

Influencia del solvente en la síntesis enzimática de perácidos carboxílicos

Brandolín, Salvador E.*; Scilipoti José; Magario Ivana

Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada (IPQA), Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Av. Vélez Sarsfield 299, 5000, Córdoba, Argentina. salvadorebrandolin@mi.unc.edu.ar.

Palabras Claves: Lipasa B de *Candida antarctica*, Dinámica molecular, catálisis heterogénea, ácidos percarboxílicos.

Resumen

Los perácidos carboxílicos son oxidantes orgánicos de relevancia para la industria cosmética, alimenticia y agroquímica. Tradicionalmente se emplean como intermediarios en un proceso conocido como epoxidación de Prileschajew. Este sistema constituye un sistema bifásico líquido-líquido, con una fase orgánica que contiene los sustratos de la epoxidación y una acuosa que contiene al sustrato polar de la peracidación, el peróxido de hidrógeno. El estudio de catalizadores selectivos y ambientalmente amigables así como de solventes convenientes para esta reacción resulta un tema de interés. En este estudio se utilizaron cuatro solventes orgánicos, éter diisopropílico, tolueno, hexano y heptano, para evaluar su influencia sobre la capacidad catalítica de la enzima Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) inmovilizada en partículas acrílicas en la síntesis de ácido peroctanoico y perláurico. A través de ensayos cinéticos, se determinó que CALB posee el mayor rendimiento en tolueno. Se descartaron posibles limitaciones difusionales en la partícula catalítica como causa relevante en la diferencia de rendimientos entre solventes. Por medio de simulaciones moleculares realizadas con el software NAMD se analizó la influencia que provocan los solventes en las inmediaciones del sitio activo de la enzima, destacando los factores que podrían explicar la diferencia de velocidades de síntesis entre solventes.

Abstract

Carboxylic peracids are organic oxidants of relevance for the cosmetic, food and agrochemical industries. They are traditionally used as intermediates in a process known as Prileschajew epoxidation. This system constitutes a liquid-liquid two-phase system, with an organic phase that contains the epoxidation substrates and an aqueous phase that contains the polar substrate of the peracidation, hydrogen peroxide. The study of selective and environmentally friendly catalysts, as well as suitable solvents for this reaction, results from a topic of interest. In this study, four organic solvents, diisopropyl ether, toluene, hexane and heptane, were used to evaluate their influence on the catalytic capacity of the *Candida antarctica* Lipase B (CALB) enzyme immobilized in acrylic particles in the synthesis of peroctanoic and perlauric acid. Through kinetic tests, it was determined that CALB has the highest yield on toluene. Possible diffusional limitations in the catalytic particle were ruled out as a relevant cause in the difference in yields between solvents. Employing molecular simulations carried out with the NAMD software, the influence caused by solvents in the vicinity of the active site of the enzyme was analyzed, highlighting the factors that could explain the difference in synthesis speeds between solvents.

Introducción

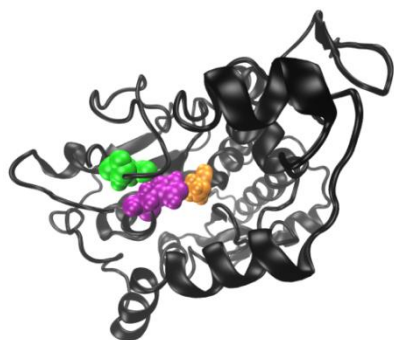
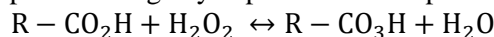


Figura 1: Estructura cristalina CALB. Naranja: serina 105, violeta: histidina 224, verde: aspartato 187.

Los perácidos son oxidantes orgánicos de gran importancia en la industria cosmética, alimenticia y petroquímica. Por otro lado, se emplean como intermediarios en la reacción de Baeyer-Villiger y la epoxidación de Prileschajew, entre otras. La síntesis de perácidos se realiza a partir de un ácido carboxílico y peróxido de hidrógeno, dando como productos agua y el perácido correspondiente, según:



En la reacción de Prileschajew, el perácido formado reacciona con un sustrato insaturado para dar como producto un epóxido. Tradicionalmente, el catalizador utilizado en la síntesis de perácidos es el ácido sulfúrico, el cual es un compuesto abrasivo, de difícil manipulación a escala industrial y que además promueve la apertura del enlace epóxido [1]. Por lo tanto, el estudio de catalizadores ambientalmente amigables y selectivos como las enzimas resulta un

tópico de interés. Particularmente, las lipasas inmovilizadas en soportes sólidos, al ser catalizadores heterogéneos, suponen una ventaja dada su fácil separación del producto final, permitiendo además reutilizarse en sucesivos lotes. La reacción de epoxidación con generación de perácido in situ catalizada por lipasas fue propuesta por Björkling [2]. Una de las lipasas más empleadas es la Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) (Figura 1). Estos sistemas se encuentran conformados por dos fases líquidas: Una orgánica, que contiene los sustratos de la epoxidación, y otra de naturaleza acuosa, que contiene el sustrato polar de la peracidación, el peróxido de hidrógeno. El solvente orgánico más ampliamente empleado en la síntesis con CALB es tolueno [3]. El tolueno es una sustancia nociva para la salud de personas y animales, además de poseer un punto de ebullición de 110 °C, que lo hace costoso de separar de los productos finales. El objetivo de este trabajo es la evaluación de solventes menos nocivos para la salud y de menor punto de ebullición en reemplazo de tolueno. Por lo que en este trabajo se utilizaron cuatro solventes, éter diisopropílico, tolueno, hexano y heptano para analizar la influencia de los mismos en la síntesis enzimática de ácido per octanóico y per láurico.

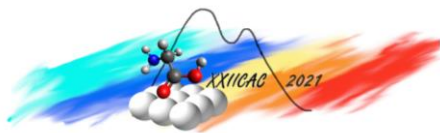
Experimental

Materiales

Se utilizó la enzima Lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en partículas de poliacrílico (tamaño medio de partícula de 350 um) IMMCALB-T1-350 de ChiralVision (Den Hoorn, The Netherlands). Los solventes empleados fueron tolueno (pro análisis A.C.S) de Sintorgan (Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina) y heptano normal 0,01% H₂O, éter diisopropílico p.a. y hexano normal de Cicarelli (Santa Fe, Argentina). Los reactivos utilizados fueron peróxido de hidrógeno 25% p/p grado analítico (Taurus, Argentina), ácido octanóico para síntesis (Tetrahedron, India) y ácido láurico (Serquim, Argentina). Por último, para las técnicas analíticas, se utilizó ioduro de potasio, amonio y cerio (IV) sulfato, tiosulfato de sodio, ácido sulfúrico 95-98% e hidróxido de potasio grado analítico.

Ensayos de síntesis

Para estudiar la influencia del solvente en la velocidad de síntesis de ácido per octanóico y perláurico se realizaron ocho experiencias utilizando éter diisopropílico, tolueno, hexano y heptano. En cada ensayo se colocaron 0,01 moles de ácido octanóico o láurico, 1,636 ml de solución de peróxido de hidrógeno 25% p/p, 0,5 g de catalizador y la cantidad correspondiente de solvente para alcanzar los 54 ml de volumen de reacción total. Además, se realizó un ensayo blanco sin catalizador, utilizando tolueno como solvente y ácido láurico. Se utilizó un controlador de temperatura y un baño térmico para mantener los sistemas a 30 ± 1 °C constantes. Los sistemas se mantuvieron a 600 rpm



con un agitador tipo hélice de 2,5 cm de diámetro inmerso en un balón de vidrio de 3 bocas de 4,6 cm de diámetro interno. Se interpolaron las tres primeras mediciones de producción de perácido vs tiempo utilizando un polinomio de orden 2. Este polinomio se derivó y se evaluó en tiempo cero para obtener el valor de la velocidad inicial de cada experiencia.

Técnicas analíticas

En los ensayos de síntesis, al tomar la muestra, se detuvo la agitación mecánica durante 30 segundos para permitir la correcta separación de fases. Luego se muestrearon 0,5 ml de la fase superior (oleosa). Se determinó la concentración de perácido formado por iodometría y cerimetría. [4]

Estimación de retardo difusional

Se evaluó la difusión molecular de los reactivos ácido láurico, ácido octanoico y peróxido de hidrógeno en los solventes empleados (difusividad binaria D_{AB}) según la correlación propuesta por Siddiqi – Lucas [5]. Las propiedades físicas de los compuestos fueron obtenidas de la base de datos DIPPR 2003. Para el cálculo de posible resistencia pelicular se estimaron los coeficientes de transferencia de masa (k_L [m/s]) con la correlación para tanques sin deflectores de Jha - Raja Rao [6]. Para el cálculo del retardo difusional externo se utilizó el criterio de Mears (1974) [7] expresado en la ecuación 1. Para el cálculo del retardo difusional intrapartícula, se utilizó el criterio de Weisz-Prater (1954) [8] expresado en la ecuación 2 para una partícula esférica:

$$M = \frac{-r'_a R n}{k_L C} < 0,15 \text{ (Ec. 1)} \quad \Phi = \frac{-r'_a \left(\frac{R}{3}\right)^2}{D_e C} \ll 1 \text{ (Ec. 2)}$$

Donde $-r'_a$ [M/min] es la velocidad inicial observada, R [m] es el radio de la partícula, n es el orden de reacción, C [M] es la concentración molar global del reactivo y D_e [m²/min] es la difusividad efectiva. Dada la dificultad de estimar la difusividad efectiva de líquidos en partículas sólidas porosas, se asume que estas caen a un valor del 5% de las difusividades binarias [9].

Simulación molecular

Se utilizó el software NAMD v2.14 para realizar las simulaciones. Para el cálculo de energías de interacción de no enlace se empleó el plugin NAMD Energy del software VMD v1.9.3. La herramienta Packmol se utilizó para realizar la configuración inicial de los sistemas simulados [10]. Se utilizó la estructura cristalina PDB ID: 1TCA [11] de la proteína CALB, obtenida del banco de datos de proteínas. Se utilizaron los campos de fuerzas CHARMM22, CHARMM general force field, CHARMM36 y el modelo TIP3P [12]. Se realizaron cuatro simulaciones moleculares sobre las condiciones iniciales de reacción de las experiencias de síntesis de ácido peroctanoico. La estructura cristalina 1TCA de la CALB contiene 286 moléculas de agua que fueron retiradas. Se definió un cubo de 66 x 66 x 66 Å, con una molécula de lipasa ocupando el centro. En el espacio restante se colocaron las moléculas de solvente y reactivos acorde a las concentraciones empleadas en los ensayos de síntesis. De cada solvente se instanciaron 1154 moléculas de éter diisopropílico (ETD), 1525 moléculas de tolueno (TOL), 1238 moléculas de hexano (HEX) y 1106 moléculas de heptano (HEP). En los cuatro sistemas, se colocaron 240 moléculas de agua, 42 moléculas de peróxido de hidrógeno y 32 moléculas de ácido octanoico. La extensión de las simulaciones fue de 1 ns, por duplicado.

Resultados y discusión

En la Figura 2 se muestran los resultados cinéticos obtenidos en términos de la producción en el tiempo del perácido correspondiente. En ambos casos, el tolueno resultó ser el solvente con mayor velocidad de reacción, seguido por el éter diisopropílico, luego el hexano y por último el heptano. Algunos autores postulan que esta reacción se lleva a cabo en la fase orgánica [13] migrando el peróxido de hidrógeno por lo que solventes de mayor polaridad deberían generar una mayor solubilidad de peróxido de hidrógeno mejorando así la velocidad de reacción. Siendo que la polaridad

de los solventes es creciente en el sentido HEP < HEX < TOL < ETD, se observa que la velocidad de reacción no es estrictamente creciente ni decreciente con la polaridad del solvente, sino que se vuelve máxima en tolueno. La diferencia de velocidad de reacción entre el ácido octanoico y ácido láurico es atribuida al impedimento estérico debido a la longitud de la cadena alifática [14].

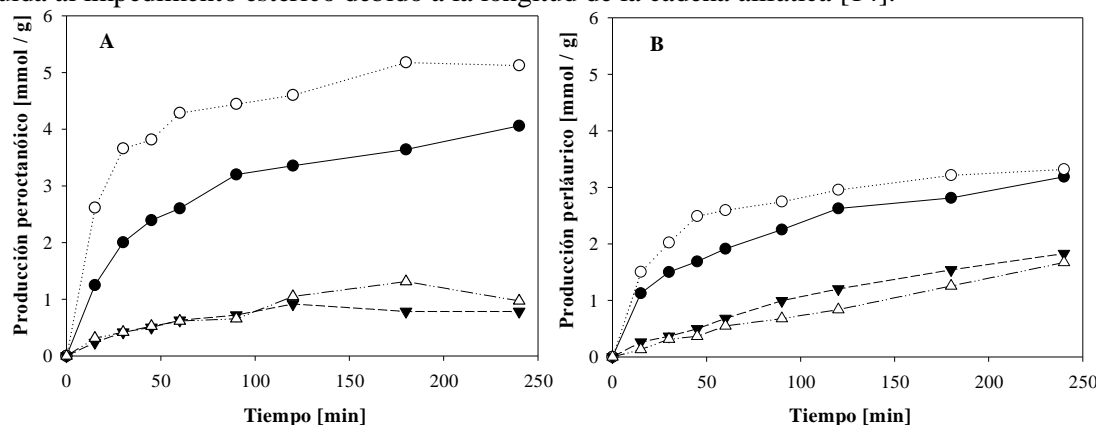


Figura 2: Resultados cinéticos. Figura A: ác. octanoico. Figura B: ác. láurico. ○:TOL ●:ETD ▼:HEX △:HEP.

Evaluación de retardo difusional

La Tabla 1 muestra el valor de la velocidad de reacción observada, el criterio de Mears y la estimación del módulo de Weisz-Prater para cada reactivo en cada uno de los solventes evaluados. El criterio de Mears evaluado se encuentra por debajo del límite de 0,15, por lo que se determina que la reacción no se encuentra limitada por la transferencia de masa externa y que la diferencia de velocidades de reacción entre solventes, en principio, no podría atribuirse a esta causa. Habiendo determinado así que la reacción no se ve limitada por la transferencia de masa externa, se asumió que la concentración en la superficie de la partícula es igual a la del bulk para el cálculo del módulo de Weisz-Prater. Los valores calculados indican que las velocidades iniciales de reacción observadas son del orden de mil veces menores a las difusiones intrapartícula estimadas. Por lo que se determina que la diferencia de velocidades de reacción entre los solventes no se encuentra afectada por efectos difusionales internos ni externos.

Tabla 1: Criterio de Mears y Weisz-Prater

Solvente	Sistema Láurico/H ₂ O ₂					Sistema Octanoico/H ₂ O ₂				
	V ₀ (M/min)	M ácido (/)	Φ ácido (/)	M H ₂ O ₂ (/)	Φ H ₂ O ₂ (/)	V ₀ (M/min)	M ácido (/)	Φ ácido (/)	M H ₂ O ₂ (/)	Φ H ₂ O ₂ (/)
ETD	8E-04	1E-04	2E-03	4E-05	6E-04	9E-04	1E-04	2E-03	5E-05	7E-04
TOL	1E-03	3E-04	6E-03	1E-04	9E-04	2E-03	5E-04	9E-03	2E-04	2E-03
HEX	2E-04	3E-05	5E-04	1E-05	2E-04	3E-04	4E-05	7E-04	2E-05	2E-04
HEP	1E-04	2E-05	3E-04	1E-05	1E-04	3E-04	4E-05	7E-04	2E-05	2E-04

Mecanismo de reacción y resultado de simulaciones moleculares

Habiéndose determinado que no existe retardo difusional con ningún solvente, las diferencias en las velocidades de síntesis pueden discutirse a la luz de efectos de solvente alrededor del sitio activo de la enzima. El rol del solvente puede favorecer o perjudicar el ingreso de los sustratos a la cavidad activa. La actividad catalítica de la CALB se debe a la acción de tres aminoácidos, la Serina 105, Histidina 224 y Aspartato 187, que se encuentran en una cavidad de 10 Å de diámetro aproximadamente [15]. En la Figura 3 se esquematiza el mecanismo de reacción de peracidación de un ácido carboxílico, donde se aprecia la acción coordinada de estos tres aminoácidos en la síntesis [16]. El mecanismo implica un orden estricto de entrada y salida de reactivos y productos conocido como ping pong bi-bi,

el cual se inicia con el ingreso del ácido carboxílico al sitio activo con su grupo ácido en posición frontal hacia la cavidad donde se encuentran los aminoácidos. La cavidad activa de la CALB se encuentra constituida por grupos polares que, mediante interacción electrostática, permiten que el ácido adquiera la posición adecuada para su ingreso [15]. Debido a la naturaleza heterogénea líq-líq del sistema, el agua y el peróxido de hidrógeno se agrupan en cúmulos esféricos de fase acuosa, separadas del solvente. Estas estructuras de alta polaridad atraen electrostáticamente a los grupos ácidos, desorientándolos para su correcto ingreso al sitio activo de la enzima. El computo de la energía de interacción electrostática del ácido octanóico con los cúmulos de agua y peróxido de hidrógeno alrededor de la enzima, se presenta en la Tabla 2. No se presentan resultados para el ácido láurico, ya que, presentan la misma tendencia que los de ácido octanóico.

Tabla 2: Interacción electrostática ác. octanóico con cúmulos de agua y peróxido de hidrógeno

Solvente	Interacción electrostática octanóico – cúmulos de fase acuosa [Kcal/mol]	Interacción total solvente – sitio activo [Kcal/mol]
ETD	-176	-160,3
TOL	-237,9	-137,1
HEX	-279,3	-131,6
HEP	-336,4	-92,17

Se observa que la interacción electrostática entre los grupos ácidos y los cúmulos polares de agua y peróxido de hidrógeno incrementa al disminuir la polaridad del solvente. Lo que podría explicar la diferencia entre las velocidades de reacción del tolueno con el hexano y el heptano. Siendo más probable que el ácido carboxílico adquiera la orientación adecuada para el ingreso al sitio activo.

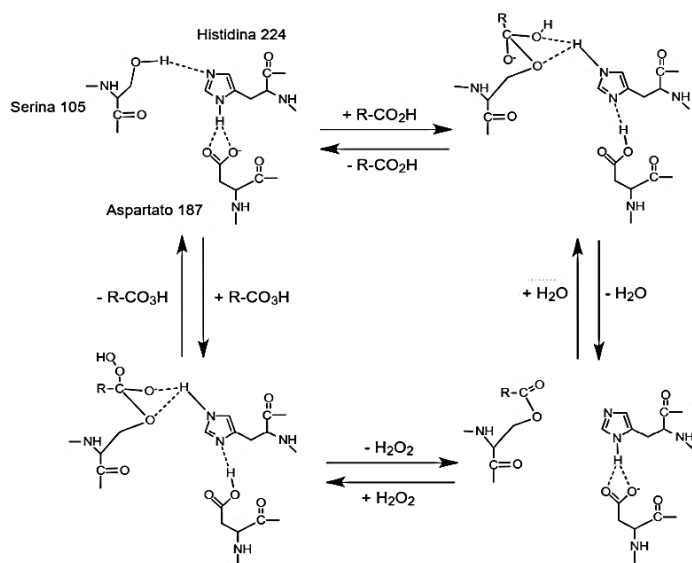
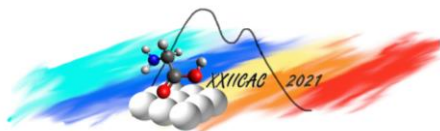


Figura 3: Mecanismo enzimático de peracidación.

Esto genera un efecto inhibitorio en la actividad catalítica de la enzima, impidiendo el ingreso de los reactivos. El efecto adverso provocado por solventes polares sobre la actividad catalítica de la CALB ha sido reportado con anterioridad [15]. Indicando que la polaridad del solvente rompe la interacción puente hidrógeno entre la serina 105 y la histidina 224, por lo que una mayor energía de interacción de un solvente con el sitio activo lleva a una menor actividad catalítica. [17].

Conclusiones

En este trabajo se evaluó la peracidación enzimática de ácido láurico y ácido octanóico en cuatro solventes orgánicos de diferente polaridad. Luego de descartar la existencia de retardo difusional de



reactivos hacia el interior de la partícula catalítica, se discutieron las diferencias cinéticas encontradas a través del modelado molecular. Se determinó que la influencia del solvente sobre la capacidad catalítica de la lipasa CALB podría estar relacionada a la interacción que estos tengan sobre los tres aminoácidos del sitio activo, serina 105, histidina 224 y aspartato 187. En donde los solventes con una alta polaridad interactúan con mayor intensidad con las inmediaciones de la cavidad activa de la lipasa, provocando un efecto inhibitorio por medio de dos mecanismos: quitando la posibilidad de ingreso al sitio activo a los sustratos de la reacción e interfiriendo con las interacciones puente hidrógeno entre la serina 105 e histidina 224. Pero además, mediante la interpretación del mecanismo de reacción y la naturaleza heterogénea liq-liq del medio de reacción, los solventes más apolares promueven la formación de cúmulos polares que interactúan con mayor intensidad con los grupos ácidos que el sitio activo de la CALB. Impidiendo así el ingreso de los ácidos carboxílicos a la cavidad activa.

Referencias

- [1] G. Sienel, R. Rieth, K. T. Rowbottom en Epoxides, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2000).
- [2] F. Björkling, S. E. Godfredsen, O. Kirk; J. Chem. Soc. Chem. Commun. 19 (1990) 1301–1303.
- [3] C. Aouf, E. Durand, J. Lecomte; Green Chem. 16 (2014) 1740–1754.
- [4] S. Bhattacharya en Solvent-free chemo-enzymatic epoxidation: Experimental and kinetic modelling studies, Universidad de Berlín (2011).
- [5] M. A. Siddiqi, K. Lucas; Can. J. Chem. Eng. 64 (1986) 839–843.
- [6] V. G. Pangarkar, A. A. Yawalkar, M. M. Sharma, A. A. C. M. Beenackers; Ind. Eng. Chem. Res. 41 (2002) 4141–4167.
- [7] D. E. Mears; Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev. 10 (1971) 541–547.
- [8] P. B. Weisz, C. D. Prater; Adv. Catal. 6 (1954) 143–196.
- [9] C. N. Satterfield, C. K. Colton, W. H. Pitcher; AIChE J. 19 (1973) 628–635.
- [10] L. Martínez, R. Andrade, E. G. Birgin, J. M. Martínez; J. Comput. Chem. 30 (2009) 2157–2164.
- [11] J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, T. A. Jones; Structure 2 (1994) 293–308.
- [12] W. L. Jorgensen, C. Jenson; J. Comput. Chem. 19 (1998) 1179–1186.
- [13] C. Orellana-Coca, U. Törnvall, D. Adlercreutz, B. Mattiasson, R. Hatti-Kaul; Biocatal. Biotransformation 23 (2005) 431–437.
- [14] R. T. Morrison, R. N. Boyd en QUÍMICA ORGÁNICA (5a. ed.), Adisson Wesley (1998).
- [15] S. Dutta Banik, M. Nordblad, J. M. Woodley, G. H. Peters; ACS Catal. 6 (2016) 6350–6361.
- [16] S. Warwel, M. Klaas; Wiley-VCH 234 (2000) 209–231.
- [17] C. Li, T. Tan, H. Zhang, W. Feng; J. Biol. Chem. 285 (2010) 28434–28441.