

Obtención de nuevos biocatalizadores: inmovilización de la peroxidasa de soja

Javier García Marín

Licenciatura en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Plaza de Ramón y Cajal s/n.
jgmarin@ucm.es

M^a José Hernáiz Gómez-Dégano, Pilar Hoyos Vidal.

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Universidad Complutense de Madrid. Plaza de Ramón y Cajal s/n.
mjhernai@farm.ucm.es

Resumen: hoy en día las biotransformaciones juegan un papel relevante en los procesos de síntesis y obtención de fármacos. Uno de los biocatalizadores más utilizados en el campo de las biotransformaciones son las peroxidasas. Gracias a sus propiedades catalíticas estas enzimas se pueden emplear en la síntesis regio y estereoselectiva de fármacos e intermedios quirales, así como para la fabricación de kits de ELISA y biodetectores. La peroxidasa más empleada por la industria farmacéutica es la de rábano picante (HRP), pero existen otras como la peroxidasa de la soja (SBP) menos estudiada y que sin embargo, presenta muchas ventajas no sólo por los procesos que cataliza, sino porque puede aislarse de un deshecho agroindustrial como es la cáscara de la soja. Los objetivos de este trabajo han sido inmovilizar una SBP purificada a partir de biomasa de soja, comprobar su estabilidad térmica y evaluar su potencial en síntesis orgánica.

Palabras clave: Peroxidasa. Biocatálisis. Soja. ELISA.

INTRODUCCIÓN

Durante la última década ha quedado plenamente demostrada la importancia de la quiralidad no sólo en la interacción de numerosos fármacos con sus correspondientes receptores, sino también en su biodisponibilidad y efectos secundarios, influyendo de una forma muy directa en su eficacia. Existe por tanto un interés creciente por parte de la industria farmacéutica en la preparación de moléculas bioactivas enantioméricamente puras. Asimismo, dado que los requerimientos de sostenibilidad y seguridad de los procesos químicos son cada vez mayores, el desarrollo de procesos sintéticos menos contaminantes y más seguros, a la vez que más económicos, continúa siendo un gran reto para los grupos de investigación.

En este contexto, las enzimas se presentan como biocatalizadores idóneos, debido a su gran regio- y estereoselectividad, que permiten la obtención de eutoméros, los isómeros ópticos provistos de mayor actividad terapéutica. Así mismo son biocatalizadores ideales para abordar rutas sintéticas que emplean numerosos pasos de protección y desprotección de los reactivos, lo que encarece mucho el proceso de síntesis y puede suponer un gran impacto medioambiental. Por otro lado, las enzimas trabajan en condiciones suaves de temperatura, pH y presión, y evitan pasos de protección y desprotección, que encarecen mucho los procesos sintéticos y pueden suponer un gran impacto medioambiental. Si se tiene en cuenta además que son biodegradables y que no generan contaminación ambiental son una herramienta sintética de gran utilidad que cumple con los principios de la química sostenible

Las oxidorreductasas representan aproximadamente el 30% de las enzimas utilizadas por la industria farmacéutica. Dentro de este grupo se encuentra la superfamilia de las peroxidasas, enzimas que catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos empleando H_2O_2 como aceptor de electrones ⁽¹⁾. Las peroxidasas son hemoproteínas que según su filogenia se agrupan en 4 clases, siendo las de la Clase III, glicoproteínas de excreción presentes en plantas ⁽¹⁾. Dentro de esta clase se encuentra la HRP (“horseradish peroxidase”) una peroxidasa muy estudiada a lo largo de las últimas décadas y la SBP (“soybean peroxidase”) una enzima aislada por primera vez de las semillas de soja, menos conocida que la anterior. Si bien la HRP es la peroxidasa más comercializada, no ha sido aplicada exitosamente en procesos industriales por su limitada termoestabilidad y elevado coste de obtención.

Gracias a sus propiedades catalíticas las peroxidasas tienen un gran interés desde el punto de vista químico para la obtención de nuevos fármacos ya que catalizan reacciones de oxidación, hidroxilación, epoxidación, etc. Una de las principales aplicaciones de las peroxidasas es la obtención de alcoholes enantioméricamente puros, que constituyen importantes intermedios sintéticos en la preparación de fármacos quirales tales como el propranolol, un β -bloqueante o el montelukast, un antiasmático.

Pese a los grandes progresos alcanzados en síntesis asimétrica, la resolución cinética de mezclas racémicas (KR) continúa siendo la técnica más empleada en la obtención de alcoholes quirales. La resolución cinética de hidroperóxidos es una metodología que permite la obtención tanto de alcoholes como de hidroperóxidos ópticamente activos. Existen varios métodos para la preparación de hidroperóxidos racémicos pero no para la síntesis de hidroperóxidos quirales. Las peroxidasas pueden reducir selectivamente uno de los dos enantiómeros del hidroperóxido, obteniéndose así un alcohol enantioméricamente puro y por otro lado el enantiómero del hidroperóxido que no ha reaccionado (Fig. 1).

El interés en el estudio de las peroxidasas no reside únicamente en sus aplicaciones sintéticas, sino también en el campo de pruebas-diagnóstico. La aplicación más generalizada de este tipo de enzimas es el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) ⁽¹⁾. Ésta es una técnica de inmunodiagnóstico que permite la detección

de antígenos o anticuerpos de una muestra y su revelado gracias a la reacción que cataliza la enzima conjugada con un anticuerpo. Recientemente se han reportado estudios sobre las ventajas de la SBP frente a la HRP en ELISAs encaminados a la detección de sulfonamidas en alimentos ⁽³⁾.

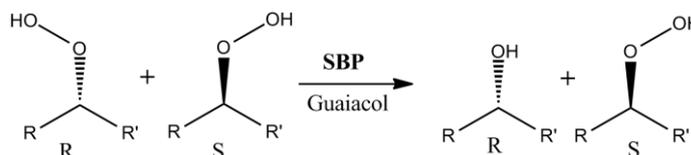


Figura 1. Resolución cinética de hidroperóxidos catalizada por peroxidasa de soja (SBP).

Dado la gran utilidad de las peroxidasas en el campo de la biocatálisis y diagnóstico clínico los objetivos de este trabajo han sido varios. Por un lado se ha procedido a la inmovilización de una SBP purificada por el Dr. Levin, con el fin de mejorar su estabilidad y optimizar su aprovechamiento a nivel industrial. Una vez inmovilizada se han llevado a cabo medidas de actividad, estabilidad térmica y ensayos para evaluar su potencial sintético en el ámbito de la química farmacéutica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estimación cualitativa de la actividad.

Para llevar a cabo una medida cualitativa de la actividad de la SBP se recurrió a un método colorimétrico. La SBP es capaz de catalizar la oxidación del guaiacol en presencia de H_2O_2 formando oligopolímeros coloreados (Fig. 2). La reacción se siguió por espectroscopía UV-Visible. Los ensayos se realizaron en cubetas de 1 mL a las que se adicionaron 10 μ L de H_2O_2 , 1 μ L de enzima y 1 mL de Buffer de reacción.

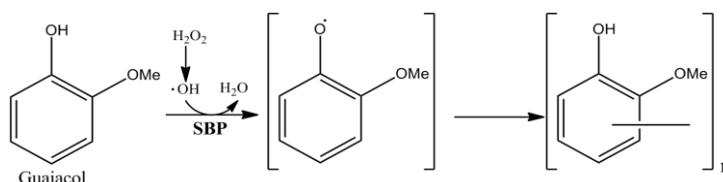


Figura 2. Reacción de polimerización del guaiacol catalizada por la SBP y en presencia de H_2O_2 .

Inmovilización

Sobre un erlenmeyer se mezcló 1 g de resina iónica TEA y 5 mL de solución de PEG al 50%. A continuación el Erlenmeyer se llevó a agitación y se le añadieron 5 g de enzima. Se tomó una muestra de 50 μ L para medir su actividad en UV-Visible, tras 30 minutos se repitió el ensayo. Seguidamente se adicionaron 5 mg de $NaBH_4$. Al cabo de

media hora de agitación se añadieron 5 mL de tampón fosfato a pH 6, el sólido resultante se filtró a vacío y se lavó con el mismo tampón.

Estabilidad térmica

Se introdujeron 5 mg de enzima libre e inmovilizada en tubos eppendorf que se incubaron en estufas eléctricas a 37 y 50 °C. La medida cualitativa de la actividad tras el ensayo se llevó a cabo por el método anteriormente descrito.

Síntesis de hidroperóxidos sustratos de la resolución cinética

Para la síntesis de hidroperóxido de feniletanol se partió de una solución fría de 3 mL de H₂O₂ al 50 % en H₂O y 0,5 mL de H₂SO₄ a la que se adicionaron 2,3 g de feniletanol comercial. La disolución se mantuvo 72 horas en agitación tras las cuales se extrajo la fase acuosa con Et₂O. La fase orgánica se concentró y los productos de reacción se purificaron en una columna de gel de sílice utilizando hexano:EtOAc 9:1 como fase móvil. El producto fue analizado mediante RMN y HPLC empleando una columna quiral (Chiralcell OD-H) (Fig. 3), determinando los tiempos de retención de cada uno de los enantiómeros, con el fin de poder monitorizar las reacciones de KR de dicho compuesto catalizadas por la peroxidasa SBP.

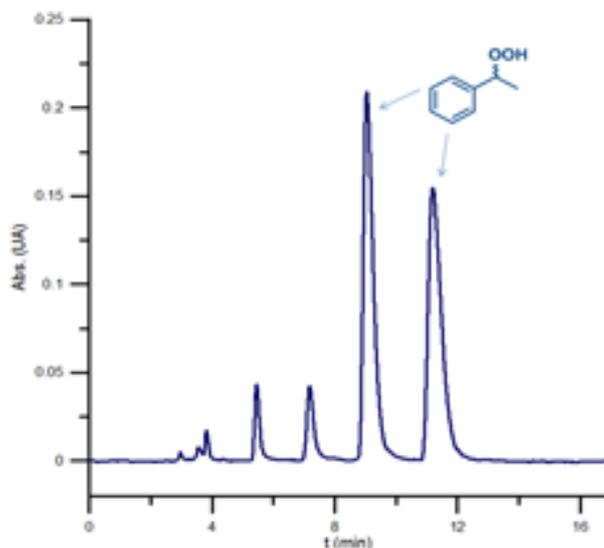


Figura 3. Cromatograma de HPLC del hidroperóxido de feniletanol.

RESULTADOS

La inmovilización de la enzima, tal y como se muestra en la Tabla 1 condujo a un aumento de su actividad tras la inmovilización de 0.44 a 0.89 unidades de absorbancia/min. Los experimentos de estabilidad térmica proporcionaron los resultados reflejados en la Figura 4.

Tiempo (h)	Actividad Enzima libre (Abs/min)		Actividad Enzima inmovilizada (Abs/min)	
	37 °C	50 °C	37 °C	50 °C
0	0.4319	0.4326	0.8813	0.8813
2	0.4763	0.4546	0.8786	0.8285
6	0.1293	0.1316	0.7181	0.8912
24	-	-	0.7128	1.0115

Tabla 1. Resultados de los experimentos de estabilidad térmica de la SBP.

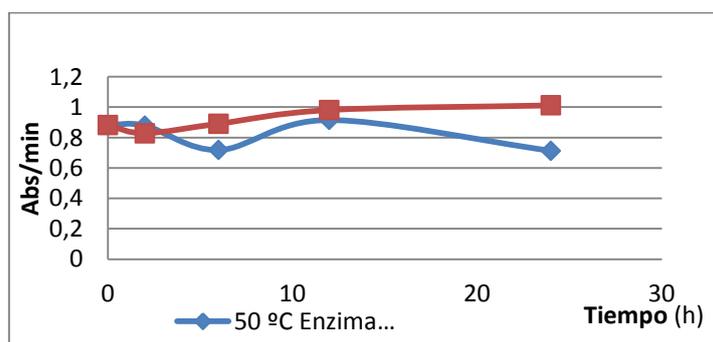


Figura 4. Resultados de la estabilidad térmica de la enzima inmovilizada.

La incubación de la enzima libre a 37 °C y 50 °C suponía una disminución y pérdida de la actividad. Sin embargo el derivado inmovilizado permitió mantener la actividad de la peroxidasa sin apreciarse disminución alguna durante 24 h.

CONCLUSIÓN

La SBP presenta gran estabilidad térmica y actividad óptima durante largos períodos de tiempo.

Hemos conseguido la obtención de un nuevo biocatalizador inmovilizado, altamente termoestable y con actividad duradera, además de presentar mayor actividad a temperaturas de 50 °C.

Para evaluar el potencial sintético de la enzima se llevó a cabo un screening de sustratos con el fin de comprobar cuáles eran reconocidos, siendo uno de ellos los hidroperóxidos secundarios y terciarios. En vista a esto, la línea a seguir será la búsqueda de posibles reacciones de reducción y resolución cinética de hidroperóxidos para la obtención de alcoholes enantioméricamente puros.

Finalmente, dado las propiedades de la SBP, ésta ha sido cedida a la empresa Ingenasa S.L. para el desarrollo de nuevos Kits de ELISA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ayala M, Torres E. Biocatalysis Based on Heme Peroxidases: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts. México: Springer, 2010.
2. Henriksen A, *et al.* Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and heme-apoprotein interactions. *Protein Science*. 2001; 10:108–115.
3. Berlina A.N, Dzantiev B.B, *et al.* Advantages of Soybean Peroxidase over Horseradish Peroxidase as the Enzyme Label in Chemiluminescent Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Sulfamethoxypyridazine.

Recibido: 7 noviembre 2013.

Aceptado: 24 febrero 2014.