

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales



Universidad
Nacional
de Córdoba



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS y NATURALES

Tesis Doctoral

OXIDACIÓN ENZIMÁTICA Y ORGANOMETÁLICA DE GLICEROL PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Autor: Ing. Adrián Parodi

Directora: Dra. Ivana Magario

Marzo de 2020

OXIDACIÓN ENZIMÁTICA Y ORGANOMETÁLICA DE GLICEROL PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Por

Ing. Adrián Parodi

Dra. Ivana Magario

Directora

Comisión Asesora

Prof. Dra. Ing. **Ivana Magario**. FCEFyN, UNC

Prof. Dra. Ing. **Noelia Pía Alasino**. FCEFyN, UNC

Prof. Dr. Ing. **Mariano Asteasuain**. PLAPIQUI, UNS

Esta Tesis fue enviada a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba como requisito parcial para la obtención del grado académico de Doctor en Ciencias de la Ingeniería.

Córdoba, Argentina

(marzo de 2020)



Universidad Nacional de Córdoba
Posgrado - Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

ACTA DE EXAMEN

Libro: 00001 Acta: 00169 Hoja 01/01
LLAMADO: Llamado 1 20/03/2020
CATEDRA - MESA: 20-03-2020

(P10-DI002) TESIS DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA

NÚMERO	APELLIDO Y NOMBRE	DOCUMENTO	INGR.	COND.	NOTA	FIRMA
32608635	PARODI, Adrián Rodrigo	DNI 32608635	2015		A (Aprobado)	

PINTO, FEDERICO - GOÑI, María Laura | ROMERO, MARCELO RICARDO -
Observaciones:

Dr. Sergio Elaskar
Director
Doctorado en Ciencias de la Ingeniería
FCEFYN - UNC

Córdoba, ___ / ___ / ____ -.

Certifico que la/s firma/s que ha/n sido puesta/s en la presente Acta pertenece/n a: _____

1	0	1	0	1		
Inscriptos	Ausentes	Examinados	Reprobados (0-3)	Aprobados (4-10)		
27/03/2020	13.02.26				Libro/Acta: 0000100169	Hoja 01/01

Agradecimientos

Esta ha sido una etapa de grandes desafíos y cambios para mí. Quiero agradecer a las personas que me ayudaron e impulsaron a superar las dificultades. Con sus palabras de aliento hicieron que vea las cosas con mayor optimismo en los momentos más difíciles.

Principalmente quiero agradecer a Ivana por ser una gran guía en mi proceso de formación. Quiero destacar tu profesionalismo y gran dedicación. Admiro tu capacidad de planificación y la de plasmar rápidamente tus ideas. Además, tu actitud positiva me ayudó muchas veces a ver las cosas desde otra perspectiva. Creo que me ha tocado como directora a la mejor guía que un doctorando puede tener. Es difícil no sentirse respaldado con alguien como vos al lado. Sos una gran persona. De nuevo, ¡gracias por todo Iva!

Agradezco al departamento de Química Industrial y Aplicada de la facultad por permitirme trabajar en la planta piloto de Ingeniería Química. También a las autoridades del ICTA por permitirme la utilización de sus instalaciones. Agradezco al CONICET y la SECyT por las becas otorgadas durante estos años de trabajo.

A Martín JD, por su buena onda, por las largas charlas y por tener siempre a mano soluciones a problemas de laboratorio, crack. A Pauli, por su perseverancia, por los momentos compartidos en la planta piloto, por su comprensión y palabras de aliento. Por bancarse el ruido del compresor y no odiarme por ello. A Mati M, Naty, Agos y Juan R, por los interminables mates compartidos a lo largo de todos estos años y las charlas en las distintas oficinas que me tocó ocupar. A Flor, por su buena onda y a Mati R, por su ayuda y sus consejos. A José S, por la vez que me recibió en Río y por su buena onda. Gracias a todos.

A los amantes del café del grupo, Gera, Juan M, José M, Frank, por generar espacios de intercambio en el grupo y por traer café de los lugares más exóticos. A Juan M por todas las veces que me ayudó con equipamiento susceptible de explotar y por las juntadas en su casa. A todos los que pusieron a disposición sus hogares para realizar las fiestas del grupo. A Raquel, Nico y Lau por su buena predisposición y sus consejos. A Alexis, por la ayuda brindada.

A quienes me ayudaron a poner en funcionamiento y reparar el cromatógrafo de la planta piloto, además de darme consejos para el desarrollo de la técnica analítica e interpretación de resultados: R. Aburrá, J.P. Fasano, M. Palacio, D. Barrionuevo, P. Cortina, G. Blanco, Ezequiel, A. Santiago, S. Renzini y Juan A. A Romina Muffari del ICTA y al Dr. Lascano del INTA, por brindarme algunos reactivos necesarios. A Fabián K., Fernanda O. y Florencia L. por la ayuda brindada y la compañía durante el tiempo en que trabajamos juntos.

A Mariano y a la gente de PLAPIQUI que me trató de la mejor manera durante mi estadía en Bahía Blanca. A Sandra y Claudia del IQUIR que hicieron lo propio en Rosario.

A mi familia, y principalmente a mi vieja, que es lo más grande que hay. A Gustavo, por recibirme en Rosario y hacerme sentir como en casa.

Por último, quiero hacer mención a toda la gente que es más cercana a mí. A mis amigos: Ruso, Nico, Mati, Fede y mi hermano Luketo con quienes comparto los mejores momentos de mi vida. Por las noches de previas y caravana, las profundas charlas (y las que no lo son tanto). Por las virgadas, por los viajes y porque me ayudan a crecer, gracias linces.

Resumen

Con la motivación de valorizar biomasa bajo los principios de la química verde, en este trabajo de tesis doctoral se evaluaron catalizadores organometálicos y enzimáticos en la oxidación primaria de glicerol para la producción de las triosas gliceraldehído (GA) y dihidroxiacetona (DHA).

Estándares de ambas triosas fueron evaluados en ensayos de actividad antibacteriana sobre las cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922). Se encontró que GA fue activa sobre las tres cepas en dosis del orden de aquellas de monoterpenos naturales (6,25 g/L). Este hallazgo amplía las potenciales aplicaciones de esta sustancia. Por su parte, DHA no demostró bioactividad bajo las condiciones ensayadas. Por lo tanto, los experimentos de oxidación se direccionaron hacia la obtención selectiva de GA.

Seguidamente, se estableció una técnica analítica alternativa para la detección y cuantificación de glicerol, GA y DHA en muestras acuosas, por medio de cromatografía gaseosa acoplada a un detector de ionización de llama (GC-FID), la cual implica la derivatización con un agente silanzante en un solo paso. La presencia de los analitos sililados fue confirmada por medio de GC-MS y las curvas de calibración validadas y contrastadas con una técnica de análisis por HPLC difundida en la literatura. Se identificó cromatográficamente que cada triosa co-existe en solución como monómero, dímero o hidrato complejizando su análisis. Asimismo, se optimizó el pretratamiento de las muestras de manera de eliminar agua y asegurar la completa derivatización de los analitos.

Hematin, una protoporfirina de hierro natural fue evaluada en reacciones de oxidación tanto en medio homogéneo, como inmovilizado covalentemente sobre partículas de polimetacrilato. Se utilizó H_2O_2 como agente oxidante. Se exploraron distintas condiciones de reacción, variando el pH del medio, la concentración de glicerol, de hematin y de H_2O_2 . No obstante, las conversiones logradas fueron bajas. Se discute a la vez, la capacidad del glicerol de actuar como sustrato reductor en la vía peroxidática de hematin. Se presenta evidencia que indica que el intermediario activado de ésta coordina preferentemente a una segunda molécula de H_2O_2 por sobre la molécula de glicerol. De esta manera, se genera oxígeno molecular y radicales superóxido que desencadenan el blanqueamiento irreversible de hematin. Se hipotetiza además que la acción de hematin sobre glicerol es debida a un proceso tipo Fenton generado por la liberación, en solución, del hierro de su estructura durante el blanqueamiento.

Por otro lado, MnL -un complejo sintético de manganeso con ligandos polidentados tipo bases de Schiff- no presentó propiedades catalíticas en la producción de GA a partir de soluciones acuosas de glicerol tratadas con H_2O_2 . No obstante, presentó actividad catalítica en la oxidación de fenol (vía peroxidática) y en la descomposición de H_2O_2 para formar O_2 (vía catalítica) aunque sólo al inicio de la reacción y deteniéndose rápidamente. Dado que el rol del solvente es crucial para la formación de intermediarios catalíticos relevantes, se chequearon diferentes solventes, con la finalidad de incrementar su eficiencia catalítica. El agregado de solventes con capacidad dadora de electrones como dimetilsulfóxido o acetona al sistema mejoraron la actividad peroxidática de MnL. Se propone un mecanismo de reacciones competitivas de peroxidación y dimerización (inactivación) del complejo MnL.

Las enzimas oxidasas no requieren del uso de cofactores y son capaces de oxidar alcoholes a aldehídos utilizando oxígeno, pero son inhibidas por el H_2O_2 generado como subproducto. Se realizaron estudios para determinar la performance en la oxidación primaria de glicerol de dos sistemas bicatalíticos basados en las enzimas comerciales galactosa oxidasa de *Dactylium dendroides* (GAO) y alcohol oxidasa de *Pichia*

pastoris (AOX), ambas en tándem con hematin, en reemplazo a la enzima catalasa, comúnmente empleada para eliminar H_2O_2 del sistema. Se hipotetiza que hematin es capaz de cumplir la doble función de convertir el H_2O_2 ya sea en oxígeno, o generando un colorante en presencia de fenol y 4-aminoantipirina, lo cual es utilizado como método rápido de detección de actividad inicial de oxidasas. Esta hipótesis fue comprobada: se evaluó el efecto de la variación de la concentración de glicerol, enzima y hematin sobre las velocidades de formación de la tinta y se encontró que las tres especies ejercen un aumento de la velocidad de reacción mientras mayor es su concentración. Se pudo estimar así la actividad específica en la oxidación de glicerol, la cual se contrastó con aquella correspondiente a los sustratos naturales de ambas enzimas. Por otro lado, se inmovilizó la enzima GAO por uniones covalentes a un soporte de polimetacrilato y se evaluaron diferentes metodologías para determinar la cantidad de proteína unida. El catalizador inmovilizado resultó activo en el sistema de reacciones acopladas propuesto, lo que constituye un resultado alentador ya que posibilitaría su reutilización y fácil separación de los productos entre lotes de reacción. La evidencia presentada es contundente. Sin embargo, se basó en observaciones indirectas obtenidas durante los primeros minutos de reacción.

Por estos motivos, se realizaron reacciones de oxidación por tiempos prolongados con los sistemas bicatalíticos oxidasa/hematin, pero sin fenol (como sustrato reductor) ni 4-aminoantipirina. Se hipotetiza que hematin ejerce acción catalítica en estas condiciones, consumiendo el H_2O_2 y generando O_2 . La evolución de la concentración de oxígeno durante la reacción aportó información útil para comprender ambos sistemas y se comprobó que la presencia de hematin aceleró su consumo en todos los casos. El pico de monómero de GA pudo ser detectado en medios de reacción en los sistemas con GAO, aunque las conversiones de glicerol fueron bajas. La mayor concentración de GA (94.4 mM en 24 h) se obtuvo con el sistema GAO/Hematin a pH 9, partiendo de una concentración de glicerol inicial de 1700 mM. Este resultado fue además superior en relación al obtenido con el empleo de catalasa como co-catalizador. En sistemas con AOX se calcularon grados de conversión de glicerol de entre 7.4 y 19.5 %, partiendo de una concentración inicial de glicerol de 33 mM, aunque solo fue posible estimar una concentración de GA de 3.31 mM luego de 24 h. Se discutieron dos vías por medio de las cuales hematin ejerce su efecto: sobre GAO parece ejercer una acción fundamentalmente peroxidática, reactivando a GAO desde un estado inactivo. Por otro lado, en presencia de AOX, hematin actúa a través de la vía pseudo-catalítica que implica la generación de radicales libres que ocasionan su blanqueamiento. De esta manera, AOX queda sin la protección necesaria, inactivándose rápidamente a causa del H_2O_2 generado, lo cual detiene la reacción.

Palabras Clave: Oxidación de glicerol, Catálisis biomimética, Complejos metálicos, Hematin, Oxidasas, Inmovilización de catalizadores, Mecanismos de reacción, Sistemas bicatalíticos, Ensayos de bioactividad.

Abstract

Motivated by the valorization of biomass under the principles of green chemistry, in this doctoral thesis organometallic and enzymatic catalysts were evaluated in the primary oxidation of glycerol in order to produce the trioses glyceraldehyde (GA) and dihydroxyacetone (DHA).

Standards of both trioses were evaluated in antibacterial activity assays against the strains *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922). It was found that GA was active against all these strains in doses of the order of those of natural monoterpenes (6.25 g/L). This finding increases the number of potential uses of this substance. On the other hand, DHA did not show bioactivity under the conditions assayed. Hence, the oxidation trials were directed in obtaining GA selectively.

Next, it was established an alternative analytic technique for the detection and quantification of glycerol, GA and DHA in aqueous samples, by means of gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID), which implies the one-step derivatization with a silylating agent. The presence of the silylated analytes was confirmed by GC-MS and the calibration curves were validated and contrasted with an HPLC analysis technique disseminated in the literature. It was seen chromatographically that GA and DHA co-exists like monomer, dimer or hydrate in solution, which complexes their analysis. Likewise, the pretreatment of the aqueous samples was optimized in order to eliminate water and to assure the complete derivatization of the analytes.

Hematin, an iron natural protoporphyrin was evaluated in oxidation reactions using both, homogeneous media, and covalently immobilized on polymethacrylate particles. H_2O_2 was used as oxidizing agent. Different reaction conditions were explored, varying the pH of the medium and the concentrations of glycerol, hematin and H_2O_2 . Nevertheless, the conversions attained were low. It is discussed at the same time the ability of glycerol to act as a reducing substrate in the peroxidatic pathway of hematin. Evidence is presented, which indicates that the activated intermediate of hematin preferentially coordinates to a second H_2O_2 molecule instead of a glycerol one. Thus, molecular oxygen and superoxide radicals are formed, which trigger the irreversible bleaching of hematin. It is also hypothesized that the action of hematin upon glycerol is produced by means of a Fenton process, generated by the release into the solution of iron from its structure during bleaching.

On the other hand, MnL -a synthetic manganese complex with polydentate Schiff base ligands- did not present catalytic properties in GA production starting from glycerol aqueous solutions treated with H_2O_2 . However, it presented catalytic activity in phenol oxidation (peroxidatic pathway) and in the decomposition of H_2O_2 (catalytic pathway) although just at the beginning of the reaction and stopping rapidly. Since the role of the solvent is crucial to the formation of relevant catalytic intermediates, different solvents were checked, in order to increase the catalytic efficiency. The addition of solvents with high donor numbers like dimethyl sulfoxide and acetone improved the peroxidatic activity of MnL. A scheme of competitive peroxidation and dimerization (inactivation) reactions of the MnL complex is proposed.

Oxidases enzymes do not require the use of cofactors and are able to oxidize alcohols to aldehydes using oxygen, but they are inhibited by the H_2O_2 generated as a by-product. Studies were carried out in order to evaluate the catalytic performance in the primary glycerol oxidation of two bi-catalytic systems based on the commercial oxidases galactose oxidase of *Dactylium dendroides* (GAO) and alcohol oxidase de *Pichia pastoris* (AOX), both in tandem with hematin, which replaces the catalase enzyme, commonly used

to eliminate H_2O_2 of the system. It is hypothesized that hematin is capable to perform the double function of transform H_2O_2 either in oxygen or generating a dye in presence of phenol and 4-aminoantipyrine, which is used as a quick detection method for oxidases initial activity. This hypothesis was checked: the effect of the variation of the concentrations of glycerol, enzyme and hematin upon the dye formation reaction rate was evaluated and it was found that the 3 species exert an increase in the reaction rate the higher their concentration. The specific activity on glycerol oxidation was estimated for both enzymes and they were contrasted with those corresponding to their natural substrates. On the other hand, GAO was covalently immobilized to porous polymethacrylate support and different methods to quantify the amount of bonded protein were evaluated. The obtained catalyst was active in the system of coupled reactions, which constitutes an encouraging result since it would enable its reuse and easy recovery between different reaction batches. The evidence presented is convincing. However, it was based on indirect observations obtained during the first reaction minutes.

For these reasons, oxidation reactions for long times were carried out using the bicatalytic systems oxidase/hematin, but without phenol (as a reducing substrate) or 4-aminoantipyrine. It is hypothesized that hematin exert catalatic action in these conditions, consuming H_2O_2 and producing O_2 . The evolution of oxygen concentration during the reaction brought useful information to understand both systems and it was checked that the presence of hematin accelerated its consumption in all cases. The monomer peak of GA was detected in reaction media in systems with GAO, although glycerol conversions were low. The highest GA concentration (94.4 mM in 24 h) was obtained with the system GAO/hematin at pH 9, starting from an initial concentration of glycerol of 1700 mM. This result was also better with respect to the use of catalase as co-catalyst. In systems with AOX, conversion degrees of glycerol of 7.4 and 19.5% were calculated, starting from an initial glycerol concentration of 33 mM, although it was only possible to estimate a GA concentration of 3.31 mM after 24 h. Two pathways by which hematin exert its effect were discussed: upon GAO it seems to exert fundamentally a peroxidatic action, reactivating GAO from an inactive state. On the other hand, in presence of AOX, hematin acts through the pseudo-catalatic pathway, which implies the generation of free radicals that finally cause its inactivation. Thus, AOX is left without the necessary protection, rapidly undergoes inactivated as a consequence of the H_2O_2 generated and the reaction stops.

Keywords: Glycerol oxidation, Biomimetic catalysis, Metal complexes, Hematin, Oxidases, Immobilization of catalysts, Reaction mechanisms, Bicatalytic systems, Bioactivity assays

Resumo

Com a motivação de valorizar a biomassa sob os princípios da química verde, neste trabalho de tese de doutorado catalisadores organometálicos e enzimáticos foram avaliados na oxidação primária de glicerol para a produção das triosas gliceraldeído (GA) y dihidroxiacetona (DHA).

Estândares de ambas triosas foram avaliadas em testes de atividade antibacteriana em cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922). Verificou-se que o GA era ativo nas três cepas em doses da ordem das dos monoterpenos naturais (6,25 g/L). Por outro lado, o DHA não mostrou bioatividade nas condições analisadas. Essa descoberta amplia as possíveis aplicações dessa substância. Portanto, os experimentos de oxidação foram direcionados à obtenção seletiva de GA.

A seguir, foi estabelecida uma técnica analítica alternativa para a detecção e quantificação de glicerol, GA e DHA em amostras aquosas, por meio de cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID), que envolve derivatização com um agente silanizante numa etapa. A presença dos analitos sililados foi confirmada por meio de GC-MS e as curvas de calibração foram validadas e contrastadas com uma técnica de análise por HPLC divulgada na literatura. Foi identificado cromatograficamente que cada triosa coexiste em solução como monômero, dímero ou hidrato complexando sua análise. Da mesma forma, o pré-tratamento das amostras foi otimizado para eliminar a água e garantir a completa derivatização dos analitos.

Hematin, uma protoporfina de ferro natural foi avaliada em reações de oxidação tanto em médio homogêneo, como imobilizados covalentemente em partículas de polimetacrilato. H_2O_2 foi usado como agente oxidante. Diferentes condições de reação foram exploradas, variando o pH do meio, a concentração de glicerol, hematin e H_2O_2 . No entanto, as conversões alcançadas foram baixas. Ao mesmo tempo, é discutida a capacidade do glicerol de agir como um substrato redutor na via peroxídica da hematin. É apresentada evidência indicando que o intermediário ativado do mesmo coordena preferencialmente com uma segunda molécula de H_2O_2 em lugar de a uma molécula de glicerol. Dessa maneira, geram-se radicais moleculares de oxigênio e superóxido que desencadeiam o clareamento irreversível de hematin. É ainda hipotetizado que a ação de hematin no glicerol se deva a um processo semelhante ao Fenton gerado pela liberação, em solução, do ferro de sua estrutura durante o clareamento.

Por outro lado, o MnL - um complexo de manganês sintético com ligantes polidentados à base de Schiff - não mostrou propriedades catalíticas na produção de GA a partir de soluções aquosas de glicerol tratadas com H_2O_2 . No entanto, mostrou atividade catalítica na oxidação do fenol (via peroxídica) e na decomposição de H_2O_2 para formar O_2 (via catalítica), embora apenas no início da reação e parando rapidamente. Dado que o papel do solvente é crucial para a formação de intermediários catalíticos relevantes, diferentes solventes foram verificados, a fim de aumentar sua eficiência catalítica. A adição de solventes com uma capacidade doadora de elétrons, como dimetilsulfóxido ou acetona ao sistema melhorou a atividade peroxídica do MnL. É proposto um mecanismo de reações competitivas de peroxidação e dimerização (inativação) do complexo MnL.

As enzimas oxidases não requerem o uso de cofatores e são capazes de oxidar álcoois em aldeídos usando oxigênio, mas são inibidas pelo H_2O_2 gerado como subproduto. Estudos foram conduzidos para determinar o desempenho na oxidação primária do glicerol de dois sistemas bicatalíticos baseados nas enzimas comerciais galactose oxidase de *Dactylium dendroides* (GAO) e álcool oxidase de *Pichia pastoris*

(AOX), ambas em conjunto com hematin, substituindo a enzima catalase, comumente usada para remover o H_2O_2 do sistema. Hipotetiza-se que a hematin seja capaz de cumprir a dupla função de converter H_2O_2 em oxigênio ou gerar um corante na presença de fenol e 4-aminoantipirina, que é usado como um método rápido para detectar a atividade inicial das oxidases. Esta hipótese foi comprovada: foi avaliado o efeito da variação da concentração de glicerol, enzima e hematin nas taxas de formação de tinta e verificou-se que as três espécies exercem um aumento na taxa de reação enquanto a concentração é maior. Assim, a atividade específica na oxidação do glicerol pôde ser estimada, o que foi contrastado com o correspondente aos substratos naturais de ambas as enzimas. Por outro lado, a enzima GAO foi imobilizada por ligações covalentes a um suporte de polimetacrilato e diferentes metodologias foram avaliadas para determinar a quantidade de proteína ligada. O catalisador imobilizado estava ativo no sistema de reação acoplado proposto, o que é um resultado encorajador, pois permitiria sua reutilização e fácil separação dos produtos entre os lotes de reação. A evidência apresentada é esmagadora. No entanto, foi baseado em observações indiretas obtidas durante os primeiros minutos de reação.

Por esses motivos, as reações de oxidação foram realizadas por um longo tempo com os sistemas bicatalíticos oxidase/hematin, mas sem fenol (como substrato redutor) ou 4-aminoantipirina. Hipotetiza-se que a hematin exerça ação catalítica nessas condições, consumindo H_2O_2 e gerando O_2 . A evolução da concentração de oxigênio durante a reação forneceu informações úteis para compreender os dois sistemas e verificou-se que a presença de hematin acelerou seu consumo em todos os casos. O pico do monômero GA pode ser detectado no meio de reação nos sistemas GAO, embora as conversões de glicerol sejam baixas. A concentração mais alta de GA (94,4 mM em 24 h) foi obtida com o sistema GAO/Hematin para pH 9, iniciando com uma concentração de glicerol de 1700 mM. Este resultado também foi superior em relação ao uso da catalase como co-catalisador. Nos sistemas AOX, foram calculados graus de conversão de glicerol entre 7,4 e 19,5%, a partir de uma concentração inicial de glicerol de 33 mM, embora só fosse possível estimar uma concentração de GA de 3,31 mM após 24 h. Duas maneiras pelas quais a hematin exerce seu efeito foram discutidas: no GAO, parece exercer uma ação fundamentalmente peroxídica, reativando o GAO de um estado inativo. Por outro lado, na presença de AOX, a hematin atua através da via pseudo-catalítica que envolve a geração de radicais livres que causam seu clareamento. Dessa forma, o AOX fica sem a proteção necessária, se-inativando rapidamente devido ao H_2O_2 gerado, o que interrompe a reação.

Palavras-chave: Oxidação do glicerol, Catálise biomimética, Complexos metálicos, Hematin, Oxidases, Imobilização de catalisadores, Mecanismos de reação, Sistemas bicatalíticos, Ensaio de bioatividade.

Índice de contenido

Agradecimientos	vii
Resumen.....	ix
Abstract	xi
Resumo.....	xiii
Índice de contenido.....	xv
Capítulo 1: Introducción.....	2
1.1 Química verde en la oxidación de derivados biomásicos.....	4
1.2 Bioplaguicidas.....	5
1.3 Valorización de glicerol	7
1.3.1 Oxidación de glicerol	8
1.4 Rutas catalíticas de oxidación de glicerol.....	9
1.4.1 Catálisis metálica heterogénea	9
1.4.2 Catálisis microbiana.....	10
1.4.3 Catálisis organometálica.....	11
1.4.4 Catálisis enzimática	14
1.5 Preselección de sistemas catalíticos	17
1.5.1 Sistema Hematin-H ₂ O ₂	17
1.5.2 Sistema Fenton.....	20
1.5.3 Sistema MnL/H ₂ O ₂	21
1.5.4 Sistema alcohol oxidasa-hematin-O ₂	22
1.5.5 Sistema galactosa oxidasa-hematin-O ₂	25
1.6 Detección de oxidados de glicerol.....	27
1.7 Inmovilización de enzimas.....	28
1.7.1 El soporte seleccionado.....	30
1.7.2 Reactivo acoplante	30
1.8 Objetivos y estructura de la tesis.....	31
1.9 Referencias	31
Capítulo 2: Ensayos de bioactividad.....	44
2.1 Objetivo del capítulo	46
2.2 Métodos	46
2.2.1 Selección de microorganismos.....	46
2.2.2 Determinación de la densidad mínima de inóculo.....	47

2.2.3	Determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC) y de la concentración bactericida mínima (MBC).....	47
2.3	Resultados	48
2.3.1	Determinación de la mínima concentración de inóculo	48
2.3.2	Actividad antimicrobiana de soluciones de los estándares GA y DHA.....	49
2.4	Conclusiones del capítulo.....	51
2.5	Resultados publicados.....	51
2.6	Referencias	52
Capítulo 3:	Cuantificación de triosas por GC-FID: Desarrollo de técnica analítica.....	54
3.1	Objetivo del capítulo	56
3.2	Materiales.....	56
3.3	Métodos	56
3.3.1	Procesamiento de la muestra.....	56
3.3.2	Cromatografía gaseosa.....	57
3.3.3	Calibración en GC y validación	58
3.3.4	Mediciones por HPLC	59
3.4	Resultados y discusión.....	60
3.4.1	Respuesta cromatográfica de analitos puros y sus derivados TMS	60
3.4.2	Estudio de la reacción de derivatización	64
3.4.3	Selección de un estándar interno.....	67
3.4.4	Influencia del pretratamiento en el análisis de los derivados TMS.....	67
3.4.5	Identificación de derivados TMS por GC-MS.....	70
3.4.6	Curvas de calibración y validación.....	71
3.5	Conclusiones del capítulo.....	75
3.6	Resultados publicados.....	76
3.7	Referencias	76
Capítulo 4:	Oxidación de glicerol con hematin	78
4.1	Objetivos del capítulo.....	80
4.2	Materiales.....	80
4.3	Métodos	80
4.3.1	Inmovilización covalente de hematin.....	80
4.3.2	Inmovilización electrostática de hematin	82
4.3.3	Determinación de hematin inmovilizado	82
4.3.4	Ensayos de oxidación de glicerol.....	82
4.3.5	Pruebas de actividad catalítica de hematin.....	84
4.3.6	Pruebas de actividad peroxidática de hematin	84

4.4	Resultados	86
4.4.1	Oxidación de glicerol con hematin libre	86
4.4.2	Inmovilización de hematin	88
4.4.3	Oxidación de glicerol con hematin inmovilizado.....	90
4.4.4	Oxidación de glicerol mediante sistema Fenton	92
4.4.5	Propuesta de mecanismo de reacción	92
4.5	Conclusiones del capítulo.....	96
4.6	Resultados publicados.....	97
4.7	Referencias	97
Capítulo 5: Complejo mononuclear de manganeso en reacciones de oxidación		100
5.1	Objetivo del capítulo	102
5.2	Materiales.....	102
5.3	Métodos	102
5.3.1	Oxidación de glicerol con MnL ⁻	102
5.3.2	Actividad catalítica de MnL ⁻	102
5.3.3	Actividad peroxidática de MnL ⁻	102
5.4	Resultados y discusión.....	103
5.4.1	Oxidación de glicerol con complejo MnL ⁻	103
5.4.2	Actividad catalítica y peroxidática del complejo MnL ⁻	104
5.5	Conclusiones.....	108
5.6	Resultados publicados.....	108
5.7	Referencias	108
Capítulo 6: Oxidación de glicerol con sistemas bicatalíticos: Detección de actividad inicial.....		110
6.1	Objetivo del capítulo	112
6.2	Materiales.....	112
6.3	Métodos	112
6.3.1	Ensayos de actividad catalítica	112
6.3.2	Inmovilización de GAO en soporte de polimetacrilato	114
6.3.3	Cuantificación de GAO inmovilizada	116
6.3.4	Prueba de actividad para GAO inmovilizada	116
6.4	Resultados y discusión.....	116
6.4.1	Identificación de biocatálisis oxidativa a través de la reacción acoplada	116
6.4.2	Cinética de la reacción acoplada	117
6.4.3	Determinación preliminar de actividades específicas.....	120
6.4.4	Puesta a punto de técnica espectrofotométrica para cuantificación de GAO soportada	121
6.4.5	Cuantificación de GAO soportada	122

6.4.6	Pruebas de actividad con GAO inmovilizado.....	123
6.5	Conclusiones.....	124
6.6	Resultados publicados.....	125
6.7	Referencias.....	125
Capítulo 7:	Perfil de productos y reactivos en la oxidación con sistemas bicatalíticos	126
7.1	Objetivo del capítulo	128
7.2	Materiales.....	128
7.3	Métodos	128
7.3.1	Experimentos de oxidación	128
7.3.2	Procesamiento de muestras.....	130
7.3.3	Cromatografía gaseosa.....	130
7.3.4	Determinaciones con reactivo de Schiff.....	131
7.3.5	Determinación de actividad catalasa	132
7.4	Resultados y discusión.....	132
7.4.1	Optimización del procesamiento de muestras.....	132
7.4.2	Reacciones con AOX	135
7.4.3	Reacciones con GAO.....	139
7.4.4	Resumen de la evidencia cromatográfica	144
7.4.5	Evolución de oxígeno disuelto en sistemas oxidasa/hematin.....	146
7.5	Conclusiones.....	149
7.6	Resultados publicados.....	150
7.7	Referencias	150
Capítulo 8:	Conclusiones y perspectivas futuras.....	152
8.1	Conclusiones generales.....	154
8.2	Trabajos a futuro	156
Anexos.....		158
Anexo 1:	Ensayos con reactivo de Bradford.....	160
Introducción		160
Metodología		160
Preparación de solución de Bradford (RB)		160
Procedimiento estándar.....		160
Microensayo.....		161
Resultados		161
Calibración con BSA: Procedimiento estándar.....		161
Calibración con BSA vs. GAO: Microensayo		161
Interferencia de soluciones buffer		162

Conclusión	164
Referencias	164
Anexo 2: Determinación de la actividad de la enzima catalasa	166
Introducción	166
Metodología	166
Reactivos	166
Procedimiento	166
Resultados	167
Referencias	167
Anexo 3: Cromatogramas.....	168

Capítulo 1: Introducción

1.1 Química verde en la oxidación de derivados biomásicos

Existe en la industria química una tendencia creciente a generar procesos más eficientes y amigables con el medio ambiente. A esta tendencia se la conoce actualmente como química verde e implica un cambio de paradigma, pasando del concepto tradicional de eficiencia (el cual se focaliza especialmente en los rendimientos químicos) a otro en donde se le da valor a la eliminación en la fuente de la generación de residuos y del uso de sustancias peligrosas y/o tóxicas [1]. Una buena definición de la química verde se puede formular como sigue: la química verde utiliza materias primas (preferentemente renovables) de manera eficiente, elimina o disminuye la generación de residuos y evita el uso de solventes y reactivos tóxicos y/o peligrosos en la manufactura y aplicación de productos químicos [1]. La química verde impulsa el diseño de procesos y productos ambientalmente benignos y se rige por los siguientes 12 principios [1,2]:

1. Prevención de la generación de residuos antes que la remediación.
2. Eficiencia o economía de átomos: se deben diseñar los procesos de tal manera que la mayor cantidad del material utilizado sea incorporado en el producto final.
3. Uso de químicos de menor toxicidad y peligrosidad: tanto para el ser humano como para el medio ambiente.
4. Diseño de productos más seguros: para que cumplan con su función a la vez que se reduce su toxicidad.
5. Uso de solventes y sustancias auxiliares inocuas.
6. Uso eficiente de la energía.
7. Uso de materiales renovables, preferentemente.
8. Síntesis de productos en menor cantidad de pasos: esto implica la reducción de la generación de productos intermediarios y de desechos.
9. Uso de reactivos catalíticos en vez de estequiométricos: son superiores en cuanto a rendimientos.
10. Diseño de productos para que sean degradables.
11. Metodologías analíticas que eviten la contaminación.
12. Diseño de procesos inherentemente más seguros para prevención de accidentes.

Varios de estos principios guardan una íntima relación. Por ejemplo, un proceso que genera una menor cantidad de desechos también mejora la eficiencia de átomos.

Así como gran parte del desarrollo económico y tecnológico logrado durante el siglo XX estuvo impulsado principalmente por el acceso a combustibles fósiles, el desarrollo y la sustentabilidad futura van a basarse en gran medida en el uso apropiado e innovador de diversos materiales de origen biomásico. Entre estos materiales se encuentran desechos de la industria forestal, excrementos de animales, cultivos producidos con fines de producción de energía, entre otros. Gran cantidad de compuestos pueden ser obtenidos a partir del procesamiento de la biomasa, como por ejemplo alcoholes, combustibles, ácidos orgánicos, proteínas, etc. La industria de la biomasa o bioindustria, genera commodities claves hoy en día, como el etanol, aminoácidos, ácido láctico, ácido acético, ésteres de ácidos grasos, furfural, entre muchos otros [2]. Dos ejemplos ilustrativos y de relevancia para nuestro país incluyen el bioetanol y el biodiesel. El bioetanol se produce principalmente a partir de la fermentación del azúcar de caña y del maíz y el volumen de producción a nivel mundial alcanzó unos 120 millones de m³ en 2018 [3]. Aproximadamente el 70% del volumen producido se utiliza en el corte de naftas con contenidos de etanol de 15% y 85% [4]. Otro producto importante de la bioindustria es el biodiesel, cuya producción a nivel mundial aumentó significativamente en las últimas décadas debido a políticas de sustentabilidad y empleo de recursos renovables. La producción mundial de este biocombustible en el año 2000 fue de menos de 1 millón de m³ [5], lo que equivale a 0,9 millones de toneladas (Mtn) y llegó a los 34,1 Mtn en el año 2016 [6].

Argentina se ubica como el quinto productor mundial de este biocombustible con una producción de unos 2,7 Mtn en 2018 [6] y como el mayor exportador a nivel mundial [3]. En Argentina, la producción de biodiesel se realiza principalmente a través de la transesterificación del aceite de soja con metanol. El principal subproducto de este proceso es el glicerol, generándose aproximadamente 10 kg por cada 100 kg de biodiesel [7]. De esta manera, la producción de glicerol a partir del biodiesel ascendió a 3,4 Mtn en 2016 a nivel mundial y a 0,27 Mtn en Argentina en 2018. Esto ha provocado una enorme oferta de glicerol, con la consecuente disminución de su valor comercial.

Por su parte, las reacciones de oxidación son una importante vía para la obtención de productos de interés en la industria, y la oxidación de alcoholes para formar compuestos carbonílicos se encuentra entre las transformaciones más importantes en la síntesis orgánica [8]. Las reacciones catalíticas convencionales para llevar a cabo tales transformaciones generalmente involucran el uso de metales tóxicos como paladio, iridio, rutenio y molibdeno. Además, muchas veces utilizan solventes y/u oxidantes peligrosos. Sin embargo, el O₂ se encuentra fácilmente disponible, es barato y adecuado cuando el reactivo está en fase gaseosa y se debe procesar en grandes cantidades [9], debido a que los costos operativos y de mantenimiento son elevados cuando se trabaja con gases presurizados. Adicionalmente, las oxidaciones aeróbicas pueden provocar combustiones y las conversiones en general se mantienen bajas para evitar la sobreoxidación [10,11]. Por otro lado, los productos de química fina se caracterizan por poseer varios grupos funcionales, elevados puntos de ebullición y estabilidad térmica limitada y generalmente su producción es llevada a cabo en fase líquida, los volúmenes manejados son menores y los procesos son discontinuos. En estos casos, el uso de H₂O₂ ofrece las ventajas de ser simple y fácil de usar y los costos operativos son menores que con O₂.

La oxidación de alcoholes para generar aldehídos y cetonas es una de las operaciones más importantes en la industria de la química fina debido a que estos constituyen moléculas esenciales (building blocks) para la producción de muchos productos químicos valiosos [12]. La metodología tradicionalmente empleada es el uso de cantidades estequiométricas de oxidantes que contienen metales pesados como Cr y Mn [13]. También se utiliza la metodología de Pfitzner-Moffat, la cual se vale del uso de dimetilsulfóxido como oxidante en presencia de un activador como N,N'-diciclohexilcarbodiimida, un anhídrido ácido o un haluro de acilo [14]. Aunque estos últimos métodos evitan el uso de metales pesados, generalmente involucran el uso de oxidantes sensibles a la humedad y solventes de reacción poco amigables, como compuestos clorados. La economía de átomos en la oxidación de alcoholes por medio de estos métodos es extremadamente desventajosa, debido a que el proceso solamente requiere la transferencia formal de dos átomos de hidrógeno. Actualmente, la oxidación de alcoholes se basa en el empleo de catalizadores químicos junto con oxígeno o peróxido de hidrógeno, produciéndose únicamente agua como subproducto. Entre los métodos reportados, los catalizadores basados en Pd [15], Pt [15,16], Ru [17] y W [18] han demostrado gran potencial. Por otro lado se utilizan métodos enzimáticos, los cuales usualmente muestran elevada especificidad y selectividad, producen menos residuos y se llevan a cabo bajo condiciones suaves de reacción [12]. Las alcohol deshidrogenasas (ADH) y las alcohol oxidasas (AOX) son utilizadas con esta finalidad. La ADH requiere del agregado de un cofactor como NAD⁺ o NADP⁺ como aceptor de electrones [19], los cuales pueden ser inestables y costosos y se requiere de un sistema de regeneración del cofactor. Por otro lado, las AOX utilizan O₂ molecular como oxidante verde y solo generan H₂O₂ como subproducto [20]. Para prevenir la inhibición de estas enzimas por H₂O₂ se agrega una catalasa o peroxidasa al medio de reacción.

1.2 Bioplaguicidas

Los biopesticidas o bioplaguicidas son derivados de materiales naturales como animales, plantas, microorganismos y minerales. Son altamente específicos contra las plagas objetivo y generalmente

representan poco o ningún riesgo para las personas o el medio ambiente [21]. Los pesticidas tradicionales, por el contrario, en general son materiales sintéticos, suelen tener una gran persistencia en el medio ambiente y afectan no solo a la plaga objetivo, sino también a otros, como insectos benéficos (polinizadores), la vegetación circundante y la vida silvestre [21].

La OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) define a un bioplaguicida como una formulación o producto de un compuesto puro, obtenido desde una fuente natural para el control de plagas de una forma amigable con el ambiente y con escaso efecto sobre la salud humana. Los bioplaguicidas son eficaces en el control de plagas agrícolas, sin causar daños graves al ambiente ni contaminación. Por su naturaleza biológica, promueven el desarrollo sustentable de la agricultura. Los bioplaguicidas obtenidos a partir de especies vegetales presentan una serie de limitaciones, entre las más importantes se encuentran:

- Los tiempos durante los cuales se pueden almacenar son menores, comparados con los de origen sintético, debido a que tienden a degradarse con mayor facilidad.
- La dificultad en la producción a escala industrial. La disponibilidad del material vegetal se ve afectado por las condiciones ambientales.
- La actividad como bioplaguicida muchas veces no puede ser asignada a un único compuesto y las concentraciones de los principios activos pueden variar entre distintos cultivares.

El mercado global de bioplaguicidas ha aumentado de forma ininterrumpida en los últimos años. En el año 2011 este mercado fue evaluado en 1300 millones de dólares en Estados Unidos y se espera un crecimiento de cerca de 144% para el año 2020 [22]. Los bactericidas son los bioplaguicidas de mayor mercado a nivel mundial. En cambio, dentro de los plaguicidas de origen sintético, los herbicidas son los más utilizados. Factores importantes para el crecimiento del mercado de bioplaguicidas son la demanda de una producción agrícola y de sus productos libre de plaguicidas y también el crecimiento del mercado de alimentos [22].

Muchos metabolitos secundarios (aquellos compuestos que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción) poseen actividad antimicrobiana y pueden ser de plantas (frutas, vegetales, semillas, hierbas y especias), de animales (huevos, leche y tejidos) y de microorganismos (hongos y bacterias) [23–25]. Debido a su potencial como antimicrobianos contra organismos patógenos y del deterioro, estos metabolitos están cobrando mucha importancia en la industria de alimentos [26–28]. Los principales compuestos con actividad antibacteriana son los fenólicos, los terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides [29–32].

La toxicidad de compuestos carbonílicos, como los aldehídos y cetonas, está relacionada a la electrofilicidad de este grupo funcional y a su polarizabilidad (esto es, a la facilidad con la cual la densidad electrónica del grupo carbonilo puede ser desplazada y distribuida -o deslocalizada- entre distintos átomos). La diferencia de polarizabilidad tiene incidencia en su mecanismo de acción [33]. Los aldehídos, notablemente el formaldehído y el glutaraldehído, son conocidos por poseer una potente actividad antimicrobiana [34] y se utilizan ampliamente como desinfectantes debido a su actividad contra bacterias y sus esporas, virus y hongos [35]. Algunos estudios sugieren que la toxicidad de los aldehídos es mayor a la de las cetonas, lo cual se debe al mayor poder electrofílico de los primeros [36]. Durante la peroxidación de lípidos se producen diferentes aldehídos 4 hidroxí- α , β -insaturados como el 4-hidroxí-2-trans-hexenal (HHE), 4-hidroxí-2-trans-octenal (HOE), 4-hidroxí-2-trans-nonenal (HNE), 4-hidroxí-2-transdecenal (HDE). Estos aldehídos son de interés debido a su reactividad con biomoléculas, por su toxicidad y porque son producidos en los aceites comestibles cuando son calentados [37,38]. Los aldehídos pueden formar bases de Schiff con las proteínas, alterándolas [39]. La acción antimicrobiana de los aldehídos parece manifestarse principalmente a través de su interacción con las superficies celulares lo que produce una

perturbación de las funciones de las proteínas de membrana [40,41]. La actividad biocida de aldehídos disminuye con el largo de la cadena carbonada y también depende de la presencia o ausencia de enlaces insaturados, siendo los aldehídos insaturados más activos que sus homólogos saturados [42].

1.3 Valorización de glicerol

Actualmente el glicerol obtenido en nuestro país como subproducto luego de su separación del biodiesel se exporta a diferentes países [43] y cuenta simplemente con un tratamiento de purificación parcial, por lo tanto, se está frente a una materia prima de muy bajo costo, a la cual se le agrega muy poco valor. Por estos motivos, la acumulación de glicerol se ha convertido en un gran problema para la economía del proceso, razón por la cual deben encontrarse nuevos usos a este excedente con la finalidad de mejorar toda la cadena de valor de la producción del biodiesel. Por otro lado, el glicerol es también el subproducto más importante de otras industrias, como por ejemplo la de producción de jabón.

Dentro de las propiedades físicas del glicerol se encuentran su higroscopicidad y elevada viscosidad por lo cual son muy utilizados en la industria cosmética para fabricación de cremas, lociones, como humectantes, plastificantes y lubricantes. Se utiliza en la industria del tabaco, de las gomas y plásticos. Por otro lado, debido a sus tres grupos hidroxilo, el glicerol tiene características de solubilidad similares a las del agua y de alcoholes alifáticos sencillos y se utiliza como solvente de muchos compuestos industriales, en preparaciones farmacéuticas y de saborizantes. Las soluciones acuosas de glicerol (hasta en un 80 % en peso, aproximadamente) tienen la característica de poseer puntos de fusión menores a los del agua pura, y por lo tanto se utilizan como anticongelantes. Además, como el glicerol es un líquido en condiciones atmosféricas, es fácil de manejar y de almacenar. El glicerol es virtualmente no tóxico, es incoloro y tiene un ligero sabor dulce, por lo cual puede ser utilizado en la industria farmacéutica y alimenticia [44].

El glicerol -1,2,3-propanotriol- es un triálcohol el cual es estable a temperaturas normales de almacenamiento y uso, sin embargo, puede oxidarse parcialmente si entra en contacto con el aire especialmente a temperaturas mayores a 54°C [45]. A su vez, es capaz de reaccionar para formar una gran cantidad de compuestos y es considerado un building-block. Actualmente es utilizado para la fabricación poliéteres destinados a la producción de espumas de poliuretanos. Además, el glicerol puede ser nitrado para formar nitroglicerina la cual se utiliza en la fabricación de dinamita y como vasodilatador contra enfermedades coronarias [46]. La demanda estimada de glicerol a nivel mundial en el año 2011 fue de 2,0 Mtn y se espera que llegue a 3,1 Mtn en el año 2020 [47]. Estos valores implican que la oferta de glicerol es mayor a la demanda y solo se ha tenido en cuenta al glicerol proveniente de la producción del biodiesel.

Debido a su naturaleza altamente funcionalizada, el glicerol puede ser transformado químicamente en una gran variedad de productos (Figura 1.1). Por ejemplo, puede ser reformado para producir gas de síntesis, el cual se utiliza para la fabricación de combustibles líquidos a través del proceso Fischer-Tropsch y para producción de H₂. Los estudios de halogenación de glicerol se han abocado particularmente a la cloración, por medio de la cual se puede obtener 1,3 dicloropropanol, un intermediario en la síntesis de epiclorhidrina, la cual se utiliza en la producción de resinas epoxi, elastómeros sintéticos y en la industria del papel [48]. La reducción se utiliza para obtener dialcoholes, el 1,3-propanodiol se utiliza para la fabricación de poliésteres y el 1,2-propanodiol es un importante commodity derivado del óxido de propileno. A través de la deshidratación de glicerol puede obtenerse acroleína el cual puede ser utilizado en la producción de ácido acrílico, productos farmacéuticos y para tratamiento de fibras, entre otros. La esterificación permite obtener aditivos oxigenados para el biodiesel, como por ejemplo los tert-butil éteres de glicerol o los acetales cíclicos. Los poligliceroles y sus ésteres están ganando relevancia en su uso como surfactantes, lubricantes, en cosmética y como aditivos para alimentos. Por su parte, la esterificación de

glicerol con ácidos grasos para producir mono y diglicéridos (MAG y DAG, respectivamente) es un área muy activa de investigación [48,49] ya que son muy utilizados principalmente en la industria alimenticia debido a sus propiedades como surfactantes no iónicos y emulsificantes. El carbonato de glicerol es un solvente útil para plásticos y resinas, como las de acetato de celulosa, nylon, nitrocelulosa y poliacrilonitrilo. Otra vía interesante de valorización es su oxidación.

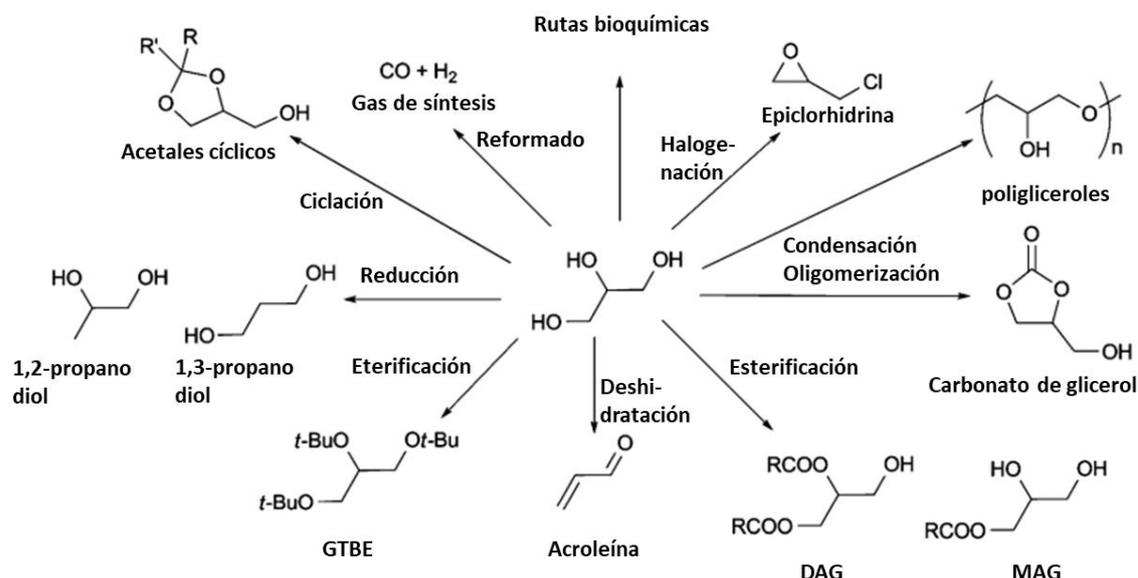


Figura 1.1. Algunas posibles rutas para la valorización del glicerol. Adaptado de Katryniok (2011) [50].

1.3.1 Oxidación de glicerol

A partir de la oxidación de glicerol se pueden formar una gran variedad de productos (Figura 1.2), los cuales incluyen aldehídos, cetonas y ácidos carboxílicos, los cuales son utilizados frecuentemente en la preparación de nuevos productos químicos para la industria cosmética, médica y de alimentos [51]. Los productos oxigenados más valiosos generados a partir de glicerol son la dihidroxiacetona (DHA), gliceraldehído (GA), ácido glicérico, ácido hidroxipirúvico, ácido tartrónico, ácido mesoxálico, ácido glicólico y ácido glicoxálico [50,51].

El ácido glicérico tiene aplicaciones en medicina ya que es un metabolito de la glucólisis y un intermediario en la síntesis de aminoácidos; se utiliza para el tratamiento de enfermedades de la piel. El ácido tartrónico se puede utilizar como absorbedor de oxígeno y en productos farmacéuticos destinados al tratamiento de la osteoporosis y de la obesidad. El ácido mesoxálico se utiliza como agente acomplejante, como precursor en síntesis orgánica y como agente anti VIH. El ácido glicólico se utiliza como desengrasante, removedor de óxidos, productos para el cuidado de la piel, en el teñido y curtido de cueros [52]. El ácido fórmico se utiliza en la industria del cuero, en agricultura, las sales de ácido fórmico para deshielo de pistas de aterrizaje en aeropuertos y en celdas de combustible. El ácido hidroxipirúvico puede ser utilizado como material de partida en la síntesis de D,L-serina [53], es un componente del aroma de algunos quesos y es utilizado en maduración de frutas [54].

Por otro lado, DHA y GA son los productos de la oxidación primaria de glicerol y constituyen las triosas más simples. DHA es utilizada en formulaciones para tratar la psoriasis [55], vitiligo [56,57] y en formulaciones para cremas autobronceantes [58]. GA se utiliza en la preparación de cosméticos [59] y en la síntesis de azúcares [60]. Debido a su estructura, estas sustancias podrían presentar actividad antimicrobiana. Desde el punto de vista de la química verde, los compuestos obtenidos a partir de la oxidación del glicerol pueden considerarse como derivados de compuestos naturales, ya que se generan como un subproducto de un compuesto natural. Además, desde la perspectiva de la producción de

bioplaguicidas, poseen la ventaja de que su producción a escala industrial sería más factible, dado que la disponibilidad de la materia prima es mayor y la variabilidad en cuanto a composición es menor si se compara con productos de origen vegetal.

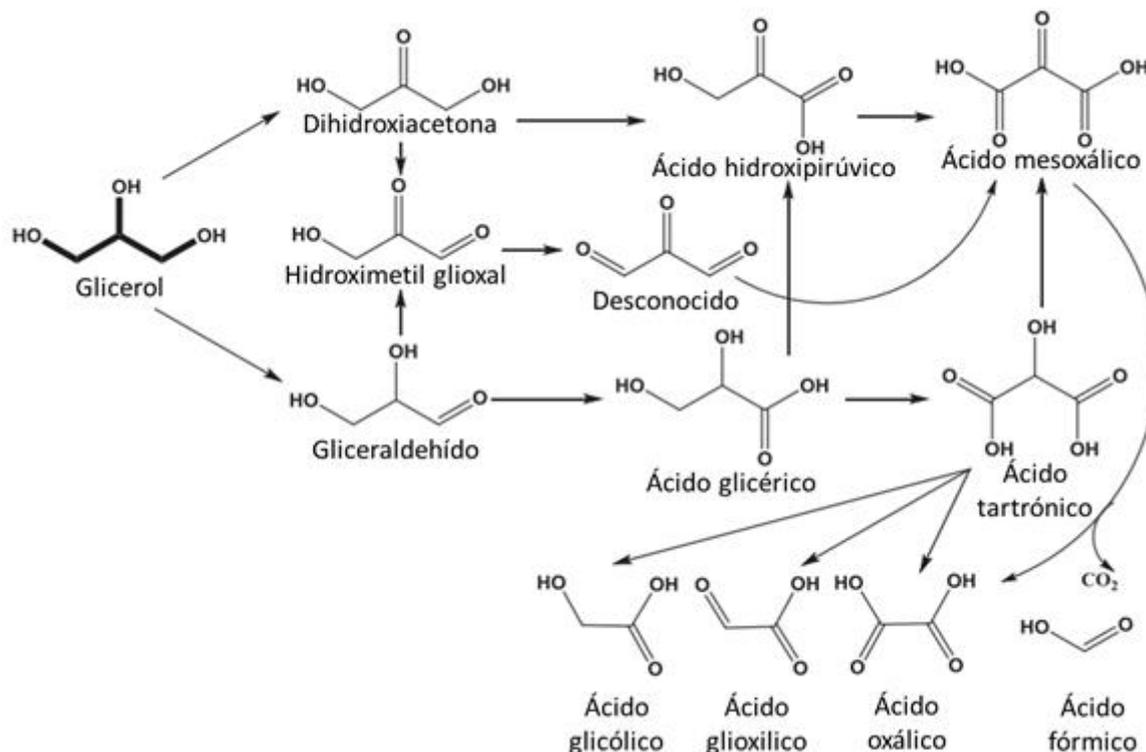


Figura 1.2. Esquema general de reacciones posibles para generar derivados oxigenados del glicerol. Adaptado de Zhou et al. (2008) [61].

1.4 Rutas catalíticas de oxidación de glicerol

1.4.1 Catálisis metálica heterogénea

La catálisis heterogénea orientada a la oxidación del glicerol es un área de investigación muy activa desde hace varios años, con una gran cantidad de artículos publicados relacionados a la temática como así también varios artículos de revisión [48,50,51,62]. Basado en el análisis realizado por Kiakalaieh et al. (2018) [51], la gran mayoría de los estudios se realizaron con catalizadores basados en metales tales como Au, Pt y Pd, pero también se reportaron otras opciones, como Cu, Ag, Bi o Ce. Se utilizaron tanto catalizadores monometálicos, bimetálicos como multimetálicos. Dentro de los soportes utilizados se encuentran el carbón negro, carbón activado, grafeno, nanotubos de carbono, hidróxido doble capa de Mg-Al (LDHs), óxidos metálicos, zeolitas y polímeros.

Las condiciones de operación reportadas son muy variadas al igual que los rendimientos y selectividades obtenidas. La selectividad puede ajustarse en algunos casos modificando la composición del catalizador heterogéneo utilizado. Las temperaturas de tales oxidaciones variaron entre 25 °C y 150 °C. Las reacciones siempre se llevaron a cabo en medio líquido, como agente oxidante más común se utilizó O₂ puro (con presiones entre 1 y 10 atmósferas aproximadamente), luego aire y en algunos casos también H₂O₂. Una de las grandes desventajas de los catalizadores basados en metales soportados es su tendencia al envenenamiento con O₂ cuando su presión parcial es elevada. Por otro lado, los tiempos de reacción estuvieron en la mayoría de los casos debajo de las 8 h, aunque también se reportaron tiempos de hasta 24 h. Las conversiones de glicerol variaron desde un 30% hasta un 100% e incluso algunos catalizadores

no se mostraron activos. Las selectividades, por su parte, resultaron muy variables y los estudios apuntaron a distintos productos, como DHA, ácido glicérico, ácido fórmico, ácido glicólico o ácido láctico. Katryniok et al. (2011) reportaron una dependencia respecto al pH de la vía de oxidación primaria del glicerol, siendo favorecida la formación de GA en medio básico y de DHA en medio ácido. También reportaron la posibilidad de interconversión entre GA y DHA en función de la basicidad del medio, siendo GA y DHA más estables en medio básico y ácido, respectivamente [50]. Se ha demostrado que la presencia de un medio básico favorece la pérdida de hidrógeno del glicerol, el primer paso en el proceso de oxidación, considerado esencial para la oxidación de alcoholes primarios [63,64]. La concentración de glicerol en todos los casos reportados fue igual o menor a 1,5 M y el solvente elegido fue agua.

Sin embargo, en la mayoría de los casos se han utilizado catalizadores basados en metales costosos como oro, platino y paladio, que de sustituirse por otros más económicos (como por ejemplo hierro o manganeso), podrían favorecer la factibilidad de este tipo de oxidaciones. También es habitual el uso de oxígeno a presiones moderadas, a pesar de que este es capaz de producir el envenenamiento del catalizador. Por esta razón, debe disponerse de un sistema para manejo de gases presurizados, lo cual incrementa el costo del proceso. El uso de aire a presión atmosférica puede reducir los costos de manejo de gases, a la vez que evitaría la inactivación de estos catalizadores.

1.4.2 Catálisis microbiana

Existen reportes de diferentes sustancias producidas a partir del tratamiento oxidativo de glicerol con microorganismos, entre ellas se encuentran DHA, ácido glicérico, ácido 3-hidroxi-propanoico y ácido láctico [65]. DHA se produce industrialmente a través de la oxidación producida por la bacteria *Gluconobacter oxydans* [66], aunque el uso de otros microorganismos de la familia *Gluconobacter* también ha sido evaluado [67,68]. Distintos estudios se focalizaron en el uso de esta bacteria tanto en medio homogéneo como soportadas, reportando conversiones de glicerol que van desde 60 % hasta 82 % partiendo de concentraciones iniciales en el medio de cultivo de entre 0,11 y 0,87 M, con rendimientos de DHA de entre 0,8 y 0,95 kg DHA/kg GLY (glicerol). Los tiempos de procesamiento reportados variaron entre 6 y 30 días. La inmovilización de la bacteria produjo una mejora en el rendimiento de la reacción, como así también la posibilidad de tratar sucesivos lotes de medio de cultivo fresco. La disponibilidad de oxígeno es uno de los mayores inconvenientes del proceso como así también la intolerancia de las células a concentraciones elevadas tanto de sustrato como de producto. Además, la separación de la DHA es relativamente costosa, laboriosa y requiere de mucho tiempo [69]. Como ventajas del método se pueden mencionar la alta selectividad y rendimientos alcanzados. Por otro lado, se ha reportado la síntesis química de DHA a partir de formaldehído en un medio bifásico utilizando un catalizador de transferencia de fase [70], dicho proceso requiere de mayores medidas de seguridad que el método microbiológico debido a la naturaleza peligrosa de las reacciones químicas involucradas [66]. Por otro lado, se ha reportado la producción de ácido glicérico utilizando *Acetobacter tropicalis* (NBRC16470) y *Gluconobacter frateurii* [71]. A partir de 200 g/L (2,17 M) de glicerol y 4 días de cultivo, *G. frateurii* produjo 136,5 g/L (1,29 M) de ácido glicérico, siendo un 72% el enantiómero D; por otro lado, *A. tropicalis* produjo 101,8 g/L (0,96 M), pero con un porcentaje para el enantiómero D de un 99%. Por lo tanto, la producción es altamente selectiva hacia el enantiómero D, lo que abre la posibilidad de su potencial uso en medicina. Hong et al. [72] fueron capaces de encontrar 8 cepas bacterianas capaces de convertir glicerol a ácido láctico de las cuales *E. coli* AC-521 produjo los mejores resultados bajo las condiciones optimizadas de 42°C y pH 6,5, con una productividad de 0,97 g/L.h, un rendimiento de 0,9 mol/mol de glicerol y llegando a una concentración de producto de 85,5 g/L (0,95 M).

Entre las ventajas de estos métodos se puede mencionar que se obtienen conversiones elevadas y buenos rendimientos hacia los productos de interés. Las principales desventajas de los métodos biológicos

radican en los largos tiempos necesarios para producir las fermentaciones, el gasto energético en el que se incurre en la esterilización del equipamiento y del medio donde se lleva a cabo la reacción, la posibilidad de contaminación del reactor por otros microorganismos, la posible inhibición del crecimiento celular por elevadas concentraciones de sustratos y productos, y la dificultad de brindar el oxígeno requerido de manera efectiva al sistema. Otro problema es la separación posterior de los productos luego de la reacción. El uso de enzimas puede ayudar a superar algunas de estas limitaciones, disminuyendo los gastos energéticos y facilitando la posterior purificación de los productos. Sin embargo, para que el proceso sea eficiente es necesario inmovilizar y estabilizar las enzimas para que puedan ser reutilizadas, disminuyendo los costos del proceso.

1.4.3 Catálisis organometálica

Otra posibilidad muy interesante para llevar adelante reacciones de oxidación es la del uso de complejos metálicos como catalizadores, generalmente en fase homogénea. Se considera un complejo metálico a una entidad química formada generalmente por un átomo central metálico, el cual posee orbitales de valencia desocupados rodeado por un cierto número de moléculas o iones (denominados ligandos) que poseen pares de electrones no compartidos, los cuales pueden ceder al centro metálico para formar enlaces de coordinación. Estos enlaces suelen ser un poco más débiles que un enlace covalente típico [73]. Generalmente el grupo central suele ser un catión, aunque también puede ser un átomo neutro o incluso un anión. Los ligandos más importantes son aquellas moléculas o iones que tienen átomos de la parte superior derecha de la tabla periódica, como N y O seguido luego por otros con átomos de carbono, fósforo, azufre, cloro, flúor, etc. Estos ligandos pueden ser monodentados, como el amoníaco, o polidentados, los cuales son capaces de formar más de una unión de manera simultánea con el metal y se los conoce también con el nombre de agentes quelantes. Una clase importante de ligandos son los de base de Schiff (las cuales se forman generalmente a través de la condensación entre un aldehído y una amina primaria). La imina formada actúa como ligante de metales gracias a los pares de electrones libres del átomo de nitrógeno [74]. En la Figura 1.3 se muestran algunos ligandos comunes del tipo base de Schiff.

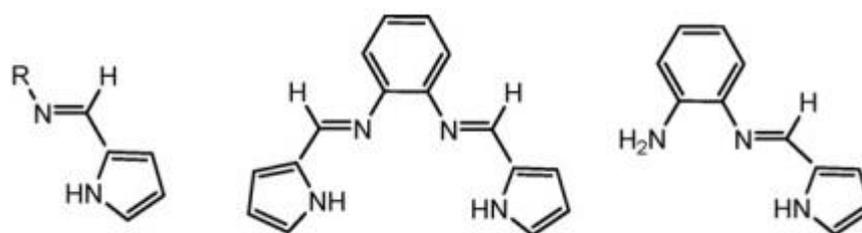


Figura 1.3. Ligandos tipo base de Schiff comunes.

Los complejos de bases de Schiff de metales de transición son catalizadores eficientes, tanto en reacciones llevadas a cabo en medio homogéneo como heterogéneo y la actividad de estos complejos puede ser ajustada modificando el tipo y número de ligandos, la carga local, la geometría alrededor del metal y, por supuesto, el tipo de metal utilizado [74,75]. Este tipo de complejos ha sido investigado en una gran variedad de reacciones como, por ejemplo: polimerizaciones, oxidaciones, epoxidaciones, reducción de cetonas, descomposición de H_2O_2 , entre otras [74]. Dentro de este grupo de compuestos, los complejos de Mn son muy estudiados como agentes antioxidantes y como terapéuticos en la reducción del daño en los tejidos causado por el estrés oxidativo [76–79]. Se utilizan en este sentido como biomiméticos de enzimas superóxido dismutasas (SOD), las cuales son capaces de descomponer el anión radical superóxido O_2^- para formar H_2O_2 , y de enzimas catalasas (CAT), capaces de descomponer el H_2O_2

para generar O_2 . Diversos complejos mononucleares de Mn han sido reportados como miméticos de SOD [76,77] y los complejos dinucleares, como miméticos de CAT [78,79].

Por otro lado, existen varios reportes del uso de complejos metálicos en la oxidación de glicerol (Tabla 1.1), aunque en cantidad es comparativamente menor que los reportes con catalizadores metálicos. La mayoría estos complejos poseen ligandos tipo base de Schiff, como el salen (N,N'-Bis(salicilideno)etilendiamina), $N(CH_2CH_2O)_3$ (trietanolaminato), BPA (bis(2-piridilmetil) amina) y 1,4,7-trimetil-1,4,7-triazaciclononano. Como agente oxidante, el más utilizado fue el H_2O_2 y luego el O_2 . Como solvente se ha utilizado agua o mezclas agua/acetonitrilo y las temperaturas de reacción variaron entre 22 y 70°C. Las conversiones han variado en función de las condiciones bajo las que se llevaron a cabo las reacciones. El producto de reacción más buscado fue DHA. Crotti et al. obtuvieron una selectividad de hasta 100% hacia DHA pero en este caso la conversión del glicerol fue de tan solo un 17% [80]. Generalmente, al aumentar la conversión del glicerol, también disminuye la selectividad hacia los productos de oxidación incompleta como DHA o GA. Esto se puede observar en la última entrada de la tabla, donde Kong et al. (2019) [81] alcanzaron un 100% de conversión con un complejo de aluminio y obtuvieron solamente ácido fórmico y ácido glicérico como productos de la reacción.

En los casos en donde se han utilizado complejos de Fe o de Mn, se obtuvieron conversiones de hasta 47% aunque en el caso del complejo $Mn(II)(SO_3\text{-salen})$ apenas se alcanzó un 9,6%. Las selectividades hacia DHA fueron en general las más elevadas, aunque en otros casos la producción de compuestos más oxidados como ácido fórmico fue preponderante. La selectividad hacia GA resultó baja en todos los casos (menores a 5,2%). La máxima selectividad hacia GA fue de 6,3% alcanzada con un complejo de Cr [82].

Tabla 1.1. Complejos metálicos estudiados en la oxidación de glicerol

Complejo	Oxidante (Conc.)	Conv. (%)	Productos (% selectividad)	[GLY] (M)	Temp. (°C)	[Comp] (mM)	Solvente	Ref
Co(II)(SO ₃ -salen)	H ₂ O ₂ (3%)	18,8	DHA (35,1) AcFor (41,2); GA (6,4)	0,54	60	-	Agua	[82]
Cr(SO ₃ -salen) y LDH-[Cr(SO ₃ -salen)]	H ₂ O ₂ (3%) O ₂ *	73,1	DHA (43,5); AcGly (21,5); AcTar (0,8); AcFor (92,6); AcOx (5,6)	0,2	60	9,4	Agua	[83] [84]
Cr(III)(SO ₃ -salen)	H ₂ O ₂ (3%)	57	DHA (42,6); AcFor (34,8); GA (6,3)	0,54	60	-	Agua	[82]
Cu(II)(SO ₃ -salen)	H ₂ O ₂ (3%)	40,3	DHA (52,9); AcFor (38,8); GA (0,4)	0,54	60	-	Agua	[82]
[O-Cu ₄ {N(CH ₂ CH ₂ O) ₃ } ₄ (BOH) ₄] [BF ₄] ₂	H ₂ O ₂ ; aire t-BuOOH; K ₂ S ₂ O ₈ ;	2,5 - 50	DHA (24-96)	0,2 - 0,5	25 - 70	1	Agua/ AcNit	[85]
Fe(III)(SO ₃ -salen)	H ₂ O ₂ (3%)	24,6	DHA (40,8) AcFor (38,0); GA (4,2)	0,54	60	-	Agua	[82]
[Fe(BPA) ₂ (Otf) ₂]	H ₂ O ₂	18	DHA (74); AcFor (22); AcGco (4)	0,35	Amb	0,01	AcNit /agua (2:1)	[86]
[Fe(BPA) ₂ (Otf) ₂]	H ₂ O ₂ 10-30% p/p o t-BuOOH (70% p/p)	hasta 47%	DHA (hasta 100%). AcFor (hasta 98%). GA (trazas)	0,35	25 - 40	0,01	AcNit /agua (2:1)	[80]
[LMn(μ-O) ₃ MnL](PF ₆) ₂ soluble e inmovilizado	H ₂ O ₂	hasta 45%	DHA (15,3). AcGco (19,4). AcGly (16,0) y AcHpir (3,4)	0,08 - 0,5	22	0,025 - 0,05	AcNit	[87]
Mn(II)(SO ₃ -salen)	H ₂ O ₂ (3%)	9,6	DHA (28,7) AcFor (48,4); GA (5,2)	0,54	60	-	Agua	[82]
(Al, Bi, Ag, Zn, Y, Sc, In, Ce) (Otf) _x	H ₂ O ₂	0 - 100 (Al)	AcFor (72); AcGco (20)	0,08	70	2	Agua /AcNit	[81]

*Flujo de O₂: 60 mL/min.

Productos: **AcFor:** ácido fórmico; **AcGly:** ácido glicérico; **AcTar:** ácido tartrónico; **AcOx:** ácido oxálico; **AcGco:** ácido glicólico; **AcHpir:** ácido hidroxipirúvico.
Solventes y oxidantes: **AcNit:** Acetonitrilo; **t-BuOOH:** tert-butil hidroperóxido. **Ligantes:** **BPA:** bis(2-piridilmetil) amina; **Salen:** N,N'-Bis(salicilideno)etilendiamina; **Otf:** trifluorometanosulfonato; **L:** 1,4,7-trimetil-1,4,7-triazaciclononano. **Soporte:** **LDH:** capa de hidróxido doble.

1.4.4 Catálisis enzimática

Muchas de las enzimas presentes en los microorganismos que son capaces de catalizar la oxidación del glicerol han sido aisladas y empleadas directamente para producir su transformación.

1.4.4.1 Deshidrogenasas

Las deshidrogenasas son enzimas que catalizan la oxidación o reducción de un sustrato por sustracción o adición de dos átomos de hidrógeno de una molécula utilizando un grupo de coenzimas o cofactores que son capaces de donar o aceptar electrones y protones, como por ejemplo el par NAD^+/NADH (nicotinamida adenina dinucleótido). Existen algunos reportes de la utilización de la enzima glicerol deshidrogenasa inmovilizada para la producción de DHA [69,88]. Rocha-Martin et al. (2014) [88] obtuvieron conversiones de glicerol de 15% en 8,5 h de reacción a 25°C partiendo de una concentración inicial de glicerol de 20 mM. Sin embargo, el principal problema que presentan este tipo de enzimas es justamente la necesidad de agregar un cofactor al medio de reacción para que la enzima ejerza su acción catalítica. Esto muchas veces vuelve económicamente inviable su escalamiento o implica que se deba acoplar la reacción a otra que sea capaz de regenerar el cofactor. Existen reportes del uso de sistemas de varias enzimas co-inmovilizadas, las cuales son capaces de producir el producto deseado y a la vez regenerar el cofactor [89,90], llegando incluso a acoplar la regeneración del cofactor a la producción de otro producto de valor, como el xilitol a partir de xilosa [91].

La producción de GA a través de la enzima metanol deshidrogenasa de *Methylobacterium organophilum* ha sido patentada por Wolf [92]. El medio de cultivo puede contener hasta un 20% de glicerol (2,17 M) en un rango de pH de entre 5 a 11, la temperatura puede variar entre 5 y 50°C bajo condiciones aeróbicas. Se reportó una conversión máxima de 35% del glicerol luego de 7 días de incubación.

1.4.4.2 Oxidasas

Otro grupo importante de enzimas utilizadas en oxidación son las oxidasas. Estas tienen la ventaja de que no necesitan del uso de cofactores como las deshidrogenasas, ya que son capaces de utilizar O_2 como aceptor final de electrones, aunque únicamente catalizan reacciones de oxidación y no así la reacción inversa de reducción [93]. Como subproducto de las reacciones de oxidación generan H_2O_2 el cual tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de estas enzimas.

Un grupo importante de oxidasas lo constituyen las lacasas, enzimas que provienen generalmente de hongos, aunque también se han encontrado en bacterias y plantas [94]. Pertenecen al grupo de las oxidasas con múltiples átomos de cobre (poseen 4 átomos de cobre por molécula), catalizan la oxidación de sustratos aromáticos ricos en electrones, como fenoles o aminas aromáticas, a través de un proceso de cuatro pasos de oxidación de un electrón y producen la reducción del O_2 , generando dos moléculas de H_2O en el proceso [13]. Las lacasas se diferencian de otras oxidasas en este aspecto ya que no generan H_2O_2 como subproducto sino agua. En este sentido son considerados como los catalizadores verdes ideales. Las lacasas juegan un rol importante en la delignificación de la lignocelulosa [13] en la industria del papel [95] y encuentran aplicación en procesos de decoloración de tintas en aguas residuales [94]. Liebminger et al. [96]. reportaron el uso de una enzima lacasa de *Trametes hirsuta* para oxidar glicerol a GA. No obstante, el radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO) a bajas concentraciones (< 6 mM) debió ser añadido como mediador en el transporte de electrones con la finalidad de superar las limitaciones respecto al potencial redox de estas enzimas. Mayores concentraciones del mediador aumentaron la conversión del glicerol, pero disminuyeron la selectividad hacia GA a la vez que se incrementó la producción de compuestos como ácido glicérico y ácido tartrónico. El pH juega un rol importante en esta reacción ya que el radical TEMPO se descompone y la enzima se inactiva en medio ácido (pH menor a 4) [96,97]. Obtuvieron conversiones del orden del 75% a partir de una concentración de 0,1 M de glicerol en un tiempo de 24 h a 25°C.

El empleo de diferentes oxidasas en la oxidación de glicerol con generación de H_2O_2 como subproducto (Tabla 1.2) ha sido más estudiado. En estos casos la reacción de oxidación se acopló a una que consume el H_2O_2 para evitar la inhibición por producto, por ejemplo, agregando catalasa para descomponer el H_2O_2 y generar O_2 . No obstante, una práctica frecuente consiste en agregar una enzima con actividad peroxidática en vez de catalasa, como por ejemplo peroxidasa de rábano picante (HRP) en conjunto con compuestos fenólicos. HRP descompone el H_2O_2 generando radicales libres que oxidan los compuestos fenólicos y estos se combinan dando sustancias coloreadas que pueden ser monitoreadas por espectrofotometría UV/visible (ver detalle de mecanismo en sección 1.5.1). De esta manera, es posible determinar de manera sencilla la actividad inicial de las oxidasas frente a distintos sustratos.

Dentro de las enzimas utilizadas se encuentra alcohol oxidasa (AOX) de *Pichia pastoris* la cual fue testada en la oxidación de etilenglicol a glioxal [98], obteniéndose una conversión de 6 % luego de 6 h de reacción. En este caso, la concentración del sustrato fue bastante elevada (hasta 10 M). Los productos se derivatizaron y se siguieron por espectrofotometría UV/visible. Klibanov et al. (1982) [99] reportaron una conversión de glicerol cercana al 6 % luego de 3 semanas de reacción utilizando galactosa oxidasa (GAO), partiendo de una concentración de sustrato de 2 M. La concentración de GA fue determinada por medio de titulación con NADH, catalizada por una enzima alcohol deshidrogenasa. Por su parte, Franke et al. (2003) [100] utilizaron GAO para producir L-GA y luego L-fructosa en el mismo medio de reacción en un sistema multienzimático. Midieron la actividad de GAO con la reacción de la 4-aminoantipirina (AAP) con fenol catalizada por peroxidasa y determinaron la concentración de GA por medio de la reacción con reactivo de Schiff, la cual genera un cromóforo que se puede cuantificar espectrofotométricamente. Aparte del uso de estas enzimas, se hallaron reportes del uso de otras no disponibles comercialmente: alditol oxidasa de *A. cellulolyticus 11B*, glicerol oxidasa de *A. japonicus AT 008*, glicerol oxidasa y glioxal oxidasa de *P. chrysosporium*. En la mayoría de los casos la actividad de estas enzimas se midió por medio de una reacción acoplada para consumir el H_2O_2 y generar un cromóforo, aunque también se realizaron estudios del consumo de oxígeno durante la reacción en algunos casos. La generación de productos fue seguida por HPLC [101] o por medio del consumo de GA con NAD^+ , midiendo el consumo de NAD^+ por espectrofotometría [102]. En las últimas dos entradas de la Tabla 1.2, las conversiones de glicerol alcanzadas fueron más elevadas que las reportadas con GAO de *D. dendroides* y AOX de *P. pastoris* siendo los productos principales GA y ácido glicérico.

En el caso de las reacciones enzimáticas las velocidades de reacción y las conversiones de glicerol son menores a las alcanzadas con catálisis metálica u organometálica. A pesar de esto, las selectividades hacia productos de la oxidación primaria del glicerol, DHA y particularmente GA han resultado mayores en los casos de catálisis enzimática, llegando incluso a producirse GA enantioméricamente puro. Otro aspecto para resaltar es que se emplearon en todos los casos condiciones ambientales de temperatura y presión siendo el oxígeno proporcionado por agitación y aireación, implicando un coste energético mínimo.

Tabla 1.2. Reportes de oxidación de glicerol con enzimas oxidasas

Ref	Enzima	U Enz /ml	Cant. de CAT o Perox	[GLY] (M)	Entrega de O ₂	Medición de la actividad	Resultado
[98] (*)	AOX de <i>P. pastoris</i> (Boehringer Mannheim)	10	2600 U CAT/mL	0,1 – 10 (*)	Agitación	Se miden los productos por UV/VIS	Conversión de un 6 % en 6 h, Producto: glioxal
[99]	GAO de <i>D. dendroides</i> (Sigma)	50	1000 U CAT/mL	2	-	[GA] por titulación con NADH + ADH	105 mM de GA (casi 100% S-(L)-GA) en 3 semanas
[100]	GAO de <i>D. dendroides</i>	5 – 75	93 U CAT/mL	0,87	Aireación	4-AAP + fenol + Peroxidasa. [GA] con reactivo de Schiff	50 mM de L-GA a en 48 h
[103]	Alditol Oxidasa de <i>A. cellulolyticus</i> 11B	20 nm	20 U HRP	-	Sin aireación	4-AAP + un compuesto fenólico + HRP.	Inhibición de la enzima a [GLY]>0,5 M,
[104]	Glicerol Oxidasa de <i>A. japonicus</i> AT 008	94,8	100 U HRP	0,017	Sin aireación	4-AAP+ fenol + peroxidasa y por consumo de O ₂ .	La enzima es más activa hacia oxidación de glicerol
[102]	Glicerol Oxidasa de <i>P. chrysosporium</i>	-	100 U HRP	0,1	Sin aireación	4-AAP + fenol + peroxidasa. Reacción GA + NAD ⁺ se sigue por UV/Vis	D-GA producto principal. Actividad Relativa de 17% con glicerol respecto a metanol.
[101]	Glioxal oxidasa de <i>P. chrysosporium</i>	-	10 µg /mL de HRP y 1000 U de CAT	0,1	Aireación	Rojo de fenol + HRP. Consumo de O ₂ . Productos por HPLC.	Conversión de 10 % en 20 h. Productos: ácido glicérico y DL-GA (secundario)

(*) Se utilizó etilenglicol como sustrato.

Enzimas: **ADH:** Alcohol deshidrogenasa; **HRP:** peroxidasa de rábano picante; **GAO:** galactosa oxidasa; **CAT:** Catalasa. **Reactivos y productos:** **4-AAP:** 4-aminoantipirina; **GA:** gliceraldehído.

1.5 Preselección de sistemas catalíticos

Sobre la base de los antecedentes expuestos en las secciones anteriores se plantean las siguientes hipótesis para el desarrollo de esta tesis:

- Los productos de la oxidación primaria del glicerol pueden resultar potencialmente activos como antimicrobianos.
- Complejos metálicos de Fe o de Mn pueden resultar activos en la oxidación catalítica de glicerol.
- Las enzimas oxidasas en conjunto con un complejo metálico con actividad catalasa-peroxidática puede resultar en un sistema capaz de oxidar glicerol hacia GA con un 100 % de selectividad.

De esta manera, se pretende evaluar alternativas de procesos que atienden a los siguientes principios de la química verde, a saber:

Prevención de la generación de residuos: las alternativas de oxidación propuestas emplean O_2 o H_2O_2 , ambos considerados como los oxidantes más verdes que pueden ser utilizados ya que no generan subproductos tóxicos al ser reducidos [8].

Empleo de catalizadores: El uso de catalizadores elimina el uso de reactivos estequiométricos ya que estos pueden generar muchas transformaciones mientras se encuentran activos. También reduce o elimina la formación de desechos indeseados y reduce la energía de activación de las reacciones, mejorando la eficiencia energética. Se propone trabajar particularmente con enzimas y con complejos metálicos que son miméticos de enzimas, es decir actúan de manera similar al sitio activo de una enzima, pero carecen de la estructura proteica que las caracteriza.

Uso de químicos de menor toxicidad: se reemplazarán catalizadores basados en metales preciosos como Pd, Pt, Au y Cr por otros basados en metales de transición que resulten menos tóxicos, más económicos y más abundantes.

Uso de solventes inocuos: el agua es el solvente más inocuo que existe y será utilizado como medio de reacción en la mayoría de los casos.

Uso eficiente de la energía: se llevarán a cabo las reacciones a temperaturas menores a $40^\circ C$ y a presión atmosférica. El uso de condiciones suaves de reacción implica un importante ahorro de energía.

En las subsecciones siguientes se describen en detalle los sistemas catalíticos preseleccionados para ser evaluados en la oxidación del glicerol.

1.5.1 Sistema Hematin- H_2O_2

Hematin porcino es una protoporfirina natural de hierro (III) que posee actividad catalítica y que, por otro lado, mimetiza el sitio activo de las peroxidasas [105]. El grupo hemo de aquellas es el que genera, entre otras funciones, la abstracción de un átomo de hidrógeno de sustratos reductores luego de haber sido activadas por H_2O_2 a través de la formación de un intermediario de alto estado de valencia Fe(IV)-oxoporfirin π -catión radical [106–108]. Una gran variedad de metaloporfirinas han sido estudiadas en reacciones de oxidación utilizando distintos agentes oxidantes. Un buen panorama se puede encontrar en Che y Huang (2009) [109]. Por ejemplo, varias metaloporfirinas de Fe (III) fueron testeadas en la oxidación de alcanos utilizando O_2 como agente oxidante [110]. También se han utilizado con H_2O_2 en la oxidación de alcanos [105] y en la epoxidación alquenos [111,112]. Hematin ha demostrado ser efectivo en la oxidación de sustratos fenólicos [108,113]. Su estructura se muestra en la Figura 1.4.

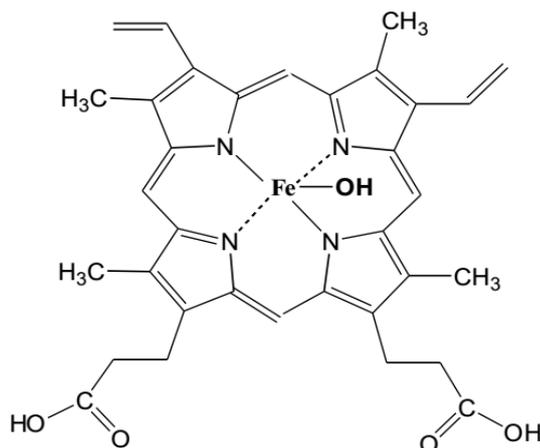
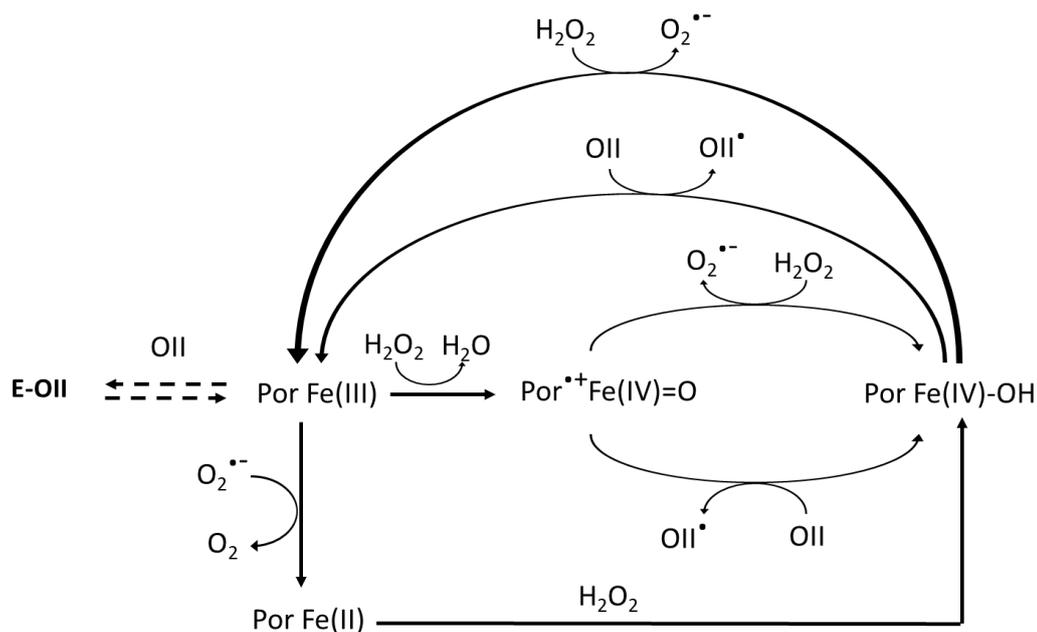


Figura 1.4. Estructura de hematin.

El mecanismo de acción de las peroxidasas ha sido muy estudiado [112,114,115]. En base a éste ha sido posible proponer un mecanismo de acción para hematin en la oxidación de un sustrato fenólico, el colorante naranja II, para simular los perfiles de decoloración y de producción de oxígeno molecular a pH alcalino (ver Esquema 1.2). Este mecanismo propone que hematin en estado nativo (E_0) es activado en primera instancia por una molécula de H_2O_2 para producir un intermediario reactivo denominado E_1 (ver estructuras de los distintos intermediarios de hematin en la Figura 1.5). En este estado, se asume que el Fe de hematin cambia su estado de oxidación de +3 a +4 por unión covalente doble de un oxígeno de H_2O_2 , el cual sufre una ruptura heterolítica de su enlace O-O. E_1 constituye así un intermediario radical pi con carga positiva. Su estructura se simboliza como: $Por^+Fe(IV)=O$ (siendo Por =porfirina). Luego, E_1 es capaz de reaccionar con otra molécula de H_2O_2 para generar el anión radical superóxido O_2^- en una vía de reacción denominada pseudocatalítica [116] o bien, reacciona con un sustrato orgánico para generar un radical orgánico; y por su parte, hematin- E_1 es reducido a un estado conocido como E_2 (Por $Fe(IV)-OH$). Luego, el compuesto E_2 al igual que antes, puede reaccionar tanto con un sustrato orgánico como con H_2O_2 , produciendo más radicales libres y volviendo el hematin a su estado nativo E_0 . Estas vías de generación de radicales orgánicos y superóxido son competitivas y la prevalencia de una sobre otra depende de la afinidad que los sustratos tengan sobre cada uno de estos intermediarios. Todo el mecanismo consiste en la oxidación de hematin por una molécula de H_2O_2 seguido de dos reducciones de un electrón, brindando sucesivamente los estados E_2 y finalmente E_0 [116]. El mecanismo propone además la posibilidad de que el sustrato orgánico se una a E_0 , para explicar la disminución de las velocidades de reacción observadas a partir de cierta concentración del colorante. Finalmente, propone la posibilidad del ataque de los radicales superóxido al estado nativo de hematin, con lo cual el Fe (III) de la porfirina es reducido a Fe (II), el cual puede ser re oxidado por otra molécula de H_2O_2 , formando nuevamente el compuesto E_2 que reingresa al ciclo catalítico. Esta vía provoca un consumo ineficiente del oxidante.

La actividad catalasa de un complejo sirve como indicativo de que el metal acomplejado es oxidado por H_2O_2 para generar un intermediario inestable capaz de interaccionar, en ausencia de un compuesto orgánico, con una segunda molécula de H_2O_2 para producir O_2 . Por otro lado, si el complejo ha de mimetizar la actividad peroxidática, se requiere que ese intermediario de mayor estado de oxidación sea capaz de coordinarse preferentemente a un sustrato orgánico. Por lo tanto, estas dos vías de actividad del complejo son competitivas. Una manera de favorecer la vía peroxidática es reduciendo la disponibilidad del H_2O_2 . Esto se puede lograr, por ejemplo, preparando soluciones de H_2O_2 en acetona; de esta manera se genera 2-hidroxi-2-hidroperoxipropanona, la cual promueve la disponibilidad gradual del agente oxidante, disminuyendo de esta manera su descomposición por la vía catalítica catalizada por el complejo metálico [117,118].



Esquema 1.2. Mecanismo peroxidático acoplado al mecanismo pseudocatalítico de hematin. Reproducido a partir de Cabrera et al. (2017) [116].

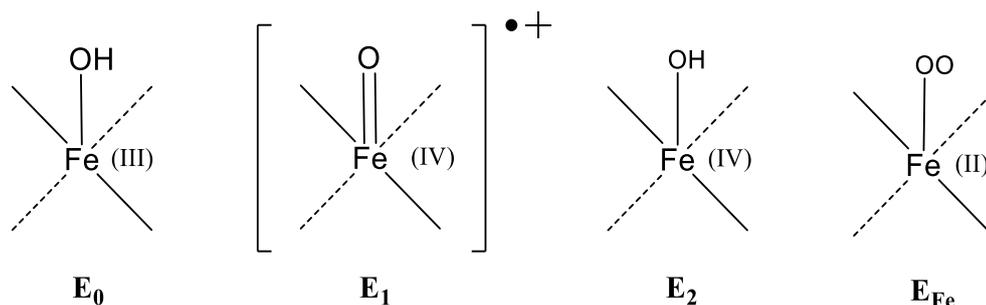
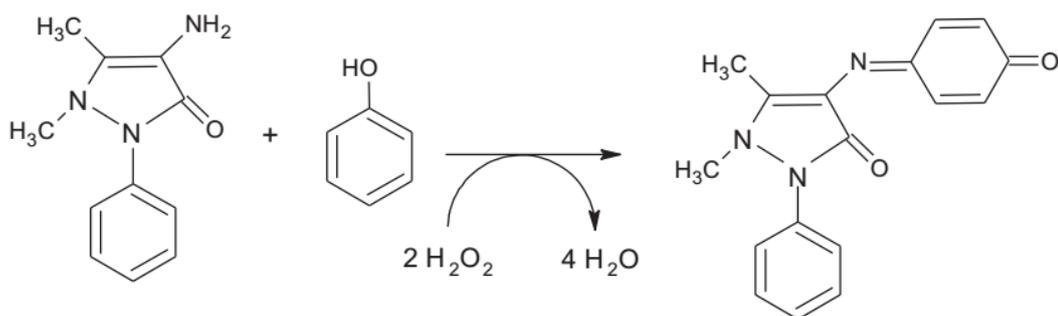
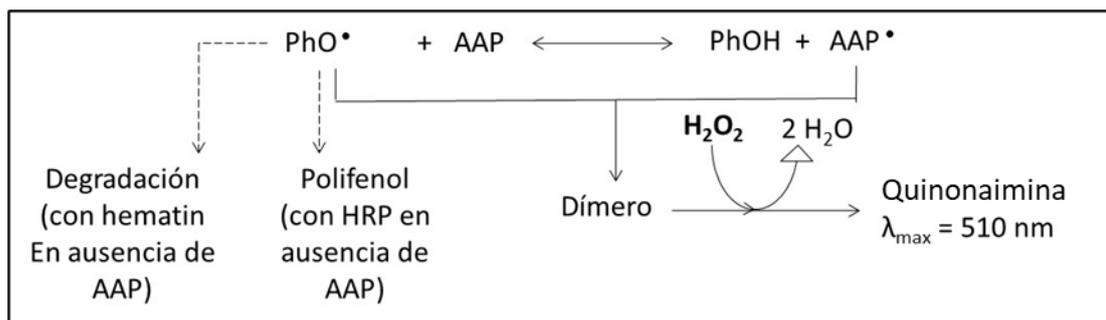


Figura 1.5. Estructuras electrónicas del centro metálico en los distintos intermediarios de hematin.

La actividad peroxidática de un complejo metálico puede ser chequeada de manera simple y rápida a través del test de oxidación de fenol y AAP con H₂O₂ en la cual se genera un aducto púrpura denominado quinonaimina (Esquema 1.3). Es decir, si el sustrato orgánico es fenol (en vez de OII) en el Esquema 1.2 entonces los radicales fenoxi generados (PhO[•]) reaccionan no catalíticamente según el Esquema 1.4 [119]. La evolución de la intensidad de los picos a 330 nm y 510 nm en espectros UV/visible de sistemas reaccionantes son utilizados para identificar la formación del aducto quinonaimina. Varios estudios de los presentados en la Tabla 1.2 hicieron uso de esta técnica para medir la actividad enzimática de oxidasas, como una medida indirecta de generación de H₂O₂ a causa de su acción sobre la molécula de glicerol.



Esquema 1.3. Formación y estructura de la quinonaimina púrpura.



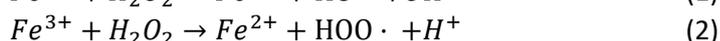
Esquema 1.4. Apareamiento no catalítico en la reacción acoplada de la AAP/fenol/ H_2O_2 .

1.5.2 Sistema Fenton

Por otro lado, se ha detectado que en ausencia de AAP, HRP es capaz de catalizar el apareamiento de radicales fenoxi generando polifenol mientras que con hematin los radicales fenoxi son degradados [120]. Este hallazgo puede ser una consecuencia de la mayor afinidad de hematin hacia H_2O_2 en relación a HRP. Con la primera se genera mayor proporción de radicales inorgánicos que finalmente degradan la materia orgánica inespecíficamente. Existe vasta literatura que intenta explicar el mecanismo de acción de las porfirinas de hierro en base al proceso Fenton [121–124]. Los procesos Fenton o Tipo-Fenton, emplean sales de Fe en solución ácida y H_2O_2 para provocar la oxidación por medio de la generación de radicales libres [121]. Las reacciones Fenton implican la reducción de H_2O_2 por el catión ferroso (estado de oxidación +2), mientras que en los procesos Tipo-Fenton la descomposición del peróxido de hidrógeno es catalizada por iones férricos (estado de oxidación +3) o hierro en estado de oxidación cero.

La efectividad de las reacciones Fenton en la oxidación de glicerol ha sido estudiada previamente por su impacto en la industria vitivinícola [125]. Dado que el glicerol es un componente importante en los vinos y que la oxidación de estos parece incluir la formación del radical OH^\bullet , se estudió el proceso Fenton en soluciones modelo en la cual se observó la generación de gliceraldehído y dihidroxiacetona a partir del glicerol, utilizando concentraciones de FeSO_4 de 25 mg/L y concentración de H_2O_2 de 2,54 mM [125]. No fueron reportadas las concentraciones alcanzadas para dichos productos de reacción en estos sistemas. Por su parte, Farnetti y Crotti. (2016) [86] utilizaron sales FeCl_2 y FeCl_3 obteniendo conversiones de glicerol de hasta un 99% utilizando H_2O_2 como oxidante y obtuvieron DHA, ácido fórmico y ácido glicólico como productos (Tabla 1.1). Estos constituyen importantes antecedentes de que hematin podría ser efectivo en la oxidación del glicerol, principalmente porque el mecanismo catalítico de hematin implica la participación del hierro en diferentes estados de oxidación, como así también la generación de radicales libres reactivos. Por lo expuesto, se decidió evaluar el sistema Fenton para comparar su desempeño con el de hematin.

El mecanismo catalítico de Fenton se describe mediante cinco reacciones presentadas a continuación [126]:



En la primera reacción el Fe^{2+} se oxida, mientras que el peróxido de hidrógeno se escinde homolíticamente formando un ion y un radical hidroxilo. La segunda reacción describe cómo el hierro se recupera a Fe^{2+} al reaccionar con peróxido de hidrógeno, formando un radical peroxilo. En las reacciones 3, 4 y 5 se describe la producción de radicales orgánicos (R^\bullet) y la reducción del Fe^{3+} mediante dicho radical

formando así un compuesto orgánico oxidado (R-OH). La reacción de radicales hidroxilo con compuestos orgánicos son bien conocidas. Estas reacciones tienen lugar principalmente a través de la abstracción de H (de enlaces C-H, N-H o O-H), por la adición a enlaces C=C o por la adición a anillos aromáticos [127,128]. El rendimiento del proceso Fenton depende de diversos factores, entre ellos, la concentración del agente oxidante y catalizador, la temperatura, el pH y tiempo de reacción. Asimismo, la eficiencia de este proceso está relacionada con la naturaleza del compuesto a oxidar y la presencia de otros compuestos orgánicos e inorgánicos. Debido a que mediante este proceso se generan radicales inorgánicos la oxidación de la materia orgánica suele ser poco selectiva, por ello los sistemas Fenton se emplean principalmente para tratamiento de efluentes con alto contenido de materia orgánica.

1.5.3 Sistema MnL^-/H_2O_2

Este sistema representa un complejo mononuclear de Mn (III) tipo base de Schiff, donde el ligando es el 1,3-bis(5-sulfonatosalilcilidenamino) propano, abreviado como 5-SO₃-salpn (MnL⁻). Se trata de un ligando tetradentado que se une al centro metálico a través de 4 enlaces de coordinación que se encuentran en el mismo plano. Su estructura se puede observar en la Figura 1.6. Este complejo presenta similitudes con otros complejos tipo base de Schiff los cuales han sido reportados como catalizadores apropiados para la oxidación de alcoholes, de alcanos y en reacciones de epoxidación, entre otras, llevadas a cabo en presencia de un oxidante primario, como por ejemplo alquil hidroperóxidos, H₂O₂ u O₂ [74,129–131] y pueden ser utilizados en medio acuoso [132–134]. Este complejo es muy similar en estructura al que se reportó en la décima entrada de la Tabla 1.1, aunque en dicho caso el estado de oxidación del Mn fue +2.

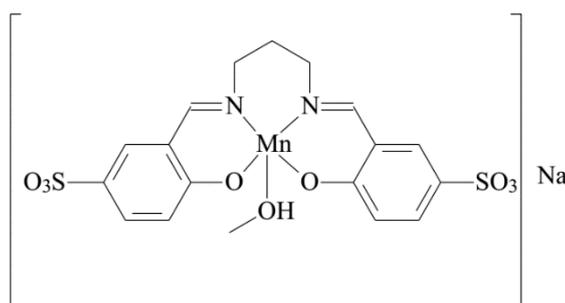
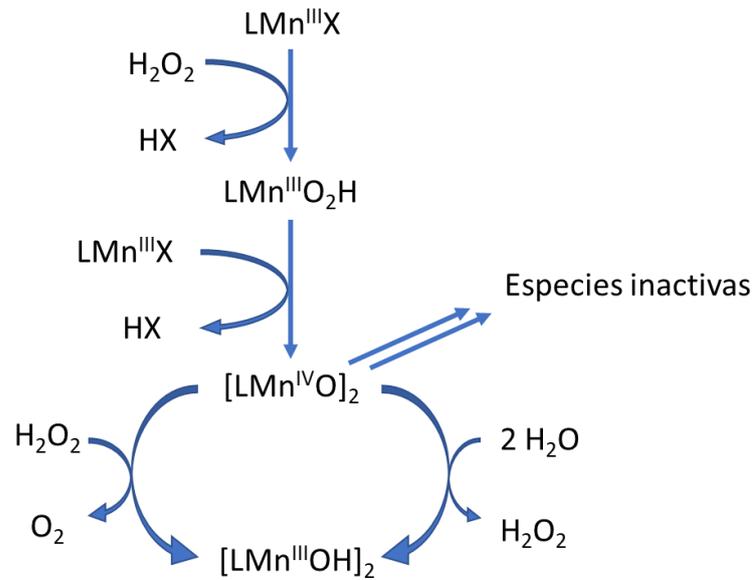


Figura 1.6. Estructura del complejo de Mn (III) con ligando 1,3-bis(5-sulfonatosalilcilidenamino) propano (5-SO₃-salpn o MnL⁻).

Este complejo posee actividad superóxido dismutasa ya que es capaz de catalizar la dismutación del O_2^- con una constante de velocidad de $3,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Además, es capaz de desproporcionar hasta 250 equivalentes de H₂O₂ en solución acuosa a pH 8,0, con una velocidad inicial de $25,2 \text{ mM H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} (\text{mM catalizador})^{-1}$ [135]. Uno de los mecanismos de acción reportados para este tipo de complejos implica la activación del centro metálico Mn (III) por una molécula dadora de O₂, como el H₂O₂ para formar Mn(V)=O el cual es luego capaz de oxidar a un sustrato orgánico [130], volviendo el Mn a su estado basal (III). Palopoli et al. (2017) [136], por su parte, reportaron para dos complejos similares ([Mn(3,5-F₂salpn)(H₂O)₂][B(C₆H₅)₄]₂·2H₂O y [Mn(3,5-Cl₂salpn)(OAc)(H₂O)]·H₂O), el mecanismo que se muestra en el Esquema 1.5. En dicho mecanismo, la reacción se realizó en medio básico. Existe un primer paso donde el H₂O₂ se une al complejo, el cual luego se dimeriza, con lo cual el centro metálico pasa del estado de oxidación (III) al (IV) y en ese estado es capaz de transformar el H₂O₂ tanto a O₂ como a H₂O, ejerciendo actividad catalítica. Similarmente a lo que ocurre con hematin, el estado activado podría actuar sobre sustratos orgánicos, dependiendo de la afinidad de los mismos hacia el catalizador, con lo cual posee potencial actividad peroxidática.



Esquema 1.5. Mecanismo propuesto para la reacción de complejos de Mn con H_2O_2 . X = OH o OAc. Adaptado de Palopoli et al. (2017) [136].

1.5.4 Sistema alcohol oxidasa-hematin- O_2

La enzima alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* es flavin dependiente y permite a las levaduras metilotróficas utilizar metanol como única fuente de carbón y energía [137]. Es una enzima intracelular ubicada en peroxisomas y microcuerpos en el citoplasma de esta levadura [93]. Se la clasifica dentro de la familia de las glucosa-metanol-colina (GMC)-oxidoreductasas [138]. Es una enzima homooctomérica con un peso molecular de 675 kDa, con ocho subunidades iguales de 80 kDa y cada una contiene una molécula de flavin adenin dinucleótido (FAD) (Esquema 1.6) unida no covalentemente, como grupo prostético [139,140]. En la Figura 1.7 se muestra una representación de la estructura de la enzima. Esta enzima permite oxidar alcoholes primarios para formar aldehídos, utiliza O_2 como agente oxidante y genera H_2O_2 como subproducto de la oxidación. Actúa en un rango de pH de entre 6,5 y 8,3 y temperaturas de entre 18 y 45°C. El pH y temperatura óptimos son de 7,5 y 37°C, respectivamente, El H_2O_2 formado inhibe a las oxidasas y algunos estudios sugieren que se produce una oxidación reversible de grupos $-\text{SH}$ en la enzima lo cual es la causa de la inactivación [139].

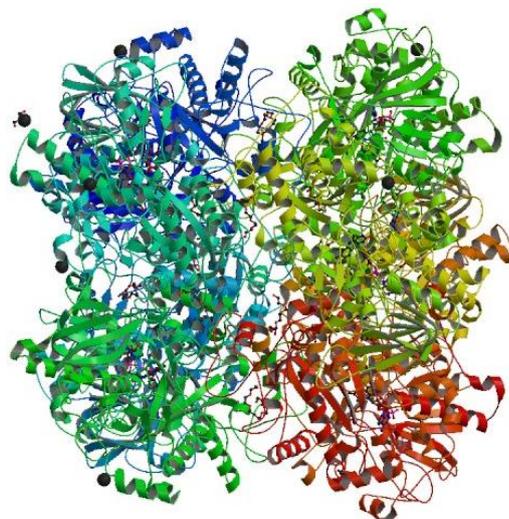


Figura 1.7. Representación de la estructura octamérica de alcohol oxidasa. Fuente: Protein Data Bank (PDB).

Como otros miembros de la familia de las enzimas GMC oxidoreductasas, AOX exhibe dos dominios característicos, uno de ellos es el dominio para la unión de FAD (residuos 1–155, 192–306 y 568–663) y el otro el dominio para la unión del sustrato (residuos 156-191 y 307-567) [140] (Figura 1.8). En comparación con otras alcohol oxidasas, el sitio activo de AOX de *P. pastoris* posee un tamaño bastante reducido, lo cual podría explicar su preferencia hacia el metanol como sustrato. Se puede observar con más detalle el sitio activo en la Figura 1.9. El análisis de la estructura cristalina de AOX revela que el sitio activo es completamente inaccesible al solvente. A pesar de esta inaccesibilidad del solvente al centro catalítico y de que está delimitada principalmente por residuos aromáticos e hidrofóbicos, una molécula de agua ocupa la pequeña cavidad de un volumen aproximado de 135 \AA^3 y se encuentra unida a cadenas laterales de residuos Asn616, His567 y al átomo de N 5 del anillo isoaloxasina (Figura 1.9).

La descripción detallada del mecanismo de funcionamiento de AOX todavía no se ha resuelto. Sin embargo, en el Esquema 1.6 se muestra un mecanismo catalítico general de las enzimas alcohol oxidasas flavin dependientes [20], el cual se divide en una media reacción de reducción y otra de oxidación. En la reacción de reducción, el FAD toma dos protones y dos electrones del sustrato a oxidar, generándose flavin reducido. Luego, el flavin reducido es regenerado por dos pasos de transferencias de un electrón a través de la media reacción de oxidación. El O_2 actúa como un aceptor de un electrón y forma superóxido O_2^- , el cual es estabilizado por una carga positiva de un residuo de histidina [20]. Luego, una nueva reacción de transferencia de un electrón genera, a través de una unión covalente, un intermediario hidroperoxo flavin, el cual elimina H_2O_2 y regenera el flavin oxidado.

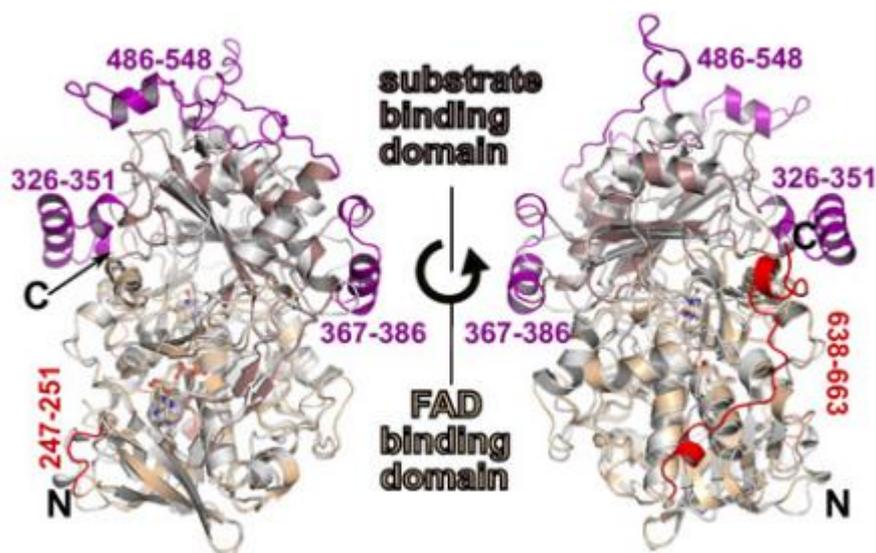


Figura 1.8. Organización de los dominios de una subunidad de AOX. El dominio de unión de FAD (AOX, residuos 1-155, 192-306 y 568-663) es de color beige y el dominio para la unión de sustrato (AOX, residuos 156-191 y 307-567) es de color violeta. Extraído de Koch et al. (2016) [140].

Los alcoholes de cadena lineal han sido reportados como factibles de ser oxidados por AOX, siendo el metanol el sustrato más adecuado y disminuyendo rápidamente la actividad de la enzima cuando la cadena de carbonos aumenta [139]. AOX es considerada como una alcohol oxidasa para alcoholes de cadena corta $\text{C}_1\text{-C}_8$ [93]. Siebum et al. (2006) [138] reportaron la misma especificidad hacia mono alcoholes alifáticos y dioles. Sustratos más voluminosos, como alcoholes ramificados o alcoholes secundarios pueden provocar impedimento estérico, con lo cual la actividad enzimática disminuye. Murray et al. (1990) [137] reportaron la oxidación de alcoholes alifáticos de hasta 11 átomos de C y algunos alcoholes aromáticos modificando el solvente de reacción a hexano saturado con agua.

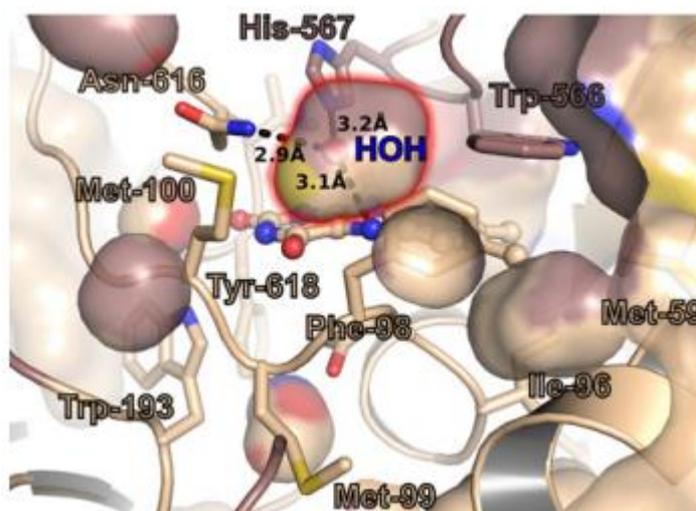
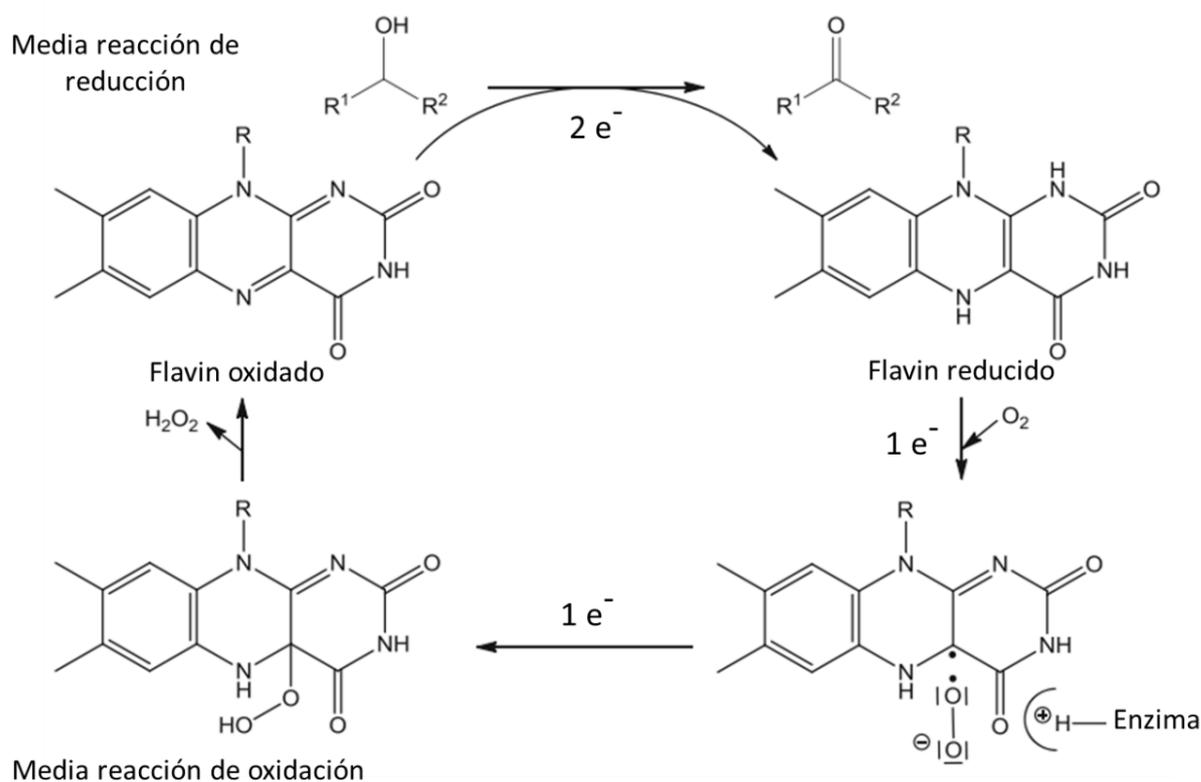


Figura 1.9. Representación del sitio activo de AOX. Las cavidades para la unión del sustrato se representan con un borde de color rojo borroso. La molécula de agua, la cual está unida cerca del anillo de isoaloxazina se representa como una esfera. Las interacciones polares están marcadas con líneas entrecortadas. Extraído de Koch et al. (2016) [140].

Por otro lado, se propone utilizar hematin (detallado en sección 1.5.1) en conjunto con AOX y en reemplazo de la enzima catalasa comúnmente empleada. Hematin posee probada acción catalítica en el rango de pH 7-11 [119,141]. Por otro lado, en el caso de que hematin resultara activa en la oxidación de glicerol, ésta podría contribuir doblemente al proceso ya que consumiría el H_2O_2 generado, oxidando más moléculas de glicerol. Además, al poseer hematin probada actividad peroxidática con fenol como sustrato es posible emplearla en la reacción de la 4-AAP/fenol en reemplazo de HRP, para detectar evolución de H_2O_2 durante la reacción de oxidasas sobre glicerol.



Esquema 1.6. Ciclo catalítico de alcohol oxidasas Flavin-dependientes. Extraído de Pickl et al. (2015) [20].

1.5.5 Sistema galactosa oxidasa-hematin-O₂

Galactosa oxidasa (GAO) es una enzima extracelular monomérica segregada por *Dactylium dendroides* con la finalidad de catalizar la oxidación de una gran variedad de alcoholes primarios, utiliza O₂ como aceptor de electrones y le permite al hongo producir H₂O₂. Actúa en un rango de pH de entre 5,5 y 9,0 y temperaturas de entre 30 y 60°C, El pH y temperatura óptimos son de 7,5 y 40°C, respectivamente [142]. GAO posee una masa molar de unos 68 kDa. *Dactylium dendroides* fue reclasificada como *Fusarium graminearum* en 1997 [143], sin embargo, la mayor parte de la bibliografía se refiere a este microorganismo como *D. dendroides* y en este trabajo se utilizará dicha denominación. Por su parte, la enzima GAO fue clasificada en la base de datos de enzimas activas sobre carbohidratos (www.cazy.org) como un miembro de la familia AA5_2 que incluye a oxidasas radicales de cobre.

El sitio activo de la enzima involucra a una especie mononuclear de Cu (II) con una estructura de pirámide cuadrada distorsionada y a un radical libre proteico estable formando un complejo metaloradical que funciona como un sistema capaz de transferir dos electrones durante el ciclo catalítico [144]. Este radical es establecido por medio de un enlace tioéter entre tirosina (Tyr272) y cisteína (Cys228), el cual actúa como ligando del cobre (Figura 1.10).

Durante el mecanismo de acción de GAO, la enzima alterna entre tres estados distintos: la forma activa, una forma inactiva y una completamente reducida. En su forma activa, el átomo de cobre está en estado +2 y la tirosina 272 en su forma radical. La reducción de este radical genera la forma inactiva de GAO, la cual puede ser revertida tratándola con agentes oxidantes moderados como dicromato de potasio o periodato de sodio. Las peroxidasas son capaces de incrementar la acción de GAO por medio de la oxidación de la forma inactiva a la forma radical [143] e incluso puede eliminar la necesidad de incorporar un oxidante extra [144]. En su forma completamente reducida, el átomo de cobre se encuentra en estado de oxidación +1 y puede reaccionar con oxígeno molecular para generar peróxido de hidrógeno. Elevadas concentraciones de H₂O₂ inhiben a la enzima, por lo cual se agregan enzimas catalasas al medio de reacción para consumirlo y prolongar la actividad de GAO.

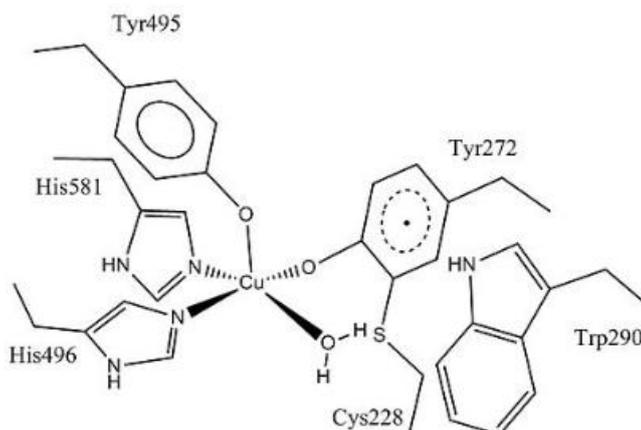


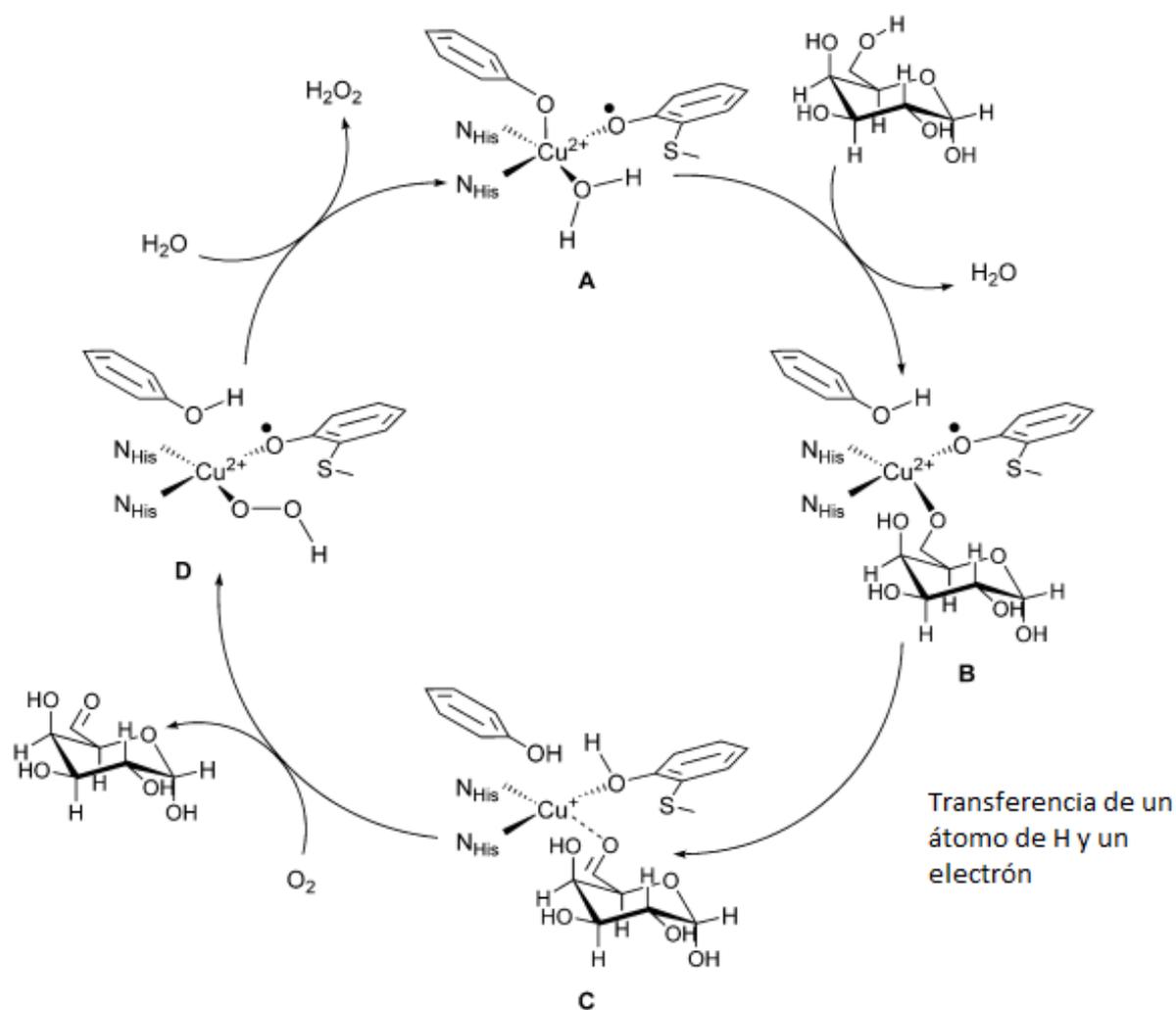
Figura 1.10. Estructura del sitio activo de Galactosa oxidasa de *D. dendroides*. Adaptado de Whittaker, 2003 [144].

En el Esquema 1.7 se puede observar el mecanismo de acción propuesto para la oxidación de galactosa catalizada por GAO. En su estado activo (A) la molécula de galactosa se une al sitio activo, liberándose una molécula de agua y dando lugar a la formación del complejo radical fenoxi metálico (B). Posteriormente, se produce la abstracción de un protón del sustrato por parte del tirosinato axial (Tyr495), seguido de una transferencia de electrón intramolecular rápida del anión cetilo radical intermediario con reducción del

Cu (II) a Cu (I). La especie de Cu (I) reacciona con O₂ para dar el complejo D hidroperoxo cobre (II) con la liberación del aldehído. Finalmente, se libera H₂O₂ y se obtiene nuevamente la forma activa de la enzima.

Entre las hexosas, GAO es selectiva hacia la oxidación de galactosa. Por otro lado, los α -carbonil alcoholes como clase son los mejores sustratos para la enzima. Notablemente, GA y DHA han sido reportados como excelentes sustratos para esta enzima, con velocidades de reacción relativas de 3 y 3.8, respectivamente, comparadas con la velocidad alcanzada utilizando galactosa como sustrato [13], aunque no se especificaron las unidades de las velocidades de reacción ni qué productos se obtuvieron a partir de dichos sustratos. Sin embargo, se ha reportado que los aldehídos pueden pasar a una forma hidratada cuando se encuentran en solución acuosa y pueden continuar oxidándose para generar ácidos carboxílicos a partir de dicha estructura [20]. Las cetonas también son susceptibles de hidratarse y continuar oxidándose (en el Esquema 3.2 – Capítulo 3, se pueden observar las estructuras hidratadas del gliceraldehído y de dihidroxiacetona). Los alcoholes insaturados o aromáticos también son buenos sustratos y por último los alcoholes saturados. Klivanov et al. (1982) [99] reportaron que D-galactosa, glicerol y R-3-cloro-1,2-propanodiol son oxidados por GAO con la misma estereoespecificidad, brindando D-galactosa-hexodialdosa, S(-) gliceraldehído y R-3-cloro-2-hidroxiopropan-1-al, respectivamente. Es decir, GAO es capaz de favorecer la formación estereoespecífica de ciertos enantiómeros.

Por lo expuesto y al igual que con AOX, se propone utilizar hematin en conjunto con GAO, ya que posee actividad tanto peroxidática como catalítica.



Esquema 1.7. Mecanismo de acción de GAO en la oxidación de galactosa [145].

1.6 Detección de oxidados de glicerol

Habitualmente se utiliza cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detectores ultravioleta (UV) y de índice de refracción (RI) para detectar y cuantificar glicerol y sus productos de oxidación en medio acuoso [146], [147], [82,148,149]. El tratamiento de las muestras es simple con HPLC [150], sin embargo, el límite de detección (LOD) de los detectores RI se encuentra en el orden de los $\mu\text{g}/\text{mL}$ [151] y se considera que es menor al de otro tipo de detectores como el detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) [152]. Una desventaja del uso de HPLC es que requiere del uso de dos detectores para la cuantificación de los productos, debido a que el glicerol no logra separarse de manera efectiva de algunos de sus productos de oxidación (como DHA) [153], lo cual complejiza el análisis e introduce errores en el cálculo de la concentración. Por otro lado, el uso de cromatografía gaseosa (GC) para la detección y cuantificación de los productos de la oxidación del glicerol está mucho menos extendida, siendo los detectores de conductividad térmica (TCD) y de ionización de llama (FID) [80,154], los empleados. Ambos tienen mejores LOD que los detectores RI [155].

El glicerol y sus productos de oxidación tienen elevados puntos de ebullición, lo cual hace que estas moléculas no sean adecuadas para ser analizadas por GC. También tienen tendencia a ser adsorbidas en la fase estacionaria de la columna debido a su elevada polaridad, produciendo picos con colas en los cromatogramas. Adicionalmente, la respuesta del FID hacia los compuestos carbonílicos y carboxílicos puede ser muy baja debido a que estos grupos funcionales no forman iones en una llama [156]. Una técnica efectiva para superar estos inconvenientes es la derivatización. Esta técnica es utilizada principalmente para incrementar la volatilidad, mejorar la estabilidad térmica, la detectabilidad y para reducir las interacciones indeseadas de los analitos con la columna, de tal modo que se producen picos más finos y altos en los cromatogramas [157]. Los trimetilsilil (TMS) éteres son producidos a partir de la reacción de los analitos con reactivos silanzantes, los cuales son los derivatizantes más populares en el análisis por GC de sacáridos y polialcoholes debido a su buena volatilidad y estabilidad [158]. En efecto, se ha reportado el uso de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) para el análisis de glicerol y para los productos de transesterificación incompleta en la producción de biodiesel. La técnica de inyección on-column fue utilizada para alcanzar una inyección reproducible y controlada [109]. Sin embargo, esta técnica de derivatización presenta algunos inconvenientes. Los agentes silanzantes reaccionan con agua, disminuyendo la velocidad de reacción y también la extensión de la derivatización del analito de interés. Adicionalmente, los derivados trimetilsililados son susceptibles a la hidrólisis, especialmente si están presentes contaminantes o sub productos ácidos o básicos [159]. Por lo tanto, siempre que el agua sea el solvente, las muestras deben ser pre tratadas para eliminarlo. Esto generalmente se lleva a cabo por medio de secado al vacío, destilación azeotrópica con un cosolvente o por liofilización. Los agentes desecantes como NaSO_4 , MgSO_4 , entre otros o los tamices moleculares también pueden ser de utilidad. En segundo lugar, el gran número de grupos OH con distintas reactividades en los carbohidratos provoca que su derivatización completa en derivados TMS siga siendo desafiante.

En un estudio de la década del 60 se reportó el análisis por GC de los derivados TMS de DHA y GA producidos a temperatura ambiente, utilizando trimetilclorosilano en piridina [160]. Wang Lili et al. (2006) [161], reportaron un método para determinación simultánea de DHA y glicerol en un caldo de cultivo a través de la metilación pirolítica en línea en presencia de hidróxido de tetrametilamonio en un microhorno pirolizador vertical conectado a un GC-FID [161]. GA y DHA tienden a formar estructuras diméricas con una reactividad similar a la de la ciclación de aldosas y cetosas [162]. La formación de isómeros de los dímeros cristalinos también es posible [160]. Adicionalmente, GA y DHA se interconvierten uno en el otro a través de la formación de un intermediario enediol [163–165]. Este es un problema común en el análisis de carbohidratos ya que muchos de ellos existen en varias formas tautoméricas, dando cromatogramas complicados [166]. Las técnicas de derivatización en dos pasos han sido aplicadas para evitar la

interconversión entre tautómeros por medio de la modificación del grupo carbonilo en el primer paso, seguido de la derivatización de los grupos hidroxilo. Este enfoque ha sido utilizado para la determinación de GA [158,167,168]. Sin embargo, siempre que sea posible, la derivatización en un paso es preferida debido a su simplicidad.

1.7 Inmovilización de enzimas

El empleo a escala industrial de catalizadores en fase homogénea tiene una serie de inconvenientes, entre los cuales se destacan:

- 1) su inestabilidad química o térmica lo que da lugar a la pérdida de actividad;
- 2) la incorporación del catalizador en el medio de reacción, con lo cual deben incluirse etapas posteriores de separación;
- 3) la imposibilidad de recuperar el catalizador para su reutilización;
- 4) la dificultad del diseño de reactores catalíticos que operen en continuo.

Para superar estas limitaciones se utilizan métodos de inmovilización, los cuales restringen total o parcialmente el movimiento de las enzimas por medio de una unión de las mismas a un soporte. Los métodos de inmovilización se clasifican de acuerdo al tipo de unión involucrada. De este modo tenemos los métodos por uniones covalentes, por uniones físicas y los de atrapamiento (Figura 1.11).

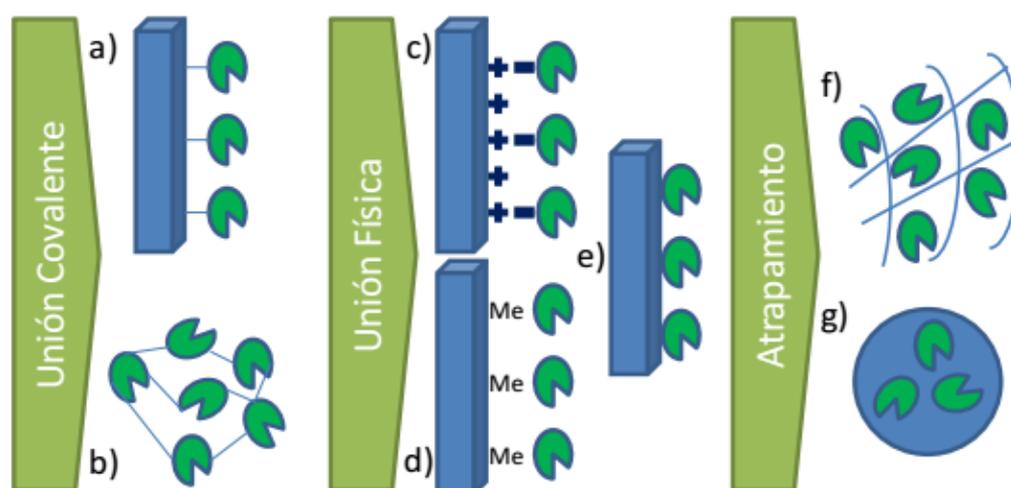


Figura 1.11. Métodos de inmovilización de enzimas. a) Unión covalente, b) Entrecruzamiento, c) Unión iónica, d) Unión Metálica, e) Adsorción, f) Atrapamiento, g) Encapsulación. Extraído de Córdoba, 2015 [169].

Dentro de las uniones de tipo covalente se encuentra el método de unión a un soporte sólido (Figura 1.11, a), que implica la unión de grupos funcionales de la enzima y del soporte activado. Generalmente se debe realizar una activación previa del soporte para generar un grupo reactivo que luego reacciona con algún grupo funcional en el catalizador. Un agente acoplante muy utilizado con esta finalidad es el glutaraldehído. El otro método de unión covalente es el entrecruzamiento (Figura 1.11, b), en el cual no se requiere un soporte insoluble, pero sí se necesita de un reactivo acoplante, el cual actúa como soporte. El glutaraldehído se utiliza también con esta finalidad.

Los métodos por uniones físicas implican fuerzas de menor intensidad que los enlaces covalentes. La unión iónica (Figura 1.11, c) se produce por medio de la interacción entre grupos ionizados de cargas opuestas en el catalizador y en el soporte. Generalmente, la ionización de grupos funcionales está regulada por el pH del medio, con lo que si se modifica el pH la unión puede romperse y el catalizador

liberarse. Sin embargo, la unión resultante es intensa debido a la interacción de cargas eléctricas entre todos los grupos implicados. En la unión metálica (Figura 1.11, d), una sal metálica precipitada previamente sobre un soporte se une con grupos nucleofílicos de enzimas. La adsorción, por su parte, involucra a fuerzas más débiles como las de Van der Waals y enlaces por puente hidrógeno (Figura 1.11, e).

Los catalizadores también pueden ser inmovilizados en soportes por medio de atrapamiento en matrices poliméricas (Figura 1.11, f) o por encapsulación (Figura 1.11, g). Las matrices pueden ser sintéticas o naturales y deben ser permeables a los reactivos y productos de las reacciones que se quieran llevar a cabo. Como ventaja de este método se encuentra que las estructuras de los catalizadores no se ven alteradas, sin embargo, estos catalizadores pueden presentar limitaciones a la transferencia de masa [170].

Existen numerosos reportes de inmovilización de metaloporfirinas sobre diversos soportes para ser utilizados en reacciones de oxidación [171,172]. En particular, la inmovilización de hematin sobre quitosano resultó exitosa para la eliminación de colorantes modelo de efluentes textiles, resultando activo en la oxidación de compuestos fenólicos y antraquinónicos [108,173]. Por otro lado, se pueden encontrar numerosos reportes sobre la oxidación de glicerol con complejos metálicos en medio heterogéneo. Shul'pin et al. (2010) [87] inmovilizaron el complejo dinuclear $[LMn(\mu-O)_3MnL]$ sobre el soporte $SiW_{12}O_{40}$, donde L representa al ligando del átomo de Mn (1,4,7-trimetil-1,4,7-triazaciclononano). El catalizador pudo ser recuperado y reutilizado por lo menos hasta en 4 ciclos de oxidación de glicerol sin pérdidas sustanciales de actividad y no se produjo liberación del complejo inmovilizado al medio de reacción. El producto principal obtenido fue DHA, aunque también se generaron compuestos de mayor grado de oxidación. Por otro lado, Wang et al. (2012). [83] y Wu et al. (2015). [84] utilizaron el complejo $Cr(SO_3\text{-salen})$ inmovilizado en capas de hidróxido doble de Mg-Al (LDH), generando un catalizador que pudo ser reciclado hasta 6 veces sin pérdida importante de la actividad y generando DHA con un 43% de selectividad y con conversiones de glicerol cercanas al 73%. Generalmente, se prefieren los soportes inorgánicos por sobre los orgánicos, debido a que son más robustos y eficientes en la prevención de la desactivación causada por la dimerización de este tipo de catalizadores, esto es, la formación de μ -oxo dímeros [174,175]. La inmovilización también puede ayudar a prevenir la desactivación de las porfirinas provocada por su auto destrucción a través de reacciones secundarias indeseadas [176]. También existe un reporte de co-inmovilización en un soporte de sílica mesoporosa: una glucosa oxidasa y la enzima HRP la cual se agrega por su actividad catalasa [177]. De este modo, se juntan en un solo soporte, dos enzimas capaces de producir reacciones acopladas o en cascada. Por otro lado, la enzima D-aminoácido oxidasa ha sido inmovilizada a un soporte sólido previamente funcionalizado con hematin [178], es decir, la enzima se une directamente al hematin soportado, de modo tal que el sistema mimetiza la acción de un catalizador multienzimático en el cual los diferentes sitios activos se encuentran muy cercanos, facilitando la transferencia de H_2O_2 y O_2 entre ellos.

El estudio de la inmovilización de la enzima alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* y otras especies de la misma familia ha sido motivado principalmente por su posible utilización en sensores para medir la concentración de etanol en fluidos humanos [179,180]. Se han empleado fibras de poliestireno para este fin, a través de enlaces covalentes utilizando glutaraldehído o por técnicas de adsorción sobre óxidos metálicos. Se ha reportado la inmovilización de AOX de *P. pastoris* y de *Hansenula sp* sobre distintos soportes como amino epóxido sephabeads o agarosa. Los catalizadores obtenidos fueron evaluados en ensayos de oxidación acoplados a una reacción mediada por una enzima peroxidática [181]. La estabilización de la estructura cuaternaria de la proteína es importante en estos casos, ya que un posible mecanismo de pérdida de actividad en enzimas multiméricas es a través de la disociación de sus subunidades. También se utiliza en aplicaciones de cromatografía líquida [182,183] utilizando, por

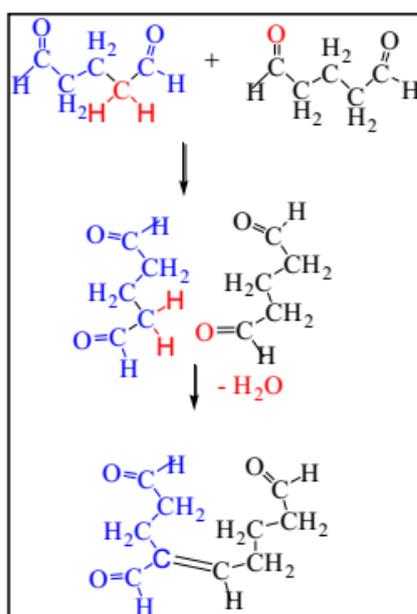
ejemplo, un soporte de hidroxietilmetacrilato. La inmovilización de GAO es estudiada principalmente por su aplicación en sensores para medición de galactosa en alimentos [184–186], particularmente en la leche y se han llegado incluso a desarrollar tiras con varias enzimas inmovilizadas para la detección rápida de este azúcar [187]. No se han encontrado en la bibliografía antecedentes de la utilización de los catalizadores seleccionados en fase heterogénea para la oxidación de glicerol.

1.7.1 El soporte seleccionado

El soporte seleccionado para realizar la inmovilización fue el ReliZyme™ HA-403, un soporte comercial sintético de polimetacrilato altamente poroso e hidrofílico el cual posee grupos hexametildiamina en su superficie, con una densidad de grupo funcional mínima de 500 $\mu\text{mol/g}$ partícula húmeda, un diámetro medio de poro de 40-60 nm y una capacidad de retención de agua de entre 60 y 70%. El grupo amino de la superficie del soporte es capaz de activarse por medio de un reactivo bifuncional para luego formar enlaces covalentes y también es capaz de protonarse para favorecer uniones de tipo iónicas con el catalizador. Los soportes sintéticos son conocidos por poseer mayor estabilidad mecánica, lo cual es un factor a tener en cuenta cuando una reacción que utiliza un catalizador inmovilizado debe ser escalada [188].

1.7.2 Reactivo acoplante

El glutaraldehído (Esquema 1.8) constituye un reactivo bifuncional ampliamente utilizado en inmovilización de enzimas por entrecruzamiento, debido a su capacidad de formar enlaces estables con los grupos amino de las proteínas a valores neutros de pH [189]. El empleo de este compuesto como agente entrecruzante motivó el estudio de su comportamiento en solución, la formación de oligómeros y la naturaleza de los mismos [190,191]. En soluciones acuosas de glutaraldehído se producen espontáneamente reacciones de condensación aldólica (Esquema 1.8) que dan lugar a la formación de dímeros, trímeros y polímeros [190]. Además, según las condiciones de pH del medio, su forma hidratada puede formar un hemiacetal cíclico, sin disponibilidad de grupos aldehídos reactivos. La presencia de estas especies en solución puede tener amplio impacto en la efectividad y eficiencia alcanzada en la inmovilización de enzimas.



Esquema 1.8. Condensación aldólica de glutaraldehído.

1.8 Objetivos y estructura de la tesis

El objetivo general de esta tesis es la valorización de glicerol a través de su oxidación, catalizada por enzimas o complejos metálicos, con la finalidad de obtener productos que posean bioactividad de interés industrial y aplicando tecnologías limpias y económicas en línea con las bases de la química verde.

Los objetivos específicos a alcanzar son los siguientes:

- Evaluar el desempeño de dos complejos metálicos basados en Fe (**capítulo 4**) y en Mn (**capítulo 5**) en la oxidación primaria de glicerol explorando un amplio rango de condiciones de reacción.
- Determinar la performance en la oxidación primaria de glicerol de dos sistemas bicalalíticos basados en enzimas oxidasas comerciales y hematin, ésta última en reemplazo de la enzima catalasa. Se plantea esta tarea atendiendo a dos enfoques diferentes: a través de la determinación de la cinética de la reacción (**capítulo 6**) y a través de la performance de la reacción en el tiempo (**capítulo 7**).
- Discutir los rendimientos de reacción encontrados en base a propuestas de mecanismos de vías de reacción deseadas y no deseadas (**incluido dentro de capítulo 4, capítulo 5 y capítulo 6**).
- Evaluar la inmovilización de aquellos catalizadores que hayan demostrado buen rendimiento de reacción, en una matriz polimérica funcionalizada (**subsecciones del capítulo 4 y del capítulo 6**).
- Evaluar la actividad antimicrobiana de productos de la oxidación primaria del glicerol por medio de ensayos específicos de bioactividad (**capítulo 2**).

Adicionalmente, en el **capítulo 3** se discute el desarrollo de una técnica analítica por cromatografía gaseosa para la cuantificación de glicerol y de sus productos oxidados, la cual se desarrolló como un medio para alcanzar los dos primeros objetivos específicos de esta tesis.

En los capítulos subsiguientes se detallan los materiales, la metodología y los resultados obtenidos durante el desarrollo de los trabajos experimentales tendientes a cumplimentar cada uno de estos objetivos específicos. Finalmente, en el capítulo 8 se expone una conclusión final sobre este trabajo de investigación.

1.9 Referencias

- [1] I. Arends, R. Sheldon, U. Hanefeld, Green Chemistry and Catalysis, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2007. <https://doi.org/10.1002/9783527611003>.
- [2] H. Xie, N. Gathergood, The Role of Green Chemistry in Biomass Processing and Conversion, 2012. <https://doi.org/10.1002/9781118449400>.
- [3] OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027. Chapter 9: Biofuels, 2018. www.fao.org/3/i9166e/i9166e_Chapter9_Biofuels.pdf.
- [4] M. Vohra, J. Manwar, R. Manmode, S. Padgilwar, S. Patil, Bioethanol production: Feedstock and current technologies, J. Environ. Chem. Eng. (2014). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.013>.
- [5] WBA GLOBAL BIOENERGY STATISTICS 2018, 2018. https://worldbioenergy.org/uploads/181203_WBA_GBS_2018_hq.pdf.

- [6] Wolfgang Vogel, Report on Global Market Supply: 2017/2018, Union Zur Förderung von Oel. (2017). https://www.ufop.de/files/3515/1515/2657/UFOP_Report_on_Global_Market_Supply_2017-2018.pdf.
- [7] V.K. Garlapati, U. Shankar, A. Budhiraja, Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products, *Biotechnol. Reports.* 9 (2016) 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.11.002>.
- [8] A. Kokel, C. Schäfer, Application of Green Chemistry in Homogeneous Catalysis, in: *Green Chem. An Incl. Approach*, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809270-5.00016-9>.
- [9] R.A. Sheldon, Catalytic Oxidations in the Manufacture of Fine Chemicals, *Stud. Surf. Sci. Catal.* (1990). [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(08\)60130-5](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(08)60130-5).
- [10] R. Noyori, M. Aoki, K. Sato, Green oxidation with aqueous hydrogen peroxide., *Chem. Commun. (Camb.)*. (2003). https://doi.org/10.5363/tits.14.3_60.
- [11] P. Gallezot, Selective oxidation with air on metal catalysts, *Catal. Today.* (1997). [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(97\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(97)00024-2).
- [12] J. Liu, S. Wu, Z. Li, Recent advances in enzymatic oxidation of alcohols, *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.12.001>.
- [13] I.W.C.E. Arends, P. Gamez, R.A. Sheldon, Green oxidation of alcohols using biomimetic Cu complexes and Cu enzymes as catalysts, *Adv. Inorg. Chem.* 58 (2006) 235–279. [https://doi.org/10.1016/S0898-8838\(05\)58006-1](https://doi.org/10.1016/S0898-8838(05)58006-1).
- [14] T.T. Tidwell, Oxidation of Alcohols to Carbonyl Compounds via Alkoxysulfonium Ylides: The Moffatt, Swern, and Related Oxidations, in: *Org. React.*, 1990. <https://doi.org/10.1002/0471264180.or039.03>.
- [15] M. Besson, P. Gallezot, Selective oxidation of alcohols and aldehydes on metal catalysts, *Catal. Today.* (2000). [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(99\)00315-6](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(99)00315-6).
- [16] R. Anderson, K. Griffin, P. Johnston, P.L. Alsters, Selective Oxidation of Alcohols to Carbonyl Compounds and Carboxylic Acids with Platinum Group Metal Catalysts, *Adv. Synth. Catal.* (2003). <https://doi.org/10.1002/adsc.200390060>.
- [17] K. Yamaguchi, N. Mizuno, Scope, kinetics, and mechanistic aspects of aerobic oxidations catalyzed by ruthenium supported on alumina, *Chem. - A Eur. J.* (2003). <https://doi.org/10.1002/chem.200304916>.
- [18] Y. He, X. Ma, M. Lu, Oxidation of alcohols with hydrogen peroxide in the presence of a new triple-site phosphotungstate, *Arkivoc.* (2012). <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0013.817>.
- [19] W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, Biocatalytic Oxidation of Primary and Secondary Alcohols, *Adv. Synth. Catal.* (2004). <https://doi.org/10.1002/adsc.200303177>.
- [20] M. Pickl, M. Fuchs, S.M. Glueck, K. Faber, The substrate tolerance of alcohol oxidases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2015). <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6699-6>.
- [21] G. Lopretti, Mary; Lluberas, Biomasa y bioplaguicidas, in: J. Zygodlo (Ed.), *Bioplaguicidas*, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, 2017: pp. 129–156.
- [22] P. Leng, Z. Zhang, G. Pan, M. Zhao, Applications and development trends in biopesticides, *African J. Biotechnol.* (2011). <https://doi.org/10.5897/AJBX11.009>.
- [23] M. Jałosińska, J. Wilczak, Influence of plant extracts on the microbiological shelf life of meat

- products, *Polish J. Food Nutr. Sci.* (2009).
- [24] F.E. Koehn, G.T. Carter, The evolving role of natural products in drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.* (2005). <https://doi.org/10.1038/nrd1657>.
- [25] M.H. Medema, K. Blin, P. Cimermancic, V. De Jager, P. Zakrzewski, M.A. Fischbach, T. Weber, E. Takano, R. Breitling, AntiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences, *Nucleic Acids Res.* (2011). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>.
- [26] A.L. Demain, A. Fang, The natural functions of secondary metabolites., *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* (2000). https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_1.
- [27] N.D. Fedorova, V. Moktali, M.H. Medema, Bioinformatics approaches and software for detection of secondary metabolic gene clusters, *Methods Mol. Biol.* (2012). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-122-6_2.
- [28] M.A. Wyatt, J. Lee, Y. Ahilan, N.A. Magarvey, Bioinformatic evaluation of the secondary metabolism of antistaphylococcal environmental bacterial isolates, *Can. J. Microbiol.* (2013). <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0016>.
- [29] S. Cicerale, L.J. Lucas, R.S.J. Keast, Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil, *Curr. Opin. Biotechnol.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.09.006>.
- [30] J. Gutierrez, C. Barry-Ryan, P. Bourke, Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components, *Food Microbiol.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.10.008>.
- [31] B. Mahesh, S. Satish, Antimicrobial Activity of Some Important Medicinal Plant Against Plant and Human Pathogens, *World J. Agric. Sci.* (2008).
- [32] J.P. Rauha, S. Remes, M. Heinonen, A. Hopia, M. Kähkönen, T. Kujala, K. Pihlaja, H. Vuorela, P. Vuorela, Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds, *Int. J. Food Microbiol.* (2000). [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00218-X).
- [33] R.M. Lopachin, T. Gavin, Molecular mechanisms of aldehyde toxicity: A chemical perspective, *Chem. Res. Toxicol.* (2014). <https://doi.org/10.1021/tx5001046>.
- [34] H.J. Dorman, S.G. Deans, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils., *J. Appl. Microbiol.* 88 (2000) 308–316.
- [35] S.D. Rubbo, J.F. Gardner, R.L. Webb, Biocidal activities of glutaraldehyde and related compounds., *J. Appl. Bacteriol.* 30 (1967) 78–87.
- [36] R.C. Gueldner, D.M. Wilson, A.R. Heidt, Volatile compounds inhibiting *Aspergillus flavus*, *J. Agric. Food Chem.* 33 (1985) 411–413. <https://doi.org/10.1021/jf00063a022>.
- [37] H. Esterbauer, F. Muskiet, D.F. Horrobin, Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products, in: *Am. J. Clin. Nutr.*, 1993. <https://doi.org/10.1093/ajcn/57.5.779S>.
- [38] I.H. Han, A.S. Csallany, Formation of Toxic α,β -Unsaturated 4-Hydroxy-Aldehydes in Thermally Oxidized Fatty Acid Methyl Esters, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86 (2009) 253–260. <https://doi.org/10.1007/s11746-008-1343-6>.
- [39] U. Stemmer, A. Hermetter, Protein modification by aldehydophospholipids and its functional consequences., *Biochim. Biophys. Acta.* 1818 (2012) 2436–2445. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.03.006>.

- [40] Ramos-Nino, Ramirez-Rodriguez, Clifford, Adams, QSARs for the effect of benzaldehydes on foodborne bacteria and the role of sulfhydryl groups as targets of their antibacterial activity, *J. Appl. Microbiol.* 84 (2002) 207–212. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00324.x>.
- [41] S.E. Walsh, J.Y. Maillard, C. Simons, A.D. Russell, Studies on the mechanisms of the antibacterial action of ortho-phthalaldehyde., *J. Appl. Microbiol.* 87 (1999) 702–710.
- [42] F. Testud, J. Descotes, Aldehydes, esters, ketones, ethers and amines, in: J.B.T.-H.T. DESCOTES (Ed.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1996: pp. 649–660. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-044481557-6/50027-7>.
- [43] F. Di Yenno, E. Terré, ¿Cuántos dólares traerá la soja en 2019?, (2019). <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/cuantos> (accessed December 24, 2019).
- [44] Glycerine: an overview, New York, 1990.
- [45] Dow, Product Safety Assessment: Glycerine, (n.d.). http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_091a/0901b8038091a41a.pdf?filepath=productsafety/pdfs/noreg/233-00490.pdf&fromPage=GetDoc (accessed December 24, 2019).
- [46] Glycerine: an overview, New York, 1990. https://www.aciscience.org/docs/Glycerine_-_an_overview.pdf.
- [47] A. Villa, N. Dimitratos, C.E. Chan-Thaw, C. Hammond, L. Prati, G.J. Hutchings, Glycerol oxidation using gold-containing catalysts, *Acc. Chem. Res.* (2015). <https://doi.org/10.1021/ar500426g>.
- [48] Y. Zheng, X. Chen, Y. Shen, Commodity chemicals derived from glycerol, an important biorefinery feedstock., *Chem. Rev.* 108 (2008) 5253–77. <https://doi.org/10.1021/cr068216s>.
- [49] Y. Zhao, J. Liu, L. Deng, F. Wang, T. Tan, Optimization of *Candida* sp. 99-125 lipase catalyzed esterification for synthesis of monoglyceride and diglyceride in solvent-free system, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 72 (2011) 157–162. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.05.014>.
- [50] B. Katryniok, H. Kimura, E. Skrzyńska, J.-S. Girardon, P. Fongarland, M. Capron, R. Ducoulombier, N. Mimura, S. Paul, F. Dumeignil, Selective catalytic oxidation of glycerol: perspectives for high value chemicals, *Green Chem.* 13 (2011) 1960. <https://doi.org/10.1039/c1gc15320j>.
- [51] A. Talebian-Kiakalaieh, N.A.S. Amin, K. Rajaei, S. Tarighi, Oxidation of bio-renewable glycerol to value-added chemicals through catalytic and electro-chemical processes, *Appl. Energy.* 230 (2018) 1347–1379. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.09.006>.
- [52] DuPont, DuPont™ Glycolic Acid, (2006). <https://chemical-centre.com/d/982327/d/glycolicacidbrochure-extended.pdf>.
- [53] H. Kimura, K. Tsuto, Catalytic synthesis of dl-serine and glycine from glycerol, *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1993). <https://doi.org/10.1007/BF02543031>.
- [54] A. Abbadi, H. Van Bekkum, Selective chemo-catalytic routes for the preparation of β -hydroxypyruvic acid, *Appl. Catal. A Gen.* (1996). [https://doi.org/10.1016/S0926-860X\(96\)00229-3](https://doi.org/10.1016/S0926-860X(96)00229-3).
- [55] C.R. Taylor, C. Kwangstith, J. Wimberly, N. Kollias, R.R. Anderson, Turbo-PUVA: Dihydroxyacetone-enhanced photochemotherapy for psoriasis: A pilot study, *Arch. Dermatol.* (1999). <https://doi.org/10.1001/archderm.135.5.540>.
- [56] H.I. Maibach, A.M. Kligman, Dihydroxyacetone: A Suntan-Simulating Agent, *Arch. Dermatol.* (1960). <https://doi.org/10.1001/archderm.1960.01580040023004>.

- [57] Y. Suga, A. Ikejima, S. Matsuba, H. Ogawa, Medical pearl: DHA application for camouflaging segmental vitiligo and piebald lesions, *J. Am. Acad. Dermatol.* (2002). <https://doi.org/10.1067/mjd.2002.119670>.
- [58] S.B. Levy, Tanning preparations, *Dermatol. Clin.* (2000). [https://doi.org/10.1016/S0733-8635\(05\)70209-6](https://doi.org/10.1016/S0733-8635(05)70209-6).
- [59] H.J. Wolf, Process for preparing glyceraldehyde from glycerol with methanol dehydrogenase, U.S. Patent 4353987, 1982.
- [60] P. Vogel, I. Robina, Synthesis of Monosaccharides and Analogs, *Compr. Glycosci. From Chem. to Syst. Biol.* 1–4 (2007) 489–582. <https://doi.org/10.1016/B978-044451967-2/00014-3>.
- [61] C.H. Zhou, J.N. Beltramini, Y.X. Fan, G.Q. Lu, Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals, *Chem. Soc. Rev.* (2008). <https://doi.org/10.1039/b707343g>.
- [62] G. Dodekatos, S. Schünemann, H. Tüysüz, Recent Advances in Thermo-, Photo-, and Electrocatalytic Glycerol Oxidation, *ACS Catal.* 8 (2018) 6301–6333. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b01317>.
- [63] W.C. Ketchie, M. Murayama, R.J. Davis, Promotional effect of hydroxyl on the aqueous phase oxidation of carbon monoxide and glycerol over supported Au catalysts, *Top. Catal.* (2007). <https://doi.org/10.1007/s11244-007-0304-x>.
- [64] M.S. Ide, R.J. Davis, The important role of hydroxyl on oxidation catalysis by gold nanoparticles, *Acc. Chem. Res.* (2014). <https://doi.org/10.1021/ar4001907>.
- [65] A.W. Westbrook, D. Miscevic, S. Kilpatrick, M.R. Bruder, M. Moo-Young, C.P. Chou, Strain engineering for microbial production of value-added chemicals and fuels from glycerol, *Biotechnol. Adv.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.006>.
- [66] D. Hekmat, R. Bauer, J. Fricke, Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*, *Bioprocess Biosyst. Eng.* (2003). <https://doi.org/10.1007/s00449-003-0338-9>.
- [67] C.S. Black, G.R. Nair, Bioconversion of Glycerol to Dihydroxyacetone by Immobilized *Gluconacetobacter Xylinus* Cells, *Int. J. Chem. Eng. Appl.* (2013). <https://doi.org/10.7763/ijcea.2013.v4.316>.
- [68] Y.P. Liu, Y. Sun, C. Tan, H. Li, X.J. Zheng, K.Q. Jin, G. Wang, Efficient production of dihydroxyacetone from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Gluconobacter frateurii*, *Bioresour. Technol.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.055>.
- [69] G.S. Kumar, Y. Wee, I. Lee, H.J. Sun, X. Zhao, S. Xia, S. Kim, J. Lee, P. Wang, J. Kim, Stabilized glycerol dehydrogenase for the conversion of glycerol to dihydroxyacetone, *Chem. Eng. J.* 276 (2015) 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.04.039>.
- [70] E. Gehrler, W. Harder, H. Vogel, B. Knuth, K. Ebel, G. Carsten, PREPARATION OF DIHYDROXYACETONE, 5,410,089, 1995. <https://patentimages.storage.googleapis.com/f4/87/f4/71d0314fc10c20/US5410089.pdf>.
- [71] H. Habe, Y. Shimada, T. Yakushi, H. Hattori, Y. Ano, T. Fukuoka, D. Kitamoto, M. Itagaki, K. Watanabe, H. Yanagishita, K. Matsushita, K. Sakaki, Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol, *Appl. Environ. Microbiol.* (2009). <https://doi.org/10.1128/AEM.01535-09>.
- [72] A.A. Hong, K.K. Cheng, F. Peng, S. Zhou, Y. Sun, C.M. Liu, D.H. Liu, Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*

- (2009). <https://doi.org/10.1002/jctb.2209>.
- [73] P. Muller, Glossary of terms used in physical organic chemistry: (IUPAC Recommendations 1994), *Pure Appl. Chem.* (1994). <https://doi.org/10.1351/pac199466051077>.
- [74] K.C. Gupta, A.K. Sutar, Catalytic activities of Schiff base transition metal complexes, *Coord. Chem. Rev.* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.09.005>.
- [75] S. Signorella, C. Palopoli, G. Ledesma, Rationally designed mimics of antioxidant manganoenzymes: Role of structural features in the quest for catalysts with catalase and superoxide dismutase activity, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.005>.
- [76] O. Iranzo, Manganese complexes displaying superoxide dismutase activity: A balance between different factors, *Bioorg. Chem.* (2011). <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2011.02.001>.
- [77] I. Batinic-Haberle, A. Tovmasyan, E.R.H. Roberts, Z. Vujaskovic, K.W. Leong, I. Spasojevic, SOD therapeutics: latest insights into their structure-activity relationships and impact on the cellular redox-based signaling pathways, *Antioxid. Redox Signal.* (2014). <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5147>.
- [78] S. Signorella, C. Hureau, Bioinspired functional mimics of the manganese catalases, *Coord. Chem. Rev.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.003>.
- [79] A.J. Wu, J.E. Penner-Hahn, V.L. Pecoraro, Structural, Spectroscopic, and Reactivity Models for the Manganese Catalases, *Chem. Rev.* (2004). <https://doi.org/10.1021/cr020627v>.
- [80] C. Crotti, E. Farnetti, Selective oxidation of glycerol catalyzed by iron complexes, *J. Mol. Catal. A Chem.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2014.10.021>.
- [81] K. Kong, D. Li, W. Ma, Q. Zhou, G. Tang, Z. Hou, Aluminum(III) triflate-catalyzed selective oxidation of glycerol to formic acid with hydrogen peroxide, *Chinese J. Catal.* (2019). [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(19\)63319-X](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(19)63319-X).
- [82] J. Luo, H. Li, N. Zhao, F. Wang, F. Xiao, Selective oxidation of glycerol to dihydroxyacetone over layer double hydroxide intercalated with sulfonato-salen metal complexes, *J. Fuel Chem. Technol.* 43 (2015) 677–683. [https://doi.org/10.1016/S1872-5813\(15\)30019-0](https://doi.org/10.1016/S1872-5813(15)30019-0).
- [83] X. Wang, G. Wu, F. Wang, K. Ding, F. Zhang, X. Liu, Y. Xue, Base-free selective oxidation of glycerol with 3% H₂O₂ catalyzed by sulphonato-salen-chromium(III) intercalated LDH, *Catal. Commun.* 28 (2012) 73–76. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2012.08.014>.
- [84] G. Wu, X. Wang, T. Jiang, Q. Lin, Selective Oxidation of Glycerol with 3% H₂O₂ Catalyzed by LDH-Hosted Cr(III) Complex, *Catalysts.* (2015). <https://doi.org/10.3390/catal5042039>.
- [85] M. V. Kirillova, A.M. Kirillov, D. Mandelli, W.A. Carvalho, A.J.L. Pombeiro, G.B. Shul'Pin, Mild homogeneous oxidation of alkanes and alcohols including glycerol with tert-butyl hydroperoxide catalyzed by a tetracopper(II) complex, *J. Catal.* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2010.03.017>.
- [86] E. Farnetti, C. Crotti, Selective oxidation of glycerol to formic acid catalyzed by iron salts, *Catal. Commun.* 84 (2016) 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2016.05.014>.
- [87] G.B. Shul'Pin, Y.N. Kozlov, L.S. Shul'Pina, T. V. Strelkova, D. Mandelli, Oxidation of reactive alcohols with hydrogen peroxide catalyzed by manganese complexes, *Catal. Letters.* 138 (2010) 193–204. <https://doi.org/10.1007/s10562-010-0398-9>.
- [88] J. Rocha-Martin, A. Acosta, J. Berenguer, J.M. Guisan, F. Lopez-Gallego, Selective oxidation of glycerol to 1,3-dihydroxyacetone by covalently immobilized glycerol dehydrogenases with higher

- stability and lower product inhibition., *Bioresour. Technol.* 170 (2014) 445–53. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.116>.
- [89] J. Rocha-Martin, A. Acosta, J.M. Guisan, F. López-Gallego, Immobilizing Systems Biocatalysis for the Selective Oxidation of Glycerol Coupled to InSitu Cofactor Recycling and Hydrogen Peroxide Elimination, *ChemCatChem*. 7 (2015) 1939–1947. <https://doi.org/10.1002/cctc.201500210>.
- [90] M.-Q. Xu, F.-L. Li, W.-Q. Yu, R.-F. Li, Y.-W. Zhang, Combined cross-linked enzyme aggregates of glycerol dehydrogenase and NADH oxidase for high efficiency in situ NAD⁺ regeneration, *Int. J. Biol. Macromol.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.178>.
- [91] Y. Zhang, F. Gao, S.P. Zhang, Z.G. Su, G.H. Ma, P. Wang, Simultaneous production of 1,3-dihydroxyacetone and xylitol from glycerol and xylose using a nanoparticle-supported multi-enzyme system with in situ cofactor regeneration, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 1837–1843. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.069>.
- [92] H.J. Wolf, U.S. Patent 4353987, 2012.
- [93] P. Goswami, S.S.R. Chinnadayala, M. Chakraborty, A.K. Kumar, A. Kakoti, An overview on alcohol oxidases and their potential applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2013). <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4842-9>.
- [94] M. Deska, B. Kończak, Immobilized fungal laccase as “green catalyst” for the decolourization process – State of the art, *Process Biochem.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.024>.
- [95] G. Singh, S.K. Arya, Utility of laccase in pulp and paper industry: A progressive step towards the green technology, *Int. J. Biol. Macromol.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.168>.
- [96] S. Liebming, M. Siebenhofer, G. Guebitz, Oxidation of glycerol by 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) in the presence of laccase, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 4541–4545. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.051>.
- [97] I.W.C.E. Arends, Y.X. Li, R. Ausan, R.A. Sheldon, Comparison of TEMPO and its derivatives as mediators in laccase catalysed oxidation of alcohols, *Tetrahedron*. 62 (2006) 6659–6665. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.12.076>.
- [98] K. Isobe, H. Nishise, A new enzymatic method for glycolaldehyde production from ethylene glycol, *J. Mol. Catal. B. Enzym.* (1995). [https://doi.org/10.1016/1381-1177\(95\)00008-9](https://doi.org/10.1016/1381-1177(95)00008-9).
- [99] A.M. Klibanov, B.N. Alberti, M.A. Marletta, Stereospecific oxidation of aliphatic alcohols catalyzed by galactose oxidase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108 (1982) 804–808. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(82\)90900-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(82)90900-7).
- [100] D. Franke, T. Machajewski, C.C. Hsu, C.H. Wong, One-pot synthesis of L-fructose using coupled multienzyme systems based on rhamnulose-1-phosphate aldolase, *J. Org. Chem.* 68 (2003) 6828–6831.
- [101] T. Roncal, C. Muñoz, L. Lorenzo, B. Maestro, M.D.M. Díaz de Guereñu, Two-step oxidation of glycerol to glyceric acid catalyzed by the *Phanerochaete chrysosporium* glyoxal oxidase, *Enzyme Microb. Technol.* 50 (2012) 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.11.007>.
- [102] D. Linke, N. Lehnert, M. Nimtz, R.G. Berger, An alcohol oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* with a distinct glycerol oxidase activity, *Enzyme Microb. Technol.* 61–62 (2014) 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.04.001>.
- [103] R.T. Winter, D.P.H.M. Heuts, E.M.A. Rijpkema, E. Van Bloois, H.J. Wijma, M.W. Fraaije, Hot or not? Discovery and characterization of a thermostable alditol oxidase from *Acidothermus cellulolyticus*

- 11B, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2012). <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3750-0>.
- [104] O. Terada, Properties of New Enzyme Glycerol Oxidase from *Aspergillus japonicus* AT 008, *Agric. Biol. Chem.* (1980). <https://doi.org/10.1271/bbb1961.44.2039>.
- [105] R.A. Sheldon, *Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations*, 1994.
- [106] T.L. Poulos, Thirty Years of Heme Peroxidase Structural Biology, *Arch. Biochem. Biophys.* 500 (2010) 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.02.008>.
- [107] G. Battistuzzi, M. Bellei, C.A. Bortolotti, M. Sola, Redox properties of heme peroxidases, *Arch. Biochem. Biophys.* 500 (2010) 21–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.03.002>.
- [108] A. Córdoba, I. Magario, M.L. Ferreira, Evaluation of hematin-catalyzed Orange II degradation as a potential alternative to horseradish peroxidase, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 73 (2012) 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.020>.
- [109] C.M. Che, J.S. Huang, Metalloporphyrin-based oxidation systems: From biomimetic reactions to application in organic synthesis, *Chem. Commun.* (2009). <https://doi.org/10.1039/b901221d>.
- [110] P.E. Ellis, J.E. Lyons, Selective air oxidation of light alkanes catalyzed by activated metalloporphyrins - the search for a suprabiotic system, *Coord. Chem. Rev.* (1990). [https://doi.org/10.1016/0010-8545\(90\)80022-L](https://doi.org/10.1016/0010-8545(90)80022-L).
- [111] Y.M. Goh, W. Nam, Significant electronic effect of porphyrin ligand on the reactivities of high-valent iron(IV) oxo porphyrin cation radical complexes, *Inorg. Chem.* (1999). <https://doi.org/10.1021/ic980989e>.
- [112] N.A. Stephenson, A.T. Bell, A study of the mechanism and kinetics of cyclooctene epoxidation catalyzed by iron(III) tetrakis(pentafluorophenyl) porphyrin, *J. Am. Chem. Soc.* (2005). <https://doi.org/10.1021/ja043380n>.
- [113] A. Córdoba, I. Magario, M.L. Ferreira, Experimental design and MM2–PM6 molecular modelling of hematin as a peroxidase-like catalyst in Alizarin Red S degradation, *J. Mol. Catal. A Chem.* 355 (2012) 44–60. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATA.2011.12.011>.
- [114] T.C. Bruice, J.R. Lindsay Smith, P.N. Balasubramanian, R.W. Lee, The Mechanism of Hydroperoxide O–O Bond Scission on Reaction of Hydroperoxides with Iron(III) Porphyrins, *J. Am. Chem. Soc.* (1988). <https://doi.org/10.1021/ja00231a057>.
- [115] S.L.H. Rebelo, M.M. Pereira, M.M.Q. Simões, M.G.P.M.S. Neves, J.A.S. Cavaleiro, Mechanistic studies on metalloporphyrin epoxidation reactions with hydrogen peroxide: Evidence for two active oxidative species, *J. Catal.* (2005). <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2005.05.026>.
- [116] C. Cabrera, A. Cornaglia, A. Córdoba, I. Magario, M.L. Ferreira, Kinetic modelling of the hematin catalysed decolourization of Orange II solutions, *Chem. Eng. Sci.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.11.049>.
- [117] V.K. Bansal, R. Kumar, R. Prasad, S. Prasad, Niraj, Catalytic chemical and electrochemical wet oxidation of phenol using new copper(II) tetraazamacrocyclic complexes under homogeneous conditions, *J. Mol. Catal. A Chem.* 284 (2008) 69–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcata.2007.12.030>.
- [118] É. Balogh-Hergovich, G. Speier, Catalytic oxidation of alcohols to carbonyl compounds with hydrogen peroxide using dinuclear iron complexes, *J. Mol. Catal. A Chem.* 230 (2005) 79–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcata.2004.12.013>.
- [119] A. Córdoba, N. Alasino, M. Asteasuain, I. Magario, M.L. Ferreira, Mechanistic evaluation of hematin

- action as a horseradish peroxidase biomimetic on the 4-aminoantipyrine/phenol oxidation reaction, *Chem. Eng. Sci.* 129 (2015) 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.02.031>.
- [120] J.A. Akkara, J. Wang, D.P. Yang, K.E. Gonsalves, Hematin-catalyzed polymerization of phenol compounds, *Macromolecules*. 33 (2000) 2377–2382. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033751956&partnerID=40&md5=6fc0495fb54b525c751c0d4af7262d19>.
- [121] I. Magario, F.S. García Einschlag, E.H. Rueda, J. Zygodlo, M.L. Ferreira, Mechanisms of radical generation in the removal of phenol derivatives and pigments using different Fe-based catalytic systems, *J. Mol. Catal. A Chem.* 352 (2012) 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2011.10.006>.
- [122] G. Busca, S. Berardinelli, C. Resini, L. Arrighi, Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments, *J. Hazard. Mater.* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.045>.
- [123] A.N. Soon, B.H. Hameed, Heterogeneous catalytic treatment of synthetic dyes in aqueous media using Fenton and photo-assisted Fenton process, *Desalination*. (2011). <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.11.002>.
- [124] I. Oller, S. Malato, J.A. Sánchez-Pérez, Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination-A review, *Sci. Total Environ.* (2011). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.08.061>.
- [125] V.F. Laurie, A.L. Waterhouse, Oxidation of glycerol in the presence of hydrogen peroxide and iron in model solutions and wine. Potential effects on wine color, *J. Agric. Food Chem.* (2006). <https://doi.org/10.1021/jf053036p>.
- [126] P. Bautista, A.F. Mohedano, J.A. Casas, J.A. Zazo, J.J. Rodriguez, An overview of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (2008). <https://doi.org/10.1002/jctb.1988>.
- [127] C. Von Sonntag, H.P. Schuchmann, Z.B. Alfassi, Peroxyl radicals, in: *Chem. Free Radicals Peroxyl Radicals*, Wiley, New York, 1997: pp. 173–234.
- [128] G. V. Buxton, C.L. Greenstock, W.P. Helman, A.B. Ross, Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}$ -in Aqueous Solution, *J. Phys. Chem. Ref. Data.* (1988). <https://doi.org/10.1063/1.555805>.
- [129] M. Rong, J. Wang, Y. Shen, J. Han, Catalytic oxidation of alcohols by a novel manganese Schiff base ligand derived from salicylaldehyd and l-Phenylalanine in ionic liquids, *Catal. Commun.* 20 (2012) 51–53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.catcom.2011.11.035>.
- [130] W. Al Zoubi, Y.G. Ko, Organometallic complexes of Schiff bases: Recent progress in oxidation catalysis, *J. Organomet. Chem.* 822 (2016) 173–188. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2016.08.023>.
- [131] K.C. Gupta, A. Kumar Sutar, C.-C. Lin, Polymer-supported Schiff base complexes in oxidation reactions, *Coord. Chem. Rev.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.019>.
- [132] B. Bahramian, V. Mirkhani, M. Moghadam, A.H. Amin, Water-soluble manganese(III) salen complex as a mild and selective catalyst for oxidation of alcohols, *Appl. Catal. A Gen.* 315 (2006) 52–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apcata.2006.08.037>.
- [133] M.K. Brown, M.M. Blewett, J.R. Colombe, E.J. Corey, Mechanism of the Enantioselective Oxidation of Racemic Secondary Alcohols Catalyzed by Chiral Mn(III)–Salen Complexes, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 11165–11170. <https://doi.org/10.1021/ja103103d>.

- [134] D. Xu, S. Wang, Z. Shen, C. Xia, W. Sun, Enantioselective oxidation of racemic secondary alcohols catalyzed by chiral Mn(III)-salen complexes with N-bromosuccinimide as a powerful oxidant, *Org. Biomol. Chem.* 10 (2012) 2730–2732. <https://doi.org/10.1039/C2OB07087A>.
- [135] D. Moreno, V. Daier, C. Palopoli, J.-P. Tuchagues, S. Signorella, Synthesis, characterization and antioxidant activity of water soluble Mn(III) complexes of sulphonato-substituted Schiff base ligands, *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 496–502. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.12.016>.
- [136] C. Palopoli, G. Gómez, A. Foj, F. Doctorovich, S. Mallet-Ladeira, C. Hureau, S. Signorella, Dimerization, redox properties and antioxidant activity of two manganese(III) complexes of difluoro- and dichloro-substituted Schiff-base ligands, *J. Inorg. Biochem.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.11.019>.
- [137] W.D. Murray, S.J.B. Duff, Bio-oxidation of aliphatic and aromatic high molecular weight alcohols by *Pichia pastoris* alcohol oxidase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1990). <https://doi.org/10.1007/BF00176525>.
- [138] A. Siebum, A. van Wijk, R. Schoevaart, T. Kieboom, Galactose oxidase and alcohol oxidase: Scope and limitations for the enzymatic synthesis of aldehydes, *J. Mol. Catal. B Enzym.* (2006). <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.04.003>.
- [139] R. Couderc, J. Baratti, Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase, *Agric. Biol. Chem.* (1980). <https://doi.org/10.1271/bbb1961.44.2279>.
- [140] C. Koch, P. Neumann, O. Valerius, I. Feussner, R. Ficner, Crystal structure of alcohol oxidase from *Pichia pastoris*, *PLoS One.* (2016). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149846>.
- [141] A.R. Parodi, C. Merlo, A. Córdoba, C. Palopoli, J. Ferreyra, S. Signorella, M.L. Ferreira, I. Magario, Application of metal complexes as biomimetic catalysts on glycerol oxidation, *Mol. Catal.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.11.007>.
- [142] E.P.L. Gasparotto, S.C.C. Abrão, S.Y. Inagaki, D.J. Tessmann, C. Kemmelmeier, I.P.B. Tessmann, Production and characterization of galactose oxidase produced by four isolates of *Fusarium graminearum*, *Brazilian Arch. Biol. Technol.* (2006). <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000500004>.
- [143] K. Parikka, E. Master, M. Tenkanen, Oxidation with galactose oxidase: Multifunctional enzymatic catalysis, *J. Mol. Catal. B Enzym.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.06.006>.
- [144] J.W. Whittaker, Free radical catalysis by galactose oxidase, *Chem. Rev.* (2003). <https://doi.org/10.1021/cr020425z>.
- [145] I.W.C. ARENDS, P. GAMEZ, R.A. SHELDON, GREEN OXIDATION OF ALCOHOLS USING BIOMIMETIC Cu COMPLEXES AND Cu ENZYMES AS CATALYSTS, in: *Adv. Inorg. Chem. Homog. Biomim. Oxid. Catal.*, primera ed, 2006.
- [146] S. Chornaja, E. Sproge, K. Dubencovs, L. Kulikova, V. Serga, A. Cvetkovs, V. Kampars, Selective Oxidation of Glycerol to Glyceraldehyde over Novel Monometallic Platinum Catalysts, *Key Eng. Mater.* 604 (2014) 138–141. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.604.138>.
- [147] G. Wu, X. Wang, Y. Huang, X. Liu, F. Zhang, K. Ding, X. Yang, Selective oxidation of glycerol with O₂ catalyzed by low-cost CuNiAl hydrotalcites, *J. Mol. Catal. A Chem.* 379 (2013) 185–191. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.molcata.2013.08.018>.
- [148] N. Dimitratos, C. Messi, F. Porta, L. Prati, A. Villa, Investigation on the behaviour of Pt(0)/carbon and Pt(0),Au(0)/carbon catalysts employed in the oxidation of glycerol with molecular oxygen in

- water, *J. Mol. Catal. A Chem.* (2006). <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2006.04.019>.
- [149] W. Hu, B. Lowry, A. Varma, Kinetic study of glycerol oxidation network over Pt–Bi/C catalyst, *Appl. Catal. B Environ.* 106 (2011) 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2011.05.015>.
- [150] C. Claret, J.M. Salmon, C. Romieu, A. Bories, Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1994). <https://doi.org/10.1007/BF00221232>.
- [151] M. Swartz, HPLC detectors: A brief review, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* (2010). <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>.
- [152] N. Simonzadeh, B. Ronsen, An isocratic HPLC method for the determination of sorbitol and glycerol in pharmaceutical formulations, *J. Chromatogr. Sci.* (2012). <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms044>.
- [153] A. Parodi, E. Diguilio, S. Renzini, I. Magario, An alternative approach for quantification of glyceraldehyde and dihydroxyacetone as trimethylsilyl derivatives by GC-FID, *Carbohydr. Res.* 487 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107885>.
- [154] C.V. Piattoni, C.M. Figueroa, M.D. Asención Diez, I.L. Parcerisa, S. Antuña, R.A. Comelli, S.A. Guerrero, A.J. Beccaria, A.Á. Iglesias, Production and characterization of *Escherichia coli* glycerol dehydrogenase as a tool for glycerol recycling, *Process Biochem.* 48 (2013) 406–412. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.01.011>.
- [155] Ro.L. Grob, E.F. Barry, *Modern Practice of Gas Chromatography*, fourth, John Wiley & Sons, Inc., 2004.
- [156] P. de Castro Vasconcellos, G.O. da Rocha, E.B. Caramão, M.E. Machado, L.C. Krause, *Chromatographic Techniques for Organic Analytes*, *Compr. Anal. Chem.* (2015). <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2015.09.009>.
- [157] J. Drozd, *Chemical derivatization in gas chromatography*, 1st ed., Amsterdam, 1981.
- [158] A.I. Ruiz-Matute, O. Hernández-Hernández, S. Rodríguez-Sánchez, M.L. Sanz, I. Martínez-Castro, Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 1226–1240. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.013>.
- [159] C.F. Poole, Alkylsilyl derivatives for gas chromatography, *J. Chromatogr. A.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.097>.
- [160] D. Gardiner, The dimeric forms of some α -hydroxycarbonyl compounds, *Carbohydr. Res.* (1966). [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)81217-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)81217-3).
- [161] W. Lili, Q. Jie, H. Zhongce, Z. Yuguo, H. Wei, Determination of dihydroxyacetone and glycerol in fermentation broth by pyrolytic methylation/gas chromatography, *Anal. Chim. Acta.* 557 (2006) 262–266. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.030>.
- [162] A. Lehninger, *Bioquímica*, Segunda ed, Ediciones Omega, S.A., Barcelona, 1995.
- [163] V. A. Yaylayan, S. Harty-Majors, A. A. Ismail, Investigation of DL-glyceraldehyde-dihydroxyacetone interconversion by FTIR spectroscopy, *Carbohydr. Res.* (1999). [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00077-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00077-4).
- [164] H.J.H. Fenton, H. Jackson, LVI. - Crystalline glycollic aldehyde, *J. Chem. Soc. Trans.* (1899). <https://doi.org/10.1039/CT8997500575>.
- [165] N.P. McClelland, CCVII. - Bimolecular glycollic aldehyde, *J. Chem. Soc. Trans.* (1911). <https://doi.org/10.1039/CT9119901827>.

- [166] W.W.W. Sweeley C. C., Bentley R., Makita M., Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 2497–2507.
- [167] M.A. Andrews, Capillary gas-chromatographic analysis of monosaccharides: Improvements and comparisons using trifluoroacetylation and trimethylsilylation of sugar O-benzyl- and O-methyl-oximes, *Carbohydr. Res.* (1989). [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(89\)85001-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(89)85001-3).
- [168] M. Becker, T. Zweckmair, A. Forneck, T. Rosenau, A. Potthast, F. Liebner, Evaluation of different derivatisation approaches for gas chromatographic-mass spectrometric analysis of carbohydrates in complex matrices of biological and synthetic origin, *J. Chromatogr. A.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.053>.
- [169] Agostina Cordoba, CATALIZADORES ENZIMÁTICOS Y BIOMIMÉTICOS SOPORTADOS PARA LA ELIMINACIÓN DE COLORANTES MODELO DE SOLUCIONES ACUOSAS, Universidad Nacional de Córdoba, 2015. <http://hdl.handle.net/11086/4648>.
- [170] A. Karthick, G. Nallathambi, A.S. Karthick, A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme, *Che Sci Rev Lett.* (2012).
- [171] G.M. Ucoski, F.S. Nunes, G. Defreitas-Silva, Y.M. Idemori, S. Nakagaki, Metalloporphyrins immobilized on silica-coated Fe₃O₄ nanoparticles: Magnetically recoverable catalysts for the oxidation of organic substrates, *Appl. Catal. A Gen.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2013.03.012>.
- [172] X. Guo, Y.Y. Li, D.H. Shen, J. Gan, M. Tian, Z.G. Liu, Metalloporphyrins immobilized on core-shell CeO₂@SiO₂ nanoparticles prepared by a double-coating method for oxidation of diphenyl methane, *Appl. Catal. A Gen.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2011.10.040>.
- [173] A. Córdoba, I. Magario, M.L. Ferreira, Modified chitosan as an economical support for hematin: Application in the decolorization of anthraquinone and azo dyes, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90 (2015) 1665–1676. <https://doi.org/10.1002/jctb.4475>.
- [174] B. Fu, H.C. Yu, J.W. Huang, P. Zhao, J. Liu, L.N. Ji, Mn(III) porphyrins immobilized on magnetic polymer nanospheres as biomimetic catalysts hydroxylating cyclohexane with molecular oxygen, *J. Mol. Catal. A Chem.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2008.10.015>.
- [175] B. Fu, P. Zhao, H.C. Yu, J.W. Huang, J. Liu, L.N. Ji, Magnetic polymer nanospheres immobilizing metalloporphyrins. Catalysis and reuse to hydroxylate cyclohexane with molecular oxygen, *Catal. Letters.* (2009). <https://doi.org/10.1007/s10562-008-9715-y>.
- [176] X. Dong, L. Wang, J. Wang, J. Zhou, T. Sun, Evidence of nanoconfinement effects of MCM-41 on propylene polymerization catalyzed by MCM-41 supported metallocene catalyst in the presence and absence of β -cyclodextrin, *J. Phys. Chem. B.* (2006). <https://doi.org/10.1021/jp060238v>.
- [177] F. Pitzalis, M. Monduzzi, A. Salis, A bienzymatic biocatalyst constituted by glucose oxidase and Horseradish peroxidase immobilized on ordered mesoporous silica, *Microporous Mesoporous Mater.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.12.023>.
- [178] J. Sun, K. Du, X. Song, Q. Gao, H. Wu, J. Ma, P. Ji, W. Feng, Specific immobilization of d-amino acid oxidase on hematin-functionalized support mimicking multi-enzyme catalysis, *Green Chem.* 17 (2015) 4465–4472. <https://doi.org/10.1039/c5gc01233c>.
- [179] L. Zhao, Q. Liu, S. Yan, Z. Chen, J. Chen, X. Li, Multimeric immobilization of alcohol oxidase on electrospun fibers for valid tests of alcoholic saliva, *J. Biotechnol.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.08.015>.
- [180] E.L. Gulberg, G.D. Christian, The use of immobilized alcohol oxidase in the continuous flow

- determination of ethanol with an oxygen electrode, *Anal. Chim. Acta.* (1981). [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)83165-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)83165-2).
- [181] F. Lopez-Gallego, L. Betancor, A. Hidalgo, G. Dellamora-Ortiz, C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, Stabilization of different alcohol oxidases via immobilization and post immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.* (2007). <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.04.021>.
- [182] K. Johansson, G. Jönsson-Pettersson, L. Gorton, G. Marko-Varga, E. Csöregi, A reagentless amperometric biosensor for alcohol detection in column liquid chromatography based on co-immobilized peroxidase and alcohol oxidase in carbon paste, *J. Biotechnol.* (1993). [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(93\)90076-Y](https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90076-Y).
- [183] V. Pacáková, K. Štulík, K. Le, J. Hladík, Hydroxyethylmethacrylate column reactors with immobilized glucose oxidase or alcohol oxidase. Liquid chromatographic determination of ethanol in serum, *Anal. Chim. Acta.* (1992). [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(92\)80152-W](https://doi.org/10.1016/0003-2670(92)80152-W).
- [184] E.E. Szabó, N. Adányi, M. Váradi, Application of biosensor for monitoring galactose content, *Biosens. Bioelectron.* (1996). [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(96\)87664-0](https://doi.org/10.1016/0956-5663(96)87664-0).
- [185] V. Rajendran, J. Irudayaraj, Detection of glucose, galactose, and lactose in milk with a microdialysis-coupled flow injection amperometric sensor, *J. Dairy Sci.* (2002). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74201-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74201-X).
- [186] P.W. Stoecker, A.M. Yacynych, P. Manowitz, Galactose biosensors using composite polymers to prevent interferences, in: *Polym. Mater. Sci. Eng. Proc. ACS Div. Polym. Mater. Sci. Eng.*, 1997. [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(95\)96854-R](https://doi.org/10.1016/0956-5663(95)96854-R).
- [187] S.K. Sharma, S.K. Singh, N. Sehgal, A. Kumar, Biostrip technique for detection of galactose in dairy foods, *Food Chem.* (2004). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.052>.
- [188] W. Neto, M. Schürmann, L. Panella, A. Vogel, J.M. Woodley, Immobilisation of ω -transaminase for industrial application: Screening and characterisation of commercial ready to use enzyme carriers, *J. Mol. Catal. B Enzym.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.04.005>.
- [189] K. Okuda, I. Urabe, Y. Yamada, H. Okada, Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds, *J. Ferment. Bioeng.* (1991). [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(91\)90231-5](https://doi.org/10.1016/0922-338X(91)90231-5).
- [190] I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron, Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *Biotechniques.* (2004).
- [191] K. Hashimoto, Y. Masada, Y. Sumida, T. Tashima, N. Satoh, Studies of aqueous solution of glutaraldehyde by capillary gas chromatography-mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* (1983). [https://doi.org/10.1016/0020-7381\(83\)87044-2](https://doi.org/10.1016/0020-7381(83)87044-2).

Capítulo 2: Ensayos de bioactividad

2.1 Objetivo del capítulo

Los aldehídos y cetonas naturales, debido a su estructura, constituyen sustancias con potencial actividad antimicrobiana. El objetivo de este capítulo es evaluar la actividad antimicrobiana en microorganismos cuidadosamente seleccionados para los productos de oxidación primaria de glicerol; gliceraldehído y dihidroxiacetona en contraste con glicerol. De esta manera, además de confirmar o refutar la primera hipótesis de esta tesis, los resultados de este estudio sientan la base para direccionar los estudios subsiguientes de oxidación de glicerol enfocando en la producción, en el mejor de los casos, de una sustancia bioactiva con la mayor pureza posible.

Los antecedentes y motivos que fundamentan esta tarea se encuentran detallados a lo largo del capítulo 1 de la presente tesis.

2.2 Métodos

2.2.1 Selección de microorganismos

La actividad antibacteriana fue testeada contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922).

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa, aeróbica facultativa [1]. Es un patógeno oportunista en humanos (sobre todo en los inmunocomprometidos) y también en plantas [2]. Infecta los pulmones, las vías respiratorias y urinarias, los tejidos (heridas), y también causa otras sepsis (infecciones generalizadas en el organismo) [3]. Otras de las características importantes de *P. aeruginosa* son: la capacidad de formar biopelículas que le permite adherirse de manera muy eficaz a las superficies, y la resistencia a los agentes antimicrobianos, factor determinante en la efectividad de los tratamientos que realizan los pacientes infectados. Además, esta forma de agruparse de *P. aeruginosa* afecta a las industrias y a las redes de distribución de agua por adherirse a las cañerías e instalaciones, ocasionando taponamiento de filtros y alterando la calidad microbiana del agua. Las principales industrias afectadas son las del sector alimenticio dado que la presencia de esta bacteria en las tuberías produce serias alteraciones en sus procesos productivos [1]. En las últimas décadas el aumento de la resistencia a antibióticos ha sido un problema creciente y se ha incrementado hasta en un 65% el aislamiento de *P. aeruginosa* multirresistentes (resistentes a más de 3 antibióticos) desde 1998 hasta el año 2000 [3].

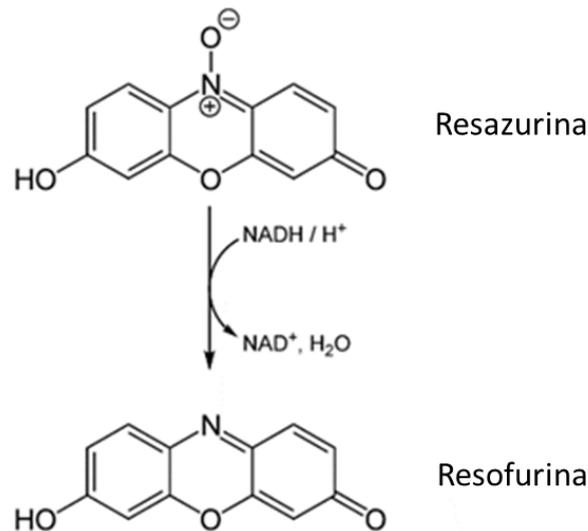
Escherichia coli es una bacteria que se encuentra en el sistema digestivo de animales y seres humanos, la mayoría de sus cepas son inofensivas, pero existen algunas que resultan patógenas. Es un bacilo Gram-negativo perteneciente a la familia de las enterobacterias, no produce esporas y es aeróbica facultativa con movilidad mediante flagelos. Las cepas patógenas se clasifican en seis grupos según los síntomas que producen, entre las cuales se encuentra la *E. coli shigatoxigénica* (STEC) que puede producir una diarrea de distinta consideración hasta provocar una enfermedad grave como el síndrome urémico hemolítico (SHU). Las *E. Coli enterohemorrágicas* (EHEC) pertenecen al subconjunto de las STEC asociadas generalmente al SHU. La cepa de *E. coli* (O157:H7) es la más importante ligada a las enfermedades transmitidas por alimentos y utilizada como indicador de contaminación fecal y parámetro de inocuidad alimenticia [4].

Staphylococcus aureus es una bacteria anaeróbica facultativa Gram-positiva, inmóvil y no esporulada. Forma parte de la flora natural del ser humano, pero cuando se interrumpe la defensa de la piel puede causar enfermedades, especialmente en grupos de riesgo [5]. Puede producir infecciones cutáneas y de la mucosa, de baja gravedad, hasta enfermedades de riesgo vital como abscesos, meningitis, endocarditis

o neumonía entre otras. Además, puede afectar el tracto intestinal por la ingesta de la bacteria o la enterotoxina que ésta secreta.

2.2.2 Determinación de la densidad mínima de inóculo

La resazurina es un indicador redox que es de color azul en su estado oxidado y que cambia a color rosado cuando es reducida. Es utilizada como un indicador de oxidación-reducción en ensayos de viabilidad celular tanto aeróbicos como anaeróbicos [6]. La reacción de reducción que se produce se representa en el Esquema 2.1.



Esquema 2.1. Reacción de reducción del indicador resazurina (color azul) para forma resorufina (color rosado).

Para determinar las concentraciones de inóculo bacteriano a utilizar en los ensayos, primero se preparó el caldo de cultivo Müeller-Hinton (MH) (Britannia), pesando 1,76 g del reactivo sólido, se agregó un poco de agua destilada y la mezcla se calentó ligeramente, luego se agregó agua destilada hasta un volumen de 80 mL. El caldo de cultivo fue esterilizado en autoclave junto con otros materiales necesarios. Las bacterias fueron incubadas en tubos con el caldo de cultivo MH por 24 h a 37°C. Luego, la concentración bacteriana requerida para reducir la resazurina fue determinada para cada cepa. Para ello, se realizaron cuatro diluciones seriadas 1:10 (desde 10^{-1} a 10^{-4}) del inóculo bacteriano madre (106 UFC/mL) en tubos de ensayo con caldo MH y agar 0,15% p/v. Alícuotas de 150 μL de estos inóculos fueron colocadas en microplacas que contenían 50 μL de agua destilada esterilizada y 10 μL de solución de resazurina (0,01% p/v) y fueron incubadas por 2 h a 37°C. La dilución apropiada de inóculo para trabajar fue considerada como la más concentrada incapaz de reducir la resazurina (a color rosa). Las unidades formadoras de colonias (CFU) por mL de estas diluciones fueron confirmadas por el método de conteo en placa en MH agar.

2.2.3 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC) y de la concentración bactericida mínima (MBC)

En microbiología, la concentración inhibitoria mínima (MIC) es la concentración más baja de una droga que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo luego de 24 h de incubación a 37°C. La concentración bactericida mínima (MBC) se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas) [7].

Se prepararon soluciones de GA, DHA y glicerol en agua destilada esterilizada de tal modo que sus concentraciones fueron de 25 g/L. Se realizaron 10 diluciones seriadas 1:2 de las soluciones de GA, DHA y glicerol antes preparadas en tubos eppendorff utilizando agua como diluyente para lograr un rango de concentraciones entre 0,048 g/L y 25 g/L.

En cada microplaca de 96 pocillos se trabajó con un solo compuesto. Los pocillos de la microplaca fueron llenados de la siguiente manera:

- **columnas 1 a 10:** 150 µL de inóculo bacteriano + 50 µL de la dilución del compuesto a testear
- **columna 12:** 150 µL de inóculo + 50 µL de agua destilada esterilizada (control positivo, color = rosado)

Por otro lado, en la última fila de cada una de las placas se sembraron algunos pocillos de la siguiente manera:

- 170 µL de medio de cultivo estéril (caldo MH) + 50 µL de agua destilada estéril (control negativo, color = azul).

El contenido de los pocillos fue mezclado utilizando una micropipeta. Dos filas fueron preparadas para cada cepa y se incubaron a 37°C por 24 h. Luego de la incubación, se agregaron 10 µL de resazurina a cada pocillo. Luego de una segunda incubación por 2 h a 37°C, los pocillos se inspeccionaron visualmente para evaluar cambio de color y aparición de turbidez. El pocillo con la concentración más diluida del compuesto que permanece azul y no muestra turbidez es la que indica la MIC [8–11].

Una vez determinada la MIC para cada compuesto y microorganismo se procedió a determinar la MBC en agar. Se pesaron 5,5 gramos de agar, se disolvió en una alícuota de agua destilada y se llevó a 250 mL finales. Posteriormente, se esterilizaron las placas de Petri y el agar en autoclave. Se colocó en cada placa de Petri el agar y se dejó solidificar. Luego, se inocularon distintas placas con el contenido de los pocillos correspondientes a las MIC para cada microorganismo y los dos pocillos siguientes con una concentración de analito mayor a la MIC. Se incubaron las placas a 37°C durante 24 horas. Finalmente, se inspeccionó visualmente si se produjo crecimiento o no del microorganismo en cada placa.

2.3 Resultados

Todo lo descrito en las Secciones 2.2.2 y 2.2.3 se realizó por duplicado en días diferentes.

2.3.1 Determinación de la mínima concentración de inóculo

En la Figura 2.1 se muestran los resultados del ensayo de determinación de la concentración mínima de inóculo, para cada cepa bacteriana, que es capaz de reducir a la resazurina. Como se puede observar (cuadros en rojo), la concentración de inóculo mínima para *E. coli* es de 0,106 UFC/mL, para *S. aureus* 1,06 UFC/mL y para *P. aeruginosa* 0,106 UFC/mL. Una vez determinadas estas concentraciones, se procedió a determinar la MIC.

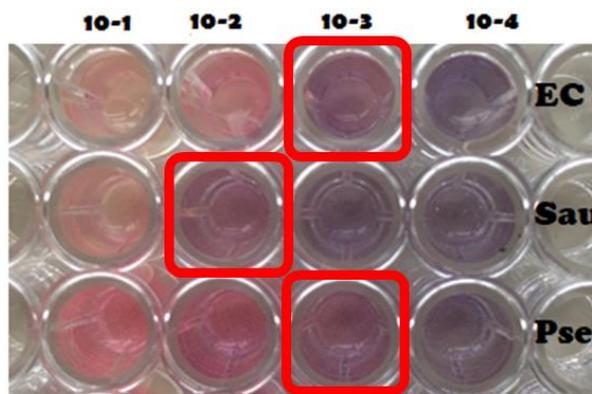


Figura 2.1. Determinación de la densidad del inóculo mínima capaz de reducir rezasurina. EC (*Escherichia coli*), Sau (*Staphylococcus aureus*), Pse (*Peudomonas aeruginosa*). Las diluciones realizadas a partir del inóculo madre (106 UFC/mL) de izquierda a derecha son: 10,6 UFC/mL (10^{-1}), 1,06 UFC/mL (10^{-2}), 0,106 UFC/mL (10^{-3}), 0,0106 UFC/mL (10^{-4}).

2.3.2 Actividad antimicrobiana de soluciones de los estándares GA y DHA

En primera instancia, se determinó la MIC de cada analito frente a cada una de las cepas estudiadas. En la Figura 2.2.A, B y C se muestran las fotografías de las microplacas de 96 pocillos para cada uno de los analitos ensayados: GA, DHA y glicerol, respectivamente. En la parte superior de las figuras se indican las concentraciones de analito en cada una de las columnas. En la fila inferior se realizaron controles negativos de crecimiento; no contienen analito ni inóculo bacteriano, siendo un indicador de que los materiales fueron esterilizados efectivamente. En la última columna de la derecha se muestran los controles positivos, esto es, pocillos sembrados con inóculos bacterianos que se desarrollan en ausencia del analito e indican que las colonias celulares son viables.

Concentración de GA (g/L)										Con trol +	
25	12,5	6,25	3,42	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09	0,04		
											<i>E. coli</i>
											<i>E. coli bis</i>
											<i>S. aureus</i>
											<i>S. aureus bis</i>
											<i>P. aerug.</i>
											<i>P. aerug. bis</i>
											Control negativo

Figura 2.2.A. Microplaca para determinación de la MIC de GA sobre distintos microorganismos. La MIC para cada fila se marca señalada con rojo.

Concentración de DHA (g/L)										Con trol +	
25	12,5	6,25	3,42	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09	0,04		
											<i>E. coli</i>
											<i>E. coli bis</i>
											<i>S. aureus</i>
											<i>S. aureus bis</i>
											<i>P. aerug.</i>
											<i>P. aerug. bis</i>
											Control negativo

Figura 2.2.B. Microplaca para determinación de la MIC de DHA sobre distintos microorganismos. No se pudo determinar un valor de MIC.

Concentración de Glicerol (g/L)										Con trol +	
25	12,5	6,25	3,42	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09	0,04		
											<i>E. coli</i>
											<i>E. coli bis</i>
											<i>S. aureus</i>
											<i>S. aureus bis</i>
											<i>P. aerug.</i>
											<i>P. aerug. bis</i>
											Control negativo

Figura 2.2.C. Microplaca para determinación de la MIC de glicerol sobre distintos microorganismos. No se pudo determinar un valor de MIC.

GA fue la única sustancia capaz de inhibir el crecimiento de las cepas evaluadas (Figura 2.2.A) y *E. coli* resultó la más susceptible, ya que la concentración de GA necesaria (promediada) resultó menor en ese caso (Tabla 2.1). Para la determinación de la MIC se tuvo en cuenta si se desarrolló turbidez en el medio luego del tiempo de incubación, ya que el cambio de color por sí sólo no resultó un indicador confiable en estos ensayos. Luego de establecer el valor de MIC, se sembraron los contenidos de los pocillos con distintas concentraciones de GA en placas de Petri con agar. Se utilizaron concentraciones de GA mayores o iguales a los valores de MIC encontrados para determinar la MBC. Se observó a partir de que concentración no hay crecimiento de las cepas ensayadas y ese fue el valor de MBC reportado. Los resultados finales se muestran también en la Tabla 2.1.

La toxicidad del gliceraldehído fue estudiada en ratas, determinándose un valor de dosis letal 50 (DL_{50}) de 2 g/kg y es considerado de ligero a moderadamente tóxico [12]. Por otro lado, DHA y glicerol no mostraron actividad antibacteriana frente a las bacterias testeadas en las concentraciones utilizadas. Sin embargo, se encontró en la literatura que DHA posee actividad anti fúngica contra el agente causante de la dermatomicosis [13].

Tabla 2.1: Concentración inhibitoria mínima (MIC) y concentración bactericida mínima (MBC) de soluciones acuosas de gliceraldehído. Rango de concentraciones testeado: 0,04 – 25 g/L.

	MIC (g/L)	CBM /(g/L)
<i>E. coli</i>	6,25 ± 0	6,25 ± 0
<i>S. aureus</i>	7,82 ± 3,13	7,82 ± 3,13
<i>P. aeruginosa</i>	7,82 ± 3,13	7,82 ± 3,13

Los valores de MIC reportados para distintos antibióticos sintéticos frente a *P. aeruginosa* se encuentran en el rango de 0,25 – 128 mg/L [14]. El máximo valor reportado es unas 60 veces mayor que el mejor valor de MIC obtenido en este trabajo (6,25 g/L). Sin embargo, los valores de MIC de la Tabla 2.1 se encuentran en el rango de valores de compuestos naturales como los monoterpenos. Los autores Kajiwara et al. (2006) [15] detectaron acción bacteriostática frente a *E. coli* de diferentes aldehídos alifáticos no saturados a concentraciones de 0,05 g/L, siendo el 3Z-hexanal el más efectivo. El citral también mostró moderada actividad frente a bacterias gram positivas y gram negativas, incluidas las bacterias testeadas en este trabajo [16]. Por su parte, Matasyoh et al. (2009) [17] reportaron valores de MIC de 163 g/L y 108 g/L del aceite esencial de *Coriandrum Sativum* contra *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. *P. aeruginosa* fue resistente. Este aceite contenía 56% de aldehídos, principalmente 2E-decenal y decanal. Monoterpenos con grupos funcionales OH, los cuales se encuentran comúnmente en aceites esenciales, presentan acción antimicrobiana frente a las cepas presentadas en este trabajo y muestran valores de MIC en el amplio rango de 3,81-222 g/L [18].

2.4 Conclusiones del capítulo

Se evaluó la actividad antibacteriana de GA, DHA y glicerol frente a cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, siendo GA la única sustancia activa en el rango de concentraciones testeado. De las tres cepas, la más susceptible fue *E. coli*, con valores de MIC y MBC de 6,25 g/L. Estos valores son similares a los de otros compuestos naturales encontrados en la literatura, como los monoterpenos. De esta manera se amplían las posibles aplicaciones para el gliceraldehído. La mayoría de los reportes de oxidación de glicerol se enfocan en la obtención de DHA como principal producto, aunque la producción de GA también ha sido reportada. Sin embargo, en la literatura es escasa la información relativa a las propiedades y posibles aplicaciones de esta sustancia en comparación con DHA.

Este resultado motivó además centrar los experimentos de oxidación de glicerol hacia la obtención selectiva de gliceraldehído por sobre la obtención de otras estructuras de mayor grado de oxidación como los ácidos carboxílicos de 3 y de 2 átomos de carbono.

2.5 Resultados publicados

Los resultados de este capítulo fueron publicados en:

- Parodi, Adrián R.; Merlo, Carolina; Córdoba, Agustina; Palopoli, Claudia; Ferreyra, Joaquín; Signorella, Sandra; Ferreira, María L.; Magario, Ivana. **“Application of metal complexes as biomimetic catalysts on glycerol oxidation”**. *Molecular Catalysis* 481 (2020), 110236. DOI: 10.1016/j.mcat.2018.11.007.

2.6 Referencias

- [1] Irene Martín, Riesgo sanitario por presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el agua para consumo, Universidad Nacional de General Sarmiento, 2004. [http://observatorioconurbano.ungs.edu.ar/Tesis de ecologia/2004_IreneMartin.pdf](http://observatorioconurbano.ungs.edu.ar/Tesis%20de%20ecologia/2004_IreneMartin.pdf).
- [2] K. Todar, *Todar's online textbook of bacteriology*, *Pseudomonas Aeruginosa*. (n.d.). <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html> (accessed January 7, 2020).
- [3] Y.J. Garnacho, M. Bodi, *Pseudomonas aeruginosa : tratamiento combinado frente a monoterapia*, 31 (2007) 83–87.
- [4] FAO, Preventing *E.coli* in food, (2020). <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/e-coli0/es/> (accessed January 7, 2020).
- [5] D.D.M. Monica Gil, *Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina*, *Rev. Chil. Infectol.* (2000). <https://doi.org/10.4067/s0716-10182000000200010>.
- [6] J.L. Chen, T.W.J. Steele, D.C. Stuckey, Modeling and Application of a Rapid Fluorescence-Based Assay for Biotoxicity in Anaerobic Digestion, *Environ. Sci. Technol.* (2015). <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03050>.
- [7] G. Horna, M. Silva, W. Vicente, J. Tamariz, Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas., *Rev. Medica Hered.* (2005).
- [8] C.M. Mann, J.L. Markham, A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils., *J. Appl. Microbiol.* 84 (1998) 538–544.
- [9] M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibsouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *J. Pharm. Anal.* 6 (2016) 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- [10] F. Haddouchi, T.M. Chaouche, Y. Zaouali, R. Ksouri, A. Attou, A. Benmansour, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria, *Food Chem.* 141(1) (2013) 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.007>.
- [11] J. Sun, X. Wang, P. Wang, L. Li, W. Qu, J. Liang, Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties of essential oil from *Dictamnus angustifolius*, *J. Ethnopharmacol.* 159 (2015) 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.06.055>.
- [12] S.R. Clough, *Glyceraldehyde A2 - Wexler, Philip BT - Encyclopedia of Toxicology (Second Edition)*, in: Elsevier, New York, 2005: pp. 448–449. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/00456-7](https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/00456-7).
- [13] C. Stopiglia, F. Vieira, A. Mondadori, T. Oppe, M. Scroferneker, In Vitro Antifungal Activity of Dihydroxyacetone Against Causative Agents of Dermatomyces, *Mycopathologia.* 171 (2011) 267–271. <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9370-x>.
- [14] S. Dosler, E. Karaaslan, Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides, *Peptides.* 62 (2014) 32–37. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.021](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.021).
- [15] T. Kajiwara, K. Matsui, Y. Akakabe, T. Murakawa, C. Arai, Antimicrobial Browning-Inhibitory Effect of Flavor Compounds in Seaweeds, *J. Appl. Phycol.* 18 (2006) 413–422. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9046-6>.
- [16] H.J. Dorman, S.G. Deans, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils., *J. Appl. Microbiol.* 88 (2000) 308–316.

- [17] J.C. Matasyoh, Z.C. Maiyo, R.M. Ngure, R. Chepkorir, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*, *Food Chem.* 113 (2009) 526–529. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.097>.
- [18] G.M. N., O. M., C. C., D. J., L. A., Z. J., D. M., Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*, *Flavour Fragr. J.* 24 (2009) 348–354. <https://doi.org/10.1002/ffj.1948>.

Capítulo 3: Cuantificación de triosas por GC-FID: Desarrollo de técnica analítica

3.1 Objetivo del capítulo

El objetivo de este capítulo fue el desarrollo y evaluación de una técnica por GC-FID para el análisis de mezclas de glicerol, gliceraldehído y dihidroxiacetona, la cual implica la derivatización con un agente silanzante en un solo paso.

3.2 Materiales

Gliceraldehído (GA), N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) (MM= 199.25 g/mol, densidad= 1,07 g/mL) y tamices moleculares 4Å (pellets de 1,6 mm de diámetro) fueron comprados a Sigma Aldrich (San Luis, Estados Unidos). Para la mayor parte de este capítulo, se utilizó dihidroxiacetona (DHA) extra pura (pureza \geq 98%) para fines cosméticos, la cual fue adquirida de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). Sin embargo, para la validación del método (Sección 3.6.2) se utilizó DHA de Sigma Aldrich. Glicerol (GLI) se adquirió de Cicarelli (Santa Fe, Argentina). Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

3.3 Métodos

3.3.1 Procesamiento de la muestra

Se estudiaron diferentes métodos para la preparación de las muestras previo al análisis cromatográfico. En el primero de ellos, los estándares puros fueron disueltos en piridina y analizados. Posteriormente, se continuó con metodologías que implicaron la derivatización de los analitos. El Esquema 3.1 da un panorama general de las diferentes rutas de procesamiento que implicaron la derivatización. Con la finalidad de optimizar las condiciones de derivatización se variaron las concentraciones de estándar y de MSTFA, tiempo de reacción, temperatura y tipo de solvente.

3.3.1.1 Estándares disueltos en piridina. Ruta A

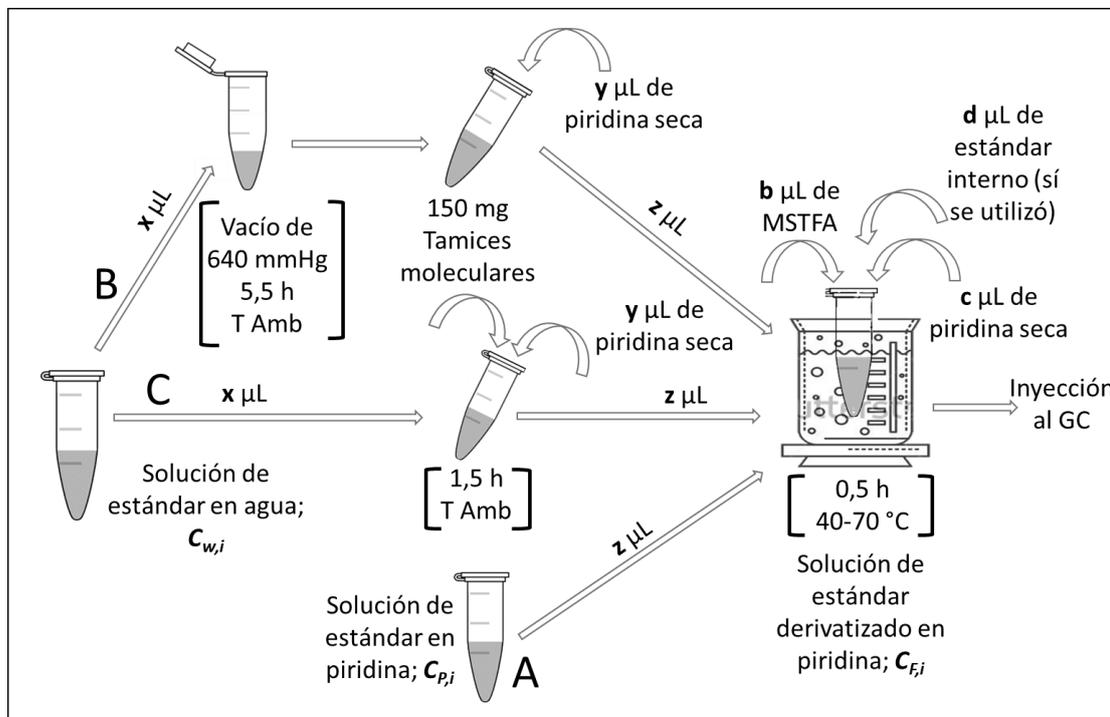
Se prepararon por separado soluciones madre en piridina de GLI, GA, DHA con n-hexanol como estándar interno (IS). Cada estándar se diluyó con piridina en un tubo plástico y se agregaron 3,7 μ L de la solución de n-hexanol (3,18 mM en piridina) y MSTFA. El volumen final fue de 40 μ L en todos los casos. Los tubos se taparon y se mezclaron por medio de un vórtex durante algunos segundos y se colocaron en un baño de agua o de aceite para su incubación a las distintas temperaturas estudiadas. Luego del tiempo de incubación, los tubos se agitaron en vórtex y finalmente, 1 μ L fue inyectado en el cromatógrafo gaseoso.

3.3.1.2 Estándares disueltos en agua. Rutas B y C

Se utilizaron dos procedimientos de secado diferentes: secado al vacío (ruta B) y secado con tamices moleculares (ruta C). Se prepararon por separado soluciones madre de GLI, GA y DHA en agua destilada. Luego, se tomaron muestras de cada tubo y se mezclaron en otro tubo para lograr mezclas de manera tal que la suma de la concentración de los 3 analitos se mantenga dentro de los siguientes rangos: 9,06-9,42 mM para secado al vacío y 2,30-2,78 mM para secado con tamices moleculares. En la ruta B, muestras de las mezclas fueron secadas a presión reducida (vacío de 640 mmHg) en un horno de vacío (Hornos Eléctricos O.R.L., Argentina) conectado a una bomba de vacío (COMECTA, España) a temperatura ambiente durante 5,5 h. Luego, se agregó piridina y los tubos se agitaron con vórtex para la re disolución de los analitos. En otro tubo se colocó una alícuota de esta muestra y se agregaron 25 μ L de MSTFA, se mezclaron con vórtex y se incubaron a 70°C. Para la ruta C, muestras de las mezclas de analitos fueron transferidas a un tubo que contenía 300 μ L o menos de piridina y aproximadamente 150 mg de tamices moleculares. Los tubos se taparon, se agitaron en vórtex por 30 s y se dejaron durante 1,5 h a temperatura

ambiente. Luego, se tomó una alícuota y se colocó en otro tubo plástico con 20 μL de MSTFA, mezclado con vórtex e incubado a 70°C.

En la Tabla 3.1 se listan los valores para cada variable utilizados y se indica en qué figura de este capítulo se muestran los resultados asociados a cada experiencia. La concentración de MSTFA se varió en un amplio rango, con la finalidad primordial de asegurar la completa derivatización de los analitos.



Esquema 3.1. Rutas de procesamiento de las muestras para análisis por GC. Ruta A: a partir de una solución del estándar en piridina. Ruta B: secado al vacío a partir de una solución de estándares en agua. Ruta C: secado con tamices moleculares a partir de una solución de estándares en agua. En un ensayo optimizado típico, las alícuotas añadidas son como sigue: $z = 0\text{-}25 \mu\text{L}$, $b = 10 \mu\text{L}$, $c = 1,5\text{-}26,3 \mu\text{L}$, $d = 3,7 \mu\text{L}$ (Ruta A); $x = 30 \mu\text{L}$, $y = 33,8 \mu\text{L}$, $z = 15 \mu\text{L}$, $b = 25 \mu\text{L}$, $c = 0 \mu\text{L}$, $d = 0 \mu\text{L}$ (Ruta B); $x = 16 \mu\text{L}$, $y = 300 \mu\text{L}$, $z = 7,2\text{-}15,5 \mu\text{L}$, $b = 20 \mu\text{L}$, $c = 0 \mu\text{L}$, $d = 0 \mu\text{L}$ (Ruta C).

3.3.2 Cromatografía gaseosa

3.3.2.1 GC-FID

Se empleó un cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer Clarus 500 equipado con un detector de ionización de llama (FID) y con una columna de sílice fundida (PE Elite-1, 15 m x 0,53 mm DI x 3 μm de espesor de película; Perkin Elmer, Shelton, U.S.A) con una fase estacionaria de 100% dimetil polisiloxano junto con una pre-columna de sílice desactivada de 5 m x 0,53 mm DI. Todas las inyecciones se realizaron on-column. Como gas portador se utilizó nitrógeno a un flujo de 3 mL/min. La adquisición de datos e integración de picos se realizó por medio del software TotalChrom, versión 6.3.1. Los métodos cromatográficos fueron desarrollados tomando como base lo propuesto por Ruppel et al. (2008) [1].

Método cromatográfico para analitos disueltos en piridina: Temperatura del inyector: 250°C. Programa de temperatura del horno: 40°C (1 min), incremento de 15°C/min hasta los 180°C (0 min), incremento a 7°C/min hasta los 230°C e incremento a 10°C/min hasta los 250°C (1 min), tiempo de corrida total de 20,5 min. La temperatura del FID fue de 250°C.

Método cromatográfico para derivados TMS: Programa de temperatura del inyector: 60°C (1 min), incremento de 15°C/min hasta los 230°C (0 min) y luego hasta 250°C a una velocidad de 3°C/min.

Programa de temperatura del horno: 50°C (1 min), incremento de 15°C/min hasta los 210°C (1 min), incremento de 3°C/min hasta los 230°C (0 min), incremento de 15°C/min hasta los 240°C (2 min), tiempo de corrida total 21 min. La temperatura del FID fue de 280°C.

Tabla 3.1. Condiciones de reacción para la derivatización. $C_{F,i}$ denota la concentración en la solución que se inyecta al GC. Ver en Esquema 3.1 el procesamiento de las muestras.

$C_{F,i}$ (mM)	C_{MSTFA} (mM)	$C_{MSTF}/C_{F,i}$ (/)	T (°C)	Tiempo (min)	Solvente	Ruta seguida	Cromatogramas en Figura
0,3-3,5	1329	379-4449	70	25	piridina	A	3.1
32	532	17	70	25	piridina	A	3.2
3,3	88-1329	27-403	70	30	piridina	B	3.3
3,3	124-1329	38-403	70	30	piridina	B	3.4
3,3	178	54	40-70	30-180	piridina	B	3.5
2,0	1329	665	70	25	CH ₃ CN	- A	3.6
2,3-3,5	1329- 3063	329-1072	70	30	piridina	B, C	3.7
3,3-3,6	181	55	70	30	piridina	B	3.8
0,0-3,5	1329	379-26691	70	25	piridina	A	3.10 A, B
0,0-2,5	3321	1200-1450	70	30	piridina	B	3.10 D
0,2-5	2657	470-634	70	30	piridina	C	3.10 E

3.3.2.2 GC-MS

El análisis por GC-MS de DHA y de GA se realizó en un cromatógrafo gaseoso – espectrómetro de masas Shimadzu GC-MS 2010Plus/QP2020. Se utilizó un inyector de tipo Split/Splitless a una temperatura de 270°C (relaciones de Split utilizadas de 100 y 50). El programa de temperaturas del horno fue el siguiente: 60°C (1 min), incremento de 25°C/min hasta los 190°C (0 min) y luego hasta 230°C a una velocidad de 3°C/min (5 min), tiempo total de corrida 24,5 min. Se utilizó una columna de sílice fundida (Mega 5-ms, 30 m x 0,25 mm DI x 0,25 µm de espesor de película; Mega, Legnano, Italia) con una fase estacionaria entrecruzada de 5% fenil, 95% de metil polisiloxano. Se utilizó helio a un flujo de 1 mL/min y velocidad lineal constante como gas portador. El espectrómetro de masas operó en el modo de impacto electrónico (EI) a 70 eV y contó con un analizador de cuadrupolo simple. La temperatura de la fuente de iones fue de 200°C y la de la interfase de 280°C. La adquisición de datos y la integración de picos se llevó a cabo utilizando el software GC-MS Solution, versión 4.2. Los patrones de fragmentación fueron comparados con las librerías NIST107 y NIST21.

3.3.3 Calibración en GC y validación

Para la ruta A, se prepararon curvas de calibración por separado para cada estándar. Una muestra con IS pero sin analitos fue derivatizada y analizada como blanco. Para las rutas B y C no se utilizó IS (debido a que el agregado de IS no mejoró significativamente el análisis en la ruta A, ver Sección 3.4.6.1) y las curvas de calibración fueron realizadas a partir de mezclas de los tres estándares. Las concentraciones de las curvas de calibración se refieren en todos los casos a la concentración de la solución final inyectada al GC; $C_{F,i}$ siendo i el analito de interés. Sin embargo, las muestras siempre fueron sometidas a dilución debido a su procesamiento. El método cromatográfico para la ruta C, incluyendo el procesamiento de la muestra, fue validado. Para esto, se preparó una solución acuosa de los tres analitos y, por triplicado, alícuotas de esta solución se sometieron al procesamiento y cuantificación por GC y por medio de una técnica por HPLC bien establecida. Las concentraciones medias para cada analito se obtuvieron a partir de curvas de calibración y la desviación estándar (S) fue calculada a partir de la siguiente fórmula [2]:

$$S = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{k} + \frac{1}{n} + \frac{(A_0 - \bar{A})^2}{b^2 \sum_j (CF_j - \bar{CF})^2}} \quad (3.5)$$

donde A_0 es el valor del área a partir del cual se determina $C_{F,i}$, b es la pendiente de la curva de calibración, n es el número de puntos experimentales utilizados para construir dicha curva, \bar{A} es la media de todos los valores de áreas en la curva de calibración, CF_j son los valores de concentración usados en la curva de calibración, \bar{CF} es la media de los CF_j y k es el número de réplicas de las mediciones. $S_{y/x}$ es un estadístico que estima los errores aleatorios en las áreas de los picos y está dado por:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (A_i - \hat{A}_i)^2}{n-2}} \quad (3.6)$$

donde A_i denotan los valores experimentales de las áreas de la curva de calibración y \hat{A}_i son los puntos en la curva de calibración correspondientes a las concentraciones individuales, esto es, los valores de áreas ajustados por la recta de regresión.

Las concentraciones en las muestras originales fueron luego computadas con la siguiente fórmula, que toma en consideración la dilución de la muestra durante las etapas del procesamiento:

$$C_{w,i} = \frac{(y+x)}{x} \left(\frac{b+c+d+z}{z} \right) C_{F,i} \quad (3.7)$$

donde el significado de las variables b , c , d , x , y , z es el mismo que el descrito en el Esquema 3.1. $C_{F,i}$ y $C_{w,i}$ son las concentraciones del analito i obtenidas a través de la curva de calibración y en la muestra problema, respectivamente. El coeficiente de variación (CV) se calculó con la siguiente fórmula:

$$CV (\%) = \frac{\overline{C_{F,i}}}{S} \times 100 \quad (3.8)$$

donde $\overline{C_{F,i}}$ es la media de las concentraciones obtenidas a través de las curvas de calibración y S está dado por la ecuación 3.5. El cálculo de los límites de detección (LOD) y los límites de cuantificación (LOQ) se realizaron a través de una estimación dependiente del diseño de calibración [3]. Los resultados fueron multiplicados por los factores de dilución mínimos para cada método (39,5 para la ruta C y 3,0 para la ruta B; para la ruta A los factores de dilución fueron dependientes de cada analito particular y los mínimos fueron 1,6, 3,1 y 1,8 para GA, GLI y DHA, respectivamente). Para el test T de Student, se utilizó un nivel de significancia $p < 0,10$, En el cálculo de los valores predichos reportados en la Tabla 3.4, tanto los valores de concentración como de desviación estándar obtenidos por GC, fueron multiplicados por el factor de dilución.

3.3.4 Mediciones por HPLC

Se utilizó un instrumento HPLC-Jasco PU-480 equipado con un detector de índice de refracción (RI) y un detector UV conectados en serie. Las condiciones del método para el análisis se basaron en las reportadas por Beltrán-Pietro et al. (2013) [4].

Para la identificación de ácidos, aldehídos y alcoholes se empleó una columna Aminex HPX-87H Boirad (300 x 7,8 mm, en forma hidrogenada, 9 μm de tamaño de partícula, 8% de entrecruzamiento, rango de pH entre 1 y 3), Como eluyente se utilizó una solución acuosa de H_2SO_4 (Cicarelli, 95- 98%- Pro Análisis A.C.S) a una concentración 5 mM y un flujo de 0,6 mL/min, La temperatura de la columna fue de 50°C. Previo a la inyección, las muestras fueron diluidas en un factor 1:10 con la fase móvil. Luego, las muestras fueron filtradas con una membrana de nitrocelulosa porosa de 0,22 μm ,

En primera instancia, se evaluaron diferentes fases móviles y temperaturas (sin exceder el límite de temperatura de la columna) utilizando el detector RI. Sin embargo, no se pudo lograr la separación de GLI

y de DHA. Debido a esto se debió utilizar el detector UV en serie con el detector RI. Se tomó el espectro de absorción de DHA entre los 190 y 850 nm, encontrándose la mayor absorción de DHA a 210 nm, mientras que GLI no presenta una señal significativa a esta longitud de onda. De esta manera, ambos compuestos pueden ser identificados y cuantificados.

Las curvas de calibración de GLI, DHA y GA fueron realizadas utilizando soluciones de concentraciones conocidas de los estándares puros, en el rango de concentraciones de 0,01 hasta 0,1 M, Luego, se relacionaron las concentraciones de los analitos a las áreas de los picos, obteniéndose los factores de corrección (Fr) para ambos detectores (Tabla 3.2)

Tabla 3.2. FR obtenidos de las curvas de calibración correspondientes

Compuesto	FR _{RI}	FR _{UV (210 nm)}
GLI	4,873E+08	-
DHA	4,079E+08	3,027E+08
GA	5,861+08	-

Para el cálculo de las concentraciones de GLI, DHA y GA, se prepararon soluciones de concentraciones conocidas, las cuales fueron diluidas con H₂SO₄ 5 mM (Factor de dilución 1:10) y medidas por triplicado. Se utilizó el siguiente procedimiento de cálculo: con la señal de DHA obtenida con el detector UV ($A_{210\text{ DHA}}$) se calculó la concentración correspondiente ($C_{UV\text{ DHA}}$) por medio de la ecuación:

$$C_{UV\text{ DHA}} = (A_{210\text{ DHA}}/Fr_{210\text{ DHA}}) \times F_d \quad (3.1)$$

Donde $Fr_{210\text{ DHA}}$: Factor de respuesta de DHA con el detector UV y F_d : Factor de dilución.

Luego, el área equivalente a esta concentración fue calculada para el detector RI ($A_{RI\text{ DHA}}$), la cual fue sustraída del área total ($A_{RI\text{ TOTAL}}$) correspondiente a la señal GLI + DHA obtenida con el detector RI (Ec. 3.2)

$$A_{RI\text{ DHA}} = (C_{UV\text{ DHA}}/Fr_{RI\text{ DHA}}) \quad (3.2)$$

$Fr_{RI\text{ DHA}}$: es el factor de respuesta de DHA con el detector RI

De este modo, la concentración de GLI ($C_{RI\text{ GLI}}$) se calcula según:

$$C_{RI\text{ GLI}} = (A_{RI\text{ TOTAL}} - A_{RI\text{ DHA}}) \times Fr_{GLI} \times F_d \quad (3.3)$$

Fr_{GLI} : factor de respuesta de glicerol (detector RI)

Aplicando estas ecuaciones se obtienen las concentraciones molares de DHA y de GLI de la muestra. La concentración de GA fue obtenida directamente de la señal en el detector RI según:

$$C_{RI\text{ GA}} = (A_{RI\text{ GA}}/Fr_{RI\text{ GA}}) \times F_d \quad (3.4)$$

Donde $A_{RI\text{ GA}}$: valor de la señal obtenida para GA con el detector RI y $Fr_{RI\text{ GA}}$: factor de respuesta de GA (detector RI)

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Respuesta cromatográfica de analitos puros y sus derivados TMS

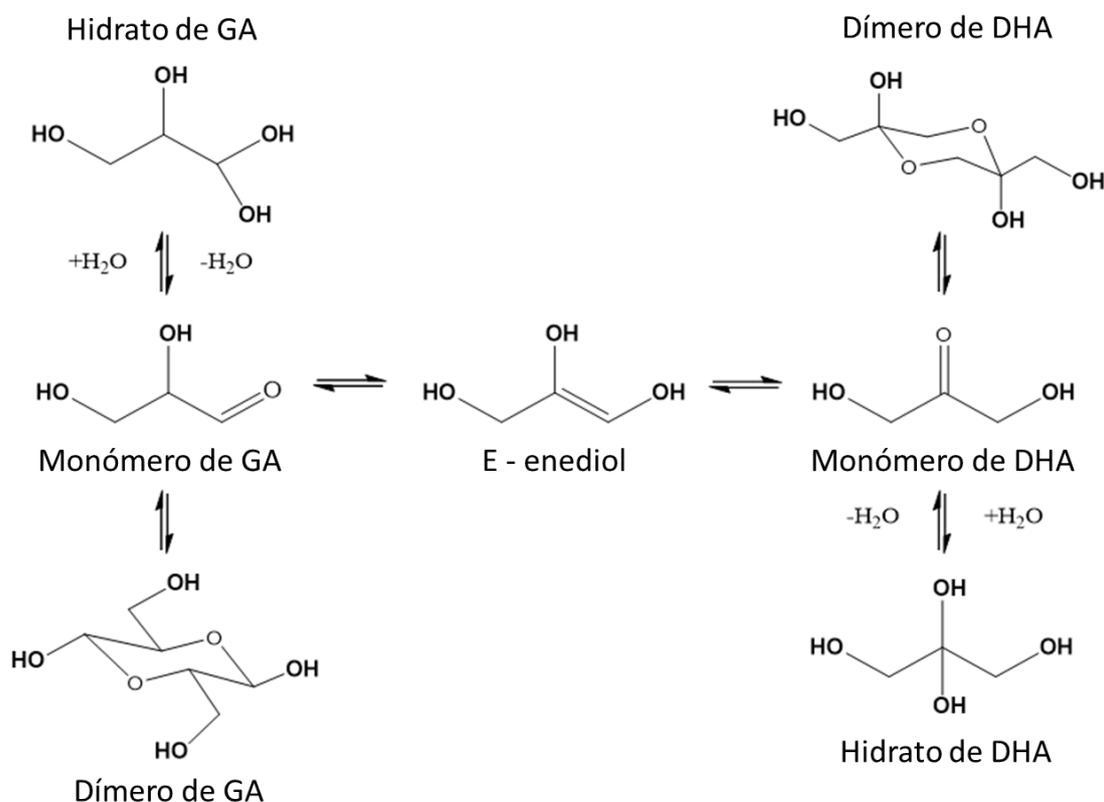
Los cromatogramas de soluciones estándar de GLI, DHA y GA se muestran en la Figura 3.1 (arriba). Los tiempos de retención se encontraron entre los 5 y los 8 min para todos los analitos. El pico saturado a los 4 min corresponde al solvente piridina. Los picos fueron bastante anchos para GLI, DHA y GA. Esto es

consecuencia de la elevada polaridad de estos compuestos, la cual es responsable de su tendencia a ser adsorbidos en la fase estacionaria de la columna, produciendo picos con colas. Adicionalmente, la respuesta del FID fue muy baja en el caso de GA. Por lo tanto, los analitos fueron derivatizados con la finalidad de mejorar su comportamiento cromatográfico. En la Figura 3.1 (abajo) se muestran cromatogramas de GLI, DHA y GA derivatizados. Los picos a 4,9 y 5,9 min corresponden a MSTFA residual y al derivado TMS de n-hexanol, respectivamente. Como se esperaba, la sensibilidad del FID y la resolución de picos fue enormemente mejorada para las muestras derivatizadas. Un pico fino a los 8,7 min eluyó para el aducto de la reacción entre GLI y MSTFA. Un claro pico fue también reportado para una muestra de GLI derivatizada con MSTFA a temperatura ambiente [1]. La señal registrada a 8,7 min corresponde con certeza al glicerol derivatizado en sus tres hidrógenos activos.

Sin embargo, para los aductos formados a partir del tratamiento de GA y de DHA con MSTFA, los picos más importantes tienen tiempos de retención mayores. Aparecieron tres picos mayoritarios para el aducto DHA/MSTFA, con tiempos de retención de 13,5 min, 8,1 min y 13,0 min, en orden de altura decreciente. Por su parte, el aducto de la reacción GA/MSTFA también presentó picos a 13,0 min y 13,5 min y adicionalmente, dos pequeños picos a 7,4 min y 10,8 min. Las moléculas de GA y DHA poseen dos grupos hidroxilo disponibles para la reacción con MSTFA. De este modo, los pesos moleculares de estos derivados son menores que el correspondiente al derivado GLI TMS. Por lo tanto, los picos a 8,1 min y 7,4 min fueron atribuidos respectivamente a los derivados de DHA y de GA en los cromatogramas de la Figura 3.1. Por otro lado, ambas moléculas tienden a dimerizar a través de la formación de enlaces hemiacetálicos y hemicetálicos en los cuales se ven involucrados sus grupos carbonilo e hidroxilos. De hecho, ambas especies cristalizan principalmente como dímeros, siendo la extensión de la disociación a monómeros en solución dependiente del solvente y de la temperatura [5,6]. Varios estudios concuerdan en que DHA dimérico se corresponde con la estructura 2,5-dihidroximetil-2,5-dihidroxi-1,4-dioxano mientras que GA dimérico con la estructura 3,6-dihidroximetil-2,5-dihidroxi-1,4-dioxano [5–7] (ver Esquema 3.2). Ambas estructuras poseen cuatro grupos hidroxilo capaces de ser derivatizadas por trimetilsililación. En un estudio de la década del 60 [7], la determinación de derivados de dímeros de GA y de DHA trimetilsililados dio un componente mayoritario en cada caso y, dependiendo del procesamiento de la muestra, varias señales fueron observadas y asignadas a mezclas de derivados de los dímeros. De acuerdo a esto, los picos a 13,5 min y 13,0 min fueron interpretados como los derivados TMS de los dímeros. Sin embargo, asignar los picos a dímeros de GA o dímeros de DHA no es posible ya que ambos picos aparecen en el aducto de GA/MSTFA como así también en el de DHA/MSTFA. Ambos dímeros son isómeros y se sospecha que sus derivados TMS tienen tiempos de retención muy similares o incluso iguales.

Existen varios factores capaces de provocar la aparición de múltiples picos para los dímeros. Una de las dificultades de la derivatización de carbohidratos es el elevado número de grupos hidroxilo que posee. A menudo se debe considerar el impedimento estérico que dificulta la derivatización de grupos hidroxilo de átomos de carbono adyacentes [8]. De este modo, la derivatización incompleta de los dímeros puede llevar a la aparición de múltiples picos. Basados en evidencia generada por espectroscopia FITR, Yaylayan et al. (1999) [9] postularon un esquema de las transformaciones moleculares que se dan entre DHA y DL-GA (mezcla de enantiómeros D y L de GA) en solución acuosa y en trimetilamina. Esto incluye no solo la disociación de los dímeros para formar monómeros, sino también las reacciones de hidratación e interconversión entre DHA y GA. De este modo, luego de que se produce la disociación de los dímeros en trimetilamina, postularon que los monómeros de DHA y de GA se interconvierten a través de un intermediario E-enediol. La piridina es un solvente básico con propiedades químicas similares a las aminas terciarias. Tanto el pico a 13,0 min en el cromatograma de DHA de la Figura 3.1 como el pico a 13,5 min en el cromatograma de GA pueden estar relacionados a las estructuras diméricas generadas a través del

proceso de disociación seguido de interconversión y redimerización, Sin embargo, no se observó evidencia cromatográfica de la presencia del pico del intermediario E-enediol.



Esquema 3.2. Estructuras de los dímeros de GA (izquierda) y DHA (derecha).

Debido a la estabilidad del enlace hemiacetálico respecto al enlace hemicetálico, la disociación de los dímeros de DHA es mucho mayor que la de los dímeros de GA bajo condiciones similares [9]. Asumir esto ayuda a explicar la mayor intensidad relativa del pico de DHA/MSTFA a 8,1 min respecto al pico de GA/MSTFA a 7,4 min en la Figura 3.1. Así, la extensión de la disociación de los dímeros fue muy baja bajo las condiciones de reacción (en piridina a 70°C). Gardiner et al. (1966) [7] no pudieron identificar ninguna señal atribuible al monómero de GA en piridina.

Por otro lado, en todos estos cromatogramas aparecieron picos a 15,7 y a 17,7 min que probablemente estén relacionados al agente derivatizante debido a que también aparecen en muestras de control de MSTFA en piridina en ausencia de analitos. Es más, estos picos tienden a disminuir con el envejecimiento de las muestras.

La respuesta de FID resultó ser aproximadamente diez veces mayor para GLI-TMS en comparación a los derivatizados de GA y de DHA. Los picos de los monómeros de GA y de DHA son los únicos que se pueden utilizar para la su cuantificación. Las fuertes señales a 13,0 y 13,5 min no pueden ser utilizadas ya que ambas aparecen para ambos aductos.

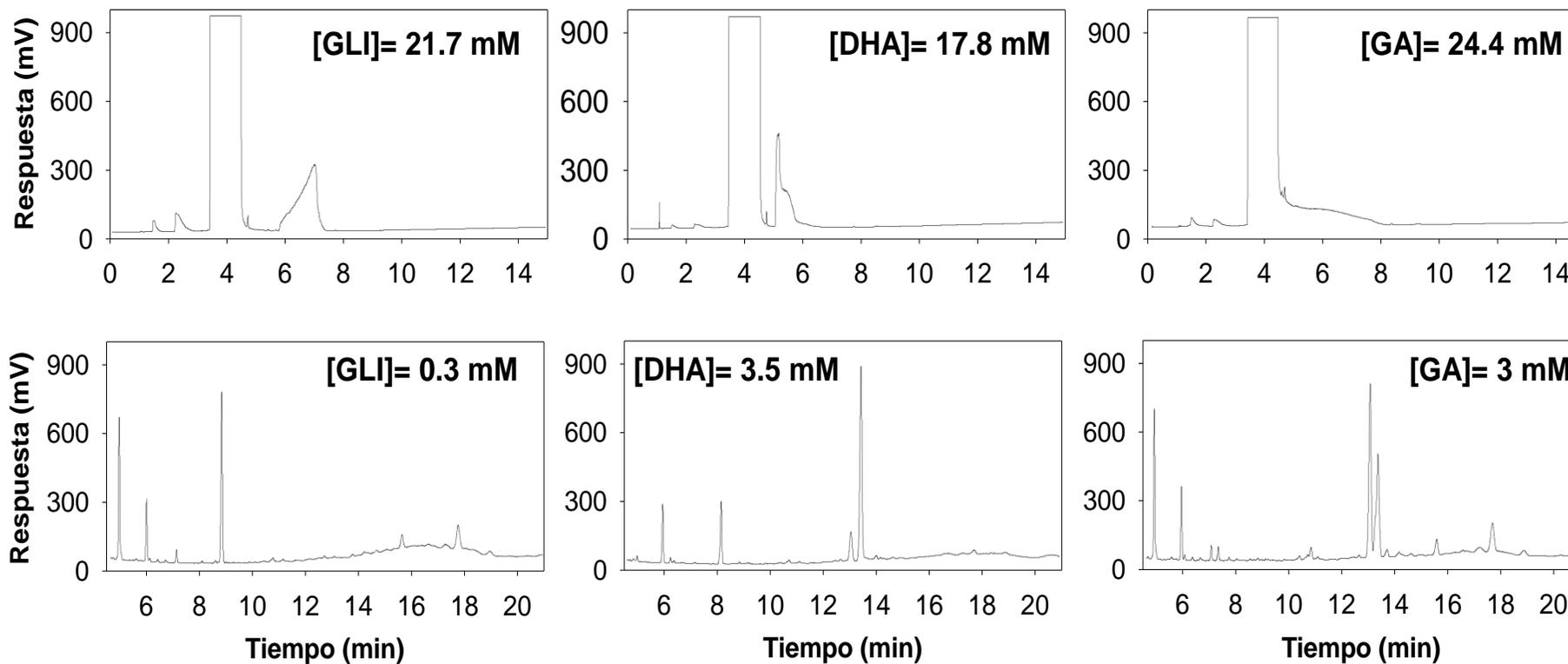


Figura 3.1 Cromatogramas de los estándares puros (arriba) y sus derivados TMS (abajo). Solvente: piridina. Para la derivatización: [MSTFA]= 1329 mM; T= 70°C; Tiempo= 25 min (ver también Tabla 3.1).

3.4.2 Estudio de la reacción de derivatización

3.4.2.1 Selección de las concentraciones de estándar

En pruebas preliminares, los estándares fueron disueltos y derivatizados en piridina por 25 min a temperatura ambiente utilizando una concentración de MSTFA de 2126 mM. Las concentraciones de DHA, GLI y GA fueron 40,63, 16,34 y 14,65 mM, respectivamente. Contrariamente a lo encontrado en bibliografía [1], no se observaron los picos de los productos de la derivatización en estas experiencias. Después de esto, la temperatura para la reacción se elevó a 70°C, la concentración de MSTFA se redujo a 1063 mM y la concentración de estándares se incrementaron a 119, 116 y 38,5 mM para DHA, GLI y GA, respectivamente. El resultado de estas modificaciones fue la aparición de varios picos en los cromatogramas, la mayoría de ellos en condiciones de saturación. Por lo tanto, el incremento de la temperatura tuvo un efecto positivo en la reacción de derivatización. Luego, la concentración de los estándares fue reducida a 32 mM. La Figura 3.2 muestra cromatogramas tipo para GLI y GA, en los cuales aparecieron múltiples picos para ambas sustancias. Comparando los cromatogramas de las Figuras 3.1 y 3.2 se puede concluir que la posterior disminución de la concentración de los analitos condujo a cromatogramas más limpios (ver las condiciones de reacción en la Tabla 3.1). De esta manera, la derivatización no fue completa bajo las condiciones de la Figura 3.2. Para GLI, además del típico pico a 8,7 min también aparecieron dos picos extra alrededor de los 8 min los cuales pueden corresponder a las estructuras de GLI TMS en uno y dos grupos hidroxilo. Para GA, además del pico a 7,4 min (también ver Figura 3.1), varios picos aparecieron entre los 11,5 y los 14 min. Estos probablemente corresponden a estructuras diméricas con diferente grado de derivatización, debido a que una reducción de la concentración de GA produjo una drástica reducción del número de picos en esta zona.

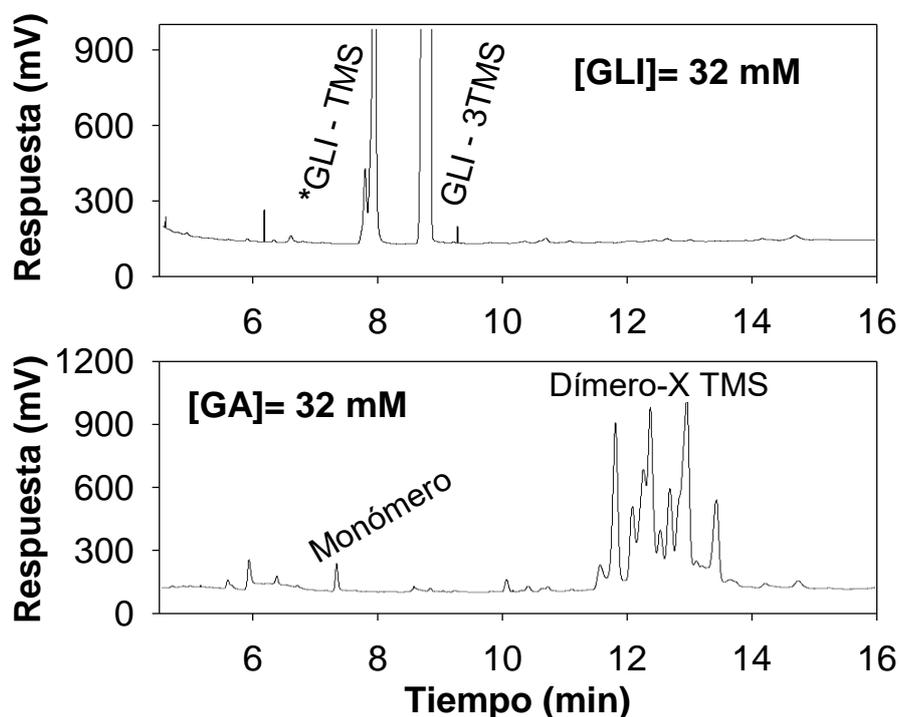


Figura 3.2. Cromatogramas que muestran productos con diferente grado de derivatización para GLI (arriba) y GA (abajo) en piridina debido a la elevada concentración de los analitos. (*) denota que los picos son productos de derivatización incompleta. (X) se refiere a diferentes números del grupo MSTFA por molécula de dímero de GA. Condiciones de derivatización: [MSTFA]= 532 mM; T= 70°C; Tiempo= 25 min (ver también Tabla 3.1).

Los picos de estructuras incompletamente derivatizadas, como en la Figura 3.2, podrían aparecer en muestras reales con concentraciones desconocidas de los analitos. Esto es indicativo de condiciones de derivatización insuficientes más que de diferentes productos. Como resultado de este análisis, las concentraciones de GLI, GA y DHA para pruebas posteriores, fueron fijadas por debajo de 0,5, 4,0 y 3,5 mM, respectivamente.

3.4.2.2 Selección de la concentración de derivatizante MSTFA

Dado que la combustión de los reactivos silanizantes puede generar la formación de depósitos de SiO_2 , los cuales afectan negativamente el desempeño del GC-FID y especialmente del GC-MS [10], el efecto de la disminución de la concentración de MSTFA fue evaluado. En la Figura 3.3 se muestran los resultados obtenidos de las áreas de DHA-TMS y MSTFA residual en función de la concentración de MSTFA. El área de DHA fue muy pequeña cuando la concentración de MSTFA fue de 88 mM, pero a mayores concentraciones, las áreas de DHA fueron mucho mayores y muy similares entre sí. Adicionalmente, la intensidad del pico del derivatizante disminuyó enormemente a bajas concentraciones de MSTFA. Esta variación también fue probada con GA y el resultado se muestra en la Figura 3.4. A baja concentración de MSTFA, el pico a 7,4 min se puede ver con claridad. A elevada concentración de MSTFA, en cambio, la intensidad del pico a 7,4 min disminuyó y los picos entre 12,5 y 14 min ganaron mayor relevancia. Estas experiencias sugieren que se requieren elevadas concentraciones de MSTFA para producir la derivatización de las estructuras diméricas de GA. Además, pareciera que la concentración de MSTFA utilizada afecta la extensión de la disociación de los dímeros. Cuando la concentración de MSTFA se mantiene baja, la formación de los derivados TMS de las estructuras diméricas no se ve favorecida, produciéndose de este modo una mayor disociación para formar monómeros que luego se derivatizan. De este modo, la concentración de MSTFA se mantuvo baja (178 mM) para el análisis por GC-MS con la finalidad de proteger el instrumento. Sin embargo, se utilizaron concentraciones elevadas de MSTFA (≥ 1328 mM) para los posteriores análisis por GC-FID.

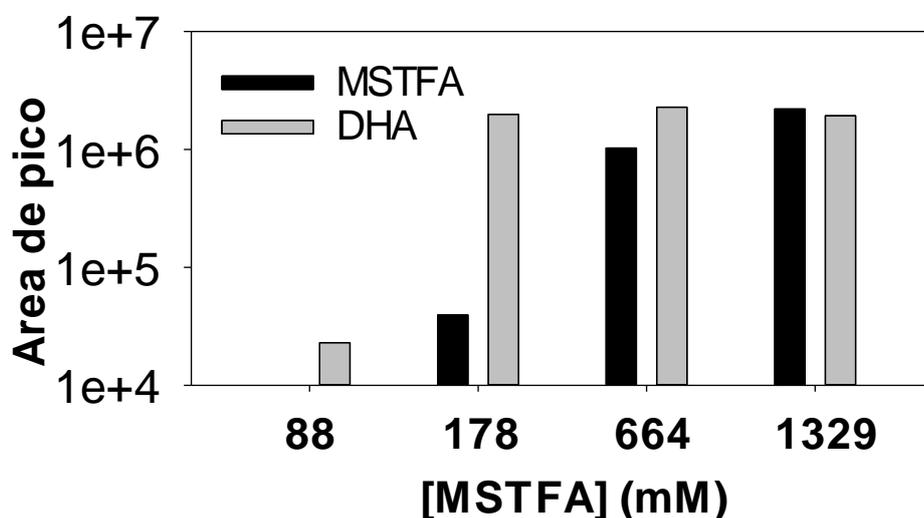


Figura 3.3. Áreas de picos de MSTFA residual (barras negras) y DHA (barras grises) vs [MSTFA]. Condiciones de derivatización: [DHA]= 3,3 mM; T=70°C; Tiempo= 30 min; Solvente: piridina (ver también Tabla 3.1).

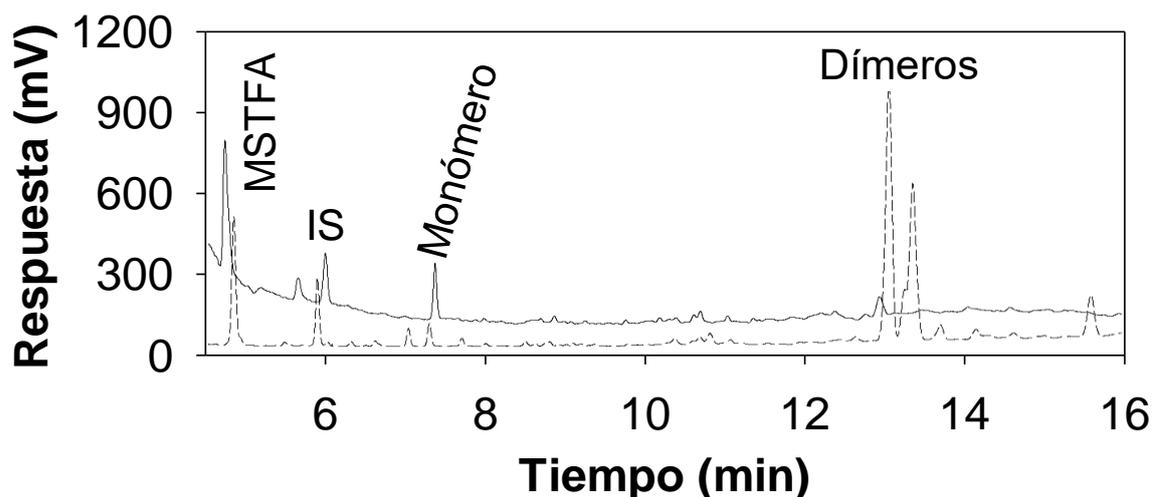


Figura 3.4. Gliceraldehído 3,33 mM derivatizado con MSTFA en concentraciones 194 mM (línea continua) y 1329 mM (guionada). Condiciones de derivatización: T= 70°C; Tiempo= 30 min (ver también Tabla 3.1).

3.4.2.3 Selección de tiempo y temperatura

Luego, se llevaron a cabo experimentos a 40°C y 70°C. Se tomaron muestras del medio de derivatización a los 30, 60 y 90 min y fueron analizadas. Los resultados se muestran en la Figura 3.5. Las áreas de los picos de DHA (8,1 min) fueron de dos órdenes de magnitud mayores a 70°C comparadas con las obtenidas a 40°C, indicando que la reacción de derivatización es más efectiva a mayor temperatura. Por otro lado, prolongar el tiempo de tratamiento por más de 30 min no produjo incremento en las áreas del pico de DHA-TMS, lo cual implica que la reacción llegó a su fin en este tiempo para ambas temperaturas ensayadas. Debido a lo expuesto, las condiciones de reacción seleccionadas fueron las siguientes: temperatura de 70°C y 30 min de tiempo de reacción.

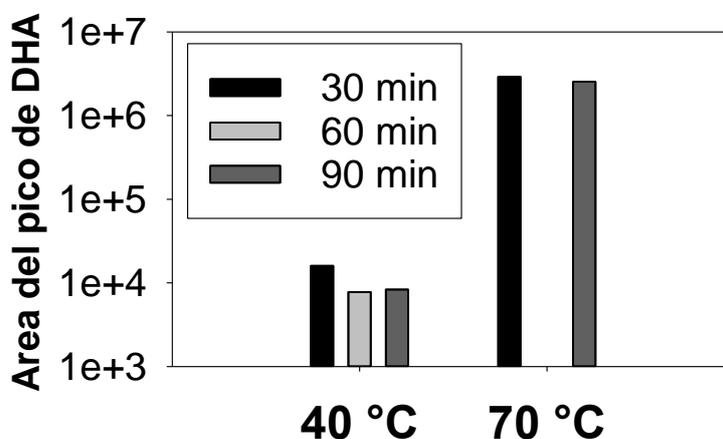


Figura 3.5. Áreas del pico de DHA-TMS a diferentes tiempos luego del tratamiento a 40°C y 70°C. Condiciones de derivatización: [DHA]= 3,3 mM; [MSTFA]=178 mM; Solvente: piridina (ver también Tabla 3.1).

3.4.2.4 Explorando diferentes solventes para la derivatización

Finalmente, la reacción de derivatización de DHA fue testeada en diferentes solventes con la finalidad de verificar si el tipo de solvente afecta a la reacción de derivatización y a los productos obtenidos. Se probaron dimetilsulfóxido (DMSO) y acetonitrilo como solventes. En DMSO no se observó evidencia de derivatización. Por otro lado, en acetonitrilo se detectó la derivatización de DHA y el cromatograma se muestra en la Figura 3.6. El orden de los picos mayoritarios a 13,5 y 8,1 min se modificó notablemente con respecto a la derivatización en piridina y el pico a 13 min se mantuvo prácticamente inalterado. Parece ser que la extensión de la disociación de los dímeros de DHA fue mayor en acetonitrilo que en piridina.

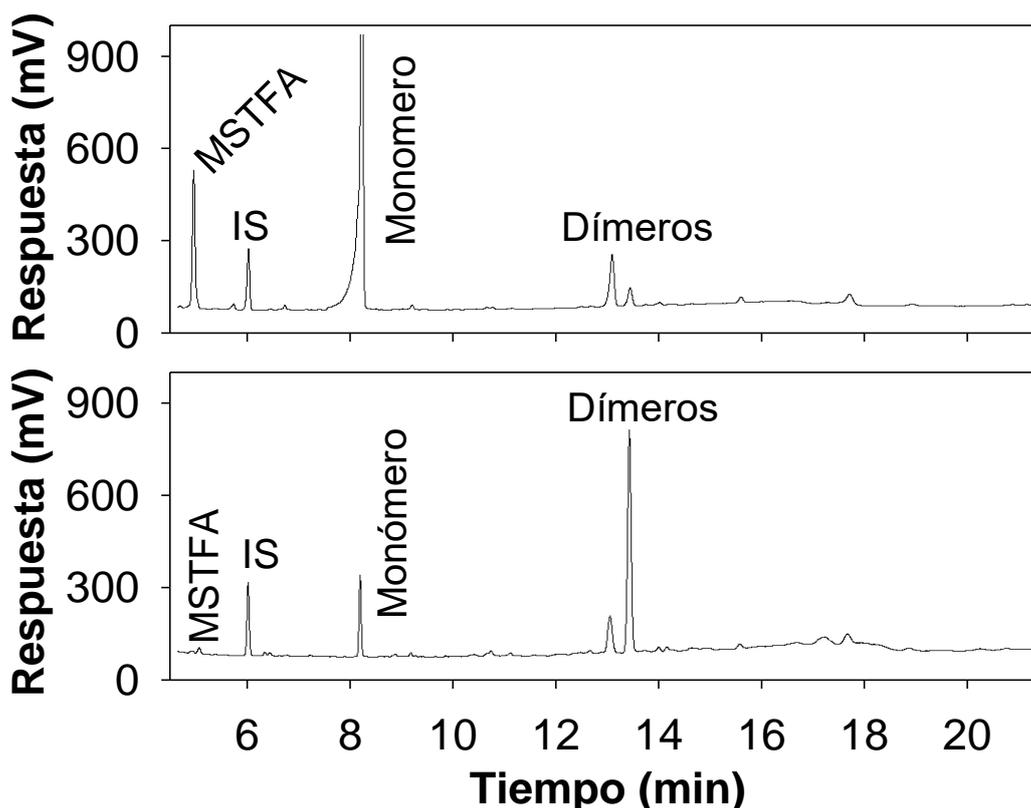


Figura 3.6. Arriba: DHA 2,0 mM derivatizado en acetonitrilo, Abajo: DHA 2,5 mM derivatizado en piridina. En ambas experiencias $T = 70^{\circ}\text{C}$ y $[\text{MSTFA}] = 1329 \text{ mM}$ (ver también Tabla 3.1).

3.4.3 Selección de un estándar interno

Los estándares internos (IS) se agregan en diferentes etapas de los métodos cromatográficos para contrarrestar los efectos producidos por errores aleatorios en la cuantificación [11]. En este trabajo se testaron isopropanol, n-butanol, n-hexanol y n-decanol como IS genéricos en la reacción de derivatización ya que poseen un grupo hidroxilo capaz de reaccionar con MSTFA. La principal suposición fue que el IS fue completamente derivatizado bajo las condiciones ensayadas dado que son alcoholes primarios y la velocidad de sililación es la más alta para los alcoholes de este tipo [12,13]. El isopropanol y el n-butanol aparecieron enmascarados por el solvente, por su parte, n-hexanol y n-decanol dieron tiempos de retención de 5,9 y 9,6 min, respectivamente. N-hexanol fue elegido finalmente porque se consideró que no interferiría con la cuantificación de otros posibles productos de la oxidación de glicerol (aparte de GA y de DHA). Una concentración de IS de 0,33 mM fue la elegida para los experimentos posteriores,

3.4.4 Influencia del pretratamiento en el análisis de los derivados TMS

La Figura 3.7 muestra cromatogramas de estándares de GA y de DHA, los cuales fueron sometidos a las diferentes rutas (A, B y C) de procesamiento de las muestras. Ambos procesos de secado (rutas B y C) fueron efectivos en remover el agua ya que se detectó MSTFA residual (pico a 4,9 min). Los reactivos silanzantes reaccionan fácilmente con agua, dando subproductos no reactivos, disminuyendo de este modo la velocidad de reacción y posiblemente la extensión de la derivatización [14]. Por lo tanto, la presencia de MSTFA residual en los cromatogramas se consideró como indicativo de que el proceso de secado fue efectivo.

La disolución del polvo sólido de GA y de DHA en agua y posterior secado, previo a la derivatización en piridina parece tener un impacto significativo en la distribución de especies. Los cromatogramas se volvieron más complejos comparados con los de la Figura 3.7 A y D. Los picos correspondientes a los dímeros estuvieron ausentes en el caso de DHA y disminuyeron en el caso de GA, lo cual indica en ambos casos mayor grado de disociación de los dímeros. Algunos estudios sugieren que la disociación de los dímeros de DHA luego de la disolución se da más rápidamente y en mayor extensión en medio acuoso que en DMSO [5]. Davis (1973) [15] midió la cinética de la disociación de dímeros de DHA en agua y reportó una vida media de 20,4 min, mientras que el mismo autor señaló que la disociación de dímeros de DHA en DMSO ocurrió en un 50% luego de 64 h, Por lo tanto, el agua provoca la completa disociación de los dímeros de DHA en el polvo sólido. La re dimerización de DHA durante el secado y/o durante el contacto con piridina no se observó bajo las condiciones de preparación de las muestras. La disociación de los dímeros es favorable para la cuantificación.

Como resultado de la mayor disociación, se incrementó la intensidad del pico de DHA a 8,1 min y, curiosamente, otro pico a 9,1 min también adquirió relevancia. Sin embargo, en el caso de GA, no se produjo aumento en la intensidad del pico del monómero a 7,4 min, pero aparecieron otros picos a 10,4 y 10,8 min. De acuerdo al peso molecular esperado, estos nuevos picos podrían corresponderse a especies derivatizadas de los hidratos de GA (ver Esquema 3.2) [9]. Dichos hidratos poseen cuatro grupos hidroxilo capaces de ser derivatizados, con lo cual se generarían moléculas con tiempos de retención mayores a los de las estructuras monoméricas, pero menores que la de los dímeros. Esta hipótesis se sustenta por la observación de que estos picos fueron mucho menores o estuvieron ausentes cuando los analitos fueron disueltos en piridina. Por otro lado, el pico a 8,7 min corresponde al derivado GLI-TMS, el cual permaneció estable sin importar el modo de procesamiento de la muestra (no mostrado).

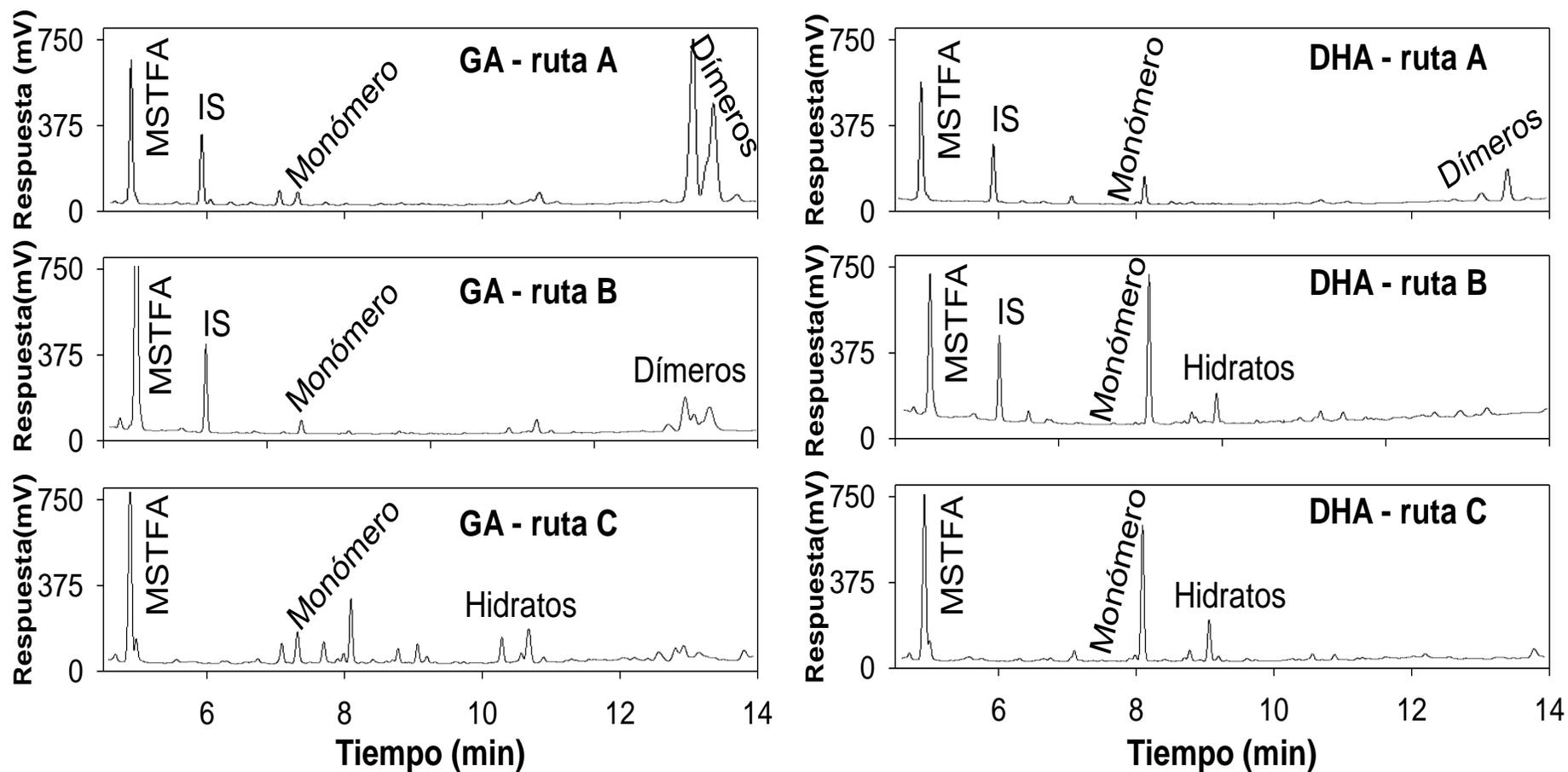


Figura 3.7. Cromatogramas de los estándares de GA y de DHA en piridina y siguiendo dos procedimientos diferentes de pretratamiento de las muestras antes de la derivatización en piridina. Condiciones de derivatización: T= 70°C; Tiempo= 30 min (ver también Tabla 3.1)

3.4.5 Identificación de derivados TMS por GC-MS

Los cromatogramas obtenidos para DHA y GA por GC-MS se muestran en la Figura 3.8. En el caso de DHA, dos picos mayoritarios aparecieron con tiempos de retención de 4,6 y 5,8 min mientras que, para GA, un pico mayoritario fue identificado a 5,2 min. Los espectros de masas de estos picos fueron analizados meticulosamente y se muestran en la Figura 3.9 junto con una posible estructura relacionada a cada uno de ellos. Los demás picos no brindaron información relevante, basado en el análisis de sus espectros de masas. En casi todos los espectros de éteres y ésteres trimetilsililados, el ion con $m/z=73$ $[(CH_3)_3Si]^+$ es el más abundante. Otros iones característicos de este tipo de compuestos incluyen los de $m/z=75$ $[(CH_3)_2Si=OH]^+$, y $m/z=147$ $[(CH_3)_2Si=O-Si(CH_3)_3]^+$ [14]. Todas estas señales aparecieron en los espectros de masa que aquí se presentan, indicando la presencia de derivados TMS de distintas especies. De hecho, los patrones de fragmentación para los distintos picos fueron muy similares en ambos cromatogramas dado que los analitos son isómeros, lo cual provoca que la identificación de los productos TMS de los analitos sea complicada. Este comportamiento se observa en MS para isómeros que son muy similares y a menudo los tiempos de retención se vuelven muy importantes para lograr su identificación efectiva [8].

3.4.5.1 Derivado TMS de DHA

Los fragmentos mayoritarios del espectro de masas del pico a 5,8 min son: $m/z: 73$ (100%), 103 (52%), 189 (15%) y 45 (9,2%), El espectro de masas obtenido por impacto electrónico (EI) del derivatizado DHA-2 TMS fue encontrado en la literatura [16]. Los patrones de fragmentación y las abundancias relativas de los picos mayoritarios reportados son muy similares a los aquí presentados. Adicionalmente, la presencia del ion molecular ($m/z=234$) y del fragmento $m/z=219$ (el cual es el resultado de la pérdida de un grupo CH_3 del ion molecular) constituye fuerte evidencia de que este pico en el cromatograma corresponde a DHA-2 TMS. Por otro lado, los iones característicos para los trimetilsilil ésteres – $m/z=73$ (100 %), 75 (55 %) y 147 (5 %) – están presentes en el espectro de masas del pico a 4,6 min. Este pico podría corresponder a DHA incompletamente derivatizado dado que presenta el fragmento de $m/z=89$. Dos posibles estructuras son posibles con dicha relación m/z : $[(HO)CH_2-CO-CH_2-O]^+$ y $[OSi(CH_3)_3]^+$ y ambos fragmentos se pueden relacionar con la mencionada estructura.

3.4.5.2 Derivado TMS de GA

En el espectro de masas del pico a 5,2 min en el cromatograma de GA los fragmentos mayoritarios y sus abundancias relativas son: 73 (100%), 45 (15,8%), 103 (13%) y 75 (8,8%). Además, los siguientes fragmentos también se encuentran presentes: 59 (7,4%) y 61 (1,43 %). En esta corrida, se empleó una baja concentración de MSTFA debido a que previamente se detectó un pico a 7,4 min, el cual se hipotetizó que se debe al derivado GA-2TMS (ver Figura 3.4). Sin embargo, el ion molecular de GA-2TMS ($m/z=234$) no se observó y el espectro de masas para este compuesto no se encontró en librerías. A pesar de esto, se encontró el espectro de masas de un derivado de GA relacionado pero obtenido a partir de un proceso de derivatización en dos etapas, denominado 2,3-bis[(trimetilsilil)oxy]-, O-metiloxima (S) [17]. Comparando ambos espectros, se puede apreciar que hay coincidencia en los fragmentos m/z 73 (100%) y 103 (13%, el valor reportado aquí, contra 20% en librerías). Por otro lado, los fragmentos $HO-\dot{C}H-CH_2=O$ ($m/z=59$) y $HO-CH_2-\dot{C}H-OH$ ($m/z=61$) están presentes en el espectro de masas reportado aquí y pueden relacionarse a la estructura de GA. La presencia del fragmento de m/z 61 fue reportado en el espectro de masa por EI de GA no derivatizado [18]. Adicionalmente, estos fragmentos se encontraron presentes en los espectros de masas de los picos a 4,6 y 5,8 min en la corrida de DHA, Otro factor que debe notarse es que el tiempo de retención de este pico es más pequeño que el del pico de DHA-2TMS (5,2 min y 5,8 min, respectivamente) y esto está de acuerdo a los tiempos de retención reportados en la Sección 3.3.1, en donde GA eluyó antes que DHA (7,4 min y 8,1 min, respectivamente). Aunque las condiciones cromatográficas utilizadas fueron diferentes para GC-MS y GC-FID y las polaridades de ambas columnas

fueron ligeramente diferentes, el orden de elución no se vio modificado. A partir de la evidencia presentada puede predecirse que este pico puede ser el GA-2TMS.

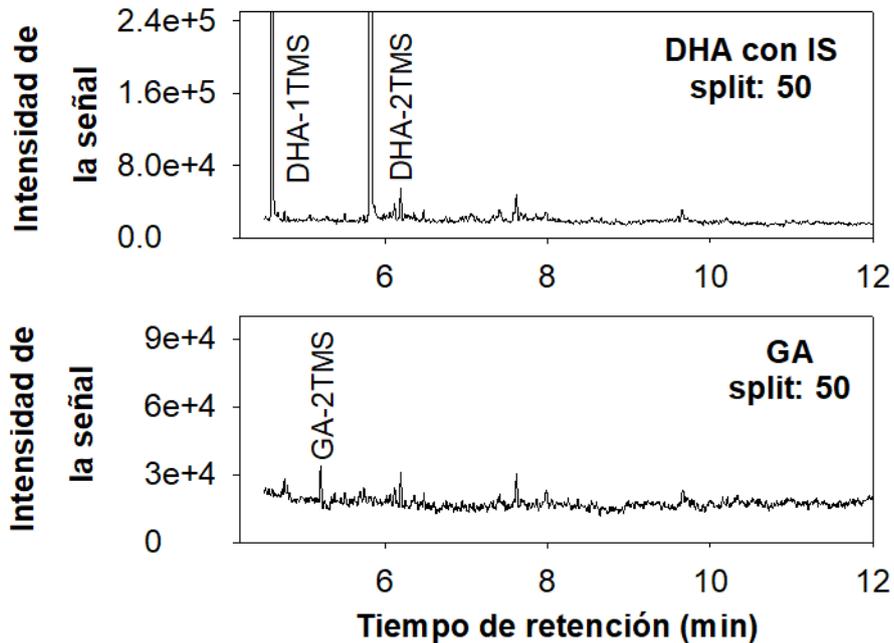


Figura 3.8. Cromatogramas por GC-MS para los derivados DHA-TMS (arriba) y GA-TMS (abajo). Relación de split: 50.

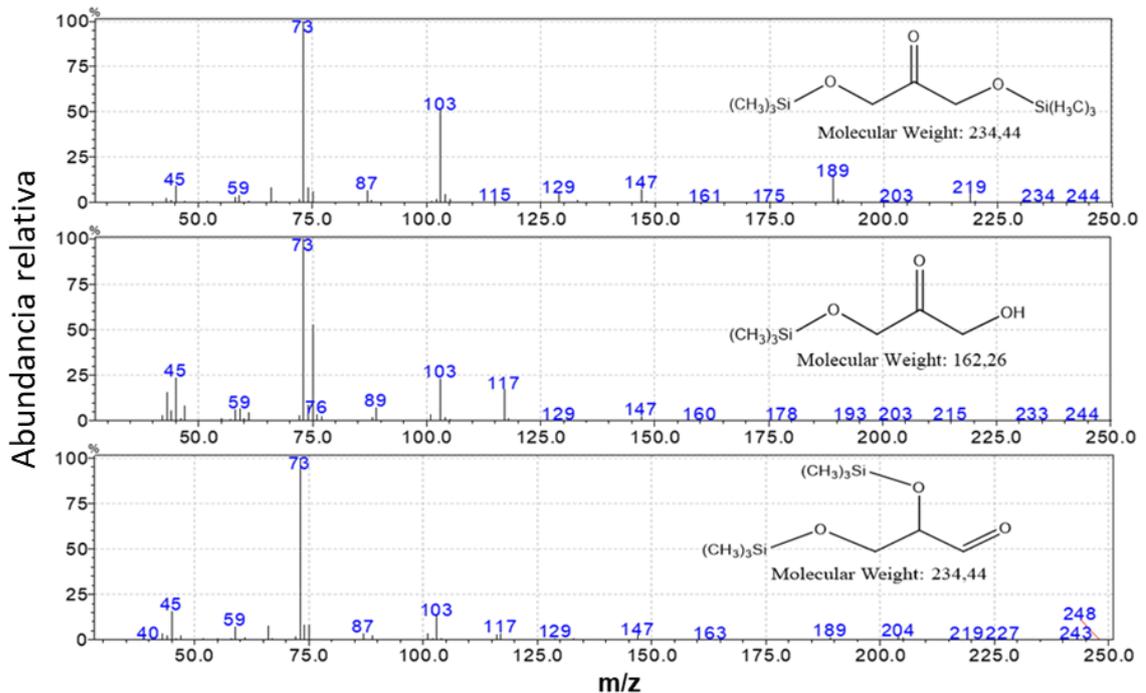


Figura 3.9. Espectro de masas por EI del pico a 5,8 min en el cromatograma de DHA (arriba), del pico a 4,6 min en el cromatograma de DHA (medio) y del pico a 5,2 min en el cromatograma de GA (abajo).

3.4.6 Curvas de calibración y validación

3.4.6.1 Soluciones de estándares en piridina

Las curvas de calibración para la cuantificación de los analitos en piridina se muestran en la Figura 3.10 tomando en cuenta las áreas de los picos de los derivados TMS de los monómeros de cada especie. Por lo

tanto, los siguientes picos fueron considerados para cada estándar: 7,4 min para GA, 8,1 min para DHA y 8,7 min para glicerol. Los valores de los coeficientes de determinación (R^2) de las rectas de regresión también se indican en las Figura 3.10 A y 3.10 B. Debido a la dimerización de DHA y de GA, las pendientes de sus rectas de regresión son mucho menores en comparación con la del glicerol. Sin embargo, una elevada correlación lineal fue encontrada para ambas especies. Además, el valor de R^2 mejoró ligeramente cuando se consideró al pico del IS para el cálculo, contrario a lo que ocurrió en los casos de GA y de DHA en donde la presencia del IS hizo disminuir el grado de correlación. Teniendo en cuenta las diluciones realizadas durante el procesamiento de las muestras (ver leyendas del Esquema 3.1 – ruta A), el LOD y el LOQ para todos los analitos fueron calculados (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) para GA, GLI y DHA siguiendo diferentes métodos de procesamiento de la muestra.

	Ruta	GA	GLI	DHA
LOD (mM)	A	0,3	0,1	0,9
	B	1,0	1,3	1,0
	C	21,0	2,0	16,2
	HPLC	18,5	38,9	113,9*
LOQ (mM)	A	0,5	0,1	1,4
	B	1,8	2,0	1,8
	C	38,9	3,9	28,8
	HPLC	36,6	75,8	214,7*

* Determinado por medio de detector UV

DHA y GA se encuentran como dímeros en estado sólido. Luego de su disolución en piridina, los dímeros (D) se disocian en monómeros de acuerdo a:



Por lo que las corridas cromatográficas también brindan información de la extensión de la disociación de los dímeros (α) a una concentración. Asumiendo que los monómeros y los dímeros tienen respuestas cromatográficas similares en el FID, α puede aproximarse a:

$$\alpha = \frac{0,5 \cdot A_M}{A_M + A_D} \quad (3.9)$$

siendo A_M y A_D las áreas de los picos de los derivatizados del monómero y del dímero, respectivamente. A_D se computa como la suma de las áreas de los picos a 13,0 min y a 13,5 min (ver Figura 3.1). Los valores de α para cada corrida fueron computados y los mismos mostraron una tendencia decreciente con rangos de 0,12-0,08 y 0,022-0,013 para DHA y GA, respectivamente. Por lo tanto, los dímeros se disociaron en baja proporción en piridina. En el equilibrio, se cumple la siguiente relación:

$$K_D = 4 \cdot C_T \cdot \frac{\alpha^2}{(1-\alpha)} \quad (3.10)$$

En la ecuación 3.10, K_D es la constante de disociación y C_T la concentración de analito de la corrida. La Figura 3.10 C ilustra la correlación encontrada entre α y C_T en cada solución. De acuerdo con la Ecuación 3.10, la pendiente de esta curva nos da una estimación de la constante de disociación de los dímeros de DHA y de GA en piridina. Valores de 0,11 mM y 0,004 mM fueron encontrados para K_{DHA} y K_{GA} , respectivamente. Desafortunadamente, no se puede considerar que los estándares se encuentran en un estado de equilibrio; sin embargo, esta interpretación da soporte a la hipótesis de que los picos a mayores tiempos de retención (13-13,5 min) pueden ciertamente deberse a los derivados TMS de los dímeros. Además, los valores estimados de K_D están en concordancia con el hecho de que los dímeros de GA son más estables que los dímeros de DHA [9].

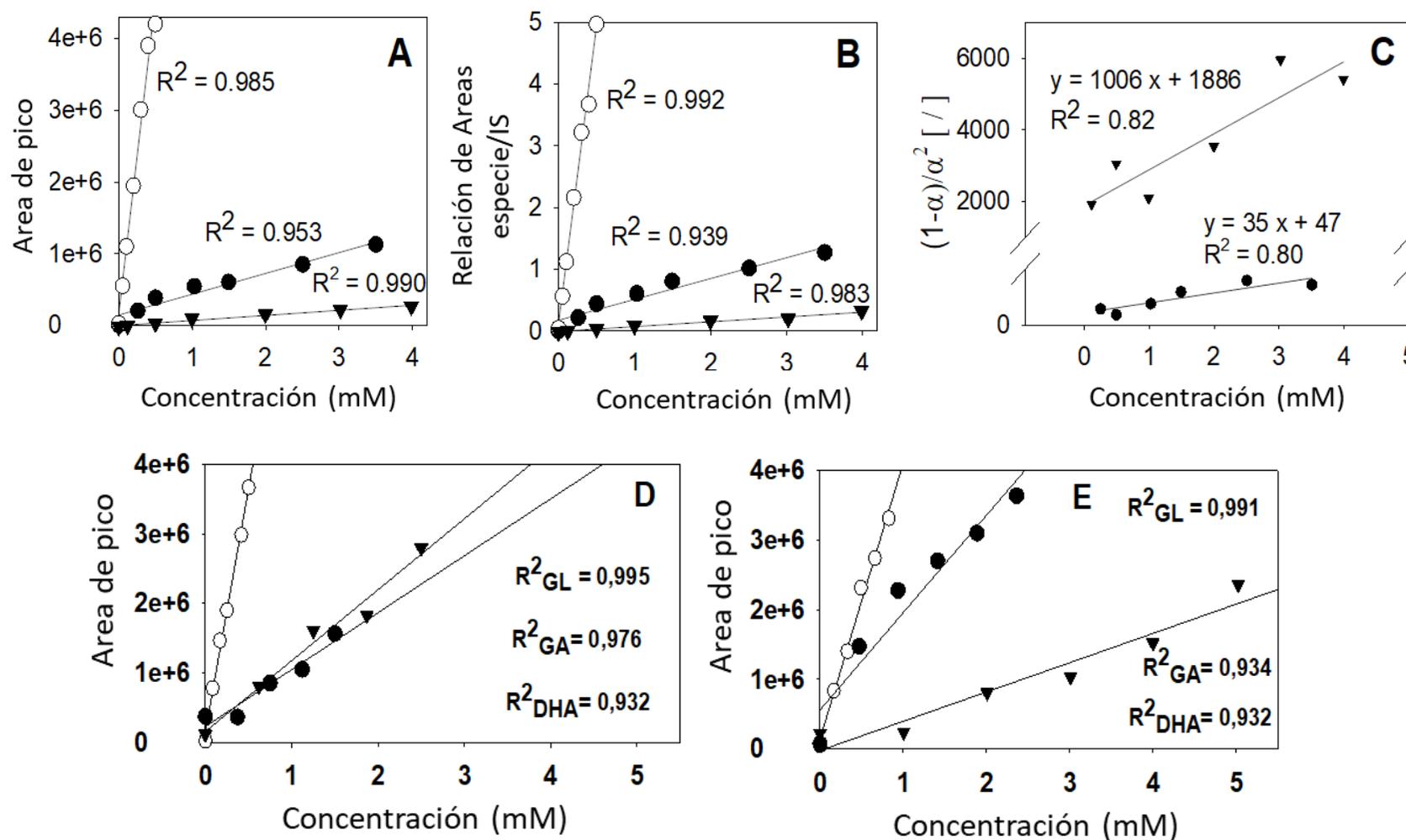


Figura 3.10. Curvas de calibración. Círculos blancos: glicerol. Círculos negros: DHA. Triángulos: GA. **A:** estándares en piridina sin IS. **B:** estándares en piridina con IS. **C:** correlación lineal para la estimación de las constantes de disociación de los dímeros de GA y de DHA. **D:** estándares a partir de secado al vacío de soluciones acuosa, sin IS. **E:** a partir de secado con tamices moleculares de soluciones acuosa. Ver las condiciones de derivatización en la Tabla 3.1

3.4.6.2 Soluciones de estándares en agua

Las curvas de calibración para la cuantificación de los analitos en agua fueron hechas a partir de mezclas de los tres analitos. Teniendo en cuenta que:

1) los cromatogramas de GA y de DHA obtenidos a partir de muestras acuosas fueron complejos;

2) que la distribución de las diferentes especies asociadas a ambos analitos, es decir monómeros, dímeros y especies hidratadas variaron aleatoriamente de muestra a muestra, siendo esta distribución probablemente afectada por el envejecimiento de la muestra;

3) en el caso de GA la disociación de los dímeros no se completó antes de la derivatización de modo tal que la proporción de monómeros y dímeros sería afectada por la concentración, siendo el valor desconocido en una muestra problema; y que

4) los dímeros de DHA fueron completamente disociados en agua antes de la derivatización;

se evaluó un enfoque para la calibración que involucra la suma de las áreas de los picos más relevantes que se basó en la asignación discutida en las secciones anteriores. Por lo tanto, para DHA se correlacionó la suma de los picos a 8,1 min y 9,1 min a su concentración, mientras que en el caso de GA se utilizó la suma de las áreas de los picos a 7,4 min, 10,8 min, 13,0 min y 13,2 min, respectivamente.

Las Figuras 3.10 D y E muestran las curvas de calibración obtenidas para cada especie de acuerdo con las diferentes rutas de procesamiento de las muestras, estas son: secado al vacío (ruta B en el Esquema 3.1) y secado con tamices moleculares (ruta C en el Esquema 3.1). Como se esperaba, el glicerol dio la mayor respuesta con el detector FID, que tiene el mayor número de OH por molécula. Además, el factor de correlación para el glicerol fue el más elevado dado que a él solamente se asocia una especie estable. Los estándares utilizados para la calibración en las Figuras 3.10 D y E fueron de lotes distintos, por lo tanto, la diferencia en las pendientes no puede ser asociada a los diferentes métodos de procesamiento de la muestra. Sin embargo, en ambos casos las pendientes de GA y de DHA fueron mayores a las obtenidas en la calibración a partir de soluciones hechas en piridina (Figura 3.10 A) y esto es consecuencia del mayor grado de disociación de los dímeros en agua respecto a piridina. Los valores de LOD y LOQ fueron calculados teniendo en consideración la dilución requerida para el procesamiento de la muestra (ver leyenda del Esquema 3.1 – rutas B y C) y los resultados se muestran en la Tabla 3.3 junto con los valores obtenidos por HPLC. El enfoque validado a través de la ruta C aquí presentado resultó 19,5 veces más sensible en la determinación de GLI y 7 veces más sensible para determinar DHA. Por otro lado, los valores de LOQ fueron muy similares para ambos métodos en el caso de GA. Sin embargo, las sensibilidades fueron superiores por medio de la ruta B, dado que las muestras son diluidas en mucha menor medida cuando se utiliza este método.

Los resultados de la validación de este enfoque se presentan en la Tabla 3.4. En cada medición por GC, tanto el valor objetivo como el valor predicho por HPLC estuvieron dentro del intervalo de estimación. Por otro lado, el coeficiente de variación se encontró debajo del 5% para GLI y debajo de 12% para DHA y GA y fueron mucho menores que con el método por HPLC, probablemente porque en ese caso los valores objetivo se encontraron cerca de los correspondientes valores de LOQ.

Tabla 3.4. Validación de la calibración con agua como solvente y posterior secado con tamices moleculares. Las alícuotas de cada componente durante el tratamiento de la muestra (Esquema 3.1) fueron: b=20 μ L, c=5,6 μ L, x=20 μ L, y= 170 μ L y z= 7 μ L. [MSTFA]= 3908 mM.

		[GA] (mM)	[GLI] (mM)	[DHA] (mM)
	Valores objetivo	106,9	33,3	107,8
GC (ruta C)	Valores predichos	96,7 \pm 10,8	31,9 \pm 1,2	112,1 \pm 11,6
	CV (%)	11,2	3,9	10,4
HPLC	Valores predichos	84,9 \pm 63,2	19,4 \pm 24,8	116,3 \pm 63,6*

* Determinado por medio de detector UV

3.5 Conclusiones del capítulo

La derivatización con MSTFA produjo una profunda mejora en la morfología de los cromatogramas de gliceraldehído, dihidroxiacetona y glicerol a la vez que mejoró su detectabilidad en el FID.

Se evaluó el efecto de la disolución de estándares en agua y su posterior secado previo al paso de derivatización. Dos procesos de secado fueron utilizados: secado al vacío y tamizado molecular. Ambos procesos fueron efectivos en la remoción del agua. El procesamiento por tamizado molecular (Ruta C) implicó una mayor dilución de las muestras que el secado al vacío (Ruta B), mientras que este último resultó más laborioso.

Las condiciones de derivatización fueron cuidadosamente estudiadas de manera de obtener cromatogramas concluyentes. Estas incluyen que las concentraciones de analitos deban mantenerse por debajo de 0,5, 4,0 y 3,5 mM para GLI, GA y DHA, respectivamente, una concentración de MSTFA mayor a 1328 mM y un tiempo de reacción de 30 min a una temperatura de 70°C. También se demostró que se produce la derivatización completa de DHA bajo estas condiciones en acetonitrilo en lugar de piridina.

Distintas especies aparecieron en los cromatogramas de los derivados TMS de GA y de DHA, mientras que el aducto MSTFA/glicerol brindó un único pico estable, el cual no se vio afectado por las diferentes rutas de procesamiento de la muestra. La presencia de los monómeros de GA y de DHA fue confirmada por experiencias de GC-MS por impacto electrónico. La información sobre el patrón de fragmentación de GA-2TMS no pudo ser encontrado en la literatura. No obstante, su identificación fue efectuada utilizando información de espectros de compuestos relacionados.

Dado que DHA y GA presentaron los mismos picos para los dímeros, sólo los picos de los monómeros fueron utilizados para la cuantificación en las soluciones en piridina. A partir de muestras acuosas, en cambio, se recurrió a un enfoque de calibración que involucró realizar la suma de las áreas de picos más relevantes. Sin embargo, la distribución de estos picos se vio modificada entre distintos procesos de calibración y parece estar afectada por factores difíciles de controlar, como el envejecimiento del reactivo silanzante o de los estándares acuosos. El coeficiente de variación obtenido a partir de las mediciones por triplicado estuvo por debajo del 5% para GLI y debajo del 12% para DHA y GA. Las sensibilidades para GLI y DHA a través de la ruta C fueron superiores a las obtenidas por HPLC.

De acuerdo a nuestros conocimientos, este es el primer registro de la cuantificación de DHA y GA a través de GC-FID utilizando un enfoque de derivatización en un solo paso. GC-FID es una técnica versátil, barata y de amplia aceptación en los laboratorios. Por lo tanto, el desarrollo de un método de cuantificación simple es altamente deseable. Los derivados TMS sin una oximación previa de los grupos carbonilo puede ser útil en el estudio del equilibrio entre distintas formas tautoméricas en solución debido a que las formas anoméricas no se modifican.

3.6 Resultados publicados

El desarrollo de la técnica analítica y los resultados obtenidos han sido publicados en:

- Parodi, Adrián; Diguilio, Eliana; Renzini, Soledad; Magario, Ivana. **“An alternative approach for quantification of glyceraldehyde and dihydroxyacetone as trimethylsilyl derivatives by GC-FID”**. *Carbohydrate Research*, 487 (2020), 107885. DOI: 10.1016/j.carres.2019.107885

3.7 Referencias

- [1] T. Ruppel, G. Hall, T. Huybrighs, W. Goodman, Free and Total Glycerol in B100 Biodiesel by Gas Chromatography According to Methods EN 14105 and ASTM D6584, Shelton, 2008. https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_GlycerinBiodiesel.pdf.
- [2] J.N. Miller, J.C. Miller, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 6th ed., Pearson Education Limited, Gosport, UK, 2010.
- [3] P.C. Meier, R.E. Zünd, Statistical Methods in Analytical Chemistry, second edi, A Wiley-Interscience publication, 1945.
- [4] J.C. Beltrán-Prieto, J. Pecha, V. Kašpárková, K. Kolomazník, Development of an hplc method for the determination of glycerol oxidation products, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 36 (2013) 2758–2773. <https://doi.org/10.1080/10826076.2012.725695>.
- [5] Y. Kobayashi, T. Igarashi, H. Takahashi, K. Higasi, Infrared and raman studies of the dimeric structures of 1,3-dihydroxyacetone, d(+)- and dl-glyceraldehyde, *J. Mol. Struct.* (1976). [https://doi.org/10.1016/0022-2860\(76\)80104-4](https://doi.org/10.1016/0022-2860(76)80104-4).
- [6] K. Šlepokura, T. Lis, Crystal structures of dihydroxyacetone and its derivatives, *Carbohydr. Res.* (2004). <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.05.020>.
- [7] D. Gardiner, The dimeric forms of some α -hydroxycarbonyl compounds, *Carbohydr. Res.* (1966). [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)81217-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)81217-3).
- [8] A.I. Ruiz-Matute, O. Hernández-Hernández, S. Rodríguez-Sánchez, M.L. Sanz, I. Martínez-Castro, Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 1226–1240. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.013>.
- [9] V. A. Yaylayan, S. Harty-Majors, A. A. Ismail, Investigation of DL-glyceraldehyde-dihydroxyacetone interconversion by FTIR spectroscopy, *Carbohydr. Res.* (1999). [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00077-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00077-4).
- [10] S.-A. Co, Cleaning Flame Ionization Detectors: When and How, (1998) 4. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Bulletin/4488.pdf>.
- [11] R. Whelpton, Encyclopedia of Analytical Science, in: Elsevier Ltd., 2005: pp. 432–441.
- [12] A.E. Pierce, Silylation of Organic Compounds, Rockford, US, 1968.
- [13] K. Blau, G.. King, eds., Handbook of Derivatives for Chromatography, Heyden, London, 1978.
- [14] C.F. Poole, Alkylsilyl derivatives for gas chromatography, *J. Chromatogr. A.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.097>.
- [15] L. Davis, The structure of dihydroxyacetone in solution, *Bioorg. Chem.* (1973). [https://doi.org/10.1016/0045-2068\(73\)90023-0](https://doi.org/10.1016/0045-2068(73)90023-0).

- [16] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database., Bis(trimethylsiloxy)acetone, CID=552756, (n.d.).
- [17] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database, CID=20845401, (n.d.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/20845401> (accessed March 28, 2019).
- [18] N.C. for B.I.P. Database., Glyceraldehyde, CID=751, (n.d.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/751> (accessed March 28, 2019)

Capítulo 4: Oxidación de glicerol con hematin

4.1 Objetivos del capítulo

Los objetivos de este capítulo son:

- Evaluar el desempeño de hematin (complejo metálico basado en Fe) en la oxidación primaria de glicerol explorando un amplio rango de condiciones de reacción, dentro de las cuales se incluye el empleo de catalizador tanto en medio homogéneo como inmovilizado.
- Discutir los rendimientos de reacción encontrados en base a propuestas de mecanismos de vías de reacción deseadas y no-deseadas.

Los antecedentes y motivos que fundamentan esta tarea se encuentran detallados a lo largo del capítulo 1 de la presente tesis.

4.2 Materiales

Hematin porcino (PM: 633,49 g/mol), gliceraldehído y N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) fueron adquiridos a través de Sigma Aldrich (San Luis, Estados Unidos). Fenol, 4-aminoantipirna y glutaraldehído 25% (GLU) (PM = 100,12 g/mol) fueron obtenidos de Tetrahedron (Godoy Cruz, Argentina) mientras que glicerol y H₂O₂ de Cicarelli (Santa Fe, Argentina). La fucsina básica se adquirió de Anedra (Tigre, Argentina). Para la inmovilización de hematin se utilizaron partículas porosas de polimetacrilato funcionalizadas con grupos hexametilnamino (ReliZyme™-HA 403/S) las cuales fueron gentilmente donadas por Resindion S.R.L (Binasco, Italia). La densidad de grupos funcionales NH₂ en el soporte HA 403 es de 500 μmol/g húmedo (dato proporcionado por el fabricante). La capacidad de retención de agua del soporte es de entre un 60 y 70% en peso y en base a esto se consideró que 1 g_{seco} de HA 403 = 1,65 g_{húmedo}. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico, excepto por el bórax (grado técnico).

4.3 Métodos

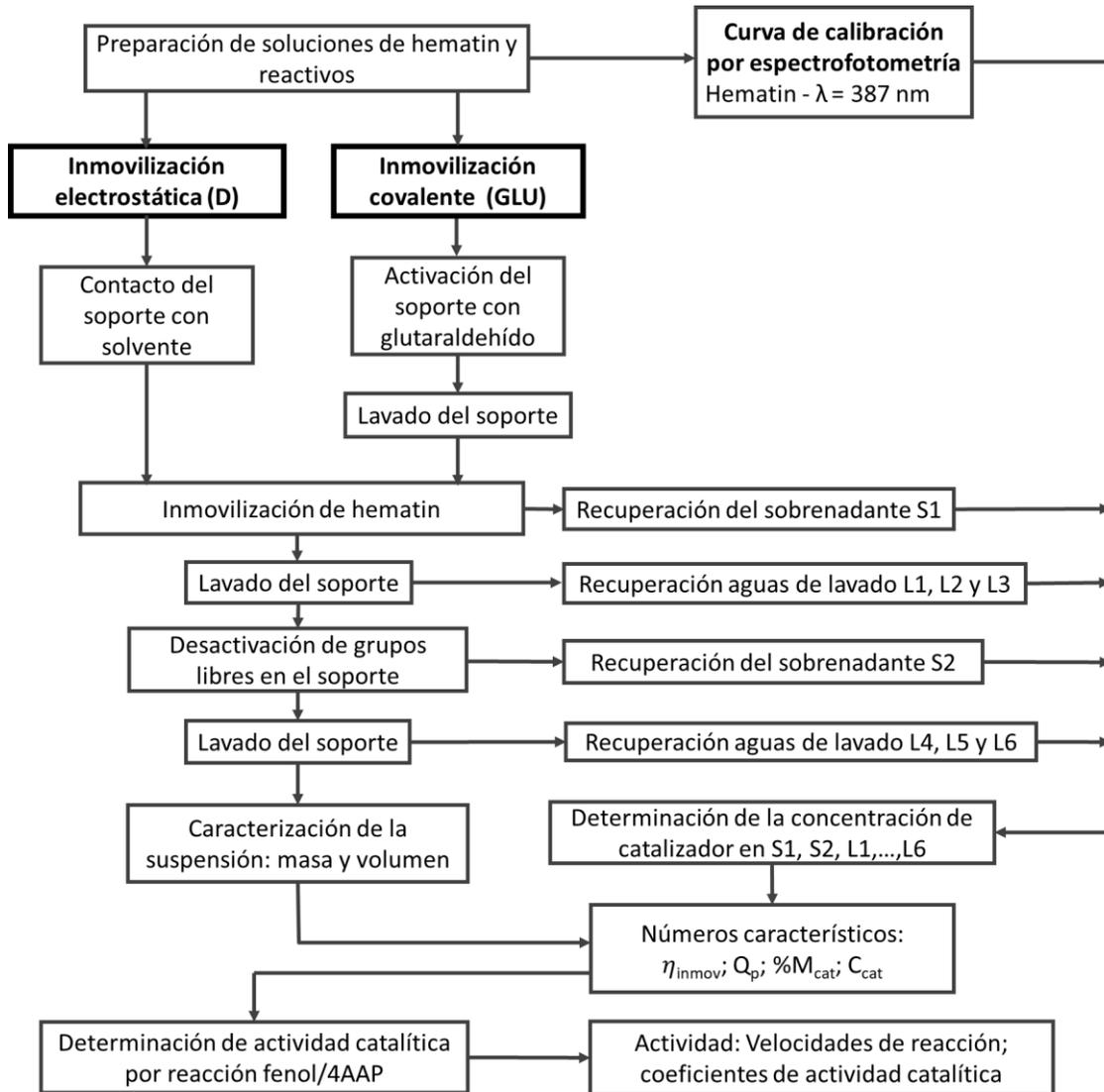
En el Esquema 4.1 se muestra de manera resumida el procedimiento seguido para la inmovilización de hematin y la caracterización de los catalizadores obtenidos. A continuación, se detallan cada uno de los métodos de inmovilización.

4.3.1 Inmovilización covalente de hematin

La unión covalente de hematin sobre el soporte de polimetacrilato HA 403, se efectuó con GLU siguiendo el protocolo de Córdoba et al. (2015) [1] que incluye los siguientes pasos: (1) activación del soporte; (2) fijación de hematin al soporte activado; (3) desactivación de los grupos -C=O remanentes.

4.3.1.1 Activación del soporte

La cantidad de GLU se calculó considerando una relación de GLU a grupos NH₂ de las partículas de 1:1. Se colocaron 0,5016 g de partículas HA 403 secas en un Erlenmeyer de 50 mL y se agregaron 25 mL de buffer fosfato 0,1 M pH 7 con 155 μL de GLU al 25% P/P. Se dejó reaccionar durante 1 h con agitación magnética a temperatura ambiente. Luego, se trasvasó a un tubo falcon previamente pesado y se centrifugó y lavó 3 veces con 25 mL de buffer fosfato. La mayor cantidad de sobrenadante se eliminó con micropipeta, procurando dejar las partículas embebidas en buffer hasta el próximo tratamiento.



Esquema 4.1. Procedimientos de inmovilización de hematin y caracterización de catalizadores.

4.3.1.2 Inmovilización de hematin sobre el soporte funcionalizado

Las partículas obtenidas de la etapa anterior se contactaron con 25 mL de una solución de hematin (1,1 g/L en NaOH 0,01 M) durante 2 h con agitación magnética y a temperatura ambiente en un Erlenmeyer. La relación másica de hematin a partículas fue cercana a 54 mg/g. Posteriormente el medio fue trasvasado a un tubo falcon y centrifugado durante 5 min (Centrífuga Presvac DCS-16RTV, Argentina). El sobrenadante (S1) se recuperó trasvasándolo a un matraz de 100 mL y se llevó a volumen final con agua destilada. El sólido se lavó con 20 mL de agua destilada resuspendiéndolo con vortex durante 1 min. Luego se centrifugó y recuperó el agua de lavado en un matraz de 25 mL, llevando a volumen final con agua destilada. Se repitió esta operación tres veces, generándose tres soluciones.

4.3.1.3 Desactivación de los grupos carbonilo libres

Las partículas obtenidas en la etapa anterior se contactaron con 25 mL de buffer tris 0,5 M en un Erlenmeyer de 50 mL durante 1 h con agitación magnética y a temperatura ambiente. Posteriormente, el medio fue trasvasado a un tubo falcon y centrifugado durante 5 min. El sobrenadante (S2) se recuperó trasvasándolo a un matraz de 50 mL y se llevó a volumen final con agua destilada. El sólido se lavó resuspendiéndolo con vortex durante 1 min con 20 mL de agua destilada. Luego se centrifugó y recuperó el agua de lavado en un matraz de 25 mL, llevando a volumen final con agua destilada. Se repitió esta

operación tres veces, generándose tres soluciones. El tubo falcon con el catalizador obtenido se pesó para estimar la masa de la suspensión. Se midió luego el volumen de la suspensión utilizando una micropipeta. De esta manera, se estimó la concentración de catalizador (C_{cat}) como $g_{secos}/V_{suspension}$ y el porcentaje de catalizador ($\% M_{cat}$) como $g_{secos}/g_{suspension}$. Se guardó el catalizador obtenido en la heladera.

4.3.2 Inmovilización electrostática de hematin

Por otro lado, se ensayó la unión electrostática directa (D) entre hematin y ReliZyme™-HA 403. Se contactaron 0,5023 g de partículas secas de polimetacrilato con 25 mL de buffer acetato pH 5,0 durante 18 h en un Erlenmeyer de 50 mL. Luego se agregó 25 mL de solución de hematin (1,1 g/L en NaOH 0,01 M). La relación de hematin a partículas secas fue de 54 mg/g. Se observó la formación de hematin precipitado, por lo cual se aumentó el pH hasta 7 con NaOH 1 M y se agitó por 19 h a temperatura ambiente. Se trasvasó la suspensión a un tubo falcon previamente pesado, se centrifugó por 5 min, se recuperó el sobrenadante por medio de una micropipeta y se lo colocó en un matraz de 100 mL, donde el líquido fue llevado a volumen final con agua destilada. El sólido se lavó con 20 mL de agua destilada resuspendiéndolo con vortex durante 1 min. Luego se centrifugó y recuperó el agua de lavado en un matraz de 25 mL, llevando a volumen final con agua destilada. Se repitió esta operación tres veces, generándose tres soluciones.

4.3.3 Determinación de hematin inmovilizado

Para cada procedimiento de inmovilización, la masa de hematin inmovilizada se determinó considerando que la cantidad unida es igual a la diferencia entre lo que se contactó inicialmente con las partículas y la masa recuperada en los sobrenadantes y en aguas de lavado. La concentración de hematin en los sobrenadantes y aguas de lavado se determinaron por lectura de su absorbancia a 387 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 35 (Massachusetts, Estados Unidos) previamente calibrado con soluciones de estándares de hematin ($\epsilon_{hematin}=0,0469 \text{ L mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

En base a las mediciones realizadas se estimó la cantidad de hematin unido por gramo de soporte (Q_p):

$$Q_p = \frac{\text{masa de hematin soportado (mg)}}{\text{masa de soporte (g)}} \quad (4.1)$$

Y la eficiencia de inmovilización η , definida como la cantidad unida respecto a la que se contactó inicialmente

$$\eta = \frac{\text{masa de hematin soportado (mg)}}{\text{masa inicial de hematin (mg)}} \times 100 \quad (4.2)$$

4.3.4 Ensayos de oxidación de glicerol

Se disolvió hematin en una solución acuosa de NaOH 0,1 M para dar soluciones madre de 0,5-0,7 g/L. La Tabla 4.1 muestra las condiciones utilizadas en los ensayos de oxidación de glicerol. Los medios de reacción fueron agitados con agitador magnético y su temperatura se mantuvo con un baño termostático. Las reacciones fueron iniciadas por el agregado de H_2O_2 . En las experiencias en las que se indica el uso de solución buffer, se utilizó el siguiente: ácido acético/NaOH 0,1 M (pH 5). En los demás casos, el pH inicial fue ajustado agregando gotas de HCl o NaOH 1M a las soluciones acuosas de glicerol.

Tabla 4.1. Condiciones utilizadas en ensayos de oxidación de glicerol

Exp. ID	Catalizador	C _{cat} (mM)	C _{glicerol} (mM)	C _{H₂O₂} (mM) (N°etapas)	T (°C)	Solvente	V _{Reacción} (mL)	[GA] _{3-5 h} (mM) ^{***} o en Fig.
1	-	-	1000	138 (1)	35	Agua pH ₀ 5	10	5,2
2	-	-	1000	138 (1)	35	Agua pH ₀ 7	10	5,3
3	-	-	25	25 (5*)	35	Agua pH ₀ 5	10	Fig. 4.5
4	HL	0,16	1000	138 (1)	35	Agua pH ₀ 5	10	Fig. 4.1
5	HL	0,16	1000	138 (1)	35	Agua pH ₀ 7	10	Fig. 4.1
6	HL	0,16	1000	138 (1)	35	Agua pH ₀ 11	10	Fig. 4.1
7	HL	0,16	100 – 1000	28–202 (3*)	35	Agua pH ₀ 5	10	Fig. 4.2 A
8	HL	8 **	1000	100 (5*)	Amb	Buffer pH 5	10	Fig. 4.2 B
9	HS (Glu)	0,04	25	25 (5*)	35	Agua pH ₀ 5	15	2,0 (Fig.4.5)
10	HS (D)	0,04	25	25 (5*)	35	Agua pH ₀ 5	15	Fig. 4.5
11	HS (Glu)	0,197	25	25 (5*)	35	Agua pH ₀ 5	3	-
12	HS (Glu)	0,158	200	400 ^A	35	Agua pH ₀ 5	3	-
13	HS (D)	1,730	200	400 ^A	35	Agua pH ₀ 5	3	-
14	FeSO ₄	0,29	76	35 (1)	Amb	Agua pH ₀ 3.6	25	6,4
15	FeSO ₄	0,66	76	70 (5*)	Amb	Agua pH ₀ 3.6	25	31

Referencias: HL: Hematin libre; HS: Hematin soportado; FeSO₄: Sulfato ferroso. Inmovilización: uniones covalentes (Glu) y electrostáticas (D).

* Dosificados al inicio y cada 1 h en partes iguales hasta llegar a la concentración reportada a la izquierda.

** Dosificados de 1,6 mM a tiempos de reacción de 0, 1, 2, 3 y 4 h.

*** Determinado por reactivo de Schiff

^A Dosificados a lo largo de 5 min (con una pipeta)

4.3.4.1 Seguimiento de la reacción por detección de aldehídos

Se tomaron muestras de 200 μ L a diferentes intervalos de tiempo y se mezclaron con 800 μ L de reactivo de Schiff. Este reactivo se preparó disolviendo 1 g de fucsina básica en agua destilada, se mezcló luego con 100 mL de una solución de sulfito de sodio anhidro al 10% y se acidificó con 10 mL de HCl, se llevó la mezcla a un volumen final de 1000 mL y finalmente se filtró. El reactivo de Schiff dura hasta dos semanas guardado en la oscuridad [2]. Las mezclas se dejaron reaccionar por 30 min a temperatura ambiente y finalmente se midió su absorbancia a 560 nm. La concentración de GA se calculó por medio de una curva de calibración, la cual brindó un coeficiente de extinción a 560 nm de 0,039 (\pm 0,013) mM/cm con un valor de $R^2=0,98$. En el ensayo que se realizó con alta cantidad de hematin libre (8 mM – entrada 8 en la Tabla 4.1), las muestras fueron centrifugadas previo a la adición del reactivo de Schiff. La interferencia del hematin no disuelto en este ensayo fue corregida deduciendo la absorbancia a 560 nm de muestras blanco sin glicerol tratadas con reactivo de Schiff.

4.3.4.2 Seguimiento de la reacción por cromatografía gaseosa

Manteniendo la agitación se tomaron muestras de los medios de oxidación con glicerol y se sometieron a centrifugación para separar el catalizador suspendido. Luego, se tomaron 40 μ L del sobrenadante y se secaron a presión reducida durante 3 h para eliminar el agua (procesamiento correspondiente a ruta B – ver capítulo 3). Posteriormente se añadió piridina y el tubo se agitó con agitador vortex para lograr la redisolución de los analitos. Se tomó una muestra y se la colocó en un segundo tubo, al cual se le agregó piridina, n-hexanol y MSTFA para iniciar la derivatización, la cual se llevó a cabo a 70 °C por 30 min en un baño de aceite. Las muestras derivatizadas fueron analizadas utilizando un cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 500 equipado con un detector FID y una columna PE elite-1 de 15 m \times 0,53 mm DI \times 3 μ m de grosor de película. Todas las inyecciones se realizaron on-column. El inyector siguió el siguiente programa de temperatura: 60 °C (1 min), aumento de 15 °C/min hasta 230 °C (0 min) y luego hasta 250 °C a una velocidad de 3 °C/min. Programa de temperatura del horno: 50 °C (1 min), aumento de 15 °C/min hasta 210 °C (0 min), aumento de 3 °C/min hasta 230 °C (0 min) aumento de 15 °C/min hasta 240 °C (2 min), tiempo total de la corrida 21 min. La temperatura del FID se fijó en 280 °C.

4.3.5 Pruebas de actividad catalítica de hematin

Los perfiles de oxígeno disuelto durante la reacción de hematin con H_2O_2 a temperatura ambiente fueron registrados con un sensor electroquímico Pasco Passport modelo PS-2108 (California, Estados Unidos). Se disolvió hematin en 5 mL de buffer borato 0,05 M pH 8,0 para dar una concentración final de 0,044 mM (27,9 mg/L). Por otro lado, se realizaron pruebas en buffer fosfato 0,1 M pH 7. Dos sistemas fueron analizados: hematin/ H_2O_2 y hematin/glicerol/ H_2O_2 . Las mediciones se llevaron a cabo en un volumen de 8 mL en un vaso de precipitados. Se utilizaron concentraciones de 0,028 mM o 18 mg/L (hematin), 4,0 mM (H_2O_2) y 1703 mM (glicerol, en sistema hematin/glicerol/ H_2O_2).

En todos los casos, el sensor fue introducido y, bajo agitación magnética a 100 rpm, se realizó la medición en línea de la concentración de O_2 disuelto utilizando el software Pasco Capstone (versión de prueba 1.8.0). Luego de la estabilización de la señal, 57 μ L o 3,63 μ L de H_2O_2 30% P/V (100 mM o 4,0 mM, para sistemas en buffer borato y fosfato, respectivamente) fueron agregados en un paso y las mediciones se realizaron durante al menos 30 min.

4.3.6 Pruebas de actividad peroxidática de hematin

La actividad peroxidática de hematin tanto libre como inmovilizado fue evaluada a través de la reacción entre fenol/4-AAP/ H_2O_2 a temperatura ambiente, debido a que es una técnica sencilla y de uso extendido en la literatura (Sección 1.5.1). Las condiciones de reacción iniciales se pueden observar en la Tabla 4.2. Para hematin libre (set A), se mezclaron todos los componentes en una cubeta plástica y se inició la

reacción con el agregado de H_2O_2 , la cubeta fue tapada e invertida tres veces y se colocó en el portacubetas de un espectrofotómetro UV/visible Perkin-Elmer Lambda 35 (Massachusetts, Estados Unidos). La experiencia se realizó por triplicado. Las mediciones de absorbancia para determinar la actividad de los catalizadores se realizaron a 510 nm. Con hematin inmovilizado (sets B y C), las reacciones se llevaron a cabo en un vaso de precipitados en un volumen de 10 mL a temperatura ambiente y con agitación magnética. Las experiencias se realizaron una única vez. Cada 5 min (hasta los 20 min), se tomaron muestras de 1,3 mL y se sometieron a centrifugación (centrífuga Presvac EPF-12, Argentina) durante 3 min, luego se recuperó el sobrenadante en una cubeta plástica y se midió su absorbancia. Debido a que la reacción con hematin libre es rápida (ver Figura 4.3) y a que se requiere tiempo para procesar la muestra con hematin inmovilizado previamente a la medición de su absorbancia, se disminuyó la concentración de H_2O_2 (Tabla 4.2) con la finalidad de obtener datos en la región en la que la absorbancia varía linealmente con el tiempo. La actividad catalítica se definió para el hematin inmovilizado como $U/g_{sólido}$, donde U son los micromoles del aducto quinonaimina producido por min, como se puede ver en la siguiente ecuación:

$$A_{Cat} = \frac{\mu mol \text{ tinta}}{min \times g \text{ catalizador}} = \frac{U}{g \text{ sólido}} \quad (4.3)$$

La concentración de la tinta se calculó a partir de los valores de absorbancia utilizando el coeficiente de extinción de la quinonaimina ($13473 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [3]. U representa la pendiente de la recta de regresión en la región de variación lineal de la concentración con el tiempo. Es útil definir la actividad en función de la masa de hematin, para poder comparar las actividades de los catalizadores inmovilizados con la del hematin libre:

$$A'_{Cat} = \frac{\mu mol \text{ tinta}}{min \times mg \text{ hematin}} = \frac{U}{mg \text{ hematin}} \quad (4.4)$$

Para los ensayos de reúso, el catalizador soportado D (con unión electrostática directa) fue previamente secado al vacío a temperatura ambiente hasta peso constante. Entre ciclos de reúso el catalizador fue lavado cuatro veces con buffer fosfato. Las reacciones fueron llevadas a cabo dentro de tubos plásticos cerrados a temperatura ambiente. El tubo se sometió a agitación durante algunos segundos en agitador vortex a intervalos regulares de tiempo. Luego de 5 min de reacción el tubo se sometió a centrifugación durante 3 min, luego se recuperó el sobrenadante en una cubeta plástica y se midió su absorbancia. Cada experiencia se realizó por triplicado.

Tabla 4.2. Condiciones utilizadas en ensayos de actividad peroxidática

Set	Catalizador	C_{cat} (mM)	C_{fenol} (mM)	C_{4-AAP} (mM)	$C_{H_2O_2}$ (mM)	$V_{reacción}$ (mL)	En Fig.
A	HL	0,0095	8,35	0,11	17,3	1	4,3
B	HS (D)	0,016	8,35	0,11	4,0	10	4,3
C	HS (Glu)	0,016	8,35	0,11	4,0	10	4,3
Reúso	HS (D)	0,038	8,35	0,11	4,0	1,1	4,4

Referencias: HL: Hematin libre; HS: Hematin soportado; Inmovilización: uniones covalentes (Glu) y electrostáticas (D).

4.4 Resultados

4.4.1 Oxidación de glicerol con hematin libre

4.4.1.1 Efecto del pH de medio

Hematin fue testeado como catalizador en la oxidación de glicerol en soluciones acuosas a diferentes valores de pH (experiencias 4 a 6 de la Tabla 4.1). Debido a que posee dos grupos carboxílicos en su estructura (Figura 1.4 - capítulo 1), hematin incrementa su solubilidad con el aumento del pH del medio [4]. Sin embargo, el H_2O_2 tiende a descomponerse a pH alcalinos [5]. La Figura 4.1 muestra la producción de aldehído durante el tratamiento de soluciones acuosas de glicerol a distintos pH con hematin/ H_2O_2 . La concentración de aldehído aumentó con el transcurso del tiempo en todos los casos, aunque el aumento fue mayor a menor pH. En ensayos blanco de soluciones de hematin/ H_2O_2 en ausencia de glicerol no se registró aumento de la absorbancia a 510 nm por medio del reactivo de Schiff. El número de equivalentes de GA producidos fue mayor que la cantidad de equivalentes de hematin utilizadas, lo cual es indicativo de que se está produciendo un ciclo catalítico.

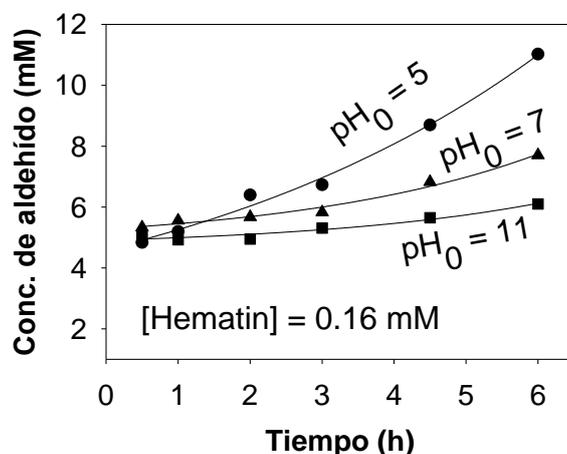


Figura 4.1. Evolución de la concentración de aldehído durante el tratamiento de soluciones acuosas de glicerol con hematin/ H_2O_2 . Las condiciones de reacción se indican en la Tabla 4.1 (experiencias 4, 5 y 6).

En todos los ensayos de reacción con hematin, se produjo un cambio de coloración de los medios de reacción de marrón claro a incoloro al transcurrir la reacción, debido a la degradación de la banda Soret de hematin [6]. El blanqueamiento irreversible es consecuencia de la adición de H_2O_2 y depende de la relación molar H_2O_2 /hematin. Probablemente, una forma inactiva de hematin es producida ya sea por la oxidación del anillo porfirínico o por la formación de dímeros, la cual es promovida por el H_2O_2 [7]. Además, cuando la solución madre alcalina de hematin fue agregada a la solución de glicerol ajustada a pH 5, un precipitado de color verde-marrón se formó y desapareció luego de unas 2 h de contacto con H_2O_2 debido a su degradación. La precipitación de hematin a pH 5 podría ayudar a prevenir su blanqueamiento, manteniéndolo de esta manera activo por tiempos más prolongados. Este efecto de “blanqueamiento” por acción conjunta del hematin/ H_2O_2 pudo ser observado en la reacción de fenol/4-amoniantipirina/ H_2O_2 [8]. Allí se observó que a pH mayores a 9, la concentración de la quinonaimina generada por la acción peroxidática de hematin disminuyó con el tiempo, es decir se blanqueó o degradó de la misma manera que se observó aquí con la banda Soret de hematin.

4.4.1.2 Efecto de la concentración de reactivos

El efecto de las concentraciones iniciales de glicerol y de H_2O_2 sobre el contenido de aldehído fue también evaluado luego de 5 h de tratamiento con hematin. La selección de las condiciones iniciales fue efectuada de acuerdo con un arreglo Doehlert [9]. Sin embargo, un modelo de superficie de respuesta no pudo ser obtenido dado que el error estándar del punto central (26,9%) fue mayor que las variaciones en

las respuestas. Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 4.2.A (corresponden a la experiencia 7 de la Tabla 4.1). El contenido de aldehído fue mayor a mayor concentración inicial de H_2O_2 en el rango estudiado (28-202 mM). La concentración de glicerol parece ser óptima alrededor de los 500 mM. Sin embargo, los rendimientos de aldehído fueron bajos en todos los ensayos. Los rangos de relaciones molares empleados fueron de 186-1320 para H_2O_2 /hematin y de 0,04-1,15 para H_2O_2 /glicerol. Aunque el H_2O_2 fue dosificado en tres etapas (ver Tabla 4.1) la intensidad de la banda Soret de hematin (395 nm) también disminuyó entre un 89 y 100 % hacia el final de la reacción en todos los casos.

4.4.1.3 Efecto de la concentración de hematin

Una corrida experimental fue realizada a una mayor dosis de hematin y con un dosaje gradual de H_2O_2 con la finalidad de prevenir su blanqueamiento y propiciar la interacción de hematin-glicerol por sobre la de hematin- H_2O_2 . En dicha corrida, la relación molar H_2O_2 /hematin fue de 66, pero el H_2O_2 y el hematin fueron dosificados en 5 etapas a las 0, 1, 2, 3 y 4 h (experiencia 8, Tabla 4.1). La concentración de aldehído alcanzada luego de 24 h en este caso fue la más elevada, alrededor de 26 mM (Figura 4.2.B). Además, no se observó blanqueamiento de hematin. Sin embargo, la mayor parte de éste permaneció insoluble.

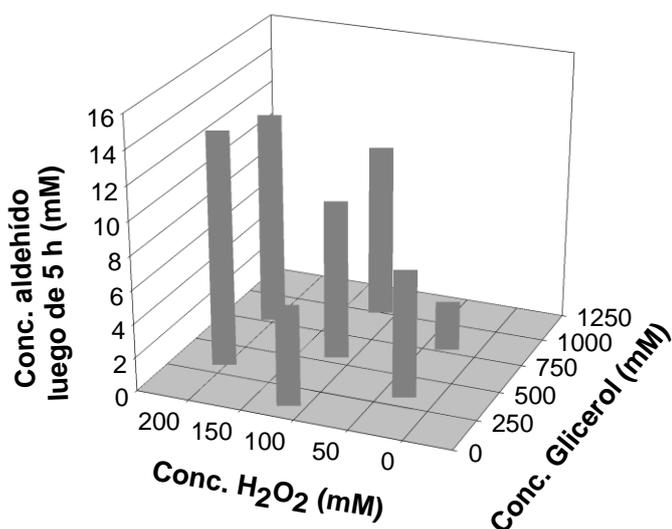


Figura 4.2.A. Contenido de aldehído después de 5 h de contacto entre hematin/ H_2O_2 con la solución de glicerol a tratar. Corresponde a la experiencia 7 de la Tabla 4.1.

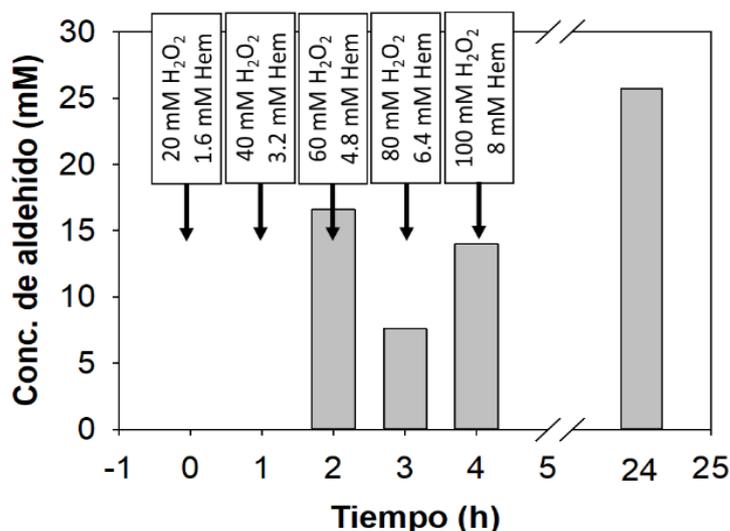


Figura 4.2.B Evolución de aldehído en una solución acuosa de glicerol a pH = 5 tratada con hematin/ H_2O_2 agregado en etapas (indicadas con flechas). Corresponde a la experiencia 8 de la Tabla 4.1.

4.4.2 Inmovilización de hematin

Hematin fue más eficiente en la producción de GA a menores valores de pH (Figura 4.1). A su vez, la solubilidad de hematin disminuye cuando el pH desciende. Esta situación impide emplear mayores concentraciones del catalizador bajo las condiciones donde la producción del aldehído es mayor. Por lo tanto, una estrategia atractiva para lograr una mayor disponibilidad de hematin es su inmovilización en una matriz sólida. Con esta finalidad, hematin fue inmovilizado en una matriz porosa de polimetacrilato. La actividad de los inmovilizados y su estabilidad en ensayos de reusos fueron evaluadas a través de la reacción de fenol/4-aminoantipirina.

En la Figura 4.3 se muestran los perfiles de concentración de quinonaimina frente al tiempo de reacción utilizando hematin tanto libre como inmovilizado. Todos los catalizadores resultaron activos en la oxidación del fenol.

De cada gráfica se tomaron las pendientes de las rectas en las zonas de variación lineal y en base a ellas se calcularon las actividades reportadas en la Tabla 4.3. Se incluyen además varios parámetros que permiten comparar los distintos catalizadores obtenidos: la cantidad de hematin unido por gramo de soporte (Q_p), la eficiencia de inmovilización (η), y la actividad catalítica ($U/g_{sólido}$). Además, se calcularon C_{cat} , que es la concentración del catalizador en la suspensión obtenida luego del proceso de inmovilización y %Mcat, que es el porcentaje en masa del catalizador inmovilizado en dicha suspensión. Finalmente, los catalizadores generados fueron testeados en la oxidación de glicerol. La generación de gliceraldehído fue monitoreada a través de cromatografía gaseosa en estos ensayos.

La eficiencia de inmovilización fue aceptable para el catalizador D (74%). Por el contrario, el anclaje de hematin utilizando glutaraldehído fue poco eficaz (5,9%). En un proyecto integrador de grado llevado a cabo en simultáneo a estos experimentos [10], se determinó una eficiencia del 12% en el proceso de inmovilización, utilizando glutaraldehído como agente acoplante y hojuelas de quitosano como soporte. Esos resultados contrastan fuertemente con los obtenidos por Pirillo et al. (2012) [11] y Córdoba et al. (2014) [1], quienes reportaron eficiencias de inmovilización del orden del 95% utilizando el mismo acoplante y soporte. El glutaraldehído tiene la tendencia a polimerizar en solución acuosa por medio de condensación aldólica [12], por lo cual, su concentración efectiva puede haber sido menor a la esperada, disminuyendo la eficiencia del proceso.

La actividad del hematin inmovilizado (por mg de hematin) con ambos métodos se vio notablemente reducida respecto al hematin libre. En ambos casos, la actividad es del orden del 3% respecto a hematin libre. Cordoba et al. (2014) [1] reportaron que el catalizador inmovilizado conservó un 33% de la actividad respecto al catalizador homogéneo, en la misma reacción aquí evaluada aunque empleando hojuelas de quitosano como soporte. Además, el agregado de aminopropiltriétoxosilano (APTS) como brazo espaciador mejoró la actividad del catalizador (57% respecto a hematin libre) debido a que en ese caso se mejoró el acceso de sustratos voluminosos al centro activo del catalizador. En este sentido, el catalizador Glu aquí obtenido posee un comportamiento similar al descripto. El anclaje con glutaraldehído al soporte aleja a la molécula de hematin en comparación con el catalizador D (generado por medio interacciones electrostáticas). De esta manera se mejora la accesibilidad y, en consecuencia, la actividad del catalizador Glu es mayor (última entrada de la Tabla 4.3).

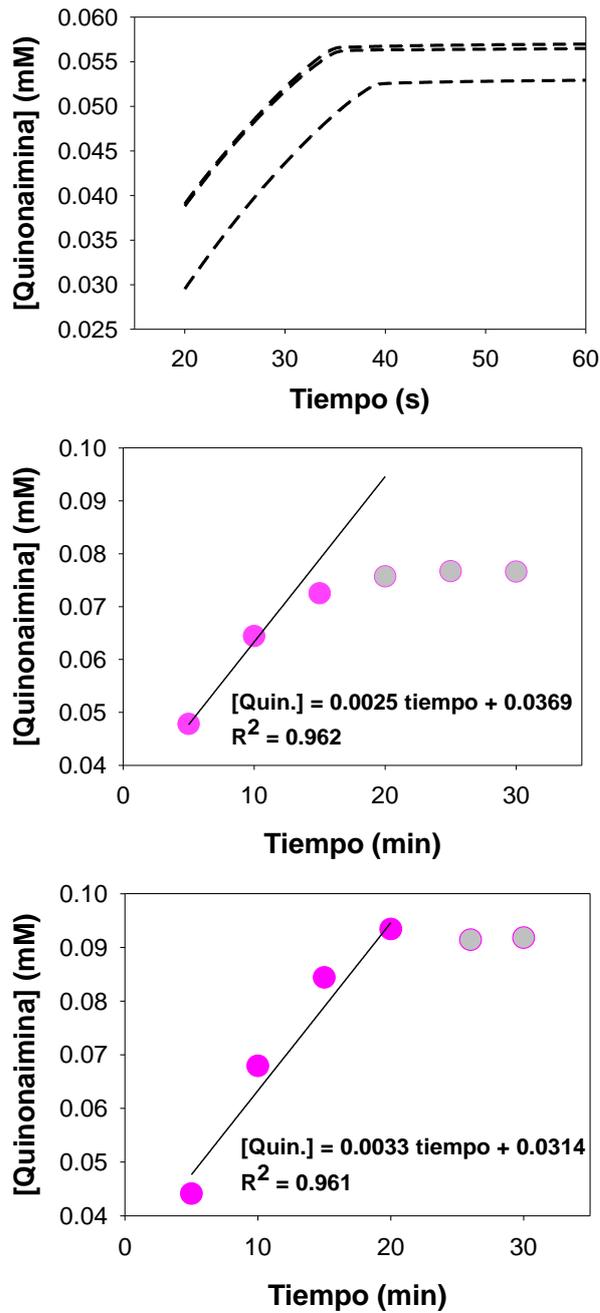


Figura 4.3. Perfiles de concentración versus tiempo en ensayos de actividad peroxidática. Ver condiciones de reacción en la Tabla 4.2 **Arriba:** hematin libre (Set A, 3 repeticiones). **Medio:** catalizador D (Set B). **Abajo:** catalizador Glu (Set C). Los círculos rellenos de color rosa se utilizaron en la regresión lineal. y los valores de actividad obtenidos en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Parámetros de los catalizadores obtenidos

Catalizador	D	Glu	Libre
Q_p (mg _{Hem} /g _{sólido})	39	3,9	
η (Eficiencia de inmovilización, %)	74	5,9	
C_{cat} (g seco/L susp)	53,8	49,2	
%M _{cat} (g seco/g susp)	5,4	4,9	
Actividad (U/g _{sólido})	9,78	1,55	
Actividad (U/mg _{hematin})	0,25	0,40	12

4.4.2.1 Actividad del catalizador D durante sucesivos ciclos de reacción

La Figura 4.4 muestra los resultados de las pruebas de actividad peroxidática del catalizador D utilizado durante varios ciclos de reacción y con recuperación y posterior lavado del catalizador entre ciclos. Las condiciones de reacción para estas experiencias figuran en la Tabla 4.2 (Set "reúso"). Las muestras se tomaron a los 5 min en los ensayos D1 y D2 y a los 2 min en los ensayos D3* y D4*. La actividad calculada resultó mayor en D3* y D4*. Esto se debe probablemente a que la reacción finaliza antes del tiempo de toma de muestra en las experiencias D1 y D2 (5 min) lo cual conduce a una subestimación en el cálculo de la actividad catalítica bajo las condiciones ensayadas. Se puede observar además que el catalizador resultó activo durante 4 ciclos. Esto nos indica que las interacciones electrostáticas fueron eficaces en mantener al hematin inmóvil y que la catálisis proviene principalmente del hematin soportado. El porcentaje de retención de la actividad catalítica luego del tercer uso de los catalizadores fue en promedio de un 74% (respecto a los 9,78 U/g_{sólido} de la Tabla 4.3). Córdoba et al. (2015) [1] reportaron una retención de la actividad catalítica cercana a un 60% luego de 6 ciclos de uso, utilizando como catalizador heterogéneo hematin unido covalentemente a quitosano por medio del acoplante glutaraldehído. El catalizador fue utilizado en la decoloración de colorantes azoicos y antraquinónicos. Asimismo, la retención de la actividad catalítica llegó a 70% luego de 6 ciclos utilizando APTS como brazo espaciador entre hematin y el soporte.

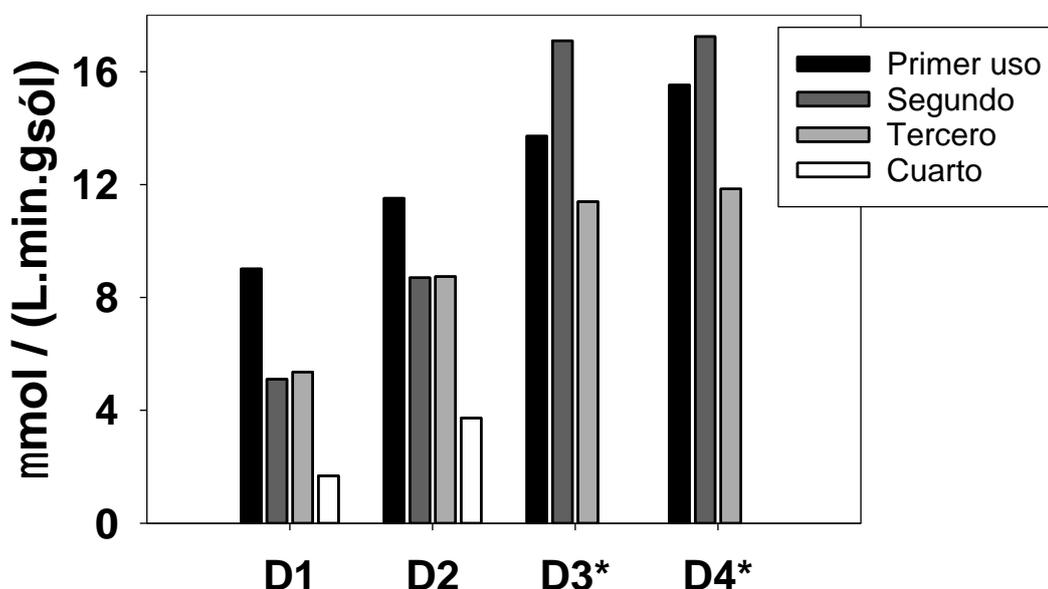


Figura 4.4. Ensayos de reúso (catalizador D). (*): Medios centrifugados a los 2 min de iniciada la reacción. Condiciones de reacción en la Tabla 4.2 (Set "reúso").

4.4.3 Oxidación de glicerol con hematin inmovilizado

La Figura 4.5 muestra cromatogramas de soluciones acuosas de glicerol tratadas con H₂O₂ y utilizando hematin soportado y sin catalizador mientras que la Tabla 4.1 indica las condiciones bajo las que se realizaron ambos ensayos. Solo con el catalizador GLU aparecieron pequeños picos correspondientes a GA (con tiempos de retención de 7,3 y 10,8 min). Además, en la misma experiencia se observó un pico a los 7,9 min, el cual estaría relacionado a otro producto de reacción no identificado. Dicho pico apareció también en una solución acuosa de glicerol tratada con FeSO₄ (Figura 4.6). Por otro lado, un descenso en el pico de glicerol luego de 6 h de reacción se ha observado en todos los casos.

Otras pruebas realizadas incrementando la cantidad de hematin soportado (a 1,7 mM) o la concentración de H₂O₂ (a 400 mM) no produjeron aumento en la conversión de glicerol ni en la producción de GA (condiciones en Tabla 4.1, entradas 11, 12 y 13). Además, el soporte sólido no fue capaz de prevenir

que hematin se blanqueara, proceso que fue más pronunciado mientras mayor fue la concentración de H_2O_2 empelada. Jing et al. (2015) [13] reportaron conversiones de glicerol de hasta un 24,6% con sulfonato-salen Fe (III) inmovilizado dentro de capas de hidróxidos doble (LDH) como catalizador y H_2O_2 como agente oxidante luego de 4 h de reacción. El producto principal fue DHA y la selectividad hacia GA fue de 4,2%. Se argumenta en dicho trabajo que la capa de hidróxidos del material sobre el que inmovilizan el complejo metálico genera un efecto sinérgico que ayuda a la activación del H_2O_2 para formar el enlace $M=O$ que es el responsable de producir la abstracción de átomos de hidrógeno del glicerol y formar DHA. Además, indican que el catalizador de Fe (III) ha sido menos activo que otros complejos, como los de Cr (III) ya que el Fe (III) posee una capa de valencia $3d^5$, la cual resulta más estable. Por su parte, Crotti et al. (2014) [14] obtuvieron conversiones comparables a los resultados de Jing et al. (2015) [13] utilizando complejos tipo base de Schiff de Fe (III), lo cual sugiere que este tipo de ligandos genera catalizadores que son más activos en la oxidación del glicerol.

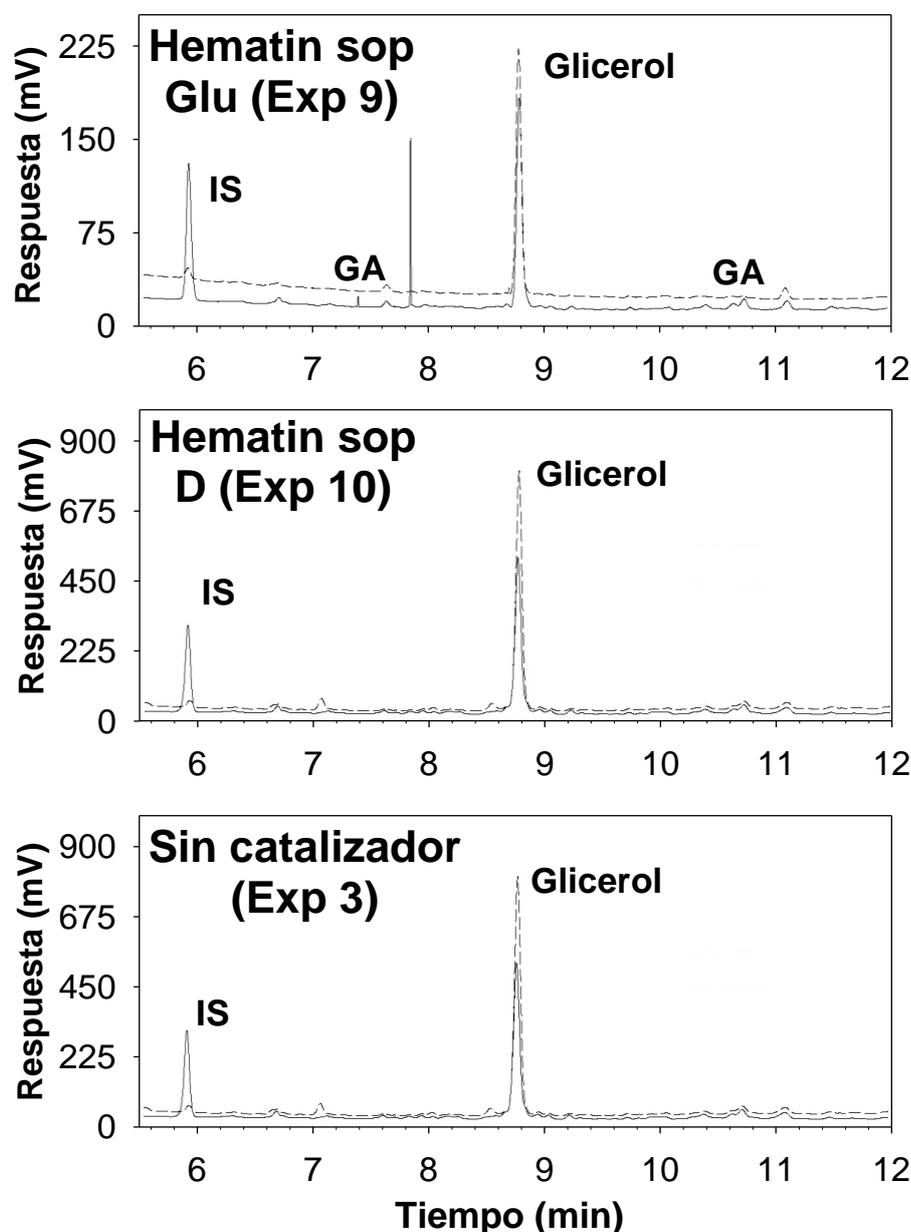


Figura 4.5. Cromatogramas de los medios de reacción. Líneas entrecortadas: al inicio de la reacción. Líneas continuas: luego de 6 h de reacción. Ver condiciones de reacción en la Tabla 4.1.

4.4.4 Oxidación de glicerol mediante sistema Fenton

Soluciones ácidas de glicerol fueron tratadas con H_2O_2 en presencia de $FeSO_4$. Efectivamente se pudo demostrar producción de GA por reactivo de Schiff (ver Tabla 4.1), la cual se incrementó con el aumento de la cantidad de $FeSO_4$ utilizada. En la Figura 4.6 se observan los cromatogramas de muestras de reacción de ambas experiencias. Aparecieron pequeños picos a 7,3 y a 8,1 min debido a la presencia de GA y de DHA, respectivamente. Sin embargo, también se observó la presencia de importantes picos a 6,6, 6,8 y 6,3 min en los medios de reacción tratados con mayores concentraciones de $FeSO_4$ y podrían deberse a otros productos de oxidación, como por ejemplo ácidos carboxílicos derivados de la sobreoxidación del glicerol [14,15]. Se confirma así que el proceso Fenton, si bien logra oxidar glicerol no es selectivo hacia los productos de su oxidación primaria. Farnetti et al. (2016) [15] observaron que se produce la oxidación de glicerol catalizada por cloruro ferroso y cloruro férrico para formar principalmente ácido fórmico, sin embargo, las concentraciones de hierro y de H_2O_2 fueron mucho más elevadas que las utilizadas en este trabajo.

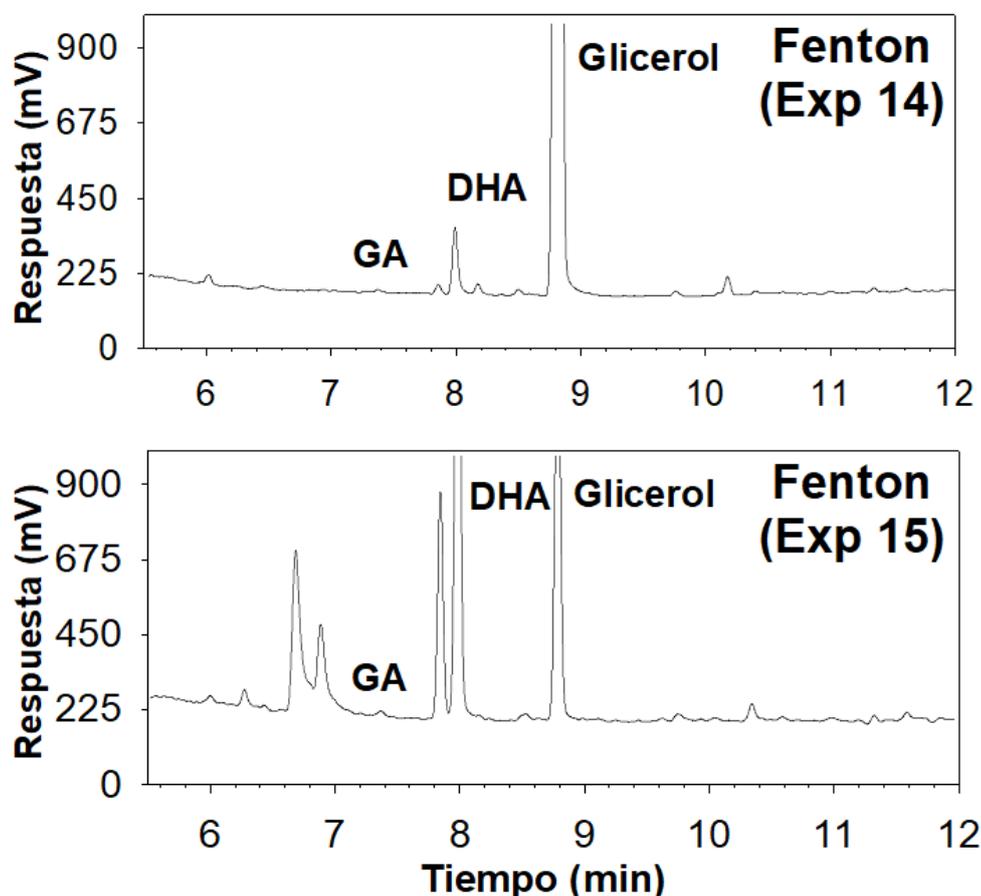


Figura 4.6. Cromatogramas de los medios de reacción. Experiencia 14: luego de 3 h de reacción. Experiencia 15: luego de 24 h de reacción.

4.4.5 Propuesta de mecanismo de reacción

Los sistemas de reacción de las Figuras 4.1 y 4.2 siempre burbujearon cuando se agregó H_2O_2 para iniciar la reacción, especialmente a pH elevado, muy probablemente debido a la actividad catalasa de hematin, como reacción secundaria. Trabajos anteriores demostraron la generación de oxígeno durante la oxidación de una tinta de la familia de las antraquinonas, catalizada por hematin [7]. La Figura 4.7 muestra la evolución de oxígeno en el tiempo durante el tratamiento con H_2O_2 de soluciones de hematin en buffer borato acuoso a pH 8,0. La cantidad de oxígeno disuelto aumentó durante los primeros min de la reacción

y fue mantenida. La frecuencia de recambio fue de $8,71 \text{ min}^{-1}$ (mmol de dismutación de H_2O_2 por min por mmol de catalizador). Este valor se encuentra en el rango encontrado para complejos metálicos mononucleares relacionados [16]. En un trabajo anterior, un mecanismo para interpretar la dismutación del H_2O_2 a pH alcalinos en presencia de hematin fue propuesto (Esquema 1.2 de capítulo 1) [17]. El mismo incluyó la acumulación de superóxido, el cual después de coordinarse al estado nativo de hematin termina generando oxígeno molecular.

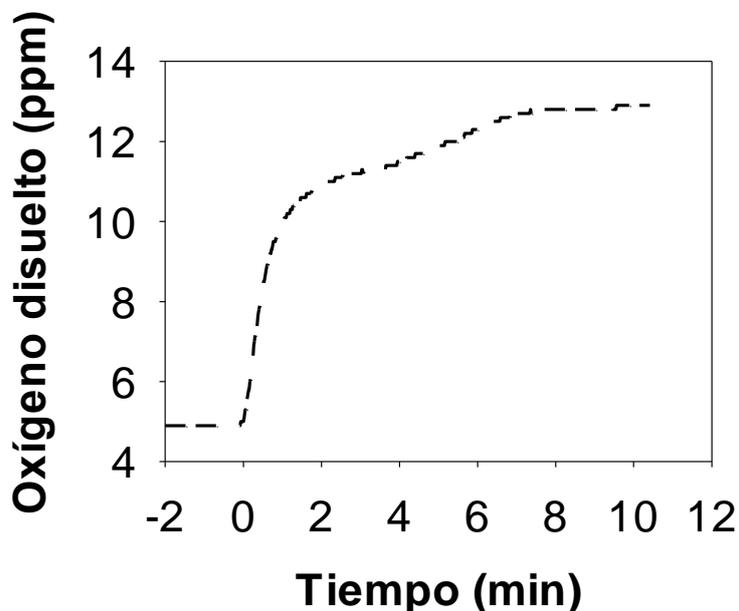


Figura 4.7. Evolución del oxígeno disuelto durante la reacción entre hematin y H_2O_2 en buffer borato pH 8,0. A los 0 min se agregó H_2O_2 al medio. $[\text{Hematin}] = 0,044 \text{ mM}$; $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 100 \text{ mM}$.

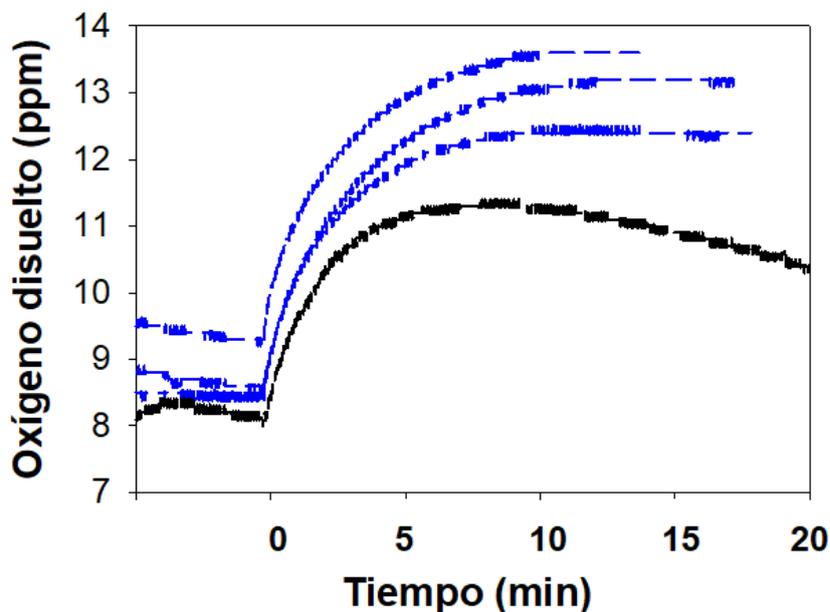
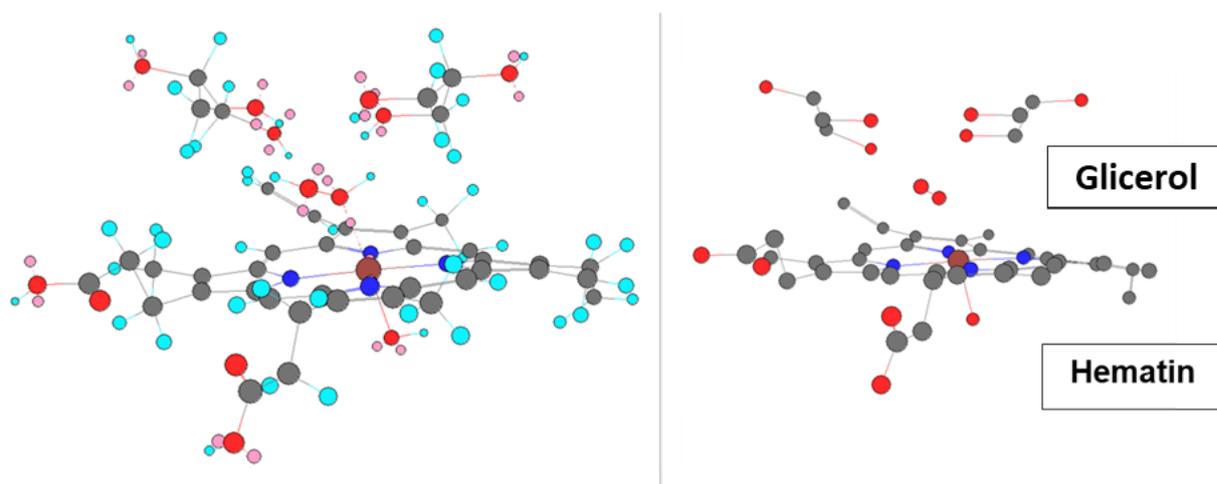


Figura 4.8. Evolución de oxígeno disuelto en buffer fosfato pH 7 en sistemas hematin/ H_2O_2 (curva negra) y hematin/glicerol/ H_2O_2 (curvas azules). $[\text{Hematin}] = 0,028 \text{ mM}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,0 \text{ mM}$; $[\text{glicerol}] = 1703 \text{ mM}$.

En la Figura 4.8 se muestra la evolución de oxígeno disuelto en medios amortiguados a pH 7. En negro, la curva obtenida para el sistema hematin/ H_2O_2 muestra un aumento del O_2 hasta los 10 min aproximadamente, tiempo a partir del cual empieza a disminuir. Las curvas en azul muestran la evolución cuando la concentración de glicerol en el medio es de 1703 mM. La frecuencia de recambio fue de 2,90

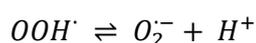
min^{-1} (mmol de dismutación de H_2O_2 por min por mmol de catalizador en ambos sistemas). Esto indica que la presencia de glicerol en el medio no favorece a la vía peroxidática de hematin, por lo cual el glicerol no es buen sustrato para hematin en estas condiciones.

Por otro lado, glicerol, peróxido de hidrógeno y hematin pueden verse involucrados en enlaces de puentes de hidrogeno de largo alcance. Estos enlaces de H podrían interferir con la velocidad de formación del catión oxoperferryl π -radical Fe(IV)=O . El Esquema 4.2 muestra la vista lateral de una molécula de H_2O_2 coordinada a hematin y dos moléculas de glicerol involucradas en la formación extensiva de puentes de hidrógeno.



Esquema 4.2. Peróxido de hidrógeno coordinado a hematin y dos moléculas de glicerol coordinadas a peróxido de hidrógeno. A la derecha se puede ver el sistema simplificado. Rojo: O, gris: C, azul: N, celeste: hidrógeno, rosa pálido: orbitales disponibles para enlaces.

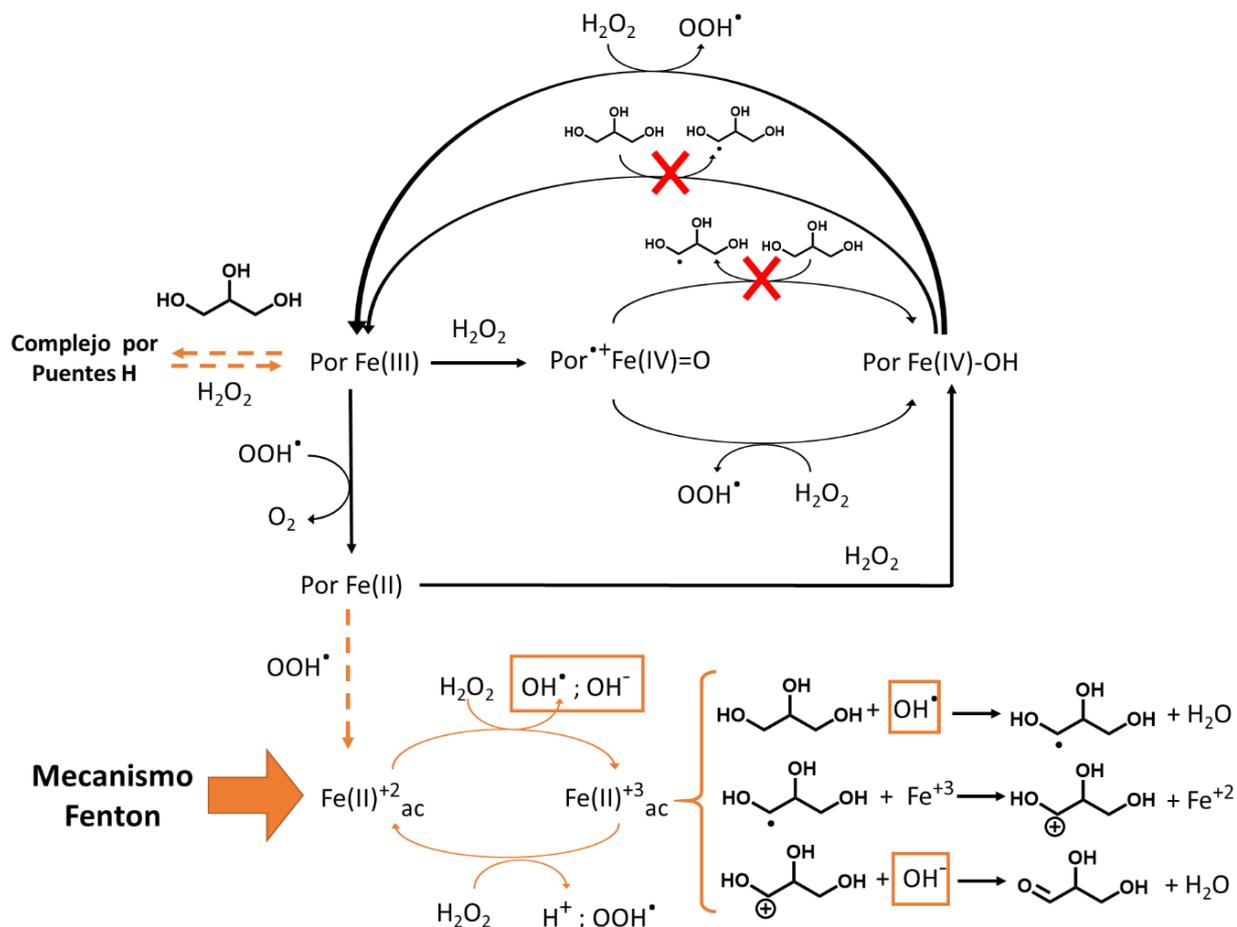
El mecanismo pseudocatalítico-peroxidático de hematin se representa en el Esquema 4.3. Se partió de un mecanismo reportado previamente [17] y presentado en el Esquema 1.2 (capítulo 1). Las líneas entrecortadas denotan nuevas rutas agregadas con la finalidad de interpretar la evidencia aquí presentada con glicerol como sustrato. Por otro lado, a pH ácidos el radical superóxido se encuentra protonado como radical hidroperóxido según:



Con un pK igual a 4.8 [17]. Por tal motivo el radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ fue reemplazado por el OOH^{\cdot} en relación al Esquema 1.2 del capítulo 1. De esta manera, la principal premisa de este mecanismo plantea que el Compuesto I y el Compuesto II de hematin no son capaces de ejercer su capacidad peroxidática de extraer un hidrógeno de la molécula de glicerol a diferencia de sustratos fenólicos. En su lugar, la reacción procede por la coordinación de una segunda molécula de peróxido de hidrógeno. Esta última coordinación genera radicales superóxido. Estos últimos se coordinan con el estado basal de hematin generando oxígeno molecular y la especie F(II)-OO (E_{Fe}), aunque también atacan la estructura del catalizador, siendo ambos procesos responsables del blanqueamiento observado. Este proceso de blanqueamiento está asociado a la inactivación irreversible de hematin y a la pérdida de actividad del catalizador [3].

De hecho, Ferreira (2003) [18] indica en su estudio UV/visible del sistema hematin- H_2O_2 que la disminución irreversible de la banda Soret de hematin a tiempo prolongado se debe a la generación de especies de hematin con Fe(III) o Fe(II) unidas a oxígeno molecular. El ataque de radicales libres sobre el anillo porfirínico libera al medio el hierro de la estructura de hematin [6]. Luego, el hierro liberado posibilita la oxidación observada de glicerol hacia GA a través de un mecanismo tipo Fenton, el cual es

operativo a valores de pH menores a 4,5 [6]. En el Esquema 4.3 se representa el mecanismo Fenton y la serie de reacciones que llevan a la oxidación del glicerol por medio de este mecanismo.



Esquema 4.3. Mecanismo propuesto para la acción de hematin sobre glicerol (ROH). Las líneas coloreadas denotan nuevas rutas añadidas. Las rutas marcadas con una cruz son rutas no favorecidas en presencia de glicerol como sustrato. *Referencias:* Por Fe (III): estado nativo de hematin; (Por•+ Fe(IV)=O): Compuesto I; Por Fe (IV)-OH: Compuesto II.

Esta propuesta de mecanismo permite explicar los principales hallazgos encontrados a lo largo de este capítulo, a saber:

- El blanqueamiento y el burbujeo durante las reacciones, ya que las rutas de coordinación de hematin con H_2O_2 serían las únicas efectivas.
- La mayor oxidación de glicerol hacia el aldehído con hematin mientras menor fue el pH, ya que el proceso Fenton con hematin sería operativo solo a pH ácidos.
- Una alta dosis de hematin y el agregado gradual de H_2O_2 logró evitar el blanqueamiento de hematin y el burbujeo, aunque no mejoró sustancialmente la oxidación de glicerol, ya que para que el hierro se libere y sea operativo según el proceso Fenton, hematin precisaría previamente ser blanqueada.
- La nula (con catalizador D) o escasa (con catalizador GLU) actividad en hematin inmovilizado en la oxidación de glicerol, ya que la liberación de hierro se vería impedida con el anclaje a un soporte, más aún con el catalizador D en el cual no se ha proporcionado un brazo espaciador.

- El menor grado de oxidación con hematin en relación con el sistema Fenton, ya que el hierro en hematin se iría liberando gradualmente conforme ésta se blanquea.

4.5 Conclusiones del capítulo

Los productos de oxidación primaria del glicerol son GA y DHA. Dado que GA posee actividad antimicrobiana (Capítulo 2) este estudio se focalizó en producirlo a través de procesos catalíticos. Así, los ensayos de oxidación de glicerol con hematin en solución fueron monitoreados a través de la detección de la formación de aldehído por medio del reactivo de Schiff. Se pudo observar que la producción de GA se vio favorecida a un pH de 5, obteniéndose una concentración de 12 mM a partir de 1000 mM de glicerol luego de 6 h de reacción. Ensayos realizados modificando las concentraciones de oxidante y de glicerol mostraron una mayor producción de GA luego de 5 h a concentraciones de H₂O₂ de 202 mM y de glicerol cercana a 500 mM, alcanzando una concentración de GA de 12 mM aproximadamente, aunque en todos los casos se observó blanqueamiento de hematin. Una experiencia llevada a cabo con una concentración más elevada de hematin fue capaz de prevenir su blanqueamiento, pero gran parte del hematin se encontraba insolubilizado. La concentración de GA en este ensayo fue la máxima alcanzada e igual a 25 mM luego de 24 h de incubación. Cabe aclarar que no se ha empleado cromatografía gaseosa para monitorear los ensayos realizados con hematin en medio homogéneo, ya que en el momento en que estas experiencias fueron realizadas no se disponía de una precolumna en el cromatógrafo, la cual se agrega para retener compuestos no volátiles que pueden depositarse en la columna, disminuyendo su vida útil y afectando a los resultados de los análisis.

Por otro lado, se ensayó la inmovilización de hematin sobre un soporte de polimetacrilato por medio de enlaces covalentes y electrostáticos como una estrategia para evitar su blanqueamiento. Todos los catalizadores demostraron actividad peroxidática hacia fenol sin evidenciar blanqueamiento. No obstante, la eficiencia de la inmovilización resultó ser unas 12,5 veces mayor por medio de uniones electrostáticas. Por otro lado, este catalizador mantuvo actividad durante 4 ciclos de reuso y lavado. No obstante, estos catalizadores mostraron escasa o nula actividad en la oxidación de glicerol y fueron blanqueados durante la reacción. Determinaciones por cromatografía gaseosa del medio de reacción a distintos tiempos confirmaron la generación de GA.

De esta manera, GA fue el único producto de reacción identificado bajo condiciones suaves de operación y en ausencia de solventes orgánicos. No obstante, la conversión de glicerol y la producción de GA alcanzadas resultaron marginales.

El mecanismo de reacción propuesto implica la activación del hematin con H₂O₂ para formar un estado intermediario reactivo, el cual es capaz de reaccionar con una molécula de glicerol o con otra de H₂O₂ para generar radicales libres. Al ser las conversiones de glicerol registradas bajas y por observarse blanqueamiento de hematin, se incluyeron nuevas vías al mecanismo de reacción para explicar el comportamiento observado. Particularmente, se agregó la vía de degradación de hematin provocada por radicales superóxido con la consecuente liberación en la solución de Fe⁺². Posteriormente, éste desencadena una serie de reacciones radicalarias que llevan a la formación de gliceraldehído. La relación entre radicales peroxo y superóxido depende del pH del medio. Ambos radicales pueden combinarse para formar oxígeno diatómico, sin embargo, también son agentes oxidantes muy activos y son capaces de degradar la materia orgánica, como la molécula de glicerol. De hecho, se pudo confirmar que el tratamiento de soluciones de glicerol por medio de un sistema Fenton fue efectivo. La cinética de producción de aldehído con hematin brindó velocidades iniciales iguales a cero, las cuales son consistentes con un mecanismo radicalario en un esquema de reacciones consecutivas en el cual GA es el producto de la interacción de los radicales inorgánicos generados previamente y el glicerol. Los radicales

peroxo y superóxido también se encuentran involucrados en la degradación de porfirinas [19], lo cual se manifiesta en los experimentos llevados a cabo en este capítulo como blanqueamiento de hematin.

La producción de oxígeno diatómico catalizada por hematin a partir de H₂O₂ disminuye y en algunos casos es totalmente suprimida en presencia de sustratos reductores como el fenol [20]. De hecho, los sustratos reductores actúan como agentes protectores contra la inactivación suicida de la peroxidasa de rábano picante (HRP), de la cual hematin es una estructura biomimética [19]. De este modo, el glicerol parece no ser un buen sustrato para el Compuesto I de hematin y la oxidación marginal observada puede deberse tanto a la acción directa de radicales superóxido sobre moléculas de glicerol como a un mecanismo Fenton, el cual es activado cuando el hierro es liberado de la estructura de la porfirina al medio de reacción durante el blanqueamiento.

4.6 Resultados publicados

Los resultados de este capítulo fueron publicados en:

- Parodi, Adrián R.; Merlo, Carolina; Córdoba, Agustina; Palopoli, Claudia; Ferreyra, Joaquín; Signorella, Sandra; Ferreira, María L.; Magario, Ivana. **“Application of metal complexes as biomimetic catalysts on glycerol oxidation”**. *Molecular Catalysis* 481 (2020), 110236. DOI: 10.1016/j.mcat.2018.11.007.

Asimismo, se presentaron los siguientes trabajos a Congresos:

- Parodi, A. R.; Córdoba, A.; Palopoli, C.; Signorella, S.; Ferreira M. L.; Magario, I. M. **“Aplicación de complejos metálicos como catalizadores biomiméticos en la oxidación de glicerol”**. XX Congreso Argentino de Catálisis (XX CAC 2017). Córdoba, Argentina, November 1-3, 2017.
- Parodi, A.; Sappia P.; Falco, M.; Zygadlo J.; Ferreira M. L.; Magario, I. M. **“Valorization of By-Products from Biomass Processing Through Bio-Catalytic Oxidation”**. 2nd RCN Conference on Pan American Biofuels & Bioenergy Sustainability. Buenos Aires, Argentina, September 13-16, 2016.
- A. R. Parodi, F. Kröhl, I. M. Magario. **“Hematin inmovilizado. Evaluación de su estabilidad y actividad oxidativa hacia glicerol”**. IV Reunión Interdisciplinaria de Tecnología y Procesos Químicos (RITeQ 2018). Villa Carlos Paz, Argentina, mayo 29 – junio 1, 2018.
- F. Ovejero, F. Lesser, N. Gañán, A. Parodi, I. Magario. **“Derivados oxidados de glicerol: obtención e impregnación en film polimérico”**. IV Reunión Interdisciplinaria de Tecnología y Procesos Químicos (RITeQ 2018). Villa Carlos Paz, Argentina, mayo 29 – junio 1, 2018.

4.7 Referencias

- [1] A. Córdoba, I. Magario, M.L. Ferreira, Modified chitosan as an economical support for hematin: Application in the decolorization of anthraquinone and azo dyes, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90 (2015) 1665–1676. <https://doi.org/10.1002/jctb.4475>.
- [2] Farmacopeia Argentina. 7th Edition, Ministry of Health of The Nation, 2003.
- [3] A. Córdoba, N. Alasino, M. Asteasuain, I. Magario, M.L. Ferreira, Mechanistic evaluation of hematin action as a horseradish peroxidase biomimetic on the 4-aminoantipyrine/phenol oxidation reaction, *Chem. Eng. Sci.* 129 (2015) 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.02.031>.
- [4] M. Panas, J. Lukaszewicz, Stabilizing influence of hematin on the properties of the oxygen-sensitive

- carbon electrode, *Sensors Actuators, B Chem.* (1999). [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(99\)00014-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(99)00014-3).
- [5] W.D. Nicoll, A.F. Smith, Stability of Dilute Alkaline Solutions of Hydrogen Peroxide, *Ind. Eng. Chem.* 47 (1955) 2548–2554. <https://doi.org/10.1021/ie50552a051>.
- [6] I. Magario, F.S. García Einschlag, E.H. Rueda, J. Zygadlo, M.L. Ferreira, Mechanisms of radical generation in the removal of phenol derivatives and pigments using different Fe-based catalytic systems, *J. Mol. Catal. A Chem.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2011.10.006>.
- [7] A. Córdoba, I. Magario, M.L. Ferreira, Experimental design and MM2–PM6 molecular modelling of hematin as a peroxidase-like catalyst in Alizarin Red S degradation, *J. Mol. Catal. A Chem.* 355 (2012) 44–60. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATA.2011.12.011>.
- [8] A.R. Parodi, C. Merlo, A. Córdoba, C. Palopoli, J. Ferreyra, S. Signorella, M.L. Ferreira, I. Magario, Application of metal complexes as biomimetic catalysts on glycerol oxidation, *Mol. Catal.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.11.007>.
- [9] I. Magario, A. Neumann, E. Oliveros, C. Syltatk, Deactivation kinetics and response surface analysis of the stability of alpha-L-rhamnosidase from *Penicillium decumbens.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 152 (2009) 29–41.
- [10] F. Lesser, F. Ovejero, Derivados oxidados de glicerol: Obtención e impregnación en film polimérico comercial, Universidad Nacional de Córdoba - Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 2018.
- [11] S. Pirillo, E.H. Rueda, M.L. Ferreira, Supported biocatalysts for Alizarin and Eriochrome Blue Black R degradation using hydrogen peroxide, *Chem. Eng. J.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.07.057>.
- [12] I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron, Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *Biotechniques.* (2004).
- [13] L.U.O. Jing, L.I. Hong-guang, Z. Ning, W. Feng, X. Fu-kui, Selective oxidation of glycerol to dihydroxyacetone over layer double hydroxide intercalated with sulfonato-salen metal complexes, 43 (2015).
- [14] C. Crotti, E. Farnetti, Selective oxidation of glycerol catalyzed by iron complexes, *J. Mol. Catal. A Chem.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2014.10.021>.
- [15] E. Farnetti, C. Crotti, Selective oxidation of glycerol to formic acid catalyzed by iron salts, *Catal. Commun.* 84 (2016) 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2016.05.014>.
- [16] S. Signorella, C. Palopoli, G. Ledesma, Rationally designed mimics of antioxidant manganoenzymes: Role of structural features in the quest for catalysts with catalase and superoxide dismutase activity, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.005>.
- [17] C. Cabrera, A. Cornaglia, A. Córdoba, I. Magario, M.L. Ferreira, Kinetic modelling of the hematin catalysed decolourization of Orange II solutions, *Chem. Eng. Sci.* 161 (2017) 127–137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.11.049>.
- [18] M.L. Ferreira, UV / Visible Study of the Reaction of Oxidoreductases and Model Compounds with H₂O₂, *Macromol. Biosci.* 3 (2003) 179–188. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mabi.200390026>.
- [19] W. Al Zoubi, Y.G. Ko, Organometallic complexes of Schiff bases: Recent progress in oxidation catalysis, *J. Organomet. Chem.* 822 (2016) 173–188. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2016.08.023>.

- [20] H. Hosseini-Monfared, C. Näther, H. Winkler, C. Janiak, Highly selective and “green” alcohol oxidations in water using aqueous 10% H₂O₂ and iron-benzenetricarboxylate metal-organic gel, *Inorganica Chim. Acta.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.05.007>.

Capítulo 5: Complejo mononuclear de manganeso en reacciones de oxidación

5.1 Objetivo del capítulo

Los objetivos de este capítulo son:

- Evaluar el desempeño del complejo MnL^- en la oxidación primaria de glicerol bajo diversas condiciones de reacción.
- Discutir los rendimientos de reacción encontrados en base a propuestas de mecanismos de vías de reacción deseadas y no-deseadas.

Los antecedentes y motivos que fundamentan esta tarea se encuentran detallados a lo largo del capítulo 1 de la presente tesis.

5.2 Materiales

Fenol y 4-aminoantiripirina fueron obtenidos de Tetrahedron (Godoy Cruz, Argentina), el glicerol y H_2O_2 se adquirieron de Cicarelli (Santa Fe, Argentina). La fucsina básica fue comprada a Anhedra (Tigre, Argentina). Hematin porcino (PM: 633,49 g/mol) y gliceraldehído fueron adquiridos a través de Sigma Aldrich (San Luis, Estados Unidos). Todos los otros reactivos utilizados en este capítulo fueron de grado analítico, a excepción del bórax (grado técnico). El complejo $Mn(5-SO_3-salpn)$ (PM = 620 g/mol), donde (5- $SO_3-salpn$) es el ligando 1,3-bis(5-sulfonatosalilcilidenamino) propano y cuya sal de sodio se representa como $NaMnL$ (estructura en el Capítulo 1, Figura 1.6), se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito por Moreno et al. (2010) [1] y fue proporcionado por el Instituto de Química Rosario (IQUIR- CONICET).

5.3 Métodos

5.3.1 Oxidación de glicerol con MnL^-

El complejo MnL^- se disolvió en agua destilada para dar una solución madre de 31 g/L. Las condiciones de reacción utilizadas para los ensayos fueron: $[MnL^-] = 1,00$ mM, $[Glicerol] = 500$ mM; $[H_2O_2] = 81$ mM, temperatura ambiente y como solventes se utilizaron agua destilada y mezclas agua destilada/acetronitrilo en proporción 1:1. Los medios de reacción fueron agitados. Las reacciones fueron iniciadas por el agregado de H_2O_2 en una sola etapa. Se tomaron muestras de 200 μ L a diferentes intervalos de tiempo y se mezclaron con 800 μ L de reactivo de Schiff, cuyo procedimiento de preparación fue descrito en la Sección 4.2.5. Las mezclas se dejaron reaccionar por 30 min a temperatura ambiente y finalmente se midió la absorbancia a 560 nm para determinar la concentración a través de una curva de calibración, la cual brindó un coeficiente de extinción a 560 nm de $0,039 (\pm 0,013)$ $mM^{-1}cm^{-1}$ con un valor de $R^2=0,98$.

5.3.2 Actividad catalítica de MnL^-

Se disolvió el complejo $NaMnL$ en 5 mL de buffer borato 0,05 M pH 8,0 para dar una solución de concentración final igual a 2,1 mM. Los perfiles de oxígeno disuelto se midieron siguiendo la metodología ya descrita en el capítulo 4.

5.3.3 Actividad peroxidática de MnL^-

Las pruebas de actividad peroxidática se llevaron a cabo por medio de la reacción entre fenol/4-AAP/ H_2O_2 a temperatura ambiente en cubetas plásticas, siguiendo la metodología descrita en el capítulo 4. La influencia del solvente en la actividad peroxidática del complejo MnL^- y comparativamente de hematin, fue evaluada a través de esta reacción. Las concentraciones de los distintos reactivos en las cubetas fueron las siguientes: fenol (8,00 mM), 4-AAP (0,11 mM) y H_2O_2 (17 mM). En las experiencias con

hematin, su concentración fue de 0,01 mM y en el caso del complejo MnL^- , su concentración fue de 0,08 mM. Los siguientes solventes fueron testeados: buffer borato 0,05 M pH 8,0 y mezclas 50:50 de dicho buffer con dimetilsulfóxido (DMSO) o acetona. Se dio inicio a las reacciones por la adición en un paso de H_2O_2 , la cubeta fue tapada e invertida tres veces antes de colocarse en el portacubetas. Luego, se determinó el espectro visible en zona 300 – 800 nm al inicio de la reacción y a los 10 min empleando un espectrofotómetro UV/visible Perkin-Elmer Lambda 35 (Massachusetts, Estados Unidos).

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Oxidación de glicerol con complejo MnL^-

Una gran variedad de complejos de Mn(III) es utilizada comúnmente en acetonitrilo como medio solvente [2] y el complejo MnL^- es también soluble en agua [1]. Por esta razón, se utilizaron agua y mezclas agua/acetonitrilo en proporción 1:1 como solventes en la reacción de oxidación de glicerol. La figura 5.1 muestra la producción de aldehído durante el tratamiento de soluciones de glicerol a los cuales se añadió el complejo MnL^- y H_2O_2 .

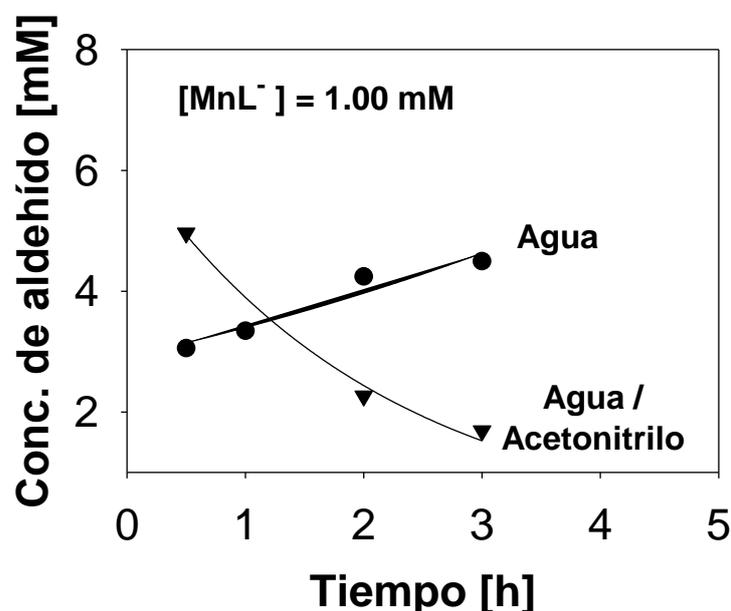


Figura 5.1. Evolución de aldehído durante el tratamiento de soluciones acuosas de glicerol con MnL^-/H_2O_2 . Condiciones de reacción: $[MnL^-]= 1,00$ mM; $[Glicerol]= 500$ mM; $[H_2O_2]= 81$ mM; Temperatura ambiente.

La concentración de aldehído llegó hasta 5 mM en el sistema MnL^-/H_2O_2 , el cual fue equivalente a valores medidos en ausencia del complejo metálico bajo condiciones de reacción similares (5,2 y 5,3 mM de GA en las entradas 1 y 2 de la Tabla 4.1 –Capítulo 4). Por otro lado, se observó caída en la concentración de aldehído en la mezcla acetonitrilo/agua como solvente. Este resultado puede atribuirse a una sobre oxidación del aldehído para formar ácido carboxílico. Esto último fue observado en el caso del uso de $[Cr(SO_3-salen)]^+$ (salen = 1,2-bis(salicilidenamino)etano) en acetonitrilo: agua en proporción 1:1 como solvente [3] y en el caso de $[Mn(SO_3-salen)]^-$ inmovilizado en agua como solvente [4]. Estos complejos brindaron bajas conversiones de glicerol en presencia de H_2O_2 , siendo el ácido fórmico el producto de reacción mayoritario. A diferencia de lo que ocurrió con el glicerol, los complejos Mn(III) de bases de Schiff han demostrado catalizar eficientemente la oxidación de alcoholes primarios y secundarios a los correspondientes productos carbonílicos utilizando H_2O_2 como oxidante terminal, en acetonitrilo [5], acetonitrilo/ H_2O [6] y líquidos iónicos [7]. Adicionalmente, Shul'pin et al. (2010) [8] utilizaron el complejo

dinuclear de Mn: $[\text{LMn}(\mu\text{-O})_3\text{MnL}](\text{PF}_6)_2$ donde L es 1,4,7-trimetil-1,4,7-triazaciclononano (un ligando tridentado que posee tres grupos amino) tanto en solución como inmovilizado sobre $[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ y reportaron conversiones de glicerol de hasta un 45% y selectividades hacia DHA de hasta un 15%. No se obtuvo gliceraldehído en dichos experimentos.

5.4.2 Actividad catalítica y peroxidática del complejo MnL^-

La Figura 5.2 muestra la evolución del oxígeno disuelto en función del tiempo cuando se agrega H_2O_2 a una solución del catalizador en buffer borato pH 8,0 y en ausencia de un sustrato reductor. El valor de la frecuencia de recambio para esta reacción fue de $1,04 \text{ min}^{-1}$ (mmol de dismutación de H_2O_2 por min por mmol de MnL^-). En este caso, a diferencia de lo que se observó con hematin (ver Figura 4.7 en la Sección 4.4.5), la concentración de oxígeno se disparó al inicio de la reacción, pero se detuvo rápidamente. Una posible explicación a esta observación es que durante la reacción se produzca un proceso de inactivación del catalizador debido a la oxidación irreversible del Mn en el complejo metálico. Como se observa en la Figura 5.2, la concentración de oxígeno comienza a decrecer luego de los 20 s. Este consumo de oxígeno sugiere que, en las condiciones básicas empleadas en este ensayo, la dimerización aeróbica de MnL^- puede verse favorecida, dando lugar a la formación de un dímero de Mn(IV) bis-oxo unido a través de la “reacción de la catalasa inversa” como se ha observado previamente en un complejo Mn-salen relacionado [9].

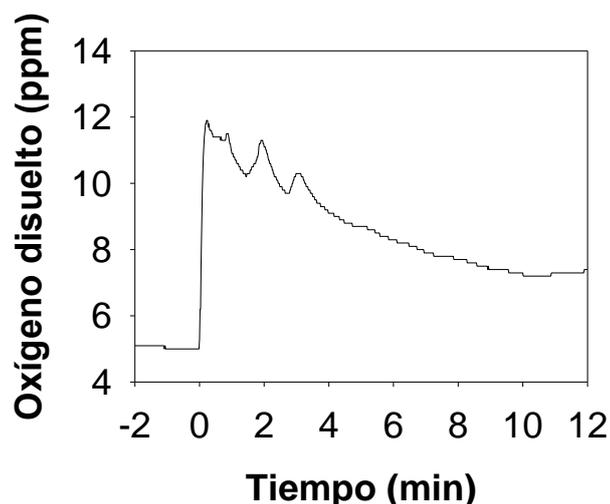


Figura 5.2. Evolución del oxígeno disuelto de una solución en buffer borato pH 8,0 de $\text{MnL}^-/\text{H}_2\text{O}_2$. El H_2O_2 se agregó a los 0 min. $[\text{MnL}^-] = 2,1 \text{ mM}$; $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 100 \text{ mM}$.

La Figura 5.3 muestra el espectro visible del medio de reacción fenol/4-amininoantipirina al inicio de la reacción y luego de 10 min en sistemas tratados con el complejo MnL^- y, por otro lado, con hematin. Las elevadas concentraciones de MnL^- utilizadas interfieren con el espectro de la tinta en la región entre 300 y 400 nm. Sin embargo, la reacción llevada a cabo en un sistema blanco que consistió en una mezcla de $\text{MnL}^-/\text{H}_2\text{O}_2$ (esto es, en ausencia de fenol y de 4-aminoantipirina) reveló que no hubo evolución del pico a 510 nm, con lo cual este pico es suficiente para indicar la formación de quinonaimina.

En los sistemas mostrados en la Figura 5.3 se observa que la intensidad alcanzada por el pico a 510 nm luego de 10 min de reacción es baja y similar a la que se observa al inicio de la reacción. Por lo tanto, MnL^- demostró poseer actividad peroxidática, la cual se detiene luego de cierto tiempo al igual que lo observado en los ensayos de determinación de la actividad catalítica. Se obtuvo un número de recambio de $0,035 \text{ min}^{-1}$ (mmol de quinonaimina por min por mmol de catalizador) durante el primer minuto de reacción. Este valor es dos órdenes de magnitud menor al reportado para un complejo dinuclear de manganeso en condiciones similares [10].

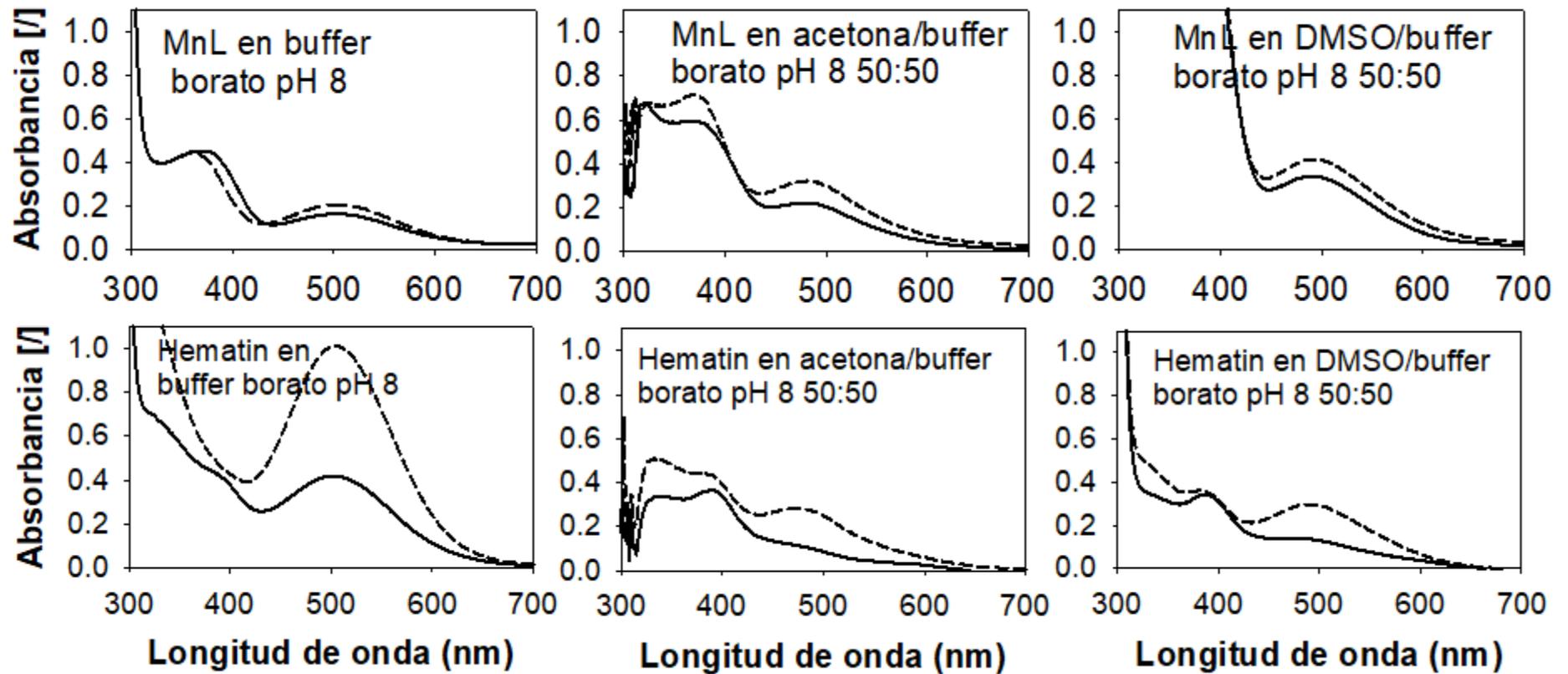


Figura 5.3. Espectro UV/visible de sistemas de reacción fenol/4-AAP/H₂O₂ a tiempo cero (líneas continuas) y a los 10 min (líneas punteadas). Arriba: experiencias con el complejo MnL. Abajo: experiencias con hematin. Condiciones de reacción: fenol (8,00 mM), 4-AAP (0,11 mM) y H₂O₂ (17 mM).

Por otro lado, se evidenció un notable aumento de la absorbancia a 510 nm luego de 10 min de reacción cuando el complejo se utilizó con mezclas de solventes (Figura 5.3 -al medio y a la derecha-), alcanzándose incrementos de hasta 2 veces en la actividad debido a la adición de DMSO. Se observó en todos los casos un leve burbujeo, producto de la actividad catalítica de MnL^- .

Por otro lado, la formación de la quinonaimina catalizada por hematin a pH neutro fue demostrada en un trabajo previo [11] y discutida en el capítulo 4. Como se esperaba, hematin también mostró actividad peroxidática en buffer borato a pH 8. Contrariamente a lo observado con el complejo de Mn, la actividad peroxidática fue inhibida cuando se utilizaron mezclas de solventes y hematin como catalizador (Figura 5.3 -abajo-). Las constantes dieléctricas de las mezclas de solventes utilizadas son menores comparadas con las de las soluciones acuosas, con lo cual, en estos casos, se promueve la ruptura homolítica del enlace O-O de la molécula de H_2O_2 [12]. Sin embargo, de acuerdo con el mecanismo peroxidático para hematin, se requiere de una ruptura heterolítica de este enlace para dar el catión oxoperferril π radical $Fe(IV)=O$ (esto es, el mimético del compuesto I del ciclo catalítico de las peroxidasas) responsable de la abstracción de un átomo de hidrógeno de la molécula de fenol [11].

En un trabajo previo [13] se evaluó la actividad del complejo MnL^- en una mezcla de dimetilformamida (DMF) y agua en proporción 1:6 en la reacción de la formación de la quinonaimina. Se encontró una frecuencia de recambio inicial de $0,45 \text{ min}^{-1}$ (mmol de aducto por min por mmol de catalizador), unas 70 veces más rápido que en ausencia del complejo. La velocidad de oxidación catalítica del fenol se encontró en el rango reportado para otros complejos del tipo base de Schiff [14–16]. Además, se determinó que un 1% del catalizador sería la mejor proporción para producir la oxidación del fenol con H_2O_2 . Menores proporciones produjeron menores velocidades y proporciones más altas en medio básico (10% en buffer borato pH 8) favorecen la dimerización del complejo y, en consecuencia, la actividad se reduce.

El complejo MnL^- se encuentra en forma de monómeros en disolución acuosa [1]. Los solventes con mayor poder dador de electrones (Donor Number) favorecen la formación del complejo mononuclear de alto estado de valencia Mn(IV) o Mn(V), involucrado en la oxidación del fenol. La formación del complejo mononuclear Mn(IV/V) oxidado compite con la dimerización aeróbica de MnL^- en medio básico, la cual produce una estructura de Mn(IV) en donde los átomos metálicos están unidos a través de dos puentes de oxígeno [17]. Una posible estructura para el dímero se esquematiza en la Figura 5.4. Este dímero de Mn(IV) no posee actividad peroxidática y, por lo tanto, no produce la banda de absorción a 510 nm en mezclas de fenol, 4-AAP y H_2O_2 , al igual que otro dímero de Mn(IV) con doble puente de O sintetizado independientemente, siguiendo un método reportado en la literatura [18].

Por otro lado, en un trabajo en cooperación con la Dra. Signorella (Instituto de Química Rosario, IQUIR-CONICET-UNR) se utilizó una técnica que es sensible a electrones desapareados, denominada resonancia paramagnética electrónica (EPR, por sus siglas en inglés). Las mediciones se realizaron en modo perpendicular para monitorear el estado de oxidación del Mn durante la reacción del complejo MnL^- con fenol en presencia de H_2O_2 . Como medio de reacción se utilizó una mezcla de buffer borato y DMSO en proporción 1:1 [13]. Los datos obtenidos a través de dicha técnica indican que se produce la formación de una especie de Mn(II) luego del agregado de H_2O_2 , la cual decae rápidamente y solo una señal residual de una especie Mn(II) desacoplada persistió por periodos prolongados, probablemente por la liberación de Mn^{2+} del complejo reducido al medio. Estas observaciones sugieren que, a cortos tiempos de reacción, la actividad peroxidática de MnL^- puede tener lugar a través de un ciclo que involucra a las especies activas Mn(IV)/Mn(II), las cuales se inactivan rápidamente de acuerdo a los resultados espectrofotométricos discutidos en esta sección. El contenido de Mn^{+2} de la mezcla final constituyó un 10% de la concentración inicial de MnL^- , por lo que la mayor parte del complejo se convirtió en una especie inactiva que no produce señal en EPR. El candidato más probable para esta especie inactiva es un dímero Mn(IV)Mn(IV) con doble

puente de oxígeno silencioso en EPR, cuya formación se favorece en medio básico y probó ser inactivo en el test del fenol/4-aminoantipirina.

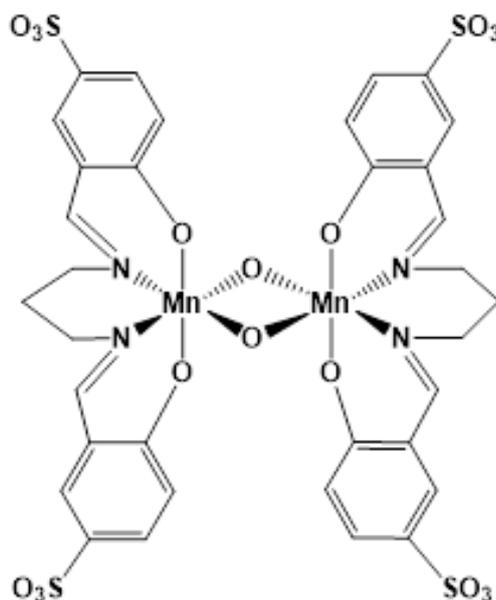
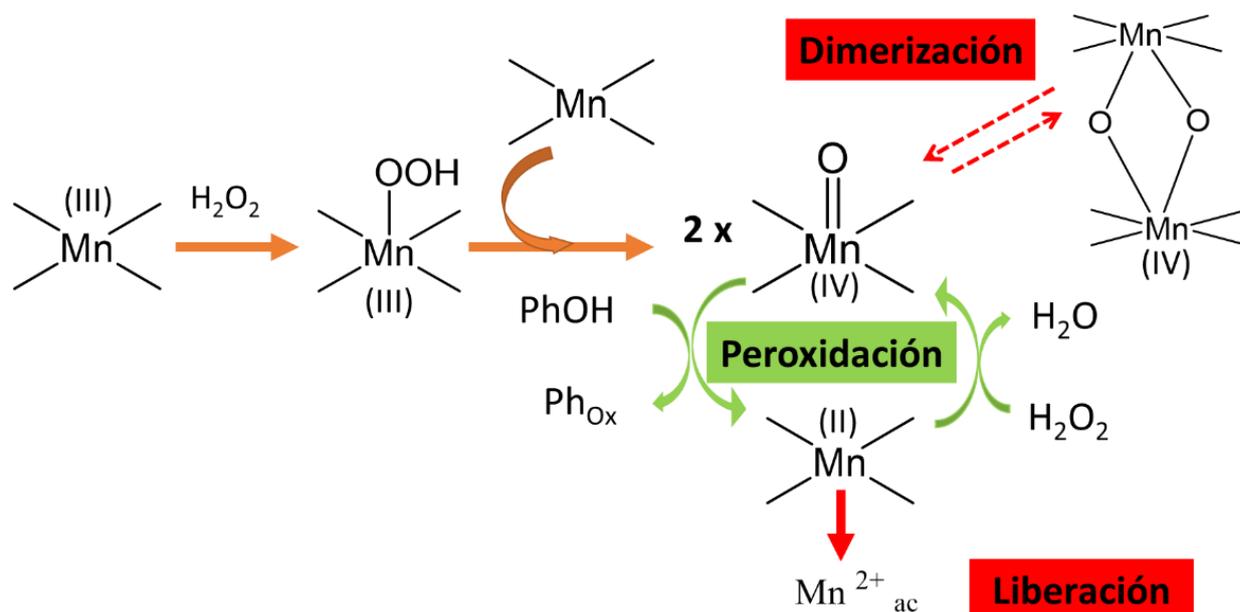


Figura 5.4. Posible estructura del complejo de Mn formado durante la dimerización aeróbica.

En el esquema 5.1 se muestra un mecanismo de reacción que resume las evidencias espectroscópicas y cinéticas encontradas en los ensayos de actividad peroxidática del complejo MnL^+ , incluidas la formación del dímero inactivo $Mn(IV)Mn(IV)$ con doble puente de oxígeno.



Esquema 5.1. Mecanismo propuesto para las reacciones competitivas de peroxidación y dimerización del complejo MnL^+ .

5.5 Conclusiones

El complejo mononuclear MnL^- no presentó propiedades catalíticas para la producción de GA a partir de soluciones de glicerol tratadas con H_2O_2 . Por medio del reactivo de Schiff se pudo determinar como máximo una concentración de GA de 5 mM a partir de una solución de glicerol 500 mM, lo cual representa concentraciones de GA similares a las alcanzadas en ausencia de catalizador en condiciones similares (Capítulo 4). Cuando el solvente fue acetonitrilo/agua se observó un decaimiento de la producción de aldehído lo que podría indicar sobreoxidación de glicerol.

Por otro lado, tanto la actividad catalítica como la peroxidática de MnL^- mostraron un rápido decaimiento en los ensayos llevados a cabo en buffer básico acuoso. El agregado de solventes con capacidad dadora de electrones como DMSO o acetona al sistema mejoraron la actividad peroxidática, debido a la promoción de la formación de especies de Mn (IV) o Mn (V). Finalmente, la espectroscopía por EPR de MnL^- dio soporte a la hipótesis de la formación de dímeros inactivos del complejo luego del agregado de H_2O_2 , con lo cual el complejo se inactiva rápidamente.

5.6 Resultados publicados

Los resultados de este capítulo fueron publicados en:

- Parodi, Adrián R.; Merlo, Carolina; Córdoba, Agustina; Palopoli, Claudia; Ferreyra, Joaquín; Signorella, Sandra; Ferreira, María L.; Magario, Ivana. **“Application of metal complexes as biomimetic catalysts on glycerol oxidation”**. *Molecular Catalysis* 481 (2020), 110236. DOI: 10.1016/j.mcat.2018.11.007.

Asimismo, se presentó el siguiente trabajo a Congreso:

- Parodi, A. R; Córdoba, A.; Palopoli, C.; Signorella, S.; Ferreira M. L.; Magario, I. M. **“Aplicación de complejos metálicos como catalizadores biomiméticos en la oxidación de glicerol”**. XX Congreso Argentino de Catálisis (XX CAC 2017). Córdoba, Argentina, 1-3 noviembre, 2017.

5.7 Referencias

- [1] D. Moreno, V. Daier, C. Palopoli, J.-P. Tuchagues, S. Signorella, Synthesis, characterization and antioxidant activity of water soluble Mn(III) complexes of sulphonato-substituted Schiff base ligands, *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 496–502. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.12.016>.
- [2] W. Al Zoubi, Y.G. Ko, Organometallic complexes of Schiff bases: Recent progress in oxidation catalysis, *J. Organomet. Chem.* 822 (2016) 173–188. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2016.08.023>.
- [3] G. Wu, X. Wang, T. Jiang, Q. Lin, Selective Oxidation of Glycerol with 3% H_2O_2 Catalyzed by LDH-Hosted Cr(III) Complex, *Catalysts*. (2015). <https://doi.org/10.3390/catal5042039>.
- [4] J. Luo, H. Li, N. Zhao, F. Wang, F. Xiao, Selective oxidation of glycerol to dihydroxyacetone over layer double hydroxide intercalated with sulfonato-salen metal complexes, *J. Fuel Chem. Technol.* 43 (2015) 677–683. [https://doi.org/10.1016/S1872-5813\(15\)30019-0](https://doi.org/10.1016/S1872-5813(15)30019-0).
- [5] R. Azadbakht, A. Amini Manesh, M. Malayeri, B. Dehghani, Synthesis, characterization, reactivity and catalytic activity of a novel chiral manganese Schiff base complex, *New J. Chem.* (2015). <https://doi.org/10.1039/c5nj01031d>.

- [6] B. Bahramian, V. Mirkhani, M. Moghadam, A.H. Amin, Water-soluble manganese(III) salen complex as a mild and selective catalyst for oxidation of alcohols, *Appl. Catal. A Gen.* 315 (2006) 52–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apcata.2006.08.037>.
- [7] M. Rong, J. Wang, Y. Shen, J. Han, Catalytic oxidation of alcohols by a novel manganese Schiff base ligand derived from salicylaldehyde and L-Phenylalanine in ionic liquids, *Catal. Commun.* 20 (2012) 51–53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.catcom.2011.11.035>.
- [8] G.B. Shul'pin, Y.N. Kozlov, L.S. Shul'pina, T. V. Strelkova, D. Mandelli, Oxidation of Reactive Alcohols with Hydrogen Peroxide Catalyzed by Manganese Complexes, *Catal. Letters.* 138 (2010) 193–204. <https://doi.org/10.1007/s10562-010-0398-9>.
- [9] T. Kurahashi, Reverse Catalase Reaction: Dioxygen Activation via Two-Electron Transfer from Hydroxide to Dioxygen Mediated By a Manganese(III) Salen Complex, *Inorg. Chem.* 54 (2015) 8356–8366. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b01025>.
- [10] J. Zhang, Y. Tang, J.Q. Xie, J.Z. Li, W. Zeng, C.W. Hu, Study on phenol oxidation with H₂O₂ catalyzed by Schiff base manganese complexes as mimetic peroxidase, *J. Serbian Chem. Soc.* (2005). <https://doi.org/10.2298/JSC0510137Z>.
- [11] A. Córdoba, N. Alasino, M. Asteasuain, I. Magario, M.L. Ferreira, Mechanistic evaluation of hematin action as a horseradish peroxidase biomimetic on the 4-aminoantipyrine/phenol oxidation reaction, *Chem. Eng. Sci.* 129 (2015) 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.02.031>.
- [12] P. Ratnasamy, D. Srinivas, H.B.T. Knözinger, Active Sites and Reactive Intermediates in Titanium Silicate Molecular Sieves, in: *Adv. Catal.*, Academic Press, 2004: pp. 1–169. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0360-0564\(04\)48001-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0360-0564(04)48001-8).
- [13] A.R. Parodi, C. Merlo, A. Córdoba, C. Palopoli, J. Ferreyra, S. Signorella, M.L. Ferreira, I. Magario, Application of metal complexes as biomimetic catalysts on glycerol oxidation, *Mol. Catal.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.11.007>.
- [14] W. Hu, J.Z. Li, Y. Wang, J. Du, C.W. Hu, X.C. Zeng, Studies on phenol oxidation with h₂o₂ catalyzed by schiff base cobalt(ii) complexes in micellar solution, *J. Dispers. Sci. Technol.* (2008). <https://doi.org/10.1080/01932690802313667>.
- [15] A. Panja, N.C. Jana, P. Brandão, Influence of anions and solvents on distinct coordination chemistry of cobalt and effect of coordination spheres on the biomimetic oxidation of o-aminophenols, *Mol. Catal.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.02.013>.
- [16] S.F. Mapolie, J.L. Van Wyk, Synthesis and characterization of dendritic salicylaldehyde complexes of copper and cobalt and their use as catalyst precursors in the aerobic hydroxylation of phenol, *Inorganica Chim. Acta.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.09.006>.
- [17] S. Signorella, C. Palopoli, G. Ledesma, Rationally designed mimics of antioxidant manganese enzymes: Role of structural features in the quest for catalysts with catalase and superoxide dismutase activity, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.005>.
- [18] J.W. Gohdes, W.H. Armstrong, Synthesis, structure, and properties of [Mn(salpn)(EtOH)₂](ClO₄) and its aerobic oxidation product [Mn(salpn)O]₂, *Inorg. Chem.* 31 (1992) 368–373. <https://doi.org/10.1021/ic00029a007>.

**Capítulo 6: Oxidación de glicerol
con sistemas bicatalíticos:
Detección de actividad inicial**

6.1 Objetivo del capítulo

Las enzimas oxidasas constituyen una alternativa catalítica sustentable para la oxidación de alcoholes ya que actúan en condiciones suaves y no requieren de cofactores costosos. Además, utilizan oxígeno como agente oxidante (Capítulo 1). No obstante, son inactivadas por un subproducto de la reacción, el peróxido de hidrógeno. El objetivo de este capítulo es determinar la performance en la oxidación primaria de glicerol de dos sistemas bicatalíticos basados en enzimas oxidasas comerciales en tándem con hematin (en el mismo medio de reacción), en reemplazo de la enzima catalasa, comúnmente empleada para eliminar peróxido de hidrógeno del sistema y promover el desarrollo de la reacción. Hematin, al ser una estructura mimética tanto de catalasa como de peroxidasa, se hipotetiza que cumpliría aquí la doble función de convertir el inactivante peróxido de hidrógeno ya sea en oxígeno o, en presencia de fenol y 4-aminoantipirina, en la generación de un colorante para la rápida detección de actividad inicial. Este capítulo detalla los trabajos realizados en la detección de la biocatálisis oxidativa en los primeros minutos de la reacción.

Los antecedentes y motivos que fundamentan esta tarea se encuentran detallados a lo largo del capítulo 1 de la presente tesis.

6.2 Materiales

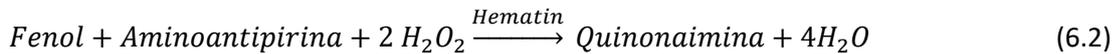
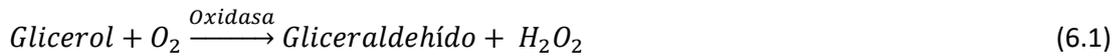
Alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* (AOX) (PM= 675 KDa; solución proteica de 40 mg/mL en buffer fosfato 0,1 M pH 8 con 30% de sacarosa), galactosa oxidasa de *Dactylium dendroides* (GAO) (PM= 68 KDa; polvo liofilizado), hematin porcina y gliceraldehído fueron adquiridos a través de Sigma Aldrich (San Luis, Estados Unidos) y utilizados sin previa purificación. La galactosa (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) fue cordialmente donada por la Facultad de Ciencias Químicas (UNC), mientras que la albumina de suero bovino (BSA; PM= 66 KDa, polvo liofilizado, Sigma Aldrich) fue gentilmente donada por el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la FCEFyN (UNC), mientras que fenol, 4-aminoantipirina (4AAP), glutaraldehído 25% (GLU) (PM = 100,12 g/mol) y azul brillante de coomassie G250 se obtuvieron de Tetrahedron (Godoy Cruz, Argentina). Glicerol, metanol y peróxido de hidrógeno fueron adquiridos de Cicarelli (Santa Fe, Argentina). Para la inmovilización de las enzimas se utilizaron partículas porosas de polimetacrilato funcionalizadas con grupos hexametilnamino (ReliZyme™-HA 403/S) las cuales fueron gentilmente donadas por Resindion S.R.L (Binasco, Italia). La cantidad de GLU se calculó considerando una relación de GLU a grupos NH₂ de las partículas de 62,5:1 y una densidad de grupos funcionales NH₂ en el soporte HA 403 de 500 μmol/g húmedo (dato proporcionado por el fabricante). La capacidad de retención de agua del soporte es de entre un 60 y 70% en peso y en base a esto se consideró que 1 g_{seco} de HA 403 = 1,65 g_{húmedo}. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 (Massachusetts, Estados Unidos).

6.3 Métodos

6.3.1 Ensayos de actividad catalítica

Como ya se mencionó en los capítulos 4 y 5, la oxidación de 4-aminoantipirina/fenol en presencia de H₂O₂ mediada por peroxidasa o biomiméticos de ésta (reacción 6.2) constituye una reacción test utilizada para determinar actividad peroxidática, concentración de H₂O₂ o fenol, entre otros [1]. Dicha reacción, acoplada a la reacción de oxidación de distintos sustratos (reacción 6.1 –que muestra al glicerol como posible sustrato–) permite cuantificar de forma sencilla la actividad catalítica de las oxidasas [2] a la vez

que consume H_2O_2 , el cual se ha reportado como agente inhibidor de estas enzimas [3]. El término “actividad catalítica” aquí utilizado hace referencia a la velocidad de reacción de cualquier reacción mediada por un catalizador, en cambio, el término “actividad catalática” se refiere expresamente a la velocidad de descomposición del H_2O_2 para formar O_2 . El fundamento de la técnica se centra en que la generación de la quinonaimina mediada por hematin (reacción 6.2) es indicativa de la generación de H_2O_2 a causa de la acción enzimática de las oxidasas sobre el glicerol, según:



Se prepararon soluciones de fenol, 4-aminoantipirina y GAO (1450 mg/L) en buffer fosfato 0,1 M pH 7. La solución de AOX se utilizó directamente como fue entregada por el proveedor. Como posibles sustratos para las enzimas se utilizaron soluciones de glicerol, galactosa y metanol en buffer fosfato 0,1 M pH 7. Por su parte, hematin se disolvió en NaOH 0,01 M (495 mg/L). Las reacciones fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente en cubetas plásticas de 1 mL (modo time drive: para mediciones de la evolución de la absorbancia a 510 nm, durante 900 s o más) o en cubetas de cuarzo de 3 mL (modo scan: para determinación de espectros de absorción –Figura 6.1–), monitoreando el avance de la reacción mediante espectrofotometría UV-Vis. Se dosificaron las soluciones en la cubeta de forma tal que las concentraciones de las distintas especies fueron las que se indican en la Tabla 6.1. La reacción se inició por el agregado en un solo paso del sustrato correspondiente. Luego del agregado del sustrato, se tapó la cubeta y se invirtió tres veces antes de ser colocada en el portacubetas. Las experiencias de la Tabla 6.1 correspondientes a la Figura 6.5 se realizaron por triplicado. Para las demás, se llevó a cabo un único experimento.

6.3.1.1 Cálculo de las actividades específicas

Con la finalidad de obtener una comparación de las actividades, se llevaron a cabo experiencias con glicerol para ambas enzimas. Adicionalmente, se utilizó metanol como sustrato con AOX y galactosa con GAO. Estos últimos son considerados como los “sustratos naturales” para cada una de las enzimas, es decir, el sustrato sobre el cual la enzima actúa con máxima eficacia. De esta manera, se obtiene una comparación entre la velocidad de oxidación del glicerol y de los sustratos naturales. Las actividades específicas se calcularon por regresión lineal de los datos de absorbancia versus tiempo entre 200-1200 s (AOX/glicerol), 200-300 s (AOX/metanol) y 600-1200 s (GAO/glicerol y GAO/galactosa) luego de restar la absorbancia correspondiente del experimento control con 0 mM de sustrato (glicerol, galactosa o metanol); de este modo, si el fenol es atacado por las oxidasas y se genera H_2O_2 el cual activa a la reacción 6.2, su aporte a la absorbancia es descontado de los experimentos. El coeficiente de absorción de la quinonaimina utilizado para calcular su concentración es $\epsilon=13473 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [1]. Las unidades calculadas se basaron en gramo de proteína empleada en el caso de AOX y en gramo de polvo liofilizado en el caso de GAO considerando los datos suministrados por el proveedor. La actividad catalítica se definió para cada enzima como U/g enzima, donde U son los micromoles del aducto quinonaimina producido por minuto, como se puede ver en la siguiente ecuación:

$$A_{Cat} = \frac{\Delta[\text{quinonaimina}]}{\Delta t C_{cat}} 6 \times 10^7 = \frac{\mu\text{mol tinta}}{\text{min} \times \text{g enzima}} = \frac{U}{\text{g enzima}} \quad (6.3)$$

Donde 6×10^7 es un factor que se utiliza para expresar el valor de A_{cat} en las unidades que se indican en la ecuación 6.3, C_{cat} es la concentración de la enzima en mg/L y U representa el promedio de las pendientes de las rectas de regresión en la región de variación lineal de la concentración con el tiempo. Las reacciones fueron llevadas a cabo por triplicado (Figura 6.5). Con GAO como catalizador se utilizó un único experimento para la determinación de la pendiente.

Tabla 6.1. Concentraciones de las distintas especies en las reacciones llevadas a cabo.

	[Glicerol] (mM)	[Metanol] (mM)	[Galactosa] (mM)	[AOX] (mg/L)	[GAO] (mg/L)	[Hematin] (mg/L)
Figura 6.1	67	-	-	92	-	18
	-	67	-	92	-	18
	2600	-	-	-	600	18
	-	-	130	-	600	18
Figura 6.2 A	0	-	-	62	-	12
	17	-	-	62	-	12
	33	-	-	62	-	12
	67	-	-	62	-	12
Figura 6.2 B	67	-	-	185	-	6
	67	-	-	185	-	12
	67	-	-	185	-	18
	67	-	-	185	-	24
Figura 6.2 C	67	-	-	62	-	12
	67	-	-	185	-	12
Figura 6.3	-	-	54	-	500	18
	-	-	-	-	500	18
	1700	-	-	-	800	18
	-	-	-	-	800	18
Figura 6.4	1700	-	-	-	800	18
	1700	-	-	-	800	24
Figura 6.5	67	-	-	123	-	18
	-	67	-	123	-	18

- Cada serie contiene además fenol y 4-aminoantipirina a concentraciones de 8,35 y 0,11 mM, respectivamente.

6.3.2 Inmovilización de GAO en soporte de polimetacrilato

En el Esquema 6.1 se muestra de manera resumida el procedimiento seguido para la inmovilización y la caracterización del catalizador obtenido. Este procedimiento es idéntico al empleado para hematin en el capítulo 4 (método GLU). A continuación, se detallan cada uno de los tratamientos.

6.3.2.1 Activación del soporte con glutaraldehído

En un tubo falcon de 50 mL previamente pesado, se colocó 1 g de partículas HA-403 secas, Se agregaron 22,5 mL de buffer fosfato 0,1 M pH 7,0 con 22,5 mL de Glu al 25% P/P. Se dejó reaccionar por una hora con agitación magnética a temperatura ambiente. Luego se centrifugó por 5 min y se eliminó el sobrenadante con una pipeta. Se realizaron 3 lavados con 45 mL de buffer fosfato resuspendiendo las partículas con vortex durante 1 min y centrifugando. Se eliminó la mayor cantidad posible de sobrenadante con micropipeta, procurando dejar las partículas embebidas en buffer hasta el próximo tratamiento.

6.3.2.2 Contacto con GAO

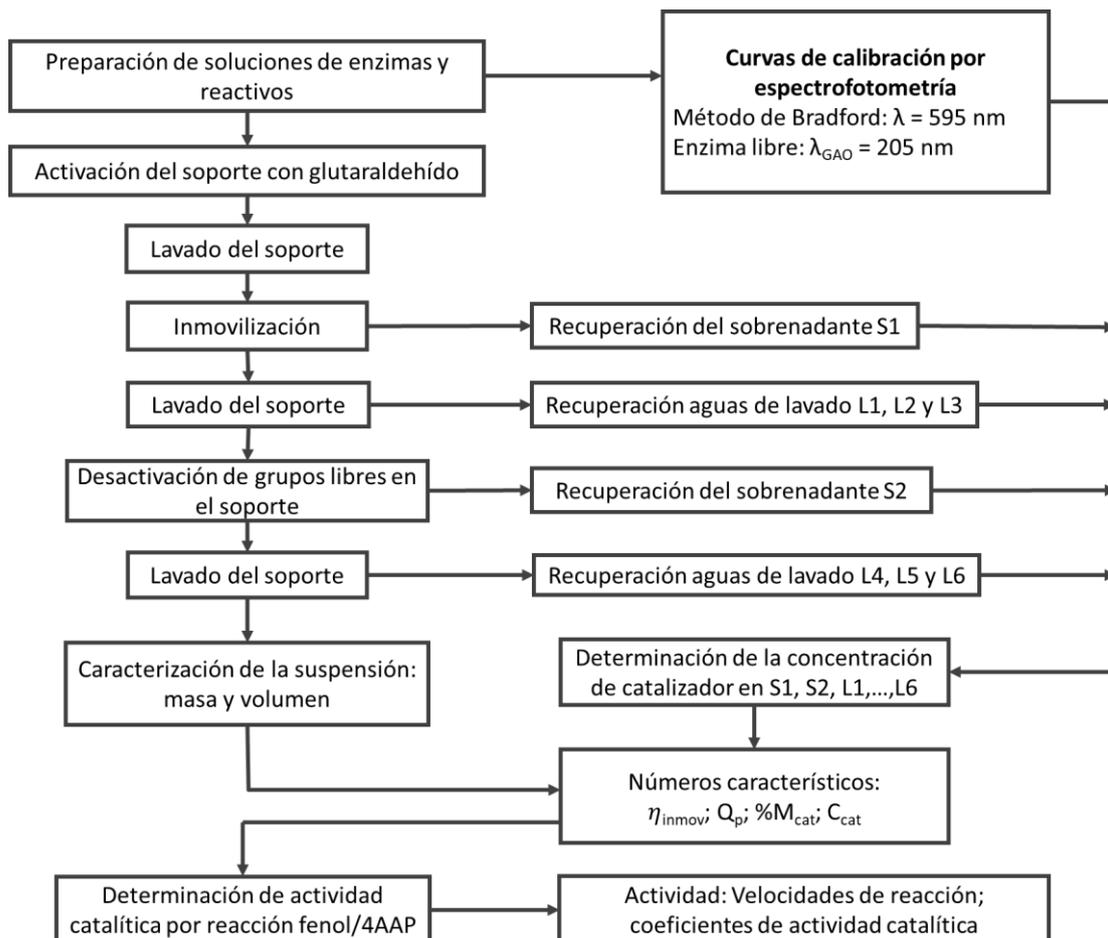
Las partículas del paso anterior se pusieron en contacto con 27,5 mL de buffer fosfato 1 M pH 7.5 durante una hora y luego se agregaron 2500 μ L de una solución de GAO de 2 g/L en buffer fosfato 0,1 M pH 7,5. De este modo, la relación de GAO a partículas secas fue de aproximadamente 5 mg GAO/g soporte seco y la concentración inicial de GAO fue de 167 mg/L. Se dejaron en contacto por 20 h con agitación

magnética a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó la solución por 5 min, el sobrenadante (S1) se recuperó en un matraz de 50 mL y se enrasó con buffer fosfato 1 M. El sólido se lavó con 20 mL de buffer fosfato 0,1 M resuspendiéndolo con vortex, se recuperó el líquido en un matraz de 25 mL y se enrasó. Se repitió el procedimiento tres veces, generándose las aguas de lavado L1, L2 y L3.

6.3.2.3 Desactivación de grupos carbonilo

Las partículas del paso anterior se pusieron en contacto con 45 mL de buffer Tris y se agitaron durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó la suspensión y se separó el sobrenadante (S2), recuperándolo en un matraz de 50 mL llevándose a volumen final con buffer fosfato 0,1 M pH 7. Se realizaron tres etapas de lavado con 40 mL de buffer fosfato 0,1 M de igual manera que en el paso anterior, se recuperaron las aguas de lavado en matraces de 50 mL y se enrasaron con el buffer. Se repitió el procedimiento tres veces, generándose las aguas de lavado L4, L5 y L6.

Finalmente, se midió el volumen de la suspensión obtenida con micropipeta y luego se agregó buffer fosfato 0,1 M pH 7 de modo tal de llegar a un volumen final de 10 mL de suspensión de catalizador. El tubo falcon con el catalizador obtenido se pesó para estimar la masa de la suspensión. De esta manera, se estimó la concentración de catalizador (C_{cat}) como $g_{secos}/V_{suspension}$ y el porcentaje de catalizador ($\%M_{cat}$) como $g_{secos}/g_{suspension}$. La suspensión obtenida fue congelada sumergiéndola en nitrógeno líquido por unos segundos y conservándolas en el freezer, hasta su posterior utilización.



Esquema 6.1. Procedimiento de inmovilización y caracterización de catalizadores.

6.3.3 Cuantificación de GAO inmovilizada

La masa de GAO inmovilizada se determinó, al igual que con hematin (ver en capítulo 4), considerando que la cantidad unida es igual a la diferencia entre lo que se contactó inicialmente con las partículas y la masa recuperada en los sobrenadantes y en aguas de lavado. La concentración de GAO en los sobrenadantes y aguas de lavado se determinaron por lectura de su absorbancia a 205 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 35 (Massachusetts, Estados Unidos) previamente calibrado con soluciones de estándares de GAO en buffer fosfato 0,1 M pH 7 empleando cubetas de cuarzo. En base a las mediciones realizadas se estimó la cantidad de GAO unido por gramo de soporte seco (Q_p) como:

$$Q_p = \frac{OX_U (mg)}{\text{masa de soporte (g)}} \quad (6.4)$$

En donde OX_U indica la masa de oxidasa unida, que se calculó como:

$$OX_U = C_{P,0} \cdot V_0 - \sum_{i=1}^8 C_P^i \cdot V_f^i \quad (6.5)$$

En donde C_P denota la concentración de proteína al inicio y en las soluciones recuperadas y V los volúmenes de cada una de ellas. El subíndice i indica la solución de lavado o sobrenadante en el orden en que fueron generadas siendo S1 para $i = 1$, L1 para $i = 2$ y así respectivamente hasta L6 para $i = 8$. Por su parte, la eficiencia de inmovilización η , definida como la cantidad unida respecto a la que se contactó inicialmente, se calculó según:

$$\eta = \frac{OX_U (mg)}{C_{P,0} \cdot V_0 (mg)} \times 100 \quad (6.6)$$

6.3.4 Prueba de actividad para GAO inmovilizada

De manera muy similar a lo realizado con las enzimas en medio homogéneo, se mezclaron los reactivos en un tubo falcon, con la diferencia de que se utilizó la enzima inmovilizada en el soporte de polimetacrilato. Se agregó una barra magnética al tubo para agitar el medio de reacción y se lo colocó en un baño termostatzado a 25°C. Para realizar las mediciones espectrofotométricas, se tomaron 1200 μL del medio de reacción y se centrifugaron por 2 min. Luego se tomaron 1000 μL del sobrenadante, se colocaron en una cubeta plástica y se midió su absorbancia a 510 nm. Finalmente, el contenido de la cubeta se devolvió al tubo para continuar con la reacción. Las condiciones de reacción utilizadas se muestran en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Condiciones de reacción en experiencias con GAO soportada.

Experiencia	[Fenol] (mM)	[4AAP] (mM)	Sustrato	[Sustrato] (mM)	[Hematin] (mg/L)	[Enzima] _{sop} (mg/L)
Gal GAO 1	8,36	0,11	Galactosa	130	18	100
GL GAO 1	8,36	0,11	Glicerol	1701	18	100

El volumen de reacción fue de 2 mL ambos casos

6.4 Resultados y discusión

6.4.1 Identificación de biocatálisis oxidativa a través de la reacción acoplada

En la Figura 6.1 se muestran los espectros de absorción UV/visible durante la reacción de fenol/4-aminoanipirina/hematin con el agregado de las enzimas AOX o GAO y glicerol, bajo las condiciones seleccionadas. En ambos casos se evidencia la generación de la quinonaimina producto a través de sus picos característicos a 330 y 510 nm [1]. Por lo tanto, esto evidencia la generación de H_2O_2 y consecuente

oxidación de glicerol mediada por las oxidasas de acuerdo al esquema de reacción descrito en la Sección 6.3.1. A modo de control positivo, la Figura 6.1 muestra además los espectros de absorción respectivos de la misma reacción, pero en presencia de los sustratos naturales de AOX y GAO; metanol y galactosa, respectivamente. La similitud de los espectros obtenidos en relación al glicerol como sustrato confirma una vez más que éste es susceptible de ser oxidado por ambas enzimas. Es importante mencionar además que se evidencia reacción aún sin necesidad de aireación ni de agitación en el sistema, es decir que esta se produce empleando únicamente el oxígeno disuelto en las soluciones estancas dentro de las cubetas.

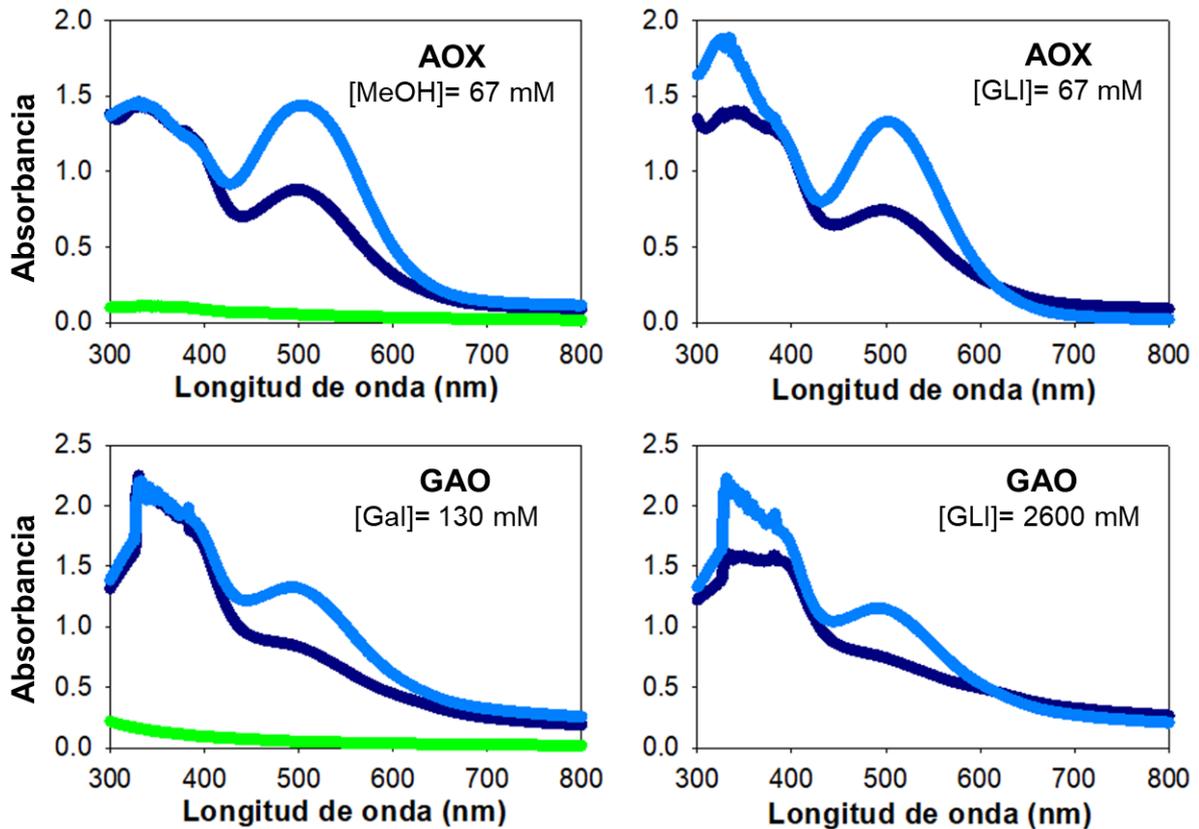


Figura 6.1. Espectros UV/Visible de sistemas con AOX y GAO utilizando distintos sustratos. Curvas azules: $t_{\text{reacción}}=15$ min. Curvas celestes: $t_{\text{reacción}}=30$ min. Curvas verdes: espectros de las enzimas en buffer fosfato 0,1 M pH 7 (concentraciones de GAO y AOX: 600 y 185 mg/L, respectivamente). Ver en la Tabla 6.1 las condiciones empleadas.

6.4.2 Cinética de la reacción acoplada

Una vez confirmada la existencia de reacción, el monitoreo de la absorbancia a 510 nm durante la reacción posibilita una rápida y eficaz determinación de la actividad catalítica de las enzimas bajo estudio. La Figura 6.2 muestra cómo la velocidad de generación de la quinonaimina se ve afectada por la concentración inicial de glicerol, la concentración de hematin y la concentración de AOX aplicadas, indicando que las reacciones en las cuales estas especies están involucradas son relevantes para la cinética de la formación de la quinonaimina.

En todos los casos se observa una fase inicial de velocidad de reacción cero lo cual es indicativo de que la quinonaimina se genera por una reacción en serie con otra previa que genera y acumula un producto intermediario clave, en este caso el H_2O_2 . Se observa que a mayor concentración de glicerol la reacción transcurre a mayor velocidad. No obstante, cuando la concentración de glicerol es igual a cero, aún existe un leve aumento de la absorbancia a 510 nm. Este comportamiento podría indicar que fenol puede ser

también sustrato de AOX (Figura 6.2 A) aunque no existen reportes en la literatura de que el fenol pueda ser oxidado por esta enzima. Aparentemente, entre 33 mM y 67 mM de glicerol se alcanza el nivel de saturación de la enzima ya que las velocidades de reacción para ambas concentraciones son muy similares. Además, a tiempos mayores de 600 s la velocidad de reacción es ligeramente mayor a una concentración inicial de glicerol de 33 mM que a 67 mM, lo cual parecería indicar una posible inhibición por productos de la oxidación.

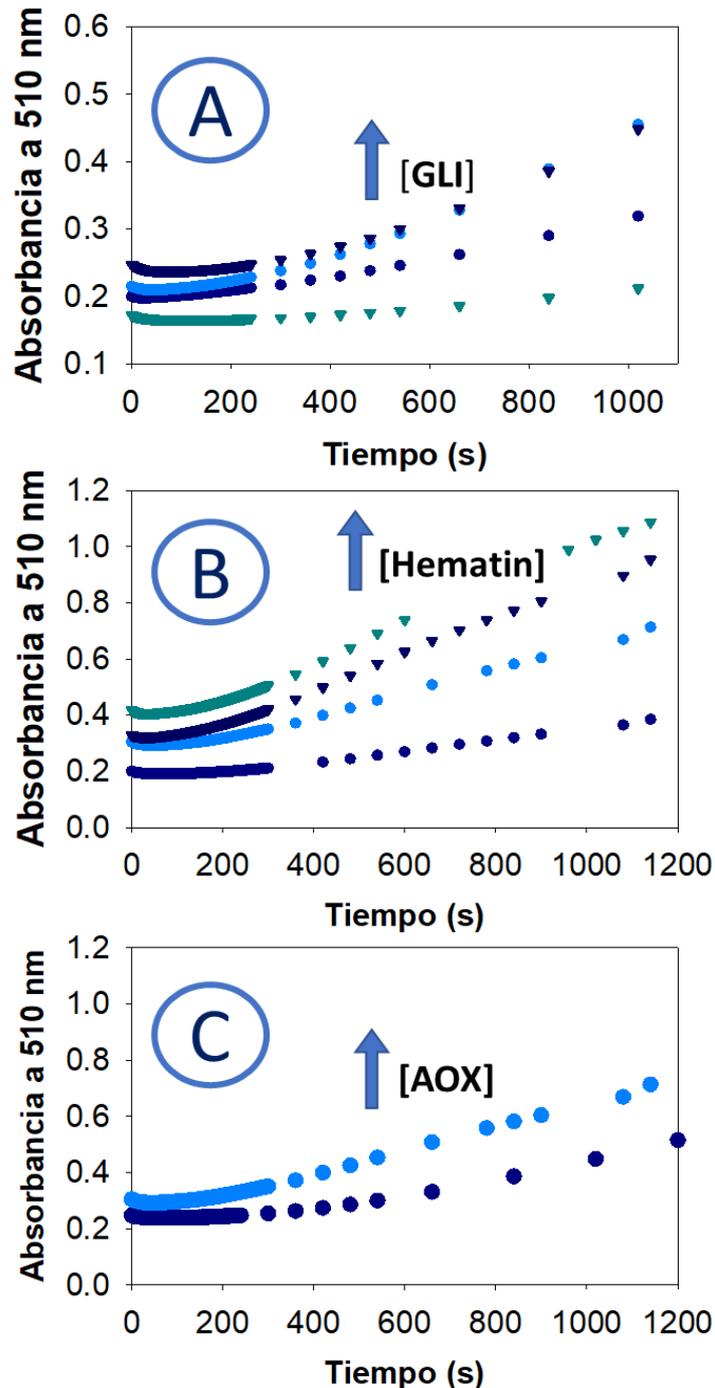


Figura 6.2. A. Incidencia de la [Glicerol] sobre la velocidad de reacción. Triángulos verdes: 0 mM; Círculos azules: 17 mM; Círculos celestes: 33 mM; Triángulos azules: 67 mM. **B.** Incidencia de la [hematin] sobre la velocidad de reacción. Círculos azules: 6 mg/L; Círculos celestes: 12 mg/L; Triángulos azules: 18 mg/L; Triángulos verdes: 24 mg/L. **C.** Incidencia de la [AOX] sobre la velocidad de reacción. Círculos azules: [AOX]=62 mg/L; Círculos celestes: [AOX]=185 mg/L. Ver Tabla 6.1 para demás concentraciones empleadas.

En la Figura 6.2 B se puede observar claramente que a mayor concentración de hematin, mayor es la velocidad de reacción. Esto, por otro lado, es indicativo de que la velocidad de la reacción global no está únicamente gobernada por la oxidación del glicerol (el paso que involucra a la AOX) sino también por el proceso de formación del colorante que se produce posteriormente, en el cual está involucrado hematin. Esta observación está en concordancia con las velocidades iniciales iguales a cero en todas las corridas. La generación de la tinta no es instantánea, sino que precisa de cierto tiempo y este período de latencia claramente disminuye a mayor concentración de hematin. Se puede observar también que, a mayor concentración de la enzima, más rápida es la reacción (Figura 6.2 C) lo cual es una clara evidencia de que la generación de la tinta es desencadenada por la acción de la oxidasa.

En la Figura 6.3 se observan algunos resultados de experiencias de reacción en las cuales se utilizó la enzima GAO. Cuando galactosa es el sustrato (círculos verdes), la reacción ocurre mucho más rápido que con glicerol (círculos azules), a pesar de que con galactosa la concentración de GAO utilizada fue menor. Se puede observar que ambas curvas presentan también la región de latencia más pronunciada que en el caso de AOX. En ausencia de sustrato también se produce aumento de absorbancia, siendo el aumento más pronunciado a mayor concentración de GAO. Esto, nuevamente, es indicio de que el fenol presente en el medio es sustrato de la enzima GAO.

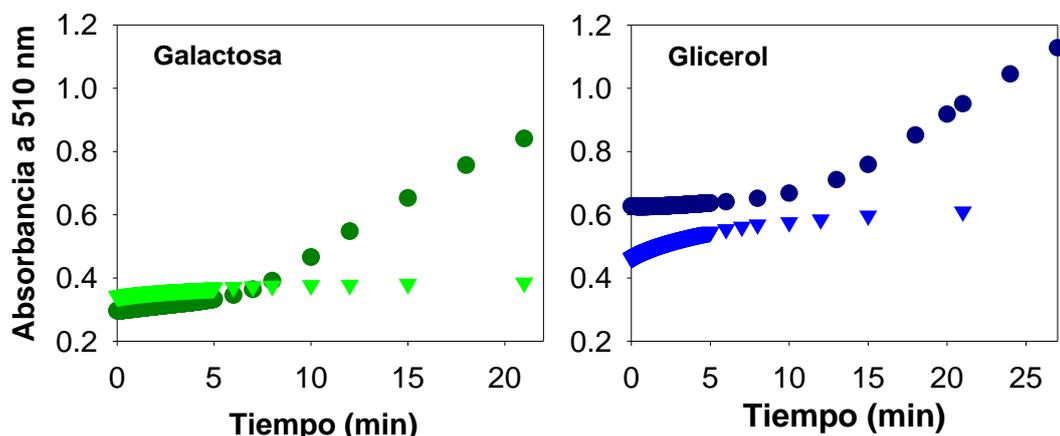


Figura 6.3. Velocidades de reacción con GAO como catalizador. **Izquierda:** círculos verdes: [Gal]= 55 mM; triángulos verdes: 0 mM galactosa con 500 mg/L de GAO. **Derecha:** círculos azules: [glicerol]= 1700 mM; triángulos azules: 0 mM glicerol con 800 mg/L de GAO. Ver Tabla 6.1 para demás concentraciones empleadas.

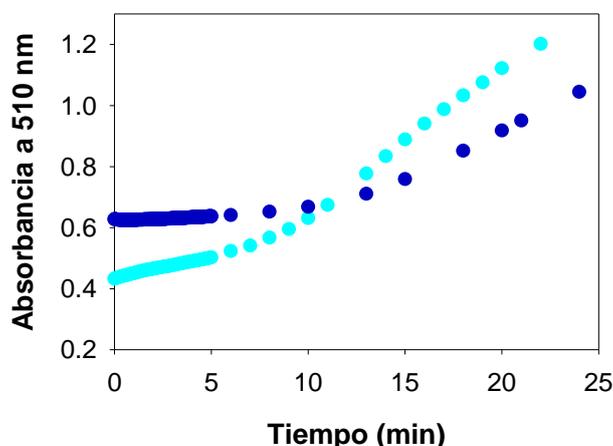


Figura 6.4. Velocidades de reacción con GAO (800 mg/L) como catalizador y glicerol (1700 mM) como sustrato. Efecto de la variación de la concentración de hematin. Círculos celestes: 24 mg/L de hematin; círculos azules: 18 mg/L.

En la Figura 6.4 se muestran los resultados obtenidos al modificar la concentración de hematin, manteniendo fijas las demás variables. Al igual que con AOX (Figura 6.2 B), se puede observar que a mayor concentración de hematin, la reacción resulta más rápida y la fase de latencia se acorta.

6.4.3 Determinación preliminar de actividades específicas

En la Figura 6.5 se muestran los resultados de las experiencias utilizadas para el cálculo de la actividad catalítica de AOX tanto con metanol (en verde) como con glicerol (en azul) como sustratos. La curva en negro es una experiencia de control realizada sin sustratos. Se puede observar que la reacción es más rápida cuando el sustrato es el metanol, con una etapa de mayor velocidad y que luego disminuye. Con glicerol la reacción es más lenta, con una fase de latencia.

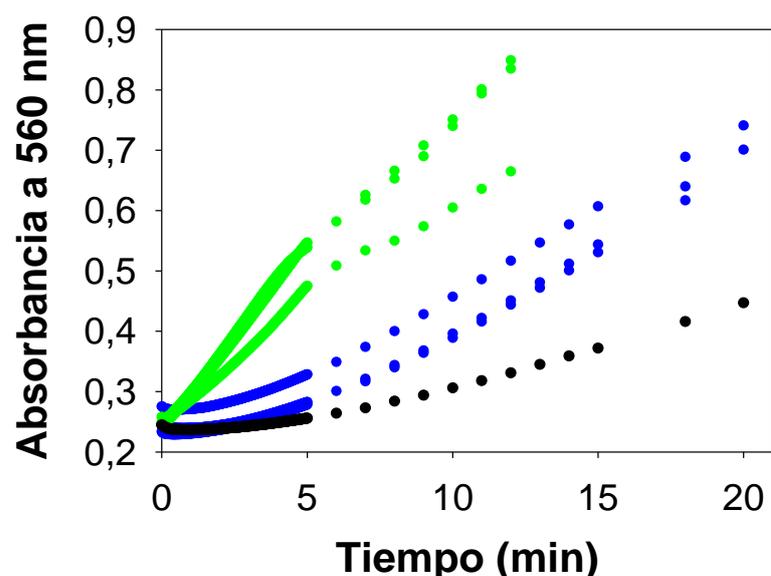


Figura 6.5. Velocidades de reacción con AOX como catalizador, utilizando como sustratos metanol (en verde), glicerol (en azul). Experimento de control sin sustratos en negro. Ver condiciones de reacción en Tabla 6.1.

La Tabla 6.3 muestra los valores de actividades específicas estimadas para AOX y GAO en la reacción acoplada de formación de quinonaimina, en donde U/g indica los micromoles de colorante formado por minuto por gramo de proteína aplicada bajo las condiciones establecidas en la sección 6.3.1 y con una concentración de sustrato que se indica en la misma Tabla.

Tabla 6.3. Estimación preliminar de actividades específicas.

		Glicerol	Metanol	Galactosa
AOX*	Actividad (U g ⁻¹)	8,4±0,6	32±5	-
	[Sustrato] ₀ (mM)	67	67	-
GAO**	Actividad (U g ⁻¹)	2,6	-	5,0
	[Sustrato] ₀ (mM)	1700	-	55

* Actividad calculada a partir de las curvas de la Figura 6.5.

** Actividad calculada a partir de las curvas de la Figura 6.3.

La concentración de hematin fue de 18 mg/L en todos los casos.

La relación de actividades sustrato natural a glicerol indica que AOX es cuatro veces más activa para metanol que para glicerol mientras que GAO es aproximadamente dos veces más activa para galactosa en relación a glicerol. Este primer mapeo permite establecer que AOX es tres veces más activa en relación a GAO para oxidar glicerol. Se destaca además que se requirió aumentar la concentración de glicerol a 1700

mM con GAO para obtener velocidades de reacción comparables a las de AOX, lo que indica que GAO es mucho menos afín al sustrato glicerol en comparación con AOX y con su sustrato natural, la galactosa. Estos valores constituyen importantes puntos de partida para la determinación de constantes cinéticas de ambas oxidasas. Cabe resaltar además que la aplicación del método de las velocidades iniciales para estimar constantes cinéticas de las oxidasas, no puede ser aplicado para estas corridas dado que las mismas estarán supeditadas a una determinada concentración de hematin, a menos que se emplee para ello la concentración de saturación probablemente cercana a los 24 mg/L. En la literatura se encontraron valores de las actividades específicas de la enzima AOX de *P. pastoris* hacia la oxidación de metanol, con valores de 11,9 U/mg (11900 U/g) [4], medidos a través de la producción de formaldehído y 6,6 U/mg (6600 U/g) [5], determinado a partir de mediciones de consumo de oxígeno. Por su parte, Siebum et al. (2006) [6] no fueron capaces de determinar oxidación de glicerol con AOX como catalizador en un ensayo acoplado muy similar al aquí desarrollado, por lo cual ambos resultados difieren significativamente. No se encontraron valores para la actividad específica con glicerol como sustrato con esta enzima, como así tampoco para la enzima GAO de *D. dendroides*, tanto para galactosa como para glicerol, pero sí se reportan valores de constantes cinéticas de las reacciones implicadas en el mecanismo catalítico de la enzima [7–10].

6.4.4 Puesta a punto de técnica espectrofotométrica para cuantificación de GAO soportada

Se ha realizado un considerable esfuerzo para llevar a cabo la cuantificación de GAO soportada por medio de la medición espectrofotométrica del contenido proteico en aguas de lavado empleando el método de Bradford, ya sea con BSA (albúmina de suero bovino) o con GAO como estándares de calibración. El detalle de por qué se utilizaron ambas proteínas para las determinaciones y los resultados obtenidos se encuentran detallados en el Anexo 1 de esta tesis. La tarea no ha sido posible debido a los siguientes inconvenientes:

- El factor de respuesta de GAO hacia el cambio de coloración del reactivo de Bradford fue muy débil y mucho menor al de BSA, por lo que además invalida emplear esta última en soluciones patrón para calibración del equipo.
- Los buffers fosfato 1 M y Tris 0,5 M presentes en los sobrenadantes (soluciones S1 y S2) interfieren en la medición de la absorbancia del método, esto es a 595 nm.

Por lo tanto, esta tarea se abordó en un segundo intento a través de mediciones espectrofotométricas directas de soluciones de GAO, por lo cual se tomó el espectro de absorción de GAO en buffer fosfato pH 7 0,1 M (Figura 6.6, izquierda) con la finalidad de encontrar la región de máxima absorción de la enzima. GAO presentó un pico de absorción cerca de los 205 nm y se observa que este pico presenta un corrimiento batocrómico a mayores concentraciones. La curva de calibración a 205 nm (Figura 6.6, derecha) presentó una linealidad de 96 % con un factor de respuesta (pendiente) mucho mayor a la obtenida con el método de microensayo de Bradford con GAO (9,20 mL/mg contra 1,30 mL/mg).

Por otro lado, se analizó si los buffers fosfato 1 M y Tris 0,5 M absorben en la misma región que GAO. La conclusión fue afirmativa (Figura 6.7), con lo cual, para utilizar este método de cuantificación, se emplearon blancos adecuados para descontar la absorción de estos buffers. Estos blancos consistieron en: una mezcla de 45% buffer fosfato 1M pH 7,5 y 55% de fosfato 0,1 M pH 7 para el sobrenadante S1 y una mezcla de 90% buffer Tris 0,5 M y 10% de buffer fosfato 0,1 M para el sobrenadante S2. De las mediciones de aguas de lavado no se realizó ningún descuento, porque el autozero del equipo se realizó con el buffer fosfato 0,1 M pH 7 y en la cubeta de referencia se colocó el mismo solvente. El buffer tris es el que mayor interferencia provocó en estas mediciones (al igual que en el método con el RB, Figura 4 - Anexo 1).

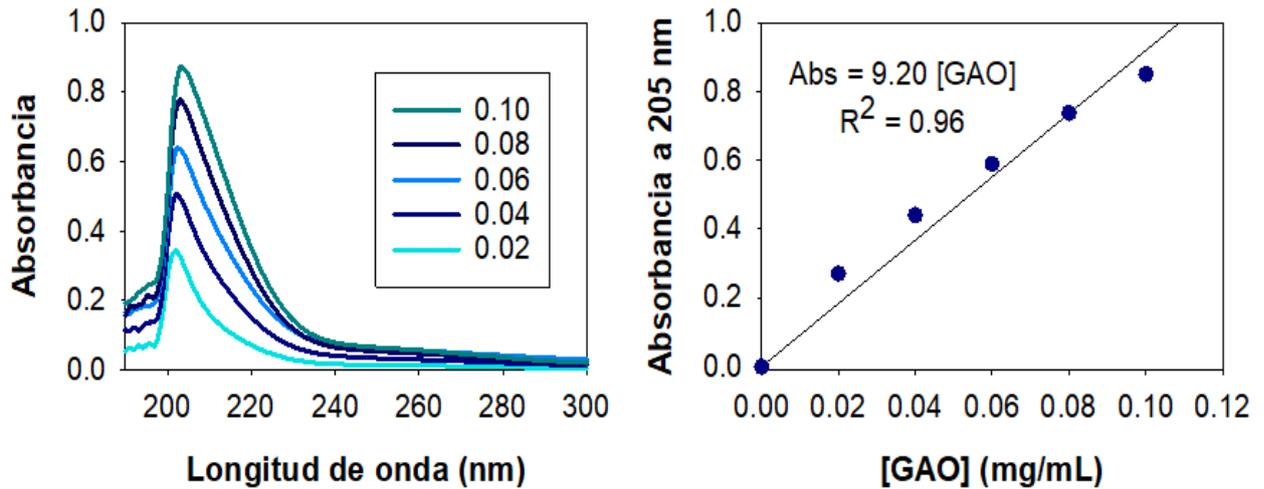


Figura 6.6. Izquierda: Espectros de absorción de GAO en buffer fosfato 0,1 M pH 7. Autozero y referencia: buffer pH 7 (concentraciones en mg/mL). Derecha: Curva de calibración a 205 nm.

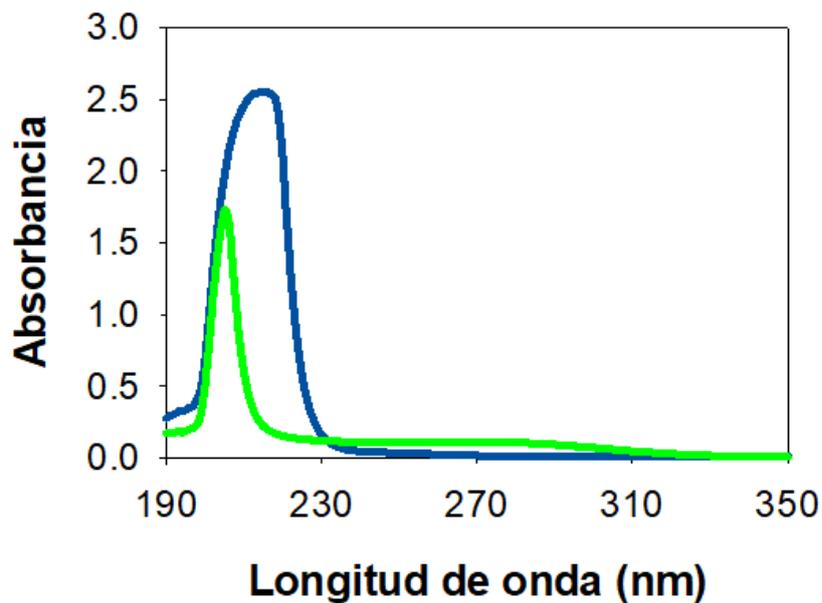


Figura 6.7. Espectros de absorción de buffers. Autozero y referencia: buffer fosfato 0,1 M pH 7. Curva azul: tris 0,5 M. Curva verde: fosfato 1 M pH 7,5.

6.4.5 Cuantificación de GAO soportada

Los resultados de las mediciones espectrofotométricas de las aguas de lavado junto con la estimación de la masa de GAO perdida en cada etapa del proceso se pueden observar en la Tabla 6.4. La masa de GAO contactada inicialmente para la inmovilización fue de 5 mg y la masa total perdida calculada ronda los 4,79 mg. Sin embargo, El sobrenadante S2 y las aguas de lavado L5 y L6 dieron valores negativos, por lo que no se tuvieron en cuenta en el cálculo de los parámetros del catalizador inmovilizado (Tabla 6.5). Además, como S2 dio un valor negativo, también se descartó el valor de L4. Lamentablemente, la interferencia de los buffers produjo desviaciones importantes aún descontando su aporte y puede ser apreciado, por ejemplo, en el caso en donde la masa perdida en el agua de lavado L2 es mayor a la perdida en el sobrenadante S1, lo cual es muy poco probable que ocurra. En el Anexo 1, la estimación de la masa perdida por medio del RB da un valor mayor al contactado inicialmente (18,23 mg), por lo que el método de estimación de GAO a 205 nm resultó más confiable, al menos, para una estimación preliminar.

Tabla 6.4. Mediciones a 205 nm de sobrenadantes y aguas de lavado de la inmovilización de GAO.

Volumen (mL)	muestra	Abs1	Abs2	Abs prom	Abs neta	[GAO] (mg/mL)	masa (mg)
50	S1	1,886	1,885	1,8855	0,282	0,026	1,30
25	L1	0,828	0,829	0,829	0,829	0,092	2,30
25	L2	0,405	0,416	0,411	0,411	0,041	1,04
25	L3	0,122	0,11	0,116	0,116	0,006	0,15
50	S2	1,906	1,903	1,9045	0,008	-0,007	-0,36
50	L4	0,616	0,612	0,614	0,614	0,066	3,30
50	L5	-0,195	-0,207	-0,201	-0,201	-0,032	-1,61
50	L6	-0,001	-0,001	-0,001	-0,001	-0,008	-0,41
	Blanco S1	1,604	1,604	1,604			
	Blanco S2	1,898	1,896	1,897			
						Masa total perdida (mg)	4,79

Tabla 6.5. Parámetros del catalizador de GAO inmovilizado por uniones covalentes

Eficiencia (masa GAO unida/masa inicial)	4,2 %
Qp (mg GAO/g sólido)	0,21
C _{cat} (g secos/L suspensión)	146,5
%M cat (g seco/g suspensión)	14,3

6.4.6 Pruebas de actividad con GAO inmovilizado

En la figura 6.8 se muestran los resultados de experiencias llevadas a cabo con GAO inmovilizado, utilizando galactosa o glicerol como sustratos. En ambos casos se observó la evolución de un pico a 510 nm. Se puede observar que este pico aumentó muy ligeramente con galactosa como sustrato luego de 72 h de reacción, comparado con el espectro obtenido a los 75 min de reacción. Con glicerol, por su parte, se ve que la forma del espectro se modificó para generar un pico, aunque muy pequeño, luego de 72 h de reacción. Sin embargo, la absorbancia a los 75 min de reacción fue mayor que a las 72 h. El agregado de H₂O₂ seguido de hematin soluble a estos medios de reacción luego de 72 h no produjo un aumento de la absorbancia a 510 nm por lo que esto hace sospechar que al menos 4-AAP (el reactivo limitante del sistema) no se encuentra en solución ya sea por agotamiento o adsorción al soporte de polimetacrilato (empleado para inmovilizar la oxidasa). De hecho, parece haberse adsorbido al soporte de la enzima al estar en contacto con éste durante tiempos prolongados y eso explicaría las menores absorbancias encontradas en los espectros de glicerol a 72 h.

Por lo tanto, se interpreta que GAO inmovilizada presentó actividad tanto para galactosa como para glicerol. No obstante, estos resultados no son útiles para la cuantificación de la actividad dado la presunta adsorción de la tinta al soporte a tiempos prolongados de exposición.

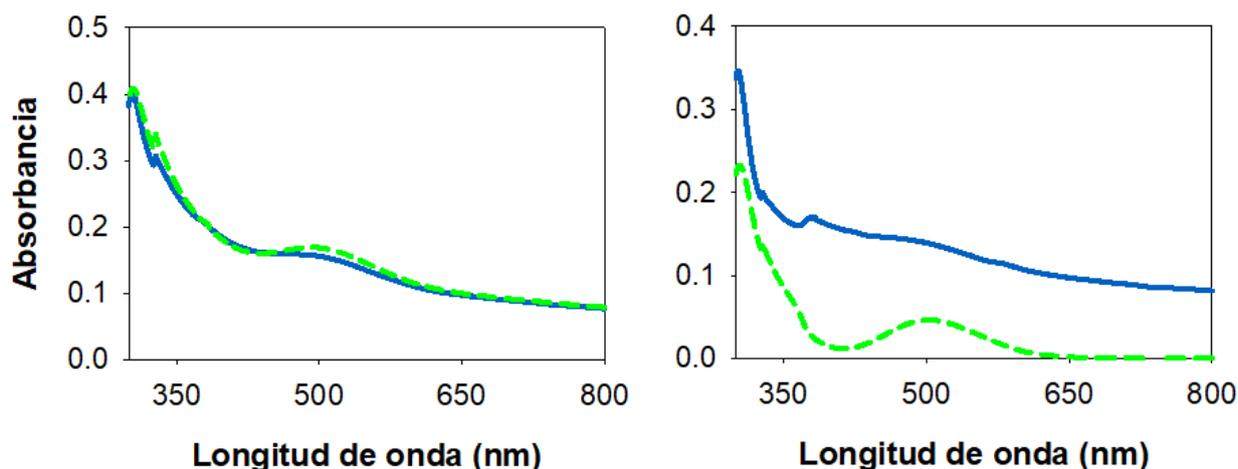


Figura 6.8. Espectros UV/Visible de sistemas fenol/4AAP con GAO inmovilizado utilizando galactosa (izquierda) y glicerol (derecha) como sustratos. Curvas azules: $t_{\text{reacción}}= 75$ min. Curvas verdes: $t_{\text{reacción}}=72$ h. Ver en la Tabla 6.2 las condiciones empleadas.

6.5 Conclusiones

Por medio de la reacción entre fenol y 4-aminoantipirina mediada por hematin acoplada a la oxidación mediada por las oxidasas se verificó la hipótesis de que tanto alcohol oxidasa de *P. pastoris* como galactosa oxidasa de *D. dendroides* han sido capaces de catalizar la oxidación de glicerol a velocidades de reacción comparables a las de sus correspondientes sustratos naturales.

Se evaluó el efecto sobre las velocidades de formación de la tinta, de la variación de la concentración de glicerol, enzima y hematin y se encontró que las tres especies ejercen un aumento de la velocidad de reacción mientras mayor es su concentración.

Posteriormente, se ensayó la inmovilización de GAO por medio de uniones covalentes a un soporte de polimetacrilato, utilizando glutaraldehído como agente acoplante. Se trabajó en la puesta a punto de una técnica espectrofotométrica para la determinación de la cantidad de enzima inmovilizada utilizando enfoques diferentes. Uno de ellos consistió en el uso del reactivo de Bradford con albúmina de suero bovino o GAO como estándares. La construcción de las curvas de calibración evidencia que es mejor utilizar como estándar la enzima que se quiere cuantificar siempre que esta se encuentre disponible, ya que los factores de respuesta de ambas proteínas son muy diferentes. Además, los distintos buffers utilizados en las sucesivas etapas del proceso de inmovilización generaron interferencias con el RB, por lo cual es importante realizar blancos adecuados para realizar las correcciones necesarias. Esta no siempre es tarea fácil, sobre todo con las aguas de lavado, para las cuales es difícil determinar en qué proporción se mezclan los diferentes buffers. El otro enfoque utilizado consistió en la medición de la absorbancia de las soluciones de GAO a 205 nm. Este método resultó ser mucho más sensible que el microensayo con RB, aunque el problema de interferencias con los buffers utilizados no pudo ser eliminado. Finalmente, se eligió este método para estimar la cantidad de GAO inmovilizada, la cual indicó una eficiencia de inmovilización del 4,2 %.

Ensayos preliminares de la reacción acoplada llevados a cabo con la enzima GAO inmovilizada confirmaron la hipótesis de que la oxidasa luego de ser soportada continúa siendo activa tanto para galactosa como para glicerol, lo que constituye un resultado alentador ya que posibilitaría su reúso y fácil separación de los productos entre lotes de reacción.

6.6 Resultados publicados

Parte de estos resultados han sido publicados en:

- Parodi, Adrián ; Asteasuain, Mariano; Magario, Ivana. **“Kinetic analysis and evaluation of galactose oxidase activation by hematin in the green oxidation of glycerol”**. *Biochemical Engineering Journal* 176 (2021), 108203. DOI: 10.1016/j.bej.2021.108203

Parte de los resultados de este capítulo fueron publicados en un trabajo a Congreso:

- Parodi, A. R.; Ferreira, M. L.; Magario, I. M. **“Oxidación de glicerol mediada por oxidasas comerciales”**. XX Congreso Argentino de Catálisis (XX CAC 2017). Córdoba, Argentina, noviembre 1-3, 2017.

6.7 Referencias

- [1] A. Córdoba, N. Alasino, M. Asteasuain, I. Magario, M.L. Ferreira, Mechanistic evaluation of hematin action as a horseradish peroxidase biomimetic on the 4-aminoantipyrine/phenol oxidation reaction, *Chem. Eng. Sci.* 129 (2015) 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.02.031>.
- [2] D. Linke, N. Lehnert, M. Nimtz, R.G. Berger, An alcohol oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* with a distinct glycerol oxidase activity, *Enzyme Microb. Technol.* 61–62 (2014) 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.04.001>.
- [3] T. Roncal, C. Muñoz, L. Lorenzo, B. Maestro, M.D.M. Díaz de Guereñu, Two-step oxidation of glycerol to glyceric acid catalyzed by the *Phanerochaete chrysosporium* glyoxal oxidase, *Enzyme Microb. Technol.* 50 (2012) 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.11.007>.
- [4] R. Couderc, J. Baratti, Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase, *Agric. Biol. Chem.* (1980). <https://doi.org/10.1271/bbb1961.44.2279>.
- [5] R.N. Patel, C.T. Hou, A.I. Laskin, P. Derelanko, Microbial oxidation of methanol: Properties of crystallized alcohol oxidase from a yeast, *Pichia sp*, *Arch. Biochem. Biophys.* (1981). [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90212-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90212-5).
- [6] A. Siebum, A. van Wijk, R. Schoevaart, T. Kieboom, Galactose oxidase and alcohol oxidase: Scope and limitations for the enzymatic synthesis of aldehydes, *J. Mol. Catal. B Enzym.* (2006). <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.04.003>.
- [7] C.D. Borman, C.G. Saysell, A. Sokolowski, M.B. Twitchett, C. Wright, A.G. Sykes, Reactivity of galactose oxidase, in: *Coord. Chem. Rev.*, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(99\)00120-4](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)00120-4).
- [8] L.D. Kwiatkowski, M. Adelman, R. Pennelly, D.J. Kosman, Kinetic mechanism of the Cu(II) enzyme galactose oxidase, *J. Inorg. Biochem.* (1981). [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(00\)80001-X](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(00)80001-X).
- [9] A.J. Baron, C. Stevens, C. Wilmot, K.D. Seneviratne, V. Blakeley, D.M. Dooley, S.E.V. Phillips, P.F. Knowles, M.J. McPherson, Structure and mechanism of galactose oxidase. The free radical site, *J. Biol. Chem.* (1994).
- [10] M.M. Whittaker, D.P. Ballou, J.W. Whittaker, Kinetic isotope effects as probes of the mechanism of galactose oxidase, *Biochemistry.* (1998). <https://doi.org/10.1021/bi980328t>.

Capítulo 7: Perfil de productos y reactivos en la oxidación con sistemas bicatalíticos

7.1 Objetivo del capítulo

La evidencia de la acción de oxidasa/hematin sobre glicerol presentada en el capítulo 6 fue contundente. No obstante, constituye una observación indirecta y basada en los primeros minutos de reacción. Para considerar un catalizador como apto para su aplicación, es necesario evaluar el rendimiento de la reacción, es decir la conversión de glicerol y la generación de productos lograda durante todo el período de tiempo que el sistema reaccionante se encuentra dentro del reactor químico. El objetivo de este capítulo es determinar la performance en la oxidación primaria de glicerol de dos sistemas bicatalíticos basados en enzimas oxidasas comerciales y hematin, esta última en reemplazo de la enzima catalasa. Se incluyen también mediciones -durante el curso de la reacción- de oxígeno disuelto, el cual constituye el oxidante y si bien se encontró siempre en exceso, su evolución temporal aportó información útil para comprender ambos sistemas.

La principal diferencia con los sistemas empleados en el capítulo 6 es que aquí se elimina el fenol (y la 4-aminoantipirina) como sustrato reductor de hematin. En su lugar se pretende que esta última ejerza su acción catalítica consumiendo el H_2O_2 y generando O_2 adicional (ver Esquema 1.2). Se evita, de esta manera, la inclusión de fenol en los sistemas.

Los antecedentes y motivos que fundamentan esta tarea se encuentran detallados a lo largo del capítulo 1 de la presente tesis.

7.2 Materiales

Alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* (AOX) (PM= 675 KDa; solución proteica de 61 mg/mL en buffer fosfato 0,1 M pH 8 con 30% de sacarosa), galactosa oxidasa de *Dactylium dendroides* (GAO) (PM= 68 KDa; polvo liofilizado), hematin porcina y N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) fueron adquiridos a través de Sigma Aldrich (San Luis, Estados Unidos) y utilizados sin previa purificación. La galactosa (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) fue cordialmente donada por la Facultad de Ciencias Químicas (UNC) y la catalasa de hígado bovino (Sigma Aldrich, PM = 250 kDa; suspensión acuosa con 0,1% de timol) fue gentilmente donada por el Dr. Lascano (INTA, Córdoba). Glicerol, metanol y peróxido de hidrógeno fueron adquiridos de Cicarelli (Santa Fe, Argentina). Todos los demás reactivos utilizados son de grado analítico, a excepción del bórax (grado técnico).

7.3 Métodos

7.3.1 Experimentos de oxidación

Las reacciones de oxidación se llevaron a cabo bajo una gran variedad de condiciones, recopiladas en la Tabla 7.1. Los tiempos de reacción variaron entre 3 y 128 h. El oxígeno se proporcionó constantemente burbujeando aire con un aireador de pecera. Para las reacciones 1 a 8 (excepto la 5 y 6, las cuales se llevaron a cabo en un tubo plástico con tapa de 1,5 mL) el equipo de reacción consistió en un vaso de precipitados de 10 mL, cerrado con un tapón de goma de manera no hermética, mientras que para las reacciones 9 a 14 se llevaron a cabo en un reactor de vidrio con tapa metálica (ver fotos en las Figuras 7.6 y 7.7), el cual permitió burbujear aire y controlar la temperatura por medio de un baño termostático con circulación de una corriente de agua. Sin embargo, el cierre no fue hermético con lo cual las pérdidas por evaporación no pudieron ser suprimidas totalmente, aunque se disminuyeron considerablemente respecto a las experiencias previas.

Tabla 7.1. Condiciones de reacción utilizadas en experiencias de oxidación

Exp N°	Sistema	[Sustrato] (mM)	[oxidasa] (mg/L)	[Cat] (mg/L)	[Hematin] (mg/L)	V _{reacción} (mL)	Temperatura (°C)	Recipiente de reacción	Inactivación enzimática	Secado
1	GAO/Hem/GLI	1700	800	-	18 y 0	4	Ambiente	Vaso	Calor	Vacío
2	GAO/Hem/Gal	130	800	-	18 y 0	4	Ambiente	Vaso	Calor	Vacío
3	AOX/Hem/GLI	33	62	-	24 y 0	4	Ambiente	Vaso	Calor	Py+TM
4	AOX/Hem/Met	33	62	-	24 y 0	4	Ambiente	Vaso	Calor	Py+TM
5	GAO/Hem/GLI	1700	800 y 0	-	24	0,5	Ambiente	Tubo 1,5 mL	Py+TM	Py+TM
6	AOX/Hem/GLI	33	62 y 0	-	24	1	Ambiente	Tubo 1,5 mL	Py+TM	Py+TM
7	GAO/Hem/GLI	1700	800	-	24	5	30	Vaso	Py+TM	Py+TM
8	AOX/Hem/GLI	33	61	-	24	5	30	Vaso	Py+TM	Py+TM
9	AOX/Hem/GLI	33	60	-	24	20	30	Reactor	Py+TM	Py+TM**
10	AOX/Hem/GLI	33	61	-	24	12	30	Reactor	Py+TM	Py+TM**
11	AOX/CAT/GLI	33	71	83,2	-	13	30	Reactor	Py+TM	Py+TM**
12	AOX/CAT/GLI	33	385	206,2	-	3	30	Reactor	Py+TM	Py+TM**
13	GAO/CAT/GLI	1700	2468	168,8	-	8	30	Reactor	Py+TM	Py+TM**
14*	GAO/Hem/GLI	1700	2444	-	108	8	30	Reactor	Py+TM	Py+TM**

* Llevada a cabo en buffer borato pH 9,0

** Secado llevado a cabo en freezer

Recipiente de reacción: Vaso: Vaso de precipitados de 10 mL no hermético con tapón de goma; Reactor: Reactor de vidrio no hermético con tapa metálica (fotos en Figuras 7.6 y 7.7).

Referencias: AOX: alcohol oxidasa; GAO: galactosa oxidasa; Hem: hematin; CAT: catalasa; GLI: glicerol; Met: metanol, Gal: galactosa; Py: piridina; TM: tamices moleculares.

La concentración de oxígeno disuelto se monitoreó durante un tiempo de entre 30 y 50 min en las reacciones 1 a 4 con la ayuda de un sensor electroquímico Pasco Pasport modelo PS-2108 (California, Estados Unidos) acoplado al software Pasco Capstone (versión 1.13.0) y a una termocupla.

Cada medio de reacción se preparó adicionando en el siguiente orden: buffer fosfato 0,1 M pH 7,0 (o buffer borato 0,1 M pH 9,0), solución de sustrato reductor (glicerol, galactosa o metanol) en buffer fosfato (o borato, según el caso), solución de hematin (0,87 g/L) en NaOH 0,1 M o suspensión acuosa de la enzima catalasa y solución de enzima (GAO 5 mg/mL o AOX 61 mg/mL). Las concentraciones de cada especie al inicio de la reacción fueron seleccionadas de acuerdo a la caracterización catalítica previa (Capítulo 6) y se denotan en la Tabla 7.1.

7.3.2 Procesamiento de muestras

Durante las reacciones se tomaron muestras de reacción a diferentes tiempos para ser analizadas. Las muestras indicadas como a $t=0$ fueron tomadas previo al agregado de la enzima oxidasa en las experiencias 7 a 14 (GAO o AOX), la cual inició la reacción. En las demás, la muestra se tomó posteriormente a dicho agregado. Para las primeras reacciones, las muestras se sometieron a calentamiento a 70 °C durante 5 min para inactivar la enzima. Luego, las muestras fueron dispuestas en un baño de hielo por unos minutos y frizadas hasta su procesamiento. Luego de descongeladas, las muestras fueron centrifugadas a 12500 rpm durante 5 minutos para separar la enzima. Se tomaron alícuotas para medición con reactivo de Schiff (200 μ L) y por cromatografía (30 μ L). Para el secado de las muestras para cromatografía se utilizaron dos protocolos diferentes: secado al vacío y secado con tamices moleculares (rutas B y C de procesamiento, respectivamente - ver Capítulo 3). Para las experiencias 1 y 2 (Tabla 7.1): luego de la inactivación de la enzima, se secaron 30 μ L de muestra en estufa de vacío durante 5,5 h, en un horno de vacío (Hornos Eléctricos O.R.L., Argentina) conectado a una bomba de vacío (COMECTA, España) a temperatura ambiente y luego se re-disolvió el contenido del tubo en 350 μ L de piridina. Para las experiencias 5 a 14: se agregaron 30 μ L de muestra del medio de reacción en un tubo eppendorf conteniendo 150 mg de tamices moleculares y volúmenes de piridina que variaron entre 210 y 400 μ L de piridina. Este tratamiento también se utilizó con fines de inactivar la enzima en el mismo paso. En las experiencias 3 y 4, en cambio, la muestra fue previamente sometida a calor para inactivación de la oxidasa antes del secado.

7.3.3 Cromatografía gaseosa

Una vez que se concluyó con el proceso de secado para eliminar el agua, un volumen de esta solución seca se diluyó con piridina – sólo para muestras de GAO, en una proporción de 9 a 200 – se mezcló con 20-35 μ L de MSTFA para llegar a un volumen final de 40 μ L y se colocaron en baño termostatzado a 70°C durante 30 min para derivatizar las especies a analizar. Diferentes variables relevantes en el proceso de derivatización se recopilan en la Tabla 7.2. Finalmente, se inyectó 1 μ L de solución en un cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 500 (Sheldon, USA) equipado con una columna de sílica (PE Elite-1, 15 m x 0,53 mm ID x 3 μ m espesor del film de 100% dimetil polisiloxano), una precolumna de sílica desactivada y un detector FID. Las inyecciones se realizaron on-column. El programa de temperatura del inyector fue el siguiente: 60°C (1 min), incremento de 15°C/min hasta 230°C (0 min) y luego incremento de 3°C/min hasta 250°C. El programa del horno fue el siguiente: 50°C (1 min), incremento de 15°C/min hasta 210°C (0 min), incremento de 3°C/min hasta 230°C (0 min) incremento de 15°C/min hasta 240°C (2 min), tiempo total de corrida de 21 min. La temperatura del FID fue 280°C. Se realizaron las respectivas curvas de calibración a partir de mezclas acuosas de estándares de glicerol, dihidroxiacetona y gliceraldehído en diferentes proporciones (Capítulo 3). Las soluciones de estándares fueron sometidas al mismo procesamiento de secado y derivatización que las muestras de reacción (según el caso, con tamices moleculares o con estufa de vacío).

Tabla 7.2. Condiciones de reacción durante la derivatización. Los números de experiencia se corresponden con los de la Tabla 7.1

Exp Nº	Sistema	[GLY] (mM)	[Oxidasa] (mg/L)	[MSTFA] (mM)	[MSTFA] / [Oxidasa]	V(µL) MSTFA	Factor de dilución *
1	GAO/Hem/GLI	0,47	0,22	3321	1831	25	3612
3	AOX/Hem/GLI	0,72	3,33	2657	798	20	19
5	GAO/Hem/GLI	0,72	0,34	2657	7851	20	2370
6	AOX/Hem/GLI	0,69	1,28	2657	2078	20	48
7	GAO/Hem/GLI	1,84	0,86	2657	3072	20	2774
8	AOX/Hem/GLI	1,75	3,26	2657	815	20	19
9	AOX/Hem/GLI	0,79	1,45	2657	1831	20	41
10	AOX/Hem/GLI	0,56	1,03	4384	4244	33	59
11	AOX/CAT/GLI	0,48	1,03	4650	4530	35	33
12	AOX/CAT/GLI	0,48	5,55	4650	838	35	33
13	GAO/CAT/GLI	0,64	0,93	4650	4974	35	2640
14	GAO/Hem/GLI	0,65	0,93	4650	4974	35	2640

En todos los casos el volumen de reacción fue de 40 µL.

*El factor de dilución representa cuantas veces se diluyó el volumen desde que se tomó la muestra hasta que se inyectó al cromatógrafo.

Para realizar la cuantificación, se estimó la pérdida de volumen por evaporación del medio de reacción a través de la diferencia entre el volumen inicial del reactor (V_0) y el volumen al finalizar la reacción (V_t , determinado con una micropipeta). De este modo se pudo determinar una disminución aproximada de 19% del volumen en 24 horas para el reactor de vidrio. La reducción del volumen del medio fue tenida en cuenta en el cálculo de las concentraciones de las muestras, como se indica en la siguiente ecuación:

$$C_{i,0} = C_{i,GC} \times F_{dil} \times \frac{V_t}{V_0} \quad (7.1)$$

donde $C_{i,0}$, $C_{i,GC}$ son las concentraciones de la especie i en el medio de reacción y la determinada por GC, respectivamente. V_t es el volumen del reactor a un tiempo t y se estima con la siguiente ecuación:

$$V_t = \left(\frac{V_0 - V_f}{t_f} \times t + V_0 \right) \quad (7.2)$$

donde t_f es el tiempo (en horas) al cual se midió el volumen del reactor. F_{dil} es el factor en el que se diluye la muestra durante todo el procesamiento, sin tener en cuenta la evaporación (Tabla 7.2).

El grado de conversión porcentual de glicerol (X_{GLI}) se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$X_{GLI} = \frac{[GLI]_0 - [GLI]_f}{[GLI]_0} \times 100\% \quad (7.3)$$

Siendo $[GLI]_0$ y $[GLI]_f$ las concentraciones inicial y final de glicerol (luego de 24 h), respectivamente. Ambas concentraciones fueron estimadas a partir de rectas de regresión lineales de los datos de concentración de glicerol respecto al tiempo, con la forma:

$$[GLI] = pendiente \times tiempo(h) + ordenada \quad (7.4)$$

7.3.4 Determinaciones con reactivo de Schiff

200 µL de muestras del medio de reacción se mezclaron con 800 µL de reactivo de Schiff (solución acuosa al 0,1 % de fucsina básica con sulfito de sodio y ácido clorhídrico), se dejó reaccionar por 30 minutos a

temperatura ambiente y posteriormente se midió su absorbancia a 560 nm en cubetas plásticas. Se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 (Massachusetts, Estados Unidos). Se pueden encontrar más detalles del ensayo en la sección 4.3.7.1.

7.3.5 Determinación de actividad catalasa

Se preparó una solución 17,7 mM de H₂O₂ en buffer fosfato 0,01 M a pH 7. En una cubeta de cuarzo se colocaron 2970 µL de la solución de H₂O₂ en buffer y se inició la reacción por el agregado de 30 µL de solución madre de catalasa de concentración 3 mg/mL (dilución 1:10 del preparado enzimático; 10 µL + 90 µL de buffer). La concentración de catalasa en la cubeta fue entonces de 30 mg/L. Se colocó la cubeta en el portacubetas y se midió la disminución de la absorbancia a 240 nm por un tiempo de 5 minutos. Se realizó la medición por triplicado. Más detalles del ensayo, el método de cálculo y los resultados obtenidos se pueden encontrar en el Anexo 2.

El valor encontrado para la actividad catalasa fue de 12597±2042 U/mg lo que denota una pérdida de actividad respecto a los valores indicados por el proveedor de 58 %.

7.4 Resultados y discusión

7.4.1 Optimización del procesamiento de muestras

La cuantificación de la conversión de glicerol, así como la concentración de los productos de la reacción alcanzadas a diferentes tiempos de reacción se abordó con la técnica de GC-FID cuidadosamente establecida y optimizada según se describe en el capítulo 3 de esta tesis. Sin embargo, los primeros cromatogramas de reacción mostraron algunas inconsistencias, a saber:

1. Ausencia de pico de derivatizante residual; lo cual indica que la cantidad de derivatizante o el procesamiento de secado, o ambos, fueron insuficientes
2. Ausencia del pico de glicerol en muestras tomadas al inicio de la reacción o existencia de picos relacionados a glicerol parcialmente derivatizado (7,9 – 8,0 minutos)

Por lo tanto, se puede plantear como regla general que un cromatograma de reacción sin pico de derivatizante (MTSFA) no es útil para cuantificación de especies y explican en parte la falta de ajuste de los balances molares resultantes según, (M = moles)

$$M_{Gli,añadidos} = [M_{Gli,t} + M_{GA,t} + M_{DHA,t} + M_{otros,t}]_{en\ cualquier\ instante} \quad (7.5)$$

En donde “otros” indica cualquier otro pico emergente no identificado a causa de la reacción.

En relación a las muestras de reacción de estándares como las del capítulo 3, estas muestras contienen ahora la enzima, la cual aporta una considerable cantidad de residuos aminoácidos susceptibles de reacción con el derivatizante, consumiéndolo ineffectivamente. Por otro lado, las enzimas con estructuras multiméricas (como AOX) generalmente son asociadas con una extrema termofilicidad [1], es decir que son capaces de soportar elevadas temperaturas sin desnaturalizarse, con lo cual es posible que AOX no haya sido efectivamente inactivada durante el tratamiento térmico. GAO, al ser una enzima monomérica, no presentaría esta característica. Además, el tratamiento térmico pudo también haber desencadenado reacciones entre residuos amoniácidos de la enzima y glicerol o sus productos de reacción.

Debido a estas inconsistencias, se realizaron nuevos ensayos en donde la etapa de inactivación de la enzima por calentamiento se sustituyó por el secado directo de las muestras en un medio con piridina y tamices moleculares. Los solventes polares, como la piridina, tienen mayor capacidad de disminuir la actividad catalítica de las enzimas ya que son capaces de eliminar moléculas de agua de la superficie que

son cruciales para la actividad [2]. El foco en estas experiencias se centró en determinar por GC la concentración de GLI tanto en soluciones acuosas de glicerol como en muestras de reacción a tiempo cero (es decir que contienen todas las especies necesarias para la reacción, glicerol+enzima+hematin) luego del secado y compararlas con las concentraciones nominales esperadas para juzgar la efectividad del procesamiento. Esta tarea se realizó además para diferentes tiempos de secado. Los resultados se muestran en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3. Concentraciones de glicerol obtenida por GC y diferencia con el valor nominal en experiencias de inactivación de la enzima con piridina y tamices moleculares.

Exp Nº	Sistema	Tiempo de secado en piridina (h)	[GL] (mM) por GC	[GL] (mM) nominal	Dif respecto a la conc. nominal (%)	¿Se observa MSTFA?
A	GLI	1,5	0,729	0,718	1,6	Si
5a	GAO/Hem/GLI	1,5	0,735	0,738	-0,5	Si
5b	GAO/Hem/GLI	24	0,763	0,738	3,3	Si
6a	AOX/Hem/GLI	1,5	0,804	0,685	17,3	Si
6b	AOX/Hem/GLI	24	0,272	0,685	-60,4	No
6c	AOX/Hem/GLI	48	0,026	0,685	-103,8	Si

La diferencia entre las concentraciones determinadas por GC y el valor nominal fue aceptable para GAO (experiencias 5a y 5b) con lo cual se puede afirmar que el tratamiento fue eficiente en este caso. Además, estas mediciones constituyen evidencia de que el secado en piridina con tamices moleculares detiene la reacción, lo cual es condición necesaria para estudios de cinética. Por otro lado, el pico de derivatizante estuvo presente en ambos cromatogramas. Notablemente, en el caso de AOX/Hem/GLI (Experiencias 6a, 6b y 6c), esto no ocurrió y la concentración de glicerol fue disminuyendo progresivamente entre las 1,5 hasta las 48 horas de secado en piridina.

Los cromatogramas obtenidos con AOX se muestran en la Figura 7.1. Se puede observar claramente que el pico de glicerol disminuye a medida que aumenta el tiempo de secado, aunque el pico de MSTFA no siempre apareció en los cromatogramas. Por otro lado, es interesante notar que aparece un pico cerca de los 13,3 min al inicio de la reacción y que decrece a mayores tiempos de secado, apareciendo un pico a los 12,3 min. Este último pico parece haberse generado a causa de la reacción y puede estar relacionado con la inefectiva derivatización de dímeros de GA (Capítulo 3) ya que apareció en muestras estándar de GA-que se realizaron como blanco, tanto en presencia como en ausencia de enzimas y siguiendo el mismo protocolo de secado, con lo cual, su presencia en medios de reacción indica que se ha generado como consecuencia de la reacción. Estas observaciones constituyen indicios de que la reacción sigue ocurriendo durante el secado y plantea el interrogante de si es posible que la reacción haya continuado en piridina.

Por otro lado, desde el punto de vista de la técnica analítica, se pudo determinar que no es recomendable almacenar las muestras de reacción en piridina por tiempo prolongado antes de la cuantificación por GC, por lo menos cuando se utiliza AOX como catalizador.

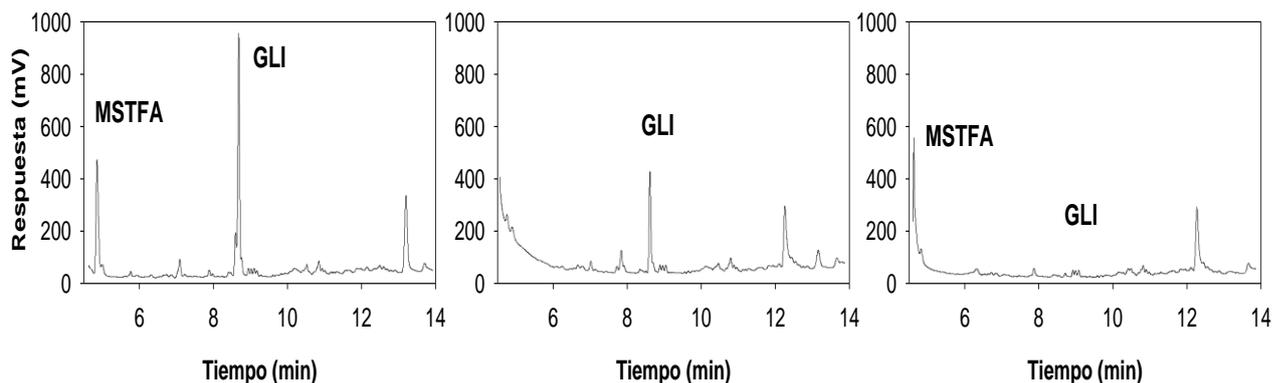


Figura 7.1. Caída del pico de glicerol (8,7 min) a distintos tiempos durante el proceso de secado en presencia de AOX. Izquierda: 1,5 h (Exp. 6a); Medio: 24 h (Exp. 6b); Derecha: 48 h (Exp. 6c). GLI: glicerol; MSTFA: derivatizante.

A partir del indicio de que la reacción con AOX no se detiene durante el proceso de secado, se decidió realizar el procesamiento y medición por GC de las muestras en el mismo día y luego de 1,5 h de secado. En la Figura 7.2 se muestran cromatogramas de los medios de reacción en presencia de AOX, al inicio y luego de 24 h de reacción. No se observó el pico de glicerol, pero tampoco el del derivatizante para ninguna de las muestras, lo cual invalida la cuantificación. En cambio, el pico a 12,3 min se observa en ambos, a diferencia de lo que ocurre en la Figura 7.1, en donde este pico aparece a tiempos prolongados de secado. La ausencia de derivatizante, puede ser indicativo de que AOX presente en el medio de reacción está reaccionando con él, disminuyendo su concentración.

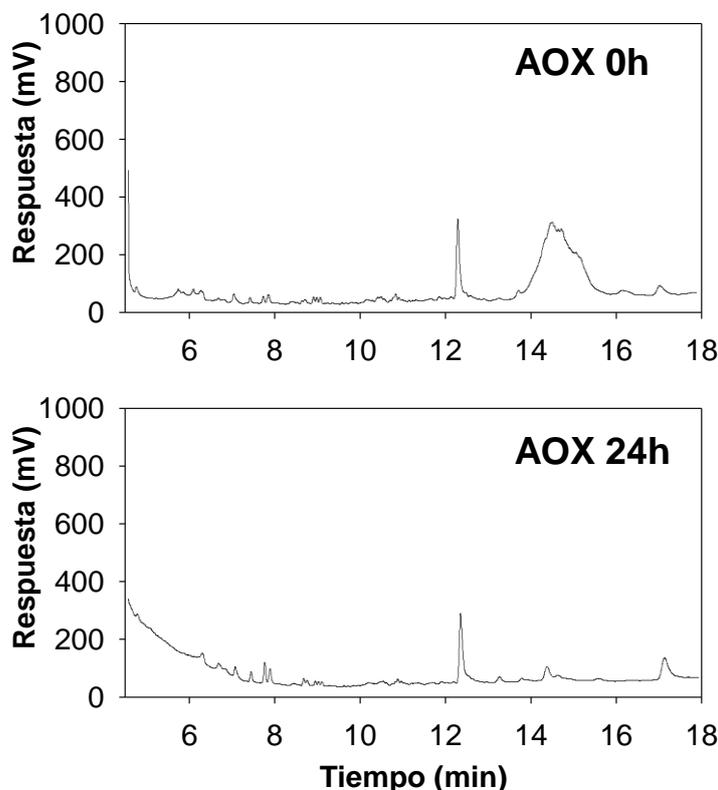


Figura 7.2. Cromatogramas correspondientes a la experiencia 8 de la Tabla 7.1. GLI: glicerol; MSTFA: derivatizante.

Adicionalmente, se realizó la etapa de secado en el freezer. Esto provocó una mejora en la apariencia de los cromatogramas, aunque en otros no pudo observarse el pico del derivatizante o el de glicerol (Figura

1, Anexo 3). Debido al comportamiento observado, se decidió aumentar la concentración de derivatizante de 2657 a 4384 mM y finalmente esto condujo a cromatogramas aptos para la cuantificación de especies. En resumen, el procesamiento que se realizó desde la experiencia N°10 en adelante incluye para todas las muestras:

- Tratamiento con piridina y tamices moleculares durante 1,5 h en freezer para secar la muestra e inactivar la enzima.
- Aumento de la concentración de derivatizante a 4384 mM o más.

7.4.2 Reacciones con AOX

7.4.2.1 Con hematin como co-catalizador

La Figura 7.3 muestra la absorbancia a 560 nm obtenida de muestras de reacción de la experiencia 3 que fueron sometidas al reactivo de Schiff. Los valores encontrados no indican una tendencia que indique evolución de aldehído. Es llamativo que, la absorbancia al inicio de la reacción es distinta de cero lo que indicaría presencia de aldehído. Una posible explicación es que se produzca algo de oxidación de glicerol durante el tratamiento térmico al que se someten las muestras para inactivar y precipitar las oxidasas (5 min, 70 °C).

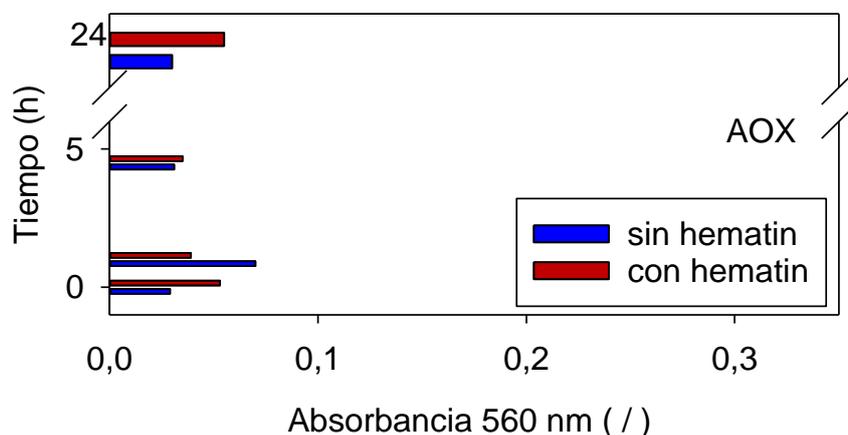


Figura 7.3 Prueba de Schiff sobre muestras del medio de reacción. (Experiencia N°3, Tabla 7.1).

La Figura 7.4 muestra los cromatogramas obtenidos de muestras de reacción de la misma experiencia. Se observa la presencia de hidratos de GA en la zona de 10,4 – 10,8 min, aunque no aumentan su concentración apreciablemente desde el inicio de la reacción hasta las 24 h y tampoco marca una diferencia la presencia de hematin en el sistema, lo cual es coincidente con la prueba de Schiff de la Figura 7.3. Se aprecia que el pico de derivatizante no apareció en la mayoría de los cromatogramas. Además, se observa la ausencia del pico de glicerol y la presencia de picos de silil derivados correspondientes a glicerol parcialmente derivatizados. Ambas observaciones son consecuencia del procesamiento de muestra no optimizado.

La Figura 7.5 muestra cromatogramas de reacción en las mismas condiciones (experiencia N° 10) aunque con el procesamiento de muestras optimizado. En todos los casos se ven los picos de derivatizante y de glicerol a 4,7 y 8,7 min, respectivamente. En la Figura 7.6 se muestra la variación de la concentración de glicerol en función del tiempo de reacción. El grado de conversión de glicerol alcanzado luego de 72 h fue de 7,4%. Se calcularon concentraciones de GA de 1,48 y 3,31 mM, al inicio y a las 24 h de reacción, respectivamente. Sin embargo, a mayores tiempos de reacción, la concentración de GA resultó ser menor al límite de detección.

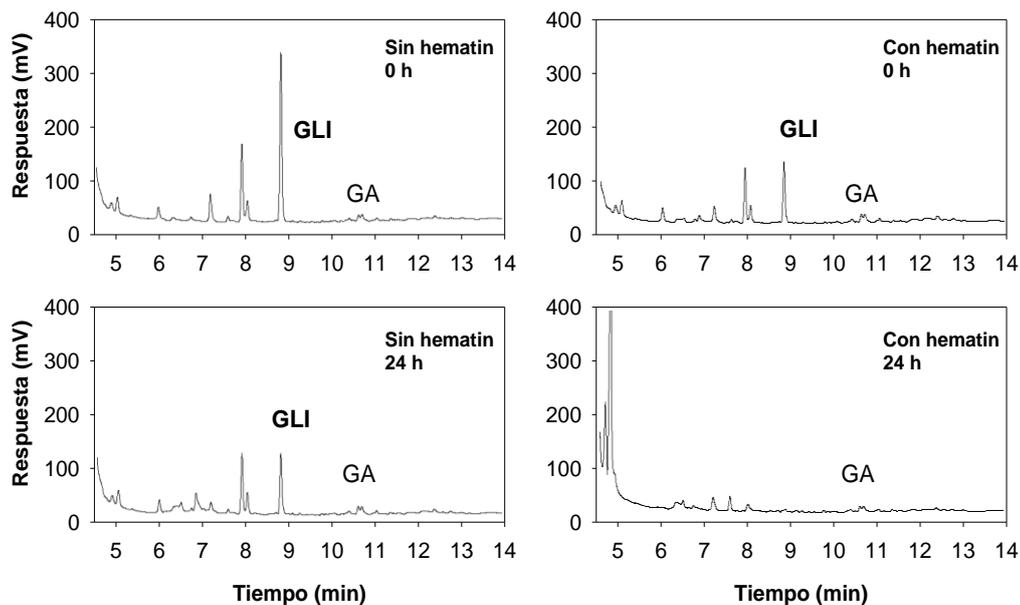


Figura 7.4. Cromatogramas correspondientes a la experiencia 3 de la Tabla 7.1. Columna Izquierda: sin hematin. Columna derecha: con hematin. GLI: glicerol; GA: gliceraldehído.

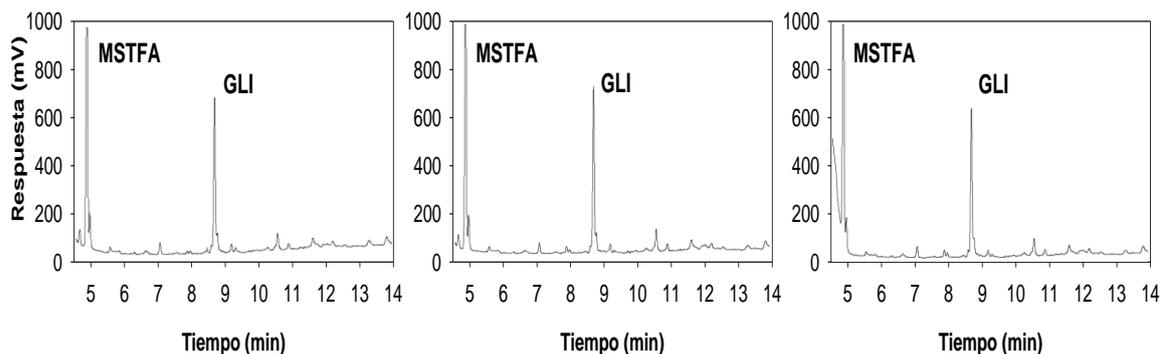


Figura 7.5. Cromatogramas de experiencia realizada con el sistema AOX/hematin/glicerol (Nº 10, Tabla 7.1). Izquierda: al inicio de la reacción, medio: a las 24 h, derecha: a las 48 h (antes del reagregado de hematin y AOX). GLI: glicerol; MSTFA: derivatizante.

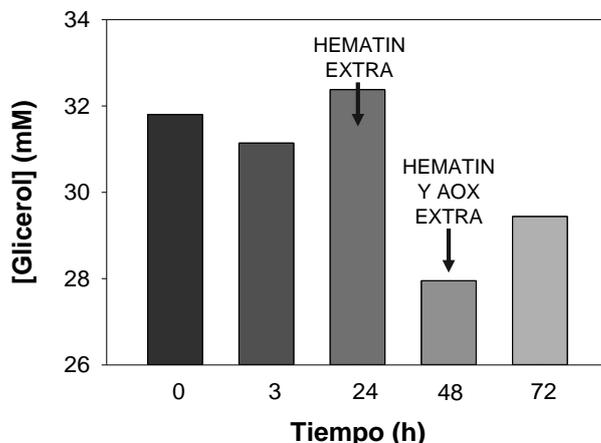


Figura 7.6. Variación de la concentración de glicerol en función del tiempo para la experiencia 10. La concentración de glicerol nominal al inicio de la reacción fue de 33 mM. Se indican con flechas tiempos para los cuales se agregaron hematin y AOX adicionales al sistema. Ver condiciones de reacción en Tabla 7.1.

En la Figura 7.7 se puede apreciar cómo cambió el aspecto del medio de reacción al transcurrir el tiempo en esta experiencia. Al inicio, la solución presentó el color amarillado característico de las soluciones acuosas de hematin pero luego de 24 h esta coloración se perdió totalmente. Se formó un precipitado blanco en forma de pequeños cristales. En la tercera imagen de la Figura 7.7 se volvió a agregar hematin, en una concentración de 8 mg/L con lo cual la suspensión recobró parte de su coloración, pero de nuevo se observa cierta pérdida de color luego de 48 h. El agregado de hematin y AOX frescos luego de 48 h, produjo cromatogramas similares a los obtenidos en la Figura 7.5 luego de 72 h (no se muestran).

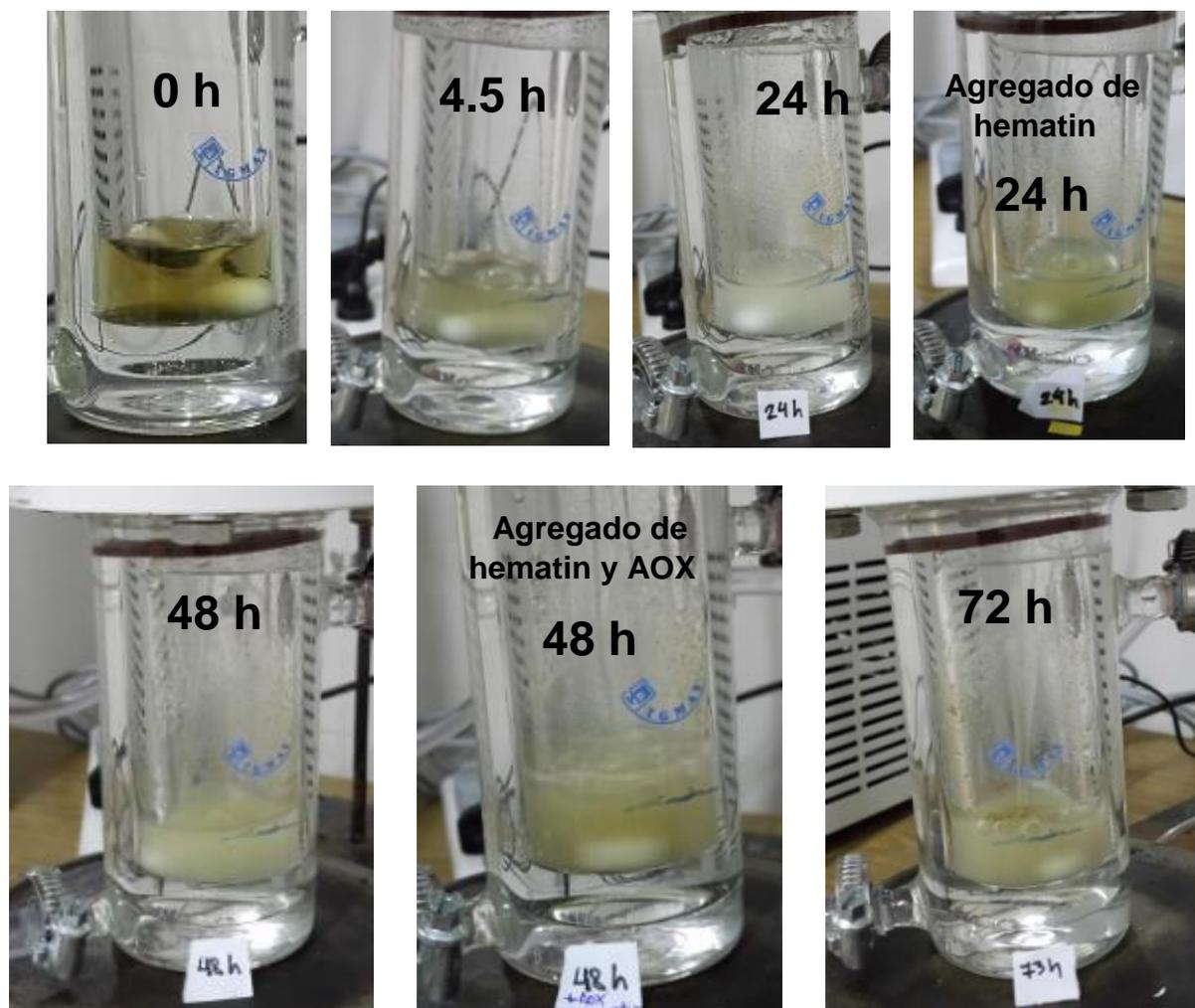


Figura 7.7. Oxidación de glicerol con el sistema AOX/hematin en reactor de vidrio (Experiencia N° 10, Tabla 7.1). Aspecto del medio de reacción a distintos tiempos.

Por otro lado, el agregado de 4,0 mM de H_2O_2 a una solución que contenía hematin (24 mg/L) y glicerol (33 mM) en buffer fosfato pH 7,0 bajo agitación y burbujeo de aire (Figura 7.8) presentó el mismo comportamiento que se muestra en la Figura 7.7. El blanqueamiento se observó a las 4 h de reacción y la formación de precipitado ocurrió luego de 50 h. Se trató bajo burbujeo además una solución blanco de hematin (24 mg/L) y glicerol (33 mM) sin agregado de H_2O_2 y no se observó el blanqueo. Esta importante evidencia indica que, bajo las condiciones de la Figura 7.7, el cambio de coloración de la solución implica que hematin entró en contacto con H_2O_2 producido por la oxidación del glicerol, ya que no existe otra fuente para esta sustancia. Una muy baja concentración de H_2O_2 fue suficiente para blanquear hematin en las condiciones de este experimento. Esto es coincidente con el esquema de reacción presentado en el capítulo 4. Por otro lado, la generación de GA, aunque muy baja puede solo provenir de la acción de la oxidasa sobre el glicerol ya que a pH 7 el proceso Fenton es inoperativo.

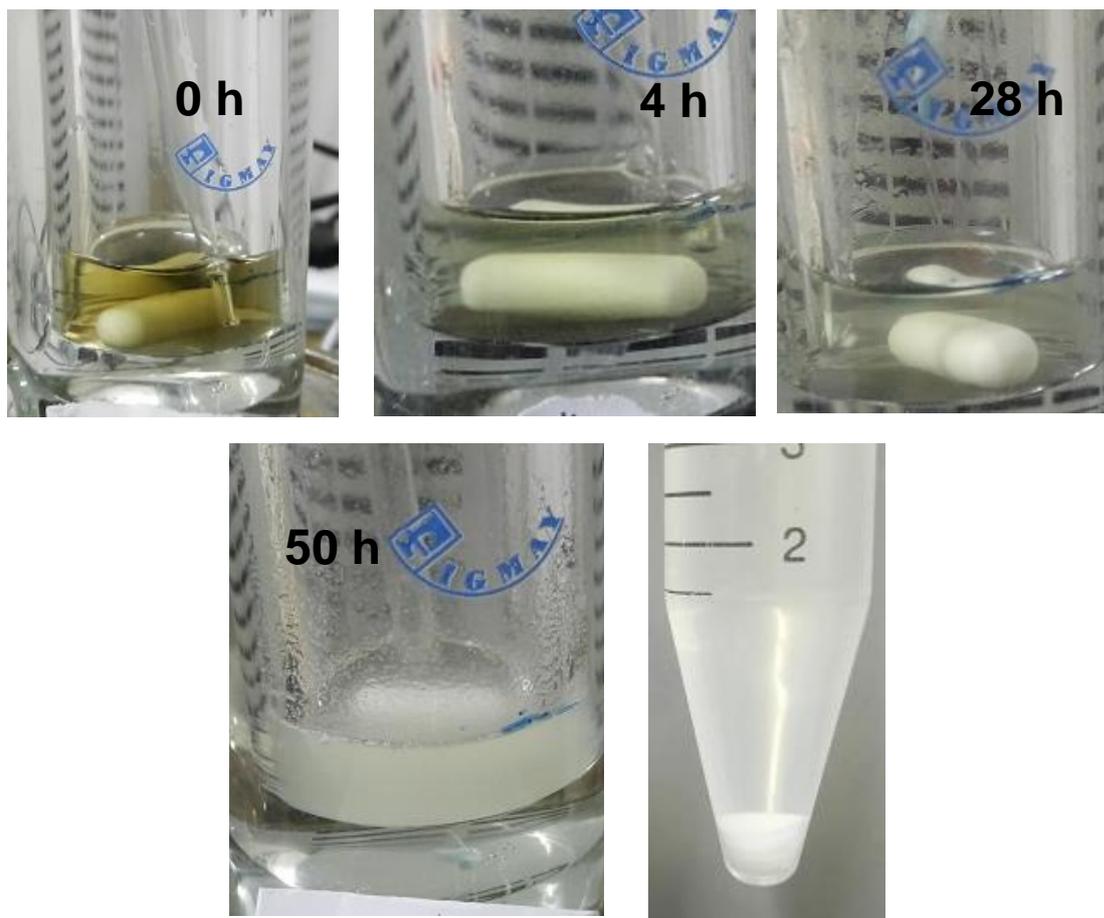


Figura 7.8. Fotografías del medio de reacción Hematin/glicerol/H₂O₂ (24 mg/L; 33 mM; 4,0 mM, respectivamente) con burbujeo de aire. **Abajo (derecha):** medio de reacción centrifugado.

7.4.2.2 Con catalasa como co-catalizador

Dado que la conversión de glicerol fue muy baja en las experiencias previas, se llevaron a cabo experimentos con enzima catalasa en reemplazo de hematin, con la finalidad de verificar si el blanqueamiento de hematin es lo que limitó el avance de la reacción. Se realizaron dos experiencias con el sistema AOX/catalasa (experiencias 11 y 12 de la Tabla 7.1). Se muestran en la Figura 7.9 dos cromatogramas de cada una de estas experiencias. En todos los casos se pudo observar el pico de MSTFA. En la Figura 7.10 se muestra la evolución temporal de la concentración de glicerol en estas dos experiencias y se puede notar una tendencia a la baja en ambas. Se calcularon grados de conversión luego de 24 h de 3,4 y 24,6% para las experiencias 11 y 12, respectivamente. La concentración de GA estuvo por debajo del límite de detección de la técnica en estas experiencias. Siebum et al. (2006) realizaron el tratamiento de una solución de glicerol 50 mM en buffer fosfato 50 mM de pH 7, a 21°C y a una presión de O₂ de 1 atm con un sistema AOX/catalasa. Reportaron la ausencia de conversión de glicerol luego de 48 h de reacción [3].

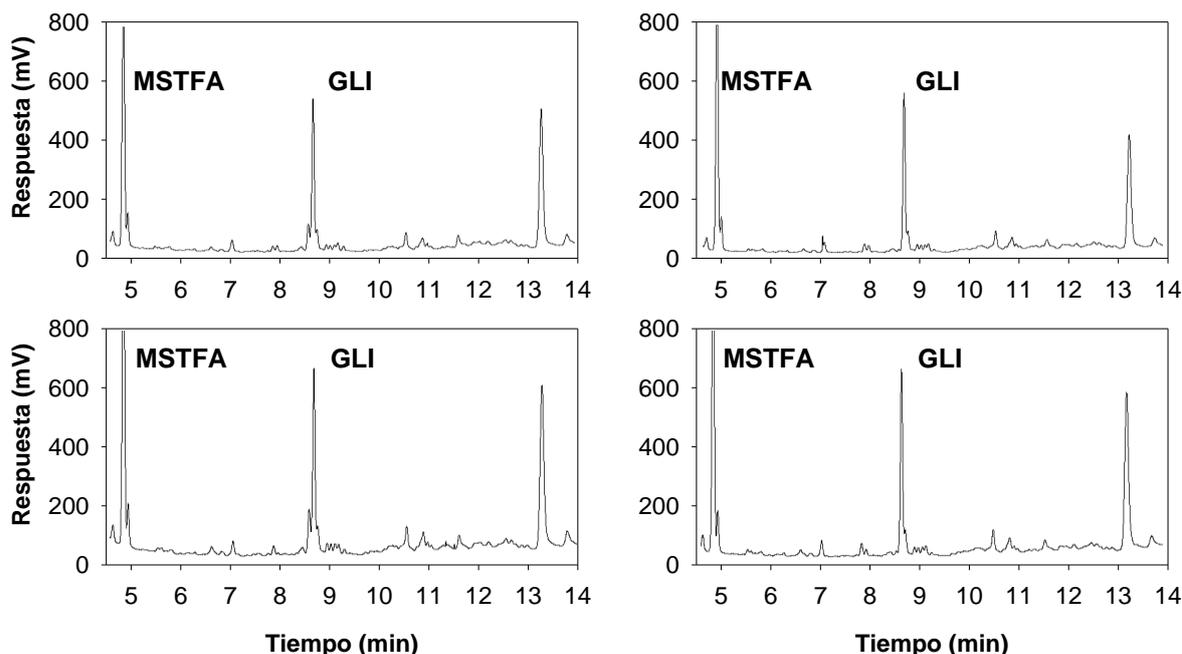


Figura 7.9. Experiencias de reacción para el sistema AOX/catalasa/glicerol. **Arriba:** Experiencia 11. **Abajo:** Experiencia 12. **Izquierda:** al inicio de la reacción. **Derecha:** a las 24 horas. GLI: glicerol; MSTFA: derivatizante.

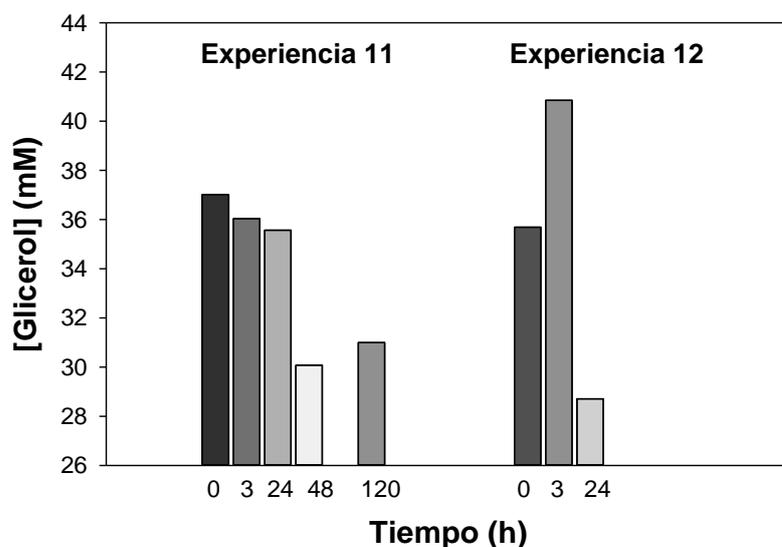


Figura 7.10. Variación de la concentración de glicerol en función del tiempo para las experiencias 11 y 12. La concentración de glicerol nominal al inicio de la reacción fue de 33 mM en ambos casos. Ver condiciones de reacción en Tabla 7.1.

7.4.3 Reacciones con GAO

7.4.3.1 Con hematin como co-catalizador

La Figura 7.11 muestra la absorbancia a 560 nm obtenida de muestras de la reacción N° 1 que fueron sometidas al reactivo de Schiff. Se observa que el sistema con GAO como catalizador entregó mayores valores de absorbancia en comparación con el sistema con AOX. En este caso la absorbancia aumentó con el tiempo de reacción lo que indica acumulación de aldehído. Para este sistema se aprecia además que la presencia de hematin repercute positivamente en el avance de la oxidación, ya que la concentración de

aldehído es mayor cuando éste está presente. Franke et al. (2003) [4] fueron capaces de determinar producción de GA a partir del glicerol utilizando el reactivo de Schiff.

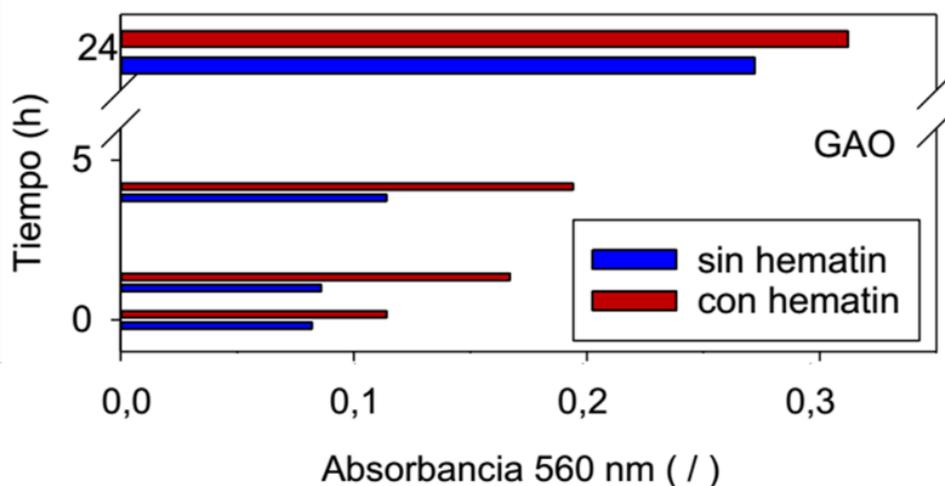


Figura 7.11 Prueba de Schiff sobre muestras del medio de reacción en sistemas GAO/Glicerol. (Experiencia N°1, Tabla 7.1).

En la Figura 7.12 se pueden observar los resultados cromatográficos para estos sistemas al inicio de la reacción y luego de 24 h. Se puede observar incremento del tamaño del pico de los hidratos de GA en el sistema que posee hematin. En ambos sistemas se aprecia un pequeño aumento en el pico del monómero a 7,3 min. Estos resultados guardan correlación con los obtenidos por medio del ensayo de Schiff.

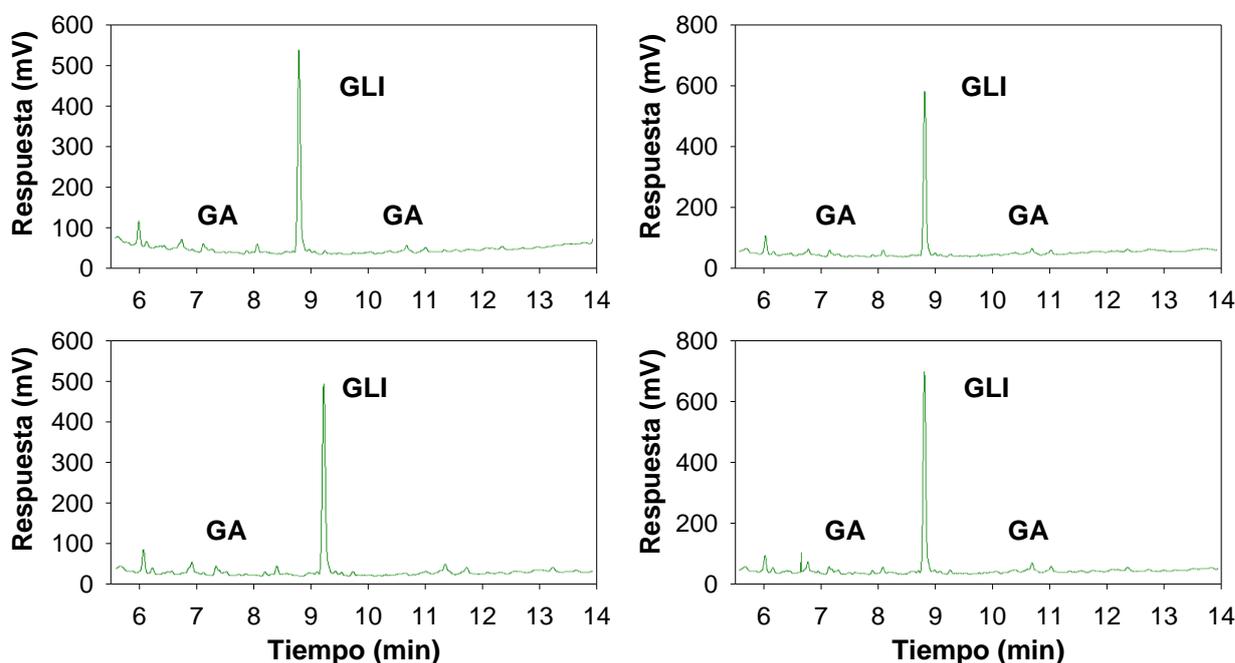


Figura 7.12. Cromatogramas de los experimentos de la entrada 1 de la Tabla 7.1 **Izquierda:** sistema GAO/GLI. **Derecha:** sistema GAO/Hem/GLI. **Arriba:** al inicio de la reacción. **Abajo:** luego de 24 h.

En la experiencia N°7 el pico de glicerol se observó perfectamente en todos los cromatogramas (Figura 7.13, a modo de ejemplo al inicio, a las 2 h y a las 24 h). Además, se observó el pico de derivatizante con lo cual constituyen cromatogramas útiles para la cuantificación. Sin embargo, durante esta experiencia la evaporación del medio de reacción fue importante ya que se realizó en un vaso de precipitados, y la pérdida de volumen no fue considerada en el cálculo de las concentraciones, lo cual conllevó a

determinaciones de concentraciones de glicerol crecientes (no decrecientes, como cabría esperar). No obstante, los resultados se incluyeron en la Tabla 7.4 ya que muestran una tendencia interesante.

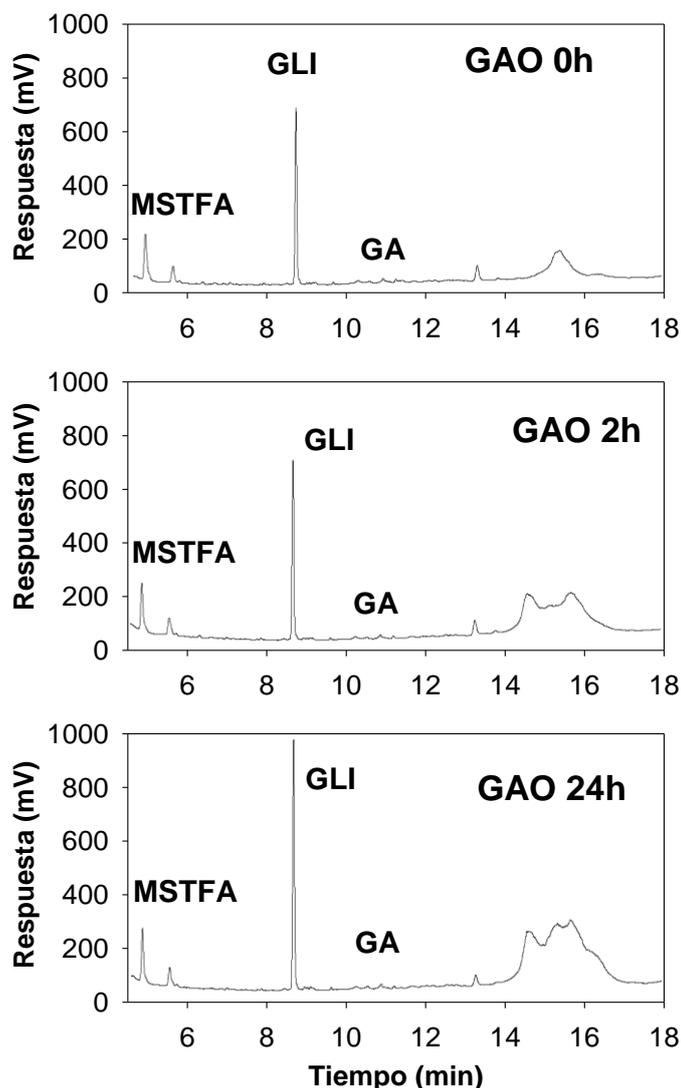


Figura 7.13. Cromatogramas correspondientes a la experiencia 7 de la Tabla 7.1. Sistema GAO/Hem/GLI. GLI: glicerol; MSTFA: derivatizante.

Tabla 7.4. Cuantificación de concentraciones de la experiencia 7 (sistema GAO/Hem/GLI) de la Tabla 7.1.

Tiempo (h)	[GLI] (mM)	[GA] (mM)	[GLI]+[GA] (mM)	[GA]/[GLI]
0	1427	282	1709	0,198
2	1504	324	1828	0,215
4	1435	406	1842	0,283
24	2129	13	2142	0,006
48	3118	305	3423	0,098
72	3944	348	4292	0,088

Nuevamente, se pudo detectar GA en los cromatogramas en forma de hidratos y su cuantificación fue posible, debido a que su concentración se encontró por encima del límite de detección. La concentración inicial de glicerol fue menor que la nominal (1700 mM), sin embargo, la suma de concentraciones de GA y de GLI brindó un valor muy próximo a ésta. La muestra al inicio de la reacción se tomó con GAO presente,

lo cual puede ser la causa de la aparición de GA y de la menor concentración de GLI respecto a la nominal. La concentración de glicerol en cambio, siempre fue en aumento debido a la evaporación del medio de reacción, con lo cual no fue posible calcular la conversión alcanzada. Sin embargo, aún así, es posible calcular la relación entre las concentraciones de GA y glicerol ($[GA]/[Gli]$) en cada tiempo. Se aprecia una tendencia en la concentración de GA; primero aumenta y luego de cierto tiempo comienza a disminuir probablemente debido a una sobre-oxidación.

Posteriormente se llevó a cabo una experiencia de reacción con el sistema GAO/hematin/glicerol, pero en una solución de buffer borato 0,1 M de pH 9,0. La elección de este solvente se justifica por los siguientes motivos:

- el H_2O_2 tiende a descomponerse no-catalíticamente con mayor facilidad a valores de pH alcalinos
- hematin posee comprobada actividad catalítica en el rango de pH 7 a 11 [5,6], siendo mayor a mayores pH
- mientras mayor es el pH del medio, mayor es la solubilidad de hematin, pudiendo así aplicarla en mayor concentración

La hipótesis es que en estas condiciones se facilita la labor catalítica de hematin a la vez que se incrementa su concentración, eliminando el H_2O_2 generado en el paso que involucra a GAO. Por otro lado, GAO es aún activa en este pH, según se discutió en el capítulo 1. La concentración de hematin en esta experiencia fue 5 veces mayor a la aplicada en las experiencias 4 y 8. En la Figura 7.14 se muestran dos cromatogramas de este sistema. En ambos casos se observa el pico de glicerol, el del derivatizante, el pico a 7,4 min correspondiente a GA y un pequeño pico a 6,6 min. Se sospecha que el pico a 6,6 min puede deberse a un producto de sobreoxidación de glicerol, debido a que ha aparecido en cromatogramas obtenidos a partir de sistemas Fenton (Capítulo 4). Esto pareciera indicar que hematin ha desempeñado el rol esperado como mimético de catalasa, favoreciendo el progreso de la reacción. El pico a 9,4 min del cromatograma de la izquierda es un pico fantasma, ya que no volvió a aparecer al repetirse la medición de la muestra.

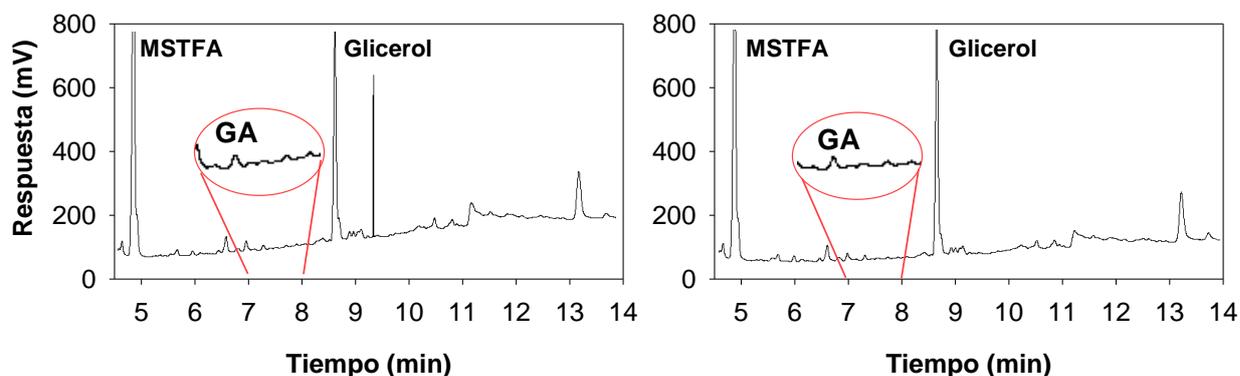


Figura 7.14. Cromatogramas correspondientes al sistema GAO/Hem/glicerol a pH 9 (experiencia 14, Tabla 7.1). Izquierda: al inicio de la reacción. Derecha: luego de 48 horas. GA: gliceraldehído; MSTFA: derivatizante.

A diferencia de AOX, en ninguna de las experiencias con GAO se apreció blanqueamiento de hematin con el tiempo de contacto. Esto, permitiría indicar que no hubo acumulación de H_2O_2 durante la reacción.

La evolución de la concentración de GA en el tiempo para esta experiencia se muestra en la Figura 7.15 (color verde oscuro). El grado de conversión de glicerol fue de 5,2% luego de 24 h y la máxima concentración de GA fue de 94,4 mM en el mismo tiempo.

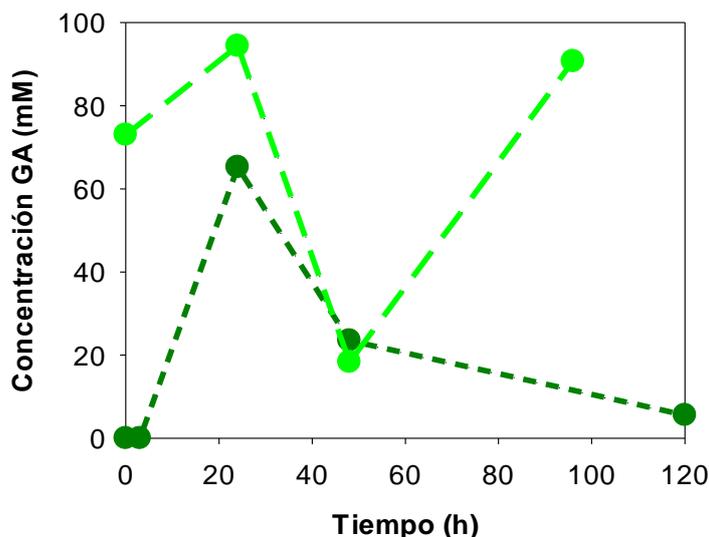


Figura 7.15. Variación de la concentración de GA en función del tiempo. La concentración de glicerol nominal al inicio de la reacción fue de 1700 mM. Círculos verdes (oscuro): experiencia 13; círculos verdes (claros): experiencia 14. Ver condiciones de reacción en Tabla 7.1.

7.4.3.2 Con catalasa como co-catalizador

Se realizó una experiencia utilizando el sistema GAO/catalasa/glicerol. En la Figura 7.16 se muestran dos cromatogramas correspondientes a la entrada 13 de la Tabla 7.1. Se puede observar en las figuras la presencia tanto de MSTFA en exceso como de glicerol. Las concentraciones de GA obtenidas por GC a distintos tiempos se muestran en la Figura 7.15 (color verde claro). El grado de conversión alcanzado fue de 1% luego de 24 h de reacción. Además, a este tiempo se detectó el pico a 7,4 min, correspondiente a GA. Dicho pico no apareció al inicio de la reacción. La máxima concentración de GA alcanzada fue de 65,3 mM luego de 24 h. Esto indica que el GA producido inicialmente pudo continuar oxidándose. De hecho, se observa la aparición de un pico alrededor de los 6,6 min, a partir de las 24 h (flecha naranja en la Figura 7.16), el cual también se encontró en la reacción de glicerol por medio del sistema Fenton (Figura 4.6 – Capítulo 4). En la Figura 7.17 se muestra la evolución temporal de las áreas de los picos de GA a 7,3 min y el pico de 6,6 min. Con la finalidad de obtener un estimado de la selectividad hacia la producción de GA, se dividió el área del pico de GA por el área del pico a 6,6 min. De esta manera, se obtiene una selectividad hacia GA de cerca del 30% a las 24, 48 y 120 h. Sin embargo, este método de estimación no tiene en cuenta la diferencia entre los factores de respuesta de ambos picos, lo que puede derivar en una subestimación de las selectividades hacia GA. Para obtener una estimación certera de la selectividad se deberían identificar los productos de oxidación y cuantificarlos.

La sobreoxidación de glicerol con la enzima GLIOX ha sido reportada por Roncal et al. [7], produciéndose GA en el primer paso, el cual continua oxidándose a ácido glicérico. GAO es una enzima estructuralmente muy similar a GLIOX y, además, se ha reportado que GA constituye un sustrato para GAO (Capítulo 1). Por otro lado, la ausencia de una peroxidasa (mimetizada por hematin) no impidió el avance de la reacción, porque como se discutió anteriormente, GAO se encontraba en una forma parcialmente activa al inicio de la reacción. De todos modos, parece probable que el rendimiento de la reacción pueda ser mejorado si a este sistema se le adiciona también hematin.

Siebum et al. (2006) [3] reportaron una conversión de 1% luego de 48 h con el sistema GAO/catalasa, en iguales condiciones a las descritas para AOX en la Sección 7.4.2, mientras que Klibanov et al. (1986) [8] reportaron una conversión de 6% luego de 3 semanas de reacción, partiendo de una solución de glicerol 2 M, utilizando 50 U/mL de GAO y 1000 U/mL de catalasa en buffer fosfato 0,1 M pH 7, a 4°C. Por su parte, Roncal et al. (2012) [7] reportaron conversiones de glicerol menores al 10% luego de 20 h con un

sistema de reacción más complicado que implica la presencia de una peroxidasa, una catalasa, un mediador redox y una oxidasa. La conversión aquí presentada supera al primer reporte en magnitud y al segundo respecto al tiempo empleado para la reacción. El último reporte es superador en cuanto a grado de conversión, el cual se logra a expensas de complejizar el medio de reacción.

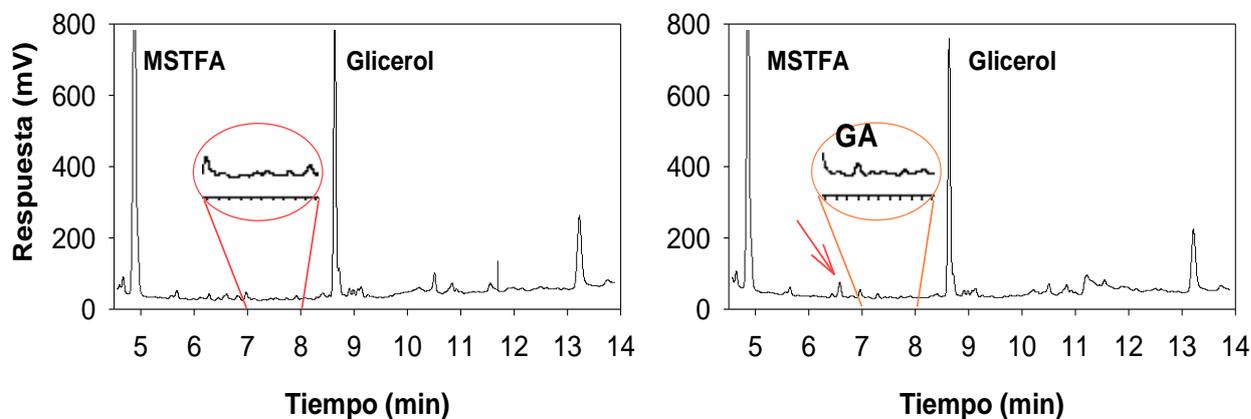


Figura 7.16. Experiencia de reacción para el sistema GAO/catalasa/glicerol (experiencia 13, Tabla 7.1). Izquierda: al inicio de la reacción. Derecha: luego de 24 horas. GA: gliceraldehído; MSTFA: derivatizante.

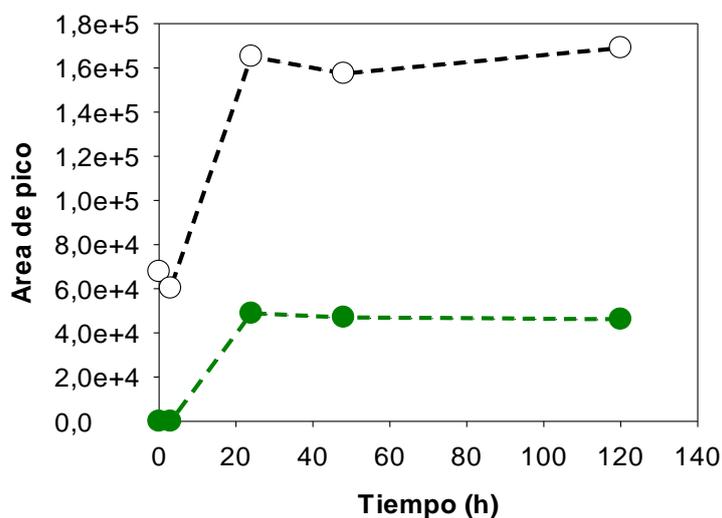


Figura 7.17. Variación del área de picos en función del tiempo para la experiencia 13. Círculos blancos: pico a 6,6 min círculos verdes: pico de gliceraldehído (7,3 min). Ver condiciones de reacción en Tabla 7.1.

7.4.4 Resumen de la evidencia cromatográfica

En la Tabla 7.5 se recopilan los datos de porcentajes de conversión y concentraciones alcanzadas de gliceraldehído a las 24 h de reacción en las distintas experiencias presentadas en las Secciones 7.4.2 y 7.4.3, en las cuales fue posible cuantificar ambas especies. Con estos valores se calculó la actividad de las oxidases como los micromoles de glicerol convertidos por hora y por mg de oxidasa añadida a los sistemas.

Tabla 7.5. Grados de conversión de glicerol y concentraciones de GA máximas alcanzadas en experiencias de oxidación. **ND*** Por debajo del límite de detección
****** Valores a las 4 h de reacción.

Experiencia Nº	Enzima	[Enzima] mg/L	[GLI] ₀ (mM)	[Hematin] mg/L	[Catalasa] mg/L	Conversión a 24 h (%)	Actividad ($\mu\text{mol/h}^*$ mg _{oxidasa})	[GA] a 24 h (mM)	Forma de GA	¿Se blanqueó hematin?
10	AOX	61	33	24	-	3,2	0,72	3,31	hidrato	si
11	AOX	71	33	-	83	3,4	0,66	ND*	hidrato	-
12	AOX	385	33	-	206	24,6	0,88	ND*	hidrato	-
14	GAO	2444	1700	108	-	5,2	1,51	94,4	monómero e hidrato	no
13	GAO	2468	1700	-	169	0,94	0,27	65,3	monómero e hidrato	-

La mayor concentración de GA se obtuvo con el sistema GAO/Hem a pH 9. También en este experimento se registró la mayor actividad específica para oxidar glicerol siendo mucho mayor que empleando catalasa. Probablemente, la mayor concentración de hematin empleada y el aumento del pH en dos puntos promovieron un mayor consumo de H_2O_2 . De hecho, no se ha evidenciado blanqueo de hematin en estas condiciones. No obstante, probablemente exista un máximo en la concentración de GA a tiempos menores que 24 h, tal como lo sugiere los resultados de la experiencia 7 (sistema GAO/HEMATIN a pH 7 y menores concentraciones de ambos catalizadores). De hecho, tanto con hematin como con catalasa se ha podido evidenciar la evolución en el tiempo de un pico a 6,8 min que podría corresponder a un producto de sobre-oxidación de GA.

Con AOX se obtuvieron concentraciones de GA mucho más bajas tanto con hematin como con catalasa. Se evidenció fuerte blanqueamiento en los sistemas con hematin, producto de la acumulación de H_2O_2 . Se hipotetiza que en este caso la reacción inicia, es decir glicerol es atacado por AOX pero el H_2O_2 generado, al ser consumido por hematin, genera radicales libres que producen su blanqueamiento, inactivándola irreversiblemente. De esta manera, el H_2O_2 se acumula en el medio de reacción, inhibiendo a la oxidasa. El reemplazo de hematin por catalasa, no obstante, tampoco resultó eficaz. Una mayor concentración de catalasa y de AOX generaron una mayor conversión de glicerol indicando que el sistema es catalíticamente activo. Aunque, aún en este caso, no pudo detectarse acumulación apreciable de GA. Una posible causa es que GA reaccione con restos aminoacídicos de AOX.

7.4.5 Evolución de oxígeno disuelto en sistemas oxidasa/hematin

El oxígeno del aire que se burbujea en el medio de reacción es la especie oxidante en estos sistemas. Por lo tanto, su consumo en el tiempo es indicativo de avance de reacción. El monitoreo de esta variable durante la reacción es una manera indirecta pero muy sencilla para detectar la ocurrencia de la reacción. Una disminución de la concentración de oxígeno por debajo del valor de saturación a la temperatura de reacción se interpreta como indicativa de reacción, mientras que un aumento paulatino hasta los niveles de saturación indicaría que la velocidad de reacción decrece a causa del consumo del sustrato reductor o por inactivación de la enzima. La Figura 7.18 muestra la variación de la concentración de oxígeno disuelto durante la reacción de oxidación de glicerol en presencia de GAO en medios sin aireación. A modo de control positivo se monitoreó la concentración de oxígeno en sistemas en donde se reemplaza glicerol por el sustrato natural de la enzima: galactosa. Las líneas azules indican sistemas sin hematin mientras que las líneas rojas indican sistemas con hematin. En todos los sistemas se observa la disminución de la concentración de oxígeno, aunque la reacción es más rápida con galactosa como sustrato (izquierda) ya que la tasa de consumo de oxígeno observada es mayor. También se observa que la reacción es más rápida siempre que hematin se encuentra presente (curvas rojas). En el sistema GALACTOSA+GAO sin hematin, se insufló aire por unos minutos a los de 40 min y luego se cortó el suministro. Se observa nuevamente un marcado descenso del oxígeno, indicando que GAO seguía activa, aunque la tasa de consumo es menor a la inicial. Por otro lado, en la experiencia con hematin la velocidad de consumo oxígeno es mucho mayor. El agregado de aireación por algunos minutos y posterior corte del suministro indica que el sistema seguía activo y la tasa de consumo de oxígeno siguió siendo mayor a la observada sin hematin.

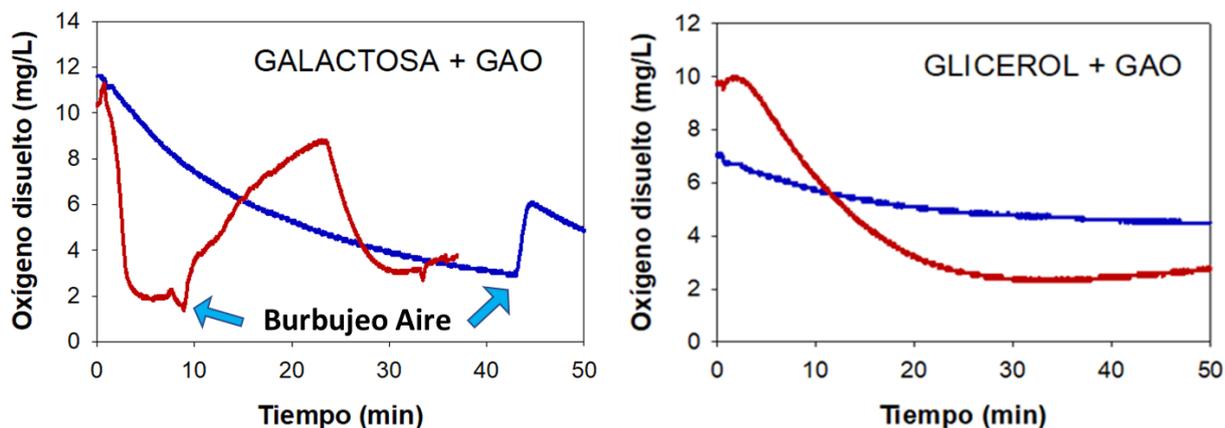


Figura 7.18. Evolución del oxígeno disuelto en soluciones acuosas no aireadas de galactosa (izquierda) y glicerol (derecha) en presencia de GAO. Las curvas azules corresponden a sistemas sin hematin y las curvas rojas a sistemas con hematin.

La Figura 7.19 muestra la variación de la concentración de oxígeno disuelto durante la reacción de oxidación de glicerol en presencia de GAO o AOX, pero con burbujeo constante de aire. A modo de control en el caso de AOX se utilizó metanol como sustrato. En el sistema GALACTOSA+GAO es apreciable la disminución de oxígeno en el tiempo. Cerca del minuto 16 se agregó hematin a este sistema observándose un abrupto descenso en la concentración de oxígeno luego de un mínimo y muy corto incremento. Este marcado descenso de la $[O_2]$ se observa también en la curva roja cuando se agrega hematin desde el inicio de la reacción. Por otro lado, el sistema GLICEROL+GAO no acusa disminución apreciable de la $[O_2]$, y esto se debe al burbujeo de aire al sistema, ya que en la Figura 7.18 (derecha) sí se observa consumo en ausencia de aireación. Cuando se agrega hematin al sistema el consumo de oxígeno se acelera, indicando que se produce oxidación.

Roncal et al. (2012) realizaron mediciones de perfiles de O_2 disuelto en reacciones de oxidación de glicerol [7], utilizando la enzima glioxal oxidasa (GLIOX). Esta enzima, al igual que GAO, es una oxidasa metaloradical de cobre por lo cual su sitio activo y mecanismo de acción son muy similares a los de GAO. En dicho artículo, los autores reportan que esta enzima mejora su actividad cuando agregan al sistema un oxidante (Mn^{+3}) acompañado del agregado de la enzima HRP (peroxidasa). En este reporte, HRP es activada por el H_2O_2 y provee al sistema de Mn^{+3} que es el responsable de que GLIOX pueda regenerarse (oxidarse) desde su estado inactivo para reingresar al ciclo catalítico que permite la oxidación del glicerol. Este paso de regeneración involucra la oxidación del radical Tyr 272 de la secuencia de la enzima, mediada por el Mn^{+3} (ver más detalles de los estados posibles de GAO en el Capítulo 1). Además, afirman que el oxidante debe estar presente para que se produzca esta reactivación. En el caso de GAO, como se mencionó en el Capítulo 1, se ha reportado que esta reactivación puede darse incluso en ausencia de un oxidante, es decir, solo en presencia de peroxidasa [9]. Siguiendo estas evidencias se puede postular que GAO aumenta su actividad por el agregado de hematin, debido a que este es capaz de ejercer su acción peroxidática, reactivando a la enzima. Además, ayuda a explicar el período de latencia observado en las gráficas para GAO de la Figura 7.19; al principio la reacción es lenta debido a que parte de la enzima está en forma inactiva, lo cual se traduce en una leve disminución del O_2 en los primeros minutos de la reacción y luego se acelera fuertemente su consumo. Por otro lado, Roncal et al. (2012) [7]. afirman además que el agregado de una enzima catalasa ayuda al sistema a mantenerse activo por más tiempo, debido a que la peroxidasa requiere solo de una pequeña cantidad de H_2O_2 para ser activa, mientras que su exceso puede producir la inhibición, tanto de la peroxidasa como de la oxidasa. Por lo expuesto y dado que hematin es capaz de producir la descomposición de H_2O_2 para generar oxígeno, es posible que el hematin pueda cumplir ambas acciones, de acuerdo a las condiciones del medio. De hecho, este fenómeno

explicaría en parte porque hematin no fue blanqueado en los experimentos de oxidación como sí lo fue con AOX. Hematin al ejercer su acción peroxidática sobre GAO, consume H_2O_2 inactivante sin generar radicales libres que ocasionan su blanqueamiento (vía pseudo-catalática, Esquema 1.2 de capítulo 1).

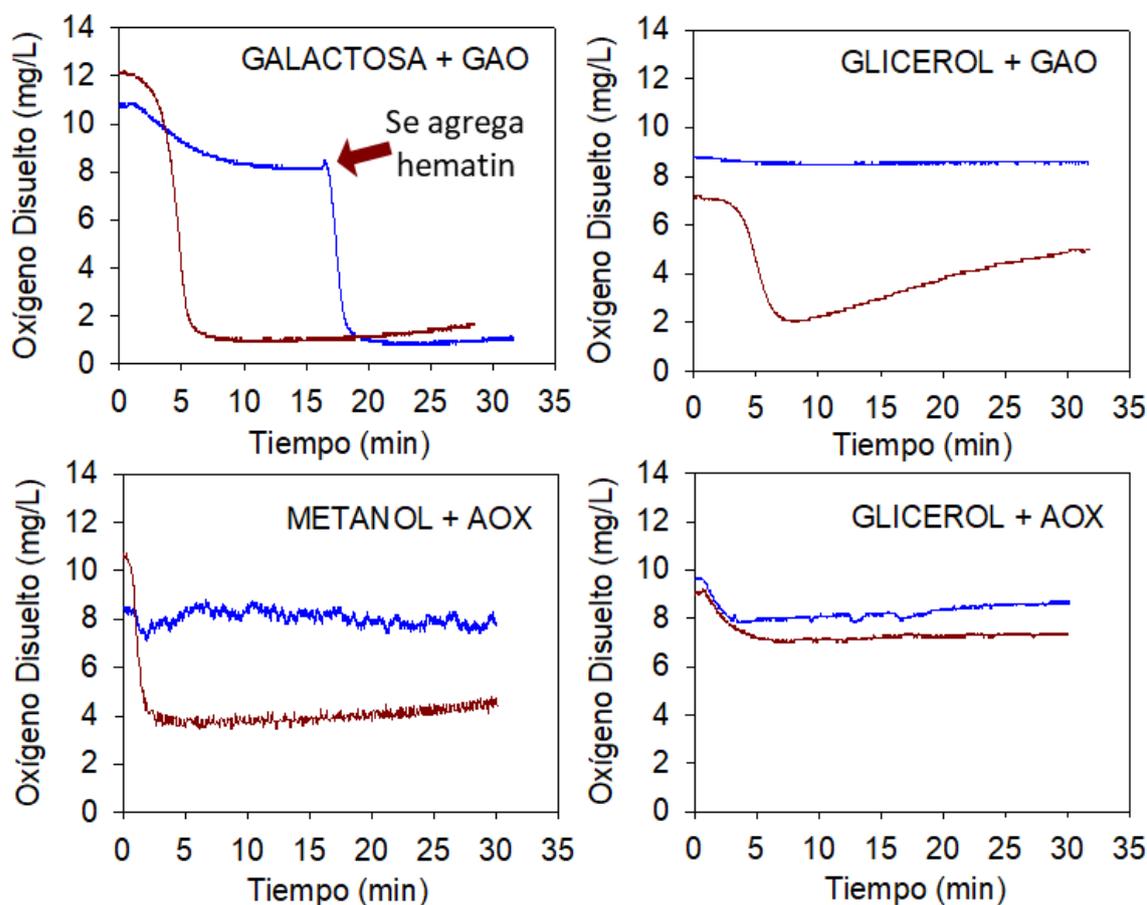


Figura 7.19. Evolución del oxígeno disuelto en soluciones acuosas de glicerol aireadas en presencia de GAO o AOX y en ausencia (líneas azules) o en presencia (líneas rojas) de hematin.

En el sistema METANOL+AOX se observa una ligera caída del oxígeno en ausencia de hematin (curva azul) y un rápido restablecimiento hacia los niveles originales. Por otro lado, cuando hematin está presente, al igual que en el caso GALACTOSA+GAO, se produce una rápida caída del oxígeno, aunque su magnitud es menor a la que se produce con GAO. A la vez, el período de latencia en los sistemas con AOX es menor que con GAO, lo cual concuerda con la idea de que GAO requiere de cierto tiempo para ser activada.

En el sistema GLICEROL+AOX se observa disminución de la concentración de O_2 , tanto en presencia como en ausencia de hematin indicando reacción en ambos casos, aunque en mayor extensión cuando hematin está presente en el sistema. En una experiencia muy similar a la aquí descrita, sin el agregado de catalasa o peroxidasa, Koch et al. [10] no observaron conversión de glicerol por medio del seguimiento del oxígeno disuelto, lo cual lo asocian a una mayor dificultad de unión del glicerol por poseer un sustituyente hidrofílico (OH) en el carbono alfa. Como se esperaba, la reacción es más lenta con glicerol como sustrato que con metanol. Por otro lado, el incremento de los niveles de oxígeno disuelto hacia los valores iniciales es más lento cuando hematin se encuentra presente, lo cual es indicativo de que la reacción continúa debido a que AOX se mantiene activa por más tiempo.

Con AOX los períodos de latencia fueron muy similares en todos los casos (de aproximadamente 1 minuto). En cambio, con GAO dichos períodos se han visto ligeramente alterados por el tipo de sustrato y

la presencia o ausencia de hematin, lo que sugiere que hay diferencias en el efecto producido por hematin en los sistemas que contienen AOX o GAO. De este modo, hematin no tendría incidencia en el estado de oxidación de AOX, ya que su agregado no modifica el período de latencia, como sí se observó con GAO. Por otro lado, resulta plausible que hematin en presencia de AOX, actúe ejerciendo actividad catalasa, consumiendo el H_2O_2 generado y manteniendo a AOX activa por más tiempo. Según se discutió en el Capítulo 1, el H_2O_2 es capaz de oxidar reversiblemente a grupos sulfhidrilos (SH) esenciales para la actividad catalítica de AOX, inactivándola [11]. Esta observación encuentra sustento en estas experiencias ya que las reacciones con AOX (sin hematin, curvas azules) se frenan rápidamente, aumentando nuevamente la concentración de oxígeno hacia los valores iniciales, a diferencia del sistema GALACTOSA+GAO en el cual el consumo de oxígeno, incluso en ausencia de hematin, se extiende por tiempos más prolongados. Por lo tanto, AOX es más sensible a inactivación por H_2O_2 que GAO.

7.5 Conclusiones

En este capítulo se presenta evidencia espectroscópica y cromatográfica de formación de gliceraldehído a partir de glicerol mediada por las oxidasas comerciales AOX y GAO empleando oxígeno del aire como agente oxidante en solución acuosa y a temperatura ambiente. Se modificó secuencialmente el procesamiento de las muestras previas al análisis por GC en relación a lo descrito en el capítulo 3, con la finalidad de inactivar la oxidasa y asegurar una completa derivatización de los analitos de interés. Esto condujo a llevar a cabo el proceso de inactivación enzimática y secado en un solo paso, colocando las muestras acuosas en un tubo con piridina y tamices moleculares. Posteriormente, las muestras se colocaron en el freezer para el secado y finalmente se trataron con una mayor dosis de derivatizante y se midieron por GC, en el mismo día de toma de muestras.

El pico de monómero de gliceraldehído pudo ser detectado en medios de reacción con los sistemas GAO/Catalasa/Glicerol y GAO/Hematin/glicerol (a pH 9) aunque en ambos casos las conversiones fueron bajas. La mayor concentración de GA (94,4 mM en 24 h) se obtuvo con el sistema GAO/Hematin/GLI a pH 9, partiendo de una concentración de glicerol inicial de 1700 mM. En sistemas AOX/CAT/GLI y AOX/hematin/GLI se calcularon grados de conversión de glicerol de entre 7,4 y 19,5 % aunque solo fue posible estimar una concentración de GA de 3,31 mM luego de 24 h en el sistema de menor grado de conversión. En muchos casos aparecieron picos relacionados a hidratos y monómeros de GA aun al inicio de la reacción, lo cual está relacionado con un inefectivo tratamiento de inactivación de la enzima luego de que se tomaron las muestras.

Mediciones de oxígeno disuelto en soluciones de glicerol con GAO o AOX proveen indicios de que la oxidación glicerol se llevó a cabo durante los primeros minutos. Se pudo observar consumo de oxígeno en todos los sistemas y, en todos los casos, el consumo se aceleró con el agregado de hematin, indicando que su presencia favorece a la oxidación de los sustratos. Se discutieron dos vías por medio de las cuales hematin ejerce su efecto: sobre GAO parece ejercer una acción fundamentalmente peroxidática, reactivando a GAO desde un estado inactivo. Por otro lado, en presencia de AOX, hematin actúa como catalasa a través de la vía pseudo-catalítica que implica la generación de radicales libres que ocasionan su blanqueamiento.

De esta manera, AOX queda sin la protección necesaria, inactivándose rápidamente a causa del H_2O_2 generado, lo cual detiene la reacción. Por otro lado, el reemplazo de hematin por catalasa tampoco fue eficaz en tanto que no pudo detectarse evolución apreciable de GA a pesar de observar mayores conversiones de glicerol. Pareciera que la cantidad de enzima catalasa no fue suficiente para eliminar el H_2O_2 formado a causa de la reacción, quien en su lugar provocó la inactivación de AOX, ya que ésta

demonstró ser más sensible a H₂O₂. Resulta plausible además que GA o sus hidratos reaccionen con restos aminoacídicos de AOX.

7.6 Resultados publicados

Parte de estos resultaos han sido publicados en:

- Parodi, Adrián ; Asteasuain, Mariano; Magario, Ivana. **“Kinetic analysis and evaluation of galactose oxidase activation by hematin in the green oxidation of glycerol”**. *Biochemical Engineering Journal* 176 (2021), 108203. DOI: 10.1016/j.bej.2021.108203

Además, se ha publicado el siguiente trabajo en un Congreso:

- Parodi. Adrián R.; Magario. Ivana M. **“Producción de gliceraldehído a partir de glicerol mediado por el sistema catalítico oxidasa-hematin”**. X Congreso de Catálisis del Mercosur (X MercoCat) - XXI Congreso Argentino de Catálisis (XXI CAC 2019). Santa Fe. Argentina. septiembre 18-20. 2019.

7.7 Referencias

- [1] R. Fernandez-Lafuente, Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation, *Enzyme Microb. Technol.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.08.009>.
- [2] M.N. Gupta, Enzyme function in organic solvents, *Eur. J. Biochem.* (1992). <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb19823.x>.
- [3] A. Siebum, A. van Wijk, R. Schoevaart, T. Kieboom, Galactose oxidase and alcohol oxidase: Scope and limitations for the enzymatic synthesis of aldehydes, *J. Mol. Catal. B Enzym.* (2006). <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.04.003>.
- [4] D. Franke, T. Machajewski, C.C. Hsu, C.H. Wong, One-pot synthesis of L-fructose using coupled multienzyme systems based on rhamnulose-1-phosphate aldolase, *J. Org. Chem.* 68 (2003) 6828–6831.
- [5] A.R. Parodi, C. Merlo, A. Córdoba, C. Palopoli, J. Ferreyra, S. Signorella, M.L. Ferreira, I. Magario, Application of metal complexes as biomimetic catalysts on glycerol oxidation, *Mol. Catal.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.11.007>.
- [6] A. Córdoba, N. Alasino, M. Asteasuain, I. Magario, M.L. Ferreira, Mechanistic evaluation of hematin action as a horseradish peroxidase biomimetic on the 4-aminoantipyrene/phenol oxidation reaction, *Chem. Eng. Sci.* 129 (2015) 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.02.031>.
- [7] T. Roncal, C. Muñoz, L. Lorenzo, B. Maestro, M.D.M. Díaz de Guereñu, Two-step oxidation of glycerol to glyceric acid catalyzed by the *Phanerochaete chrysosporium* glyoxal oxidase, *Enzyme Microb. Technol.* 50 (2012) 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.11.007>.
- [8] A.M. Klibanov, B.N. Alberti, M.A. Marletta, Stereospecific oxidation of aliphatic alcohols catalyzed by galactose oxidase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108 (1982) 804–808. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(82\)90900-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(82)90900-7).
- [9] J.W. Whittaker, Free radical catalysis by galactose oxidase, *Chem. Rev.* (2003). <https://doi.org/10.1021/cr020425z>.
- [10] C. Koch, P. Neumann, O. Valerius, I. Feussner, R. Ficner, Crystal structure of alcohol oxidase from

Pichia pastoris, PLoS One. (2016). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149846>.

- [11] R. Couderc, J. Baratti, Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase, *Agric. Biol. Chem.* (1980). <https://doi.org/10.1271/bbb1961.44.2279>

Capítulo 8: Conclusiones y perspectivas futuras

8.1 Conclusiones generales

Con la motivación de valorizar biomasa bajo los principios de la química verde, esta tesis planteó como objetivo general la valorización de glicerol a través de su oxidación, orientada a la obtención de productos que presenten bioactividad de interés industrial. De esta manera, se evaluaron catalizadores organometálicos y enzimáticos en la oxidación primaria de glicerol para la producción de las triosas gliceraldehído (GA) y dihidroxiacetona (DHA).

Ensayos de actividad antibacteriana llevados a cabo con estándares de ambas triosas sobre las cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) permitieron concluir que GA fue activo sobre las tres cepas en dosis del orden a aquellas encontradas con monoterpenos naturales (6,25 g/L). Este hallazgo amplía las potenciales aplicaciones de GA. Basados en estos resultados, los experimentos de oxidación de glicerol se direccionaron hacia la obtención selectiva de GA.

Una segunda etapa de este proyecto consistió en el desarrollo de una técnica analítica alternativa para la detección y cuantificación de glicerol, GA y DHA en muestras acuosas por medio de cromatografía gaseosa acoplada a un detector de ionización de llama (GC-FID), la cual implica la derivatización con un agente silanzante en un solo paso. La derivatización en piridina produjo una profunda mejora en el comportamiento cromatográfico de los analitos, permitiendo su detección y cuantificación. Un inconveniente importante de esta técnica fue la sensibilidad de los productos silanzados a la hidrólisis. Debido a que las reacciones de oxidación de glicerol siempre se llevaron a cabo en medios acuosos, se abordaron dos metodologías para eliminar el agua y asegurar la completa derivatización de los analitos: el secado al vacío y el secado con tamices moleculares en piridina. Esta etapa fue completada con éxito. La técnica desarrollada fue validada y contrastada con una de técnica de análisis por HPLC difundida en la literatura.

En el cuarto capítulo se evaluó como catalizador a hematin, una protoporfirina de hierro natural que mimetiza el sitio activo de enzimas peroxidasas y catalasas. Se utilizó H_2O_2 como agente oxidante. Se exploraron distintas condiciones de reacción, no obstante, las conversiones logradas fueron bajas. En todos los casos se observó blanqueamiento de hematin y burbujeo de oxígeno. Se interpretó y discutió la evidencia encontrada a partir de la propuesta de un mecanismo de reacción según el cual, se postula que la capacidad del glicerol de actuar como sustrato reductor en la vía peroxidática de hematin es baja. En su lugar, el intermediario activado del catalizador (E_1) coordina preferentemente a una segunda molécula de H_2O_2 por sobre la molécula de glicerol, generando oxígeno molecular y radicales superóxido que desencadenan su blanqueamiento irreversible. Se hipotetiza además que la acción catalítica sobre el glicerol es debida a un proceso tipo Fenton, el cual es generado por la liberación a la solución del hierro de la estructura de la porfirina durante su blanqueamiento. Posteriormente, éste desencadena una serie de reacciones radicalarias que llevan a la formación de GA. El proceso Fenton es operativo a pH ácidos, lo cual explica la mayor concentración de GA alcanzada a pH 5.

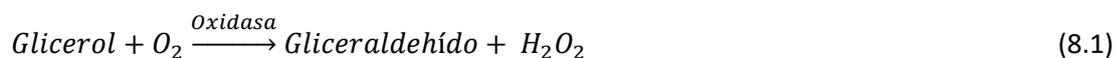
Por otro lado, la inmovilización de hematin sobre partículas porosas de polimetacrilato, a través de uniones covalentes (Glu) y de interacciones electrostáticas (D), brindó catalizadores que mostraron actividad peroxidática hacia fenol, sin evidenciar blanqueamiento. El catalizador D, además, mantuvo actividad durante 4 ciclos de reuso y lavado. No obstante, estos catalizadores mostraron escasa o nula actividad en la oxidación de glicerol y fueron blanqueados durante la reacción. Determinaciones por cromatografía gaseosa del medio de reacción a distintos tiempos confirmaron la generación de GA. De esta manera, GA pudo ser identificado como único producto de reacción bajo condiciones suaves de

operación y en ausencia de solventes orgánicos. No obstante, la conversión de glicerol y la producción de GA alcanzadas resultaron aún más bajas que con hematin libre.

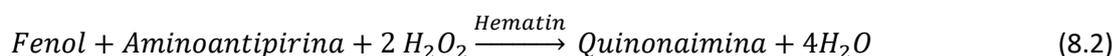
En el capítulo 5 se evaluó a MnL, un complejo mononuclear sintético de manganeso con ligandos polidentados tipo base de Schiff. MnL no presentó propiedades catalíticas en la producción de GA a partir de soluciones acuosas de glicerol tratadas con H_2O_2 . No obstante, presentó actividad catalítica en la oxidación de fenol (vía peroxidática) y en la descomposición de H_2O_2 para formar O_2 (vía catalítica) aunque sólo al inicio de la reacción y deteniéndose rápidamente. Dado que el rol del solvente es crucial para la formación de intermediarios catalíticos relevantes, se chequearon diferentes solventes, con la finalidad de incrementar la eficiencia catalítica del catalizador. La incorporación al sistema de solventes con capacidad dadora de electrones, como dimetilsulfóxido o acetona, mejoraron la actividad peroxidática de MnL. En cambio, en el caso de hematin, el agregado de estos solventes inhibió la actividad peroxidática debido probablemente a que se dificulta la ruptura heterolítica del enlace O-O y la formación del compuesto E_1 de hematin.

Para el complejo MnL se propuso un mecanismo de reacciones competitivas de peroxidación y dimerización. Según el mismo, la actividad peroxidática a cortos tiempos de reacción tiene lugar a través de un ciclo que involucra a las especies activas Mn(IV)/Mn(II). Este ciclo se detiene rápidamente por la formación de una especie inactiva, probablemente un dímero Mn(IV)Mn(IV) cuyos centros metálicos se unen a través de un doble puente de oxígeno.

Los dos últimos capítulos de la tesis se abocaron al estudio de dos sistemas bicatalíticos basados en las enzimas comerciales galactosa oxidasa de *Dactylium dendroides* (GAO) y alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* (AOX), ambas en tándem con hematin. La reacción catalizada por las oxidasas, en la cual se basa este es la siguiente:



En el capítulo 6, a esta reacción se le acopló la siguiente:



Mientras que en el capítulo 7, la reacción 8.1 se acopló a:



Se hipotetiza así que hematin es capaz de cumplir la doble función de convertir el H_2O_2 , generado en la primera reacción, ya sea en oxígeno (vía catalítica), o generando un colorante en presencia de fenol y 4-aminoantipirina (vía peroxidática), lo cual es utilizado como método rápido de detección de actividad inicial de las oxidasas. Esta hipótesis fue comprobada: se evaluó el efecto de la variación de la concentración de glicerol, enzima y hematin sobre las velocidades de formación de la tinta y se encontró que las tres especies ejercen un aumento de la velocidad de reacción mientras mayor es su concentración. Se pudo estimar así la actividad específica en la oxidación de glicerol, la cual se contrastó con aquella correspondiente a los sustratos naturales de ambas enzimas. Estos resultados permitieron estimar que AOX fue aproximadamente 3 veces más activa en la oxidación de glicerol que GAO. Estos resultados contrastan notablemente con los encontrados en la bibliografía, en donde se reportó que AOX no fue capaz de oxidar glicerol.

Por otra parte, GAO fue inmovilizada a un soporte de polimetacrilato por medio de uniones covalentes y el catalizador obtenido resultó activo en el sistema de reacciones propuesto. Esto constituye un resultado alentador, ya que permitiría recuperar y reutilizar el catalizador.

En el capítulo 7 se llevaron a cabo las reacciones en ausencia de fenol y por tiempos prolongados. La evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante las reacciones aportó información útil para comprender ambos sistemas (GAO/hematin y AOX/hematin) y se comprobó que la presencia de hematin aceleró su consumo en todos los casos.

El pico de monómero de GA pudo ser detectado en medios de reacción en los sistemas con GAO, aunque las conversiones de glicerol fueron bajas. La mayor concentración de GA (94,4 mM en 24 h) se obtuvo con el sistema GAO/Hematin a pH 9, partiendo de una concentración de glicerol inicial de 1700 mM. Este resultado resultó además superior en relación con el empleo de catalasa como co-catalizador. En sistemas con AOX se calcularon grados de conversión de glicerol de entre 7,4 y 19,5 %, partiendo de una concentración inicial de glicerol de 33 mM, aunque solo fue posible estimar una concentración de GA de 3,3 mM luego de 24 h, a partir del pico del hidrato.

Se discutieron dos vías por medio de las cuales hematin ejerce su efecto: sobre GAO parece ejercer una acción fundamentalmente peroxidática, oxidando al radical Tyr 272 presente en el sitio activo de GAO, desde un estado parcialmente reducido (inactivo) y regenerándolo para que reingrese al ciclo catalítico. Por otro lado, en presencia de AOX, hematin actúa a través de la vía pseudo-catalítica que implica la generación de radicales libres que ocasionan su blanqueamiento. De esta manera, AOX queda sin la protección necesaria, inactivándose rápidamente a causa del H₂O₂ generado, lo cual detiene la reacción.

Tanto los catalizadores testeados mostraron escasa (o nula) resistencia al peróxido de hidrógeno. Esto, constituyó en 3 de los 4 catalizadores el principal obstáculo para lograr una catálisis efectiva. En hematin esta escasa resistencia radica en el hecho de que mostró además escasa actividad peroxidática hacia glicerol. Un buen sustrato de hematin, como por ejemplo fenol logró “proteger” la integridad de su estructura al evitar la activación de la vía pseudo-catalítica que conduce a su degradación. En MnL, por el contrario, la inactivación por H₂O₂ ocurrió también en presencia de fenol.

Esto los convierte en catalizadores no aptos para llevar adelante la oxidación de glicerol por sí mismos. Sin embargo, es posible utilizarlos en sistemas bicatalíticos, como los sistemas estudiados que incorporan hematin, y de esta manera prolongar el tiempo durante el cual las oxidasas se mantienen activas. Finalmente, la enzima GAO resultó más prometedora que AOX a pesar de las bajas conversiones obtenidas, debido a que el pico del monómero de GA pudo ser efectivamente detectado por GC utilizando esta enzima. Por otro lado, la escasa resistencia a H₂O₂ por parte de AOX se identifica como la causa del detenimiento de reacción. En cambio, con GAO, la principal causa de las escasas conversiones alcanzadas se debe a la inefectiva o demasiado lenta coordinación de glicerol a su sitio activo.

Finalmente, se postula un efecto co-catalítico interesante entre hematin y GAO. Hematin “activa” a GAO y GAO “protege” a hematin a causa de la acción peroxidática de hematin sobre la estructura de GAO. Además, ambos catalizadores demostraron permanecer activos luego de su anclaje a una matriz polimérica. Esta sinergia resulta entonces prometedora para la exploración de la catálisis heterogénea en la oxidación de otros sustratos de interés.

8.2 Trabajos a futuro

En base a los resultados y conclusiones de la siguiente tesis, se propone avanzar en los diferentes puntos que se detallan a continuación.

Respecto a la oxidación de glicerol con hematin y con complejos metálicos:

- Determinar fehacientemente qué es lo que le ocurre a hematin cuando se blanquea. ¿El hierro realmente se libera a la solución? Y si no es así, ¿es reversible el proceso?
- Testear nuevos catalizadores que mantengan su actividad catalítica y peroxidática por más tiempo y que tengan mayor resistencia a la inactivación por H_2O_2 .
- Explorar el empleo de ambos complejos en mayores concentraciones y a pH alcalinos y con una estrategia de dosificación gradual del oxidante de manera de favorecer la oxidación en medio básico de glicerol.
- Explorar el empleo del sistema Fenton o tipo Fenton en la oxidación de glicerol como una alternativa simple y económica para la producción de ácidos carboxílicos como por ejemplo ácido fórmico.

Respecto a los mecanismos de reacción, modelado cinético y parametrización:

- Proponer modelos cinéticos que describan el mecanismo del sistema de reacciones acopladas dado por las ecuaciones 8.1 y 8.2.
- Realizar la estimación de parámetros del modelo a partir de datos experimentales, con la finalidad de obtener las constantes de velocidad de las distintas reacciones implicadas en el mecanismo.
- Establecer cuáles son las vías a través las que se produce la inhibición de las oxidasas.

Respecto a la inmovilización de enzimas y complejos:

- Mejorar el procedimiento de cuantificación de la cantidad de enzima unida al soporte. Debido al gran problema de interferencias que se encontró, se propone realizar, en paralelo con la inmovilización enzimática, un procedimiento análogo, pero sin la enzima presente de modo de utilizar los sobrenadantes y aguas de lavado como blancos para una cuantificación más exacta.
- Estudiar procesos de co inmovilización de catalizadores, de modo de obtener sistemas catalíticos heterogéneos en una sola partícula.
- Testear la catálisis oxidativa hacia otros sustratos como por ejemplo dihidroxiacetona.

Respecto al gliceraldehído generado:

Los dos grupos hidroxilo del GA pueden ser utilizados para anclarlo en diferentes superficies y, de esta manera, ejercer su actividad antimicrobiana sin ser liberada al medio que se intenta proteger. Se propone inmovilizar GA sobre diferentes superficies y evaluar la actividad antimicrobiana del material modificado, con la finalidad de generar envases bioactivos.

Anexos

Anexo 1: Ensayos con reactivo de Bradford

Introducción

El uso del ensayo de Bradford para la determinación de la cantidad de proteína unida a un soporte luego del proceso de inmovilización, utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar se encuentra ampliamente difundido [1–3]. Existen severas limitaciones en el uso de BSA como estándar para la cuantificación de otras proteínas. Los pesos moleculares, la secuencia de aminoácidos y la estructura expuesta de la BSA en soluciones acuosas puede ser muy diferente de la proteína que se quiere cuantificar [4]. La agregación de proteínas (desnaturalización) puede verse afectada con la agitación o el contacto por tiempos prolongados con buffers [1]. Otra posible fuente de error es la interacción entre la tinta de Bradford y el soporte utilizado para la inmovilización [5]. Habitualmente, la presencia de interferencias no es tomada en cuenta, como por ejemplo compuestos disueltos de los soportes, la coordinación de iones de los buffers a las proteínas, la naturaleza y grado de extensión de la agregación de proteínas y el rol de coloides y nanopartículas en la solución. Muchas veces las pendientes obtenidas utilizando BSA o la proteína deseada varían significativamente, conduciendo a groseros errores en la cuantificación si se utiliza BSA como estándar. Incluso resultados anormales, como una absorbancia mayor en el sobrenadante luego de la inmovilización (no menor, como cabría esperar) son habituales [1].

El objetivo de este estudio fue evaluar la validez de la técnica espectrofotométrica de Bradford para cuantificar GAO soportada en esferas de polimetacrilato (capítulo 6). Para ello se elaboraron curvas de calibración en diferentes rangos de concentración empleando BSA o GAO como estándares. Además, se evaluaron las interferencias de las soluciones buffers empleadas durante el procedimiento de inmovilización ya que están presentes en las muestras a analizar.

Metodología

Preparación de solución de Bradford (RB)

Se disolvieron 100 mg de Coomassie blue en 50 mL de metanol y se filtró. A la solución se agregó 100 mL de H_3PO_4 al 85 % P/P y se diluyó hasta 200 mL con agua destilada. La solución presentó un color rojo oscuro. Las concentraciones finales del reactivo fueron 0,5 mg/mL de Coomassie blue G, 25% P/P de metanol y 42,5 % P/P de H_3PO_4 . Esta solución es estable indefinidamente si se mantiene refrigerada a 4°C en una botella oscura. El reactivo de ensayo fue preparado diluyendo un volumen de la solución anterior con 4 volúmenes de agua destilada. El reactivo de ensayo presentó un color marrón y es estable por varias semanas en una botella oscura y refrigerada a 4°C.

Procedimiento estándar

Se prepararon seis soluciones estándar de proteína (cada una de 1 mL) con concentraciones 0, 0,25; 0,50; 1,0; 1,5 y 2,0 mg/mL de BSA o GAO. Luego, en una cubeta se colocaron 2,0 mL de reactivo de ensayo y 0,04 mL de la solución de proteína estándar, comenzando desde la más diluida a la más concentrada o una de las muestras a ser ensayadas. Se cubrió la cubeta con parafilm y se invirtió varias veces para mezclarla. Se registró la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 (Massachusetts, Estados Unidos). El autozero del equipo se realizó con buffer fosfato 0,1 M pH 7 y en la cubeta de referencia se utilizó el mismo solvente.

Microensayo

Se prepararon cinco soluciones estándar de proteína (cada una de 1 mL) con concentraciones 0, 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 y 0,05 mg/mL de BSA o GAO. En una cubeta plástica se agregaron 0,2 mL de solución madre y 0,8 mL de la solución de proteína estándar o una de las muestras a ser ensayadas (con cantidades <0,05 mg de proteína/mL). Se cubrió la cubeta con parafilm y se invirtió varias veces para mezclarla. Se registró la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 (Massachusetts, Estados Unidos). El autozero del equipo se realizó con buffer fosfato 0,1 M pH 7 y en la cubeta de referencia se utilizó el mismo solvente.

Resultados

Calibración con BSA: Procedimiento estándar

Se tomaron los espectros de absorción de los estándares de BSA luego de la reacción con el reactivo de Bradford (Figura 1, izquierda). Se puede observar que el punto de máxima absorción se encontró cerca de los 570 nm (diferente al valor de 595 nm reportado en bibliografía), pero a medida que la concentración de BSA aumenta, el pico sufre un corrimiento hipsocrómico. También se observa que la absorbancia del RB sin proteína es elevada (mayor que 1).

En el ensayo estándar se pueden medir concentraciones de BSA de entre 0,20 a 2,0 mg/mL. Para elaborar la curva de calibración se tomaron las absorbancias a 595 nm. La curva para el ensayo estándar se puede observar en la Figura 1 (derecha). Se obtuvo un $R^2 = 0,915$ y una pendiente de 0,197 mL/mg. Nicolás et al. (2017) [1] reportaron un valor de 0,844 mL/mg.

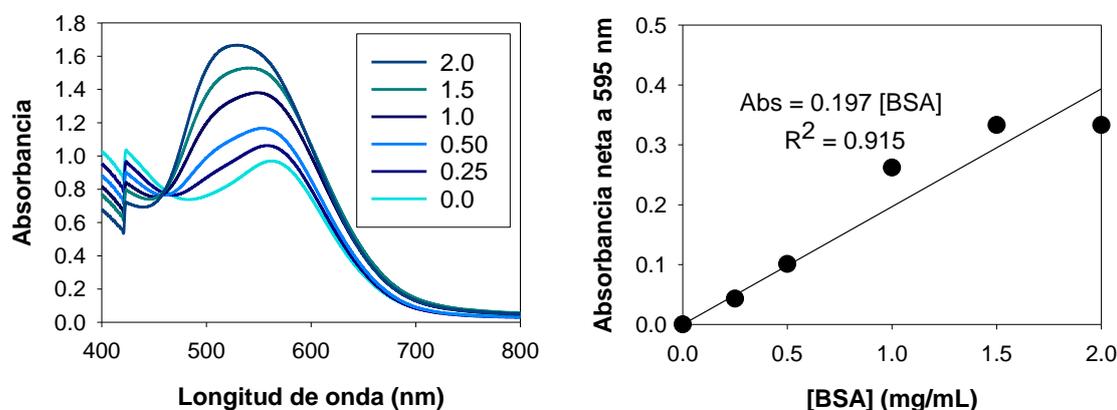


Figura 1. Izquierda: Espectros RB con BSA (ensayo estándar) Rango: 0,25 a 2,0 mg/mL. **Derecha:** Calibración BSA con RB a 595 nm (ensayo estándar). En la curva de calibración, la absorbancia neta se define como el valor de absorbancia de la solución menos el valor de absorbancia de la solución que no contiene proteína.

Calibración con BSA vs. GAO: Microensayo

Los espectros de absorción de BSA y de GAO obtenidos a través del microensayo se pueden observar en la Figura 2. En el caso de BSA (izquierda), a bajas concentraciones de la proteína (rango de entre 0 y 0,05 mg/mL), el comportamiento es análogo al que se observa en la Figura 1 para el ensayo estándar. Con la enzima GAO, se encontró un máximo de absorbancia alrededor de los 650 nm y se puede observar que los espectros en función de la concentración son bastante similares entre sí, lo cual evidencia que la sensibilidad del método es baja.

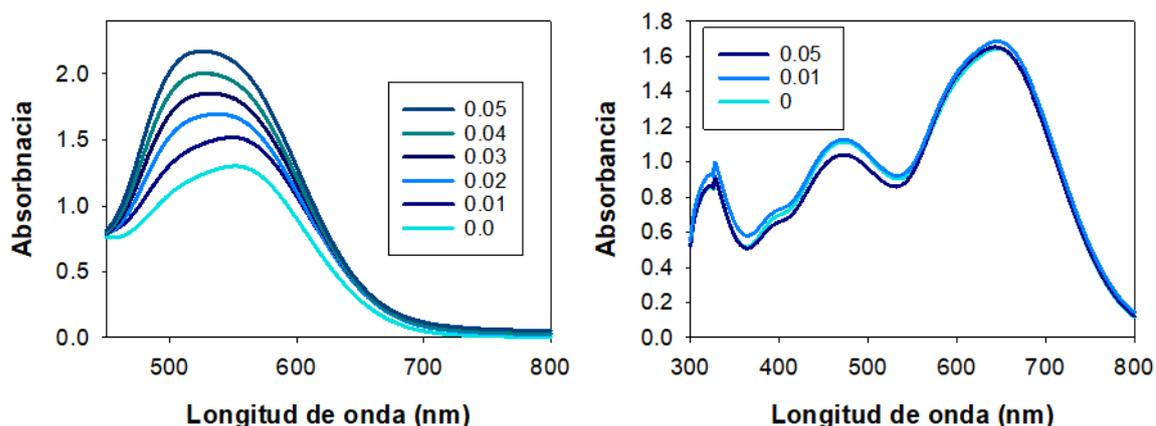


Figura 2. Espectros de BSA (izquierda) y GAO (derecha) con RB (microensayo). Rango: 0 – 0,05 mg/mL.

Para las curvas de calibración se tomó el valor de longitud de onda de 595 nm. Con BSA se obtuvo una linealidad aceptable, con un $R^2=0,93$ y una pendiente de 9,14 mL/mg, la cual resulta mucho mayor que la obtenida con el ensayo estándar, con lo cual el método de microensayo es más sensible (Figura 3). Nicolás et al. (2017) reportaron para el microensayo un valor de la pendiente de 36.3 mL/mg [1]. Para la enzima GAO se obtuvo un $R^2=0,94$ y una pendiente de 1,30 mL/mg, la cual resulta mucho menor que la que se obtiene con BSA. Por lo tanto, si se utiliza BSA como estándar en este caso se subestima la concentración de GAO en una muestra, lo cual conduciría a sobreestimar las cantidades de enzima efectivamente inmovilizadas en el soporte. Por este motivo, se descartó el método de cuantificación utilizando BSA como estándar.

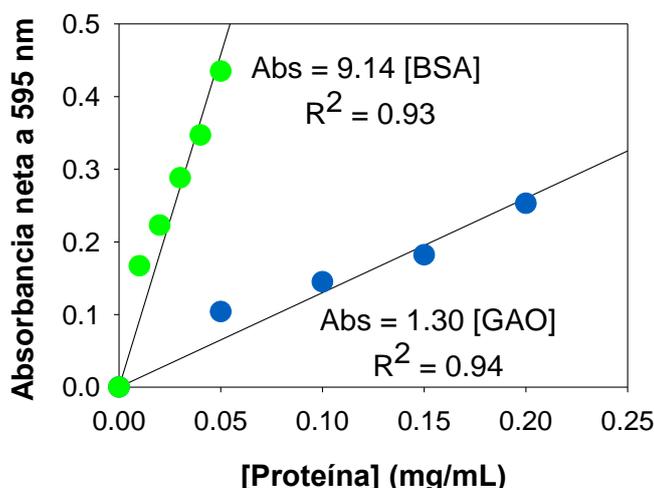


Figura 3. Curvas de calibración para BSA (círculos verdes) y GAO (círculos azules) con RB a 595 nm (microensayo).

Interferencia de soluciones buffer

Como los buffers producen interferencias en las mediciones con RB, se llevaron a cabo mediciones de diversos blancos, mezclando los buffers de distintas etapas del proceso de inmovilización con RB. Los resultados se muestran en la Figura 4. En dicha figura, S1 y S2 se refieren a los sobrenadantes obtenidos en los pasos de contacto del soporte con GAO y desactivación de grupos libres en el soporte, respectivamente. S1-ref y S2-ref hacen referencia a las mezclas de buffers de estas etapas, pero sin la presencia de GAO, donde S1-ref se compone de 45% buffer fosfato 1M pH 7.5 y 55% de fosfato 0.1 M pH 7 y S2-ref de 90% buffer Tris 0.5 M y 10% de buffer fosfato 0,1 M. Sol_{inicial} es una solución de GAO 167 mg/L en una mezcla de buffers fosfato 1 M pH 7,5 (95%) y 0,1 M pH 7 (5%).

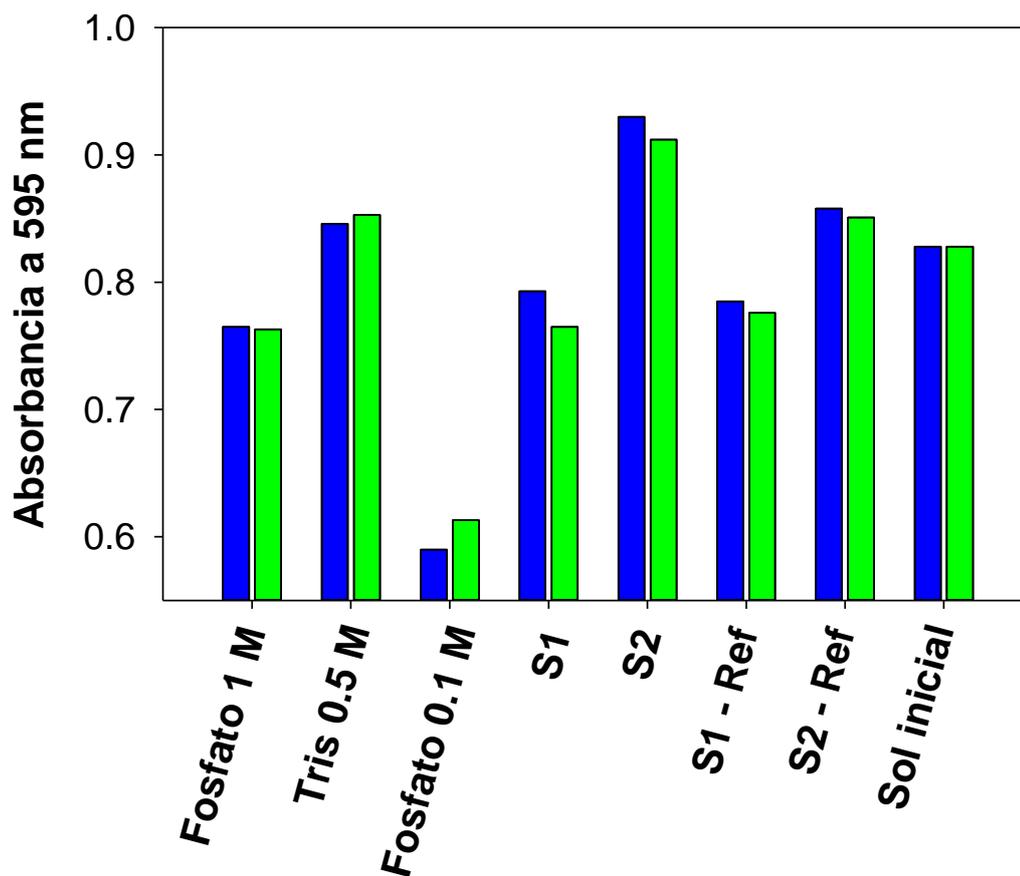


Figura 4. Mediciones con RB de distintas soluciones usadas o generadas durante el proceso de inmovilización de GAO. Barras azules: 1 min de contacto con RB; Barras verdes: 5 min de contacto con RB.

A todas estas soluciones se les agregó la solución madre de RB (microensayo) y se las dejó reaccionar por 1 y 5 min. Se puede observar que el buffer fosfato de menor concentración produjo una pequeña interferencia, pero al aumentar la concentración de la sal del buffer, esta se hizo mayor. Por otro lado, la interferencia provocada por el buffer Tris resultó más elevada que con los buffers fosfato, generando mayores valores de absorbancia. La absorbancia de Sol_{inicial} fue mayor que la del buffer fosfato 1 M utilizado en el paso de inmovilización y que de S1-ref, por lo tanto, GAO pudo ser detectado con el método de Bradford en presencia de estos buffers. En la mayoría de los casos, la absorbancia luego de 1 min es mayor que a los 5 min de reacción, pero las diferencias relativas son menores al 5%, por lo tanto, 1 min de contacto se consideró suficiente para producir la reacción. Sin embargo, en las diversas aguas de lavado generadas, las proporciones de los distintos buffers no se puede determinar con exactitud, lo que constituye un inconveniente dadas las importantes diferencias en las interferencias que cada uno produce. Esto dificulta enormemente la tarea de cuantificar fehacientemente la cantidad de enzima perdida en las aguas de lavado. En la Tabla 1 se muestran mediciones llevadas a cabo con el RB de los sobrenadantes y aguas de lavados generados en el proceso de inmovilización de GAO. A las absorbancias de S1 y S2, se les descontaron los valores de S1-ref y S2-ref, respectivamente para obtener la absorbancia neta. A las absorbancias de las aguas de lavado se les descontó la correspondiente al buffer fosfato 0.1 M (siempre tratado con RB). Los valores de [GAO] para S1 y L6 dieron valores negativos y no se tuvieron en cuenta en el cálculo de la masa perdida. Sin embargo, el valor calculado por este método asciende a 18,23 mg, cuando la masa que se contactó inicialmente con el soporte fue de solo 5 mg. Por lo tanto, el método aquí presentado sobreestima las concentraciones de GAO en las distintas aguas de lavado y sobrenadantes.

Tabla 1. Mediciones con reactivo de Bradford a 595 nm de sobrenadantes y aguas de lavado de la inmovilización de GAO.

Volumen (ml)	Muestra	Absorbancia	Absorbancia neta	[GAO] (mg/ml)	Masa GAO (mg)
50	S1	0,793	0,008	-0,0103	
25	L1	0,767	0,177	0,1344	3,36
25	L2	0,728	0,138	0,1004	2,51
25	L3	0,696	0,106	0,0737	1,84
50	S2	0,938	0,348	0,0444	2,22
50	L4	0,740	0,150	0,1109	5,54
50	L5	0,674	0,084	0,0549	2,75
50	L6	0,603	0,013	-0,0064	
Buffer fosfato 0.1 M		0,590			
S1 ref		0,785			
S2 ref		0,858			
Masa total perdida (mg)					18,23
Masa inicial contactada (mg)					5

Conclusión

La construcción de las curvas de calibración evidencia que sólo es válido utilizar como estándar GAO, ya que las desviaciones fueron importantes si se utiliza BSA. Los distintos buffers utilizados en las sucesivas etapas del proceso de inmovilización generaron interferencias con el RB por lo cual es necesario considerar las absorbancias de blancos adecuados para realizar las correcciones necesarias. Esta no es tarea fácil, sobre todo con las aguas de lavado, para las cuales es difícil determinar en qué proporción se mezclan los diferentes buffers. Esto, sumado a que la sensibilidad del método fue muy baja para GAO y que las interferencias de los buffers produjeron valores de absorbancia muy elevados, provocaron que la exactitud del método resulte pobre y que se evaluara un método alternativo para cuantificar proteína unida.

Referencias

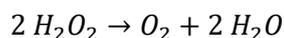
- [1] P. Nicolás, V.L. Lassalle, M.L. Ferreira, Quantification of immobilized *Candida antarctica* lipase B (CALB) using ICP-AES combined with Bradford method, *Enzyme Microb. Technol.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.11.009>.
- [2] H.K. Ku, H.M. Lim, K.H. Oh, H.J. Yang, J.S. Jeong, S.K. Kim, Interpretation of protein quantitation using the Bradford assay: Comparison with two calculation models, *Anal. Biochem.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.045>.
- [3] L.J. Daumann, J.A. Larrabee, D. Ollis, G. Schenk, L.R. Gahan, Immobilization of the enzyme GpdQ on magnetite nanoparticles for organophosphate pesticide bioremediation, *J. Inorg. Biochem.* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.10.007>.
- [4] V. Lassalle, S. Pirillo, E. Rueda, M.L. Ferreira, An accurate UV/visible method to quantify proteins and enzymes: impact of aggregation, buffer concentration and the nature of the standard, *Curr. Top. Anal. Chem.* 8 (2011) 83–93. http://www.researchtrends.net/tia/title_issue.asp?id=30&in=0&vn=8&type=3.

- [5] T. Ishii, A. Sorita, M. Sawamura, H. Kusunose, H. Ukeda, Determination of the reaction product of glutaraldehyde and amine based on the binding ability of coomassie brilliant blue, *Anal. Sci.* (1997). <https://doi.org/10.2116/analsci.13.5>.

Anexo 2: Determinación de la actividad de la enzima catalasa

Introducción

La catalasa es una enzima perteneciente al grupo de las oxidorreductasas. Esta enzima cataliza la descomposición del H_2O_2 , según la siguiente reacción:



La catalasa de hígado bovino es un tetrámero en el cual cada monómero tiene un peso molecular de 61 kDa. El sitio activo en cada monómero comprende a una molécula de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y un grupo hemo [1]. La enzima posee un pH óptimo de 7.0 y un punto isoelectrico de 5.4. La catalasa encapsulada o inmovilizada es utilizada en la industria alimentaria cuando el peróxido de hidrógeno debe ser eliminado, por ejemplo, en la producción de quesos [2]. La catalasa puede ser también utilizada en sistemas acoplados para la determinación de metabolitos en fluidos biológicos. La velocidad de descomposición del peróxido de hidrógeno es una medida de la actividad catalasa de la enzima y puede ser seguida midiendo la absorbancia a 240 nm [3].

Metodología

Reactivos

1. Buffer de fosfato de potasio 0.1 M pH 7.
2. Solución de peróxido de hidrógeno al 0.05% (sustrato). Se mezclaron 50 μ L de H_2O_2 con buffer fosfato y se llevaron a un volumen final de 25 mL.
3. La solución madre de la enzima catalasa fue preparada colocando 20 μ L de la suspensión comercial en 180 μ L de buffer fosfato 0.1 M. El reactivo comercial posee una concentración de catalasa de 30 mg/mL y una actividad reportada de 29900 U/mg.

Procedimiento

En una cubeta de cuarzo se colocan 2970 μ L de la solución de H_2O_2 en buffer y se inicia la reacción por el agregado de 30 μ L de solución madre de catalasa de concentración 3 mg/mL (dilución 1:10 del preparado enzimático; 10 μ L + 90 μ L de buffer). La concentración de catalasa en la cubeta es de 30 mg/L. Se coloca la cubeta en el portacubetas y se mide la disminución de la absorbancia a 240 nm por un tiempo de 5 minutos. La medición se hizo por triplicado.

Una unidad catalítica (U) se define como la cantidad de enzima capaz de catalizar la descomposición de un micromol de H_2O_2 por minuto a 25°C y pH 7.0.

Se toman las pendientes de las gráficas para los datos de absorción-tiempo durante los primeros 60 segundos de reacción y se multiplican por 60 (s/min). Este valor corresponde a $\Delta E_{240nm/min}$. Luego, conociendo que el coeficiente de extinción del H_2O_2 e_{240} es de $40 M^{-1}cm^{-1}$ se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{U}{mg} = \frac{\Delta E_{240nm/min}}{e_{240} C_{cat}} \times 10^6 \quad (1)$$

En donde C_{cat} está en mg/mL

Resultados

Los resultados de las mediciones se pueden observar en la Figura 1. Se muestra un excelente grado de ajuste de las curvas a ecuaciones lineales. Se promediaron las pendientes obtenidas en cada curva y, utilizando la ecuación 1 se obtuvo una actividad de **12597±2042 U/mg**. Este valor corresponde a un 42% de la actividad reportada por Sigma.

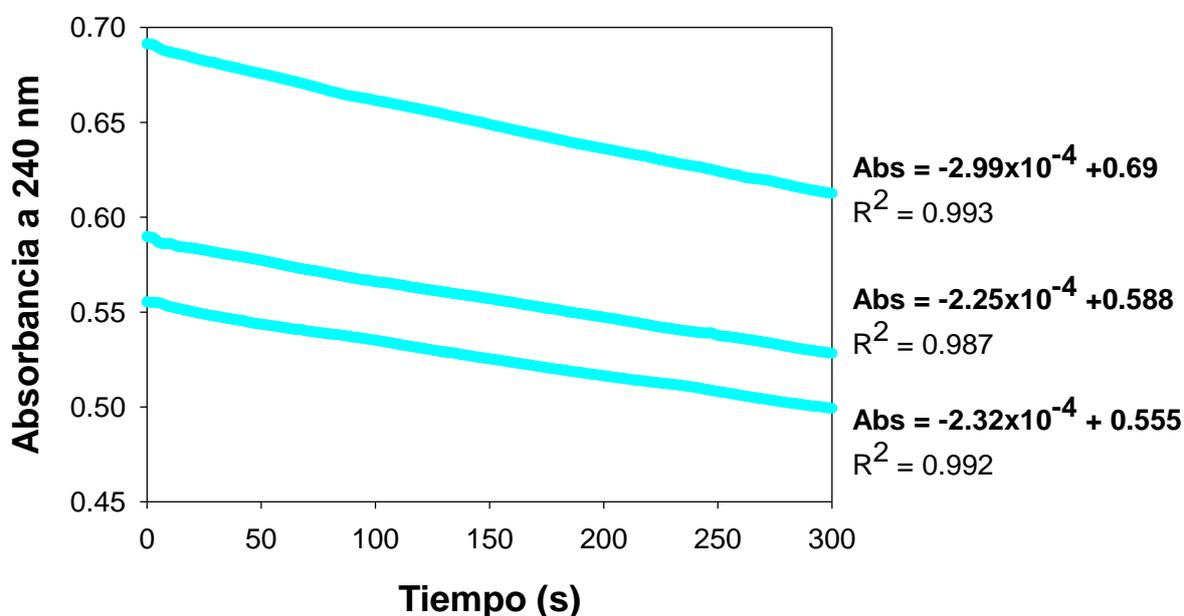


Figura 1. Disminución de la absorbancia a 240 nm en función del tiempo a causa de la actividad catalítica de la enzima.

Referencias

- [1] L. M. Foroughi, Y. N. Kang, and A. J. Matzger, "Sixty years from discovery to solution: Crystal structure of bovine liver catalase form III," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2011.
- [2] H. D. Chu, J. G. Leeder, and S. G. Gilbert, "Immobilized catalase reactor for use in peroxide sterilization of dairy products," *J. Food Sci.*, 1975.
- [3] Hans Ulrich Bergmeyer and K. Gawehn, Eds., *Methods of Enzymatic Analysis*, Segunda ed. 1974.

Anexo 3: Cromatogramas

La Figura 1 se referencia en la Sección 7.4.1 donde se discuten mejoras en el proceso de optimización del procesamiento de las muestras. Aquí, se observan cromatogramas obtenidos de muestras en las cuales el secado se llevó a cabo en un freezer. El pico de glicerol se detectó luego de 1 h y 2.5 h de reacción, indicando que el secado en frío ayuda a frenar el consumo de glicerol, con lo cual todas las muestras procesadas posteriormente se secaron en el freezer.

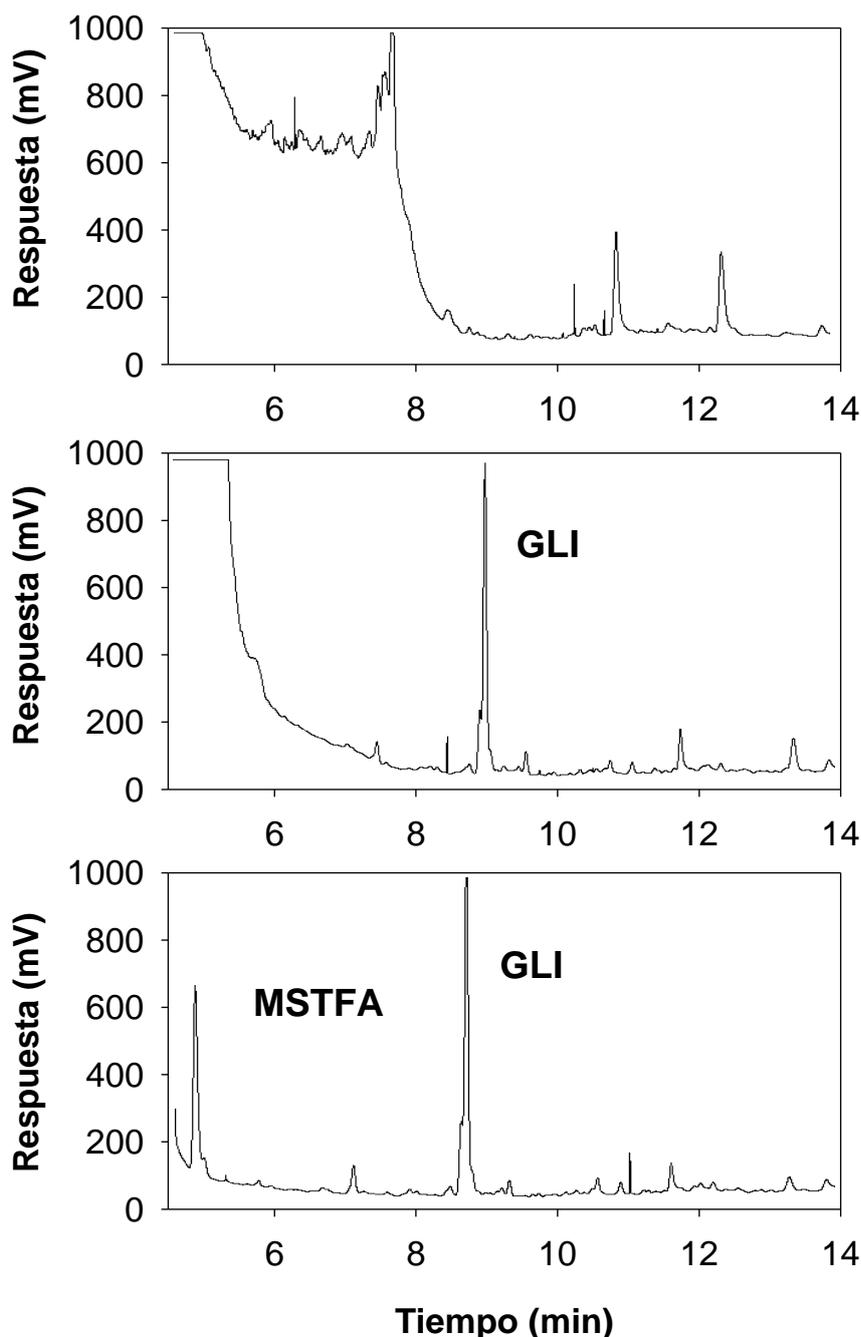


Figura 1. Oxidación de glicerol con el sistema AOX/hematin (correspondiente a la experiencia 9, Tabla 7.1 del capítulo 7), cromatogramas del medio de reacción. Arriba: al inicio de la reacción; Medio: luego de 1h de reacción; Abajo: luego de 2.5 h de reacción. GLI: glicerol; MSTFA: derivatizante. Condiciones de derivatización: [GLI]= 0.79 mM; [AOX]= 1.45 mg/L; [MSTFA]= 2657 mM; factor de dilución: 41.