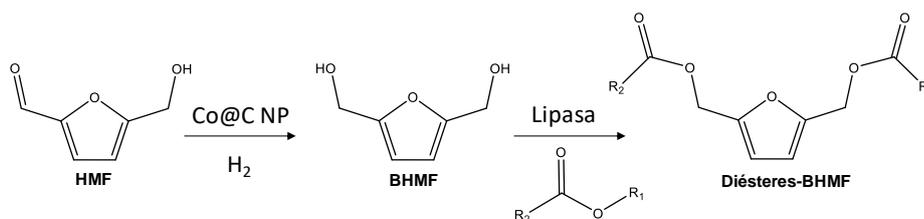
Catalizador	Disolvente	P (bar)	T (°C)	tiempo (h)	HMF Conv. (%)	BHMF Rend.(%)	Ref
Au/Al ₂ O ₃	Agua	65	120	2	100	96	194
Pd/C	Tetrahidrofurano/Agua	100	80	20	97	82	195
Pt/C	Etanol	14	23	18	-	82	196
PtSn/SnO ₂ /RGC	Etanol	20	70	1/2	99	99	197
Ru/C	Agua	50	60	2/3	100	100	198
Ru/ZrO ₂	1-butanol	15	120	6	99	99	199
Ir/TiO ₂	Agua	60	50	3	99	95	200
Cu/SiO ₂	Metanol	25	100	8	100	97	201
Cu/PMO	Etanol	50	100	3	100	99	202
Cu/ZnO	1,4-dioxano	15	100	2	100	99	203
Raney Cu	Agua	90	90	8	94	86	204
CuZn	Etanol	70	120	3	100	95	205
Raney Ni	Agua	90	90	8	100	60	204
NiFe/CNT	1-butanol	30	110	18	100	96	206
CoAl ^a	Metanol	40	120	4	89	83	207
Co/SiO ₂	Agua	34	60	4	100	96	208
Raney Co	Metanol	40	120	4	100 ^b	0	207
Raney Co	Metanol	20	120	1	100	95	209
Co-400 ^c	Metanol	20	90	1	94	93	209

^aÓxido de Co-alumina. ^bEl producto principal es BHMF. ^cCo-400 catalizador comercial Co₃O₄ reducido a 400 °C

Recientemente, nuestro grupo ha desarrollado nanopartículas metálicas de Co y CoNi monodispersas, recubiertas con una fina capa de carbón (Co@C y CoNi@C). Estos catalizadores han demostrado ser altamente activos y selectivos para la reducción quimioselectiva de nitroarenos así como en la reducción del ácido levulínico respectivamente,^{210,211} ambas reacciones se realizaron usando presiones de H₂ y temperaturas

moderadas. Se mostró que la principal ventaja de estas nanopartículas es que la capa de carbón protege a las nanopartículas metálicas de la sobreoxidación, el lixiviado y la aglomeración. Además, la preparación de estos materiales a gran escala puede llevarse a cabo fácilmente mediante la descomposición hidrotermal de un complejo Co-EDTA (formado por reacción de una sal de Co con la sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético). Además, este catalizador puede almacenarse en condiciones ambientales durante largos periodos de tiempo sin observarse cambios morfológicos aparentes. Otra característica interesante de este catalizador es que es magnético, lo que permite una fácil separación del medio de reacción.

Debido a la simplicidad de la preparación de este tipo de catalizadores y a su alta actividad catalítica en reacciones de hidrogenación y siguiendo los objetivos de esta Tesis se decidió estudiar primero el potencial del catalizador Co@C para la reducción selectiva de HMF en BHMF, para posteriormente acoplar esta reducción a una esterificación/trans-esterificación enzimática del BHMF con objeto de obtener diésteres útiles como agentes plastificantes (Esquema 5. 2).



Esquema 5. 2. Proceso quimioenzimático para la síntesis de diésteres del BHMF.

En la bibliografía se ha descrito que los diésteres de los ácidos grasos del BHMF tienen aplicaciones como aditivos para biodiesel²¹² y surfactantes no iónicos.²¹³ Por otro lado, los diésteres del BHMF con menor longitud de cadena (C2-C10) se pueden utilizar como una nueva clase de plastificantes derivados de la biomasa. Esto presenta claras ventajas frente a los plastificantes más utilizados actualmente, los ftalatos, ya que los diésteres del BHMF de cadena corta a diferencia de los ftalatos, no son tóxicos, son biodegradables y presentan una excelente compatibilidad con el policloruro de vinilo (PVC). Por lo que podrían sustituir a los ftalatos derivados del petróleo ampliamente utilizados en la industria de los plásticos.²¹⁴

En general, las reacciones de esterificación se realizan con catalizadores ácidos en fase homogénea o heterogénea. Sin embargo, la obtención de los diésteres requiere condiciones de reacción severas, es decir, altas temperaturas, ácidos fuertes y la eliminación continua del agua para desplazar el equilibrio hacia el producto deseado. Así, el uso de biocatalizadores presentaría muchas ventajas, ya que funcionan en condiciones de reacción suaves, ofrecen una alta selectividad al producto deseado, son sistemas respetuosos con el medio ambiente, y además como se ha comentado en la introducción la posibilidad de utilizar enzimas inmovilizadas reduce enormemente el coste del proceso.

Concretamente, las lipasas son enzimas muy versátiles que catalizan una variedad de reacciones como la esterificación, la transesterificación y la amidación, generalmente en medios orgánicos y anhidros, debido a que la presencia de agua puede afectar a la actividad enzimática. Por estas razones, las lipasas han sido ampliamente estudiadas a nivel académico e industrial (tanto en su forma libre como inmovilizada). En concreto, el estudio de la estabilidad de las lipasas inmovilizadas constituye un área de investigación muy activa.²¹⁵ Particularmente, la Lipasa B proveniente del organismo *Candida antártica*, inmovilizada sobre una resina acrílica macroporosa (Novozym 435) es accesible comercialmente. Este biocatalizador ha sido usado eficientemente en la esterificación/transesterificación del HMF²¹⁶ y en la doble esterificación de BHMF con ácidos grasos de cadena larga como dadores de grupos acilo.²¹²

Sin embargo, la reusabilidad de las lipasas sigue siendo uno de los puntos clave en la aplicación industrial de este biocatalizador. Teniendo en cuenta estos precedentes, nuestro objetivo ha sido el diseño de un proceso quimioenzimático secuencial para obtener diésteres de BHMF a partir de HMF. Para ello se ha combinado un catalizador químico (Co@C), para llevar a cabo la hidrogenación del HMF en BHMF, seguido de la esterificación/transesterificación biocatalítica del BHMF empleando una lipasa comercial (Novozym 435) y usando diferentes dadores de grupos acilo de cadena corta. Para ello se han optimizado ambas etapas por separado y finalmente se han acoplado en un proceso en cascada tanto en un reactor discontinuo como en reactores en continuo de lecho fijo.

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Síntesis y caracterización del catalizador Co@C

El catalizador de Co@C fue preparado mediante la descomposición hidrotermal del complejo Co-EDTA bajo atmósfera de hidrógeno a 450 °C²¹⁰ (sección experimental). El catalizador obtenido fue caracterizado mediante difracción de rayos X (DRX) y espectroscopía Raman (Figura 5. 1 y Figura 5. 2) respectivamente. Como se puede observar en la Figura 5. 1, el patrón de DRX de este catalizador muestra los picos de difracción asociados al cobalto metálico siendo la fase mayoritaria la fase cúbica centrada en las caras fcc (fase-centered cubic phase) y fase minoritaria la fase hexagonal hcp (hexagonal close-packed). Por otro lado, la espectroscopía Raman (Figura 5. 2) muestra la presencia de especies de óxido de cobalto (Co₃O₄) junto con carbón desordenado.

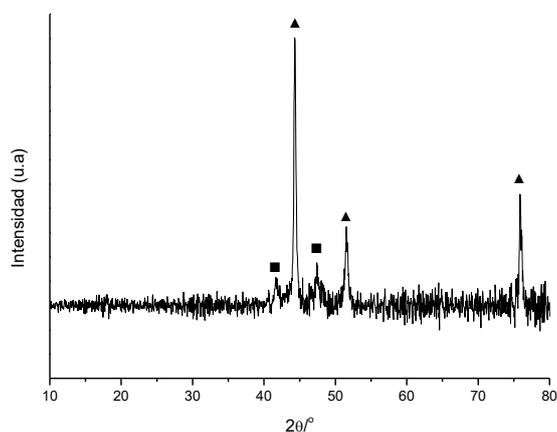


Figura 5. 1. Difracción de Rayos X del catalizador Co@C. (▲) fase cúbica centrada en las caras fcc (fase-centered cubic phase), (■) fase hexagonal hcp (hexagonal close-packed).

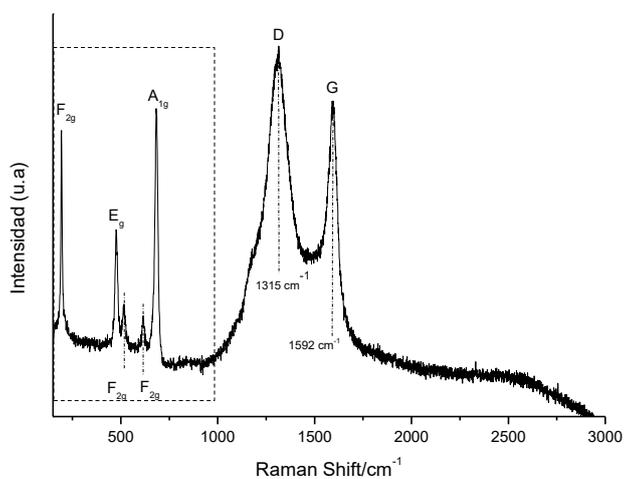


Figura 5. 2. Espectroscopía Raman del catalizador Co@C. Bandas de Raman correspondientes a Co_3O_4 (F_{2g} , E_g , y A_{1g}) y las señales Raman de láminas de carbón a 1315 cm^{-1} y 1592 cm^{-1} , que corresponden a las bandas D y G respectivamente.

La morfología del catalizador Co@C se caracterizó por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) (Figura 5. 3a) y mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 5. 3b). Como se puede observar (Figura 5. 3c) el catalizador

Co@C está formado por nanopartículas que presentan un rango de tamaños entre los 15 a los 100 nm.

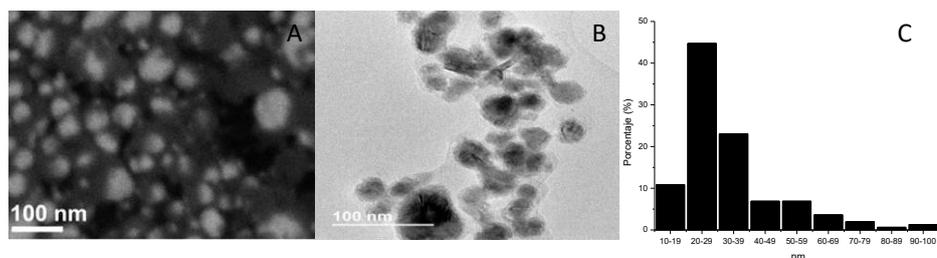


Figura 5. 3. (a) Imagen de FESEM del catalizador Co@C. (b) Imagen de TEM del catalizador Co@C. (c) Rango de tamaños.

Por otro lado, el catalizador Co@C fue caracterizado usando el microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM) (Figuras 5. 4a y 5. 4b). Como se puede observar las nanopartículas de cobalto están recubiertas por finas láminas de carbón. Las franjas reticulares (Lattice fringes) que se repiten en la estructura del catalizador corresponden a Co metálico presentes en el núcleo de la nanopartícula, mientras que las franjas reticulares (Lattice fringes) en la superficie externa más cercana al carbón corresponden a Co_3O_4 .

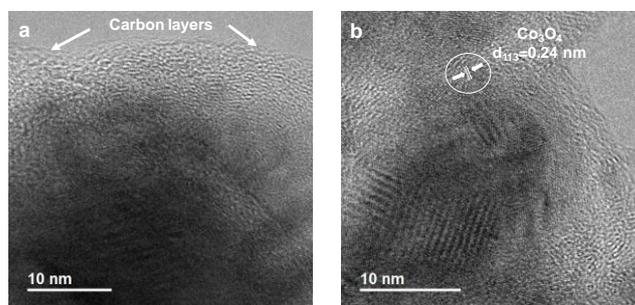


Figura 5. 4. (a) Imagen HRTEM de Co@C. (b) Imagen de HRTEM de la estructura superficial de Co@C

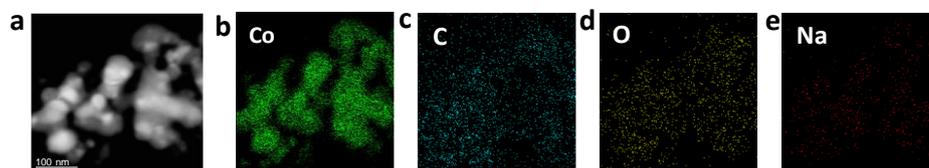


Figura 5. 5. Mapa de distribución de elementos: (a) Imágenes de TEM (STEM-HAADF) de Co@C; (b-e) Mapa de distribución de elementos de Co, C, O y Na en Co@C.

El mapa de distribución de elementos de las nanopartículas (Figuras 5. 5b-e) muestra que contienen aproximadamente un 95 % en peso de Co, también se observa la presencia de Co, C, O y Na dispersados regularmente en las nanopartículas.

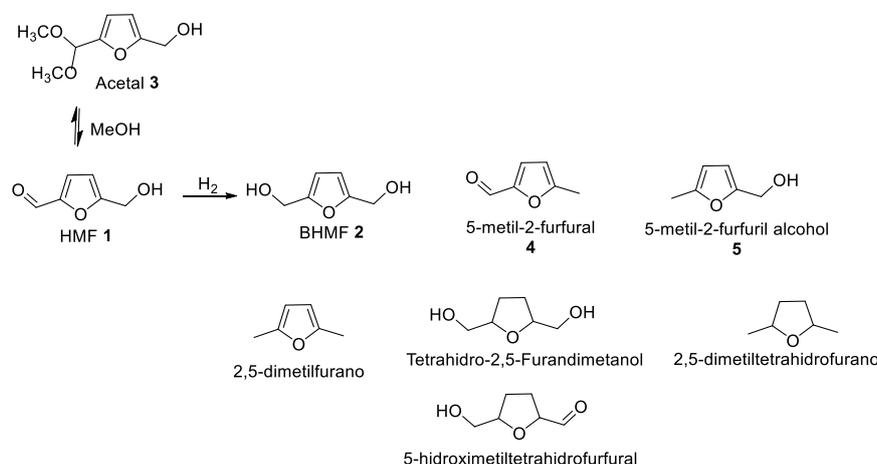
La caracterización estructural de las muestras concuerda con las descritas en la bibliografía para estos catalizadores,²¹⁰ donde se propuso que las nanopartículas de Co@C están constituidas de Co metálico con zonas de óxido de cobalto en la superficie y una fina capa de carbón con pequeñas roturas recubre las nanopartículas.

5.2.2. Propiedades catalíticas de las nanopartículas Co@C en la reducción de HMF a BHMF

5.2.2.1 Optimización de las condiciones de reacción

Con objeto de estudiar la actividad y la selectividad del catalizador de Co@C en la reducción de HMF a BHMF, la reacción se realizó primero a 90 °C bajo 20 bares de hidrógeno usando metanol como disolvente.

Como se muestra en el Esquema 5. 3 se pueden obtener una gran variedad de subproductos como resultado de la sobrerreducción del HMF. Sin embargo, después de 6 h se obtuvo BHMF (2) casi cuantitativamente con una alta selectividad (99 %), mientras que los otros compuestos reducidos **4** (5-metilfurfural) y **5** (5-metil-2-furfuril alcohol) se detectaron como trazas, (entrada 1, Tabla 5. 2).



Esquema 5. 3. Posibles compuestos formados en la reducción catalítica del HMF.

Se ha observado que la temperatura juega un papel importante en la selectividad a BHMF, de manera que un aumento de la temperatura puede favorecer la sobrerreducción

del HMF.²⁰³ Así, el efecto de la temperatura de reacción sobre la selectividad se determinó realizando la reacción a 110 °C (entrada 2, Tabla 5. 2).

Tabla 5. 2. Estudio de la temperatura y de la presión de H₂ en la hidrogenación de HMF usando Co@C.

Entrada	Catalizador	Tiempo (h)	Conversión (%)	Rendimiento (%)				Selectividad (%) 2
				2	3	4	5	
1 ^b	Co@C	2	90	89	-	<1	<1	99
	20bar-90 °C	6	98	98	-	<1	<1	99
2 ^c	Co@C	2	93	93	<1	-	-	99
	20bar-110 °C	3	99	99	<1	-	-	99
3 ^a	Co@C	2	97	95	-	1	1	98
	10bar-110 °C	6	99	96	-	1	2	97

^aCondiciones de reacción: HMF (0,5 mmol, 63 mg), relación molar sustrato/Co 3,1, 110 °C, 10 bar H₂, 5 mL metanol). ^b A 90 °C, 20 bar de H₂; ^c A 110 °C, 20 bar H₂

Como se puede observar en las Figuras 5. 6a y 5. 6b la velocidad de reacción inicial se incrementó considerablemente cuando la temperatura se aumentó de 90 a 110 °C, mientras que no se observaron cambios en la selectividad al producto deseado. En estas condiciones se obtuvo un rendimiento del 99 % con una selectividad del 99 % después de 3 h (entrada 2, Tabla 5. 2).

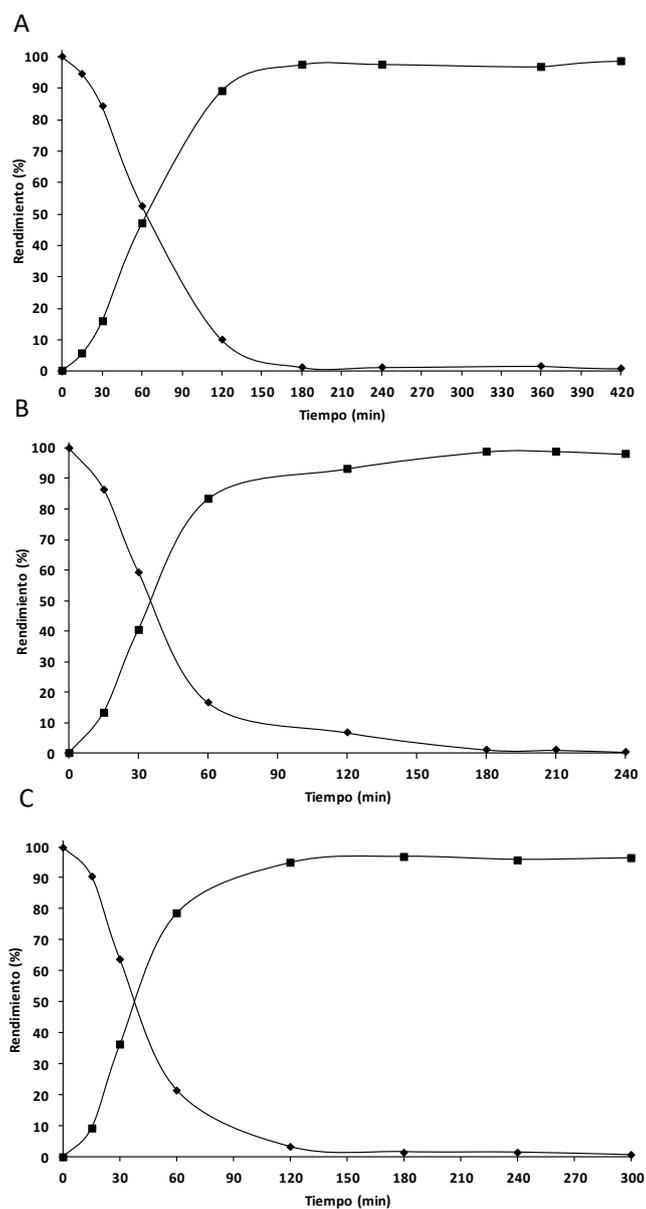


Figura 5. 6. Resultados de la reducción de HMF a BHMF usando Co@C. Condiciones de reacción: HMF (0,5 mmol, 63 mg), 10 mg de catalizador, 5 mL de metanol. A) 90 °C, 20 bar de H₂; B) 110 °C, 20 bar de H₂; C) 110 °C, 10 bar de H₂. HMF (♦) y BHMF (■).

Por otra parte, también se obtuvieron buenos resultados al disminuir la presión de hidrógeno a 10 bar, lo que indica que la actividad de hidrogenación del catalizador de Co es alta en estas condiciones, mientras que la selectividad se mantiene incluso cuando se obtienen altas conversiones de HMF (entrada 3, Tabla 5. 2 y Figura 5. 6c). En estas condiciones se logró un rendimiento del 95 % con 98 % de selectividad para BHMF después de 2 h, y solo se detectaron pequeñas cantidades de 5-metil-2-furfural (**4**) y 5-metil-2-furfuril alcohol (**5**) en el medio de reacción. Es de resaltar que, al aumentar el tiempo de reacción hasta 24 h, el BHMF permanecía estable en estas condiciones de reacción y no se observaron productos provenientes de sobreredución. Por ello, se seleccionó, 10 bar de presión de hidrógeno y 110 °C para los siguientes experimentos.

5.2.2.2 Estudio de distintos catalizadores en la reducción de HMF a BHMF

Para estudiar el papel que juega el recubrimiento de carbón de las nanopartículas de Co en la actividad catalítica del catalizador Co@C, el catalizador fue calcinado a 250 °C y 450 °C bajo atmósfera de aire, con el fin de eliminar la capa de carbón que envuelve las nanopartículas de Co. Estudios anteriores de espectroscopía Raman mostraron que parte del recubrimiento de carbón persiste cuando el catalizador se calcina bajo atmósfera de aire a 250 °C (Co@C-250a) detectándose además partículas de Co y especies oxidadas en la superficie del catalizador. Sin embargo, cuando el catalizador se calcina a 450 °C (Co@C-450a), la capa de carbón se elimina prácticamente en su totalidad y el Co₃O₄ es la única especie que se detecta.²¹⁰

Como se puede observar en la Tabla 5. 3, cuando la reacción de hidrogenación del HMF se llevó a cabo con el catalizador Co@C-250a la actividad catalítica disminuyó con respecto a la obtenida con el catalizador Co@C (entrada 2, Tabla 5. 3 y Figura 5. 7), además la pérdida de actividad es aún mayor para el catalizador (Co@C-450a) (entrada 3, Tabla 5. 3 y Figura 5. 8).

Tabla 5. 3. Hidrogenación de HMF usando diferentes catalizadores^a

Entrada	Catalizador	t (h)	Conversión (%)	Rendimiento (%)				Selectividad (%) 2
				2	3	4	5	
1	Co@C	2	97	95	-	1	1	98
		6	99	96	-	1	2	97
2	Co@C-250a	2	50	50	-	-	-	100
		6	93	92	1	-	-	99
3	Co@C-450a	2	15	15	-	-	-	100
		6	49	47	2	-	-	96
		24	77	70	7	-	-	91
4	Co ₃ O ₄ com. reducido	2	21	19	2	-	-	90
		6	49	47	2	-	-	96
		24	84	82	2	-	-	98
5	Co-BTC	2	12	4	8	-	-	33
		24	58	32	26	-	-	55
6	Co@C/C	2	10	4	6	-	-	40
		24	55	38	17	-	-	69
7	-	6	8	3	5	-	-	37
		24	15	8	7	-	-	53

^aCondiciones de reacción: HMF (0,5 mmol, 63 mg) relación molar sustrato/Co 3,1, 110 °C, 10 bar H₂, 5 mL metanol.

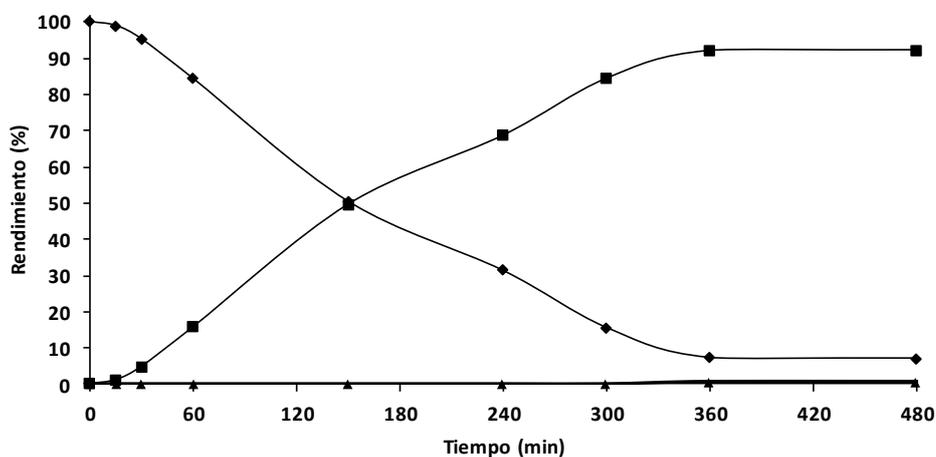


Figura 5. 7. Resultados de la reducción de HMF usando el catalizador Co@C-250a. Condiciones de reacción: 0,5 mmol HMF, 10 mg Co@C-250a, 5 mL metanol, 110 °C, 10 bar H₂. HMF (◆), BHMF (■), 3 (▲).

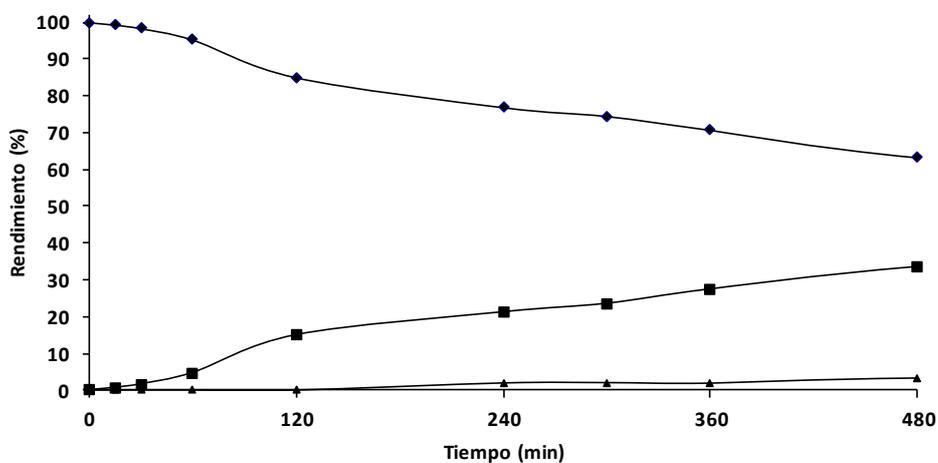


Figura 5. 8. Resultados de la reducción de HMF usando el catalizador Co@C-450a. Condiciones de reacción: 0,5 mmol HMF, 10 mg Co@C-450a, 5 mL metanol, 110 °C, 10 bar H₂. HMF (◆), BHMF (■), 3 (▲).

Además, como puede observarse en la Figura 5. 8, existe un período de inducción más largo en la muestra Co@C-450a con respecto a la muestra Co@C-250a (Figura 5. 7). Estos resultados catalíticos indican que las nanopartículas de Co metálicas son la fase activa del catalizador, y por otro lado, la existencia del recubrimiento de carbón no solo

protege a las nanopartículas de Co de la oxidación, sino que probablemente mejora la difusión de hidrógeno en la superficie de Co^0 y obviamente, la actividad catalítica. De hecho, cuando se realizó la reacción utilizando una muestra de Co_3O_4 comercial ($\text{Co}_3\text{O}_4\text{-R}$) previamente reducida con H_2 a $450\text{ }^\circ\text{C}$, (entrada 4, Tabla 5. 3 y Figura 5. 9), la velocidad de reacción fue considerablemente más baja que la mostrada por los catalizadores Co@C .

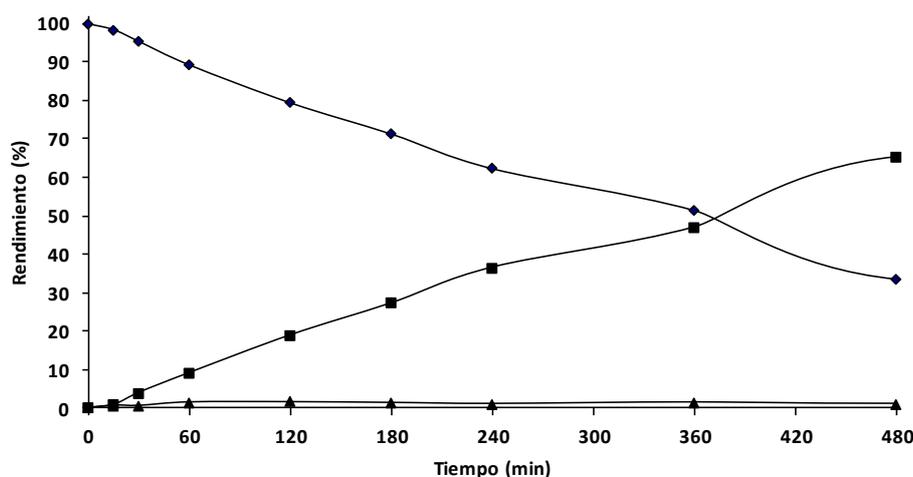


Figura 5. 9. Reducción de HMF usando el catalizador $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-R}$. Condiciones de reacción: $0,5\text{ mmol}$ HMF, 10 mg $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-R}$, 5 mL metanol, $110\text{ }^\circ\text{C}$, 10 bar H_2 . HMF (◆), BHMF (■), 3 (▲).

Además, con fines comparativos se preparó un catalizadores basado en nanopartículas de Co por descomposición de un complejo metal-orgánico: el catalizador (Co-BTC) que se preparó por descomposición de un material de Co con estructura metal-orgánico (MOF) con ácido trimésico como ligando,²¹¹ y un catalizador basado en nanopartículas de Co soportadas sobre carbón (Co@C/C) preparado por descomposición de un complejo de Co soportado.²¹⁷ Como se puede observar en la Tabla 5. 3 (entradas 5 y 6), la actividad y la selectividad de estos catalizadores fueron similares y considerablemente más bajas que las que muestra el catalizador Co@C . Finalmente, se realizó un experimento de control en ausencia de catalizador obteniéndose únicamente un 15% de conversión de HMF después de 24 h (entrada 7, Tabla 5. 3) con 53% de selectividad a BHMF, siendo el acetal **3** el único subproducto.

Estos resultados muestran que el catalizador Co@C es un excelente candidato para llevar a cabo la reacción de reducción del HMF en BHMF con excelente rendimiento y selectividad. Además, cuando se compararon los resultados obtenidos en la reducción de HMF a BHMF con el catalizador de Co@C con los descritos previamente en la bibliografía utilizando diferentes catalizadores basados en metales nobles (Tabla 5. 1), se

puede observar que este catalizador funciona de manera similar en términos de actividad y selectividad, que los catalizadores basados en metales nobles como el Ru, Pt o Pd.

5.2.2.3 Estudio de la estabilidad y reusabilidad del catalizador Co@C en la reducción de HMF a BHMF

Con el objetivo, de determinar si se produce lixiviado de Co en el medio de reacción, se llevó a cabo un experimento adicional donde se detuvo la reducción de HMF después de 30 min. En ese instante, el catalizador se retiró con un imán y la reacción continuó durante 1 h adicional durante la cual no se detectó ninguna conversión a BHMF adicional (Figura 5. 10).

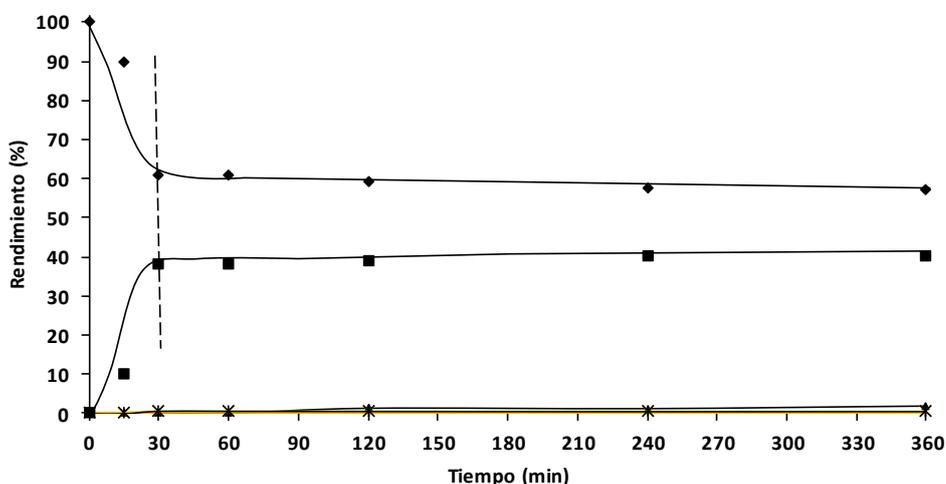


Figura 5. 10. Estudio de lixiviado del catalizador Co@C durante la reducción del HMF a BHMF. Condiciones de reacción: 0,5 mmol HMF, 10 mg Co@C, 5 mL metanol, 110 °C, 10 bar H₂. HMF (◆), BHMF (■), 3 (▲).

Con el objetivo de estudiar la reutilización del catalizador, después de una primera reacción, el catalizador Co@C se recuperó con un imán, se lavó con metanol se calcinó a 170 °C durante 2 h, bajo atmósfera de H₂, y se usó de nuevo en otro ciclo de reacción. Como puede observar en la Figura 5. 11, la conversión de HMF y la selectividad a BHMF se mantuvieron estables después de cuatro ciclos de reacción consecutivos.

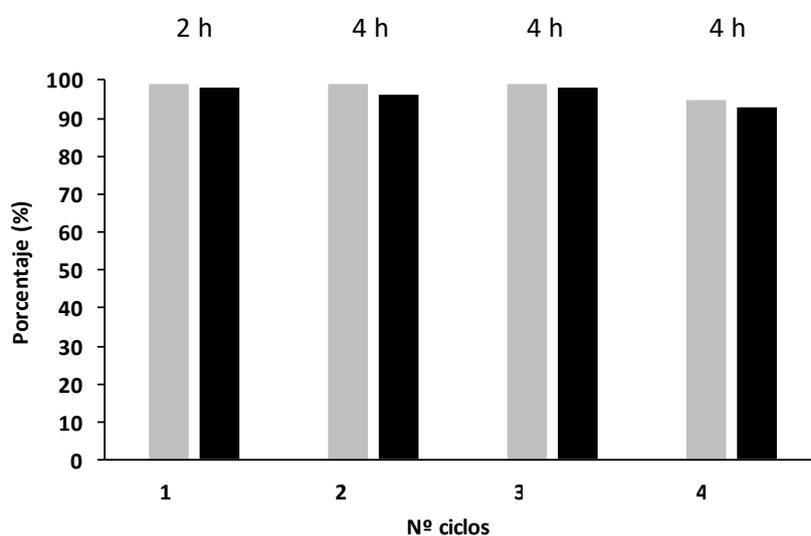


Figura 5. 11. Estudio de reusabilidad del catalizador Co@C en la hidrogenación de HMF a BHMF. Condiciones de reacción: 0,5 mmol HMF, 10 mg Co@C, 5 mL metanol, 110 °C, 10 bar H₂, 4 h. Conversión de HMF (■), Selectividad a BHMF (■).

Aunque la velocidad de reacción disminuyó después del primer ciclo, aún se pudo obtener un rendimiento del 91 % de BHMF cuando se prolongó el tiempo de reacción a 4 h. Además, el análisis de TEM del catalizador reusado después del cuarto ciclo (Figura 5. 12) indica que las nanopartículas de Co monodispersadas se conservan después del reuso del catalizador, lo que demuestra su estabilidad durante el proceso de hidrogenación de HMF.

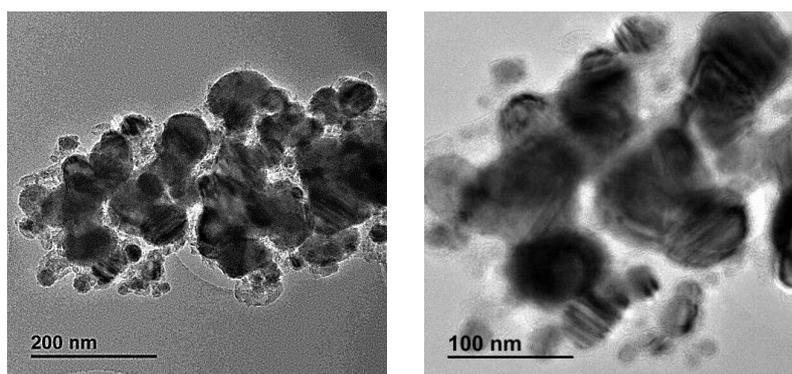
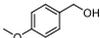
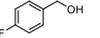
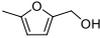
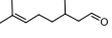
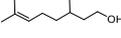
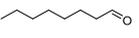
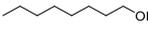
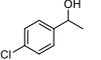


Figura 5. 12. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) del catalizador Co@C después de 4 usos consecutivos.

5.2.2.4 Generalidad del proceso de reducción en presencia de Co@C

Teniendo en cuenta el excelente resultado obtenido en la hidrogenación del HMF en presencia del catalizador Co@C, se exploró la capacidad del catalizador en la hidrogenación de diferentes aldehídos que incluye aldehídos aromáticos con grupos dadores o aceptores de electrones, alifáticos y heterocíclicos, así como distintas cetonas.

Tabla 5. 4. Resultados de la hidrogenación catalítica de distintos compuestos carbonílicos utilizando el catalizador Co@C.^a

Entrada	Substrato	Producto	t (h)	Conv. (%)	Rend. (%)	Acetal (%)	Select. (%)
1			2	96	96		100
			3	99	99		100
2			3	99	95	4	96
3			4	99	98	1	99
4			2	99	99		100
5			4	97	97		100
			6	100	100		100
6			2	98	98		100
7			3	97	97		100
			6	99	99		100
8 ^b			4	91	91		100
			7	99	99		100
9 ^b			8	82	82		100
			20	91	91		100
10 ^b			3	90	90		100
			6	99	99		100
11 ^b			6	62	62		100
			20	82	82		100

^aCondiciones de reacción: sustrato (0,5 mmol), 10 mg Co@C relación molar (sustrato/Co) 3,1, 110 °C, 10 bar H₂, metanol (5 mL). ^b 40 mg Co@C, relación molar sustrato/Co 0,76.

Como se puede observar en la Tabla 5. 4, el catalizador Co@C mostró una alta actividad catalítica y selectividad en la hidrogenación de los aldehídos aromáticos con grupos dadores y aceptores de electrones, (entradas 1-3), y además no se detectó el producto de deshalogenación en el caso de p-fluorobenzaldehído (entrada 3, Tabla 5. 4).

Otros aldehídos furánicos derivados de la biomasa, como furfural y 2-metilfurfural, se redujeron fácilmente a los alcoholes correspondientes con alta selectividad. De especial interés industrial es la reducción de furfural en alcohol furfurfílico (entrada 4, Tabla 5. 4), que es un intermedio importante en la producción de resinas, fibras, lisina, vitamina C, lubricantes y agentes dispersantes. El alcohol furfurfílico se produce comercialmente ($400 \cdot 10^3$ Tm / año) empleando un catalizador de cobre-cromita.

Para determinar si el catalizador Co@C hidrogenaba el grupo carbonilo quimioselectivamente en presencia de dobles enlaces carbono-carbono, se llevó a cabo la hidrogenación de citronelal (3,7-dimetil-6-octenal) con el fin de obtener citronelol, un alcohol importante en la industria de perfumes. En este caso se pudo obtener un rendimiento al alcohol del 98 % con una selectividad del 100 % de citronelol en solo 2 h (entrada 6, Tabla 5. 4). Como era de esperar la hidrogenación de cetonas dio lugar a los correspondientes alcoholes secundarios en menor extensión que los aldehídos, requiriéndose mayor cantidad de catalizador y tiempos de reacción más largos, pero en todos los casos la selectividad a los alcoholes correspondientes fue del 100 %.

5.2.2.5 Estudio de la influencia del disolvente en la reducción de HMF en BHMF

Como se ha comentado en la introducción, el objetivo de este estudio fue el diseño de un proceso quimioenzimático en dos etapas, acoplando la primera etapa de reducción del HMF con la segunda etapa de esterificación/transesterificación enzimática del BHMF.

Como hemos mostrado anteriormente, el primer paso, de reducción del HMF se logra con altos rendimientos utilizando Co@C y metanol como disolvente. Sin embargo, los disolventes como el metanol o etanol no son medios adecuados para las enzimas, ya que la desnaturalización del biocatalizador puede ocurrir fácilmente.²¹⁸ Por lo tanto, para optimizar el proceso quimioenzimático, el estudio de la influencia del disolvente en la actividad catalítica y la selectividad de las nanopartículas de Co@C era imprescindible.

Concretamente en la reducción de HMF, se ha descrito que la naturaleza del disolvente puede desempeñar un papel importante en la actividad y selectividad del catalizador.²¹⁹ Por lo tanto, se realizó un estudio de la actividad catalítica de las nanopartículas de Co@C usando diferentes disolventes y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5. 5.

Tabla 5. 5. Influencia del disolvente en la hidrogenación del HMF en presencia de Co@C.^a

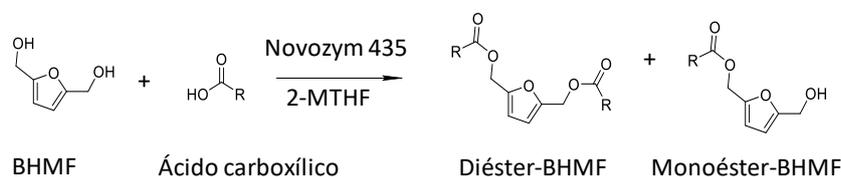
Entrada	Disolvente	Conversión (%)	Rendimiento (%)			Selectividad 2 %
			2	4	5	
1	Metanol	97	95	1	1	98
2	Isopropanol	98	86	2	10	88
3 ^b	Acetona	19	13	-	-	60
4 ^c	2-MTHF	30	26	2	2	87
5 ^d	2-MTHF	95	91	-	4	96

^aCondiciones de reacción: HMF (0,5 mmol, 63 mg), 10 mg Co@C, disolvente (5 mL) 110 °C, 10 bar H₂, 2 h. ^bSe detectó el producto de condensación proveniente de la acetona y del HMF; ^c 10 h; ^d 30 mg Co@C, 10 h.

Como se puede observar, la actividad catalítica y la selectividad están fuertemente controladas por la naturaleza del disolvente empleado. Los disolventes polares próticos, como el metanol y el isopropanol, son más adecuados para realizar la hidrogenación de HMF, que los disolventes polares apróticos. Se puede encontrar en la bibliografía un comportamiento similar utilizando un catalizador de Pt/MCM-41 en la reducción de HMF a 35 °C y 7 bar H₂.²²⁰ Estos resultados se explican teniendo en cuenta la acidez de Lewis y la basicidad del disolvente. Por ejemplo, los disolventes próticos como el metanol, capaces de aceptar electrones, pueden polarizar el grupo C=O mejor que los disolventes polares apróticos, lo que hace que el C=O sea más propenso a la hidrogenación. Como se puede observar en la Tabla 5. 5, la conversión obtenida con 2-MTHF y acetona fue considerablemente más baja que la obtenida con disolventes próticos, mientras que se mantuvo alta la selectividad con 2-MTHF. De hecho, cuando se aumentó la cantidad de catalizador, se pudo obtener una conversión del 95 % con una selectividad del 96 % al producto deseado BHMF (2).

5.2.3. Síntesis de los diésteres del BHMF en un proceso en cascada

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la reducción de HMF a BHMF y siguiendo nuestro objetivo de diseñar un proceso quimioenzimático para preparar diésteres de BHMF a partir de HMF útiles como plastificantes se estudió a continuación la etapa de esterificación del BHMF con ácidos carboxílicos de cadena corta utilizando la enzima comercial inmovilizada (Novozym 435) (Esquema 5. 4).



Esquema 5. 4. Síntesis de ésteres del BHMF en presencia de la enzima Novozym 435 con ácidos carboxílicos de cadena corta.

Recientemente, Lacatus y col.²¹² han descrito la esterificación de BHMF con ácidos grasos de cadena larga utilizando la lipasa (Novozym 435) como biocatalizador. Los autores encontraron que se pueden obtener altos rendimientos a los diésteres del BHMF utilizando una variedad de disolventes como el 2-metiltetrahidrofurano (2-MTHF), 1,4-dioxano o acetona en presencia de tamices moleculares. Los autores demostraron que la presencia de tamices moleculares para eliminar el agua fue decisiva para obtener los diésteres de BHMF con altos rendimientos.

Siguiendo este protocolo, inicialmente se estudió la esterificación enzimática del BHMF usando el ácido hexanoico y la lipasa comercial (Novozym 435). Dado que la reducción de HMF en BHMF se realizó de forma selectiva utilizando metanol como disolvente, primero se intentó realizar la esterificación enzimática de BHMF con ácido hexanoico utilizando este disolvente, aunque esperábamos que un disolvente altamente polar como el metanol podría desnaturalizar la enzima.^{221,218} Según lo esperado, cuando se utilizó metanol como disolvente la actividad enzimática quedó suprimida totalmente y no se produjo esterificación de BHMF.

Posteriormente se seleccionó como disolvente el 2-metiltetrahidrofurano (2-MTHF) ya que, como se muestra en la Tabla 5. 5, en la primera etapa se puede obtener una alta selectividad y conversión en la transformación catalítica de HMF a BHMF en presencia de Co@C.

Como se observa en la Figura 5. 13, utilizando 2-MTHF como disolvente en la esterificación del BHMF, se formó rápidamente el monoéster hexanoato del BHMF que posteriormente se transformó en el correspondiente diéster de BHMF. Después de 11 h de reacción, se obtuvo un rendimiento del 99 % del diéster de BHMF con el ácido hexanoico.

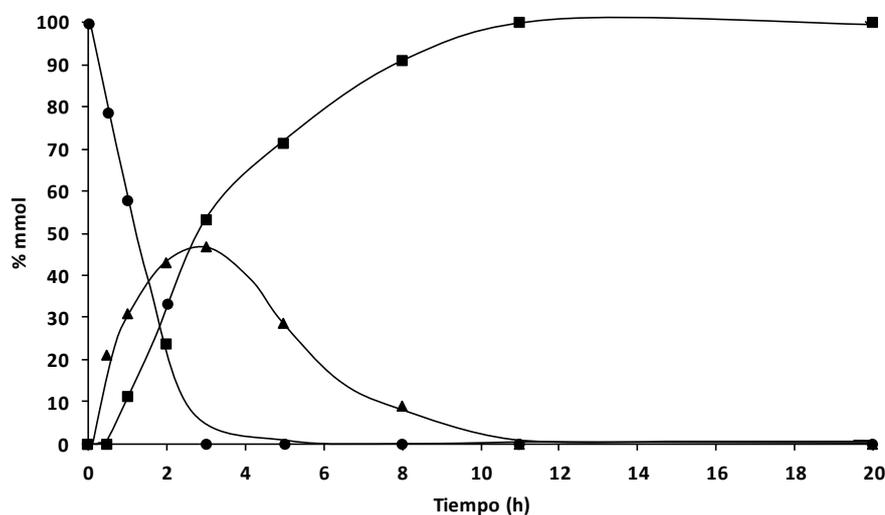


Figura 5. 13. Esterificación del BHMF con ácido hexanoico. Condiciones de reacción: BHMF (0,05 mmol), ácido hexanoico (0,2 mmol), 1 mL 2-MTHF, 25 mg Novozym 435 y 200 mg de tamiz molecular, 35 °C. BHMF (●), Monoéster (▲), Diéster (■).

A continuación, se realizó el acoplamiento de las dos etapas del proceso, para ello, inicialmente el HMF se hidrogenó en las condiciones óptimas (entrada 5, Tabla 5. 5) en presencia del catalizador de Co@C a 110 °C utilizando 2-MTHF como disolvente y una vez se logró un rendimiento de aproximadamente 92 % de BHMF la temperatura se disminuyó a 35 °C y el catalizador se retiró del medio de reacción con un imán. A continuación, se agregó el ácido hexanoico, la lipasa Novozym 435 y el tamiz molecular. Como puede observarse en la Tabla 5. 6, se obtuvo un excelente rendimiento y selectividad para el correspondiente diéster del BHMF con el ácido hexanoico. También se obtuvieron excelentes resultados cuando el proceso en cascada se realizó con ácido butírico y ácido octanoico (entradas 2 y 4, Tabla 5. 6).

Sin embargo, cuando se usó ácido acético, la selectividad al diéster fue considerablemente menor que la lograda con los otros ácidos, y se obtuvo una mezcla de monoéster (46 %) y diéster (47 %) después de 24 h de reacción. En este caso, la menor actividad enzimática se atribuyó a la mayor acidez del ácido acético que puede causar una desactivación parcial de la lipasa.²¹⁶ Aunque, después de aumentar el tiempo de reacción hasta 47 h, se obtuvo el diéster del ácido acético con un rendimiento del 89 %.

Tabla 5. 6. Resultados de la esterificación del BHMF con diferentes compuestos con grupos dadores de acilo.

Entrada	Primer paso				Grupo dador de acilos	Segundo paso				Proceso quimioenzimático	
	t (h)	Conv. (%)	Rend. BHMF (%)	Selec. BHMF (%)		t (h)	Conv. (%)	Rend. (%)	Select. (%)	Rend. Global(%)	Selec. Global(%)
1	10	96	92	96	Ácido acético	24	93	47	50	43	45
						47	100	89	89	82	85
2	10	95	91	96	Ácido butírico	11	94	94	100	85	90
3	10	95	92	97	Ácido hexanoico	24	99	99	100	91	96
4	10	96	93	97	Ácido octanoico	24	99	99	100	92	96
5	10	97	92	95	Hexanoato de vinilo	0,5	97	97	100	89	92

Condiciones de reacción: ^a primera etapa HMF (0,5 mmol, 63 mg), 30 mg Co@C, 2-MTHF (5 mL) 110 °C, 10 bar H₂, 10 h. ^b Segunda etapa relación molar BHMF/compuesto dador de acilo (1/4), 250 mg Novozym 435, 1 g tamiz molecular, 35 °C.

Para estudiar la estabilidad del sistema quimioenzimático, se repitió el proceso en cascada con el ácido hexanoico durante 3 ciclos consecutivos, bajo las mismas condiciones de reacción. Como se observa en la Tabla 5. 7 se produjo tanto la desactivación del Co@C como de la lipasa, siendo necesario aumentar el tiempo de reacción para alcanzar rendimientos razonables. La desactivación de la lipasa es considerablemente superior lo que puede ser atribuido a la desnaturalización del enzima como consecuencia de la acidez del ácido carboxílico.

Tabla 5. 7. Estudio de la reusabilidad en el proceso quimioenzimático para la obtención de los diésteres obtenidos a partir del BHMF y el ácido hexanoico.

Primer paso					Segundo paso				Proceso quimioenzimático	
Nº Ciclos	t (h)	C (%)	% R-2	% S-2	t (h)	Conv. (%)	Rend. (%)	Select. (%)	Rend. Global (%)	Select. Global (%)
1	9	95	91	96	11	98	96	98	87	92
2	10	94	90	95	15	98	93	95	84	89
3	12	91	87	96	20	96	77	80	67	74

Condiciones de reacción: ^a primera etapa HMF (0,5 mmol, 63 mg), 30 mg Co@C, 2-MTHF (5 mL) 110 °C, 10 bar H₂, 10 h. ^b Segunda etapa: relación molar BHMF/ácido hexanoico (1/4), 250 mg Novozym 435, 1 g tamiz molecular, 35 °C.

Aunque los ácidos carboxílicos son baratos y se pueden obtener fácilmente, su uso como reactivos en reacciones de esterificación presenta varias desventajas como son la formación de agua como producto de reacción, escasa solubilidad con alcoholes, baja reactividad y consecuentemente presentan largos tiempos de reacción.

Además, la formación de agua como producto de reacción no solo puede afectar a la actividad enzimática de las lipasas, sino que además el agua presente en el medio puede actuar como un nucleófilo competitivo que desplaza el equilibrio en sentido contrario y que por lo tanto tiene que ser eliminado del medio de reacción para conseguir altos rendimientos de los ésteres. Otro inconveniente de los ácidos carboxílicos es su acidez intrínseca que puede desactivar la lipasa a través de reusos consecutivos.

Una manera de superar estos problemas es la utilización de ésteres vinílicos como dadores de grupos acilo. En este caso, el grupo saliente en la transesterificación es un enol que tautomeriza a la forma cetónica (acetaldehído) rápidamente haciendo la reacción irreversible. Además, la utilización de ésteres elimina el problema de desnaturalización asociado a la acidez del ácido carboxílico.

Los ésteres vinílicos se utilizan ampliamente en reacciones de polimerización y existe una gran variedad disponible comercialmente a un precio competitivo. Por ello se decidió llevar a cabo el proceso en cascada utilizando el hexanoato de vinilo como grupo

dador de acilo. Como se puede observar en la Tabla 5. 6 (entrada 5), se pudo obtener un excelente rendimiento al diéster (97 %) con 100 % de selectividad en tan solo 0,5 h de reacción.

5.2.4. Estudio del proceso quimioenzimático en cascada de la síntesis de los diésteres del BHMF mediante reactores de lecho fijo

Aunque el proceso quimioenzimático (reducción-(trans)esterificación) mediante reactores en batch o discontinuos presentados anteriormente proporciona un excelente rendimiento y selectividad al diéster deseado, se pensó que la automatización del proceso de reducción-(trans)esterificación utilizando dos reactores en continuo resultaría interesante desde un punto de vista industrial.

Para ello, inicialmente se estudió el proceso de reducción del HMF a BHMF usando Co@C como catalizador y 2-MTHF como disolvente. Desafortunadamente, se observó la rápida desactivación del catalizador obteniéndose una conversión del HMF del orden del 60 % tras 2 h de reacción en continuo. Como se ha mostrado anteriormente cuando se eligió metanol como disolvente para esta etapa del proceso, se observó una menor desactivación del catalizador (Figura 5. 11). Así pues, se continuó la experiencia con este disolvente y se optimizó la temperatura y el flujo del reactor de reducción. Como se puede observar en la Figura 5. 14, se obtuvieron excelentes resultados en términos de conversión, selectividad y estabilidad del catalizador en el proceso en continuo, trabajando a 90 °C, con un flujo de 0,2 mL/min. El reactor en continuo se mantuvo durante 60 h de operación sin pérdidas de actividad obteniéndose un rendimiento medio del 90 % de BHMF (Figura 5. 15).

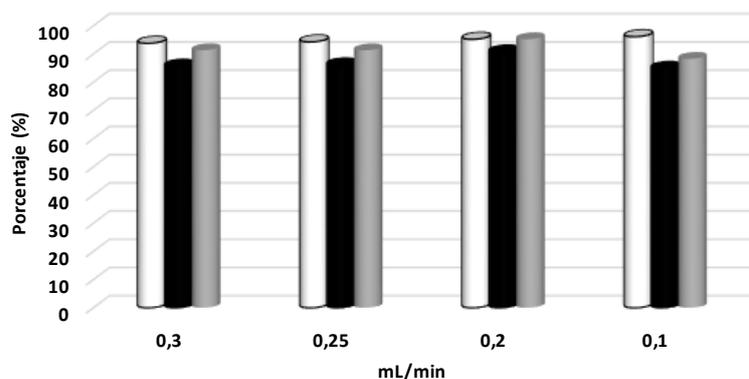


Figura 5. 14. Optimización del flujo en la hidrogenación del HMF en un reactor en continuo. (Condiciones de reacción: HMF en metanol (1,5 % en peso), temperatura: 90 °C, Co@C 0,335 g, 10 bar H₂). Flujo: 0,3 mL/min (WHSV 0,66 h⁻¹, tiempo de contacto 1,52 h), 0,25 mL/min (WHSV 0,55 h⁻¹, tiempo de contacto 1,82 h), 0,20 mL/min (WHSV 0,44 h⁻¹, tiempo de contacto 2,27 h), 0,10 mL/min (WHSV 0,22 h⁻¹, tiempo de contacto 4,55 h). (□) Conversión de HMF, (■) Rendimiento a BHMF, (▒) Selectividad a BHMF.

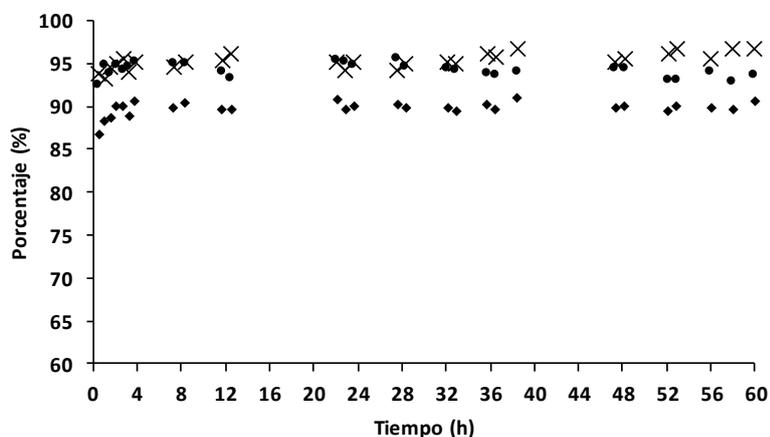


Figura 5. 15. Resultados de la hidrogenación del HMF en un reactor en continuo en presencia de Co@C. Condiciones de reacción HMF en metanol (1,5 % en peso), flujo 0,20 mL/min (WHSV: 0,44 h⁻¹) 90 °C, 10 bar H₂. Conversión HMF (●), Rendimiento de BHMF (◆), Selectividad a BHMF (x).

Una vez optimizada la primera etapa del proceso, se continuó con el estudio de la transesterificación del BHMF usando hexanoato de vinilo como compuesto dador de grupos acilo y Novozym 435 en un reactor en continuo. En este caso una disolución de BHMF disuelta en 2-MTHF (1,5 % en peso) y hexanoato de vinilo (6,5 % en peso) se alimentó en un reactor continuo a 35 °C. Inicialmente se realizó el estudio del flujo óptimo del reactor de transesterificación. Como se puede observar en la Figura 5. 16, el flujo óptimo del reactor fue de 0,2 mL/min que corresponde a un tiempo de contacto de 2,1 h. Bajo estas condiciones de reacción la producción del diéster de BHMF se mantuvo en un rendimiento medio del 98 % durante más de 60 h (Figura 5. 17) sin observarse pérdidas de actividad.

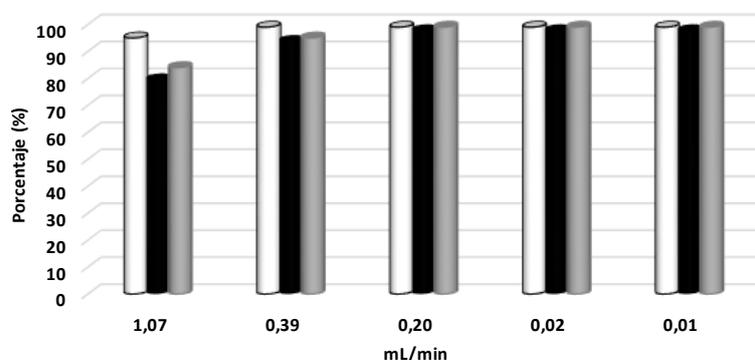


Figura 5. 16. Optimización del flujo en la transesterificación del BHMF en un reactor en continuo. Condiciones de reacción: BHMF en 2-MTHF (1,5 % en peso), hexanoato de vinilo (6,5 % en peso), 35 °C, Novozym 435 (0,330 g). Flujo: 1,07 mL/min (WHSV 2,5 h⁻¹, tiempo de contacto 0,4 h), 0,39 mL/min (WHSV 0,91 h⁻¹, tiempo de contacto 1,1 h), 0,20 mL/min (WHSV 0,48 h⁻¹, tiempo de contacto 2,1 h), 0,02 mL/min (WHSV 0,06 h⁻¹, tiempo de contacto 18 h), 0,01 mL/min (WHSV 0,02 h⁻¹, tiempo de contacto 60 h). (□) Conversión de BHMF, (■) Rendimiento al diéster de BHMF, (▨) Selectividad al diéster de BHMF.

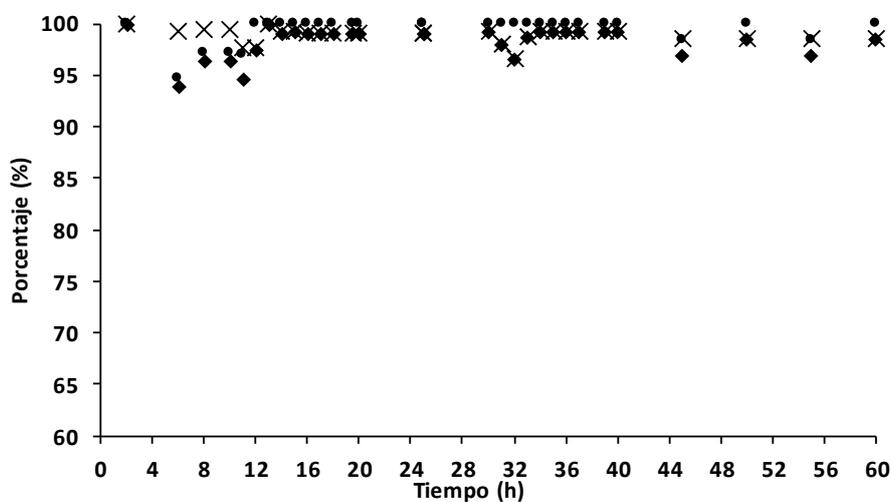


Figura 5. 17. Resultados de la transesterificación del BHMF en un reactor en continuo en presencia de Novozym 435. Condiciones de reacción BHMF en 2-MTHF (1,5 % en peso), hexanoato de vinilo (6,5 % en peso), flujo 0,20 mL/min (WHSV: 0,48 h⁻¹) 35 °C. Conversión BHMF % (●), Rendimiento del diéster de BHMF (◆), Selectividad al diéster de BHMF (x).

Finalmente, se acoplaron los dos reactores, uno para cada una de las etapas del proceso quimioenzimático. La primera etapa de reducción del HMF a BHMF se realizó en un

reactor de lecho fijo en continuo que contenía Co@C, este fue alimentado con una disolución de HMF en metanol (1,5 % en peso), (0,2 mL/min) a 90 °C y 10 bar de H₂ durante 60 h. A continuación, se eliminó el metanol por evaporación y se añadió 2-MTHF y hexanoato de vinilo finalmente esta disolución formada por 2-MTHF conteniendo (BHMF 1,3 % en peso) y hexanoato de vinilo (6 % en peso) se usó para alimentar el segundo reactor donde se encontraba la lipasa Novozym 435, a 35 °C, durante 60 h. Como se puede observar en la Figura 5. 18, la estabilidad del proceso global se mantuvo durante este tiempo y se obtuvo un rendimiento global del 88 %.

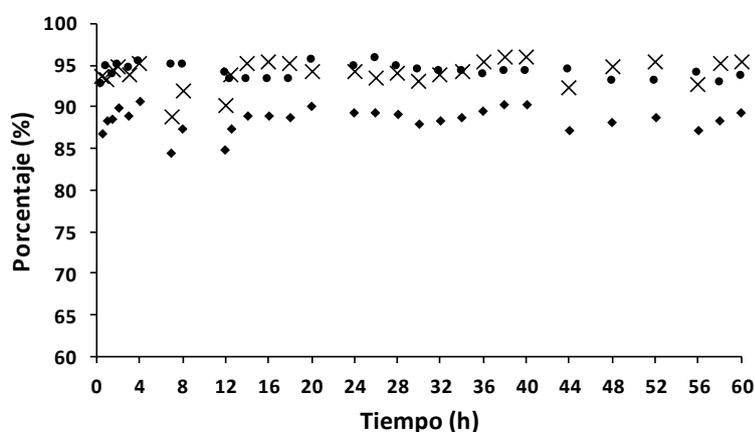


Figura 5. 18. Resultados del proceso quimioenzimático en dos reactores continuos. Primera etapa: hidrogenación del HMF usando Co@C. Segunda etapa: transesterificación del BHMF usando Novozym 435 y hexanoato de vinilo. Conversión HMF (●), Rendimiento global (◆), Selectividad Global (x).

Estos resultados demuestran que es posible acoplar los dos procesos catalíticos en un proceso quimioenzimático global, simplemente es necesario eliminar el metanol una vez acabada la primera etapa, y posteriormente introducir el hexanoato de vinilo disuelto en 2-MTHF.

5.3. Conclusiones Parciales

Se ha llevado a cabo la preparación de diésteres del BHMF útiles como agentes plastificantes en polímeros a través de un proceso quimioenzimático en cascada que implica como primer paso la hidrogenación selectiva del HMF en BHMF utilizando un catalizador metálico y como segunda etapa la esterificación del BHMF con grupos dadores de acilo catalizada por una lipasa comercial (Novozym 435).

La optimización de la etapa de reducción del HMF (temperatura, presión de H₂ y disolvente) ha mostrado que es posible obtener BHMF con excelentes rendimientos y selectividades utilizando un catalizador de Co (Co@C) consistente en nanopartículas de Co⁰

recubiertas de carbón. Este catalizador presenta una actividad y selectividad similar a los catalizadores basados en metales nobles, bajo condiciones de reacción moderadas.

Mediante la selección del disolvente adecuado, la etapa de reducción se ha podido acoplar a la etapa de esterificación del BHMF con diferentes ácidos carboxílicos como dadores de grupos acilo utilizando la lipasa soportada (Novozym 435), observándose una desactivación importante de la lipasa durante reusos consecutivos. Esta desactivación se atribuye principalmente a la acidez intrínseca del ácido carboxílico que puede desnaturar la enzima.

Sin embargo, se han obtenido excelentes resultados en cuanto actividad, selectividad y estabilidad del catalizador enzimático cuando se han utilizado como grupos dadores de acilo los ésteres vinílicos en la reacción en cascada.

El proceso que ha dado buenos rendimientos del diéster del BHMF en reactores tipo batch, se ha implementado acoplando dos reactores en continuo de lecho fijo. Uno de ellos conteniendo el catalizador metálico de Co y el otro la lipasa, obteniéndose un rendimiento global al diéster deseado cercano al 90 %, y que se ha mantenido estable durante 60 h de operación.

Estos resultados muestran que es posible la obtención de agentes plastificantes derivados de la biomasa a nivel industrial, como alternativa a los ftalatos de toxicidad comprobada, provenientes del petróleo.

5.4. Sección Experimental

5.4.1. Materiales

El HMF (pureza >97 %) se adquirió a Carbosynth. La lipasa Novozym 435, el 2-MTHF, los ácidos acético, butírico, hexanoico, octanoico, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaOH, Na_2EDTA se adquirieron de Sigma Aldrich. El tamiz molecular Molecular sieves, 4A, 1-2 mm (0.04-0.08in) beads fue adquirido en Alfa Aesar. El hexanoato de vinilo fue adquirido en Tokio chemical industry.

5.4.2. Síntesis de catalizadores

5.4.2.1 Preparación del catalizador $\text{Co}@C$

El catalizador $\text{Co}@C$ fue preparado de acuerdo con la Liu y col.²¹⁰ este método consiste en una combinación de síntesis hidrotermal y calcinación *in situ* con H_2 . Una mezcla de 6,98 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4,47 g Na_2EDTA , y 0,96 g NaOH se disuelven en 20 mL de agua desionizada.

A continuación, se añaden a esta disolución 10 mL de metanol a temperatura ambiente. Una vez se obtiene una disolución homogénea, 23 mL de esta mezcla se transfieren a un autoclave de acero inoxidable de 35 mL de capacidad, y se continua con una síntesis

hidrotermal en estático a 200 °C durante 24 h. El precipitado obtenido, se filtra y se lava con agua desionizada y acetona vigorosamente. El sólido purpura obtenido, el complejo Co-EDTA, es reducido con un flujo estable de H₂ (50 mL/min), y con una rampa de temperatura 10 °C/min hasta alcanzar la temperatura de 450 °C y se mantiene durante 4 h. Por último, el catalizador obtenido se deja enfriar a temperatura ambiente en atmósfera de H₂, y este sólido es el catalizador Co@C. El análisis de ICP muestra que la cantidad de cobalto en peso es ≥ 95 %.

5.4.2.2 Preparación del catalizador Co@C a partir de la descomposición térmica de precursor metal-orgánico (MOF)

La red metal-orgánica (Co-BTC) se preparó siguiendo Liu y col.²¹¹ utilizando ácido trimésico como ligando. Para ello, se disolvieron 1,05 g de ácido trimésico y 2,91 g de nitrato de cobalto hexahidratado, en una mezcla de disolventes (20 mL de DMF + 20 mL de H₂O + 20 mL de etanol) bajo agitación magnética a temperatura ambiente. Cuando todos los precursores sólidos se disolvieron, la mezcla se transfirió a un autoclave y se mantuvo a 100 °C durante 18 h. Después de la reacción hidrotermal, el sólido púrpura se lavó y se secó a 60 °C. El catalizador Co@C-BTC se obtuvo por descomposición térmica de Co-BTC-MOF en Ar a 600 °C. La muestra se redujo previamente con H₂ a 160 °C antes de las pruebas catalíticas. El análisis de ICP muestra que la cantidad de cobalto en peso es de 30 % en peso.

5.4.2.3 Preparación del catalizador Co@C/C

El catalizador de Co@C/C se preparó de acuerdo con Liu y col.²¹¹ Para ello se mezclaron acetato de cobalto (II) tetrahidratado (127 mg) y 1,10 fenantrolina (184 mg) (Co: fenantrolina = relación 1: 2 M) y se disolvieron en etanol (50 mL) a temperatura ambiente. A continuación, se añadió carbón en polvo (690 mg) (VULCAN® XC72R, Cabot Corporation) y la mezcla completa se calentó a reflujo durante 4 h. La suspensión se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente fue eliminado por evaporación. El sólido obtenido se secó a 60 °C durante 12 h. Por último, el sólido se calentó en un horno a 800 °C con una rampa de temperatura de 25 °C/min, y se mantuvo a 800 °C durante 2 h bajo atmósfera de Ar. Después de eso, el sólido se enfrió a temperatura ambiente. El análisis de ICP muestra que la cantidad de cobalto es del 3 % en peso.

5.4.3. Caracterización del catalizador

El contenido de metal en las muestras fue analizado mediante (Espectrometría de emisión atómica con Plasma Acoplado Inductivamente) usando un equipo Varian 715-ES.

Las muestras para los estudios de microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de transmisión de barrido (TEM y STEM) se realizaron en un microscopio JEOL 2100F con un voltaje de trabajo de 200 Kv. Las imágenes de STEM fueron realizadas usando el detector HAADF (High angle annular dark field). Las muestras se

prepararon dejando caer la suspensión de la muestra (utilizando CH₂Cl₂ como disolvente) directamente sobre rejillas de cobre o níquel.

Las muestras para microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) se realizaron en un equipo Zeiss Ultra 55 utilizando un detector de electrones retrodispersados (ESB) o (Energy selective Backscattered) las muestras se prepararon depositando el material sobre una cinta de carbono doble adhesiva.

Las imágenes de microscopía Raman fueron realizadas a temperatura ambiente usando un láser Renishaw Raman spectrometer “Reflex” equipado con un microscopio Olympus y un detector CCD utilizando una longitud de onda $\lambda=785$ nm. La potencia del láser sobre la muestra fue 15 mW con 20 adquisiciones por espectro.

La difracción de rayos X (XRD) se realizó empleando un difractómetro CUBIX de PANalytical utilizando radiación Cu K α .

5.4.4. Experimentos catalíticos

5.4.4.1 Reacción de hidrogenación del HMF

La reducción de los compuestos carbonílicos se llevó a cabo en un autoclave de acero inoxidable de 13 mL de capacidad con un recipiente de teflón que contiene una barra de agitación magnética. Así, en el reactor se introdujeron HMF (0,5 mmol), Co@C (10 mg), metanol (5 mL) y dodecano como patrón interno. Posteriormente, el reactor se cerró herméticamente y se purgó tres veces con 10 bar de hidrógeno y luego se presurizó con 10 bar de H₂. La velocidad de agitación se mantuvo a 950 rpm. Finalmente, la reacción se calentó a 110 °C. Los productos se analizaron por CG (Varian CP 3800) equipado con una columna capilar (Suprawax250, dimensiones 15mx0.32mmx0.25 μ m) y un detector FID, y las características estructurales específicas de los productos se identifican por CG-MS (Agilent 7890). El balance molar se verificó en cada prueba y fue superior al 97 %.

5.4.4.2 Reacción de esterificación/transesterificación enzimática

En un reactor de vidrio de 3 mL de capacidad, que contenía una disolución de 2,5-bis(hidroximetil) furano (6,4 mg, 0,05 mmol), ácido carboxílico (0,2 mmol), en 2-MTHF (1 mL) se le añadió 200 mg de tamiz molecular y 25 mg de lipasa (Novozym 435). El reactor se cerró herméticamente y la mezcla de reacción se agitó a 800 rpm manteniendo la temperatura a 35 °C durante 24 h. El análisis de CG se realizó en un aparato Varian CP-3800 equipado con una columna capilar (Suprawax250, dimensiones 15mx0.32mmx0.25 μ m). El balance molar se verificó en cada prueba y se confirmó que era superior al 98 %.

5.4.4.3 Reacción en cascada (hidrogenación-transesterificación) en reactor discontinuo

En un reactor de acero inoxidable de 13 mL de capacidad que contenía Co@C (10 mg), se le añadió (0,5 mmol) de HMF disueltos en 5 mL de 2-MTHF. El reactor se purgó con una corriente de H₂ y se presurizó a 10 bar de H₂. Cuando la conversión del HMF en BHMF fue aproximadamente del 92 %, el catalizador se eliminó con una barra magnética y el metanol se eliminó por destilación. A continuación, se le añadió 2 mmol de ácido carboxílico, lipasa (250 mg) y 2 g de tamiz molecular. La reacción de esterificación/transesterificación se llevó a cabo a la temperatura de 35 °C, durante el tiempo necesario según el compuesto dador de grupos acilo. Los productos de la reacción se analizaron por CG y CG-MS. Para llevar a cabo los estudios de reciclado de la enzima, tras la esterificación la fase orgánica fue retirada por filtración. La enzima fue separada del tamiz molecular utilizando un colador apropiado, posteriormente se lavó varias veces con acetona, se secó y se usó en el siguiente ciclo de reacción.

5.4.4.4 Reacción de reducción del HMF en reactor continuo de lecho fijo

La hidrogenación del HMF en presencia de Co@C en un reactor continuo de lecho fijo se realizó en un reactor tubular de acero inoxidable. En un experimento típico, el Co@C reducido (0,335 g) fue tamizado en un rango de partícula de 0,2-0,4 mm y diluido en carburo de silíceo se introdujo en el reactor (0,65 cm diámetro externo). El catalizador fue reducido previamente a 170 °C, 10 bar H₂, bajo un flujo de 50 mL/min, de mezcla H₂/N₂ (80/20) durante 2 h, tras esto el reactor fue calentado a 90°C, utilizando un termopar en contacto directo con el lecho catalítico. A continuación, una disolución de HMF en metanol (1,5 % en peso) fue introducida en el reactor utilizando una bomba de HPLC (Gilson 305 HPLC Pump) a un flujo de 0,2 mL/min junto con una corriente de H₂/N₂ a un flujo de 50 mL/min manteniéndose la presión a 10 bar. Este flujo corresponde a una velocidad espacial (WSHV) de 0,44 h⁻¹ o un tiempo de contacto de 2,27 h, que fue calculado de acuerdo con la Ecuación 5. 1 y Ecuación 5. 2. El producto obtenido fue acumulado a baja temperatura y analizado por cromatografía de gases usando dodecano como estándar en un aparato Varian CP-3800 equipado con una columna capilar (Suprawax250, dimensiones 15m x 0.32mm x 0.25µm). El balance molar se verificó en cada prueba y se confirmó que era superior al 97 %.

$$\text{Velocidad espacial } \left(\frac{1}{h}\right) = \frac{g_{\text{reactivo limitante}}}{g_{\text{catalizador}}}$$

Ecuación 5. 1

$$\text{Tiempo de contacto } (h) = \frac{1}{\text{Velocidad espacial}}$$

Ecuación 5. 2

5.4.4.5 Reacción de transesterificación del BHMF en reactor continuo de lecho fijo

La transesterificación del BHMF en presencia de la enzima Novozym 435 en un reactor continuo de lecho fijo se realizó en un reactor tubular de acero inoxidable. En un experimento típico, la lipasa Novozym 435 (0,33 g) se ha diluido en tamiz molecular 4A y se introdujo en el reactor (1 mm de diámetro interno, 35 mm de longitud).

El reactor fue calentado a 35 °C, utilizando una manta calefactora y un termopar. A continuación, una disolución de BHMF en 2-MTHF (1,5 % en peso) y hexanoato de vinilo (6,5 %) fue introducida en el reactor utilizando una bomba de HPLC (Gilson 305 HPLC Pump) a un flujo de 0,2 mL/min. Este flujo corresponde a una velocidad espacial (WSHV) de 0,48 h⁻¹ o un tiempo de contacto de 2,1 h, que fue calculado de acuerdo con la Ecuación 5. 1 y Ecuación 5. 2. Las muestras fueron recogidas a tiempos regulares y analizadas usando cromatografía de gases utilizando un equipo Varian CP-3800 equipado con una columna capilar (Suprawax250, dimensiones 15m x 0.32mm x 0.25µm). Dodecano fue usado como patrón externo y el balance molar se verificó en cada prueba y se confirmó que era superior al 97 %.

Los productos fueron caracterizados por RMN ¹H, RMN ¹³C y CG-MS:

Diacetato de 2,5-bis(hidroximetil) furano: RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD, δ): 6.41 (s, 2H), 5.03 (s, 4H), 2.05 (s, 6H); RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ 172.25, 151.84, 112.44, 58.98, 20.64; EIMS (70 eV) m/z (%) 212 [M]⁺ (2), 153 (33), 110 (100), 43 (38).

Dibutanoato de 2,5-bis(hidroximetil) furano: RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD, δ): 6.41 (s, 2H), 5.04 (s, 4H), 2.31 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H), 1.67–1.59 (m, 4H), 0.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 6H); RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ 174.73, 151.92, 112.33, 58.79, 36.76, 19.40, 13.81; EIMS (70 eV) m/z (%) 268 [M]⁺ (1), 181 (40), 110 (100), 71 (61).

Dihexanoato de 2,5-bis(hidroximetil) furano: RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD, δ): 6.41 (s, 2H), 5.04 (s, 4H), 2.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H), 1.63–1.56 (m, 4H), 1.31–1.28 (m, 8H), 0.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H); RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ 174.88, 151.91, 112.37, 58.80, 34.85, 32.31, 25.69, 23.35, 14.24; EIMS (70 eV) m/z (%) 324 [M]⁺ (1), 209 (37), 110 (100), 99 (62).

Diocetanoato de 2,5-bis(hidroximetil) furano: RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD, δ): 6.41 (s, 2H), 5.04 (s, 4H), 2.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H), 1.63–1.58 (m, 4H), 1.33–1.27 (m, 16H), 0.90 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H); RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ 174.88, 151.91, 112.36, 58.80, 34.89, 32.84, 30.05, 26.01, 23.64, 14.40; EIMS (70 eV) m/z (%) 380 [M]⁺ (1), 127 (55), 110 (100), 57 (33).

Obtención de diésteres del 2,5-bis(hidroximetil)furano (BHMF) a partir del 5-hidroximetilfurfural (HMF)

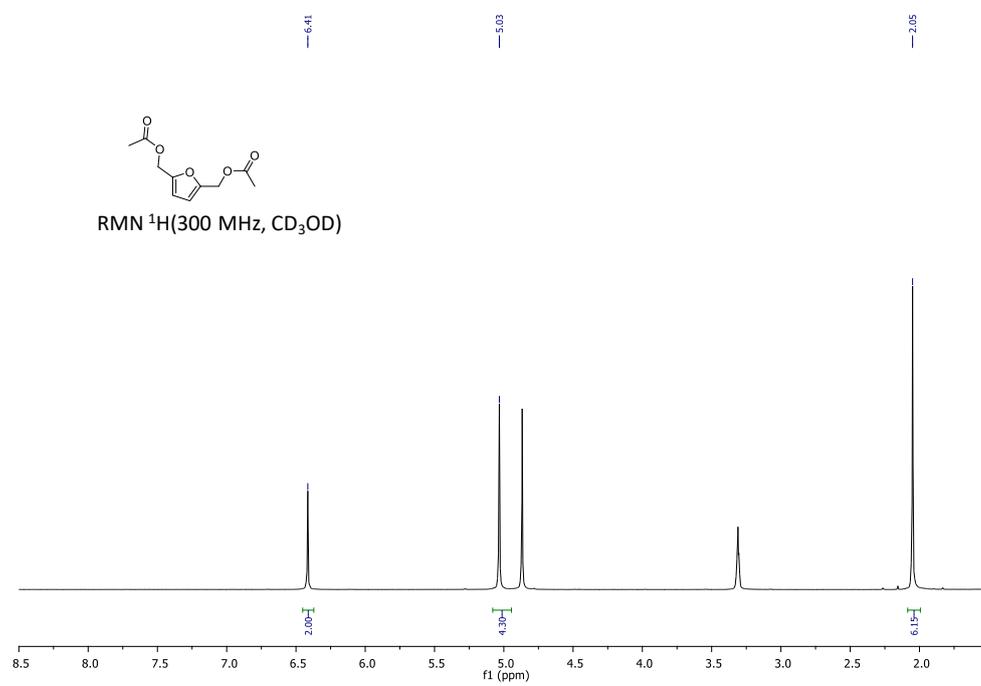


Figura 5. 19. RMN ^1H Diacetato de 2,5-bis(hidroximetil) furano.

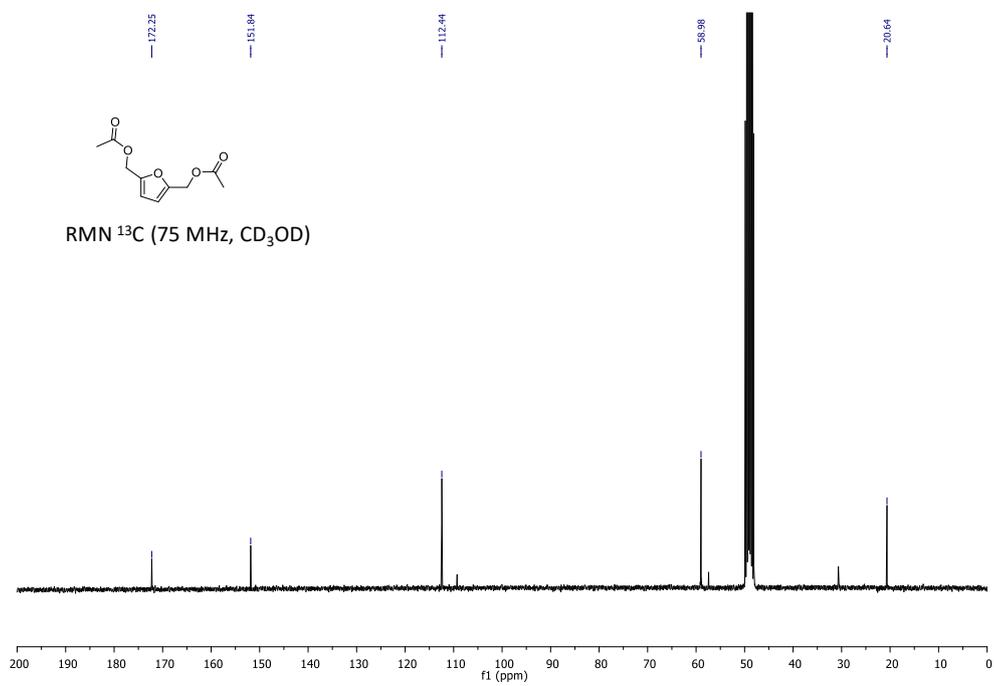


Figura 5. 20. RMN ^{13}C Diacetato de 2,5-bis(hidroxi metil) furano.

Obtención de diésteres del 2,5-bis(hidroximetil)furano (BHMF) a partir del 5-hidroximetilfurfural (HMF)

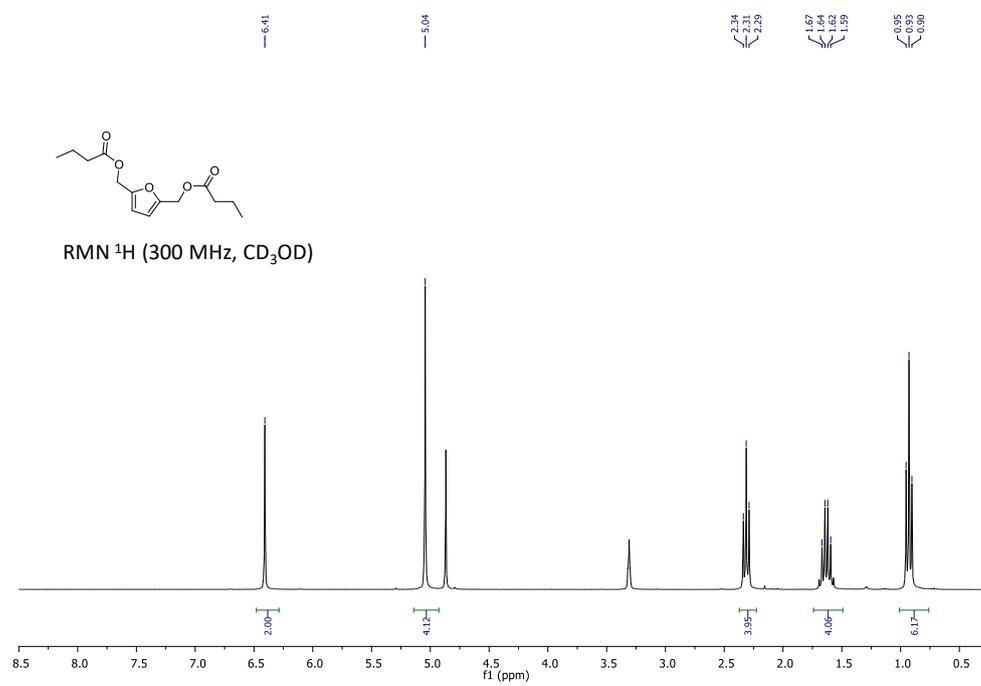


Figura 5. 21. RMN ^1H Dibutanoato de 2,5-bis(hidroximetil) furano.

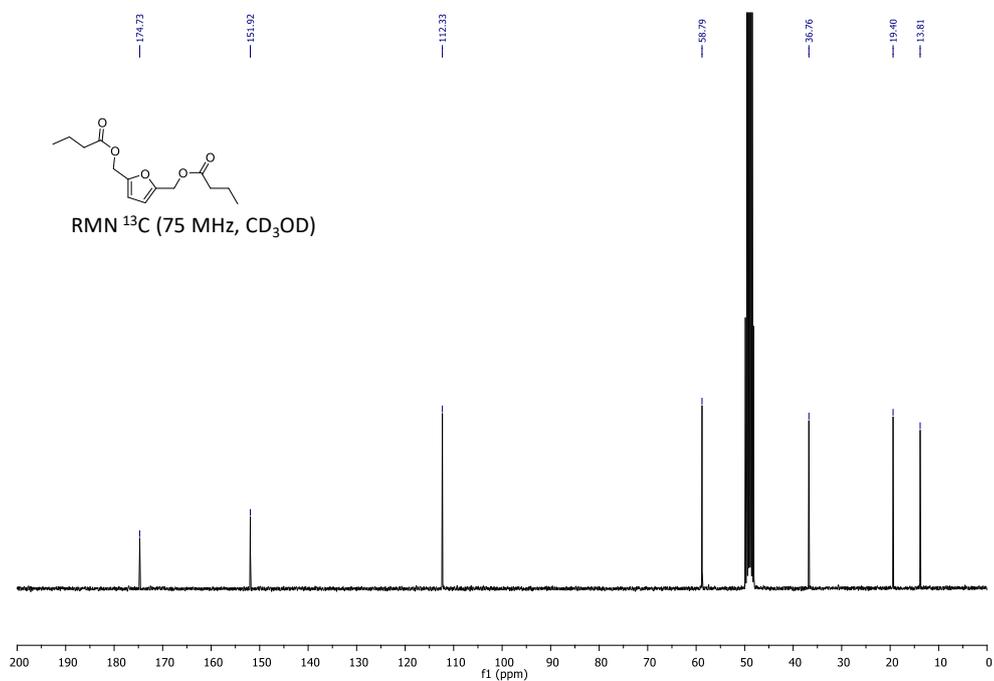


Figura 5. 22. RMN ^{13}C Dibutanoato de 2,5-bis(hidroxi metil) furano.

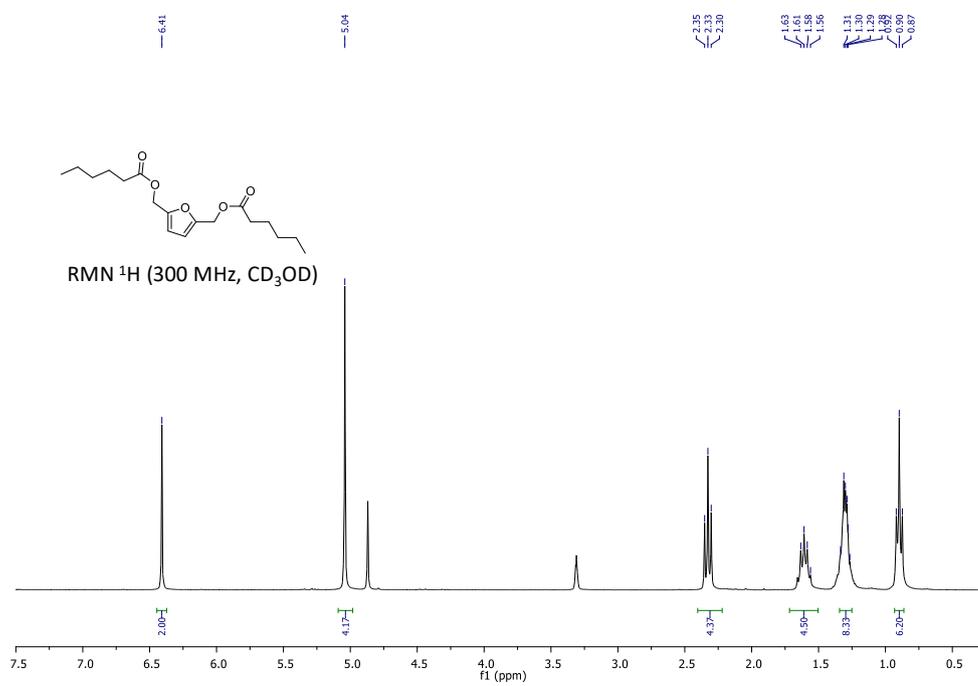


Figura 5. 23. RMN ¹H Dihexanoato de 2,5-bis(hidroxi metil) furano.

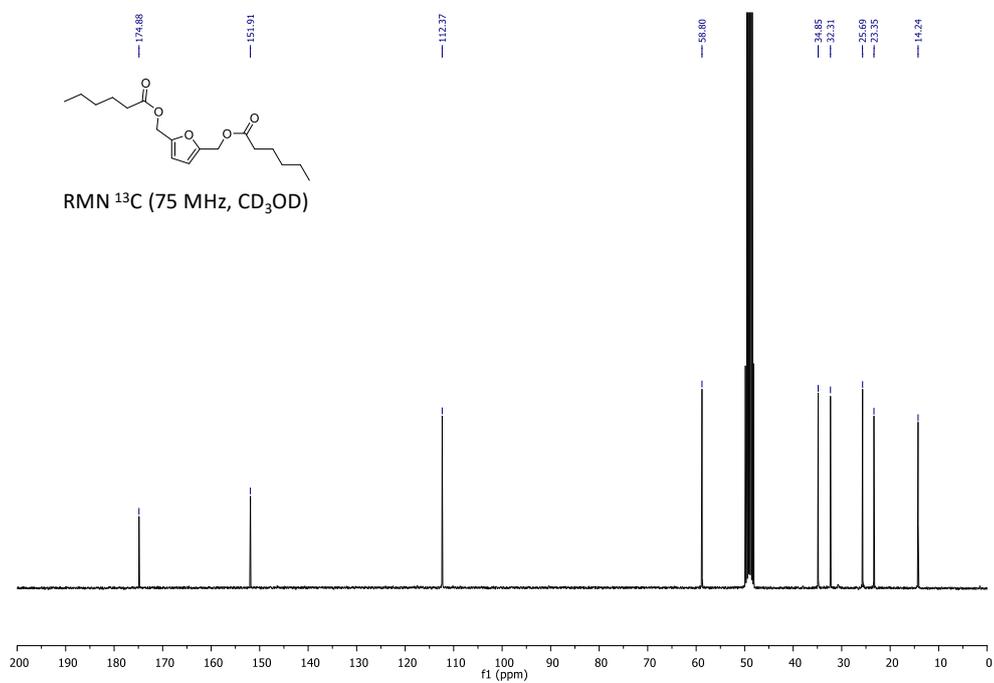


Figura 5. 24. RMN ¹³C Dihexanoato de 2,5-bis(hidroxi metil) furano.

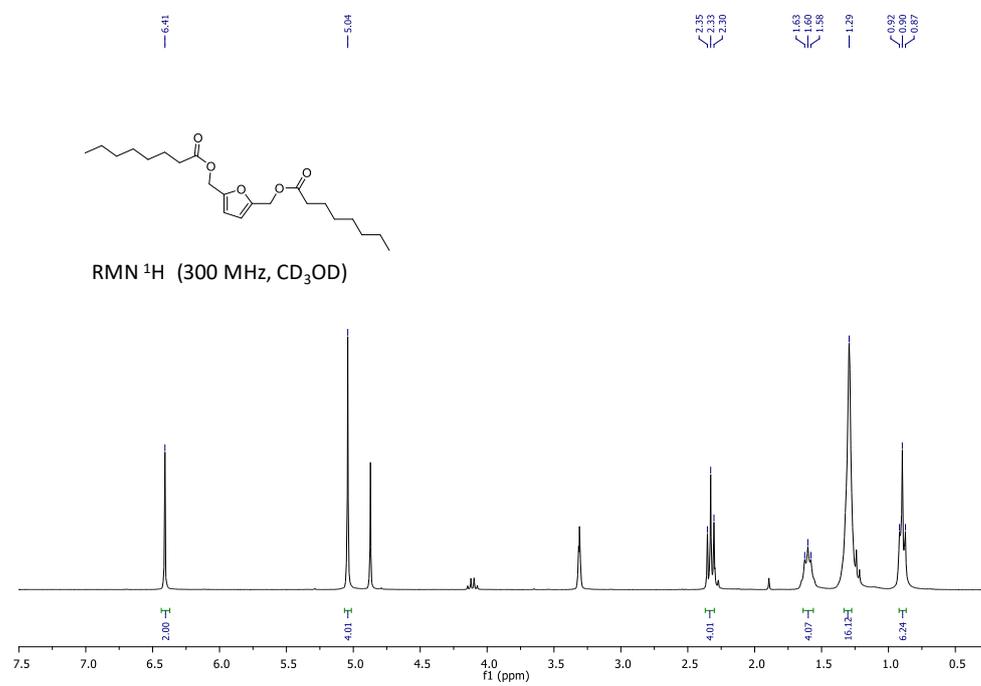


Figura 5. 25. RMN ¹H Diocetanoato de 2,5-bis(hidroximetil) furano.

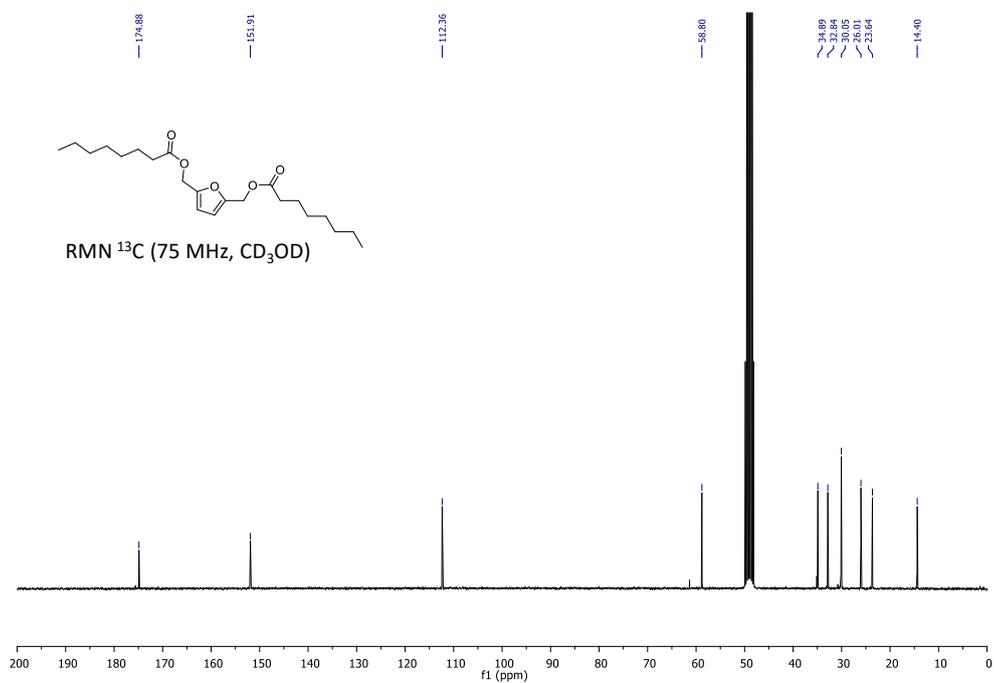


Figura 5. 26. RMN ^{13}C Dioctanoato de 2,5-bis(hidroxi metil) furano.

Capítulo 6 Conclusiones

Conforme a los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se presentan las siguientes conclusiones generales:

- i) Se ha llevado a cabo la síntesis de los flavonoides prunina y naringenina mediante la hidrólisis enzimática de la naringinasa. Se ha mostrado que es posible purificar la naringinasa comercial (NgsaC) de *Penicillium decumbens* mediante un método sencillo que implica una resina y un gradiente específico de NaCl, obteniéndose una enzima purificada (NgsaP) con alta actividad α -L-ramnosidasa que hidroliza selectivamente la naringina a prunina. Se ha llevado a cabo la inmovilización covalente sobre óxido de grafeno y la zeolita laminar previamente modificada con grupos aldehído en la superficie. El estudio de la actividad enzimática en la hidrólisis del sustrato p-nitrofenil- α -L-ramnopiranosido mostró que las enzimas inmovilizadas se vieron menos afectados por cambios de temperatura y mostraron mayor afinidad por el sustrato que las enzimas en forma libre. Además, las enzimas inmovilizadas mostraron una gran capacidad en la producción de los flavonoides naringenina y prunina siendo posible realizar más de diez ciclos consecutivos de reacción. Finalmente, se ha llevado a cabo con éxito la reducción del sabor amargo de un zumo de pomelo utilizando la naringinasa comercial inmovilizada covalentemente sobre la zeolita ITQ-2, en un reactor en continuo de lecho fijo que se mantuvo operando 300 h sin pérdida de actividad.

- ii) Se ha llevado a cabo el desarrollo de una nueva ruta sintética para la desracemización de alcoholes secundarios a través de un proceso redox quimioenzimático en cascada. El proceso implica como primera etapa la oxidación de Oppenauer de un alcohol racémico utilizando la zeolita Zr-Beta como catalizador ácido de Lewis y acetona como aceptor de hidruros. Obteniéndose la correspondiente cetona proquiral e isopropanol como subproducto. En la segunda etapa se produce la reducción de la cetona al alcohol enantioméricamente puro utilizando la enzima alcohol deshidrogenasa inmovilizada electrostáticamente sobre la zeolita laminar ITQ-2 e isopropanol como regenerador del cofactor. Ambas etapas se han acoplado en dos reactores continuos de lecho fijo, el primero conteniendo la zeolita Zr-Beta y el segundo conteniendo la enzima inmovilizada, utilizando el isopropanol

producido como subproducto entre la primera etapa como agente regenerador del cofactor (NAD⁺ o NADP⁺). Ambos reactores se han mantenido funcionando durante más de 100 h, obteniéndose los correspondientes alcoholes con un exceso enantiomérico > 99 %.

- iii) Se ha llevado a cabo la síntesis de diésteres del 2,5-bis(hidroxi metil) furano (BHMF) útiles como agentes plastificantes a partir del 5-hidroxi metil furfural (HMF) mediante un proceso quimioenzimático en cascada que implica como primera etapa la reducción del HMF en BHMF utilizando hidrógeno y nanopartículas de metales no nobles, recubiertas con una fina capa de carbón como catalizador y como segunda etapa la esterificación enzimática del BHMF con compuestos dadores de acilo (ésteres o ácidos carboxílicos) utilizando una lipasa soportada (Novozym 435). Se ha mostrado que la reducción quimioselectiva de HMF se puede llevar a cabo con éxito utilizando un catalizador basado en nanopartículas de Co (Co@C) obteniéndose excelentes rendimientos a BHMF en condiciones suaves de reacción muy semejantes a las que se utilizan cuando se emplean metales nobles.

Mientras que la optimización de la etapa de esterificación del BHMF ha conducido a excelentes rendimientos y selectividades de los correspondientes diésteres. Ambas etapas se han acoplado primero en un reactor discontinuo (batch) y posteriormente en dos reactores en continuo de lecho fijo, donde el primer reactor contiene el catalizador Co@C y el segundo la lipasa inmovilizada y que han funcionado durante 60 h consecutivas sin pérdida de actividad. De esta manera se ha demostrado que es posible obtener altos rendimientos con excelente selectividad a los diésteres de BHMF.

Capítulo 7 Resumen, Resum, Abstract

Resumen

En esta Tesis Doctoral, se han desarrollado varias rutas catalíticas para la obtención de productos químicos de alto valor añadido y de interés para la industria alimentaria, farmacéutica o petroquímica del plástico, bajo los principios de la *Química Verde* y mediante catalizadores heterogéneos químicos y enzimáticos. En concreto, se ha desarrollado la hidrólisis enzimática de la naringina (un flavonoide ampliamente presente en los residuos cítricos) para la obtención de los flavonoides prunina y naringenina, que presentan aplicación farmacológica y alimentaria. Para ello, se ha purificado de manera simple y en un solo paso la naringinasa comercial del hongo *Penicillium decumbens* y se ha obtenido una enzima purificada que permite la obtención selectiva del flavonoide cítrico prunina. Ambas enzimas, la comercial y la purificada, se han inmovilizado covalentemente sobre un soporte orgánico (óxido de grafeno) y una zeolita bidimensional (ITQ-2) modificada con grupos aldehído en su superficie. Se han caracterizado los derivados enzimáticos obtenidos mostrando una alta estabilidad térmica y una mayor afinidad por el sustrato que la enzima libre. Los derivados enzimáticos se han implementado con éxito en la hidrólisis de la naringina y se han obtenido altas conversiones y selectividades. Además, la naringinasa inmovilizada sobre la zeolita ITQ-2 se ha aplicado al tratamiento de zumo de pomelo para reducir su sabor amargo (el cual es debido en parte a la presencia de naringina) mediante un proceso en reactor continuo de lecho fijo. Se ha mostrado que es posible mantener durante al menos 300 h la actividad catalítica del enzima inmovilizado, obteniéndose altas cantidades de azúcares liberados, la consecuente pérdida del sabor amargo y, además, aumentando la capacidad antioxidante del zumo de pomelo.

Se ha desarrollado un proceso quimioenzimático para la obtención de alcoholes quirales con aplicación farmacológica, mediante un proceso en continuo y en dos pasos (oxidación-reducción). En un primer paso, se ha llevado a cabo la oxidación de Oppenauer del alcohol racémico utilizando la zeolita Zr-Beta y, como aceptor de hidruros, acetona, obteniéndose la correspondiente cetona proquiral e isopropanol como subproducto. En un segundo paso, se ha realizado la reducción enantioselectiva de la cetona proquiral utilizando la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) inmovilizada electrostáticamente sobre la zeolita ITQ-2 y el isopropanol producido en el primer paso como regenerador del cofactor enzimático, obteniéndose altos rendimientos y enantioselectividades a los alcoholes quirales (R o S). Se ha mostrado que ambos sistemas catalíticos son altamente activos,

selectivos y estables, siendo posible mantener durante al menos 100 h rendimientos mayores del 90 % en reactores continuos de lecho fijo por separado. Finalmente, se han combinado ambas etapas en continuo que se han mantenido operativas durante al menos 40 h obteniéndose rendimientos al alcohol quiral mayores del 90 %.

Se ha desarrollado un proceso quimioenzimático en continuo y en dos etapas para la obtención de diésteres del 2,5-bis(hidroximetil)furano (BHMF) a partir del 5-hidroximetilfurfural (HMF), útiles como plastificantes en la industria de polímeros. La primera etapa consiste en la reducción quimioselectiva del HMF utilizando un catalizador basado en nanopartículas de cobalto recubiertas de carbono, obteniéndose altos rendimientos y selectividades al BHMF. En un segundo paso, se ha esterificado/transesterificado el BHMF, utilizando la enzima lipasa inmovilizada (Novozym 435). Se ha llevado a cabo la optimización de ambas etapas por separado (temperatura, presión de hidrógeno, disolvente, compuesto dador de grupos acilo, etc.) en reactores discontinuos y continuos de lecho fijo. Se ha mostrado que el disolvente óptimo del primer paso es el metanol, con el que se han obtenido altos rendimientos y selectividades a BHMF, aproximadamente 90 %. Además, se ha mostrado que el disolvente utilizado y el compuesto dador de grupos acilo influyen en la desactivación enzimática. La optimización del disolvente y el compuesto dador de acilo han permitido obtener rendimientos de aproximadamente el 90 % de diésteres en el proceso quimioenzimático global, manteniéndose la actividad y selectividad del proceso en continuo durante al menos 60 h.

Resum

En aquesta Tesi Doctoral s'han desenvolupat diverses rutes catalítiques per a l'obtenció de productes químics d'alt valor afegit i d'interès per a la indústria alimentària, farmacèutica i petroquímica del plàstic, baix els principis de la *Química Verda* i mitjançant catalitzadors heterogenis químics i enzimàtics. En concret, s'ha desenvolupat la hidròlisi enzimàtica de la naringina (un flavonoide àmpliament present en els residus cítrics) per a l'obtenció dels flavonoides prunina i naringenina, que presenten aplicació farmacològica o alimentària. Per tant, s'ha purificat de manera simple i només en un pas la naringinasa comercial del fong *Penicillium decumbens* i s'ha obtingut un enzim purificat que permet l'obtenció selectiva del flavonoide cítric prunina. Aquestes enzims, el comercial i el purificat, s'han immobilitzat covalentment sobre un suport orgànic (òxid de grafè) i una zeolita bidimensional (ITQ-2) modificada amb grups aldehyd en la seva superfície. S'han caracteritzat els derivats enzimàtics obtinguts mostrant una alta estabilitat tèrmica i una major afinitat pel substrat que l'enzim lliure. Els derivats enzimàtics s'han implementat amb èxit en la hidròlisi de la naringina i s'han obtingut altes conversions i selectivitats. A més, la naringinasa immobilitzada sobre la zeolita ITQ-2 s'ha aplicat al tractament de suc d'aranja per a reduir el seu sabor amarg (en part degut a la presència de naringina) mitjançant un procés en reactor continu de llit fix. S'ha mostrat que es pot mantenir durant almenys 300 h l'activitat catalítica de l'enzim immobilitzat, obtenint-se altes quantitats de sucres alliberats, la conseqüent pèrdua del sabor amarg i, a més, augmentant la capacitat antioxidant del suc d'aranja.

S'ha desenvolupat un procés quimioenzimàtic per a l'obtenció d'alcohols quirals amb aplicació farmacològica, mitjançant un procés en continu i en dos passos (oxidació-reducció). En un primer pas, s'ha dut a terme l'oxidació de Oppenauer de l'alcohol racèmic utilitzant la zeolita Zr-Beta i, acetona com a acceptor d'hidrurs, obtenint-se la corresponent cetona proquiral i isopropanol com subproducte. En un segon pas, s'ha realitzat la reducció enantioselectiva de la cetona proquiral utilitzant l'enzim alcohol deshidrogenasa (ADH) immobilitzada electrostàticament sobre la zeolita ITQ-2 i el isopropanol produït en el primer pas com a regenerador del cofactor enzimàtic, obtenint-se alts rendiments i enantioselectivitats als alcohols quirals (R o S). S'ha mostrat que tots dos sistemes catalítics són altament actius, selectius i estables, així, es possible mantenir durant almenys 100 h rendiments majors del 90 % en reactors continus de llit fix per separat. Finalment, s'han combinat totes dues etapes en continu que s'han mantingut operatives durant almenys 40 h, obtenint-se rendiments a l'alcohol quiral majors del 90 %.

S'ha desenvolupat un procés quimioenzimàtic en continu i en dues etapes per a l'obtenció de dièsters del 2,5-bis(hidroximetil)furà (BHMF) a partir del 5-hidroximetilfurfural (HMF), útils com a plastificants en la indústria de polímers. La primera etapa consisteix en la reducció quimioselectiva del HMF utilitzant un catalitzador basat en nanopartícules de cobalt recobertes de carboni, obtenint-se alts rendiments i selectivitats al BHMF. En la segona etapa, s'ha esterificat/transesterificat el BHMF, utilitzant l'enzim

lipasa immobilitzada (Novozym 435). S'ha dut a terme l'optimització de totes dues etapes per separat (temperatura, pressió d'hidrogen, dissolvent, compost dador de grups acil, etc.) en reactors discontinus i continus de llit fix. S'ha mostrat que el dissolvent òptim del primer pas és el metanol, amb el qual s'han obtingut alts rendiments i selectivitats a BHMF aproximadament 90 %. A més, s'ha mostrat que el dissolvent utilitzat i el compost dador de grups acil influeixen en la desactivació enzimàtica. La optimització del disolvent i el compost dador de grups acil han permet obtenir rendiments d'aproximadament el 90 % de dièsters en el procés quimioenzimàtic global, mantenint-se l'activitat i selectivitat del procés en continu durant almenys 60 h.

Abstract

In this Doctoral Thesis, several catalytic routes have been developed with the aim of obtaining chemical products of high added value and of interest to the food, pharmaceutical and plastic petrochemical industries, under the principles of *Green Chemistry* and through heterogeneous catalysts both chemical and enzymatic. Specifically, enzymatic hydrolysis of naringin (a flavonoid which is widely present in citric wastes) has been developed to obtain prunin and naringenin flavonoids, which have food and pharmaceutical applications. For this purpose, the commercial naringinase from the fungus *Penicillium decumbens* has been purified in a simple way in one step, and it has been obtained a purified enzyme which allows obtaining selectively the citric flavonoid prunin. Both enzymes, the commercial and the purified one, have been covalently immobilized over an organic support (graphene oxide) and over a bidimensional zeolite (ITQ-2) modified with aldehyde groups on its surface. The enzymatic derivatives have been characterized, and it has been shown that they have high thermal stability and more affinity for the substrate than the free enzyme. The enzymatic derivatives have been used successfully in the hydrolysis of naringenin, showing high conversions and selectivities. Additionally, the immobilized naringinase over the ITQ-2 zeolite has been used to treat the grapefruit juice to reduce the bitter taste (which is in part due to the presence of naringin) through a process in a fixed bed continuous reactor. It has been shown that is possible to maintain the catalytic activity through 300 hours, obtaining high quantities of released sugars, the lose of the bitter taste and, what is more, increasing the antioxidant capacity of the grapefruit juice.

A chemoenzymatic process has been developed with the aim of obtaining chiral alcohols with pharmaceutical applications, through a continuous process in two steps (oxidation-reduction). The first step is the Oppenauer oxidation of a racemic alcohol using Zr-Beta zeolite and acetone as hydride acceptor, and as a result, the corresponding prochiral ketone and isopropanol as by-product are obtained. The second step is the enantioselective reduction of the prochiral ketone using the alcohol dehydrogenase enzyme (ADH) electrostatically immobilized on the ITQ-2 zeolite and the isopropanol produced in the first step, which regenerates the cofactor; this process presents both a high yield and enantioselectivities to the chiral alcohols (R or S). It has been shown that both catalytic systems are highly actives, selectives and stables: with both of them it is possible to keep a yield higher than 90 % during at least 100 h in continuous reactors with fixed bed. Finally, both steps have been combined in continuous, and this reaction has been kept during at least 40 h with a yield to the chiral alcohol higher than 90 %.

A chemoenzymatic process in a continuous fixed bed reactor has been developed in two steps to obtain diesters of 2,5-bis(hydroxymethyl)furan (BHMF) from 5-hydroxymethylfurfural (HMF), which are useful as plasticizers in the polymer industry. The first step consists of the chemoselective reduction of the HMF using a catalyst based on cobalt nanoparticles covered by carbon, which allow obtaining high yield and selectivities to

BHMF. In the second step, the BHMF has been esterified/transesterified using the immobilized enzyme (Novozym 435). Both steps have been optimized separately (temperature, hydrogen pressure, solvent, acyl donor compound, etc.) in discontinuos and continuous reactors. The optimum solvent for the first step is methanol, which allow obtaining high yield and selectivity to BHMF, approximate 90 %. Moreover, it has been shown that the solvent and the acyl donor compound have strong influence on the enzymatic deactivation. The optimization of the solvent and acyl donor allowed to obtain yields of diesters of around 90 % in the global chemoenzymatic process, while the activity and selectivity of the continuous process was maintained during at least 60 h.

Capítulo 8 Bibliografía

- 1 Asamblea General Naciones Unidas, *Informe de comisión sobre medio ambiente y desarrollo Nuestro futuro común*, 1987.
- 2 Report of the United Nations, *Conference on Environment and Development*, Río de Janeiro, 1992.
- 3 P. T. Anastas and J. C. Warner, *Green Chemistry: theory and Practice, 12 Principles of Green Chemistry*, Oxford Uni., 1998.
- 4 B. M. Trost, *Science (80-.)*, 1991, **254**, 1471–1477.
- 5 R. A. Sheldon, *Green Chem.*, 2007, **9**, 1273–1283.
- 6 M. del C. D. Serrano, *Educ. química*, 2009, **20**, 412–420.
- 7 K. Van Aken, L. Streckowski and L. Patiny, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2006, **2**, 1–7.
- 8 G. Koller, U. Fischer and K. Hungerbühler, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2000, **39**, 960–972.
- 9 T. Hunter, *Cell*, 1995, **80**, 225–236.
- 10 J. S. Berg, B. C. Powell and R. E. Cheney, *Mol. Biol. Cell*, 2001, **12**, 780–794.
- 11 F. Martínez Granados and V. Fenoy López, *2B : biología : ciencias de la naturaleza y salud : [proyecto 2.2]*, Editorial Luis Vives, Madrid, EDELVIVES., 2003.
- 12 J. V. Sinisterra, Inmovilización de enzimas -1.
- 13 A. S. Bommarus and K. M. Polizzi, *Chem. Eng. Sci.*, 2006, **61**, 1004–1016.
- 14 M. D. Trevan, *Biochem. Educ.*, 1980, 138.
- 15 J. D. Dziezak, *Food Technol. J. Inst. Food Technol.*, 1991, **45**, 78–85.
- 16 F. Gallego López, Universidad Autónoma de Madrid, 2006.
- 17 K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, New York, Springer B., 1996.
- 18 R. Castañeda, J. L. Jordá, M. J. Díaz-Cabañas, V. Rives, V. Miguel Angel, P. Marta, A. Primo, Q. Manuel, M. María, L.-G. Lorena and L.-G. M.^a Pilar, *Materiales porosos y de alta superficie*, Madrid (España), PEARSON ED., 2014.
- 19 I. A. C. Ribeiro and M. H. L. Ribeiro, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2008, **51**, 10–18.

- 20 M. Puri, S. S. Marwaha and R. M. Kothari, *Enzyme Microb. Technol.*, 1996, **18**, 281–285.
- 21 D. Norouzian, A. Hosseinzadeh, D. N. Inanlou and N. Moazami, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **15**, 501–502.
- 22 U. Ghosh & H. Gangopadhyay, *Indian J. Chem. Technol.*, 2003, **10**, 701–704.
- 23 J. M. Guisan, *Immobilization of Enzymes and Cells*, HUMANA PRESS, Cantoblanco Madrid, Spain.
- 24 L. Cao, F. van Rantwijk and R. A. Sheldon, *Org. Lett.*, 2002, **2**, 1361–1364.
- 25 L. Cao, L. M. Van Langen, F. Van Rantwijk and R. A. Sheldon, *J. Mol. Catal. - B Enzym.*, 2001, **11**, 665–670.
- 26 P. López-Serrano, L. Cao, F. van Rantwijk and R. A. Sheldon, *Biotechnol. Lett.*, 2002, **24**, 1379–1383.
- 27 R. Schoevaart, M. W. Wolbers, M. Golubovic, M. Ottens, A. P. G. Kieboom, F. Van Rantwijk, L. A. M. Van Der Wielen and R. A. Sheldon, *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, **87**, 754–762.
- 28 L. Wilson, L. Betancor, G. Fernández-Lorente, M. Fuentes, A. Hidalgo, J. M. Guisán, B. C. C. Pessela and R. Fernández-Lafuente, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 814–817.
- 29 C. Mateo, J. M. Palomo, L. M. Van Langen, F. Van Rantwijk and R. A. Sheldon, *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, **86**, 273–276.
- 30 C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan and R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.*, 2007, **40**, 1451–1463.
- 31 L. Cao, *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*, Wiley-VCH., 2006.
- 32 A. Salis, E. Sanjust, V. Solinas and M. Monduzzi, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2003, **24–25**, 75–82.
- 33 T. Gitlesen, M. Bauer and P. Adlercreutz, *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.*, 1997, **1345**, 188–196.
- 34 R. M. Blanco, P. Terreros, N. Muñoz and E. Serra, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2007, **47**, 13–20.
- 35 U. T. Bornscheuer and R. J. Kazlauskas., *Hydrolases in Organic Synthesis*, Wiley-VCH., 2006, vol. 123.
- 36 N. W. J. T. Heinsman, C. G. P. H. Schroën, A. Van Der Padt, M. C. R. Franssen, R. M. Boom and K. Van'T Riet, *Tetrahedron Asymmetry*, 2003, **14**, 2699–2704.
- 37 L. Veum, M. Kuster, S. Telalovic, U. Hanefeld and T. Maschmeyer, *European J. Org. Chem.*, 2002, **9**, 1516–1522.
- 38 W. Tischer and F. Wedekind, in *Immobilized Enzymes: Methods and Applications*,

- ed. Fessner WD. et al., Berlin, Heidelberg, Springer., 1999, pp. 95–126.
- 39 C. D. Murphy, *Nat. Prod. Rep.*, 2006, **23**, 147–152.
- 40 S. Hudson, J. Cooney, B. K. Hodnett and E. Magner, *Chem. Mater.*, 2007, **19**, 2049–2055.
- 41 G. Dräger, C. Kiss, U. Kunz and A. Kirschning, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 3657–3664.
- 42 J. B. Wheatley and D. E. Schmidt, *J. Chromatogr. A*, 1999, **849**, 1–12.
- 43 N. Burteau, S. Burton and R. R. Crichton, *FEBS Lett.*, 1989, **258**, 185–189.
- 44 E. M. Lamas, R. M. Barros, V. M. Balcão and F. X. Malcata, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **28**, 642–652.
- 45 Q. Z. K. Zhou and X. Dong Chen, *J. Food Eng.*, 2001, **48**, 69–74.
- 46 R. M. Barros, C. I. Extremina, I. C. Gonçalves, B. O. Braga, V. M. Balcão and F. X. Malcata, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **33**, 908–916.
- 47 L. Reis-Costa, A. Soares, V. Franca, H. Trevisan and J. Roberts, *Protein Pept. Lett.*, 2003, **10**, 619–628.
- 48 E. Magnan, I. Catarino, D. Paolucci-Jeanjean, L. Preziosi-Belloy and M. P. Belleville, *J. Memb. Sci.*, 2004, **241**, 161–166.
- 49 S. S. Tukul and O. Alptekin, *Process Biochem.*, 2004, **39**, 2149–2155.
- 50 D. G. Hoare and D. E. Koshland, *J. Biol. Chem.*, 1967, **242**, 2447–2453.
- 51 M. A. Cambor, A. Corma and S. Valencia, *Microporous Mesoporous Mater.*, 1998, **25**, 59–74.
- 52 M. A. Cambor, A. Corma and S. Valencia, *J. Mater. Chem.*, 1998, **8**, 2137–2145.
- 53 J. F. Haw, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2002, **4**, 5431–5441.
- 54 E. B. Lami, F. Fajula, D. Anglerot and T. Des Courieres, *Microporous Mater.*, 1993, **1**, 237–245.
- 55 A. Corma, V. Fornés, S. Iborra, M. Mifsud and M. Renz, *J. Catal.*, 2004, **221**, 67–76.
- 56 A. Corma, L. T. Nemeth, M. Renz and S. Valencia, *Nature*, 2001, **412**, 423–425.
- 57 A. Corma and M. Renz, *Chem. Commun.*, 2004, **4**, 550–551.
- 58 A. Corma, M. E. Domine, L. Nemeth and S. Valencia, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 3194–3195.
- 59 A. Corma, M. E. Domine and S. Valencia, *J. Catal.*, 2003, **215**, 294–304.
- 60 H. Y. Luo, V. K. Michaelis, S. Hodges, R. G. Griffin and Y. Román-Leshkov, *Chem.*

- Sci.*, 2015, **6**, 6320–6324.
- 61 M. A. Camblor, C. Corell, A. Corma, M. J. Díaz-Cabañas, S. Nicolopoulos, J. M. González-Calbet and M. Vallet-Regí, *Chem. Mater.*, 1996, **8**, 2415–2417.
- 62 M. A. Camblor, A. Corma, M.-J. Díaz-Cabañas and C. Baerlocher, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **102**, 44–51.
- 63 A. Corma, V. Fornes, S. B. Pergher, T. L. M. Maesen and J. G. Buglass, *Nature*, 1998, **396**, 353–356.
- 64 A. Corma, U. Diaz, V. Fornés, J. M. Guil, J. Martínez-Triguero and E. J. Creighton, *J. Catal.*, 2000, **191**, 218–224.
- 65 A. Corma, V. Fornés, J. M. Guil, S. Pergher, T. L. M. Maesen and J. G. Buglass, *Microporous Mesoporous Mater.*, 2000, **38**, 301–309.
- 66 C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli and J. S. Beck, *Nature*, 1992, **359**, 710–712.
- 67 A. Corma, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 2373–2420.
- 68 J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T.-W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. McCullen, J. B. Higgins and J. L. Schlenker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 10834–10843.
- 69 A. Corma, Q. Kan, M. T. Navarro, J. Pérez-Pariente and F. Rey, *Chem. Mater.*, 1997, **9**, 2123–2126.
- 70 A. Fuerte, M. Iglesias, F. Sánchez and A. Corma, *J. Mol. Catal. A Chem.*, 2004, **211**, 227–235.
- 71 R. K. Singh, R. Kumar and D. P. Singh, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 64993–65011.
- 72 Y. Zhang, C. Wu, S. Guo and J. Zhang, *Nanotechnol. Rev.*, 2013, **2**, 27–45.
- 73 J. Zhang, F. Zhang, H. Yang, X. Huang, H. Liu, J. Zhang and S. Guo, *Langmuir Lett.*, 2010, **26**, 6083–6085.
- 74 Y. Zhang, J. Zhang, X. Huang, X. Zhou, H. Wu and S. Guo, *Small*, 2012, **8**, 154–159.
- 75 M. De, S. S. Chou and V. P. Dravid, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 17524–17527.
- 76 J. Shen, M. Shi, B. Yan, H. Ma, N. Li, Y. Hu and M. Ye, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2010, **81**, 434–438.
- 77 R. Su, P. Shi, M. Zhu, F. Hong and D. Li, *Bioresour. Technol.*, 2012, **115**, 136–140.
- 78 Q. Shao, P. Wu, X. Xu, H. Zhang and C. Cai, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 9076–9085.
- 79 I. V. Pavlidis, T. Vorhaben, D. Gournis, G. K. Papadopoulos, U. T. Bornscheuer and H. Stamatis, *J. Nanoparticle Res.*, 2012, **14**, 1–10.

-
- 80 Brent H. Shanks, *ACS Chem. Biol.*, 2007, **2**, 533–535.
- 81 A. Bruggink, R. Schoevaart and T. Kieboom, *Org. Process Res. Dev.*, 2003, **7**, 622–640.
- 82 M. J. Climent, A. Corma and S. Iborra, *ChemSusChem*, 2009, **2**, 500–506.
- 83 T. Seki, J. D. Grunwaldt, N. Van Vegten and A. Baiker, *Adv. Synth. Catal.*, 2008, **350**, 691–705.
- 84 P. N. R. Vennestrøm, C. H. Christensen, S. Pedersen, J. D. Grunwaldt and J. M. Woodley, *ChemCatChem*, 2010, **2**, 249–258.
- 85 J. A. Martens, P. Buskens, P. A. Jacobs, A. van der Pol, J. H. C. van Hooff, C. Ferrini, H. W. Kouwenhoven, P. J. Kooyman and H. van Bekkum, *Appl. Catal. A, Gen.*, 1993, **99**, 71–84.
- 86 M. G. Clerici, G. Bellussi and U. Romano, *J. Catal.*, 1991, **129**, 159–167.
- 87 H. Ogino and H. Ishikawa, *J. Biosci. Bioeng.*, 2001, **91**, 109–116.
- 88 L. T. Serebryakova, N. A. Zorin and A. A. Karyakin, *Enzyme Microb. Technol.*, 2009, **44**, 329–333.
- 89 R. A. Sheldon, *Green Chem.*, 2005, **7**, 267–278.
- 90 C. J. Li and L. Chen, *Chem. Soc. Rev.*, 2006, **35**, 68–82.
- 91 A. S. Malone, C. Wick, T. H. Shellhammer and P. D. Courtney, *J. Dairy Sci.*, 2003, **86**, 1139–1146.
- 92 H. A. L. Pedro, A. J. Alfaia, J. Marques, H. J. Vila-Real, A. Calado and M. H. L. Ribeiro, *Enzyme Microb. Technol.*, 2007, **40**, 442–446.
- 93 A. Caiazza, P. M. L. Garcia, R. Wever, J. C. M. Van Hest, A. E. Rowan and J. N. H. Reek, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 2926–2932.
- 94 O. Verho and J. E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 3996–4009.
- 95 P. M. Grande, C. Bergs and P. Domíngue De María, *ChemSusChem*, 2012, **5**, 1203–1206.
- 96 J. Martinez-Florez, J. Gonzalez-Gallego, J. M. Culebras and M. J. Tuñón, *Nutr. Hosp.*, 2002, **17**, 271–278.
- 97 J. Zhang, *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 2007, **120**, 288–294.
- 98 C. R. Pace-asciak, S. Hahn, E. P. Diamandis, G. Soleas and D. M. Goldberg, *Clin. Chim. Acta*, 1995, **235**, 207–219.
- 99 F. P. Salido and A. C. Fernández, *Offarm*, 2005, **24**, 85–94.
- 100 K. Sudto, S. Pornpakakul and S. Wanichwecharungruang, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2009, **44**, 1737–1742.

- 101 M. Roitner, T. Schalkhammer and F. Pittner, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1984, **9**, 483–488.
- 102 I. A. Ribeiro, J. Rocha, B. Sepodes, H. Mota-Filipe and M. H. Ribeiro, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2008, **52–53**, 13–18.
- 103 D. W. Fox, W. L. Savage and S. H. Wender, *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, **75**, 2504–2505.
- 104 M. Puri and U. C. Banerjee, *Biotechnol. Adv.*, 2000, **18**, 207–217.
- 105 H. Vila-Real, A. J. Alfaia, M. E. Rosa, A. R. Calado and M. H. L. Ribeiro, *Process Biochem.*, 2010, **45**, 841–850.
- 106 J. Thirkettle, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 2000, **53**, 733–735.
- 107 C. Grassin and P. Fauquembergue, in *Industrial Enzymology*, eds. G. T and W. S, Nature Publishing Group, New York, 2nd editio., 1996, p. 225.
- 108 H. Vila-Real, A. J. Alfaia, M. R. Bronze, A. R. T. Calado and M. H. L. Ribeiro, *Enzyme Res.*, 2011, **2011**, 1–11.
- 109 D. Mamma, E. Kalogeris, D. G. Hatzinikolaou, A. Lekanidou, D. Kekos, B. J. Macris and P. Christakopoulos, *Food Biotechnol.*, 2004, **18**, 1–18.
- 110 M. Ono, T. Tosa and I. Chibata, *Agric. Biol. Chem.*, 1978, **42**, 1847–1853.
- 111 H. Y. Tsen and S. Y. Tsai, *J. Ferment. Technol.*, 1988, **66**, 193–198.
- 112 N. F. F. Soares and J. H. Hotchkiss, *J. Food Sci.*, 1998, **63**, 61–65.
- 113 M. Puri, H. Kaur and J. F. Kennedy, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2005, **80**, 1160–1165.
- 114 S. Lei, Y. Xu, G. Fan, M. Xiao and S. Pan, *Appl. Surf. Sci.*, 2011, **257**, 4096–4099.
- 115 M. A. P. Nunes, H. Vila-Real, P. C. B. Fernandes and M. H. L. Ribeiro, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2010, **160**, 2129–2147.
- 116 M. D. Busto, V. Meza, N. Ortega and M. Perez-Mateos, *Food Chem.*, 2007, **104**, 1177–1182.
- 117 A. Gong, C. T. Zhu, Y. Xu, F. Q. Wang, D. K. Tsabing, F. A. Wu and J. Wang, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 1–15.
- 118 H. Y. Chang, Y. B. Lee, H. A. Bae, J. Y. Huh, S. H. Nam, H. S. Sohn, H. J. Lee and S. B. Lee, *Food Chem.*, 2011, **124**, 234–241.
- 119 S. Yadav, S. Yadava and K. D. S. Yadav, *Process Biochem.*, 2013, **48**, 1348–1354.
- 120 Y. Zhu, H. Jia, M. Xi, L. Xu, S. Wu and X. Li, *Food Chem.*, 2017, **214**, 39–46.
- 121 T. Zhang, W. Yuan, M. Li, M. Miao and W. Mu, *Food Chem.*, 2018, **269**, 63–69.
- 122 Y. Zhu, H. Jia, M. Xi, J. Li, L. Yang and X. Li, *Process Biochem.*, 2017, **62**, 114–

- 121.
- 123 D. Gerstorferová, B. Fliedrová, P. Halada, P. Marhol, V. Kren and L. Weignerová, *Process Biochem.*, 2012, **47**, 828–835.
- 124 H. Vila-Real, A. J. Alfaia, J. N. Rosa, P. M. P. Gois, M. E. Rosa, A. R. T. Calado and M. H. Ribeiro, *J. Biotechnol.*, 2011, **152**, 147–158.
- 125 P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk, *Anal. Biochem.*, 1985, **150**, 76–85.
- 126 H. P. Erickson, *Biol. Proced. Online*, 2009, **11**, 32–51.
- 127 S. Saallah, M. N. Naim, I. W. Lenggoro, M. N. Mokhtar, N. F. Abu Bakar and M. Gen, *Biotechnol. Reports*, 2016, **10**, 44–48.
- 128 A. Corma, V. Fornes and F. Rey, *Adv. Mater.*, 2002, **14**, 71–74.
- 129 A. Marolewski, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 1010–1011.
- 130 C. Romero, A. Manjón, J. Bastida and J. L. Iborra, *Anal. Biochem.*, 1985, **149**, 566–571.
- 131 G. Şekeroğlu, S. Fadiloğlu and F. Göğüş, *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, **224**, 55–60.
- 132 H. Y. Tsen and G. K. Yu, *J. Food Sci.*, 1991, **56**, 31–34.
- 133 H. Y. Tsen, S. Y. Tsai and G. K. Yu, *J. Ferment. Bioeng.*, 1989, **67**, 186–189.
- 134 M. Puri, S. S. Marwaha, R. M. Kothari and J. F. Kennedy, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 1996, **16**, 145–155.
- 135 G. L. Miller, *Anal. Chem.*, 1959, **31**, 426–428.
- 136 R. Bognar, A. L. Tokes and H. Frenzel, *Acta chim*, 1969, **61(1)**, 79.
- 137 W. S. Hummers and R. E. Offeman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, **80**, 1339.
- 138 U. K. Laemmli, *Nature*, 1970, **227**, 680–685.
- 139 J. Heukeshoven and R. Dernick, *Electrophoresis*, 1985, **6**, 103–112.
- 140 R. A. Sheldon and S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 6223–6235.
- 141 D.-G. Dumbravă, N.-G. Hădărugă, C. Moldovan, D.-N. Raba, M.-V. Popa and B. Rădoi, *J. Agroaliment. Process. Technol.*, 2011, **17**, 163–168.
- 142 S. Roger A., *Chirotechnology: Industrial synthesis of optically active compounds*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1993.
- 143 A. Liese, T. Zelinski, M. R. Kula, H. Kierkels, M. Karutz, U. Kragl and C. Wandrey, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 1998, **4**, 91–99.

- 144 D. Pocięcha, M. Glogarova, E. Gorecka and J. Mieczkowski, *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.*, 2000, **61**, 6674–6677.
- 145 L. Xue, D. J. Zhou, L. Tang, X. F. Ji, M. Y. Huang and Y. Y. Jiang, *React. Funct. Polym.*, 2004, **58**, 117–121.
- 146 Y. Nie, Y. Xu, Q. M. Xiao, Y. Tang, J. Jiang and Z. H. Sun, *Biotechnol. Lett.*, 2005, **27**, 23–26.
- 147 Z. Wu, X. Li, F. Li, H. Yue, C. He, F. Xie and Z. Wang, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 33998–34002.
- 148 Y. Okamoto and T. Ikai, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 2593–2608.
- 149 R. Xie, L. Y. Chu and J. G. Deng, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 1243–1263.
- 150 M. Bakker, A. S. Spruijt, F. van Rantwijk and R. A. Sheldon, *Tetrahedron Asymmetry*, 2000, **11**, 1801–1808.
- 151 C. Kim, J. Lee, J. Cho, Y. Oh, Y. K. Choi, E. Choi, J. Park and M. J. Kim, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 2571–2578.
- 152 J. H. Lee, K. Han, M. J. Kim and J. Park, *European J. Org. Chem.*, 2010, 999–1015.
- 153 A. Parvulescu, J. Janssens, J. Vanderleyden and D. De Vos, *Top. Catal.*, 2010, **53**, 931–941.
- 154 C. C. Gruber, I. Lavandera, K. Faber and W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.*, 2006, **348**, 1789–1805.
- 155 C. V. Voss, C. C. Gruber and W. Kroutil, *Synlett*, 2010, 991–998.
- 156 C. V. Voss, C. C. Gruber and W. Kroutil, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2008, **47**, 741–745.
- 157 K. Kędziora, A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández and V. Gotor, *Green Chem.*, 2014, **16**, 2448–2453.
- 158 A. Díaz-Rodríguez, N. Rıos-Lombardıa, J. H. Sattler, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil and V. Gotor, *Catal. Sci. Technol.*, 2015, **5**, 1443–1446.
- 159 D. Mendez-Sánchez, J. Mangas-Sánchez, I. Lavandera, V. Gotor and V. Gotor-Fernández, *ChemCatChem*, 2015, **7**, 4016–4020.
- 160 E. Liardo, N. Rıos-Lombardıa, F. Morıs, J. González-Sabın and F. Rebolledo, *European J. Org. Chem.*, 2018, **2018**, 3031–3035.
- 161 P. J. Kunkeler, B. J. Zuurdeeg, J. C. van der Waal, J. A. van Bokhoven, D. C. Koningsberger and H. van Bekkum, *J. Catal.*, 1998, **180**, 234–244.
- 162 J. C. van der Waal, E. J. Creighton, P. J. Kunkeler, K. Tan and H. van Bekkum, *Top. Catal.*, 1997, **4**, 261–268.
- 163 E. J. Creighton, S. D. Ganeshie, R. S. Downing and H. van Bekkum, *J. Mol. Catal.*

- A Chem.*, 1997, **115**, 457–472.
- 164 J. C. van der Waal, K. Tan and H. van Bekkum, *Catal. Letters*, 1996, **41**, 63–67.
- 165 M. Boronat, A. Corma and M. Renz, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 21168–21174.
- 166 M. Boronat, A. Corma, M. Renz and P. M. Viruela, *Chem. - A Eur. J.*, 2006, **12**, 7067–7077.
- 167 W. Hussain, D. J. Pollard, M. Truppo and G. J. Lye, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2008, **55**, 19–29.
- 168 D. M. Tschaen, L. Abramson, D. Cai, R. Desmond, U. H. Dolling, L. Frey, S. Karady, Y. J. Shi and T. R. Verhoeven, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 4324–4330.
- 169 E. Keinan, K. K. Seth and R. Lamed, *Ann. NEW YORK Acad. Sci.*, 1987, **501**, 130–149.
- 170 W. Hummel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1990, **34**, 15–19.
- 171 D. Metrangolo-Ruiz de Temiño, W. Hartmeier and M. B. Ansorge-Schumacher, *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, **36**, 3–9.
- 172 J. M. Bolivar, L. Wilson, S. A. Ferrarotti, J. M. Guisán, R. Fernández-Lafuente and C. Mateo, *J. Biotechnol.*, 2006, **125**, 85–94.
- 173 M. Shakir, Z. Nasir, M. S. Khan, Lutfullah, M. F. Alam, H. Younus and S. I. Al-Resayes, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, **72**, 1196–1204.
- 174 X. P. Jiang, T. T. Lu, C. H. Liu, X. M. Ling, M. Y. Zhuang, J. X. Zhang and Y. W. Zhang, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, **88**, 9–17.
- 175 M. F. Alam, A. A. Laskar, M. Zubair, U. Baig and H. Younus, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2015, **119**, 78–84.
- 176 L. Liu, J. Yu and X. Chen, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2015, **15**, 1213–1220.
- 177 M. Dreifke, F. J. Brieler and M. Fröba, *ChemCatChem*, 2017, **9**, 1197–1210.
- 178 A. M. Serpa Guerra, G. Hincapié Llano and C. Álvarez López, *Prospectiva*, 2014, **12**, 30–39.
- 179 T. Blasco, M. A. Camblor, A. Corma, P. Esteve, J. M. Guil, A. Martínez, J. A. Perdigón-Melón and S. Valencia, *J. Phys. Chem. B*, 1998, **102**, 75–88.
- 180 Y. Zhu, G. Chuah and S. Jaenicke, *J. Catal.*, 2004, **227**, 1–10.
- 181 M. Renz, T. Blasco, A. Corma, V. Fornés, R. Jensen and L. Nemeth, *Chem. Eur. J.*, 2002, 4708–4717.
- 182 P. Xu, P. X. Du, M. H. Zong, N. Li and W. Y. Lou, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 1–10.
- 183 R.-J. van Putten, J. C. van der Waal, E. de Jong, C. B. Rasrendra, H. J. Heeres and J. G. de Vries, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 1499–1597.

-
- 184 F. A. Kucherov, L. V. Romashov, K. I. Galkin and V. P. Ananikov, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2018, **6**, 8064–8092.
- 185 A. Garcia-Ortiz, K. S. Arias, M. J. Climent, A. Corma and S. Iborra, *ChemSusChem*, 2018, **11**, 2870–2880.
- 186 K. S. Arias, M. J. Climent, A. Corma and S. Iborra, *Energy Environ. Sci.*, 2015, **8**, 317–331.
- 187 A. García-Ortiz, J. D. Vidal, M. J. Climent, P. Concepción, A. Corma and S. Iborra, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2019, **7**, 6243–6250.
- 188 K. S. Arias, M. J. Climent, A. Corma and S. Iborra, *Top. Catal.*, 2016, **59**, 1257–1265.
- 189 L. Hu, J. Xu, S. Zhou, A. He, X. Tang, L. Lin, J. Xu and Y. Zhao, *ACS Catal.*, 2018, **8**, 2959–2980.
- 190 L. Cottier, G. Descotes and Y. Soro, *Synth. Commun.*, 2003, **33**, 4285–4295.
- 191 A. Gelmini, S. Albonetti, F. Cavani, C. Cesari, A. Lolli, V. Zanotti and R. Mazzoni, *Appl. Catal. B Environ.*, 2016, **180**, 38–43.
- 192 L. Hu, L. Lin and S. Liu, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2014, **53**, 9969–9978.
- 193 S. Chen, R. Wojcieszak, F. Dumeignil, E. Marceau and S. Royer, *Chem. Rev.*, 2018, **118**, 11023–11117.
- 194 J. Ohyama, A. Esaki, Y. Yamamoto, S. Arai and A. Satsuma, *RSC Adv.*, 2013, **3**, 1033–1036.
- 195 F. Liu, M. Audemar, K. De Oliveira Vigier, J. M. Clacens, F. De Campo and F. Jérôme, *Green Chem.*, 2014, **16**, 4110–4114.
- 196 M. Balakrishnan, E. R. Sacia and A. T. Bell, *Green Chem.*, 2012, **14**, 1626–1634.
- 197 J. Shi, M. Zhang, W. Du, W. Ning and Z. Hou, *Catal. Sci. Technol.*, 2015, **5**, 3108–3112.
- 198 B. Op De Beeck, M. Dusselier, J. Geboers, J. Holsbeek, E. Morré, S. Oswald, L. Giebelier and B. F. Sels, *Energy Environ. Sci.*, 2015, **8**, 230–240.
- 199 J. Han, Y. H. Kim, B. Y. Jung, S. H. Hwang, J. Jegal, J. W. Kim and Y. S. Lee, *Synlett*, 2017, **28**, 2299–2302.
- 200 H. Cai, C. Li, A. Wang and T. Zhang, *Catal. Today*, 2014, **234**, 59–65.
- 201 Q. Cao, W. Liang, J. Guan, L. Wang, Q. Qu, X. Zhang, X. Wang and X. Mu, *Appl. Catal. A Gen.*, 2014, **481**, 49–53.
- 202 A. J. Kumalaputri, G. Bottari, P. M. Erne, H. J. Heeres and K. Barta, *ChemSusChem*, 2014, **7**, 2266–2275.
- 203 Y. Zhu, X. Kong, H. Zheng, G. Ding, Y. Zhu and Y. W. Li, *Catal. Sci. Technol.*,

- 2015, **5**, 4208–4217.
- 204 S. Lima, D. Chadwick and K. Hellgardt, *RSC Adv.*, 2017, **7**, 31404–31407.
- 205 G. Bottari, A. J. Kumalaputri, K. K. Krawczyk, B. L. Feringa, H. J. Heeres and K. Barta, *ChemSusChem*, 2015, **8**, 1323–1327.
- 206 L. Yu, L. He, J. Chen, J. Zheng, L. Ye, H. Lin and Y. Yuan, *ChemCatChem*, 2015, **7**, 1701–1707.
- 207 S. Yao, X. Wang, Y. Jiang, F. Wu, X. Chen and X. Mu, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2014, **2**, 173–180.
- 208 US 7994347 B2, 2005.
- 209 X. L. Li, K. Zhang, S. Y. Chen, C. Li, F. Li, H. J. Xu and Y. Fu, *Green Chem.*, 2018, **20**, 1095–1105.
- 210 L. Liu, P. Concepción and A. Corma, *J. Catal.*, 2016, **340**, 1–9.
- 211 L. Liu, F. Gao, P. Concepción and A. Corma, *J. Catal.*, 2017, **350**, 218–225.
- 212 M. A. Lăcătuș, L. C. Bencze, M. I. Toșa, C. Paizs and F. D. Irimie, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2018, **6**, 11353–11359.
- 213 WO2016028845A1, 2015.
- 214 L. Hu, L. Lin, Z. Wu, S. Zhou and S. Liu, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 2017, **74**, 230–257.
- 215 T. Tan, J. Lu, K. Nie, L. Deng and F. Wang, *Biotechnol. Adv.*, 2010, **28**, 628–634.
- 216 M. Krystof, M. Pérez-Sánchez and P. Domínguez De María, *ChemSusChem*, 2013, **6**, 630–634.
- 217 F. A. Westerhaus, R. V. Jagadeesh, G. Wienhöfer, M. M. Pohl, J. Radnik, A. E. Surkus, J. Rabeah, K. Junge, H. Junge, M. Nielsen, A. Brückner and M. Beller, *Nat. Chem.*, 2013, **5**, 537–543.
- 218 C. José, R. D. Bonetto, L. A. Gambaro, M. D. P. Guauque Torres, M. L. Foresti, M. L. Ferreira and L. E. Briand, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2017, **71**, 95–107.
- 219 J. Han, Y. H. Kim, H. S. Jang, S. Y. Hwang, J. Jegal, J. W. Kim and Y. S. Lee, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 93394–93397.
- 220 M. Chatterjee, T. Ishizaka and H. Kawanami, *Green Chem.*, 2014, **16**, 4734–4739.
- 221 E. Catoni, E. Cernia and C. Palocci, *J. Mol. Catal. A Chem.*, 1996, **105**, 79–86.

Contribuciones

Publicaciones:

Selective synthesis of citrus flavonoids prunin and naringenin using heterogeneized biocatalyst on graphene oxide. *Green Chem.*, 2019,21, 839-849. Jose Miguel Carceller Carceller; Julián Paul Martínez Galán; Rubens Monti; Juliana Cristina Bassan; Marco Filice; Sara Iborra Chornet; Jihong Yu; Avelino Corma Canós.

Patentes:

DERIVADO ENZIMÁTICO BASADO EN ENZIMA INMOVILIZADA SOBRE ZEOLITAS LAMINARES; Avelino Corma Canós; Sara Iborra Chornet; Jose Miguel Carceller Carceller; Marco Filice; Juliana Cristina Bassan; Julián Paul Martínez Galán; Rubens Monti. Universidad Politécnica de Valencia/ Consejo superior de investigaciones científicas / Universidade estadual paulista "Júlio de mesquita filho"(P201731285); Fecha de registro: 03/11/2017 España, Comunidad de Madrid

DERIVADO ENZIMÁTICO BASADO EN ENZIMA INMOVILIZADA SOBRE ÓXIDO DE GRAFENO; Avelino Corma Canós; Sara Iborra Chornet; Jose Miguel Carceller Carceller; Marco Filice; Juliana Cristina Bassan; Julián Paul Martínez Galán; Rubens Monti. Universidad Politécnica de Valencia/ Consejo superior de investigaciones científicas/ Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (UNESP) (P201731286); Fecha de registro: 03/11/2017 España, Comunidad de Madrid

Índice de Figuras

Figura 1. 1. Compuestos típicos de Química Fina.	14
Figura 1. 2. Cambio en la energía del sistema usando un catalizador.	15
Figura 1. 3. Enlace peptídico.	18
Figura 1. 4. Transición de la estructura primaria de la proteína a la secundaria.	19
Figura 1. 5. Cinética enzimática.	21
Figura 1. 6. Modelo de Lineweaver-Burk.	24
Figura 1. 7. Estrategias de inmovilización de enzimas.	28
Figura 1. 8. Estrategia de inmovilización enzimática mediante confinamiento de la enzima formando geles de alginato de calcio.	29
Figura 1. 9. Formación de agregados enzimáticos (CLEAs) mediante precipitación y glutaraldehído.	30
Figura 1. 10. Inmovilización enzimática covalente vía grupos epóxido.	32
Figura 1. 11. Inmovilización covalente sobre soporte con grupos aldehído.	32
Figura 1. 12. Inmovilización covalente vía activación de los grupos carboxilo.	33
Figura 1. 13. Posibles modificaciones superficiales de las zeolitas.	35
Figura 1. 14. Zeolita tipo Beta.	36
Figura 1. 15. Esquema de síntesis de la zeolita ITQ-2.	37
Figura 1. 16. Material mesoporoso MCM-41.	38
Figura 1. 17. Estructura del óxido de grafeno.	38
Figura 1. 18. Esquema de una resolución cinética dinámica.	41
Figura 1. 19. Reacciones quimioenzimáticas consecutivas en reactores separados.	42
Figura 3. 1. Estudio de desorción en la purificación de la naringinasa (NgsaC). (■) Actividad ramnosidasa (usando el sustrato p-Nitrofenil- α -L-Ramnopiranosido), (▲) Actividad glucosidasa (usando como sustrato el p-Nitrofenil- β -D-Glucósido).	50
Figura 3. 2. Electroforesis de la enzima naringinasa. Línea 1- Patrones de peso molecular (KDa); Línea 2-Enzima purificada desorbida a 50 mM (Ngsa-P); Línea 3- Enzima desorbida a 100 mM; Línea 4- Enzima desorbida a 150 mM.	51
Figura 3. 3. FTIR del OG(a) y OGR (b) a 80 °C.	54
Figura 3. 4. A) Imagen de AFM OG; B) Imagen de TEM OG; C) Altura de la imagen de AFM.	55
Figura 3. 5. A) Imagen de AFM NgsC@OG; B) Imagen de TEM NgsC@OG; C) Altura de AFM.	55
Figura 3. 6. Estudio de la conversión catalítica en la hidrólisis de la naringina en presencia de NgsC@OG(3h) y NgsC@OGR(24h). Conversión NgsC@OG(3h) (■) y NgsC@OGR(24h) (▲). Condiciones de reacción: (50 mg de NgsC@OG(3h) o NgsaC@OGR(24h) con 8,6 mM del sustrato naringina, en 3 mL de disolución tampón de citrato 50 mM (pH = 4,5) a 50 °C durante 30 minutos.	57
Figura 3. 7. Espectroscopía FTIR de (a) ITQ-2, (b) NITQ-2 y (c) GITQ-2 a 200 °C.	59
Figura 3. 8. Imagen de FSEM del material GITQ-2.	60

Figura 3. 9. Cinética de inmovilización de la (NgsaC) sobre la zeolita GITQ-2 (NgsaC@GITQ-2).....	61
Figura 3. 10. Cinética de inmovilización de la NgsaP sobre la zeolita GITQ-2 (NgsaP@GITQ-2).....	61
Figura 3. 11. Espectroscopía FTIR de (a) MCM-41, (b) NMCM-41 y (c) GMCM-41 a 200 °C.	62
Figura 3. 12. Espectroscopía FTIR de la zeolita (a) Beta, (b) NBeta y (c) GBeta a 200 °C. 63	
Figura 3. 13. Actividad relativa en función del pH en la hidrólisis de Rha-pNP para la naringinasa libre e inmovilizada sobre OG: (♦) NgsaC, (■) NgsaP, (●) NgsaC@OG y (▲) NgsaP@OG.	66
Figura 3. 14. Actividad relativa en función del pH en la hidrólisis de Rha-pNP para la naringinasa libre e inmovilizada sobre GITQ-2: (♦) NgsaC, (■) NgsaP, (■) NgsaC@GITQ-2 y (▲) NgsaP@GITQ-2.	66
Figura 3. 15. Actividad relativa determinada mediante la hidrólisis de Rha-pNP en función de la temperatura para la naringinasa libre e inmovilizada sobre OG: (♦) NgsaC, (■) NgsaP, (●) NgsaC@OG y (▲) NgsaP@OG.	67
Figura 3. 16. Actividad relativa determinada mediante la hidrólisis de Rha-pNP en función de la temperatura para la naringinasa libre e inmovilizada sobre GITQ-2: (♦) NgsaC, (■) NgsaP, (■) NgsaC@GITQ-2 y (▲) NgsaP@GITQ-2.	68
Figura 3. 17. Representación de Lineweaver-Burk de la enzima NgsaC e inmovilizada: (—●—) NgsaC@OG, (—♦—) NgsaC, (—■—) NgsaC@ GITQ-2.....	69
Figura 3. 18. Representación de Lineweaver-Burk de la enzima NgsaP e inmovilizada. (---▲---) NgsaP@OG, (—■—) NgsaP y (—▲—) NgsaP @GITQ-2.....	69
Figura 3. 19. Resultados de estabilidad térmica de la naringinasa libre e inmovilizada utilizando Rha-pNP: (♦) NgsaC, (■) NgsaP, (●) NgsaC@OG y (▲) NgsaP@OG. ...	71
Figura 3. 20. Estudio de la estabilidad térmica de la naringinasa libre e inmovilizada utilizando como sustrato Rha-pNP: (♦) NgsaC, (■) NgsaP, (■) NgsaC@GITQ-2 y (▲) NgsaP@GITQ-2.....	71
Figura 3. 21. Conversión de naringina después de diferentes tiempos de almacenaje utilizando NgsaC@OG (●) y NgsaC@GITQ-2 (■).	72
Figura 3. 22. Resultados de la hidrólisis de naringina tras varios ciclos consecutivos utilizando: a) NgsaC@OG, b) NgsaP@OG. (■) Conversión (■) Selectividad a Naringenina(a) o Prunina(b) a 50 °C durante 30 min.	73
Figura 3. 23. Resultados de la hidrólisis de naringina tras varios ciclos consecutivos utilizando a) NgsaC@GITQ-2 y b) NgsaP@GITQ-2: (■) Conversión, (■) Selectividad a Naringenina(a) o Prunina(b) a 50 °C durante 30 min.	73
Figura 3. 24. Evaluación del tiempo de contacto en un reactor de lecho fijo durante la hidrólisis del zumo de pomelo. Azúcares liberados (g/L) utilizando NgsaC@GITQ-2.	76
Figura 3. 25. Resultados de la hidrólisis del zumo de pomelo en un reactor en continuo en presencia de NgsaC@GITQ-2. Cantidad total de azúcares en el zumo (●), cantidad de azúcares liberados (▲).....	77
Figura 3. 26. Capacidad antioxidante. Zumo de pomelo inicial (■), Zumo de pomelo después de la hidrólisis utilizando NgsaC@GITQ-2(⊠).	77
Figura 3. 27. Absorbancia del DPPH frente a distintas concentraciones de Trolox.	86

Figura 3. 28. Capacidad antioxidante frente distintas concentraciones de Trolox.	87
Figura 4. 1. Estrategia de inmovilización electrostática.....	96
Figura 4. 2. Espectroscopia de infrarrojos (FTIR) de la zeolita: (a) ITQ-2 pura sílice; (b) NITQ-2.	97
Figura 4. 3. Reducción de 2-octanona en (S)-2-octanol: (▲) ADH(S)7,5mg@NITQ-2, (■) ADH(S)2,5mg@NITQ-2 y (✕) ADH(S)8,6mg@NITQ-2. Condiciones de reacción: 2-octanona (0,3 mmol), 10 mL de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v), NAD ⁺ (0,03 mmol).....	99
Figura 4. 4. Efecto del pH en la conversión de 2-octanona en (S)-2-octanol utilizando: (■) ADH(S) libre y (■) ADH(S)@NITQ-2. Condiciones de reacción: 2-octanona (0,3 mmol), 10 mL de tampón fosfato pH = 5,5-10 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v), NAD ⁺ (0,03 mmol), ADH(S)@NITQ-2 o ADH(S).....	100
Figura 4. 5. Efecto de la temperatura en la conversión de 2-octanona a (S)-2-octanol en presencia de: (■) ADH(S) libre y (■) ADH(S)@NITQ-2. Condiciones de reacción: 2-octanona (0,3 mmol), 10 mL de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v), NAD ⁺ (0,03 mmol), ADH(S)@NITQ-2 o ADH(S).	101
Figura 4. 6. Estudio del tiempo de contacto en un reactor de lecho fijo para la obtención de S-2-octanol; Condiciones de reacción: ADH(S)@NITQ-2 (209 mg), 10 mL de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v), relación molar cetona/(NAD ⁺) = 10, flujo 0,55 mL/h.	103
Figura 4. 7. Estudio de la estabilidad temporal del biocatalizador en la conversión de la 2-octanona a (S)-2-octanol en presencia de ADH(S)@NITQ-2. Condiciones de reacción: ADH(S)@NITQ-2 (209 mg), 10 mL de tampón fosfato pH = 7 (100 mM)/isopropanol (50/50 v/v), 2-octanona 30 mmol/L, relación molar cetona/(NAD ⁺) = 10, flujo 0,55 mL/h.	104
Figura 4. 8. Oxidación de 2-octanol racémico en 2-octanona en presencia de la zeolita Zr-Beta; (▲) 2-octanol y (●) 2-octanona. Condiciones de reacción: Zr-Beta (32 mg), 2-octanol (0,4 mmol), acetona (1,5 mL, 20,4 mmol), 50 °C.	105
Figura 4. 9. Estudio del tiempo de contacto en la oxidación del alcohol racémico 2-octanol; Condiciones de reacción: Zr-Beta (304 mg), 2-octanol, acetona (10 mL, 136 mmol), 50 °C, flujo 0,5 mL/h.	108
Figura 4. 10. Estudio de la estabilidad temporal de la zeolita Zr-Beta en la oxidación de 2-octanol; Condiciones de reacción: Zr-Beta (304 mg), 2-octanol (191 mmol/L), 50 °C, flujo 0,5 mL/h.	108
Figura 4. 11. Combinación de los reactores de oxidación de 2-octanol y reducción de la 2-octanona para la obtención de (S)-2-octanol.	110
Figura 4. 12. Esquema de la síntesis a escala industrial propuesta para la obtención de alcoholes quirales mediante un proceso quimioenzimático.	111
Figura 5. 1. Difracción de Rayos X del catalizador Co@C. (▲) fase cúbica centrada en las caras fcc (fase-centered cubic phase), (■) fase hexagonal hcp (hexagonal close-packed).	127

Figura 5. 2. Espectroscopía Raman del catalizador Co@C. Bandas de Raman correspondientes a Co_3O_4 (F_{2g} , E_g , y A_{1g}) y las señales Raman de láminas de carbón a 1315 cm^{-1} y 1592 cm^{-1} , que corresponden a las bandas D y G respectivamente.	127
Figura 5. 3. (a) Imagen de FESEM del catalizador Co@C. (b) Imagen de TEM del catalizador Co@C. (c) Rango de tamaños.	128
Figura 5. 4. (a) Imagen HRTEM de Co@C. (b) Imagen de HRTEM de la estructura superficial de Co@C.	128
Figura 5. 5. Mapa de distribución de elementos: (a) Imágenes de TEM (STEM-HAADF) de Co@C; (b-e) Mapa de distribución de elementos de Co, C, O y Na en Co@C.	128
Figura 5. 6. Resultados de la reducción de HMF a BHMF usando Co@C. Condiciones de reacción: HMF (0,5 mmol, 63 mg), 10 mg de catalizador, 5 mL de metanol. A) 90 °C, 20 bar de H_2 ; B) 110 °C, 20 bar de H_2 ; C) 110 °C, 10 bar de H_2 . HMF (◆) y BHMF (■).	131
Figura 5. 7. Resultados de la reducción de HMF usando el catalizador Co@C-250a. Condiciones de reacción: 0,5 mmol HMF, 10 mg Co@C-250a, 5 mL metanol, 110 °C, 10 bar H_2 . HMF (◆), BHMF (■), 3 (▲).	134
Figura 5. 8. Resultados de la reducción de HMF usando el catalizador Co@C-450a. Condiciones de reacción: 0,5 mmol HMF, 10 mg Co@C-450a, 5 mL metanol, 110 °C, 10 bar H_2 . HMF (◆), BHMF (■), 3 (▲).	134
Figura 5. 9. Reducción de HMF usando el catalizador $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-R}$. Condiciones de reacción: 0,5 mmol HMF, 10 mg $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-R}$, 5 mL metanol, 110 °C, 10 bar H_2 . HMF (◆), BHMF (■), 3 (▲).	135
Figura 5. 10. Estudio de lixiviado del catalizador Co@C durante la reducción del HMF a BHMF. Condiciones de reacción: 0,5 mmol HMF, 10 mg Co@C, 5 mL metanol, 110 °C, 10 bar H_2 . HMF (◆), BHMF (■), 3 (▲).	136
Figura 5. 11. Estudio de reusabilidad del catalizador Co@C en la hidrogenación de HMF a BHMF. Condiciones de reacción: 0,5 mmol HMF, 10 mg Co@C, 5 mL metanol, 110 °C, 10 bar H_2 , 4 h. Conversión de HMF (■), Selectividad a BHMF (■).	137
Figura 5. 12. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) del catalizador Co@C después de 4 usos consecutivos.	137
Figura 5. 13. Esterificación del BHMF con ácido hexanoico. Condiciones de reacción: BHMF (0,05 mmol), ácido hexanoico (0,2 mmol), 1 mL 2-MTHF, 25 mg Novozym 435 y 200 mg de tamiz molecular, 35 °C. BHMF (●), Monoéster (▲), Diéster (■).	142
Figura 5. 14. Optimización del flujo en la hidrogenación del HMF en un reactor en continuo. (Condiciones de reacción: HMF en metanol (1,5 % en peso), temperatura: 90 °C, Co@C 0,335 g, 10 bar H_2). Flujo: 0,3 mL/min (WHSV 0,66 h^{-1} , tiempo de contacto 1,52 h), 0,25 mL/min (WHSV 0,55 h^{-1} , tiempo de contacto 1,82 h), 0,20 mL/min (WHSV 0,44 h^{-1} , tiempo de contacto 2,27 h), 0,10 mL/min (WHSV 0,22 h^{-1} , tiempo de contacto 4,55 h). (□) Conversión de HMF, (■) Rendimiento a BHMF, (■) Selectividad a BHMF.	145
Figura 5. 15. Resultados de la hidrogenación del HMF en un reactor en continuo en presencia de Co@C. Condiciones de reacción HMF en metanol (1,5 % en peso), flujo 0,20 mL/min (WHSV: 0,44 h^{-1}) 90 °C, 10 bar H_2 . Conversión HMF (●), Rendimiento de BHMF (◆), Selectividad a BHMF (x).	146

Figura 5. 16. Optimización del flujo en la transesterificación del BHMF en un reactor en continuo. Condiciones de reacción: BHMF en 2-MTHF (1,5 % en peso), hexanoato de vinilo (6,5 % en peso), 35 °C, Novozym 435 (0,330 g). Flujo: 1,07 mL/min (WHSV 2,5 h ⁻¹ , tiempo de contacto 0,4 h), 0,39 mL/min (WHSV 0,91 h ⁻¹ , tiempo de contacto 1,1 h), 0,20 mL/min (WHSV 0,48 h ⁻¹ , tiempo de contacto 2,1 h), 0,02 mL/min (WHSV 0,06 h ⁻¹ , tiempo de contacto 18 h), 0,01 mL/min (WHSV 0,02 h ⁻¹ , tiempo de contacto 60 h). (□) Conversión de BHMF, (■) Rendimiento al diéster de BHMF, (▣) Selectividad al diéster de BHMF.	147
Figura 5. 17. Resultados de la transesterificación del BHMF en un reactor en continuo en presencia de Novozym 435. Condiciones de reacción BHMF en 2-MTHF (1,5 % en peso), hexanoato de vinilo (6,5 % en peso), flujo 0,20 mL/min (WHSV: 0,48 h ⁻¹) 35 °C. Conversión BHMF % (●), Rendimiento del diéster de BHMF (◆), Selectividad al diéster de BHMF (x).....	147
Figura 5. 18. Resultados del proceso quimioenzimático en dos reactores continuos. Primera etapa: hidrogenación del HMF usando Co@C. Segunda etapa: transesterificación del BHMF usando Novozym 435 y hexanoato de vinilo. Conversión HMF (●), Rendimiento global (◆), Selectividad Global (x).....	148
Figura 5. 19. RMN ¹ H Diacetato de 2,5-bis(hidroximetil) furano.	154
Figura 5. 20. RMN ¹³ C Diacetato de 2,5-bis(hidroximetil) furano.	155
Figura 5. 21. RMN ¹ H Dibutanoato de 2,5-bis(hidroximetil) furano.	156
Figura 5. 22. RMN ¹³ C Dibutanoato de 2,5-bis(hidroximetil) furano.	157
Figura 5. 23. RMN ¹ H Dihexanoato de 2,5-bis(hidroximetil) furano.	158
Figura 5. 24. RMN ¹³ C Dihexanoato de 2,5-bis(hidroximetil) furano.	159
Figura 5. 25. RMN ¹ H Dioctanoato de 2,5-bis(hidroximetil) furano.	160
Figura 5. 26. RMN ¹³ C Dioctanoato de 2,5-bis(hidroximetil) furano.	161

Índice de Tablas

Tabla 1. 1. Tipos de catálisis.	16
Tabla 1. 2. Catálisis enzimática.	18
Tabla 1. 3. Grupos funcionales de los aminoácidos, abundancia y exposición.	20
Tabla 1. 4. Clasificación de las enzimas.	25
Tabla 1. 5. Clasificación de las zeolitas.	34
Tabla 1. 6. Propiedades de las zeolitas.	34
Tabla 3. 1. Actividades alfa-L-ramnosidasa y beta-D-glucosidasa de la naringinasa utilizando los reactivos (Rha-pNP) y (Glc-pNP) respectivamente.	51
Tabla 3. 2. Porcentaje de la naringinasa (NgsaC) inmovilizada sobre OG y OGR en función del tiempo.	53
Tabla 3. 3. Análisis químico de los soportes OG y OGR.	53
Tabla 3. 4. Efecto de la fuerza iónica en la desorción de la NgsaC inmovilizada sobre OG (NgsaC@OG).	57
Tabla 3. 5. Análisis químico de los soportes de silicio.	59
Tabla 3. 6. Inmovilización de NgsaC sobre diferentes materiales.	63
Tabla 3. 7. Área (BET) de los materiales utilizados.	64
Tabla 3. 8. Conversión de la naringina en presencia de NgsaC inmovilizada sobre soportes de silicio.	65
Tabla 3. 9. Valores de K_M para la naringinasa en su forma libre e inmovilizada.	70
Tabla 3. 10. Producción de prunina y naringenina mediante la hidrólisis de naringina utilizando naringinasa inmovilizada.	74
Tabla 3. 11. Comparación de la estabilidad a largo plazo y la capacidad de producción de la naringinasa inmovilizada sobre distintos materiales.	75
Tabla 4. 1. Análisis elemental del soporte.	96
Tabla 4. 2. Condiciones de inmovilización de la enzima ADH(S) en la zeolita NITQ-2 y actividad catalítica en la reducción de 2-octanona.	98
Tabla 4. 3. Aplicabilidad de ADH(S o R)@NITQ-2 en la reducción enzimática de distintas cetonas.	102
Tabla 4. 4. Resultados del estudio del tiempo de contacto en la obtención del (S)-2-octanol en presencia de ADH(S)@NITQ-2.	103
Tabla 4. 5. Estudio de la oxidación en distintos alcoholes racémicos en presencia de la zeolita Zr-Beta.	106
Tabla 4. 6. Estudio del tiempo de contacto (h) en la oxidación de 2-octanol utilizando Zr-Beta a 50 °C.	107
Tabla 4. 7. Efecto de la cantidad de acetona en la etapa de reducción.	109
Tabla 5. 1. Resultados de la hidrogenación de HMF en BHMF en presencia de catalizadores heterogéneos de metales nobles y no nobles descritos en la bibliografía.	124

Tabla 5. 2. Estudio de la temperatura y de la presión de H ₂ en la hidrogenación de HMF usando Co@C.....	130
Tabla 5. 3. Hidrogenación de HMF usando diferentes catalizadores ^a	133
Tabla 5. 4. Resultados de la hidrogenación catalítica de distintos compuestos carbonílicos utilizando el catalizador Co@C. ^a	138
Tabla 5. 5. Influencia del disolvente en la hidrogenación del HMF en presencia de Co@C. ^a	140
Tabla 5. 6. Resultados de la esterificación del BHMF con diferentes compuestos con grupos dadores de acilo.	143
Tabla 5. 7. Estudio de la reusabilidad en el proceso quimioenzimático para la obtención de los diésteres obtenidos a partir del BHMF y el ácido hexanoico.	144

Índice de Esquemas

Esquema 1. 1. Reacción de reducción de grupos carbonilos catalizada por la enzima ADH.	25
Esquema 1. 2. Reacción catalizada por la enzima transaminasa.	26
Esquema 1. 3. Reacción de hidrólisis de la lactosa catalizada por la enzima lactasa.	26
Esquema 1. 4. Reacción retroaldólica de la 1,6-fructosa bifosfato catalizada por la enzima aldolasa.	26
Esquema 1. 5. Reacción de isomerización de la Glucosa-Fructosa catalizada por la enzima glucosa isomerasa.	27
Esquema 1. 6. Reacción de conversión del sustrato Piruvato en Oxalacetato catalizada por la enzima piruvato carboxilasa.....	27
Esquema 3. 1. Estructura química de los flavonoides.	46
Esquema 3. 2. Hidrólisis de la naringina en dos pasos en presencia de la naringinasa.	47
Esquema 3. 3. Hidrólisis de la naringina en dos pasos en presencia de la naringinasa.	48
Esquema 3. 4. Hidrólisis de p-Nitrofenil- α -L-Ramnopiranosido (Rha-pNP).....	49
Esquema 3. 5. Hidrólisis de p-Nitrofenil- β -D-Glucósido (Glc-pNP).	50
Esquema 4. 1. Estrategias para la síntesis de alcoholes quirales: (A) resolución cinética; (B) resolución cinética dinámica.	90
Esquema 4. 2. Estrategia redox para la síntesis de alcoholes quirales mediante un sistema de oxidación reducción.	91
Esquema 4. 3. Estrategia propuesta para la síntesis de alcoholes quirales mediante un sistema de oxidación-reducción usando la zeolita Zr-Beta y la enzima ADH inmovilizada sobre una zeolita deslaminada.	92
Esquema 4. 4. Estrategias para la síntesis de alcoholes quirales mediante oxidoreductasas: (A) regeneración del cofactor usando un sistema bienzimático; (B) regeneración del cofactor usando isopropanol.	94
Esquema 5. 1. Derivados del HMF y sus aplicaciones.	122
Esquema 5. 2. Proceso quimioenzimático para la síntesis de diésteres del BHMF.	125
Esquema 5. 3. Posibles compuestos formados en la reducción catalítica del HMF.	129
Esquema 5. 4. Síntesis de ésteres del BHMF en presencia de la enzima Novozym 435 con ácidos carboxílicos de cadena corta.	141

