

ESTUDIO DE BIS-(2-HIDROXIETIL)TEREFTALATO (BHET) COMO SOPORTE ENZIMÁTICO

C.R. Llerena Suster*², C. José*¹

1 Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas – Dr. Jorge J. Ronco CINDECA. CCT La Plata, CONICET – CIC – Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

2 Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIPROVE), Departamento de Cs. Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata-Centro Asociado CIC.

**carlajose@quimica.unlp.edu.ar, cllerena@quimica.unlp.edu.ar.*

Palabras claves: INMOVILIZACIÓN, CALB, LIPASAS, RESIDUOS URBANOS, IBUPROFENO

RESUMEN

En el presente trabajo se profundiza la investigación de los biocatalizadores obtenidos por adsorción de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) sobre bis-(2-hidroxietil)tereftalato (BHET) obtenido por glicolisis de del tereftalato de polietileno (PET). Se optimizó la inmovilización, evaluando la adición de glicerol y distintos volúmenes de extracto enzimático crudo (EC) entre otras variables. La cantidad de proteína adsorbida se determinó mediante espectroscopía de emisión atómica (ICP-AES). Los biocatalizadores se aplicaron a la esterificación de *rac*-ibuprofeno con etanol. En todos los ensayos se evidenció la adsorción de CALB en niveles entre 13 y 33 mg por gramo de soporte según las condiciones de inmovilización, observando los mejores resultados al utilizar 2 mL de EC y no adicionar glicerol. Al usar 1 mL de EC se obtienen valores de productividad entre 0,13 y 0,18 mmol min⁻¹ mg⁻¹, mientras que al usar 2 mL se alcanza un valor de 0,30. La actividad disminuyó al aumentar los polioles durante la inmovilización. Por último, se destaca que no se encontraron diferencias al utilizar BHET obtenido de botellas de distintos colores. Esta investigación presenta un soporte innovador y económico para lipasas, que permite obtener biocatalizadores activos en reacciones de interés industrial.

Introducción

La utilización de células y enzimas ha demostrado eficacia en la síntesis de fármacos, herbicidas, insecticidas, entre otros y representan una alternativa más eficiente y ecológica a la química sintética tradicional. Sin embargo, el alto costo y corta vida útil de las enzimas comerciales limitan su aplicación en procesos industriales. En este contexto, la inmovilización de

enzimas es la herramienta que permite superar dichos obstáculos. La utilización de materiales de descarte y su valorización como soportes enzimáticos puede resultar un aliciente para la incorporación de la biocatálisis a la industria, en particular el tereftalato de polietileno (PET) abundante componente de residuos sólidos urbanos a nivel mundial. En el trabajo presentado en el XXII Congreso Argentino de Catálisis [1] se detalló el estudio exhaustivo del uso del PP y PET y derivados como soporte de CALB, y su aplicación en la esterificación de *rac*-ibuprofeno con etanol. Se destacó el uso del BHET como soporte, con una carga enzimática de 24,5 mg/g y una conversión del 29% del ibuprofeno. En este contexto, el objetivo de este trabajo consiste en optimizar la producción de este tipo de biocatalizadores, evaluando variables como cantidad de polioles agregados, volumen de solución enzimática y la modificación de la misma.

Experimental

Materiales usados como soportes: BHET, producto de glicolisis de PET de botellas de distintos colores (incolora, verde y celeste cielo) [2]. BHET comercial (BHETc, Sigma Aldrich).

Estudio de la estabilidad del BHET en las condiciones de inmovilización y reacción

A 450 mg de BHET se agregan 15 mL de agua desionizada. La mezcla se incubó a 30°C con agitación magnética. El sólido remanente se centrifugó y secó a peso constante. La estabilidad del BHET en condiciones de reacción se determinó a partir de 20 mg del monómero en 10 mL de etanol 0,12 M en iso octano, incubando 24 h a 45°C. Ambos ensayos fueron analizados por espectroscopia UV-Visible.

Técnica de Inmovilización enzimática

Se agregaron 300 mg de BHETc a 10 mL de solución enzimática obtenida por diferentes diluciones del EC Lipozyme®CalB L (Novozymes) con agua destilada desionizada. En algunos ensayos además se añadieron distintos volúmenes de solución de glicerol al 50%. Se colocaron 30 minutos a 30°C con agitación magnética (ensayos A-G, Tabla I) Se separan los sólidos por centrifugación, se liofilizan y se conservan a 4°C. Adicionalmente se realiza la inmovilización empleando BHET proveniente de botellas celeste cielo (ensayo H) y verdes (Ensayo I).

Cuantificación de la carga proteica mediante ICP-AES

Se utilizó Espectroscopia de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-AES) de alta resolución (Shimadzu ICPE 9000) para determinar la carga proteica (CP). Se determinó el contenido de azufre en muestras obtenidas mediante la digestión ácida de los biocatalizadores. La carga enzimática se calculó considerando que prácticamente la totalidad de la proteína en el EC es CALB [3] y que la misma contiene diez aminoácidos con azufre.

Esterificación de profenos

Se estudió la esterificación de *rac*-ibuprofeno (99,23%, Parafarm) con etanol (99,8%, Carlo Erba). Las reacciones se iniciaron por el agregado de 40 mg de biocatalizador sobre 10 mL de una solución de etanol 0,12 M e ibuprofeno 0,12 M en isooctano. Las reacciones transcurrieron por 48 h a 45°C en agitador orbital. La reacción se detiene a -20°C. El avance de reacción se determina por cuantificación del ibuprofeno remanente mediante titulación ácido-base con KOH en etanol. Con esos datos se calcula la conversión (X%), actividad específica de la enzima (AE) y productividad (P).

Resultados y discusión

Estabilidad del BHET

El BHET se disuelve rápidamente en agua y llega a un valor de 12 mg/mL a las 6 h de incubación a 30°C. Considerando lo observado, se utilizan 300 mg de soporte cada 10 mL de agua en los ensayos de inmovilización.

Los espectros de absorción de BHET muestran un desplazamiento de señales a mayores longitudes de onda en agua (Figura 1). Los espectros corresponden a soluciones saturadas. La solución en agua requirió dilución 1:200 mientras que en isooctano-etanol pudo medirse sin diluir. Estos resultados evidencian que la solubilidad en la mezcla de reacción es mínima.

Por otra parte, se comprobó que el monómero en solución acuosa no afecta la actividad esterásica de CALB.

Efecto de la concentración de proteínas y polioles durante la inmovilización

Usando una dilución 1:10 de EC, se realizaron agregados de glicerol de manera de aumentar 2,5 y 4 veces el contenido de polioles. Los resultados se muestran en la **Tabla 1**, ensayos A, B y C. Aunque el primer incremento de glicerol favorece la CP, un incremento mayor no. La AE y la P caen con el aumento de glicerol en el medio, lo cual puede atribuirse a la adsorción simultánea de proteína y polioles, afectando su actividad debido a limitaciones difusionales y/o estéricas en la interacción enzima-sustrato.

Se emplearon soluciones enzimáticas de distintas concentraciones. Para ello el EC fue diluido 1:10, 1:5 y 3:10 en agua desionizada, por lo que las cantidades de proteína y polioles aumentan proporcionalmente. Los resultados se muestran en la **Tabla 1**, ensayos A, D y E. Al aumentar al doble las proteínas iniciales, se observa un aumento proporcional en la CP. Sin embargo, se

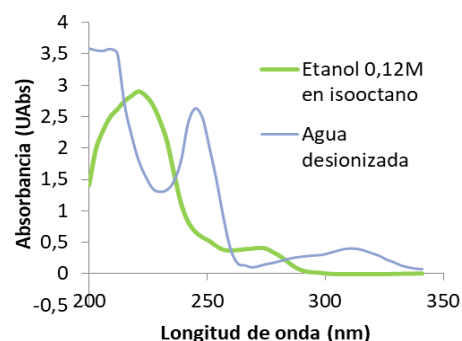


Figura 1. Espectros UV de BHET en agua desionizada y en etanol 0,12 M en isooctano.

observa una disminución en la AE, que puede explicarse por los efectos mencionados anteriormente. Al triplicar el volumen de EC (ensayo E), se produce una disminución tanto en la CP como en la AE en comparación con el ensayo D.

Tabla 1. Masa de polioles añadidos, carga proteica expresada como mg de proteína por g de biocatalizador, actividad específica y productividad en la esterificación de *rac*-ibuprofeno.

Ensayo	Extracto crudo (mL)	Polioles (g)	Carga Proteica (mg.g ⁻¹)	Actividad especifica (μmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	Productividad (μmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)
(A)	1	0,46	15,68	0,116	0,182
(B)	1	1,25	24,13	0,048	0,115
(C)	1	1,96	17,43	0,027	0,047
(D)	2	0,91	33,31	0,089	0,298
(E)	3	1,50	25,99	0,058	0,150
(F)	1**	0,50	26,10	0,062	0,160
(G)	1*	0,36	28,67	0,065	0,185
(H)	1	0,48	19,49	0,065	0,118
(I)	1	0,46	18,05	0,064	0,124

*Inmovilización en solución saturada en BHET **Solución semi-purificada o “adaptada” de CALB.

En el ensayo F, se duplicó la concentración de CALB en la inmovilización, manteniendo la concentración de polioles respecto al ensayo A, observándose un aumento en CP y disminución del 50% en la AE. Así, la presencia de polioles en la etapa de inmovilización es esencial para favorecer la adsorción de enzimas activas. Sin embargo, en presencia de una alta concentración de polioles, se evidencian efectos negativos en la CP y la actividad. En el ensayo G se usó EC diluido 1:10 en una solución saturada de BHET. En este ensayo CP y P mostraron mejoras, y se obtuvo mayor masa de catalizador. El ensayo D mostró el mejor valor de P, 0,298 μmol.min⁻¹.mg⁻¹, lo que evidencia una relación óptima entre la cantidad de proteína inicial y los polioles en la etapa de inmovilización, logrando optimizar la relación entre la carga de proteína y la actividad.

Se analizó el uso BHET obtenido desde botellas PET de diferentes colores. Los resultados se muestran en la **Tabla 1**, ensayos H (celestes) e I (verde). Independientemente del origen del monómero se obtuvieron valores similares de CP y P.

Conclusiones

Esta investigación presenta una valorización de PET de RSU. El BHET obtenido por glicólisis de botellas de RSU resulta adecuado como soporte enzimático dando biocatalizadores activos.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación del CONICET (PIP 11220200102016 CO), Agencia I+D+i (PICT2020-01118), y de la UNLP (proyecto 11X-898).

Referencias

- [1] A. Nanni, C. Llerena Suster, C. Fuentes, C. José. Libro XXII CAC (2022) La Plata, Argentina.
- [2] C.A. Fuentes, M.V. Gallegos, J.R. García, J.E. Sambeth, M.A. Peluso; Waste and Biomass Valorization, 11 (2019) 4991–5001.
- [3] C.R. Llerena Suster, L.E. Briand, S.R. Morcelle, Colloids Surf B: Biointerface. 121, (2014) 11-20.