

Síntesis de biocatalizadores basados en el látex de *Araujia sericifera*

Sánchez, Daniel A.,^{1,3*} Tonetto Gabriela M.,^{1,3} Ferreira, María L.^{2,3}

1. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur (UNS), Bahía Blanca, 8000, Argentina.

2. Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur (UNS), Bahía Blanca, 8000, Argentina.

3. Planta Piloto de Ingeniería Química – PLAPIQUI (UNS-CONICET), Bahía Blanca, 8000, Argentina.

E-mail: dsanchez@plapiqui.edu.ar

Palabras Claves: látex de *Araujia sericifera*, biocatalizador, entrapamiento, lipasas

Resumen

Se llevó a cabo la síntesis de biocatalizadores basados en el látex de *Araujia sericifera* mediante el entrapamiento de la fracción sólida del látex en una matriz de quitosano entrecruzado con glutaraldehído.

Se realizó un tratamiento preliminar del sólido para remover compuestos solubles y luego se evaluaron las condiciones de síntesis del biocatalizador mediante dos diseños de experimentos.

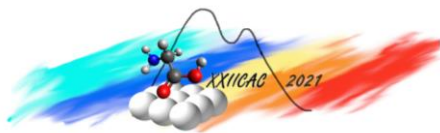
Los biocatalizadores obtenidos fueron ensayados en la síntesis de pentil oleato mediante la esterificación de ácido oleico y 1-pentanol.

Abstract

The synthesis of biocatalysts based on *Araujia sericifera* latex was carried out by entrapment of the solid fraction of the latex in a glutaraldehyde cross-linked chitosan matrix.

Preliminary treatment of the solid to remove soluble compounds was carried out and then, the synthesis conditions of the biocatalyst were evaluated by two designs of experiments.

The biocatalysts obtained were tested for the synthesis of pentyl oleate by esterification of oleic acid and 1-pentanol.



Introducción

Las lipasas son enzimas ampliamente usadas en las industrias alimentaria, química, cosmética, farmacéutica, entre otras [1]. Las lipasas se pueden obtener de fuentes animales, vegetales y microbianas. Se han encontrado lipasas en la fracción insoluble del látex de plantas de familias como Asclepiadaceae, Moraceae, Apocynaceae, Euphorbiaceae, Caricaceae y Bromeliaceae. Los catalizadores enzimáticos obtenidos a partir del látex de plantas presentan comportamientos similares a los biocatalizadores derivados de enzimas microbianas. Sin embargo, la obtención de las enzimas de hongos o bacterias implica el empleo de técnicas de modificación genética y procedimientos de purificación complejos. Esto conlleva a elevados costos de producción limitando así las aplicaciones industriales de estos catalizadores enzimáticos. Por el contrario, los biocatalizadores basados en látex de plantas son de fácil obtención, con pocos o nulos procesos de purificación y buenos rendimientos [2]. De esta manera, es posible la producción de biocatalizadores de bajo costo y con desempeños en reacciones similares a los obtenidos por las enzimas microbianas y/o fungales. Por ejemplo, la fracción insoluble en agua del látex de *Araujia sericifera* (Apocynaceae) ha demostrado una interesante actividad lipasa. Recientemente, la actividad enzimática de este sólido ha sido evaluada frente a numerosos sustratos bajo diferentes condiciones de reacción [3-5]. Sin embargo, en los sistemas de reacción el látex se disuelve parcialmente contaminando los productos y resulta difícil de separar y recuperar del medio de reacción.

En este trabajo se estudia la síntesis de biocatalizadores derivados del látex de *Araujia sericifera* obtenidos por entrapamiento del sólido en una matriz de quitosano entrecruzado con glutaraldehído.

Experimental

Extracción del látex de Araujia sericifera

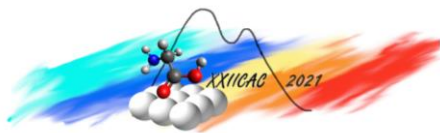
Los frutos de *Araujia sericifera* fueron recolectados en plantaciones naturales del área rural de Salliqueló, Provincia de Buenos Aires, Argentina (36° 45' 00" S, 62° 55' 59" W). La extracción del látex se llevó a cabo mediante la remoción del pecíolo de los frutos y el líquido drenado se recogió en agua destilada mantenida en un baño de hielo. El extracto se centrifugó (8000 rpm, 15 min) y la fracción insoluble obtenida se secó en estufa a 40 °C. El sólido seco obtenido se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Remoción de compuestos solubles

El sólido derivado del látex de *A. sericifera* fue tratado con etanol, acetona, éter etílico, cloroformo, *n*-heptano o decano. Para ello, el sólido fue colocado en viales de 50 ml y se adicionó el solvente a razón de entre 3 a 15 ml por cada gramo de sólido. El vial fue agitado intensamente y centrifugado a 8000 rpm durante 30 min, el líquido sobrenadante se retiró y el sólido se secó a 25 °C hasta peso constante. El sólido seco fue finamente dividido empleando un mortero y su actividad fue evaluada en la síntesis de pentil oleato.

Preparación del biocatalizador

Los biocatalizadores fueron obtenidos por entrapamiento del sólido derivado del látex en una red de quitosano entrecruzado con glutaraldehído. Se realizaron dos diseños de experimentos para determinar las condiciones óptimas de síntesis del biocatalizador. En un primer diseño se analizó el efecto de la concentración de la solución de quitosano (3 – 15 mg/ml), la concentración de glutaraldehído (0 – 0.5 mol L⁻¹) y el tiempo de entrecruzamiento (0 – 60 min) sobre la obtención y actividad del biocatalizador. En primer lugar, el quitosano fue disuelto completamente en una solución acuosa de ácido acético 1.5% v/v, a la solución de quitosano se le adicionó la solución de glutaraldehído a razón de 1.33 ml por cada 1 ml de solución de quitosano. La solución resultante se agitó a 1500 rpm por un minuto para lograr la homogenización y luego se dejó en reposo el tiempo determinado en el diseño experimental para permitir el entrecruzamiento. Alcanzado el tiempo preestablecido, se adicionó el látex finamente dividido (obtenido luego del tratamiento con solvente) y se agitó intensamente para



homogeneizar. La agitación se mantuvo en 1200 rpm y se realizó la neutralización del ácido agregando gota a gota una solución acuosa de KOH hasta lograr la precipitación del biocatalizador.

Teniendo en cuenta los resultados del primer diseño experimental, en el segundo diseño de experimentos se evaluó el efecto de la relación en peso látex/quitosano (1:1, 2:1, 3:1), el pH del sistema y la concentración de glutaraldehído. Se siguió la misma metodología de síntesis que la previamente mencionada, pero en este caso la concentración de glutaraldehído se varió entre 0.1 y 0.3 mol L⁻¹, añadiéndose a razón de 1.33 ml de solución de glutaraldehído por cada 1 ml de solución de quitosano. La concentración de la solución de quitosano se fijó en 6 mg/ml. El látex finamente dividido fue adicionado a la solución de quitosano/glutaraldehído durante el proceso de neutralización, a valores de pH comprendidos entre 3 y 6. El sólido obtenido fue secado a 25 °C hasta peso constante.

En ambos casos se llevó a cabo un diseño experimental 2³ con dos puntos centrales y un total de 10 experimentos para evaluar el efecto de las variables seleccionadas sobre la actividad de los biocatalizadores obtenidos empleando el software STATGRAPHICS Centurion version XV.2. El orden de los experimentos fue completamente aleatorizado.

La actividad de los biocatalizadores fue evaluada en la síntesis de pentil oleato.

Síntesis de pentil oleato

La síntesis de pentil oleato se llevó a cabo a través de la esterificación de ácido oleico y 1-pentanol. Para ello, se colocaron 1 mmol de ácido oleico, 2 mmol de 1-pentanol y 1 ml de n-heptano en un vial de 10 ml. El vial se colocó en un baño termostático a 30 °C y una vez alcanzada la temperatura se inició la reacción con la adición del biocatalizador en una proporción del 10% con respecto a la masa de ácido oleico. El tiempo de reacción fue de 5 h se utilizó agitación magnética a 600 rpm. La cantidad de ácido no consumido en la reacción fue determinada por titulación con una solución etanólica de KOH 0.06 M y empleando fenolftaleína como indicador. La conversión de ácido oleico fue obtenida a partir de la siguiente ecuación:

$$X_{AO} = \frac{AO_I - AO_F}{AO_I} * 100 \quad (1)$$

donde AO_I son los mmoles de ácido oleico al inicio de la reacción y AO_F son los mmoles de ácido oleico luego de 5 h de reacción.

Resultados y discusión

Pretratamiento del látex de A. sericifera

Se emplearon solventes con diferentes valores de logaritmo del coeficiente de reparto (log P) para remover compuestos solubles presentes en el sólido derivado del látex de *A. sericifera*. El log P de una sustancia es una relación de las concentraciones de un compuesto no ionizado entre dos disolventes (normalmente octanol y agua). Los valores de log P son indicativos de la polaridad de una sustancia, un valor más alto de log P indica una mayor hidrofobicidad del compuesto. La Figura 1a presenta un gráfico donde se relaciona el porcentaje de compuestos removidos con el log P del solvente empleado, sobre el mismo gráfico también se presenta la actividad relativa porcentual del sólido recuperado luego del tratamiento con solvente. La misma fue determinada mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad relativa (\%)} = \frac{X_{AO} \text{ alcanzada con el sólido tratado con solvente}}{X_{AO} \text{ alcanzada con el sólido sin tratamiento}} * 100 \quad (2)$$

El sólido derivado del látex de *A. sericifera* mostró ser altamente tolerante a la incubación con la mayoría de los disolventes orgánicos ensayados, manteniendo más del 99% de la actividad obtenida antes de la incubación. La excepción fue para el etanol, la actividad relativa después del tratamiento con este disolvente fue solo del 7%. Probablemente, la actividad enzimática se vio afectada negativamente

por la hidrofiliidad del disolvente. Los compuestos hidrófilos pueden eliminar el agua que necesitan las lipasas para mantener su actividad.

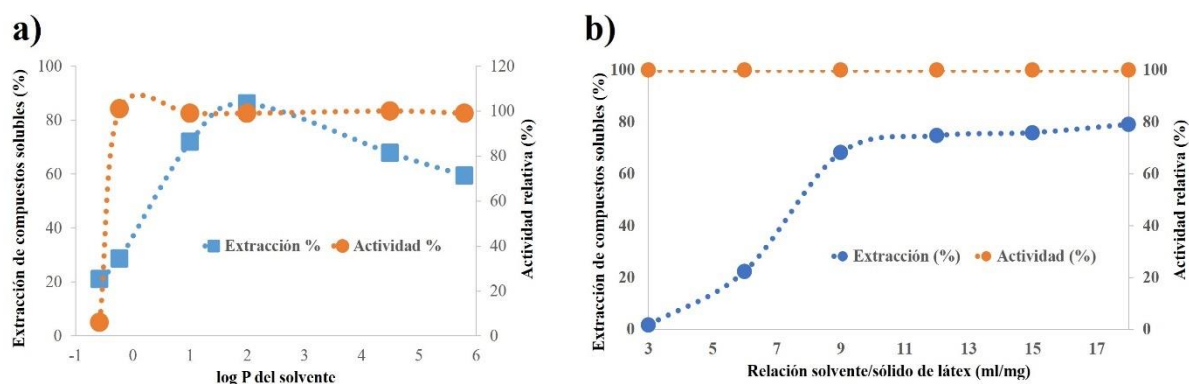


Figura 1. Remoción de compuestos del sólido derivado del látex de *A. sericifera* empleando diferentes solventes.

Los solventes con valores de log P superiores a 1 (hidrofóbicos) permitieron la remoción de entre el 60 y 85% de compuestos presentes en el sólido del látex sin afectar la actividad catalítica. Esta purificación simple del extracto de *A. sericifera* permite un importante incremento de la actividad específica ($U\ g^{-1}$) previo a la preparación del biocatalizador.

Dado el buen desempeño en la remoción de compuestos, combinado con la conservación de la actividad, la baja toxicidad y la presión de vapor moderada, el n-heptano ($\log P = 4.5$) fue seleccionado para el tratamiento del sólido derivado del látex. La Figura 1b presenta el porcentaje de extracción de compuestos solubles en función de la relación solvente/látex (ml/mg). Adicionalmente, se grafica la actividad relativa respecto al sólido de látex sin tratamiento con solvente. Un valor de 10 ml de n-heptano por cada gramo de sólido a tratar fue seleccionado como el óptimo.

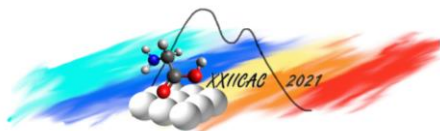
Obtención del biocatalizador

En primer lugar, se evaluó el efecto de la concentración de la solución de quitosano, la concentración de la solución de glutaraldehído y el tiempo de entrecruzamiento entre glutaraldehído y quitosano sobre la síntesis del biocatalizador y la actividad enzimática del mismo. Las condiciones para la síntesis del biocatalizador establecidas por el primer diseño de experimentos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones evaluadas en la síntesis de biocatalizadores basados en el látex de *A. sericifera* para el primer diseño de experimentos.

Ensayo	Solución de Quitosano (mg/ml)	Solución de glutaraldehído (M)	Entrecruzamiento (min)
1	3	0.5	60
2	9	0.25	30
3	3	0	60
4	15	0	0
5	3	0	0
6	15	0.5	60
7	9	0.25	60
8	3	0.5	0
9	15	0.125	60
10	15	0.5	0

Los resultados de este diseño preliminar permitieron acotar los rangos de las variables involucradas en la preparación del biocatalizador. La adición de glutaraldehído es necesaria para generar una red que permita atrapar a las partículas sólidas, sin embargo, concentraciones elevadas (tales como 0.5 M) generaron la gelificación de toda la solución. El tiempo de entrecruzamiento de 30 min resultó suficiente



para el entrapamiento de las partículas, mientras que empleando concentraciones de quitosano de entre 3 y 9 mg/ml fue posible lograr la completa disolución del biopolímero.

Con base en estos resultados preliminares, se realizó el segundo diseño de experimentos. Se analizó la concentración de glutaraldehído, el pH al que se adiciona el sólido del látex y la relación sólido de látex/quitosano. El tiempo de entrecruzamiento se fijó en 30 min y la concentración de quitosano en 6 mg/ml. La Tabla 2 presenta las condiciones de síntesis establecidas según el segundo diseño de experimentos junto con la conversión de ácido oleico alcanzada empleando cada uno de los biocatalizadores obtenidos.

Tabla 2. Condiciones evaluadas en la síntesis de biocatalizadores basados en el látex de *A. sericifera* para el segundo diseño de experimentos.

Número de Ensayo	Factores experimentales			Respuesta
	pH	Solución de glutaraldehído (M)	Relación látex/quitosano	Conversión (%)
1	4.5	0.2	2:1	88
2	3	0.3	1:1	45
3	3	0.3	3:1	52
4	3	0.1	1:1	55
5	6	0.3	3:1	90
6	6	0.1	1:1	90
7	3	0.1	3:1	58
8	4.5	0.2	2:1	87
9	6	0.1	3:1	95
10	6	0.3	1:1	89

Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos. Mediante regresión múltiple, se ajustó la conversión de ácido oleico en función de las variables estudiadas. La bondad del ajuste fue analizada a través del coeficiente de determinación (R^2), de la razón-F y del valor-p del modelo y de cada parámetro. Se evaluó el efecto estadísticamente significativo de las variables usando ANOVA. Los coeficientes no significativos fueron eliminados del modelo (valor de $p > 0.05$). La Ecuación 3 fue obtenida por regresión múltiple y logró explicar el 99.34% de los cambios observados en la conversión de ácido oleico (a través del R^2).

$$X_{AO} = -110.5 - 7.0A^2 + 75.83A - 27.5B + 2.0C \quad (3)$$

Siendo A el valor de pH de la solución (entre 3 y 6), B la concentración de la solución de glutaraldehído (entre 0.1 y 0.3) y C la relación másica sólido de látex/quitosano (entre 1 y 3).

En la Figura 2 se presenta el efecto de las variables analizadas en la síntesis del biocatalizador sobre la conversión de ácido oleico lograda empleando cada uno de estas preparaciones enzimáticas como catalizadores de la reacción de esterificación de ácido oleico y 1-pentanol.

Como puede observarse, la actividad enzimática estuvo favorecida por la adición del sólido derivado del látex de *Araujia sericifera* a la solución de quitosano/glutaraldehído cuando el pH estuvo en torno a 6, de esta manera la actividad de enzimática no se ve afectada por la acidez del medio. El incremento de la concentración de glutaraldehído tiene un efecto ligeramente negativo sobre la actividad enzimática que podría estar asociado a un excesivo entrecruzamiento del quitosano generando una red con mayores restricciones para el acceso de los sustratos. Finalmente, y como es de esperar, el aumento del contenido de sólido de látex también genera un leve aumento de la conversión de ácido oleico lograda por el biocatalizador, sin embargo, valores altos dificultan el entrapamiento del sólido.

Empleando STATGRAPHICS Centurion version XV.2 se realizó la optimización de las condiciones de síntesis del biocatalizador que maximizan la conversión de ácido oleico en la reacción de esterificación. Las condiciones óptimas para la preparación de biocatalizadores mediante el entrapamiento del látex de *Araujia sericifera* en una red de quitosano entrecruzado con glutaraldehído se presentan en la Tabla 3.

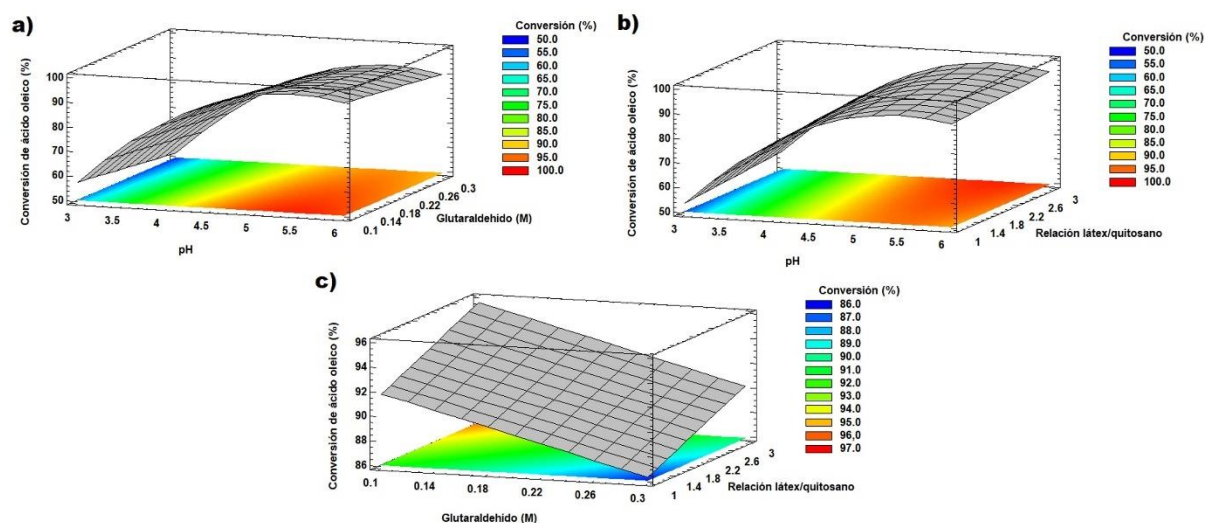


Figura 2. Efecto de las condiciones de síntesis de los biocatalizadores sobre la actividad enzimática en la esterificación de ácido oleico con 1-pentanol. a) Relación látex/kitosano = 3:1, variables: pH y concentración de la solución de glutaraldehído; b) concentración de la solución de glutaraldehído = 0.1M, variables: pH y relación látex/kitosano; c) pH = 6, variables: concentración de la solución de glutaraldehído y relación látex/kitosano.

Tabla 3. Optimización de las condiciones de síntesis del biocatalizador basado en el látex de *A. sericifera*.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
pH	3.0	6.0	5.99
Solución de glutaraldehído (M)	0.1	0.3	0.129
Relación látex/kitosano	1.0	3.0	2.156

Conclusiones

El sólido derivado del látex de *Araujia sericifera* fue tratado con diferentes solventes, aquellos con características hidrofóbicas permitieron extraer entre 60 y 85% de compuestos presentes en el látex sin afectar la actividad enzimática. Este procedimiento permitió aumentar hasta 5 veces la actividad específica del sólido. Este sólido de látex fue empleando para la preparación de biocatalizadores entrapándolo en una red de quitosano entrecruzado con glutaraldehído. Mediante diseños de experimentos se analizaron y optimizaron las condiciones de síntesis del biocatalizador que favorecen la obtención y maximizan su actividad en la esterificación de ácido oleico y 1-pentanol. Las condiciones óptimas para la preparación del biocatalizador fueron: solución de quitosano con concentración de 6 mg/ml, solución de glutaraldehído 0.13 M añadiéndose a razón de 1.33 ml de solución de glutaraldehído por cada 1 ml de solución de quitosano, tiempo de entrecruzamiento de 30 min, adición del sólido del látex cuando el pH de la solución es 6 y relación másica sólido de látex/kitosano 2:1.

Referencias

- [1] F. L. Chaves Almeida, M. P. Jiménez Castro, B. Medeiros Travália, M. B. Soares Forte; Process Biochem. 110 (2021) 37–51.
- [2] U. Mishra, R. Kandali; Indian J. Agric. Biochem. 32 (2019) 123-131.
- [3] P. Di Santo Meztler, M. E. Fait, M. L. Foresti, S. R. Morcelle; Catal. Sci. Technol. 4 (2014) 1386–1394.
- [4] D. A. Sánchez, S. R. Morcelle, M. E. Fait, G. M. Tonetto, M. L. Ferreira; Fermentation 5 (2019) 18.
- [5] P.S. Mateos, M.B. Navas, S.R. Morcelle, C. Ruscitti, S.R. Matkovic, L. E. Briand; Catal. Today 372 (2021) 211-219.