ESTRATEGIAS ECOAMIGABLES PARA EL DESARROLLO DE TENSIOACTIVOS MULTIFUNCIONALES DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS CON APLICACIONES FARMACÉUTICAS Y COSMÉTICAS

María Elisa Fait* & Susana R. Morcelle

Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIProVe), Facultad de Ciencias Exactas-CICPBA, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

*Autora a quien dirigir la correspondencia. E-mail: mefait86@gmail.com

RESUMEN 45
SUMMARY 46
Eco-friendly strategies for the synthesis of multifunctional amino acid-based surfactants with pharmaceutical and cosmetic applications 46
INTRODUCCIÓN 47
EL DESARROLLO SUSTENTABLE Y LA QUÍMICA VERDE 47
HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA QUÍMICA VERDE 48
La biocatálisis: inicios y últimos avances 48
ENZIMAS COMO BIOCATALIZADORES 50
Ingeniería de medios 50
Inmovilización enzimática 51
ENZIMAS DE APLICACIÓN INDUSTRIAL 52
PEPTIDASAS EN LA SÍNTESIS ORGÁNICA 53
Síntesis de enlaces amida bajo control termodinámico 54
Síntesis de enlaces amida bajo control cinético 55
Papaína como biocatalizador 56
SURFACTANTES 57
Definición y clasificación 57
Propiedades y aplicaciones 57
SURFACTANTES DE BASE BIOLÓGICA Y BIOSURFACTANTES 58
SURFACTANTES DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS 59
Peptidasas en la síntesis de surfactantes derivados de aminoácidos 61
Aplicaciones y características de los surfactantes derivados de aminoácidos 62
Surfactantes derivados de arginina de cadena simple: propiedades y aplicaciones 63
CONCLUSIONES 64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 64

RESUMEN

La química verde es una estrategia integral que apunta al diseño de productos y procesos químicos más seguros, más eficientes y menos costosos. La biocatálisis es una de las herramientas más importantes para la química verde: no sólo es amigable con el medio ambiente sino que permite en muchos casos eliminar múltiples pasos involucrados en complejas reacciones de síntesis química, mejorando el rendimiento y reduciendo la generación de residuos peligrosos y los costos de producción. Las proteasas son unas de las enzimas con mayores aplicaciones en el campo de la biocatálisis: catalizan la ruptura y formación de enlaces peptídicos, así como también otras reacciones de interés como la resolución cinética de mezclas racémicas. Los tensioactivos son compuestos anfifílicos capaces de disminuir la tensión ón característica desuperficial/interfacial entre moléculas en la superficie/interfaz respectivamente, presentando algunos de ellos además diversas actividades biológicas (antimicrobianas, antivirales, hemolíticas; insecticidas, etc.).

Tradicionalmente estos compuestos han sido obtenidos a partir de productos no biodegradables, como es el caso de los derivados del petróleo, lo cual ha impulsado al diseño y desarrollo de moléculas anfipáticas sintéticas basadas en estructuras anfifílicas naturales, como aquellas que mimetizan los lipoaminoácidos o los biosurfactantes (glicolípidos, lipopéptidos, fosfolípidos y ácidos grasos). En particular, los tensioactivos derivados de aminoácidos constituyen una clase de compuestos multifuncionales con alta biodegradabilidad y excelentes propiedades de adsorción y agregación. Los 20 aminoácidos naturales (junto con los no-proteinogénicos) constituyen un pool de herramientas versátil para la síntesis de tensioactivos con múltiples grupos funcionales, permitiendo la preparación de anfifilos aniónicos, catiónicos y zwitteriónicos, dependiendo de la elección del aminoácido de partida. El objetivo de este trabajo es brindar un panorama acerca de este tópico, profundizando en algunos conceptos importantes para la biocatálisis y los surfactantes derivados de aminoácidos como productos de interés.

PALABRAS CLAVE: biocatálisis, peptidasas, química verde.

SUMMARY

ECO-FRIENDLY STRATEGIES FOR THE SYNTHESIS OF MULTIFUNCTIONAL AMINO ACID-BASED SURFACTANTS WITH PHARMACEUTICAL AND COSMETIC APPLICATIONS

Green chemistry is an integral approach to design safer, more efficient, and less expensive chemical products and processes. Biocatalysis is one of the most important tools for green chemistry: is environmentally benign and can avoid multiple steps involved in complex chemical syntheses, minimizing waste and hazards, improving yields and reducing costs. Proteases are enzymes with many applications in the field of biocatalysis because they can catalyze not only the cleavage of peptide bonds but also their formation, as well as other reactions of relevance, as the kinetic resolution of racemic mixtures. Surfactants are amphiphilic compounds that are able to decrease the surface and interfacial tension between individual molecules in the surface and interface respectively, an some of them being also endowed with diverse biological activities (antimicrobial; antiviral; hemolytic; insecticide, etc.). Traditionally these compounds have been derived from non-biodegradable chemical products, such as those obtained from petroleum. This fact has attracted much interest in the design and development of synthetic amphipatic structures based on natural ones, such as biosurfactants (glycolipids, lipopeptides, phopholipids and fatty acids). In particular, amino acid-based surfactants constitute a class of tensioactive eco-friendly compounds with excellent adsorption and aggregation properties, high biodegradability and multiple biological activities. The 20 natural amino acids (together with those non-proteinogenic ones) constitute a versatile tool box for surfactant's synthesis: anionic, cationic and zwitterionic amphiphiles with several functional groups can be obtained by the proper selection of the starting amino acid. The aim of this work is to provide an overview about this topic and to highlight some concepts that are important to biocatalysis and amino acid-based surfactants as products of interest.

KEY WORDS: biocatalysis, peptidases, green chemistry.

INTRODUCCIÓN

La humanidad puede responder de diferentes maneras a las señales que nos indican que las emisiones de contaminación y el uso de recursos naturales han crecido más allá de sus límites sostenibles (Meadows *et al.*, 2005). Una manera de responder a esta problemática es aliviando las presiones mediante soluciones técnicas (como el tratamiento de efluentes y el establecimiento de límites de concentraciones tóxicas) o económicas (como la baja de la presión tributaria en pos de la integración de las tecnologías y procesos amigables con el medio ambiente al ciclo de investigación, desarrollo y manufactura). Estas medidas son de carácter urgente y muchas de ellas proporcionarán mayor eficiencia ecológica y un alivio temporal. Sin embargo, este enfoque no elimina las causas subyacentes, sino que sólo retrasa la aparición de las consecuencias. En este contexto, la única solución es producir un cambio trabajando sobre las problemáticas y la estructura del sistema.

En general se puede llegar a pensar que cambiar la estructura significa cambiar algo físico, derribando estructuras o edificios viejos y construyendo nuevos. También podría interpretarse en el sentido de cambiar la estructura de poder, jerarquía o la cadena de mando. Teniendo en cuenta esas interpretaciones, un cambio de estructura parece ser difícil, peligroso y amenazante para quienes ejercen el poder económico o político. Sin embargo, la verdadera solución, el verdadero cambio de estructura tiene poco que ver con dejar afuera a ciertas personas, destruir cosas o desmantelar burocracias. De hecho, cualquiera de estas acciones sin cambios reales en la estructura sólo resultaría en diferentes personas invirtiendo igual o más tiempo y dinero persiguiendo los mismos objetivos y alcanzando los mismos resultados.

En 1987, la publicación del *informe Brundtland* por la *Comisión Mundial sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo* marcó el advenimiento del concepto de desarrollo sostenible (Brundtland, 1987). El informe enfrenta y contrasta la postura del desarrollo económico, industrial y social actual con el concepto de sustentabilidad ambiental. Reconoce que el actual avance social se está llevando a cabo a un costo ambiental alto, planteando además la necesidad de reformular las políticas de desarrollo económico globalizado de manera que ese desarrollo sea sostenible en el tiempo. De esta manera, el *desarrollo sustentable* ha sido definido como *el desarrollo que cubre las necesidades de la generación actual sin comprometer la capacidad de generaciones futuras de cubrir sus propias necesidades*. Para ser sustentable, un proceso debe cumplir dos condiciones: (a) el consumo de recursos naturales debe darse a una velocidad tal que los suministros no se agoten a largo plazo, y (b) la velocidad de generación de residuos debe ser menor a la velocidad de asimilación de los mismos en el medio ambiente. De esta manera, está claro que una sociedad basada en el uso de recursos no renovables (como por ejemplo, recursos fósiles tales como el carbón y el petróleo) no será sostenible en el futuro (Sheldon, 2016).

EL DESARROLLO SUSTENTABLE Y LA QUÍMICA VERDE

A mediados de los años ‘80, se creó conciencia acerca de la necesidad urgente de una química alternativa más limpia, que permitiera reducir la enorme cantidad de residuos generados por la industria química. Claramente se necesitaba un cambio de paradigma de los conceptos tradicionales de eficiencia de reacción y selectividad, centrados en ese entonces en el rendimiento, a otro que priorizara el aprovechamiento de las materias primas, minimizara la eliminación de residuos y evitara el uso de sustancias tóxicas o peligrosas. Todas estas cuestiones condujeron a la aparición de los conceptos de *minimización de los desechos*, *plantas libres de residuos* y *química verde*.

La química sustentable, o *química verde*, se comprende como el desarrollo de metodologías que permiten modificar la naturaleza intrínseca de productos y procesos, con la finalidad de minimizar o eliminar las consecuencias adversas y/o los riesgos que derivan de estas prácticas y que puedan impactar tanto en el medio ambiente como en la salud humana. De esta forma, plantea la innovación en el campo de la química con beneficios económicos y ambientales, presentándose como una estrategia integral que fomenta la interdisciplinaridad, ya que incorpora aspectos de ingeniería, biología, economía y ética (Anastas & Williamson, 1996). La química verde no es un método basado en la remediación, sino es un enfoque preventivo centrado en evitar el surgimiento de las problemáticas, lo cual es indiscutiblemente más sencillo y menos costoso que lidiar con las mismas una vez instauradas. Se focaliza en el uso de materias primas (preferentemente renovables), disminuyendo o eliminando el uso de materiales peligrosos y/o tóxicos, y reemplazándolos por otros menos perjudiciales. Esta estrategia a su vez disminuye los costos, ya que requiere menor cantidad de materias primas y reduce los gastos asociados al tratamiento de residuos.

Originalmente el término para designar a este tipo de prácticas era el de "*química limpia*". A mediados de la década de los '90, Anastas y colaboradores (pertenecientes a la *Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos*, EPA) introdujeron el término de "*química verde*", estableciendo 12 principios básicos para guiar el diseño de productos y procesos amigables con el medio ambiente y el ser humano (Anastas & Warner, 1998). Estos principios son una categorización de los enfoques fundamentales adoptados para lograr el objetivo de la química sustentable (González *et al.*, 2016; Sheldon, 2016).

Si bien reducir costos y ser amigable con el medio ambiente son objetivos en los que todos concuerdan, podríamos preguntarnos por qué no se ha logrado alcanzar este objetivo hasta la actualidad. Existen diversos motivos que explican esta situación. Uno de ellos es que los costos ambientales fueron ignorados en los inicios de la industria química. Sin embargo, dado que la remediación de los efluentes recae sobre los fabricantes, existe un gran incentivo financiero para que las industrias y los procesos sean *más limpios*. Otro motivo es que los investigadores, en sus laboratorios de desarrollo y diseño, no ven los riesgos ambientales como un problema que les concierne, sino que serían algo de lo que se ocuparían más adelante en la etapa de escalado del proceso. El enfoque de la química verde cambia este pensamiento: la incorporación de la consideración de los peligros y consecuencias ambientales en la etapa de investigación y diseño, permite que muchos problemas sean eliminados de raíz, evitando la necesidad de una crear una solución en cualquier etapa posterior (Kazlauskas & Kim, 2011).

La química verde plantea una problemática existente en el mundo actual, es decir, deja de manifiesto que existen problemas ambientales y que no basta con continuar enfocando los esfuerzos en solucionar el impacto de la acción del hombre en el mundo, sino que es necesario y urgente diseñar estrategias que tiendan a disminuir ese impacto. En este sentido, la química verde se plantea como un nexo entre las cuestiones netamente químicas y las implicancias en la sociedad. Sin embargo, la completa incorporación de la química verde en la comunidad científica todavía enfrenta importantes obstáculos, tanto económicos, financieros, reglamentarios y técnicos, como de organización y culturales (Roschangar *et al.*, 2015).

HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA QUÍMICA VERDE

La biocatálisis: inicios y últimos avances

En la actualidad, la tarea más difícil para los científicos es crear nuevos productos, procesos y servicios que cumplan con los beneficios sociales, económicos y ambientales que han sido establecidos para los procedimientos y procesos. Esto requiere reducir al mínimo los materiales y los requerimientos energéticos, minimizar o eliminar la diseminación de químicos peligrosos en el ambiente, maximizar tanto como sea posible el uso de recursos renovables y extender la durabilidad y capacidad de reutilización de los productos obtenidos (Makone & Niwadange 2016)

La biotecnología y los procesos biológicos en sí se adaptan naturalmente a los objetivos y principios de la química verde, la cual busca integrar prácticas de manufactura industrial con la naturaleza. El uso de métodos biológicos, donde la sostenibilidad y el reaprovechamiento son parte integral, es un excelente punto de partida para crear un proceso verde para la manufactura industrial.

La biocatálisis representa una excelente herramienta en el campo de los procesos biotecnológicos. Puede definirse como la aplicación de enzimas y células enteras (catalizadores naturales) en la síntesis química, es decir, con aplicaciones específicas para las que las enzimas/células no han evolucionado naturalmente (Gardossi *et al.*, 2010; Tufvesson *et al.*, 2010). Aunque el prefijo *bio* convierte a esta estrategia en amigable con el medio ambiente, es la parte de *catálisis* la que proporciona las mayores ventajas en lo que concierne a la química verde (Kazlauskas & Kim, 2011).

El campo de la biocatálisis ha alcanzado su nivel industrial actual a través de varias etapas (llamadas *olas*) de investigación tecnológica e innovaciones. Durante la primera *ola* del desarrollo de la biocatálisis (hace más de un siglo) los científicos reconocieron la capacidad de aplicar células vivas o alguno de sus componentes a diferentes transformaciones químicas estéreo- y regioselectivas (Bornscheuer *et al.*, 2012), cubriendo los principales criterios de sustentabilidad. Por estas razones, la biocatálisis ha sido reconocida como una tecnología capaz de cubrir las demandas de la manufactura química sustentable (Brenna 2013; Kaslauskas & Kim 2011; Sheldon 2016).

A partir de la segunda *ola* de la biocatálisis (entre la década de 1980 y principios de los años '90), el desarrollo de tecnologías como la ingeniería de proteínas, basada en ese entonces en la estructura de las mismas, permitió ampliar el abanico de sustratos enzimáticos, facilitando la síntesis de productos e intermediarios inusuales. Este cambio expandió el campo de la biocatálisis a la fabricación de productos intermediarios farmacéuticos y de la química fina. Ejemplos de estas transformaciones incluyen la resolución catalizada por lipasas de precursores quirales, la síntesis de intermediarios para herbicidas y la síntesis de ceras catalizada por lipasas para la elaboración de cosméticos (Bornscheuer *et al.*, 2012).

La tercera y actual *ola* de la biocatálisis comenzó hacia finales de la década de 1990. Pim Stemmer y Frances Arnold fueron los pioneros de una metodología de biología molecular que rápida y extensivamente modificaría los biocatalizadores a través de una versión *in vitro* de la evolución darwiniana, lo que actualmente se conoce como *evolución dirigida* (Bornscheuer *et al.*, 2012; Illanes *et al.*, 2012). Un ejemplo de optimización de biocatalizador enzimático mediante esta técnica fue el desarrollado por la compañía biotecnológica estadounidense Codexis, en colaboración con Pfizer (una compañía farmacéutica también estadounidense), para la producción de 2-metil pentanol, un intermediario importante para la fabricación de productos farmacéuticos y cristales líquidos. En este contexto, la ingeniería de proteínas ha permitido ampliar el rango de sustrato de las transaminasas a cetonas. En un destacable trabajo desarrollado por las empresas Merck y Codexis, la síntesis de sitagliptina, el ingrediente activo de un medicamento líder para la diabetes tipo 2 (*Januvia*), fue sustituida por un nuevo proceso biocatalítico. A través de sucesivas rondas de evolución dirigida se logró el desarrollo de una nueva aminotransferasa con un aumento de su capacidad catalítica de 40000 veces. Este proceso no sólo logró reducir los residuos en un 19%, sino que también produjo un aumento del 13% en el rendimiento general de reacción y un 53% en la productividad. Los científicos de Codexis desarrollaron también una enzima aciltransferasa LovD mejorada, para catalizar la conversión del fármaco lovastatina (una droga para el tratamiento de la hipercolesterolemia) a simvastatina, un derivado semisintético con mayor efectividad (Adrio & Demain 2014).

Los ejemplos expuestos muestran cómo las herramientas de la biocatálisis han sido mejoradas dramáticamente. Los constantes avances en la biología molecular y desarrollos científicos indican que esta mejora será exponencial, llegando a convertirse en una de las tecnologías clave para la manufactura química en la próxima década (Kazlauskas & Kim 2011). No solamente se cree que la producción biotecnológica de compuestos químicos podría aumentar varias veces en los próximos 10-20 años, sino que un cambio desde la economía basada en la petroquímica a una economía basada en materias primas de base biológica se completaría en los próximos 30-80 años (Meyer & Werbitzky 2011).

ENZIMAS COMO BIOCATALIZADORES

Hongos y bacterias han servido como una de las fuentes más importantes y útiles para muchas enzimas con aplicaciones en la industria (Demain & Adrio 2008). Las enzimas desempeñan un papel fundamental como catalizadores metabólicos, pudiendo trasladarse su uso a diversas industrias y aplicaciones. El mercado para las enzimas industriales es muy extenso con numerosas aplicaciones comerciales (Adrio & Demain 2005). Muchos procesos industriales, incluyendo la síntesis química para la producción de químicos y fármacos, poseen importantes desventajas como la baja eficiencia catalítica, la falta de especificidad enantiomérica por síntesis quiral y la necesidad de altas temperaturas, bajo pH y alta presión. En este sentido, y en el marco de la química verde, las enzimas son mucho más aptas para estas aplicaciones, ya que trabajan en condiciones suaves de reacción (por ejemplo, temperatura, pH, condiciones atmosféricas), no necesitan en general protección de grupos funcionales en el sustrato, tienen una vida media larga, alta regio- y estéreo selectividad y, además, actúan sobre sustratos no naturales. Asimismo, las enzimas pueden ser seleccionadas y modificadas genéticamente de manera de mejorar sus propiedades claves: estabilidad, especificidad de sustrato y actividad específica. La necesidad del uso de cofactores sería una desventaja para el caso de algunos tipos de enzimas. Este inconveniente ha sido solucionado en muchos casos mediante diversas estrategias, como el reciclaje de cofactores y el uso de células enteras.

Ingeniería de medios

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores biológicos y, como tales, deben ser activas en condiciones de reacción compatibles con el metabolismo celular. Es así que se puede definir como el medio convencional de reacción para la mayoría de ellas a aquel formado principalmente por agua.

Las enzimas presentan numerosas propiedades (alta quimio-, regio- y enantioselectividad) que las convierten en potenciales y valiosos biocatalizadores en el campo de la química fina, la industria farmacéutica y la agroquímica. Sin embargo, para convertirse en tales, deben ser lo suficientemente robustas como para soportar las duras condiciones de un proceso industrial (Illanes, 1999). Asimismo, cuando su empleo se restringe al medio convencional acuoso, su alcance y utilidad se encuentran limitados por una serie de consideraciones. En primer lugar, muchos polímeros y compuestos empleados son insolubles en agua (Dordick, 1989) y muchos procesos se caracterizan por poseer un equilibrio termodinámico desfavorable en este medio (Khmelnitsky *et al.*, 1988). Asimismo, en muchos casos, la sola presencia del agua aún en pequeñas cantidades puede dar lugar a reacciones colaterales como hidrólisis o racemizaciones, llevando a la formación de subproductos indeseables o incluso a la degradación y pérdida de los reactivos (Adrio & Demain 2014). Por otro lado, la recuperación de los productos no es un tema trivial, ya que el agua es un solvente difícil de eliminar por su alto punto de ebullición y calor de vaporización. Finalmente, la actividad enzimática también puede verse afectada por la presencia de agua en el medio, ya que puede dar lugar a numerosas reacciones de desactivación irreversibles (Arnold, 1990).

Durante los últimos años, el uso de biocatalizadores en la síntesis orgánica se ha convertido en una alternativa atractiva respecto de las síntesis químicas convencionales. Debido a los problemas expuestos anteriormente, se planteó la idea de modificar el medio de reacción para diferentes bioconversiones reemplazando el agua por solventes orgánicos, es decir, el uso de medios *no convencionales* (Klibanov, 2001). Esta metodología, conocida como *ingeniería de medios*, puede ser explotada como una alternativa a la ingeniería de proteínas, y resulta de especial conveniencia para la modificación de precursores de productos farmacéuticos y de la química fina, ya que, en la mayoría de los casos, los mismos son insolubles o poco solubles en agua. Otra de las razones que hace tan atractiva la catálisis enzimática en medios no acuosos son las propiedades novedosas que presentan las enzimas en solventes orgánicos. En este sentido, las enzimas son considerablemente menos activas pero a su vez suelen ser mucho más estables que en medio acuoso, pudiendo catalizar reacciones que son imposibles o difíciles en agua. La biocatálisis en medio orgánico puede realizarse en fase homogénea, si el solvente es miscible con el agua (Castro & Knubovets 2003) o en fase heterogénea, cuando el solvente es inmiscible con ésta y constituye una segunda fase, que puede o no ser visible (Krieger *et al.*, 2004). Las enzimas suelen presentar *memoria de pH*, respondiendo al valor de pH del medio desde el cual fueron precipitadas o liofilizadas (Carrea & Riva 2000). Esto es particularmente cierto en el caso en el que no se produzca una alteración de las concentraciones ácido/base durante el transcurso de la reacción; si esto no fuese así, el estado de protonación de la enzima y, por lo tanto, su actividad pueden variar durante la reacción. Además, la selectividad de algunas enzimas puede también diferir e incluso invertirse de un solvente a otro (por ejemplo, reacciones de síntesis pueden llevarse a cabo con enzimas hidrolíticas en medios no acuosos). Entre las ventajas de esta estrategia también cabe destacar la posibilidad de disminuir las reacciones colaterales indeseables, así como los fenómenos de inhibición por sustrato y producto, y facilitar la recuperación de los productos y el biocatalizador (Laane *et al.*, 1987).

Sin embargo existen limitaciones para el uso de solventes orgánicos en la síntesis biocatalítica, ya que muchos solventes pueden inactivar o desnaturalizar los biocatalizadores. Asimismo, independientemente del medio utilizado, para mantener su actividad catalítica, las enzimas necesitan mantener su estructura nativa, para lo que requiere de la presencia de un contenido mínimo o crítico de agua. Muchas veces, esta fase acuosa está formada por una película de agua molecular unida directamente al biocatalizador, permitiéndole mantener su conformación y por lo tanto, su actividad (Halling, 1994). Por otro lado, la presencia de un solvente orgánico puede provocar alteraciones estructurales significativas en la enzima y, como consecuencia de ello, en sus propiedades catalíticas (Barberis & Illanes 1996; Quiroga *et al.* 2007).

Inmovilización enzimática

Por razones técnicas y económicas, los procesos industriales de manufactura química requieren la reutilización y/o el uso continuo de los biocatalizadores durante largos periodos de tiempo. Teniendo en cuenta esto, la inmovilización de los biocatalizadores consiste en una técnica ideal para cumplir con este requisito. El término *inmovilización* se refiere a un proceso mediante el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de las enzimas, células enteras, etc., por unión a un soporte, de forma permanente o temporal, reteniendo sus propiedades y actividades catalíticas, y permitiendo a su vez el flujo de sustratos y productos (Arroyo, 1998). La inmovilización combina así la elevada actividad específica de los biocatalizadores con la estabilidad química y mecánica del soporte.

El desarrollo de técnicas de inmovilización eficaces ha permitido optimizar la estabilidad operacional y de almacenamiento, así como también la recuperación y el reciclaje de enzimas (Hanefeld *et al.*, 2009). Las enzimas inmovilizadas presentan una serie de ventajas sobre su contraparte en solución. Para aplicaciones

a escala industrial, el proceso de inmovilización es considerado favorable ya que permite procesos continuos y la reutilización, beneficiando la estabilidad de las enzimas en función del pH y la temperatura y, por lo tanto, haciéndolas menos sensibles a su entorno. Incluso aquellos procesos que emplean enzimas en suspensión en medios orgánicos requieren la inmovilización del biocatalizador de manera de optimizar la dispersión del mismo y mejorar la accesibilidad de los sustratos. En entornos hidrofóbicos, como en el caso de las reacciones con lípidos catalizadas por lipasas, la inmovilización enzimática evita el agregado de las moléculas de enzima (hidrofílica), lo que constituye otra ventaja (Hanefeld *et al.*, 2009). Sin embargo, las aplicaciones de las enzimas a menudo se ven obstaculizadas por la falta de estabilidad operacional a largo plazo, un aumento en la complejidad de los procesos *downstream*, la baja productividad y el riesgo de contaminación. Asimismo, la capacidad catalítica de la enzima puede verse afectada por el proceso de inmovilización en sí (Lartigue 1975), por ejemplo por la velocidad de difusión de sustratos y productos hacia dentro y fuera del sistema. El riesgo de contaminación establece la necesidad de un control sanitario durante el proceso, cuyo costo, sumado al del soporte y el proceso de inmovilización en sí, constituyen una importante barrera económica que encarece el proceso. En este sentido, el anclaje de una enzima a un soporte sólido insoluble debe ser sencillo y rentable, teniendo que ser evaluado cada biocatalizador y reacción enzimática en particular (Miletić *et al.*, 2012). El costo del catalizador debe corresponder a un pequeño porcentaje del costo total de producción y esta restricción, en muchos casos, representa un cuello de botella para la sustentabilidad económica de las síntesis biocatalíticas a escala industrial, especialmente en el caso de producción de materias primas. Por otro lado, para compensar el costo de la inmovilización, el desempeño de la enzima inmovilizada debe ser superior al de la enzima libre. Esta ventaja debe medirse en términos del aumento de la cantidad de producto obtenido por unidad de enzima, un aumento en las velocidades y la eficiencia volumétrica de la bioconversión, la facilidad de remoción del biocatalizador y el establecimiento de nuevas aplicaciones para una enzima dada.

Si bien la mayoría de las aplicaciones de las enzimas inmovilizadas en la industria son para la síntesis de productos farmacéuticos y de la química fina, también pueden encontrarse numerosos ejemplos en las industrias alimentaria y cosmética (Kirk *et al.*, 2002; Christensen *et al.*, 2003; Hasan *et al.*, 2006; Sheldon, 2016). Sin embargo existe un enorme potencial catalítico esperando ser explotado en diferentes procesos. Un ejemplo es el proceso de transesterificación de aceites comestibles catalizada por un granulado de sílica conteniendo la lipasa de *Thermomyces lanuginosa* Lipozyme TL-IM®, contenida en un reactor portátil empacado, desarrollado por Novozymes y ADM (Yang *et al.*, 2003). Esta metodología se utiliza para la producción de aceites transesterificados en EE.UU. desde el año 2002. Entre sus mayores ventajas cabe destacar que la operación se lleva a cabo a temperaturas bien por debajo de las necesarias para realizar el proceso mediante catálisis química y que el producto no necesita ser purificado por extracción con agua.

ENZIMAS DE APLICACIÓN INDUSTRIAL

La demanda de enzimas industriales se encuentra en un continuo aumento, impulsado por una creciente necesidad de soluciones sostenibles. Alrededor de 150 procesos industriales utilizan enzimas o células enteras como biocatalizadores en la síntesis de más de 500 productos (Adrio & Demain 2005). Las aplicaciones actuales de las enzimas como biocatalizadores se centran en diversos mercados, incluyendo la industria del papel, cuero, detergentes, textil, de biocombustibles, productos farmacéuticos y para el cuidado personal, productos de la química fina, alimentos, bebidas y alimentos balanceados, entre otros. Como

biocatalizadores, las enzimas representan una alternativa generalmente mucho más eficiente que los catalizadores químicos. Típicamente, las enzimas muestran números de recambio (k_{cat}) superiores a 100000 seg^{-1}, claramente más favorables que los valores observados para catálisis homogénea y heterogénea (entre 0,01 y 1 seg^{-1}). Sin embargo, sólo una fracción mínima de los catalizadores biológicos conocidos está siendo aplicada en procesos de biocatálisis a escala industrial: en el caso de las enzimas, de aproximadamente 4000 enzimas conocidas, alrededor de 400 están disponibles comercialmente, de las cuales sólo alrededor de 40 son usadas regularmente en procesos industriales. Entre ellas, aproximadamente el 75% corresponden a enzimas hidrolíticas, principalmente amilasas, peptidasas y lipasas, constituyendo más del 70% del mercado (Li *et al.*, 2012).

De acuerdo a Adrio & Demain (2014), el mercado total mundial de enzimas industriales alcanzó los 3.300 millones de dólares en 2010 y se estimó que llegaría a un valor de 4.400 millones en 2015. De las enzimas técnicas (utilizadas en detergentes y en las industrias textil, del papel y de biocombustibles), aquellas empleadas para el tratamiento de cueros y producción de bioetanol fueron responsables de las mayores cifras de ventas. En 2011, las enzimas técnicas tuvieron ingresos de casi 1,2 mil millones de dólares, esperando que alcanzaran los 1,7 mil millones en 2016, con un aumento de ventas en el mercado de biocombustibles (bioetanol).

El mercado mundial de enzimas industriales constituye un ámbito muy competitivo para numerosas empresas, que pugnan principalmente sobre la base de la calidad de los productos, rendimiento, uso de derechos de propiedad intelectual y la capacidad de innovación. En la actualidad, este mercado se encuentra liderado por Novozymes (una empresa biotecnológica danesa con representantes en numerosos países), el cual controla aproximadamente el 48% del mercado global de enzimas, seguido por el DSM y DuPont (Adrio & Demain 2005). América del Norte y Europa son los mayores consumidores de enzimas industriales en el mundo, aunque se espera que la región de Asia que incluye a China, Japón e India experimente un rápido incremento en la demanda de enzimas, reflejando el tamaño y la fuerza de las economías de estos países. Se espera que en nuestra región se siga la misma tendencia.

El uso de enzimas (principalmente hidrolasas tales como proteasas, lipasas, amilasas, y celulasas, entre otras) como aditivos en detergentes representa una de las mayores aplicaciones de las enzimas industriales. Entre ellas, las proteasas constituyen aproximadamente el 25% del total de ventas en detergentes y el 60% del mercado mundial de enzimas (Adrio & Demain 2005).

PEPTIDASAS EN LA SÍNTESIS ORGÁNICA

Históricamente, las proteasas han sido asociadas con la hidrólisis de proteínas. Sin embargo, a finales del siglo XIX surgieron las primeras señales experimentales de una acción inversa, un fenómeno que originalmente se denominó *reacción plasteina*. Se trata de una reacción que posibilita la formación enzimática de uniones peptídicas a partir de aminoácidos que proceden de hidrolizados proteicos, para dar lugar a la generación de nuevos polipéptidos con un peso molecular de aproximadamente 3000 Da (Andrews & Alichanidis 1990; Gutiérrez 2000). Desde este primer paso hasta hoy, donde las proteasas se consideran catalizadores habituales para la síntesis orgánica, existe un largo camino, muy lejos de acabarse todavía. Para el año 2002, alrededor del 10% de todas las publicaciones científicas que involucraban proteasas estaban conectadas en cierta forma con un uso sintético de estas enzimas (Bordusa, 2002). Junto con las proteasas, las lipasas y esterasas son las hidrolasas predominantes entre las enzimas reportadas para la síntesis orgánica.

Las proteasas (EC 3.4.N.N), más correctamente denominadas *"peptidasas"* de acuerdo a la recomendación del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica (NC-IUB, siglas del inglés Nomenclature Committee of the internacional Union Of Biochemistry), pertenecen a la familia de las hidrolasas. En la actualidad, se conocen varios cientos de estas enzimas, y en un sentido general, todas catalizan la misma reacción: la hidrólisis de enlaces peptídicos. Las proteasas son catalizadores estéreo- y regioespecíficos, que actúan generalmente bajo condiciones de reacción suaves con rangos de pH óptimos entre 6 y 8. En la mayoría de los casos, son fáciles de manejar, no necesitan de cofactores costosos, son relativamente estables y simples en su arquitectura molecular. Estas propiedades "nativas" convierten a las proteasas en herramientas útiles para el clivaje dirigido de péptidos, hidrólisis éster regiospecíficas o la resolución cinética de racematos (Bordusa, 2002). Las proteasas de origen animal y vegetal representan en la actualidad aproximadamente el 15% del mercado de enzimas proteolíticas, siendo mayoritarias las de origen microbiano (Nielsen & Olsen, 2002).

Las peptidasas pueden agruparse en cinco clases de acuerdo a las características de sus respectivos mecanismos catalíticos y a la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis: serínicas, treonínicas, cisteínicas, aspárticas, glutámicas y metalopeptidasas, en las cuales los aminoácidos serina (Ser), treonina (Thr), cisteína (Cys), aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu) o grupos metálicos, respectivamente, juegan roles primarios en la catálisis. Por otro lado, también existen peptidasas de mecanismo mixto e incluso desconocido (Erez *et al.* 2009; Morcelle 2004; MEROPS 2016).

Como catalizadores, las peptidasas alteran la velocidad a la que se alcanza el equilibrio termodinámico de una reacción, sin afectar el equilibrio en sí mismo. Esto implica inevitablemente que estas enzimas funcionan reversiblemente en ambos sentidos de la reacción. Sin embargo, las constantes de equilibrio para la reacción inversa, se encuentran en el rango de 10^{-3}-10^{-4} l/mol (Borsook 1953). Por este motivo, en condiciones fisiológicas, la posición de equilibrio de reacción estará desplazada hacia la hidrólisis, siendo despreciable para la reacción inversa. Como consecuencia, para que las peptidasas puedan actuar como biocatalizadores en la formación de enlaces peptídicos debe manipularse el equilibrio de la reacción. En la práctica, dichas manipulaciones pueden llevarse a cabo mediante dos estrategias básicas: el control cinético y el control termodinámico (Bordusa, 2002).

Síntesis de enlaces amida bajo control termodinámico

La síntesis catalizada por peptidasas bajo control termodinámico representa la reacción inversa directa de la proteólisis (Figura 1). En este caso se emplean sustratos dadores de acilo cuya función carboxilato está libre. Esto permite que cualquier proteasa pueda emplearse como biocatalizador independientemente de su mecanismo catalítico. Las mayores desventajas de esta estrategia consisten en las bajas velocidades de conversión, la gran cantidad de biocatalizador requerida y la necesidad de desplazar el equilibrio hacia la reacción espontáneamente desfavorable. Esto en general se logra mediante el empleo de solventes orgánicos que disminuyen la constante dieléctrica del medio. La precipitación o extracción del producto favorece aún más este tipo de reacciones (Bordusa, 2002).

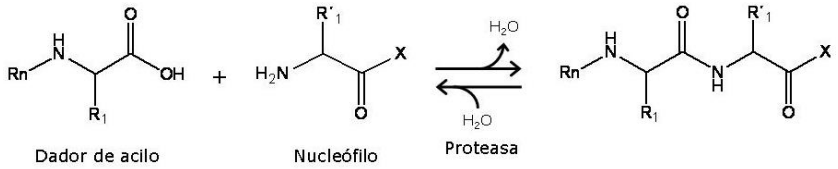

Figura 1. Síntesis de enlaces peptídicos catalizada por proteasas bajo control termodinámico.

Síntesis de enlaces amida bajo control cinético

La síntesis catalizada por peptidasas bajo control cinético requiere del empleo de proteasas serínicas o cisteínicas capaces de formar el intermediario reactivo acil-enzima. El factor clave de este método consiste en el uso de moléculas de dador de acilo levemente activadas como ésteres o amidas, lo que acelera la velocidad de reacción y minimiza el requerimiento de enzima. El intermediario acil-enzima puede luego ser atacado por un nucleófilo (agua, en el caso de hidrólisis, u otro nucleófilo como una amina, un alcohol, un tiol, etc.) para formar el compuesto deseado (Bordusa, 2002). El mecanismo de este tipo de control se ilustra en la Figura 2.

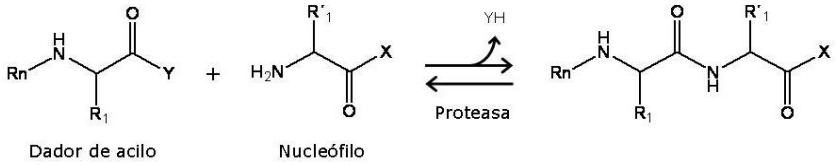

Figura 2. Síntesis de enlaces peptídicos catalizada por proteasas bajo control cinético.

Mientras que la estrategia termodinámica termina con el establecimiento de un nuevo equilibrio, la cinética se basa en la acumulación de un producto intermedio, pasando por una concentración máxima antes de que la hidrólisis (más lenta) comience a hacerse evidente. Posteriormente, si la reacción no se termina después de que el dador de acilo se consume, el producto será hidrolizado y el equilibrio verdadero será alcanzado. El éxito de síntesis en este caso depende de varios factores, mientras que los parámetros básicos de la reacción (tales como la temperatura, fuerza iónica, concentración de reactivo y el pH) juegan un papel importante. Como regla general, puede considerarse que un aumento de la concentración del nucleófilo y del pH del medio provocarán un aumento en el rendimiento del producto. Ambas manipulaciones aumentan la eficiencia del ataque nucleofílico del intermediario acil-enzima por el nucleófilo. Por último, la eficiencia de la síntesis depende de la enzima en sí misma. Considerando que la velocidad de reacción está determinada principalmente por la especificidad de la enzima hacia el dador de acilo, una unión específica del nucleófilo a los subsitios S' de la proteasa (Figura 2) es crucial para conseguir rendimientos elevados. Puesto que la especificidad de los dominios de unión del nucleófilo y el dador de acilo son parámetros específicos de cada enzima, la eficiencia de cada síntesis y, por tanto, la utilidad sintética de cada proteasa para la síntesis orgánica difiere de una enzima a otra.

Papaína como biocatalizador

La papaína (EC 3.4.22.2) es una endopeptidasa cisteínica vegetal obtenida a partir del látex de frutos de *Carica papaya*, usada ampliamente en las industrias alimentaria, cervecera, farmacéutica, veterinaria, cosmética y textil. Tiene múltiples aplicaciones en ablandamiento de carnes, clarificación de cerveza, producción de extracto de levadura, en limpieza dental y, en forma purificada, en cosmetología y medicina. Su costo es considerablemente menor que el de enzimas microbianas del mismo tipo y su estabilidad térmica es buena con respecto a la de otras proteasas.

La Figura 3 muestra un esquema del sitio activo de la papaína, el cual se encuentra formado por 7 *subsitios* (S_1-S_4 y S_1'-S_3', según la nomenclatura de Schechter y Berger) repartidos a ambos lados del sitio catalítico, identificado con la letra *C* (Schechter & Berger 1967). Las posiciones de los aminoácidos en el sustrato (P_n) se cuentan a partir del sitio de clivaje y por lo tanto se numeran de acuerdo al subsitio ocupado por cada uno. La papaína cliva preferentemente aquellos enlaces peptídicos que involucren aminoácidos básicos en la posición P1 y aminoácidos hidrofóbicos, aromáticos o voluminosos, en la posición P2.

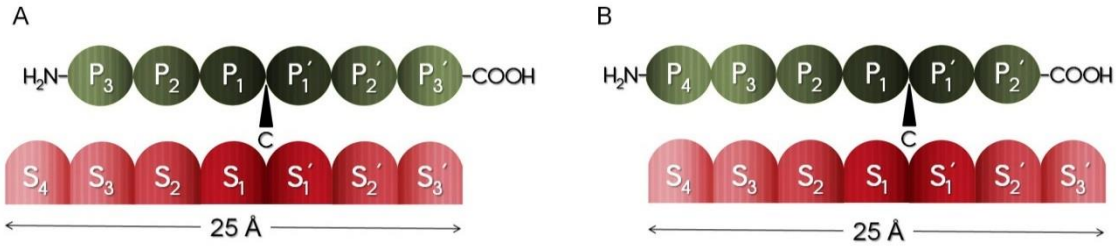

Figura 3. Representación esquemática de dos posibles complejos enzima-sustrato (A y B) de papaína con un sustrato peptídico compuesto por seis aminoácidos, donde la letra C representa el sitio de clivaje.

Como biocatalizador en la química orgánica, la papaína es una de las peptidasas más empleadas para la síntesis de diversos péptidos y derivados peptídicos debido a su robustez y amplia especificidad. Los productos sintetizados con este biocatalizador incluyen polímeros de un único aminoácido (Narai-Kanayama *et al.*, 2008), endulzantes peptídicos (Nakaoka *et al.*, 1998), hormonas (Klein & Cerovský 1996; Fité *et al*. 2002) e isósteros derivados de péptidos (Lang *et al.*, 2007; Morcelle *et al.*, 2013). Esta enzima también ha sido exitosamente utilizada como biocatalizador en la síntesis de alquilamidas y alquilésteres derivados de arginina, incluso a temperaturas tales como 65°C (Clapés *et al.*, 1999). En el caso de las reacciones de síntesis que involucren sólo aminoácidos, el requerimiento de un residuo hidrofóbico en la posición P_2 se cubre fácilmente utilizando grupos protectores de la función amino, como el grupo carbobenzoxi (Cbz- o Z-), benzoilo (Bz-) o tertbutiloxicarbonilo (Boc-).

Todas estas propiedades, sumadas a su fácil obtención y preparación a partir de una fuente natural, convierten a la papaína en una herramienta biocatalítica muy versátil para las reacciones que involucren la síntesis de enlaces amida y éster, entre una amplia gama de aminoácidos y una variedad enorme de nucleófilos simples, con motivos amina o alcohol.

SURFACTANTES

Definición y clasificación

La IUPAC (International *Union of Pure and Applied Chemistry*) define a los tensioactivos o surfactantes (conjunción del inglés *surface active agents*), como compuestos anfifílicos capaces de disminuir la tensión superficial del medio en el que se encuentran solubilizados, así como la tensión interfacial en la interfase de fluidos inmiscibles (IUPAC 2001). La estructura molecular anfifílica de estos compuestos se encuentra definida desde el punto de vista fisicoquímico como una dualidad polar-apolar. La región polar de la molécula se denomina comúnmente como *cabeza polar* o *hidrofílica* y posee una alta afinidad por los solventes polares, en particular el agua. Esta porción de la molécula exhibe por lo general un alto contenido de heteroátomos, como O, S, P y N, que se encuentran formando parte de grupos alcohol, ácido, sulfato, sulfonato, fosfato, amina, amida, etc. Por otro lado, la región apolar o poco polar, y por lo tanto con baja afinidad por los solventes polares, llamada *cola hidrofóbica* o *lipofílica*, se encuentra formada generalmente por un grupo hidrocarbonado de tipo alquilo o alquil benceno.

La forma más práctica de clasificar a los surfactantes es de acuerdo a su estructura. La porción hidrofóbica de la mayoría de los agentes tensioactivos es bastante similar: consiste en una o dos cadenas hidrocarbonadas (denominados surfactantes de cadena simple y doble, respectivamente) que pueden ser ramificadas, lineales o aromáticas, y pueden estar eventualmente halogenadas, como en el caso de los fluorosurfactantes, que contienen colas hidrofóbicas fluorocarbonadas. Debido a esto, lo más común es clasificar a los tensioactivos según la naturaleza química y la carga de la región hidrofílica o *cabeza* polar. De esta manera, los surfactantes pueden clasificarse en *no iónicos*, cuando no poseen ningún grupo cargado (como el Tritón X-100, un éster de polietilenglicol), o *iónicos*, cuando la cabeza polar tiene una carga neta. Si la carga neta de la región polar es negativa, dada por ejemplo por la presencia de grupos sulfato, sulfonato o fosfato, el surfactante será *aniónico* (por ejemplo, el lauril sulfato de sodio, más comúnmente conocido como SDS). Por otro lado, si la carga neta es positiva, como en el caso de las aminas, se tratará de un surfactante *catiónico* (como el bromuro de hexadecil-trimetilamonio o bromuro de cetiltrimetilamonio, conocido como CTAB, uno de los principales componentes del Cetrimide). Finalmente, si un agente tensioactivo presenta una región hidrofílica con ambas cargas pero sin carga neta, se denominará *zwitteriónico* (como en el caso de los *N*-alquil aminoácidos). En muchos casos, la carga neta de la región polar de los surfactantes dependerá del pH del medio.

Propiedades y aplicaciones

Los surfactantes se caracterizan por aumentar la solubilidad, movilidad, biodisponibilidad y subsecuente biodegradación de compuestos orgánicos insolubles en agua (Singh *et al.*, 2007). Su estructura anfifílica permite que sus regiones hidrofílica e hidrofóbica se orienten en las interfaces entre fluidos con diferentes polaridades, reduciendo así las tensiones superficiales e interfaciales. Como resultado, estos compuestos facilitan la formación de emulsiones, dispersiones y espuma, haciéndolos esenciales en aplicaciones que requieren la emulsificación, lubricación y espumado, así como la solubilización de compuestos no miscibles o dispersión de fases. Su capacidad de interactuar con membranas y macromoléculas, tales como ácidos nucleicos, les brinda diversas actividades, exhibiendo en muchos casos propiedades antimicrobianas, antivirales, hemolíticas, insecticidas, etc. Tienen un amplio rango de aplicaciones, que van desde la limpieza en el hogar, pasando por diversos procesos industriales y usos en agroquímicos, hasta ingredientes activos en productos de cuidado personal (Clapés & Infante 2002; Mnif & Ghribi 2015; Gudiña *et al*. 2016).

Los surfactantes en solución, cuando están presentes en bajas concentraciones, son adsorbidos en la superficie o interfase de una manera orientada, con una consecuente disminución en la tensión de superficial o interfacial del sistema. La máxima concentración de surfactante en la superficie (Γ_{max}) mide la eficacia de adsorción y es inversamente proporcional al área interfacial (A_{min}) ocupada por la molécula de surfactante en la monocapa. En el seno de la solución, las moléculas de surfactante forman agregados de diferentes tamaños y formas (esferas, elipsoides, cilindros), comúnmente conocidos como *micelas*. La concentración a la cual comienza a observarse la formación de agregados es característica de cada surfactantes y se conoce como *concentración micelar crítica* (CMC). La formación de micelas es una característica importante de los tensioactivos ya que un número importante de procesos interfaciales, como la interacción con membranas biológicas, la acción lítica y la solubilización de los compuestos no polares, dependen de este proceso (Clapés & Infante 2002).

Dado su amplio abanico de aplicaciones, los surfactantes representan un conjunto de productos consumidos diariamente en grandes cantidades a escala mundial. Por esta razón, el mercado de tensioactivos se encuentra en continuo crecimiento. Su producción total a nivel mundial se estima en más de 15 millones de toneladas por año, y se espera que supere las 24 millones de toneladas por un valor de 42 mil millones de dólares para el año 2020 (Gudiña *et al.*, 2016).

SURFACTANTES DE BASE BIOLÓGICA Y BIOSURFACTANTES

La mayoría de los surfactantes disponibles hoy en día deriva de fuentes petroquímicas, lo que consume recursos no renovables, además de contribuir a la contaminación ambiental debido a su baja biodegradabilidad (Morán *et al.*, 2004). Estos puntos han despertado un interés creciente en moléculas surfactantes basadas en estructuras anfifílicas naturales, como aquellas que mimetizan los lipoaminoácidos naturales y los compuestos tensioactivos sintetizados por microorganismos o *biosurfactantes* (glicolípidos, lipopéptidos y polímeros) (Morán *et al.* 2004; Pinazo *et al*. 2011; Bordes & Holmberg 2015; Pinazo *et al.* 2016; Nitschke & Sousa e Silva 2016). Las propiedades mostradas por los surfactantes de base biológica (alta biodegradabilidad y biocompatibilidad, baja toxicidad, alta actividad superficial, estabilidad bajo extremas condiciones de temperatura, pH y salinidad, diversidad estructura, actividad biológica, etc.), sumadas a la utilización de recursos renovables, ofrecen potenciales ventajas sobre los tensioactivos sintéticos convencionales, constituyendo así las principales razones para el creciente interés sobre estas moléculas (Gudiña *et al.*, 2016). Trabajos recientes mostraron que el volumen del mercado global actual de los biosurfactantes se estima en alrededor de las 476.500 toneladas anuales, siendo producidos por 17 empresas a escala industrial en todo el mundo (Sekhon Randhawa & Rahman 2014). El número de patentes de biosurfactantes se ha estimado en cerca de 530 hasta el año 2013, de las cuales aproximadamente el 80% ha sido emitida en la última década debido al creciente interés de los sectores cosméticos y farmacéuticos (Hames *et al.* 2015). Con el continuo crecimiento de la demanda de estos productos, se estima que el mercado mundial de los biosurfactantes supere los 2.000 millones de dólares en el año 2018 (Nitschke & Sousa e Silva 2016).

SURFACTANTES DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS

Entre los tensioactivos de base biológica, los tensioactivos derivados de aminoácidos constituyen una interesante familia de surfactantes con excelentes propiedades de adsorción y agregación, alta biodegradabilidad, baja toxicidad, bajo impacto ambiental y amplia actividad antimicrobiana. La multifuncionalidad de estos compuestos los convierte en aditivos interesantes para diversas formulaciones cosméticas y farmacéuticas, ayudando a la eliminación de ingredientes innecesarios y permitiendo el desarrollo de formulaciones más simples con una reducción en los costos. Desde un punto de vista económico y ambiental, los surfactantes derivados de aminoácidos de cadena simple son compuestos altamente atractivos, puesto que pueden ser fácilmente preparados. Se producen en una escala de unos pocos miles de toneladas por año, con importantes aplicaciones en áreas como la salud y el cuidado personal (Clapés & Infante 2002).

Los aminoácidos tienen al menos dos grupos funcionales: el grupo α-carboxílico y el grupo α-amino. Estos compuestos pueden convertirse fácilmente a surfactantes de cadena simple con una molécula reactiva portadora de una cadena hidrofóbica, como ácidos grasos, alcoholes, ésteres y aminas grasas. La cadena hidrofóbica puede introducirse en la estructura del aminoácido a través de enlaces amida o éster (Figura 4). La porción aminoacídica o peptídica de la molécula será la que determine las mayores diferencias de adsorción, agregación y actividad biológica entre los surfactantes derivados de aminoácidos. De esta manera, el uso de aminoácidos ácidos, básicos o neutros como material de partida puede dar lugar a tensioactivos aniónicos, catiónicos o no iónicos, respectivamente. Modificaciones más exhaustivas de estos grupos permitirá la selección específica de sus propiedades para cada una de las aplicaciones en particular. Los aminoácidos como la lisina o la arginina, ofrecen oportunidades adicionales para el diseño molecular de tensioactivos monocatenarios (Pinazo *et al.*, 2016).

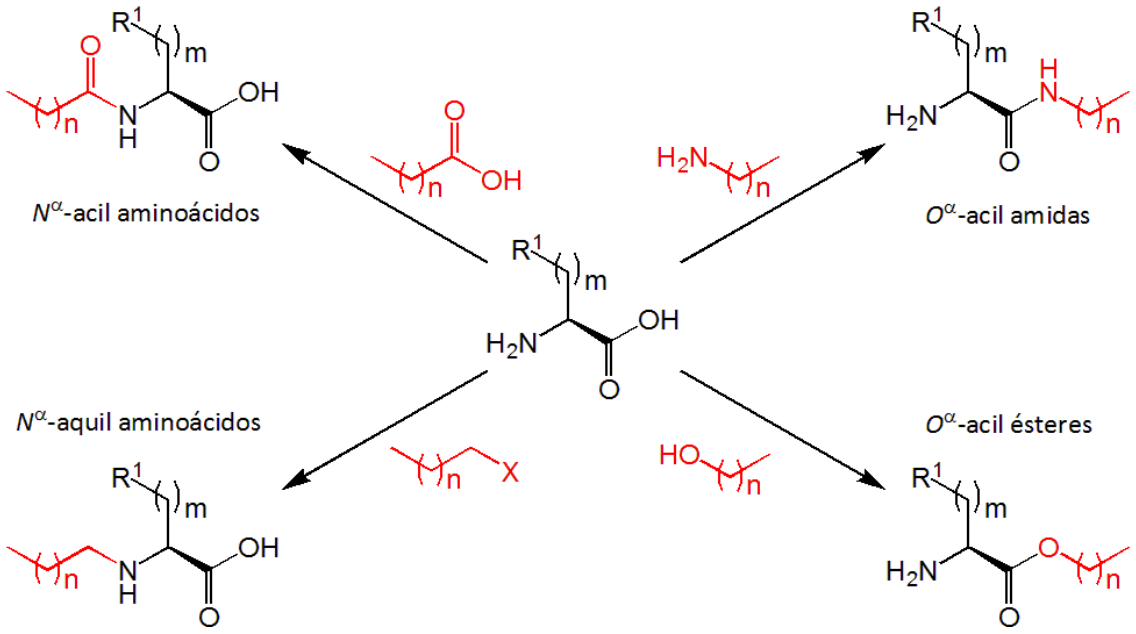

Figura 4. Principales tipos de uniones entre la porción hidrofóbica y la aminoacídica de los surfactantes derivados de aminoácidos de cadena simple. X: Cl, Br o I; R^1: cadena lateral del aminoácido.

La síntesis de tensioactivos derivados de aminoácidos se ha llevado a cabo tanto por métodos químicos (Pérez *et al.*, 1996, 2002b, 2004) como quimioenzimáticos (Clapés *et al.*, 1999; Piera *et al.*, 2000; Morán *et al.*, 2001), haciendo uso de materias primas renovables como aminoácidos, azúcares y aceites vegetales. Sin embargo, el concepto de tensioactivos de base biológica ha llevado a la consideración de métodos biotecnológicos, es decir, catalizados por microorganismos o enzimas, para su producción, ya que estas metodologías producen menos contaminantes y consumen menos energía y recursos (Clapés & Infante 2002).

Además de los surfactantes derivados de aminoácidos de cadena simple (Figura 5a), las cadenas alifáticas y los aminoácidos pueden combinarse entre sí para generar otras tres estructuras principales: diméricos o géminis, del tipo glicerolípidos y anfifilos tipo bola (Castillo Expósito, 2006). Los surfactantes géminis son estructuras formadas por dos moléculas anfifílicas idénticas (constituidas cada una por una cabeza polar y una cola hidrofóbica) unidas covalentemente entre sí mediante un espaciador (Figura 5b). En el caso de las estructuras del tipo glicerolípidos, las mismas pueden ser consideradas análogas de fosfolípidos o de mono- y diglicéridos. Consisten en una cabeza polar unida a una o dos colas hidrofóbicas a través de un esqueleto de glicerol (Figura 5c). Finalmente, los anfifilos tipo bola contienen dos cabezas polares unidas en cada extremo de una cadena de hidrocarburo alifático (Figura 5d).

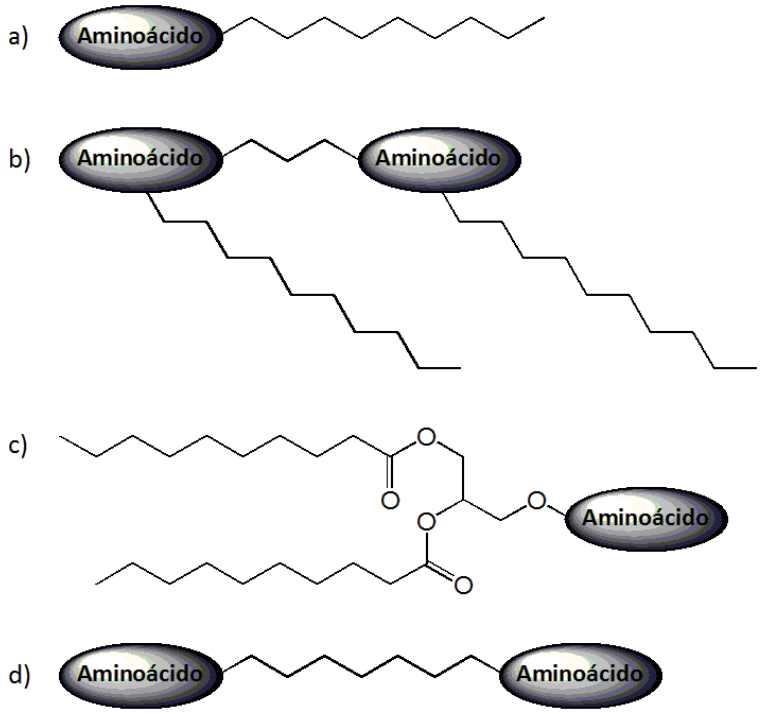

Figura 5. Clasificación de los surfactantes derivados de aminoácidos según su estructura: (a) de cadena simple, (b) diméricos o géminis, (c) del tipo glicerolípidos y (d) anfifilos tipo bola. El aminoácido constituye la cabeza polar del tensioactivo, mientras que la cadena de alquilo hidrocarbonada constituye la región hidrofóbica de la molécula.

Peptidasas en la síntesis de surfactantes derivados de aminoácidos

Hasta hace pocos años, la síntesis de surfactantes era sólo considerada dentro de las incumbencias de la química orgánica. Sin embargo, el rápido avance de la biotecnología ha despertado el interés en los tensioactivos obtenidos mediante el empleo de catalizadores biológicos (Valivety *et al.*, 1997). Si bien la mayor parte de las aplicaciones de las proteasas se refiere a reacciones hidrolíticas en medio acuoso para la degradación de moléculas complejas a moléculas más simples, el uso de proteasas y lipasas para la síntesis de enlaces éster y amida ha sido ampliamente estudiado, como en el caso de los surfactantes derivados de aminoácidos (Castillo-Expósito 2006; Valivety *et al*. 1997; Clapés *et al*. 1999; Morán *et al*. 2001; Morcelle *et al.* 2009). La síntesis y los métodos de purificación tradicionales de esta clase compuestos involucran numerosos pasos con reacciones de protección y desprotección, así como el uso de solventes orgánicos peligrosos y otros químicos de elevada toxicidad (como el BF_3, bases orgánicas fuertes y solventes clorados). A su vez, dependiendo del producto final deseado, pueden requerirse condiciones drásticas de reacción, como elevadas temperaturas y presiones e incluso reacciones de hidrogenación (Pérez *et al*. 1996; Mitin *et al*. 1997; Piera *et al*. 1998; Castro *et al*. 2004a). Por otro lado, el rendimiento global de estas reacciones de síntesis no supera el 45-60% en el mejor de los casos (Castro *et al*. 2004b; Pérez *et al*. 2014). Asimismo, es importante destacar que el uso de estas estrategias químicas no cumple con los requisitos de la química verde, ya que el uso de esta metodología resulta en la aparición de productos tóxicos provenientes de las materias primas empleadas y que pueden estar presentes en las formulaciones finales. Estas desventajas pueden ser evitadas utilizando enzimas como biocatalizadores, las cuales son altamente específicas y pueden emplearse bajo condiciones de reacción suaves.

Papaína inmovilizada por adsorción sobre poliamida demostró ser un biocatalizador eficiente para la formación de enlaces amida y éster en la síntesis de *N*-alquil amidas y *O*-alquil ésteres de arginina, dos familias surfactantes derivados de arginina de cadena simple (Clapés *et al.* 1999; Morán *et al.* 2004). La reacción en este caso fue llevada a cabo por condensación enzimática del sustrato sintético carbobenzoxi-arginina metil éster (Z-Arg-OMe) y aminas o alcoholes grasos de diferente longitud de cadena, a través del grupo carboxilo de la arginina. En el caso de la preparación de los *O*-alquil ésteres, la síntesis fue llevada a cabo en sistemas libres de solvente, usando el alcohol como medio de reacción. Ambos tipos de compuestos fueron sintetizados enzimáticamente a escala multigramo, con una pureza superior al 99%.

Los glicerolípidos conjugados de arginina constituyen otra clase de lipoaminoácidos con propiedades tensioactivas, formados por dos cadenas alifáticas unidas por una molécula de glicerol a la cabeza polar constituida por el residuo aminoacídico. Estos compuestos han sido sintetizados usando tanto estrategias químicas como enzimáticas (Pinazo *et al.*, 2016). Ambos métodos tienen en común la primera etapa de la síntesis, que consiste en la preparación enzimática del derivado gliceril-éster de arginina. Esta reacción consiste en la esterificación selectiva catalizada por una proteasa de uno de los grupos hidroxilo primarios del glicerol con el grupo carboxilato de la arginina. El segundo y último paso implica acilación enzimática o química de los dos grupos hidroxilo libres restantes con el correspondiente cloruro ácido de cadena larga.

Finalmente, también se ha reportado la síntesis enzimática de tensioactivos catiónicos tipo géminis derivados de arginina, también llamados *bis(Args)* (Pérez *et al.*, 1996). En este tipo de compuestos, la cadena hidrocarbonada se conecta al grupo N^{α}-amino de la arginina a través de un enlace amida. La estrategia de síntesis quimio-enzimática empleada en este caso implica la acilación del diamino-alcano espaciador por el N^{α}-acil-arginina etil éster (con diferentes longitudes de cadena hidrocarbonada), seguida por la reacción catalizada por papaína entre la N^{α}-acil-arginina y el grupo amino restante del espaciador.

Aplicaciones y características de los surfactantes derivados de aminoácidos

A diferencia de las sales de ácidos grasos (como el jabón de laurato de sodio), los N^{α}-acil aminoácidos de cadena larga tienen excelente solubilidad acuosa (debido a la presencia de enlaces CO – NH adicionales), alta biodegradabilidad y buena tolerancia al ion calcio (*lime resistance*). Se ha observado que la actividad superficial aumenta y la CMC disminuye al aumentar la longitud de cadena de alquilo y la hidrofobicidad del residuo aminoacídico (Clapés & Infante 2002).

El uso de vesículas de N^{α}-acil aminoácidos sintéticos como vehículo para diversas drogas (*drug carriers*), así como para la preparación de liposomas funcionales con ligandos de lipopéptidos, ha sido examinada por varios autores (Boeckler *et al.*, 1998; Yagi *et al.*, 2000; Tavano *et al.*, 2014). Las vesículas de N^{α}-acil aminoácidos de cadena alifática larga demostraron eficiencia de encapsulación comparable a la de los liposomas de lecitina convencionales. Por otro lado, se ha reportado el desarrollo de una tecnología para la transferencia de ADN foráneo a células a través de la formación de complejos hidrofóbicos ion apareado no tóxicos entre ésteres de alquilo de cadena larga derivados de arginina con moléculas de ADN (Morán *et al.*, 2004). Los lipoaminoácidos resultan también particularmente atractivos como agentes antimicrobianos y antivirales. Numerosos trabajos han mostrado la capacidad inhibitoria del crecimiento e incluso bactericida de los surfactantes derivados de aminoácidos (sobre todo de arginina y lisina) frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (Castillo Expósito, 2006; Pinazo *et al.*, 2016). En el caso de los virus, ciertos derivados de aminoácidos han mostrado ser efectivos para la inhibición de la enzima neuraminidasa (NA) del virus de la influenza (gripe), presente en la cápside del virus e involucrada en el clivaje de uniones glicosídicas que contribuyen a la movilidad de los viriones (Kondoh *et al.*, 1997).

Se ha encontrado que el enlace amida que conecta la cabeza y la cola hidrocarbonada de los tensioactivos de la familia de los N^{α}-acil aminoácidos participa en la autoagregación de las moléculas (Bordes & Holmberg 2015). Este enlace puede contribuir en la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares, lo que conduce a un empaquetamiento muy apretado, tanto en el caso en que los anfifilos se alinean en una monocapa en la interfase de dos fluidos inmiscibles (aire-agua, por ejemplo), como cuando se agrupan en forma de micelas en solución acuosa (Bordes *et al.*, 2010). Los surfactantes derivados de aminoácidos pueden producirse en forma enantiomericamente pura. La agregación de tales moléculas conduce a la formación de micelas con una superficie quiral (*quiralidad supramolecular*), la cual puede aprovecharse para la síntesis orgánica asimétrica y la inducción de quiralidad en materiales meso-porosos (Gao & Che 2010).

Los principales tipos de enlaces entre el residuo aminoacídico y la cola hidrofóbica son éster y amida. Estos tipos de unión son fácilmente degradados por la acción de enzimas hidrolíticas, como lipasas y peptidasas, lo que significa que la mayoría de los tensioactivos basados en aminoácidos son fácilmente biodegradables y no tóxicos para los organismos marinos (Pérez *et al.*, 2002a; Infante *et al.*, 2004; Morán *et al.*, 2004; Colomer *et al.*, 2012). Además, la familia de los N^{α}-acil aminoácidos ha sido ampliamente estudiada, demostrando baja capacidad de irritación y sensibilización de la piel (Bordes & Holmberg 2015).

Teniendo en cuenta todas las propiedades de estos compuestos, los tensioactivos derivados de aminoácidos presentan muchas de las características requeridas para los tensioactivos incorporados en productos de consumo. No resulta sorprendente el hecho de que con la creciente preocupación sobre los efectos biológicos de las sustancias químicas, el interés sobre esta clase de tensioactivos crezca aún más en el futuro.

Surfactantes derivados de arginina de cadena simple: propiedades y aplicaciones

Entre los surfactantes derivados de aminoácidos de cadena simple, los derivados de arginina conforman una clase de compuestos catiónicos con excelentes propiedades de agregación y adsorción, actividad antimicrobiana de amplio espectro, buena biodegradabilidad, baja toxicidad potencial y bajo impacto ambiental (Pinazo *et al.*, 2016). Los mismos pueden clasificarse según su estructura en tres series de compuestos: N^{α}-acil arginina alquil ésteres (Figura 6a), arginina-*N*-alquilamidas (Figura 6b) y arginina-*O*-alquil ésteres (Figura 6c).

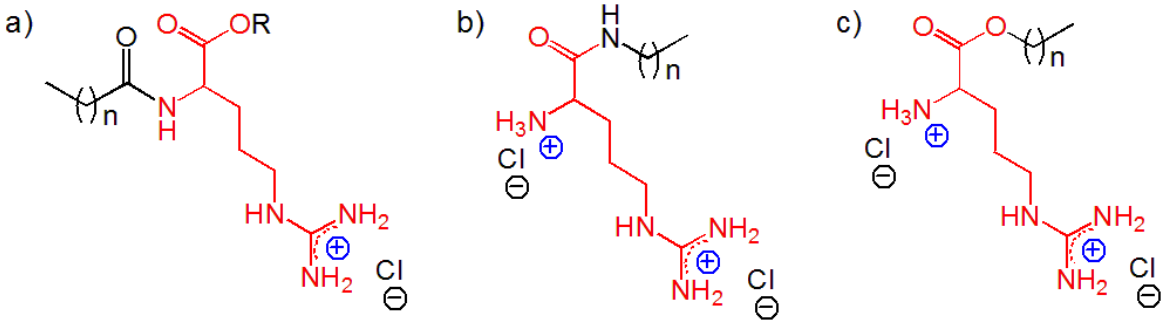

Figura 6. Estructura de surfactantes derivados de arginina de cadena simple: (a) N^{α}-acil arginina alquil ésteres con R=CH_3 y n=8 CAM, n=10 LAM, n=12 MAM; (b) arginina-N-alquilamidas, n=9 ACA, n=11 ALA, n=13 AMA; y (c) arginina-O-alquil ésteres, n=7 AOE, n=9 ACE, n=11 ALE (Pinazo *et al.*, 2016).

Las principales diferencias entre estas familias de compuestos incluyen el tipo de enlace que participa en la unión de la cola hidrocarbonada al residuo de arginina, la posición del mismo respecto del *carbono α* de la arginina (unión a través del grupo α-amino o del α-carboxilo) y la cantidad de cargas positivas presentes en la porción hidrofílica de la molécula (Morán *et al.*, 2004). En cuanto a la síntesis de los mismos, los compuestos del tipo N^{α}-acil arginina metil éster no han podido ser sintetizados enzimáticamente, en tanto que los del tipo arginina-*N*-alquilamida y arginina-*O*-alquil éster fueron obtenidos exitosamente empleando papaína como biocatalizador, como se mencionó anteriormente (Castillo Expósito, 2006).

Se ha reportado el estudio de la adsorción y agregación de los surfactantes derivados de arginina de cadena simple, a diferentes concentraciones y en presencia o ausencia de otros componentes (Pinazo *et al.*, 2016). Estos compuestos presentan generalmente buena solubilidad acuosa y excelentes propiedades tensioactivas, siendo capaces de disminuir la tensión superficial del agua y de formar agregados en medio acuoso, mostrando valores de CMC definidos. La morfología de los agregados observados en cada caso depende no sólo de la porción hidrofóbica de la molécula, sino también de la temperatura, composición y contenido de electrolitos del sistema (Morán *et al.*, 2004). Por otro lado, los tensioactivos catiónicos derivados de arginina presentaron un perfil satisfactorio toxicidad, alta biodegradabilidad y excelentes propiedades antimicrobianas contra bacterias, hongos y levaduras (Infante *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2009; Pinazo *et al.*, 2011, 2016). Esta última propiedad es el resultado de la combinación de la actividad interfacial de los compuestos y su estructura molecular, siendo factores clave la longitud de la cadena hidrocarbonada y la presencia del grupo básico guanidinio protonado de la arginina (Castillo Expósito, 2006). Estas propiedades convierten a los surfactantes derivados de arginina en interesantes alternativas para una amplia gama de

aplicaciones industriales tanto la formulación de productos para el cuidado personal, farmacéuticos y agroalimentarios, así como en el diseño y síntesis de biomateriales (Pinazo *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

La sustentabilidad, tanto de los procesos como de los bienes de consumo generados, es un reto importante para la industria química del siglo XXI. En este sentido, los tensioactivos se encuentran entre los productos más empleados en los distintos sectores industriales. En este contexto, la creciente conciencia ambiental ha impulsado el desarrollo de compuestos con propiedades tensioactivas, considerablemente menos tóxicos y biodegradables, con prometedoras aplicaciones biomédicas gracias a sus excelentes propiedades interfaciales y biológicas.

Los aminoácidos representan una serie de sustratos versátiles para la síntesis de surfactantes, permitiendo la obtención de anfifilos aniónicos, catiónicos o zwitteriónicos dependiendo de la elección del aminoácido de partida y el proceso de síntesis empleado. En este sentido, la síntesis de estos compuestos mediante estrategias biotecnológicas favorece el desarrollo de procesos menos contaminantes, empleando menos recursos y energía. Por otro lado, en los tensioactivos derivados de aminoácidos el residuo aminoacídico se encuentra generalmente unido a la porción hidrofóbica mediante un enlace éster o amida, lo cual convierte a estos compuestos en biodegradables y no tóxicos para los organismos marinos, ya que este enlace es fácilmente clivado por la acción de enzimas hidrolíticas como lipasas o peptidasas. El hecho de que muchos de los tensioactivos derivados de aminoácidos han demostrado ser suaves para la piel y no sensibilizantes, sumado a la multifuncionalidad de estos compuestos (actividades antibacterianas, antivirales, antifúngicas, hemolíticas, etc.), convierte a estos productos en una alternativa promisoria a los tensioactivos comerciales disponibles actualmente. No resulta sorprendente así que, con la creciente preocupación sobre los efectos nocivos de los químicos (tanto en los seres vivos como en el medio ambiente), el interés sobre esta familia de tensioactivos crezca aún más en el futuro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adrio, J.L. & A.L. Demain (2005) "*Microbial Cells and Enzymes A Century of Progress*". En: "Microbial Enzymes and Biotransformations". Humana Press, Totowa, NJ, pp 1-27.

Adrio, J. & A. Demain (2014) Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules* **4**: 117-39.

Anastas, P. & J. Warner (1998) Green Chemistry: Theory and practice . Oxford: Oxford University Press.

Anastas, P & T. Williamson (1996) Green Chemistry: An Overview. En: Green Chemistry - Design Chemistry for the Environment. Washington, DC: ACS Synposium Series 626.

Andrews, A.T. & E. Alichanidis (1990) The plastein reaction revisited: Evidence for a purely aggregation reaction mechanism. *Food Chem.* **35**: 243-61.

Arnold, F.H. (1990) Engineering enzymes for non-aqueous solvents. *Trends Biotechnol.* **8**: 244-9.

Arroyo, M. (1998) Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* **39**: 23-39.

Barberis, S & A. Illanes (1996) Catálisis enzimática en fase orgánica: aspectos cinéticos y termodinámicos. *Ing. Quim.* **322**:165-73

Boeckler, C., B. Frisch & F. Schuber (1998) Design and synthesis of thiol-reactive lipopeptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**: 2055-8.

Bordes, R. & K. Holmberg (2015) Amino acid-based surfactants - Do they deserve more attention? *Adv. Colloid Interfac. Sci.* **222**: 79-91.

Bordes, R., J. Tropsch & K. Holmberg (2010) Role of an amide bond for self-assembly of surfactants. *Langmuir* **26**: 3077-83.

Bordusa, F. (2002) Proteases in Organic Synthesis. *Chem. Rev.* **102**: 4817-68.

Bornscheuer, U.T., G.W. Huisman, R.J. Kazlauskas, S. Lutz, J.C. Moore & K. Robins (2012) Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **485**: 185-94.

Borsook, H. (1953) Peptide Bond Formation. *Adv. Prot. Chem*. **8**:127

Brenna, E. (2013) *Synthetic Methods for Biologically Active Molecules*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Brundtland, C.G. (1987) Our Common Future, The World Commission on Environmental Development, Oxford University Press, Oxford.

Carrea, G. &, S. Riva (2000) Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. *Ang. Chem. Int. Edit.* **39**: 2226-54.

Castillo Expósito, J.A. (2006) *Studies on antimicrobial activity of arginine-based surfactants and chemo- enzymatic synthesis of novel amphiphiles based on L -arginine and D -fagomine*. PhD. Thesis, Universidad Autónoma de Barcelona.

Castro, G.R. & T. Knubovets (2003) Homogeneous Biocatalysis in Organic Solvents and Water-Organic Mixtures. *Crit. Rev. Biotechnol.* **23**: 195-231.

Castro, M., Griffiths, D., Patel, A., Pattrick, N., Kitson, C. & Ladlow, M. (2004a) Effect of chain length on transfection properties of spermine-based gemini surfactants. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2**: 2814-20.

Castro, M., Griffiths, D., Patel, A., Pattrick, N., Kitson, C. & Ladlow, M. (2004b) Effect of chain length on transfection properties of spermine-based gemini surfactants. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2**: 2814.

Christensen, M.W., L. Andersen, T.L. Husum & O. Kirk (2003) Industrial lipase immobilization. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**: 318-21.

Clapés, P. & M.R. Infante (2002) Amino Acid-based Surfactants: Enzymatic Synthesis, Properties and Potential Applications. *Biocatal. Biotransfor.* **20**: 215-33.

Clapés, P., C. Morán & M.R. Infante (1999) Enzymatic synthesis of arginine-based cationic surfactants. *Biotechnol. Bioeng.* **63**: 333-43.

Colomer, A., A. Pinazo, M.T. García, M. Mitjans, M.P. Vinardell, M.R. Infante, *et al.* (2012) pH-Sensitive surfactants from lysine: assessment of their cytotoxicity and environmental behavior. *Langmuir* **28**: 5900-12.

Demain, A.L. & J.L. Adrio (2008) Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol. Biotechnol.* **38**: 41-55.

Dordick, J.S. (1989) Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb. Tech.* **11**: 194-211.

Erez, E., D. Fass & E. Bibi (2009) How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature*: **459**: 371-8.

Fité, M., P. Clapés, J. López-Santín, M.D. Benaiges & G. Caminal (2002) Integrated process for the enzymatic synthesis of the octapeptide PhAcCCK-8. *Biotechnol. Progr.* **18**: 1214-20.

Gao, C. & S. Che (2010) Organically functionalized mesoporous silica by co-structure-directing route. *Adv. Funct. Mat.* **20**: 2750-68.

Gardossi, L., P.B. Poulsen, A. Ballesteros, K. Hult, V.K. Švedas, D., Vasić-Rački, *et al.* (2010) Guidelines for reporting of biocatalytic reactions. *Trends Biotechnol.* **28**: 171-80.

González, P., C. Pérez & S. Figueroa-Duarte (2016) La enseñanza de la química desde la perspectiva de la química verde. *Revista Científica* **1**: 24-40.

Gudiña, E.J., A.I. Rodrigues, V. de Freitas, Z. Azevedo, J.A. Teixeira & L.R. Rodrigues (2016) Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. *Bioresource Technol.* **212**: 144-50.

Gutiérrez, J.B. (2000) "*Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos*". Díaz de Santos, Madrid, España.

Halling, P.J. (1994) Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb Tech.* **16**: 178-206.

Hames, E.E., F. Vardar-Sukan & N. Kosaric (2015) Patents on biosurfactants and future trends. En: Biosurfactants Production and Utilization – Processes, Technologies, and Economics, pp. 165-243. Kosaric, N., and Vardar-Sukan, F., Eds., CRC Press, Boca Raton.

Hanefeld, U., L. Gardossi & E. Magner (2009) Understanding enzyme immobilisation. *Chem. Soc. Rev.* **38**: 453-68.

Hasan, F., A.A. Shah & A. Hameed (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Tech.* **39**: 235-51.

Illanes, A. (1999) Stability of biocatalysts. *Electron. J. Biotechnol.* **2**: 1-9.

Illanes, A., A. Cauerhff, L. Wilson & G.R. Castro (2012) Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technol.* **115**: 48-57.

Infante, M.R., L. Pérez, A. Pinazo, P. Clapés, M.C. Morán, M. Angelet, *et al.* (2004) Amino acid-based surfactants. *C. R. Chim.* **7**: 583-92.

IUPAC (2001) Surface Active Agents, manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units. International Union Of Pure And Applied Chemistry. http://old.iupac.org/reports/2001/colloid_2001/manual_of_s_and_t/node36.html.

Kazlauskas, R. & B.G. Kim (2011) Biotechnology tools for green synthesis: enzymes, metabolic pathways, and their improvement by engineering. En: *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development,* Tao, J.; Kazlauskas, R. (Eds) *1st Edition, pp 3-19.*

Khmelnitsky, Y.L., A.V. Levashov, N.L. Klyachko & K. Martinek (1988) Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme Microb Tech.* **10**: 710-24.

Kirk, O., T.V. Borchert & C.C. Fuglsang (2002) Industrial enzyme applications. *Curr.Opin. Biotechnol.* **13**: 345-51.

Klein, J.U. & V. Čerovský (2009) Protease-catalyzed synthesis of Leu-enkephalin in a solvent-free system. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **47**, 348–352.

Klibanov, A.M. (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**: 241-6.

Kondoh, M., T. Furutani, M. Azuma, H. Ooshima & J. Kato (1997) Acyl amino acid derivatives as novel inhibitors of influenza neuraminidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **61**: 870-4.

Krieger, N., T. Bhatnagar, J.C. Baratti, A.M. Baron, V.M. De Lima & D. Mitchell (2004) Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. *Food Technol. Biotechnol.* **42**: 279-286.

Laane, C., S. Boeren, K. Vos & C. Veeger (1987) Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents, *Biotechnol. Bioeng.* **30:** 81-7.

Lang, A., C. Hatscher & P. Kuhl (2007) Papain-catalysed synthesis of Z-l-aminoacyl-antipyrine amides from Z-protected amino acid esters and 4-aminoantipyrine. *Tetrahedron Lett.* **48**: 3371-4.

Lartigue, D.J. (1975) Characteristics of free vs. immobilized enzymes. En: Messing RA (ed) Immobilized enzymes for industrial reac- tors. Academic Press, New York, pp 125–127.

Li, S., X. Yang, S. Yang, M. Zhu & X. Wang (2012) Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2**, e201209017.

Makone, S.S. & Niwadange, S.N. (2016) Green Chemistry Alternatives for Sustainable Development in Organic Synthesis. I*nt. Adv. Res. J. Sci. Eng. Tech.* **3**: 113-5.

Meadows, D., J. Randers & D. Meadows (2005) *Limits to Growth. The 30-Year Update.* Chelsea Green Publishing, London.

MEROPS (2016) Families of Proteolytic Enzymes. http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/family_index?type=P. Acceso online: 30/12/2016.

Meyer, H.P. & O. Werbitzky (2011) How green can the industry become with biotechnology? En: *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development,* Tao, J.; Kazlauskas, R. (Eds) *1st Edition, pp 23-42.*

Miletić, N., A. Nastasović & K. Loos (2012) Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technol.* **115**: 126-35.

Mitin, Y.V., K. Braun & P. Kuhl (1997) Papain catalyzed synthesis of glyceryl esters of N-protected amino acids and peptides for the use in trypsin catalyzed peptide synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **54**: 287-90.

Mnif, I. & D. Ghribi (2015) Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Biopolymers* **104**: 129-47.

Morán, C., M.R. Infante & P. Clapés (2001) Synthesis of glycero amino acid-based surfactants. Part 1. Enzymatic preparation of rac-1-O-(Nα-acetyl-l-aminoacyl)glycerol derivatives. *J. Chem. Soc. P. T. 1*, **2001**: 2063-70.

Morán, M.C., A. Pinazo, L. Pérez, P. Clapés, M. Angelet, M.T. García, *et al.* (2004) "Green" amino acid-based surfactants. *Green Chem*. 6: 233-40.

Morcelle SR (2004). Proteasas de látex de Funastrum clausum (Jacq.) Schlechter (Asclepiadaceae): purificación, caracterización y aplicación en la síntesis de péptidos en medios orgánicos. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Cs. Exactas, Departamento de Cs. Biológicas, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Morcelle, S.R., A.S. Cánepa, J.M. Padró, C.R. Llerena-Suster & P. Clapés (2013) Syntheses of dipeptide alcohols and dipeptide aldehyde precursors catalyzed by plant cysteine peptidases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **89**: 130-6.

Morcelle, S.R., C.S. Liggieri, M.A. Bruno, N. Priolo & P. Clapés (2009) Screening of plant peptidases for the synthesis of arginine-based surfactants. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **57**: 177-82.

Nakaoka, H., Y. Miyajima & K. Morihara (1998) Papain-catalyzed synthesis of aspartame precursor: A comparison with thermolysin. *J. Ferment. Bioeng.* **85**: 43-7.

Narai-Kanayama, A., H. Koshino & K. Aso (2008) Mass spectrometric and kinetic studies on slow progression of papain-catalyzed polymerization of L-glutamic acid diethyl ester. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**: 881-91.

Nielsen, P.M. & H.S. Olsen (2002) Enzymatic modification of food protein. En: Enzymes in food technology (R.J. Whitehurst & B.A. Law, eds.), CRC Press, Boca Raton, pp. 109-43.

Nitschke, M. & Sousa e Silva, S. (2016) Recent Food Applications of Microbial Surfactants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1208635

Pérez, L., M.T. Garcia, I. Ribosa, M.P. Vinardell, A. Manresa & M.R. Infante (2002a) Biological properties of arginine-based gemini cationic surfactants. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**: 1279-85.

Pérez, L., M.R. Infante, R. Pons, C. Morán, P. Vinardell, M. Mitjans, *et al.* (2004) A synthetic alternative to natural lecithins with antimicrobial properties. *Colloid. Surface. B* **35**: 235-42.

Pérez, L., A. Pinazo, R. Pons & M. Infante (2014) Gemini surfactants from natural amino acids. *Adv. Colloid Interface Sci.* **205**: 134-55.

Pérez, L., A. Pinazo, M.T. García, M. Lozano, A. Manresa, M. Angelet *et al.* (2009) Cationic surfactants from lysine: Synthesis, micellization and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **44**: 1884-92.

Pérez, L., A. Pinazo, P. Vinardell, P. Clapés, M. Angelet & M.R. Infante (2002b) Synthesis and biological properties of dicationic arginine–diglycerides. *New J. Chem.* **26**: 1221-7.

Pérez, L., J.L. Torres, A. Manresa, C. Solans &, M.R. Infante (1996) Synthesis, Aggregation, and Biological Properties of a New Class of Gemini Cationic Amphiphilic Compounds from Arginine, bis(Args). *Langmuir* **12**: 5296-301.

Piera, E., F. Comelles, P. Erra & M.R. Infante (1998) New alquil amide type cationic surfactants from arginine. *J. Chem. Soc. Perkin T. 2* **1998**: 335-42.

Piera, E., M.R. Infante & P. Clapés (2000) Chemo-enzymatic synthesis of arginine-based gemini surfactants. *Biotechnol. Bioeng*. **70**: 323-31.

Pinazo, A., M.A. Manresa, A.M. Marques, M. Bustelo, M.J. Espuny & L. Pérez (2016) Amino acid–based surfactants: New antimicrobial agents. *Adv. Colloid Interface Sci.* **228**: 17-39.

Pinazo, A., R. Pons, L. Pérez & M.R. Infante (2011) Amino acids as raw material for biocompatible surfactants. *Ind. Eng. Chem. Res.* **50**: 4805-17.

Quiroga, E., G. Camí, J. Marchese & S. Barberis (2007) Organic solvents effect on the secondary structure of araujiain hI, in different media. *Biochem. Eng. J.* **35**: 198-202.

Roschangar, F., R.A. Sheldon & C.H. Senanayake (2015) Overcoming barriers to green chemistry in the pharmaceutical industry – the Green Aspiration Level^{TM} concept. *Green Chem.* **17**: 752-68.

Schechter, I. & A. Berger (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**: 157-62.

Sekhon Randhawa, K.K. & P.K.S.M. Rahman (2014) Rhamnolipid biosurfactants: past, present, and future scenario of global market. *Front. Microbiol.* **5**: 1-8.

Sheldon, R.A. (2016) "*Biocatalysis and Green Chemistry*". En "Green Biocatalysis" (R.N. Patel, ed.). John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, pp. 1-15.

Singh, A., J.D. Van Hamme & O.P. Ward (2007) Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol. Adv.* **25**: 99-121.

Tavano, L., A. Pinazo, M. Abo-Riya, M.R. Infante, M.A. Manresa, R. Muzzalupo, *et al.* (2014) Cationic vesicles based on biocompatible diacyl glycerol-arginine surfactants: Physicochemical properties, antimicrobial activity, encapsulation efficiency and drug release. *Colloid. Surface. B* **120**: 160-7.

Tufvesson, P., W. Fu, J.S. Jensen & J.M. Woodley (2010) Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. *Food Bioprod. Process.* **88**: 3-11.

Valivety, R., P. Jauregi, I. Gill & E. Vulfson (1997) Chemo-enzymatic synthesis of amino acid-based surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**: 879-86.

Yagi, N., Y. Ogawa, M. Kodaka, T. Okada, T. Tomohiro, T. Konakahara, *et al.* (2000) Preparation of functional liposomes with peptide ligands and their binding to cell membranes. *Lipids* **35**: 673-80.

Yang, T., M. Fruekilde & X. Xu (2003) Applications of immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **80**: 881-7.