

INVESTIGACIÓN DE LA RESOLUCIÓN CINÉTICA ECO-COMPATIBLE DE R/S-KETOPROFENO

María Victoria Toledo¹, Carla José¹, Mariela Theiller¹, Luis A. Gambaro¹, Sebastián E. Collins², Laura Estefanía Briand¹

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas-Dr.- Jorge J. Ronco, CINDECA, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, CONICET, CCT La Plata, Calle 47 N° 527, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

²Instituto de Desarrollo Tecnológico para la industria Química INTEC, Universidad Nacional del Litoral-CONICET, Güemes 3450, 3000, Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

toledovictoria@gmail.com

RESUMEN: Se llevó a cabo la esterificación de R/S-ketoprofeno empleando metanol, etanol, 1- y 2-propanol como reactivos y solventes catalizada con el biocatalizador comercial Novozym® 435. Se estudió la interacción de los alcoholes con el biocatalizador mediante diversas técnicas espectroscópicas. Los resultados evidenciaron la disolución del soporte polimérico, la pérdida de proteína activa, la fuerte adsorción de los alcoholes, la modificación de la estructura secundaria de la proteína y el alisado de la estructura interna de las esferas de biocatalizador.

PALABRAS CLAVE: R/S-ketoprofeno, lipasa, Novozym® 435.

El R/S-ketoprofeno (ácido 2-(3-benzoilfenil) propiónico) pertenece a la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Su actividad farmacológica reside principalmente en el enantiómero S(+), mientras que el enantiómero R(-) es biológicamente inactivo y puede presentar propiedades perjudiciales [1]. Hoy día el biocatalizador comercial Novozym® 435 es ampliamente utilizado en la esterificación enantioselectiva de ácidos carboxílicos racémicos. Este catalizador está compuesto por esferas de polimetilmetacrilato (PMMA) sobre las que se encuentra inmovilizada físicamente la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB). Esta enzima cataliza la esterificación del enantiómero R(-), dejando el isómero S(+) deseado sin reaccionar [2].

En este trabajo se presenta la esterificación de R/S-ketoprofeno catalizada por Novozym® 435 empleando diferentes alcoholes (metanol, etanol, 1- y 2-propanol) como reactivo y solvente. Además, se estudia el efecto que estos alcoholes tienen sobre el rendimiento catalítico de la lipasa CALB en la esterificación de profenos.

La reacción de R/S-ketoprofeno (1.966 mmoles) con exceso de metanol, etanol, 1- y 2-propanol se llevó a cabo bajo las condiciones óptimas determinadas previamente [3]. Esto se realizó en frascos sellados que se mantuvieron a temperatura constante (45 °C) y agitación (200 rpm) en un baño de agua durante 72 h.

La cinética de la esterificación se investigó usando Novozym® 435 (160 mg) sin tratamiento previo y en un segundo conjunto de experimentos, el biocatalizador fue previamente tratado con los alcoholes (contacto de 1.0000 g de biocatalizador con 10.00 mL de una mezcla del alcohol correspondiente con 4.76% (v/v) de agua durante 8 días a 45 °C y 200 rpm) antes de la esterificación de R/S-ketoprofeno.

El análisis quiral de ambos enantiómeros de R/S-ketoprofeno se realizó por análisis de HPLC quiral. La conversión de R/S-ketoprofeno se determinó a través de la titulación de la mezcla de reacción final con una solución de KOH en etanol.

Luego del tratamiento, Las esferas de biocatalizador se secaron en un desecador por 8 días y fueron calentadas a la temperatura necesaria para

desorber el alcohol (determinada mediante desorción térmica programada) por 10 minutos, enfriadas y pesadas. Este procedimiento permitió establecer la masa total del biocatalizador y la cantidad de alcohol adsorbida. Por otro lado el medio líquido que estuvo en contacto con el biocatalizador se dejó secar y el sólido remanente se disolvió con 2.00 ml de agua, se centrifugó para separar las sustancias no solubles y recuperar la enzima para su cuantificación con ácido bicinconfínico. Adicionalmente, se estudió la textura interna del biocatalizador antes y después del tratamiento por microscopía electrónica de barrido medioambiental (ESEM) y se determinó la estructura secundaria de CALB en Novozym® 435 sin tratamiento previo y luego de la exposición a los alcoholes mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia difusa (DRIFT). Para ello se realizó el intercambio isotópico con D₂O de las muestras, y se analizó la banda Amida I obteniéndose la contribución de cada estructura mediante la deconvolución, integración y normalización de las señales correspondientes involucradas.

La esterificación de R/S-ketoprofeno mostró ser un proceso factible empleando etanol y 1-propanol (con 4.76 % de agua) como reactivos y solventes de la reacción. En cambio, empleando metanol y 2-propanol la conversión y exceso enantiomérico hacia S(+)-ketoprofeno obtenidos fueron muy bajos (ver Figura 1). Como se puede apreciar en la figura, la actividad del biocatalizador no se vio afectada por el tratamiento con los alcoholes.

Tanto la conversión como el exceso enantiomérico alcanzan valores aproximados a un 50 % hacia los esteres metilo y propílico a las 48 h de reacción, ya sea empleando el biocatalizador previamente tratado o no. Adicionalmente en la figura 1 se presentan las actividades específicas obtenidas para el biocatalizador con y sin contacto previo con el medio alcohol: agua. La comparación de las actividades específicas evidencia que la esterificación con 2-propanol no es factible. Este comportamiento podría ser atribuible al impedimento estérico del alcohol secundario y no al efecto que podría causar el alcohol sobre la integridad física del

biocatalizador. Sin embargo, la actividad específica para metanol empleando Novozym® 435 sin tratamiento previo es similar a la obtenida con etanol y 1-propanol pero disminuye cuando el biocatalizador estuvo en contacto con el alcohol. Esto podría estar relacionado con un efecto perjudicial del metanol sobre la integridad física del biocatalizador, y la modificación en la estructura secundaria que este alcohol provoca en la lipasa como se describirá luego.

además que esta adsorción y degradación del soporte polimérico no solo ocurre en la superficie sino también en el interior de las esferas. La investigación del corte transversal de las esferas de Novozym® 435 mediante microscopía electrónica de barrido y los parámetros que describen la rugosidad y textura interior indican que los alcoholes difunden dentro de las esferas y ejercen un efecto de alisado sobre la matriz polimérica.

Adicionalmente, el estudio de la estructura secundaria se presenta en la Tabla 2. El biocatalizador expuesto a las distintas mezclas alcohol-agua por 8 días presenta una estructura secundaria modificada con respecto al inicial. En general, la contribución de giros β aumenta y el porcentaje de láminas β y estructuras al azar disminuye manteniéndose la hélice α prácticamente inalterada. Los agregados de proteína (6.0 %), el aumento en la lámina β y la modificación de la hélice α sólo se observan en la exposición a metanol, lo cual podría estar relacionado con la inactivación de la enzima.

Tabla 2. Estructura secundaria de CALB en Novozym® 435 inicial y luego del tratamiento con los alcoholes.

Novozym® 435	Contribución porcentual				
	Agregados	Hélice α	Lámina β	Random	Giros β
Inicial	0.2	26.4	19.4	25.3	28.7
Metanol	6.0	16.6	22.3	16.3	38.8
etanol	0.2	23.6	5.7	7.5	63.0
1-propanol	0.4	23.8	13.2	9.3	53.3
2-propanol	0.0	25.3	18.6	3.6	52.5

Los resultados presentados en esta investigación permiten concluir que la resolución cinética enzimática de ketoprofeno racémico a través de la esterificación directa con etanol y 1-propanol (con agregado de 4,76 % (v/v) de H₂O) como sustratos y solventes es viable sin la adición de co-solventes orgánicos. Por otro lado, el estudio del efecto que el metanol, etanol, 1- y 2-propanol presentan sobre Novozym® 435 luego de un contacto prolongado evidenció una fuerte interacción de los alcoholes con el biocatalizador. Estos difunden dentro de las esferas de biocatalizador causando la pérdida de soporte y proteína, siendo los alcoholes de menor peso molecular los más perjudiciales. Adicionalmente, modifican la estructura secundaria de la CALB con una tendencia similar, a excepción del metanol que provoca el aumento de agregados, lámina β y logra la modificación de la hélice α , lo cual podría estar relacionado con la baja actividad de la enzima.

REFERENCIAS

[1] A.L Ong, A.H. Kamaruddin, S. Bathia, W.S. Long, S.T. Lim, R. Kumari, "Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (R)-ketoprofen", *Enzym. Microb. Technol.* 39, **2006**, 924-929.

[2] C. José, R.D. Bonetto, L.A. Gambaro, M.P. Guauque Torres, M.L. Foresti, M.L. Ferreira, L.E. Briand, "Investigation of the causes of deactivation-degradation of the commercial biocatalyst Novozym® 435 in ethanol and ethanol-aqueous media", *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 71, **2011**, 95-107.

[3] M.L. Foresti, G. Galle, M.L. Ferreira, L.E. Briand "Enantioselective esterification of ibuprofen with ethanol as reactant and solvent catalyzed by immobilized lipase: experimental and molecular modeling aspects", *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, **2009**, 1461-1473.

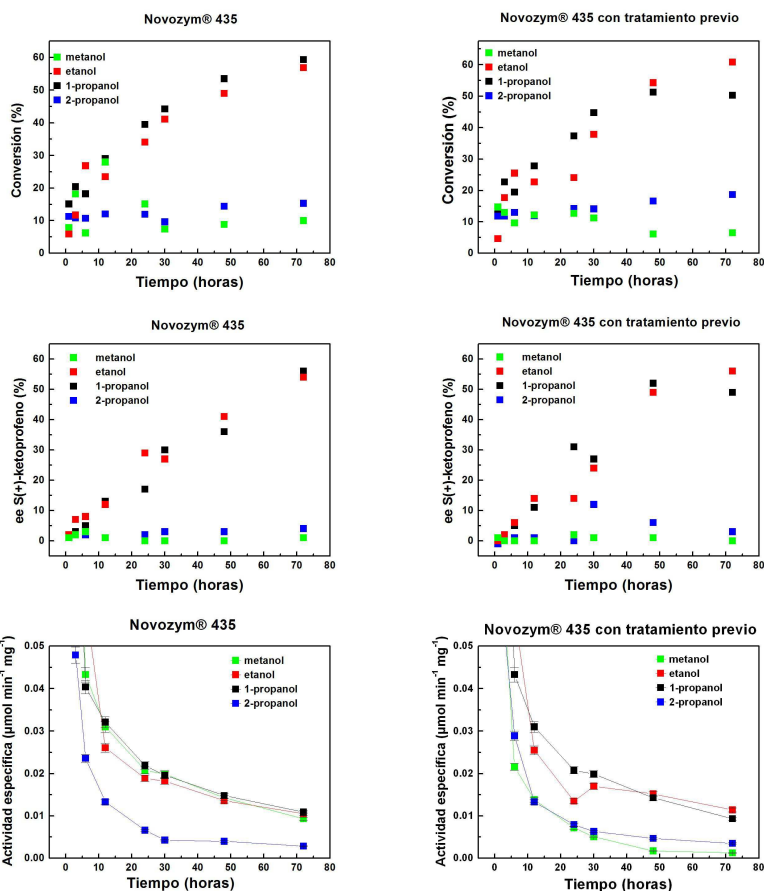


Figura 1. Conversión, exceso enantiomérico hacia S(+)-ketoprofeno y actividad específica de la esterificación de R/S-ketoprofeno con los distintos alcoholes catalizada por Novozym® 435 con y sin tratamiento previo.

Luego del tratamiento del biocatalizador con los alcoholes, se cuantificó la pérdida de masa y proteína, y se estudió la interacción de los alcoholes mediante la determinación de la temperatura de desorción de cada uno y la masa de alcohol adsorbida en el biocatalizador (Tabla 1).

Tabla 1. Pérdida de masa y proteína, temperatura de desorción de los alcoholes y masa de alcohol adsorbido por el contacto de los alcoholes con Novozym® 435.

Alcohol	Pérdida de masa	Pérdida de proteína ^a	Td (°C) ^b	g alcohol ads./g biocatalizador
Metanol	11.6 %	1.93 %	154	0.0212
etanol	16.6 %	1.27 %	184	0.3881
1-propanol	5.9 %	0.57 %	200	0.0404
2-propanol	1.2 %	0.79 %	187	0.0368

^a relación entre la cantidad de proteína perdida (mg) debido al tratamiento con el alcohol y la cantidad total de proteína (mg) en Novozym® 435.

^b temperatura de desorción de los alcoholes obtenida del análisis de desorción térmica programada (TPD).

Como muestra la Tabla 1, cuanto más corta es la cadena del alcohol, mayor es la pérdida de masa y proteína. En cuanto a los estudios de TPD, las altas temperaturas de desorción encontradas para todos los alcoholes evidencian una fuerte interacción biocatalizador-alcohol. Se demostró