



Investigación experimental y teórica de la resolución cinética eco-compatible de R/S-ketoprofeno

María Victoria Toledo^{*1}, Carla José¹, Mariela Theiller¹, Luis A. Gambaro¹, Sebastián E. Collins², María Luján Ferreira³, Laura E. Briand¹

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas-Dr. Jorge J. Ronco, CINDECA, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, CONICET, CCT La Plata, Calle 47 N° 257, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina. *toledovictoria@gmail.com.

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

³Planta Piloto de Ingeniería Química PLAPIQUI, Universidad Nacional del Sur, CONICET, Camino La Carrindanga, Km 7, CC 717, 8000, Bahía Blanca, Argentina

Palabras Claves: R/S-ketoprofeno, lipasa, Novozym® 435

Resumen

Se llevó a cabo la esterificación de R/S-ketoprofeno empleando metanol, etanol y 1-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. Sin embargo, ninguno de estos inconvenientes influye en la actividad del biocatalizador. Finalmente, los cálculos teóricos demostraron que el metanol ejerce impedimento estérico y electrónico en la etapa de coordinación del R/S-ketoprofeno con la tríada catalítica.

Abstract

Methanol, ethanol and 1-propanol were used as reactants and solvents in the esterification of R/S-ketoprofen catalyzed with Novozym® 435. The interaction of the alcohols with Novozym® 435 was studied at a molecular level through various spectroscopic techniques. The results evidenced the dissolution of the polymeric support, loss of active protein, strong adsorption of the alcohols, modification of the secondary structure of the protein and smoothing of the inner structure of the biocatalyst's beads. Nevertheless, none of those drawbacks influences the biocatalyst activity. Theoretical calculations demonstrated that methanol introduces steric and electronic hindrance from the step of the coordination of the R/S-ketoprofen with the catalytic triad.

Introducción

El R/S-ketoprofeno (ácido 2-(3-benzoilfenil) propiónico) pertenece a la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) [1]. Su actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria reside principalmente en el enantiómero (S), mientras que el isómero (R) es biológicamente inactivo y puede presentar propiedades farmacológicas perjudiciales [1]. Por esto, en los últimos años se ha investigado la forma de obtener (S)-ketoprofeno ópticamente puro. Las enzimas lipasas son

ampliamente usadas para la resolución de compuestos quirales. Comúnmente, la más usada es la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB), la cual cataliza la esterificación del enantiómero R, dejando el isómero S deseado sin reaccionar [2]. En este trabajo se emplea el biocatalizador comercial Novozym® 435, compuesto por la enzima CALB inmovilizada en una resina macroporosa de polimetilmetacrilato llamada Lewatit VP OC 1600 [3]. En la literatura, se ha reportado la producción de (S)-ketoprofeno ópticamente activo catalizada por lipasas en solventes orgánicos. Si bien el uso de solventes permite obtener buenos rendimientos, presentan la desventaja de ser tóxicos y costosos [4].

En este trabajo se presenta la esterificación de R/S-ketoprofeno catalizada por Novozym® 435 empleando diferentes alcoholes (metanol, etanol y 1-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 mediante evidencias experimentales y a nivel molecular por medio de cálculos teóricos.

Experimental

Materiales

El biocatalizador comercial Novozym® 435 fue donado por la empresa Novozymes Brasil (Paraná, Brasil). Se usó R/S-ketoprofeno (Parafarm, 99.80), metanol (Tedia), etanol (Carlo Erba) y 1-propanol (Sigma Aldrich) e hidróxido de potasio 1 mol/l en etanol (Riedel-de Haën).

Esterificación con alcoholes de cadena corta

La reacción de R/S-ketoprofeno (0.5000 g, 1.966 mmoles) con exceso de metanol, etanol y 1-propanol se llevó a cabo bajo las condiciones óptimas previamente determinadas [5]. 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. Las relaciones molares alcohol: R/S-ketoprofeno empleadas fueron: metanol y etanol (9:1) y 1-propanol (13:1). Los volúmenes de alcohol corresponden a la mínima cantidad necesaria para disolver la masa del profeno.

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 (según la metodología que se describirá luego) 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 utilizando una columna Nucleodex beta-PM (Macherey-Nagel) con un detector UV operando a 230 nm. El exceso enantiomérico (ee) referido a la forma (S)-ketoprofeno se calculó de acuerdo a la ecuación (1) donde [S] y [R] son las concentraciones del enantiómero S(+) y R(-), respectivamente.

$$ee = ([S] - [R]/[S] + [R]) * 100 \quad (1)$$

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.

Procedimiento para el tratamiento de Novozym® 435 con los alcoholes

Se investigó el efecto de los alcoholes sobre el biocatalizador poniendo en contacto 1.0000 g del mismo con 10.00 ml de una mezcla de alcohol: 4.76% (v/v) H₂O a 45° C y 200 rpm por 8 días. Una vez transcurrido el contacto, se separó el biocatalizador del líquido para su posterior análisis.

Las esferas de biocatalizador se secaron en un desecador por 8 días y fueron calentadas a la temperatura necesaria para desorber el alcohol por 10 minutos, enfriadas y pesadas. Este procedimiento permitió establecer la masa total del biocatalizador y la cantidad de alcohol adsorbida.

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 bicinónico.

Investigación del efecto de los alcoholes sobre el biocatalizador

El biocatalizador en contacto con los alcoholes y los sólidos recuperados del medio de reacción se analizaron por espectroscopia infrarroja. La interacción del alcohol con el biocatalizador se estudió

por Desorción Térmica Programada (TPD) y se analizó su textura interna antes y después del tratamiento por microscopía electrónica de barrido medioambiental (ESEM). Por otro lado, la cantidad de proteína perdida en el tratamiento se cuantificó por medio del ensayo de ácido bicinónico. Además, 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.

Estudio teórico

Para estudiar la importancia de las interacciones estéricas a nivel de sitio activo y cercanías de la triada catalítica de CALB, se llevó a cabo un estudio de mecanismo molecular empleando el programa Chem3D 5.0 Ultra y el método MM2 para el cálculo de las energías estéricas. Se consideró la interacción entre el ketoprofeno racémico con los alcoholes metanol, etanol y 1-propanol en las etapas inicial y las formaciones del intermediario 1 tetraédrico y del acil enzima.

Resultados y discusión

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 la conversión y exceso enantiomérico hacia S(+)-ketoprofeno obtenidos fueron muy bajos (ver Figura 1), similares a los obtenidos con 2-propanol [6]. Como se puede apreciar en la figura, la actividad del biocatalizador no se vio afectada por el tratamiento con los alcoholes.

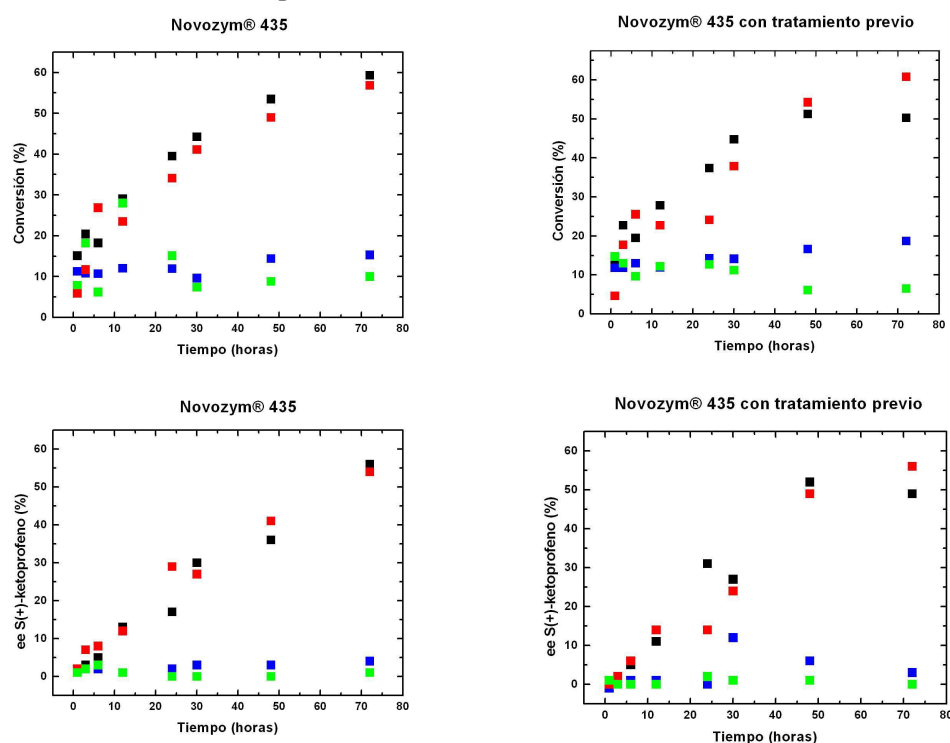


Figura 1. Conversión y exceso enantiomérico hacia S(+)-ketoprofeno de la esterificación de R/S-ketoprofeno con metanol (■), etanol (■) y 1-propanol (■) catalizado por Novozym® 435 con y sin tratamiento previo. Se incluye para comparar los resultados obtenidos empleando 2-propanol (■) [6].

Tanto la conversión como el exceso enantiomérico alcanzan valores aproximados a un 50 % hacia los ésteres metilo y propílico a las 48 h de reacción, ya sea empleando el biocatalizador previamente tratado o no. La Figura 2 presenta las actividades específicas obtenidas para el biocatalizador con y sin contacto previo con el medio alcohol: agua. Estas se calcularon como la relación entre la conversión

de R/S-ketoprofeno a ester (en micromoles, μmol) por masa (mg) de proteína y tiempo de reacción (min). La comparación de las actividades específicas evidencia que la esterificación con 2-propanol no es factible. Este comportamiento es atribuible al impedimento estérico del alcohol secundario y es independiente del efecto que podría causar el alcohol en la integridad del biocatalizador [6]. 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.

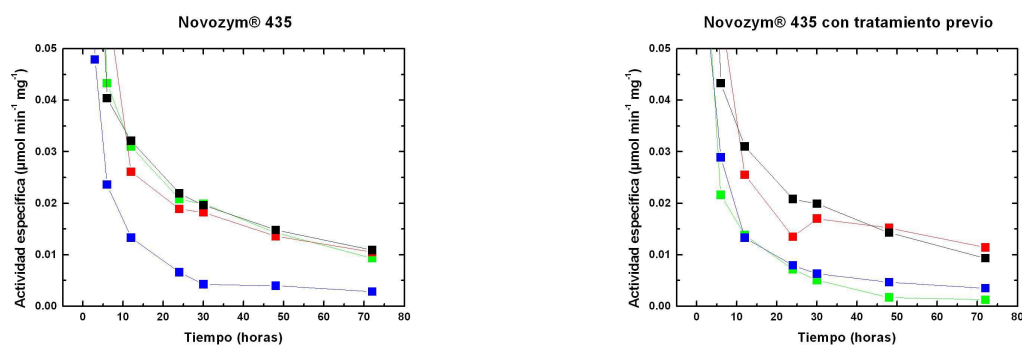


Figura 2. Actividad específica de la esterificación de R/S-ketoprofeno con metanol (■), etanol (■), 1-propanol (■) y 2-propanol (■) catalizada por Novozym® 435 con y sin tratamiento previo.

El análisis infrarrojo llevado a cabo sobre el biocatalizador en contacto con los alcoholes y los residuos sólidos recuperados del medio de reacción evidencia la disolución tanto de la enzima CALB como del soporte sobre el cual esta se encuentra inmovilizada. En este contexto, 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). Como referencia, se incluyen los valores obtenidos para etanol y 2-propanol.

Tabla 1. Porcentaje de pérdida de masa y proteína, temperatura de desorción de los alcoholes y masa de alcohol adsorbido por el contacto de Novozym® 435 con metanol, etanol, 1- y 2-propanol.

Alcohol	pérdida de masa %	pérdida proteica % ^a	Td ^b (°C)	g alcohol ads/g biocatalizador
Metanol	11.6	1.93	154	0.0212
Etanol ^c	16.6	1.27	184	0.3881
1-propanol	5.9	0.57	200	0.0404
2-propanol ^d	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).

^c datos extraídos de ref. [3]

^d datos extraídos de ref. [6]

Como muestra la Tabla 1, cuanto más corta es la cadena del alcohol, mayor es la pérdida de masa y proteína. Cuando el biocatalizador es tratado con metanol y etanol la pérdida de masa y proteína es un orden de magnitud mayor que cuando es contactado con 1- y 2-propanol. 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 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 ¹	Hélice α ²	Lámina β ³	Random ⁴	Giros β ⁵
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

1 Corresponde a la señal en 1619 cm^{-1} .

2 Corresponde a la señal en 1654 cm^{-1} .

3 Corresponde a la suma de la contribución de las señales en 1631 cm^{-1} , 1637 cm^{-1} y 1686 cm^{-1} .

4 Corresponde a la señal en 1643 cm^{-1} .

5 Corresponde a la suma de la contribución de las señales en 1664 cm^{-1} , 1666 cm^{-1} y 1676 cm^{-1} .

Por último, la figura 3 presenta la interacción entre etanol y 1-propanol en las cercanías de la tríada catalítica de CALB, en la etapa de coordinación. La tríada catalítica de CALB está formada por los residuos Serina 105, Histidina 224 y Ácido Aspártico 187 [5].

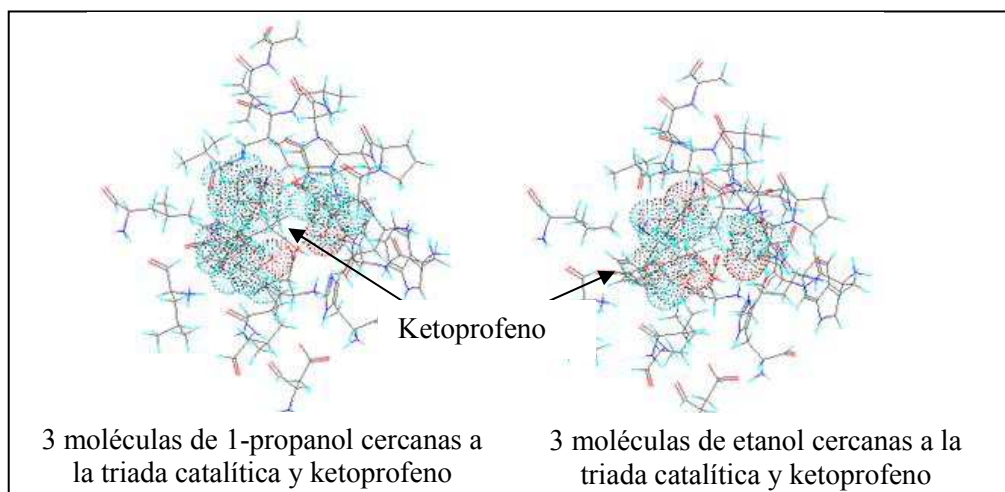


Figura 3. Representación de la interacción de etanol y 1-propanol con la tríada catalítica de CALB y R/S-ketoprofeno en la etapa de coordinación.

Además, la Figura 4 muestra los resultados en términos de energía estérica para las etapas de coordinación, intermediario 1 y acil enzima para metanol, etanol y 1-propanol. Como regla general, más negativa es la energía estérica, más estable es la interacción. Cuando se emplea metanol, éste interfiere en la formación del intermediario tetraédrico ya que se posiciona en el sitio de interacción del ketoprofeno con la enzima CALB, y de esta manera produce un impedimento estérico y electrónico para la etapa de coordinación del R/S-ketoprofeno. En cambio, si bien con etanol y 1-propanol se ve favorecida la formación del intermediario, la formación del complejo acil enzima se encuentra desfavorecida, lo cual permitiría el avance de la reacción.

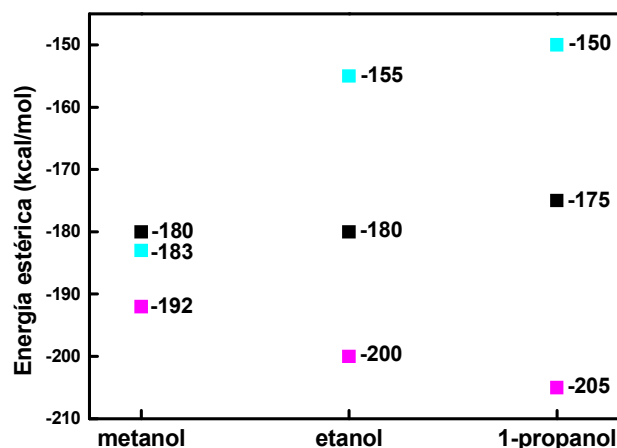


Figura 4. Energía estérica de R/S-ketoprofeno y metanol, etanol y 1-propanol cerca de CALB. Se incluyen las etapas: ■ inicial, ■ intermediario 1 (tetraédrico) y ■ acil enzima.

Conclusiones

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 y 1-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. En cuanto a los estudios teóricos, tanto el etanol como el 1-propanol presentan distinta conformación y distribución que el metanol alrededor de la molécula de ketoprofeno lo cual contribuye a distintas conformaciones del grupo carboxílico del ketoprofeno dando lugar a impedimentos estéricos por parte de los alcoholes para la coordinación de la molécula de ketoprofeno cerca de la triada catalítica de CALB.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas CONICET (proyecto PIP 112 201301 00171) y a la Universidad Nacional del La Plata (proyecto 11-X626) por el apoyo financiero para la ejecución de esta investigación.

Referencias

- [1] A.L. Ong, A.H. Kamarrudin, S. Bathia, W.S. Long, S.T. Lim, R. Kumari; *Enzym. Microb. Technol.* 39 (2006) 924-929.
- [2] A.L. Ong, A.H. Kamarrudin, S. Bathia, H.Y. Aboul-Enein; *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2476-2485.
- [3] C. José, R.D. Bonetto, L.A. Gambaro, M.P. Guauque Torres, M.L. Foresti, M.L. Ferreira, L.E. Briand; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 71 (2011) 95-107.
- [4] A. Adnani, M. Basri, N. Chaibakhsh, H.A. Ahangar, A.B. Salleh, R.N.Z.R.A. Rahman, M.B. Abdul Rahman; *Carbohydr. Res.* 346 (2011) 472-479.
- [5] M.L. Foresti, M. Galle, M.L. Ferreira, L.E. Briand; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (2009) 1461-1473.
- [6] M.V. Toledo, C. José, S.E. Collins, R.D. Bonetto, M.L. Ferreira, L.E. Briand; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 83 (2012) 108-119.