

INMOVILIZACIÓN DE LIPASA B DE *Candida antarctica* SOBRE MAGNETITA Y APLICACIÓN EN LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DE R/S-IBUPROFENO

Paula Taboada¹, María Luján Ferreira², Carla José¹

¹ Centro de investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas - Dr. Jorge J. Ronco (CINDECA), Universidad Nacional de La Plata, CONICET, CCT La Plata. Calle 47 N° 257, B1900AJK La Plata, Buenos Aires, Argentina.

² Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI), CONICET, Universidad nacional del Sur, Camino La Carrindanga Km 7, 8000, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

carlajose@quimica.unlp.edu.ar

RESUMEN: La lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) fue inmovilizada en nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) funcionalizadas con quitosano y glutaraldehído. El biocatalizador se aplicó a la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con etanol, sin uso de co-solventes. El rendimiento del nuevo biocatalizador se compara con Novozym® 435. En este sentido, se evidencian similares actividades enzimáticas a pesar de importantes diferencias en la carga enzimática para ambos biocatalizadores. Por otra parte, el soporte magnético presentado posee la ventaja de no ser degradado por alcoholes cortos, recuperarse fácilmente desde medios de reacción por decantación magnética, y bajo costo de fabricación. Así, el nuevo biocatalizador magnético es una interesante alternativa para potenciales aplicaciones industriales.

PALABRAS CLAVE: (R/S)-ibuprofeno, Lipasa B de *Candida antarctica*, resolución cinética enzimática.

El ibuprofeno, ácido (RS)-2-(p-isobutilfenil) propiónico, se caracteriza por su actividad anti-inflamatoria, antipirética y analgésica. El uso farmacológico de este compuesto está muy difundido en nuestro país y en el mundo debido a su efectividad en las dosis recomendadas. La actividad farmacológica de los derivados del ácido 2-arilpropiónico está directamente relacionada con la quiralidad del compuesto. En el caso específico del ibuprofeno, el enantiómero S(+) es 100 veces más activo que el R(-) [1]. Por otro lado, las ingestas recurrentes de la mezcla racémica causan efectos colaterales como hemorragias y úlceras gastrointestinales debido a la acidez combinada de ambos isómeros. Asimismo, según investigaciones de la compañía Merck, el enantiómero S(+) actúa dentro de los 12 minutos de ingestión versus 30 minutos de la mezcla racémica.

En la actualidad más del 50% de los principios activos (PA) utilizados en la elaboración de medicamentos son quirales, y de estos más del 80 % se comercializan como racematos. Sin embargo, la tendencia de la industria farmacéutica se orienta hacia el uso de los enantiómeros puros ya que estos presentan algunas ventajas como reducción de la carga metabólica, renal o hepática, menores interacciones con otras drogas y menor probabilidad de efectos laterales. Por lo dicho, la obtención del isómero farmacológicamente activo es un aspecto de creciente interés en las áreas de desarrollo y manufactura de medicamentos. Nuestro grupo de investigación trabaja desde hace unos años en el desarrollo de un proceso de obtención de S(+)-ibuprofeno, antiinflamatorio no esteroide (AINE) de gran eficacia comprobada, masivo uso mundial y actualmente sin producción nacional del mismo. Usualmente este AINE se presenta como mezcla racémica en los medicamentos comercializados en nuestro país y en muchos países del mundo y pocos laboratorios nacionales importan el PA. En este sentido, se evidenció que la lipasa comercial Novozym®435

(CALB adsorbida sobre polimetilmetacrilato) cataliza selectivamente la esterificación del R(-)-ibuprofeno favoreciendo la concentración del

enantiómero deseado, S(+)-ibuprofeno, no-esterificado [2, 3]. Más aún, se ha demostrado que es posible la esterificación del fármaco con etanol en un medio libre de co-solvente (convencionalmente se utilizan isooctano, heptano y hexano) alcanzándose una conversión de 62 % y un exceso enantiomérico del S(+)-ibuprofeno remanente de 54 %. Estudios más recientes demostraron que el etanol provoca disgregación del biocatalizador comercial [4-5]. A los fines de resolver este problema una de las estrategias abordadas consistió en la inmovilización de CALB sobre un soporte resistente a las condiciones de reacción. En este sentido, la magnetita Fe_3O_4 (MAG) es un material de bajo costo, estable, de fácil separación por aplicación de campo magnético externo y reutilizable. Además, en nano escala posee la ventaja adicional de una gran relación área/volumen, aspecto que mejora su eficiencia como portador de biomoléculas. Por las ventajas mencionadas se inmovilizó covalentemente CALB sobre magnetita (MAG) funcionalizada con glutaraldehído y quitosano. La síntesis y exhaustiva caracterización del nuevo biocatalizador CALB/MAG se desarrolló en una publicación previa de la Dra. Ferreira y colaboradores [6, 7]. En este trabajo se muestra la aplicación de CALB/MAG a la resolución cinética de (R/S)-ibuprofeno por esterificación con etanol, en un medio compuesto únicamente por los reactivos. En forma comparativa se muestran los resultados obtenidos al emplear Novozym®435, biocatalizador comercial de referencia. Las reacciones de esterificación se llevaron a cabo en frascos de vidrio herméticos. En todos los casos 0,5000 g (2,42 mmoles) de (R/S)-ibuprofeno se hicieron reaccionar con 1,00 mL de etanol absoluto (Carlo Erba 99,8 %). El contenido de agua inicial fue 4,76 % v/v. La esterificación se llevó a cabo a 45 °C y agitación constante (200 rpm) en un baño de agua (Julabo SW22, Alemania). Las reacciones se iniciaron con

el agregado del biocatalizador correspondiente en relación 160 mg de catalizador por mL de alcohol. Las esterificaciones se realizaron bajo condiciones halladas como óptimas al emplear etanol como agente nucleofílico y solvente [2, 3]. La conversión y la enantioselectividad fueron evaluadas en función del tiempo de reacción. Se realizaron ensayos blancos tendientes a determinar el grado de avance y la enantioselectividad de la reacción no catalizada.

Una vez transcurrido el tiempo programado de reacción se procedió a la extracción de una alícuota de 50 μ l, la cual se analizó por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) empleando una columna quiral Nucleodex beta-PM (Macherey-Nagel, Alemania), con detector UV a 230 nm, de modo de obtener parámetros de enantioselectividad. La cuantificación de ibuprofeno remanente se realizó por medio de titulación con una solución estandarizada de hidróxido de potasio en etanol, siendo la metodología reconocida por ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) para el dosaje de este principio activo. La actividad específica fue calculada como la conversión del profeno a ésteres etílicos (μ moles) por unidad de masa y tiempo de reacción. Las desviaciones estándar de la actividad específica y el exceso enantiomérico son (+/- 0,01) y (+/- 0,5), respectivamente.

La figura 1 muestra la evolución en el tiempo del avance de reacción (X%) y exceso enantiomérico hacia S(+)-ibuprofeno al emplear Novozym@435 y CALB/MAG como catalizadores en la reacción de interés.

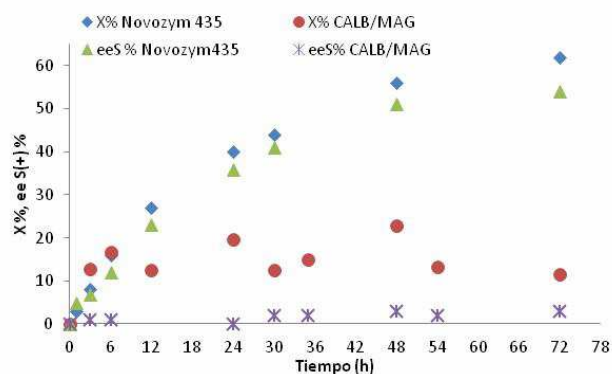


Figura 1. Evolución en el tiempo de la conversión (X%) y el exceso enantiomérico (ee S %) en la esterificación de (R/S)-ibuprofeno con etanol

Se observa que la esterificación enantioselectiva de (R/S)-ibuprofeno con etanol es llevada a cabo satisfactoriamente por Novozym@435. Respecto a CALB/MAG, la conversión alcanza rápidamente, en 6 h, un valor de 17% manteniéndose luego aproximadamente constante hasta las 72 h de reacción. Debe tenerse en cuenta que en las primeras 6 h de reacción el nuevo catalizador resultó más eficiente que el comercial. Claramente la figura 1 evidencia falta de enantioselectividad para CALB/MAG en las condiciones ensayadas. Estos resultados plantean la necesidad de evaluar la reacción bajo control de la actividad acuosa (aw), ya que la reversibilidad de la reacción catalizada por lipasas depende de este parámetro. Si bien se reporta que Novozym@435 es relativamente resistente a variaciones de aw, atribuyéndose esto a las características hidrofóbicas y macroporosas del soporte, los resultados hallados indican que CALB/MAG quizás requiera del control de aw para optimizar la reacción. El control de la aw puede mejorar no sólo la conversión, favoreciendo la esterificación respecto a la hidrólisis, sino también la enantioselectividad, ya que este parámetro se relaciona también con la flexibilidad enzimática [8]. Cabe destacar que la diferencia en carga enzimática de ambos catalizadores también

determinará la diferencia en el máximo valor de X% logrado (Novozym@435 15 %p/p y CALB/MAG 3 %p/p).

La figura 2 evidencia que la actividad específica, expresada por unidad de masa de proteína inmovilizada, es decir la actividad enzimática molecular, es superior en el nuevo biocatalizador respecto al comercial. La figura 2 muestra también la evolución de la actividad por unidad de masa de biocatalizador evidenciando nuevamente la necesidad de evaluar la reacción bajo control de aw.

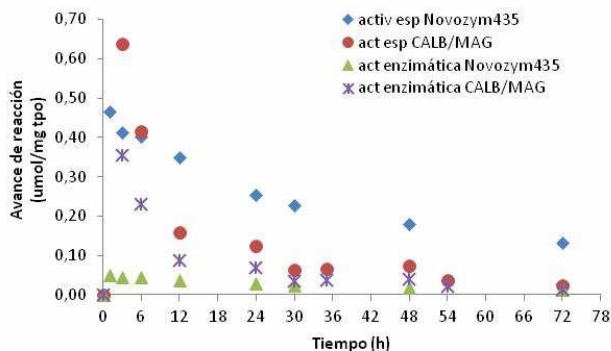


Figura 2. Evolución en el tiempo de la actividad específica (act esp) del biocatalizador (μ mol/mg catalizador hora) y actividad enzimática (μ mol/mg proteína min)

Un nuevo biocatalizador, CALB/MAG, demostró potencial aplicación en la resolución de (R/S)-ibuprofeno por esterificación con etanol (como sustrato y solvente). Se evidenciaron actividades enzimáticas comparables e incluso superiores a Novozym@435.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el soporte financiero del CONICET (PIP 112 201301 00171), la UNLP (proyecto 11 X-626), la UNS y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica ANPCyT.

REFERENCIAS

- [1] P.K. Halen, P.R. Murumkar, R. Giridhar, M.R. Yadav, "Prodrug Designing of NSAIDs", *Mini-Rev. Med.Chem.*, 9, **2009**, 124-139.
- [2] C. José, L.E. Briand, "Parametric and surface science investigation of the enzymatic resolution of ibuprofen with Novozym® 435", 238th American Chemical Society National Meeting, Division of Catalysis Science and Technology, Washington D.C., USA, **2009**, CATL014, 137.
- [3] 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.
- [4] 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 and degradation of the commercial biocatalyst Novozym® 435 in ethanol and ethanol-aqueous media", *J. Mol. Catal. B: Enz.*, 71, **2011**, 95-107.
- [5] C. José, G.B. Austic, R.D. Bonetto, R.M. Burton, L.E. Briand, "Investigation of the stability of Novozym® 435 in the production of biodiesel", *Catal. Today*, 213, **2013**, 73-80.
- [6] P. Nicolás, M. Saleta, H. Troiani, R. Zysler, V. Lasalle, M.L. Ferreira, "Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with biomolecules: Experimental and mechanistic issues", *Acta Biomaterialia*, 9, **2013**, 4754-4762.

[7] P. Nicolás, V. Lasalle, M.L. Ferreira, "Development of a magnetic biocatalyst useful for the synthesis of ethyloleate", *Bioprocess Biosyst Eng.* 37, **2014**, 585-591

[8] P. Trodler, J. Pleiss, "Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents", *BMC Struct. Biol.*, 8:9, **2008**, doi:10.1186/1472-6807-8-9.