



## Optimización de biocatalizadores basados en CALB soportada sobre TiO<sub>2</sub>

Antonela Fittipaldi<sup>1</sup>, Susana Morcelle del Valle<sup>1</sup>, Laura E. Briand<sup>2</sup>, Carlos R. Llerena Suster<sup>\*1,2</sup>

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

2. Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas –Dr Jorge J. Ronco CINDECA-CCT La Plata-CONICET. Calle 47 No 257, B1900AJK, La Plata, Buenos Aires, Argentina

E-mail: carlollzz@yahoo.com

**Palabras Claves:** *Candida antartica*, Resolución cinética, Fármacos, Profenos, Dióxido de Titanio.

---

### Resumen

La presente investigación tiene como objetivo el diseño racional de un biocatalizador y su aplicación en la esterificación enantioselectiva de R/S-ibuprofeno. En este contexto, la síntesis involucra la inmovilización de la lipasa B de *Candida antarctica* de un extracto crudo comercial sobre nanopartículas de dióxido de titanio anatasa en su límite máximo de dispersión y el agregado controlado de agentes promotores de la actividad catalítica.

Así mismo, se han optimizado las condiciones para que la actividad del material biocatalítico resulte óptima en la esterificación de R/S-ibuprofeno con etanol y que la misma preferentemente se oriente hacia el isómero R(-)-ibuprofeno.

---

### Abstract

The aim of the present investigation is the rational design of a new biocatalyst active in the kinetic resolution of racemic ibuprofen through the esterification of the profen. In this context, the synthesis of the material involves the immobilization of the lipase B of *Candida antarctica* from a commercial crude extract over titanium dioxide (anatase) nanoparticles. The maximum dispersion limit of the protein on the oxide support was determined through the adsorption isotherm at room temperature.

Additionally, certain substances were carefully added to the synthesis media in order to promote the activity of the biocatalyst in the enantiomeric esterification of the R(-)-ibuprofen.

---

## Introducción

El ibuprofeno posee un carbono secundario asimétrico que da origen a los enantiómeros R(-)-ibuprofeno y S(+)-ibuprofeno. De hecho, la actividad farmacológica de los derivados del ácido 2-arilpropanoico está directamente relacionada con la quiralidad del compuesto. En el caso específico del ibuprofeno, se sabe que el enantiómero S(+) es 160 veces más activo que el R(-) y actúa dentro de los 12 minutos de ingestión versus 30 minutos de la mezcla racémica [1, 2]. Una de las metodologías utilizadas para incrementar la fracción del enantiómero S(+) en el ibuprofeno es la resolución enantiomérica del compuesto por vía enzimática. Debido a la alta selectividad de las lipasas, esta familia de enzimas es capaz de distinguir en forma eficiente entre los dos enantiómeros de la droga y esterificar uno de ellos [3]. Típicamente se utiliza el biocatalizador comercial conocido como Novozym® 435 producido por la empresa Novozymes [4, 5].

Previamente, nuestro grupo de investigación ha sintetizado nuevos materiales bio-catalíticos a través de la adsorción simple de la lipasa B de *Candida antarctica* (típicamente llamada CALB) y fitoproteasas sobre dióxido de titanio [6, 7]. El análisis de las estructuras secundarias (por FTIR) y terciaria (por SEM) permitieron establecer que la inmovilización sobre el soporte oxidico no altera la conformación proteica.

En este contexto, la presente investigación describe la síntesis de la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada sobre nanopartículas de dióxido de titanio con el agregado controlado de promotores de actividad biocatalítica. En esta oportunidad y continuando con los estudios descriptos en el párrafo anterior, los biocatalizadores CALB/TiO<sub>2</sub> se utilizaron para esterificar preferencialmente el isómero R(-)-ibuprofeno de la mezcla de enantiómeros del R/S-ibuprofeno.

## Experimental

### *Inmovilización de CALB sobre TiO<sub>2</sub>*

Se centrifugó un extracto crudo de CALB (Novozym CALB L) a 9600×g durante 20 min. A partir del sobrenadante de la centrifugación se prepararon soluciones en distintas proporciones en agua destilada. Las concentraciones de las soluciones enzimáticas estaban entre 0,5 mg/mL y 1,5 mg/mL. Se mezclaron 20 ml de esas soluciones con 100 mg de TiO<sub>2</sub> en nanopartículas de 20 nm en promedio (P-25, Evonik Industries) en frascos de vidrio. El dióxido de titanio fue previamente calcinado a 500 °C por 12 hs y su superficie específica es de 43,1 m<sup>2</sup>/g. Las mezclas se incubaron a 30°C durante 1 hora con agitador magnético.

Transcurrido el tiempo de incubación, las mezclas se centrifugaron a 9600×g 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 de la última centrifugación fueron secados mediante liofilización durante 48 h.

### *Cálculo de las proteínas adsorbidas y saturación del soporte*

Para calcular la cantidad de proteínas adsorbidas sobre el óxido se midió el contenido proteico de las muestras iniciales y los sobrenadantes finales mediante el método de Bradford [8], usando una curva de calibración realizada con CALB pura Sigma como patrón.

### *Uso de los biocatalizadores en la esterificación de ibuprofeno*

Los ensayos se realizaron con 20 mg de biocatalizador y 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 que se mantuvieron a 45 °C y agitación orbital a 200 rpm durante 24 hs.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción se retiraron muestras de 50 µl de cada ensayo y se analizaron por cromatografía líquida de alta performance HPLC del tipo quiral. El resto de la mezcla de reacción y los blancos (igual composición de reactivos y co-solvente sin biocatalizador) se titularon contra KOH/EtOH usando fenolftaleína como indicador del punto final. El análisis de enantioselectividad fue realizado usando una columna quiral Nucleodex beta-PM (Macherey-Nagel,

Germany); la fase móvil fue la mezcla de metanol:buffer TEAA 0,1% pH 4,0 (60:40) y el flujo fue de 0,7 mL/min. A partir de estos análisis se realizaron los cálculos de conversión de ibuprofeno C% y exceso enantiomérico hacia el isómero S(+)-ibuprofeno de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$C\% = \frac{(V_B - V_M) \times 100}{V_B} \quad ees\% = \frac{(S_S - S_R) \times 100}{S_S + S_R}$$

Donde,  $V_B$  es el promedio de los volúmenes gastados en los ensayos blanco,  $V_M$  el gastado en las muestras,  $S_S$ : sustrato S(+)-ibuprofeno remanente;  $S_R$ : sustrato R(-)-ibuprofeno remanente.

#### Medidas de estabilidad de los biocatalizadores en el medio de reacción

Se realizaron ensayos para determinar si existió algún grado de desorción enzimática en el medio usado para determinar la capacidad de esterificación de ibuprofeno.

En cada ensayo se dejó incubando 20 mg de CT en 10 ml de 0,12 M etanol en isoocetano, es decir, la mezcla de reacción sin ibuprofeno, durante 24 h a 45°C y agitación orbital de 200 rpm. Concluida la incubación las muestras se centrifugaron y se separaron los sobrenadantes de los sólidos.

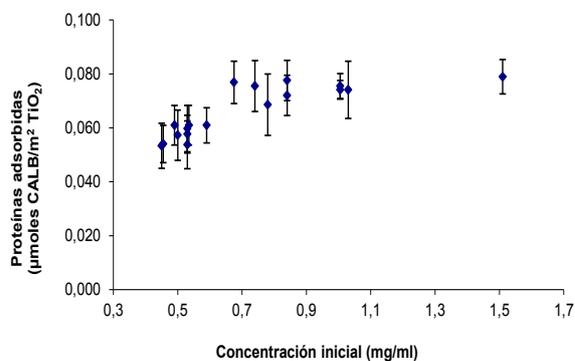
Sobre los sólidos se agregó mezcla de reacción correspondiente y se realizaron las medidas de actividad durante 24 h. A los sobrenadantes se les agregaron las masas de ibuprofeno adecuadas para completar las mezclas de reacción y se realizaron las medidas de actividad durante 24 h. En paralelo se realizaron medidas de actividad con biocatalizadores “frescos”, es decir, sin incubación. En todos los casos se siguió el procedimiento descrito previamente. Cada ensayo se realizó por triplicado.

## Resultados y discusión

#### Inmovilización de CALB y saturación del soporte

La **figura 1** muestra la variación en la cantidad de proteína adsorbida, expresada como micromoles de CALB por m<sup>2</sup> de soporte, en función de la concentración inicial de las soluciones de inmovilización. Cada punto del gráfico representa un biocatalizador diferente.

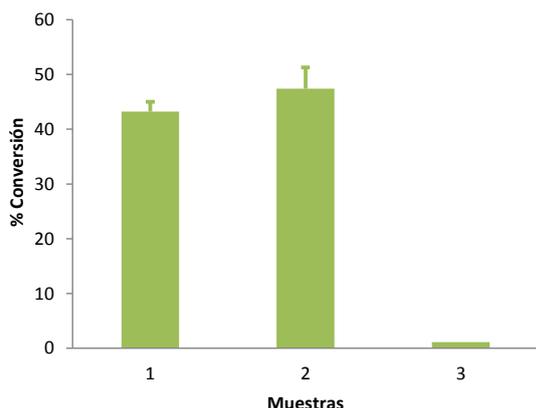
Se observa que la cantidad de proteínas adsorbidas aumentó desde 0,053 a 0,077 μmoles de CALB/m<sup>2</sup> cuando la concentración inicial ( $C_0$ ) pasó de 0,46 a 0,64 mg/ml. A valores superiores a 0,64 mg/ml no hubo un aumento apreciable de la cantidad adsorbida. Esta observación demuestra que la saturación del soporte ocurre cuando la cantidad de proteínas adsorbidas es de 0,0750,003 μmoles/m<sup>2</sup>, equivalente a aproximadamente 10,8 ± 0,5 mg de CALB cada 100 mg de SiO<sub>2</sub>.



**Figura 1.** Cantidad de proteínas adsorbidas en función de la concentración inicial de proteínas en la mezcla de inmovilización

#### Estudio de la estabilidad de los biocatalizadores

En la **figura 2** se muestran los resultados de conversión de ibuprofeno racémico obtenidos con el biocatalizador con y sin incubación previa por 24 h en el medio de reacción y el obtenido con el sobrenadante del biocatalizador pre-tratado. Se observaron porcentajes de conversión muy similares entre los biocatalizadores con y sin incubación. Por otro lado, los sobrenadantes de la incubación no esterificaron el ibuprofeno.



**Figura 2.** Porcentajes de conversión del biocatalizador sin preincubación (1), del preincubado durante 24 h en la mezcla de reacción (2) y del sobrenadante de la incubación (3).

similares, cercanos al valor de saturación del soporte (10,8 mg cada 100 mg de  $\text{TiO}_2$ ). La importante diferencia entre los valores de conversión del ibuprofeno en cambio parecería relacionarse con las concentraciones iniciales del extracto crudo utilizadas en la preparación de cada biocatalizador.

Esta observación se podría explicar considerando que existe otros componentes que se adsorben al mismo tiempo que las proteínas y que podrían actuar como protectores de la actividad enzimática. Este efecto se incrementa al aumentar su cantidad en la solución inicial y por lo tanto en los biocatalizadores preparados.

Dos de los componentes mayoritarios en el extracto crudo son sorbitol y glicerol se encuentran en concentraciones cercanas al 25% (p/v). Para probar la hipótesis planteada se prepararon nuevos biocatalizadores agregando a la mezcla de inmovilización volúmenes variables de una solución conteniendo dichos compuestos en la concentración antes mencionada.

A cada uno de los biocatalizadores se les midió la actividad siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. En la **figura 3** se muestran los resultados de conversión porcentual y exceso enantiomérico hacia el S(+)-ibuprofeno en función de la concentración de sorbitol/glicerol presente en cada solución de inmovilización.

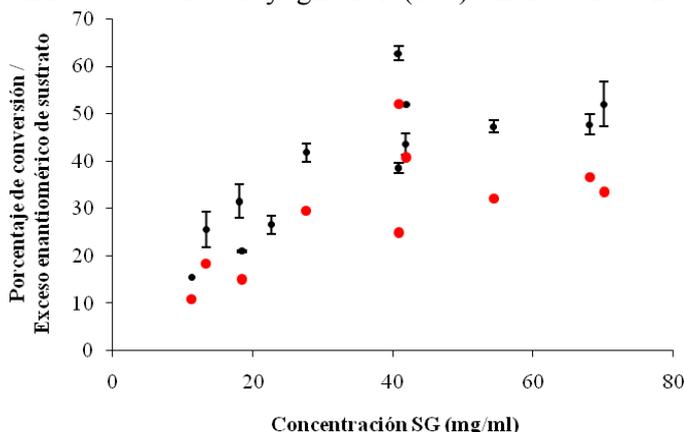
Se observa que cuando aumenta la cantidad de sorbitol y glicerol (S/G) en la solución de inmovilización aumenta la actividad del biocatalizador. Este aumento se mantiene hasta un valor de alrededor del 40 mg/ml de la solución.

A partir de los datos obtenidos se determinó que una concentración de 0,65 mg/ml de proteínas y de 40 mg/ml de S/G resultan ser los valores óptimos para la preparación de los biocatalizadores. Valores superiores de ambos componentes no producen mejoras evidentes en los niveles de actividad. Dichos valores se obtienen mezclando 1,14 ml de extracto crudo con 3,43 ml de la solución S/G y llevando a 20 ml con agua destilada.

Se podría concluir que no se estaría liberando enzima activa en el medio de reacción desde el soporte dado que no se detectó actividad en el sobrenadante, mientras que el sólido conservó los mismos niveles. Por otra parte, también es remarcable que los niveles de actividad se mantienen elevados aún después de 24 h en las condiciones exposición a solventes orgánicos, agitación intensa y alta temperatura.

### *Esterificación de ibuprofeno*

Los porcentajes de conversión (%C) alcanzados a las 24 h de reacción presentaron valores del 15% (eeS = 6,5%) al 63% (eeS = 56%) según el biocatalizador aún cuando los valores calculados de proteínas adsorbidas se mantuvieron muy



**Figura 3.** %C (●) y ee-S(+) % (●) a las 24 h de reacción en función de la concentración inicial de sorbitol/glicerol en las mezclas de inmovilización

## Conclusiones

Se desarrolló y optimizó 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 antactica* sobre nanopartículas de dióxido de titanio es de  $0,075 \pm 0,003 \mu\text{moles}/\text{m}^2$  que corresponden a  $10,8 \pm 0,5$  mg de proteínas adsorbidas cada 100 mg de  $\text{TiO}_2$  de  $43,1 \text{ m}^2/\text{g}$ .

Se lograron altos niveles de conversión de ibuprofeno (50 - 60%) y de ee-S(+) (45 – 56%) usando como medio de reacción la mezcla de sustratos ibuprofeno – etanol en cantidades equimolares en isooctano. Se comprobó la estabilidad de los biocatalizadores en ese medio dado que no existió desorción ni pérdida de actividad luego de una incubación de 24 h.

Se demostró que el agregado de sorbitol y glicerol durante el proceso de inmovilización funcionan como promotores de la actividad biocatalítica. Se observó que hasta concentraciones de 40 mg/ml el aumento de los promotores se acompaña con un significativo aumento de la actividad mientras que por encima de ese valor se mantiene.

## Agradecimientos

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

## Referencias

- [1] S. S. Adams, P. Bresloff, G. C. Manson, *J. Pharm. Pharmacol.* 28 (1976) 156-157.
- [2] Chiral Drugs. Product Report in C&EN Northeast News Report. S. C. Stinson. October 9, pp. 44-74 (1995).
- [3] F. Cardenas, M. S. De Castro, J. M. Sanchez-Montero, J. V. Sinisterra, M. Valmaseda, S. W. Elson, E. Alvarez, *Enzyme Microb. Tech.* 28 (2011) 145-154.
- [4] M. L. Foresti, M. Galle, M. L. Ferreira, L. E. Briand, *J Chem. Technol. Biotechnol.* 84/10 (2009) 1461.
- [5] C. José, M. V. Toledo, J. Osório Grisales, L. E. Briand, *Curr. Catal.* 3(2) (2014) 131-138.
- [6] M. L. Foresti, G. Valle, R. Bonetto, M. L. Ferreira, L. E. Briand. *Appl. Surf. Science* 256 (2010) 1624-1635.
- [7] C.R.F. Llerena-Suster, M.L. Foresti, L.E. Briand, S.R. Morcelle. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 72 (2009) 16-24.
- [8] M.M. Bradford. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.