



Peptidasas y lipasas vegetales como biocatalizadores en la obtención de tensioactivos derivados de aminoácidos

M^a Elisa Fait¹, Sabrina A. Rossi¹, Melisa Hermet¹, Nahuel Wanionok¹, Leticia Méndez², Juan M. Padró³, Pere Clapés⁴, Susana R. Morcelle^{1*}

¹Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIPROVE), Depto. Cs. Biológicas, Fac. Cs. Exactas, UNLP, 47 y 115, C.P. 1900, La Plata, Argentina.

²Laboratorio de Estudios de Compuestos Orgánicos (LADECOR), Depto. Cs. Químicas, Fac. Cs. Exactas, UNLP, 47 y 115, C.P. 1900, La Plata, Argentina.

³Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA), Depto. Cs. Químicas, Fac. Cs. Exactas, UNLP, 49 y 115, C.P. 1900, La Plata, Argentina.

⁴Grupo de Biocatálisis y Biomoléculas, Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC), Jordi Girona 18-26, C.P. 08034, Barcelona, España.

* E-mail: morcelle@biol.unlp.edu.ar

Palabras Claves: papaína, lipasa de *Araujia sericifera*, surfactantes derivados de aminoácidos

Resumen

Se sintetizaron compuestos derivados de aminoácidos con potencial actividad superficial mediante reacciones de condensación de Arg, Gly, Ala y Leu con alquilaminas y alcoholes alifáticos (decil y dodecilamina; decanol y dodecanol). Dichas reacciones fueron catalizadas por peptidasas vegetales cisteínicas, una de origen comercial (papaína) y otra extraída del látex de la enredadera nativa *Araujia sericifera*. Asimismo, se probó la capacidad de la lipasa obtenida de dicho látex para catalizar estas reacciones. Las estrategias ensayadas fueron control termodinámico y control cinético. Las alquilamidas derivadas de Ala y Gly pudieron ser sintetizadas mediante el enfoque termodinámico con muy buenos rendimientos para Ala pero más bajos para Gly. Dado que los derivados de Leu no pudieron ser sintetizados mediante esta estrategia, y para aumentar el rendimiento de los derivados de Gly, se ensayó la síntesis por control cinético previa esterificación de los dadores de acilo. Mediante esta metodología, se obtuvieron rendimientos cercanos al 90% para ambos dadores de acilos empleando papaína. Se utilizó este enfoque para sintetizar los derivados de Arg utilizando los tres biocatalizadores y los cuatro nucleófilos, resultando papaína la enzima más eficiente. Se escalaron las síntesis de las alquilamidas utilizando papaína como biocatalizador, a fin de caracterizar los productos obtenidos.

Abstract

Amino acid-based compounds with potential surface activity were synthesized by condensation reactions between Arg, Gly, Ala and Leu with alkyl amines and aliphatic alcohols (decyl and dodecyl amines; decanol and dodecanol). Reactions were catalyzed by plant cysteine peptidases, one from commercial origin (papain) and another obtained from the native vine *Araujia sericifera* latex. A lipase obtained from the same plant latex (ASL) was also proved as biocatalyst. Both approaches, thermodynamic and kinetic controlled synthesis were tested. Ala derivatives were successfully synthesized under the thermodynamic approach, but the syntheses of Gly derivatives showed lower yields and Leu derivatives could not be synthesized. Kinetic controlled syntheses were tested after esterification of acyl donors. Higher yields of the Gly derivatives, as well as high yields of Leu derivatives could be reached using papain under this approach. Kinetic controlled synthesis was applied to produce the Arg derivatives using the three biocatalysts and the four nucleophiles, being papain the most efficient enzyme. Syntheses of alkylamides were scaled up using papain as biocatalyst in order to have enough product mass for characterization.

Introducción

Los biocatalizadores (enzimas y células enteras) están siendo explotados en forma creciente para procesos preparativos que van desde la escala de laboratorio hasta la industrial [1,2]. De hecho, la biocatálisis ofrece una perspectiva de diseño de procesos industriales limpios, siendo una tecnología aceptada en la mayoría de los sectores. Esto se debe fundamentalmente al impacto de los procesos industriales, lo que conlleva al desarrollo de alternativas más benignas para el medio ambiente: el diseño de productos y procesos factibles y económicos, basados en materias primas renovables, que reduzcan la generación de la contaminación en sus propios orígenes y minimicen el consumo de energía [3].

Los surfactantes están entre los productos químicos más representativos con aplicación en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética, siendo utilizados en grandes cantidades a escala mundial. Los conjugados de aminoácidos y péptidos lipídicos constituyen una clase interesante de surfactantes con buenas propiedades de superficie, actividad antimicrobiana y baja toxicidad [4]. Dada la suavidad y la selectividad de las reacciones enzimáticas, las proteasas y lipasas pueden emplearse como biocatalizadores para la obtención de estos compuestos, evitando así el uso de solventes orgánicos peligrosos y la formación de subproductos de condensación no deseados [5].

El objetivo del presente trabajo consistió en el ensayo de peptidasas y lipasas provenientes del látex de frutos de *Araujia sericifera*, una enredadera nativa perteneciente a la familia de las Apocynaceae, como biocatalizadores alternativos a la peptidasa vegetal papaína, para la obtención de surfactantes derivados de aminoácidos de acuerdo con las reacciones indicadas en la Figura 1.

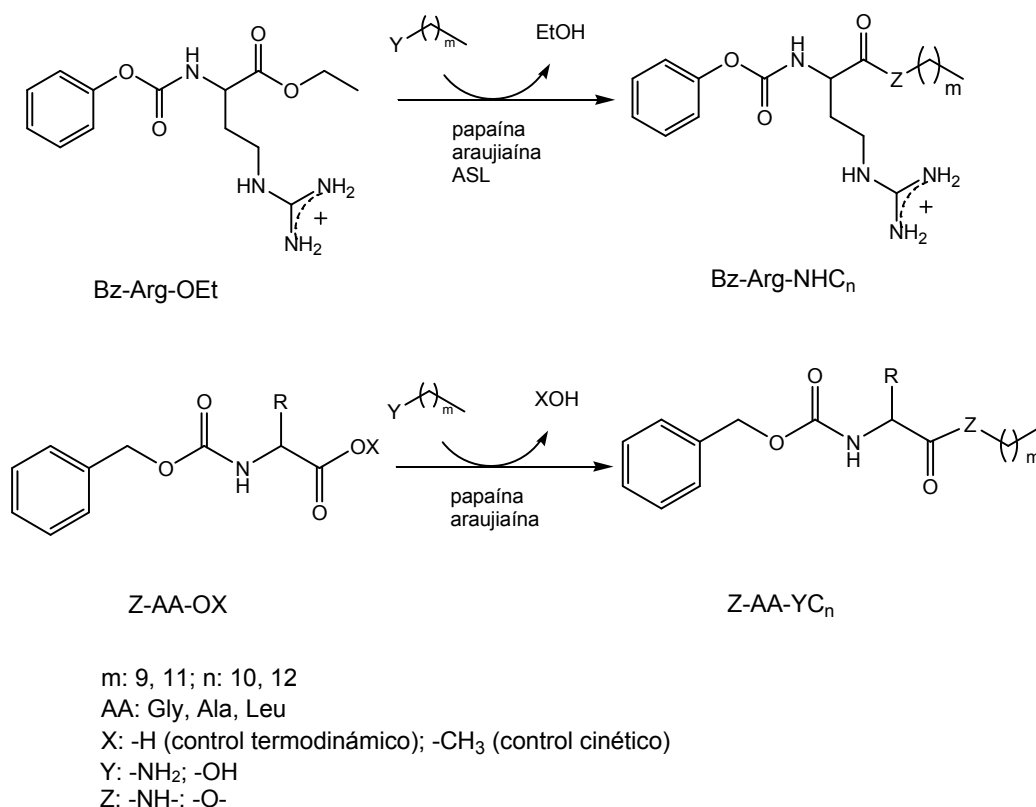


Figura 1. Reacciones de obtención de surfactantes derivados de aminoácidos.

Experimental

Materiales

Se emplearon papaína, decil- y dodecilamina, decanol, dodecanol y tamices moleculares (4Å) de Fluka; *N*^α-benzoil- arginina etil éster (BAEE) y *N*^α-carbобензоxi leucina (Z-Leu-OH) de Sigma; *N*^α-carbобензоxi glicina (Z-Gly-OH), *N*^α-carbобензоxi alanina (Z-Ala-OH) de Bachem; D,L-ditiotreitól (DTT) de Invitrogen; cloruro de tionilo de Baker. Las cromatografías en capa fina (TLC) se realizaron en cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck). Sílica gel grado 62 (60–200 mesh, Grace Davidson) fue empleada para cromatografía en columna. Poliamida-6 (EP-700, tamaño de partícula <800 μm, diámetro promedio de poro 50–300 nm, área específica calculada según el método BET 8,4 m² g⁻¹) fue una contribución de Akzo. El resto de los reactivos y solventes empleados en este trabajo fue de calidad analítica o superior.

Extracción de las peptidasas y lipasas. Obtención de los biocatalizadores

El látex de frutos inmaduros de *Araujia sericifera* cosechados en verano en las cercanías de La Plata (Buenos Aires, Argentina) fue colectado en una solución conteniendo EDTA y sulfito de sodio 5 mM en baño de hielo. La suspensión resultante fue centrifugada durante media hora a 9600×g para separar el material soluble (peptidasas) del insoluble (gomas conteniendo las lipasas). Las fracciones separadas fueron liofilizadas y almacenadas para las determinaciones posteriores. Las peptidasas fueron inmovilizadas en poliamida según se describe en [6].

Activación de los sustratos

Los ésteres metílicos de *N*^α-carbобензоxi glicina (Z-Gly-OMe) y de *N*^α-carbобензоxi leucina (Z-Leu-OMe) fueron obtenidos por esterificación de Z-Gly-OH y Z-Leu-OH según el método del cloruro de tionilo (SOCl₂) [7].

Síntesis en microescala de los surfactantes derivados de aminoácidos

Síntesis por control cinético de Bz-Arg-NHC_n y Z-AA-NHC_n. Se prepararon soluciones stock de los sustratos con 20 mM de cada dador de acilo (BAEE, Z-Gly-OMe o Z-Leu-OMe) y 30 mM de cada nucleófilo (decil o dodecilamina) en acetonitrilo (previamente almacenado con tamices moleculares) conteniendo 0,25% v/v de agua. Las síntesis (1 ml de solución stock con 100 mg de biocatalizador) se llevaron a cabo bajo atmósfera de nitrógeno en viales cerrados de 4 ml en un agitador orbital (150 rpm) a 37°C para cada tiempo de reacción (1, 3, 6, 24, 48 y 72 h). Las reacciones se detuvieron por el agregado de MeOH/HAc (4:1, 1 ml) y el soporte fue lavado con la misma mezcla de solventes (3×1 ml).

Síntesis por control termodinámico de Z-AA-OH. Soluciones stock de dadores de acilo (Z-Ala-OH o Z-Gly-OH) y los nucleófilos, se prepararon en las condiciones previamente indicadas. Las síntesis se llevaron a cabo en las condiciones descriptas para 24, 48 y 72 hs. Las reacciones se detuvieron como se especificó en el caso anterior.

Síntesis por control termodinámico de los derivados éster. Se estudiaron las cinéticas de síntesis bajo control cinético de los compuestos Bz-Arg-OC₁₀ y Bz-Arg-OC₁₂ utilizando papaína adsorbida sobre poliamida y ASL como biocatalizadores. En este caso, el dador de acilo (40 mM) fue disuelto en decanol o dodecanol, homogeneizando la mezcla por calentamiento a 50°C con agitación constante hasta la completa solubilización del derivado aminoacídico. Las reacciones fueron iniciadas por el agregado del biocatalizador (100 mg) a 1 ml de la mezcla de reactivos, llevándose luego a cabo en agitación constante (150 rpm) bajo atmósfera de nitrógeno a 50°C para 24, 48 y 72 h de incubación. Los productos obtenidos fueron extraídos según la metodología descripta previamente.

En todos los casos, las muestras fueron filtradas y analizadas por HPLC según las siguientes condiciones: columna Hibar propilciano 100 (250mm×4mm, 5 μm); solvente A, 0,1% (v/v) TFA en H₂O; solvente B, 0,1% (v/v) TFA en CH₃CN/H₂O 80:20; velocidad de flujo 1 ml/min; gradiente de elución 25-95% de B en 25 min; detección a 215 nm. La cuantificación fue realizada a partir de las áreas mediante el método del estándar externo.

Síntesis a escala preparativa de los derivados aminoacil alquilamidas. Purificación de los productos obtenidos

Las reacciones se llevaron a cabo en erlenmeyers cerrados conteniendo 1g de biocatalizador y 10 ml de solución stock de sustratos ya descritas bajo atmósfera de N₂, con agitación orbital (150 rpm) a 37 °C durante 72 h. Las reacciones se detuvieron por filtración del biocatalizador y lavado del mismo con CH₃CN y éter sulfúrico (3×10 ml), a fin de eliminar la alquilamina en exceso, y luego con la mezcla MeOH/H₂O 4:1 para el caso de los derivados de Arg. Para el caso de los derivados de Gly y Ala, el lavado se hizo con MeOH. Los extractos obtenidos fueron concentrados por evaporación del solvente para su posterior purificación por cromatografía.

Purificación de Bz-Arg-NHC_n. Los productos fueron purificados por cromatografía en un Äkta Purifier 10 utilizando SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) como intercambiador catiónico en las siguientes condiciones: solvente A, buffer bórico-borato 0,01 M pH 8,5 con 50% EtOH; solvente B, el mismo que A pero conteniendo NaCl 1 M; lavado de las sustancias no retenidas con 2 volúmenes de columna (VC) de A y elución de los productos con 31% de B (2 VC); detección a 215 y 254 nm. Los productos fueron desalados por sucesivas precipitaciones con etanol.

Purificación de Z-AA-NHC_n. Los productos fueron purificados por cromatografía en silica gel utilizando como fase móvil CH₂Cl₂/MeOH 9:1. La separación fue monitoreada mediante TLC utilizando ninhidrina como revelador.

En todos los casos, los productos fueron caracterizados por espectroscopía de masas ESI.

Resultados y discusión

Se llevó a cabo el estudio de la cinética de síntesis de los mencionados compuestos empleando las enzimas descriptas. Los extractos de papaína y araujaína fueron adsorbidos en poliamida para permitir una purificación del producto más eficiente en caso de que la reacción fuera escalada. ASL es una lipasa que se encuentra naturalmente inmovilizada en las partículas de goma del látex. La síntesis bajo control termodinámico se ensayó en primera instancia para todos los Z-AA-OH. Mediante este enfoque, se obtuvieron moderadamente buenas conversiones para las síntesis de Z-Gly-NHC_n y muy buenas para los derivados Z-Ala-NHC_n (Figura 2 a y b, respectivamente), mientras que no se logró la obtención de Z-Leu-NHC_n debido a la formación de un aducto insoluble entre el dador de acilo y la amina. A fin de mejorar la conversión en la síntesis de Z-Gly-NHC_n y lograr llevar a cabo la reacción de condensación entre el derivado de Leu y las aminas alifáticas, se planteó realizar las síntesis bajo control cinético en estos casos, para lo que fue necesario esterificar los correspondientes donores de acilo. Las reacciones de obtención de los derivados Bz-Arg-NHC_n fueron realizadas bajo control cinético debido a la disponibilidad comercial del donador de acilos (BAEE), el cual es un sustrato clásico para la determinación de actividad enzimática de diversas proteasas de gran aplicación industrial, como papaína y tripsina [8].

En la Figura 2 se puede apreciar la cinética de síntesis bajo control termodinámico de los productos para las reacciones catalizadas por araujaína y papaína adsorbidas en poliamida. El transcurso de las reacciones bajo control cinético para cada derivado Z-AA-OMe a modo de ejemplo se muestra en la Figura 3, en la que también se presenta la formación de los productos secundarios de hidrólisis de cada donador de acilos. En la Tabla 1 se resumen las mejores conversiones en los distintos productos para cada biocatalizador. Dadas las bajas conversiones obtenidas utilizando ASL como biocatalizador en la síntesis de las alquilamidas derivadas de Arg, no se realizaron las reacciones con los demás dadores de acilo.

Para la formación de los productos de condensación Bz-Arg-OC_n, se observó un máximo de conversión en Bz-Arg-OC₁₀ a las 72 hs de 20,7% y en Bz-Arg-OC₁₂ del 8,0% al mismo tiempo de reacción utilizando papaína adsorbida en poliamida. En el caso de ASL, no se observó la formación de productos.

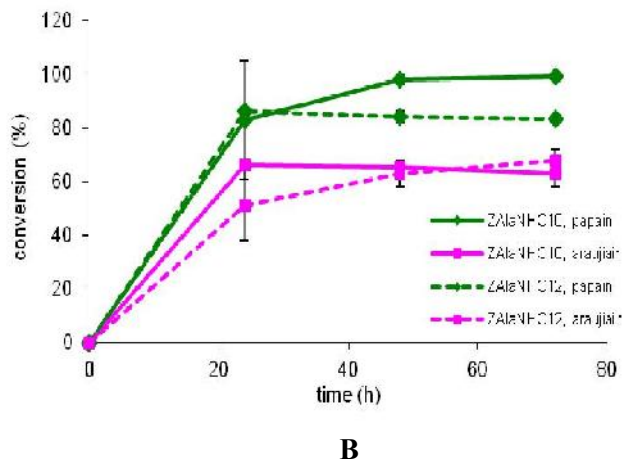
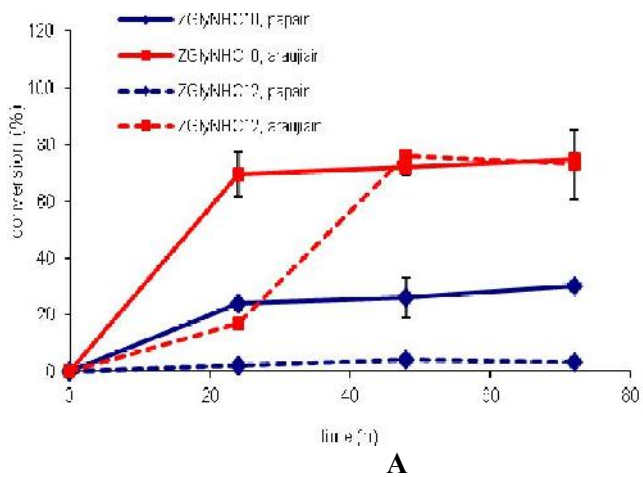


Figura 2. Síntesis bajo control termodinámico. **A.** Síntesis de Z-Gly-NHC_n. **B.** Síntesis de Z-Ala-NHC_n.

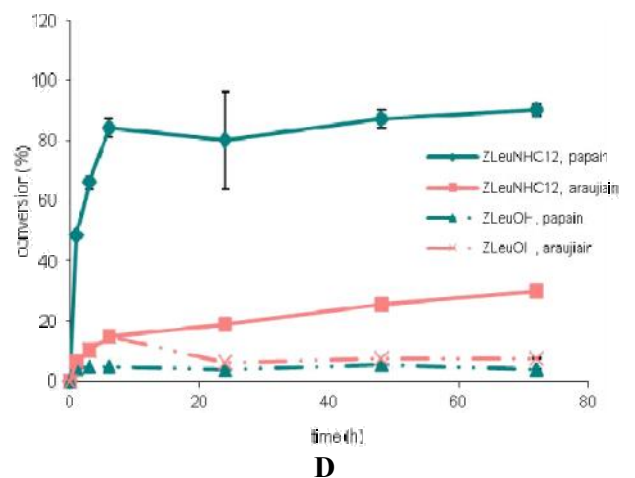
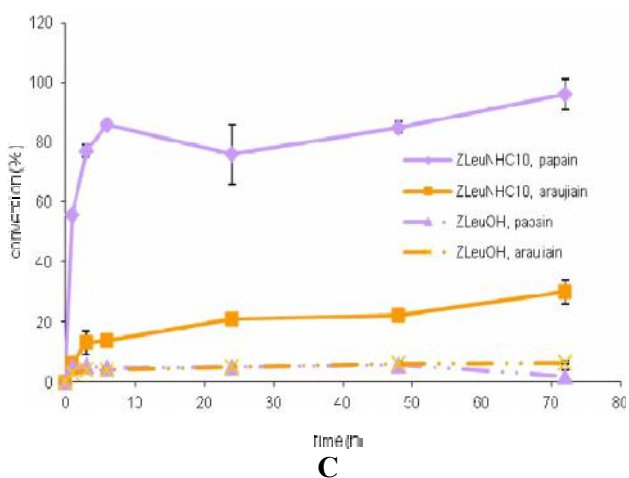
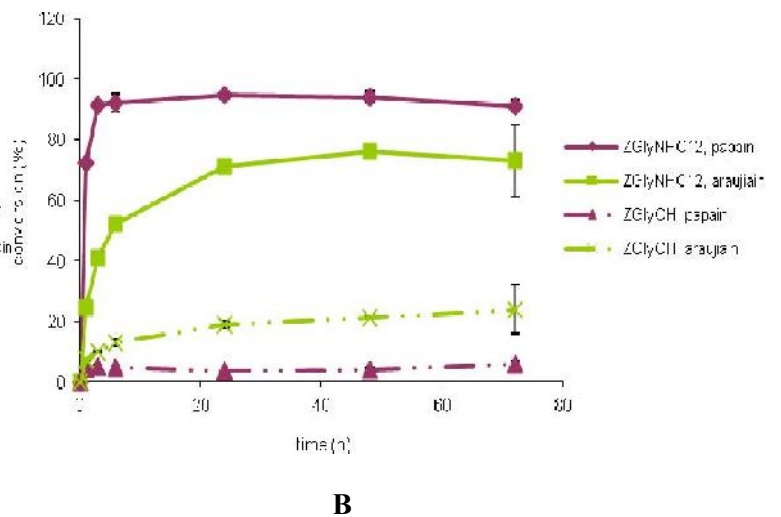
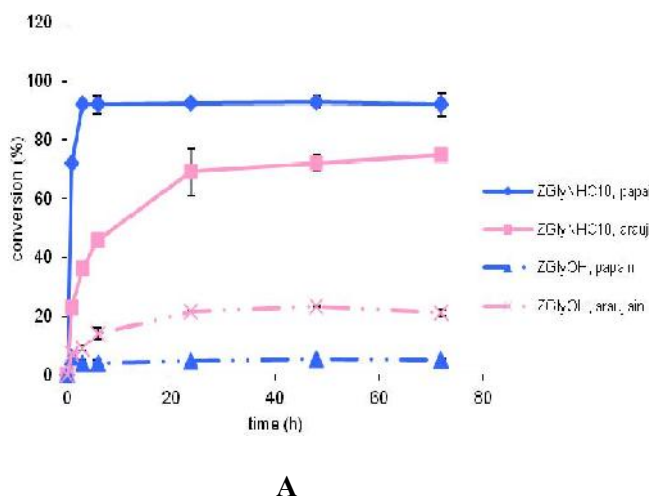


Figura 3. Síntesis bajo control termodinámico. **A.** Síntesis de Z-Gly-NHC₁₀. **B.** Síntesis de Z-Gly-NHC₁₂. **C.** Síntesis de Z-Leu-NHC₁₀. **D.** Síntesis de Z-Leu-NHC₁₂.

Tabla 1. Conversiones máximas de cada compuesto con cada biocatalizador

Enzima	Conversión máxima [%] (Tiempo de reacción [h])							
	Bz-Arg-NHC ₁₀	Bz-Arg-NHC ₁₂	Z-Gly-NHC ₁₀	Z-Gly-NHC ₁₂	Z-Ala-NHC ₁₀	Z-Ala-NHC ₁₂	Z-Leu-NHC ₁₀	Z-Leu-NHC ₁₂
Papaína	98,0% (72 h)	73,0% (72 h)	93,6% (48 h)	94,7% (24 h)	99,1% (72 h)	86,0% (72 h)	86,1% (72 h)	90,8% (72 h)
Araujiaína	60,0% (48 h)	62,0% (72 h)	75,2% (72 h)	76,7% (48 h)	66,8% (72 h)	67,9% (72 h)	22,3% (72 h)	30,6% (72 h)
ASL	36,0% (48 h)	19,0% (48 h)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: No determinado.

El escalado de las reacciones permitió la obtención de cantidad suficiente de productos para su caracterización. Los espectros de masas arrojaron los siguientes resultados: *Bz-Arg-NHC*₁₀, ESI (+)-TOF-MS [M+1] calculada para C₂₃H₄₀N₅O₂: 418,3182; hallada: 418,3188. *Bz-Arg-NHC*₁₂, ESI (+)-TOF-MS [M+1] calculada para C₂₅H₄₄N₅O₂: 446,3495; hallada: 446,3492. *Z-Gly-NHC*₁₀, ESI (+)-TOF-MS [M+1] calculada para C₂₀H₃₃N₂O₃: 349,2491; hallada: 349,2435. *Z-Gly-NHC*₁₂, ESI (+)-TOF-MS [M+1] calculada para C₂₂H₃₇N₂O₃: 377,2804; hallada: 377,2789. *Z-Ala-NHC*₁₀, ESI (+)-TOF-MS [M+1] calculada para C₂₁H₃₅N₂O₃: 363,2648; hallada: 363,2977. *Z-Ala-NHC*₁₂, ESI (+)-TOF-MS [M+1] calculada para C₂₃H₃₉N₂O₃: 391,2961; hallada: 391,3348.

Conclusiones

Se lograron las síntesis de tensioactivos derivados de aminoácidos catalizadas por tres enzimas (papaína, araujaína y ASL). Papaína demostró ser el biocatalizador más eficiente, en tanto que ASL produjo bajos rendimientos en las condiciones ensayadas. Para la síntesis de algunos derivados aminoacídicos fue necesario activar el dador de acilo mediante esterificación de su función carboxilo. Todos los productos de síntesis pudieron ser identificados por espectrometría de masas luego de escalar las reacciones.

Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias a los subsidios PIP 0150 (CONICET) y 11/X-682 (UNLP). Los espectros de masas fueron realizados en la Universidad de Fortaleza (UNIFOR, Ceará, Brasil). MEF es becaria doctoral de CONICET. LM y JMP son becarios posdoctorales de CONICET. SRM es investigadora CONICET.

Referencias

- [1] L. Gardossi, P.B. Poulsen, A. Ballesteros, K. Hult, V.K. Švedas, D. Vasic-Racki, G. Carrea, A. Magnusson, A. Schmid, R. Wohlgemuth, P.J. Halling; Trends Biotech. 28 (2010) 171-180.
- [2] P. Tufvesson, W. Fu, J.S. Jensen, J.M. Woodley; Food Bioprod. Processing 8 (2010) 3-11.
- [3] P.C. Anastas, J.C. Warner en Green chemistry: Theory and practice. Oxford University Press (1998).
- [4] J.A. Castillo, A. Pinazo, J. Carilla, M.R. Infante, M.A. Alsina, I. Haro, P. Clapés; Langmuir 20 (2004) 3379-3387.
- [5] M.C. Morán, A. Pinazo, L. Pérez, P. Clapés, M. Angelet, M.T. García, M.P. Vinardell, M.R. Infante; Green Chem. 6 (2004) 233-240.
- [6] S.R. Morcelle, S. Barberis, N. Priolo, N.O. Caffini, P. Clapés; J. Mol. Catal. B: Enzymatic 41(2006) 117-124.
- [7] M. Brenner, W. Huber; Helvetica Chim. Acta 36 (1953) 1109-1115.
- [8] K.A. Walsh, P.E. Wilcox; Methods Enzymol 19 (1970) 31-41.