

PREPARACIÓN DE UN BIOCATALIZADOR BASADO EN CALB INMOVILIZADA SOBRE TiO₂

Celina Jordi¹, Carlos R. Llerena Suster^{1,2}

¹ Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIPROVE), Fac. Cs. Exactas, UNLP, Calle 47 y 115, B1900AJK, La Plata, Argentina

² Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas –Dr Jorge J. Ronco CINDECA-CCT. Calle 47 No 257, B1900AJK, La Plata, Argentina
carlollzz@yahoo.com

RESUMEN: En la presente investigación se realizó el diseño racional de un nuevo biocatalizador y se lo aplicó en la esterificación enantioselectiva de R/S-ibuprofeno. La preparación del mismo involucra la inmovilización de la lipasa B de *Candida antarctica*, tanto en elevada pureza como proveniente de un extracto crudo comercial, sobre nanopartículas de dióxido de titanio anatasa en su límite máximo de dispersión. Los biocatalizadores preparados junto a un biocatalizador comercial se aplicaron en distintos ensayos de esterificación de R/S-ibuprofeno con etanol. Los mejores resultados se observaron en los ensayos desarrollados con los biocatalizadores preparados mediante la inmovilización del extracto crudo de la lipasa, en medios de reacción conteniendo isooctano.

PALABRAS CLAVE: Lipasa B de *Candida antarctica*, dióxido de titanio, esterificación de ibuprofeno.

La lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) es una enzima muy utilizada en la industria y en investigación con diversas aplicaciones. Generalmente, se utiliza CALB inmovilizada sobre distintos soportes. En este sentido, uno de los biocatalizadores comerciales más usados basados en esta lipasa es Novozym® 435 (Novo Nordisk) donde la CALB está soportada sobre una resina de polimetilmetacrilato. Sin embargo, estudios recientes demostraron que la resina soporte del biocatalizador Novozym® 435 se disuelve en medios orgánicos, conduciendo a la pérdida de enzima, la desactivación del biocatalizador y la contaminación del producto [1,2]. Por otra parte, se ha comprobado que es posible inmovilizar CALB sobre TiO₂ sin afectar su conformación [3]. En el presente trabajo, se prepararon y optimizaron biocatalizadores basados en CALB inmovilizada sobre TiO₂ y se usaron en la esterificación enantioselectiva de (R,S)-ibuprofeno con etanol [4].

Inmovilización de CALB sobre TiO₂: Soluciones de CALB purificada y del extracto crudo comercial (EC) de la misma (Lipozyme L®) en agua destilada se mezclaron, en frascos de vidrio, con 100,0 mg de dióxido de titanio. Las soluciones enzimáticas contenían entre 0,5 mg/mL y 1,5 mg/mL de proteínas. El dióxido de titanio fue previamente calcinado a 500 °C por 12 hs y su superficie específica fue de 43,1 m²/g, encontrándose en nanopartículas de 20 nm en promedio (P-25, Evonik Industries). Esta mezcla se incubó a 30 °C durante 1 hora con agitador magnético. Transcurrido el tiempo de incubación, las mezclas se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 minutos. Los sólidos fueron resuspendidos en agua destilada y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Todos los sobrenadantes se reservaron para analizar. Los sólidos fueron secados mediante liofilización durante 48 hs. Los biocatalizadores preparados con CALB pura se denominaron CT mientras que los preparados con EC se denominaron CT*.

Cálculo de las proteínas adsorbidas y saturación del soporte: Para conocer la cantidad de proteínas adsorbidas sobre el óxido se determinó la concentración proteica de las muestras iniciales y los sobrenadantes finales mediante el método de Bradford. Se realizó, asimismo, una curva de calibración con CALB pura Sigma.

Uso de los biocatalizadores en la esterificación de ibuprofeno: Se realizaron distintos ensayos para poner a punto una técnica para esterificar ibuprofeno con etanol usando los biocatalizadores preparados y el biocatalizador comercial Novozym® 435 (Novo). Se utilizaron dos mezclas de reacción: sin cosolvente y con isooctano como cosolvente. En el primer caso se mezclaron 20,0 mg de biocatalizador con 1,4 ml de solución de ibuprofeno 2,4 M en etanol, mientras que en el segundo se mezcló la misma masa del biocatalizador con 10 ml de una solución de ibuprofeno 0,12 M y etanol 0,12 M en isooctano. Las reacciones se llevaron a cabo en frascos color caramelo a 45 °C, agitación orbital (200 rpm) durante 48 horas. Las mezclas de reacción y los blancos respectivos se titularon contra KOH/EtOH usando fenolftaleína como indicador del punto final. Para analizar la enantioselectividad de las reacciones, se analizaron las muestras por HPLC usando una columna quiral de acuerdo a la publicado anteriormente [4]. A partir de estos análisis se realizaron los cálculos de conversión de ibuprofeno *C*% y exceso enantiomérico *eeS*% hacia el isómero S(+)-ibuprofeno de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\%C = \frac{(V_b - V_m) \times 100}{V_b} \quad eeS\% = \frac{(S_s - S_R \times f) \times 100}{S_s + S_R \times f}$$

Donde V_b = Volumen del blanco, V_m = Volumen de la muestra, *eeS*%: exceso enantiomérico de sustrato, S_s : Sustrato S remanente; S_R : Sustrato R remanente; f : factor de corrección.

Proteínas adsorbidas y saturación del soporte: En la figura 1 se muestran los resultados de proteínas adsorbidas en función de las concentraciones iniciales en distintos ensayos utilizando soluciones de CALB purificada y de EC.

En los ensayos con menores concentraciones iniciales se observa una adsorción casi completa de las proteínas mientras que a mayores valores crece el contenido de proteínas remanentes en los sobrenadantes. Esto está evidenciando un nivel de saturación del soporte. De acuerdo a estos datos 100 mg de soporte permite la adsorción de una cantidad entre 10 y

12 mg de proteínas en las condiciones detalladas. Se obtuvieron valores de proteínas adsorbidas muy similares cuando se utilizaron soluciones enzimáticas iniciales de CALB pura o de EC.

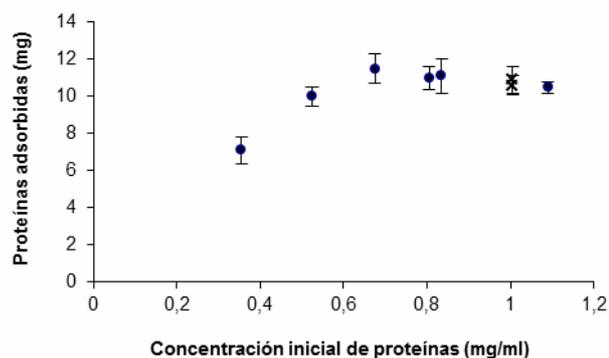


Figura 1. Isoterma de adsorción de CALB sobre TiO₂

Esterificación enantioselectiva de ibuprofeno: En la tabla 1 se muestran los valores de conversión de ibuprofeno y exceso enantiomérico alcanzados a las 48 hs, con y sin isooctano en la mezcla de reacción, usando los biocatalizadores preparados y el biocatalizador comercial Novozym® 435.

Tabla 1. Actividad biocatalítica

Biocatalizador	Cosolvente	C%	ees%
CT	-	0	-
CT*	-	4,5	4,5
Novo	-	14,5	14,3
CT	Isooctano	3,6	-
CT*	Isooctano	67,0	57,0
Novo	Isooctano	69,0	50,0

Se observa que el medio conteniendo isooctano fue el más apropiado para los biocatalizadores. El biocatalizador de CALB pura no tuvo actividad sin cosolvente, en tanto que presentó mínima actividad en el medio con cosolvente. Para el biocatalizador preparado con extracto crudo la actividad aumentó unas 15 veces, en tanto que para Novozym® 435 la actividad se incrementó alrededor de 5 veces. Por otro lado, resultó notoria la diferencia entre los biocatalizadores preparados con la lipasa purificada y los preparados con el extracto crudo, con los que la

conversión fue casi 20 veces superior. Estos biocatalizadores, a su vez, mostraron niveles de conversión semejantes a los alcanzados por el comercial, aunque con mejores valores de exceso enantiomérico.

Se desarrolló y estudió una metodología para obtener, de manera muy sencilla y rápida, biocatalizadores económicos y útiles para ensayos de esterificación enantioselectiva del ibuprofeno. En este sentido se determinó que el límite máximo de dispersión de la lipasa B de *Candida antarctica* sobre nanopartículas de dióxido de titanio es de $10,8 \pm 0,5$ mg de proteínas adsorbidas cada 100 mg de TiO₂ de $43,1 \text{ m}^2/\text{g}$. Se determinó que se obtienen mejores resultados de conversión de ibuprofeno con el uso de EC en lugar de la enzima pura. Por otra parte, la presencia de isooctano como cosolvente permitió porcentajes de conversión mucho más elevados que en los ensayos donde sólo se usó la mezcla etanol – ibuprofeno. Estos ensayos preliminares muestran que el biocatalizador preparado resulta ser una buena alternativa frente al biocatalizador comercial.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias a la financiación de CONICET (PIP 0150 y PIP 112 201301 00171), CLS es miembro de la Carrera del Investigador de CONICET.

REFERENCIAS

- [1] 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 comercial biocatalyst Novozym® 435 in ethanol and ethanol-aqueous media", *J. Mol. Catal. B: Enz.* 71, **2011**, 95-107.
- [2] C. José, L.E. Briand. "Deactivation of Novozym® 435 during the esterification of ibuprofen with ethanol: evidences of the detrimental effect of the ethanol", *React. Kinet. Mech. Catal.* 99, **2010**, 17-22.
- [3] M.L. Foresti, G. M. Valle, R. Bonetto, M.L. Ferreira, L.E. Briand. "FTIR, SEM and fractal dimension characterization of lipase B from *Candida antarctica* immobilized onto titania at selected conditions", *Appl. Surf. Sc.* 256, **2010**, 1624-1635
- [4] M.L. Foresti, M. 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. Tech. Biotechnol.* 84, **2009**, 1461-1473.