



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**“PROCESOS BIOCATALÍTICOS PARA LA
OBTENCIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
ANTIINFLAMATORIA”**

Autor: Mena Gabán, J. A.

DNI: 47463908-G.

Tutora: Hoyos Vidal, P.

Convocatoria: Junio.



1. Resumen:

Los profenos o ácidos 2-arilpropiónicos, constituyen una de las clases más destacadas de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Su actividad antiinflamatoria se debe principalmente al enantiómero *S*, sin embargo la mayoría de estos fármacos se comercializan en forma de racematos. Hoy en día, el método más empleado para su obtención como enantiómeros puros es la resolución cinética, destacando en este ámbito el empleo de estrategias biocatalíticas. Los biocatalizadores (enzimas) exhiben una gran especificidad y tienen la ventaja de llevar a cabo secuencias sintéticas más cortas proporcionando productos más puros. Factores como su eficacia, su respeto con el medio ambiente y menor coste del proceso, ha permitido a la biocatálisis convertirse en una de las estrategias sintéticas más útiles y prometedoras en el desarrollo de fármacos enantioméricamente puros.

2. Introducción y antecedentes:

El hombre siempre ha buscado alternativas para preservar la salud y atenuar el sufrimiento. El dolor, la fiebre y la inflamación, constituyen los síntomas cardinales de la mayoría de las enfermedades, lo que ha llevado a la búsqueda de sustancias que sean capaces de aliviar estas manifestaciones del organismo, que nos anuncian la existencia de alguna alteración fisiológica.

Con relación al dolor, la *Asociación Internacional para el Estudio y Tratamiento del Dolor* (IASP), lo define como una “*experiencia sensorial y emocional displacentera asociada a daño real o potencial o descrita en términos de ese daño*”. El avance en el conocimiento sobre los mecanismos que generan y mantienen el dolor, la fiebre y la inflamación, ha permitido el diseño y desarrollo de fármacos más específicos y selectivos entre los que destacan por su importancia los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)¹.

Los AINEs, son un grupo variado y químicamente heterogéneo. No obstante, tienen en común ser ácidos orgánicos débiles con un pKa de 3 a 5, y tener la capacidad de inhibir con mayor o menor potencia y especificidad las isoformas de la enzima ciclooxygenasa



(COX). Esta acción permite explicar su utilidad terapéutica como analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios.

La ciclooxigenasa es una enzima que se localiza en el retículo endoplasmático y es capaz de sintetizar los principios activos locales de las prostaglandinas (PGs), las prostaciclina (PGI) y tromboxanos (Tx) a partir de la liberación de ácido araquidónico al interior de la célula².

Al comienzo de la década de 1990, se reconocieron diferentes familias de la ciclooxigenasa, y a partir de ellas se identificaron dos isoformas. La COX-1 es una enzima constitutiva, localizada en el retículo endotelial que se expresa en la mayoría de los tejidos y participa en la función fisiológica de los órganos. La COX-2 está considerada una enzima inducible que aparentemente se expresa sólo durante el proceso inflamatorio, localizada en el sistema retículo endotelial y membrana nuclear. No obstante, también es constitutiva en algunos órganos como el riñón, endotelio vascular o útero.

Los AINEs poseen acciones adicionales al mecanismo inhibitorio de las ciclooxigenasas, que favorecen la resolución del proceso inflamatorio, inhibiendo otras enzimas y vías asociadas con la inflamación como, la inhibición de las acciones de la bradikina, modulación en la liberación de citoquinas (IL-1, 6 y TNF), depuración de radicales libres o la activación de la anhidrasa carbónica.

Este grupo de medicamentos se usan clínicamente como analgésicos para el control del dolor de baja a moderada intensidad, como antipiréticos para el control de la fiebre de diversa etiología y como antiinflamatorios en diversos procesos inflamatorios como la bursitis, tendinitis, artritis reumatoide y gota. Sin embargo, es importante señalar que todos los AINEs comparten en mayor o menor medida una serie de efectos adversos como: reacciones de hipersensibilidad, intolerancia gastrointestinal, inhibición de la agregación plaquetaria e inhibición de la función renal (nefrotoxicidad), dependiente de prostaglandinas.

Dentro de las diversas clases químicas de los AINEs, este trabajo tiene como principal objetivo el estudio de metodologías biocatalíticas para la obtención de los ácidos 2 aril-

propiónicos o profenos. Este grupo de fármacos tiene propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas, efectos que se atribuyen a su capacidad para bloquear la biosíntesis de prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina, por inhibición no selectiva de la ciclooxigenasa.

El primer miembro de los profenos que ingresó en el mercado, fue el ibuprofeno. Su relativo éxito, debido a la baja incidencia de efectos adversos, promovió el desarrollo de numerosos compuestos como los que se muestran en la Figura 1: naproxeno, ketoprofeno y flurbiprofeno entre otros.

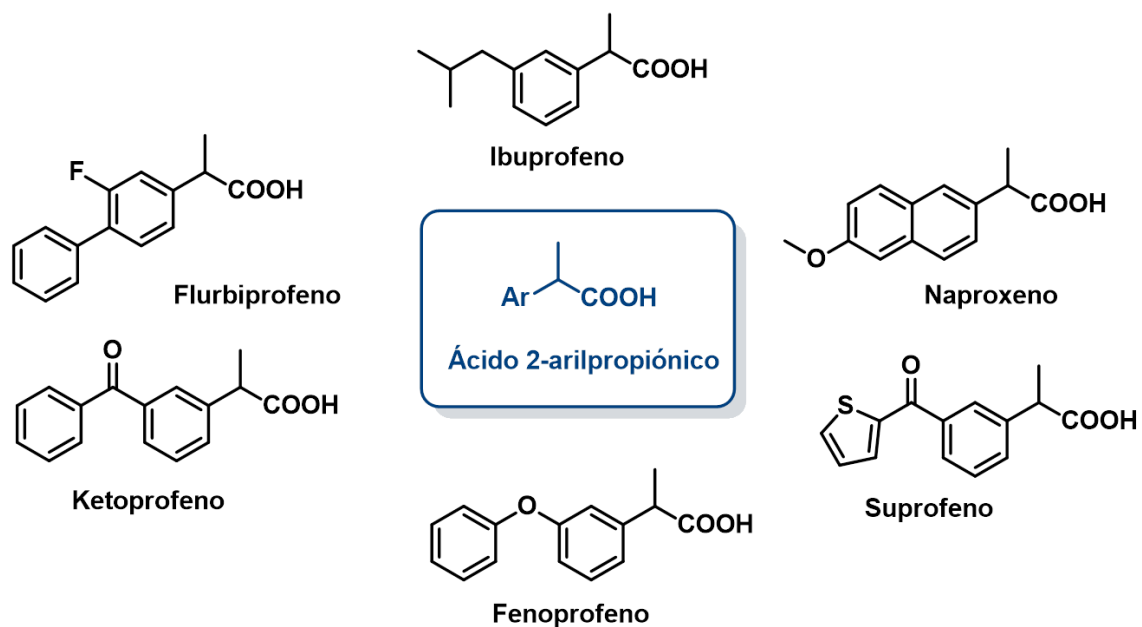


Figura 1: Fármacos más representativos de la familia de los profenos.

Los ácidos 2-aryl propiónicos o profenos presentan un carbono asimétrico adyacente a un ácido carboxílico, pudiendo existir bajo la forma de dos enantiómeros, *R* y *S*.

Muchos receptores del organismo solamente interactúan con las moléculas con una determinada forma enantiomérica, por tanto, la diferencia estructural entre enantiómeros puede ser muy importante con respecto a la acción de fármacos.

Aunque las dos formas enantiómeras de un mismo compuesto, en principio, tienen las mismas propiedades fisicoquímicas, cada uno de los enantiómeros de una mezcla racémica suele presentar distinta farmacocinética, biodisponibilidad y actividad



farmacológica. Por ello, la preparación de fármacos homoquirales tiene un elevado interés en la industria. Esto llevó a introducir los términos de *eutómero* y *distómero*, el primero de los cuales designa al enantiómero más activo y el segundo al que ha mostrado menor actividad biológica. En algunos casos el distómero es inocuo para el organismo, pero en otros muchos puede inhibir el efecto del eutómero, o presentar otra actividad, dañina para el organismo, como ocurre con el conocido caso de la Talidomida³. Puede ser también que el efecto sea producido por sólo uno de ellos, así las acciones analgésicas y anti-inflamatorias de los derivados del ácido 2-aril propiónico se atribuyen, con carácter, casi exclusivo, al enantiómero S^4 .

Sin embargo, ello no implica que la forma R carezca de actividad biológica, porque algunos analgésicos, como los profenos, presentan *inversión quiral*, un proceso generalmente unidireccional, que permite la transformación del enantiómero R “inactivo” en la forma enantiomérica S “activa” responsable de los efectos terapéuticos. Este fenómeno se puede decir que es un proceso metabólico ampliamente variable y fuertemente dependiente del fármaco, de la especie y del estado fisiológico. Además, no debe ser ignorada la contribución potencial de efectos colaterales del enantiómero R^5 .

Por todo ello, la fabricación de la forma activa o enantiómero puro, de muchas sustancias se ha convertido en uno de los objetivos primordiales de la industria farmacéutica.

Existen diversas ventajas potenciales asociadas al uso de productos enantioméricos puros, entre las que se incluyen⁶:

- Un aumento en la selectividad del perfil farmacológico del fármaco.
- La posibilidad de presentar un índice terapéutico mayor (reducción de la dosis administrada y del tiempo requerido para el desarrollo de la acción terapéutica deseada).
- Un perfil farmacocinético menos complejo (disminución de efectos secundarios gastrointestinales directos y de efectos adversos potenciales asociados a la acumulación de ibuprofeno en el tejido adiposo).



Todas estas ventajas muestran con claridad la importancia de la obtención de enantiómeros simples y justifican el interés desarrollado en las últimas décadas por la obtención de ácidos *S* (+)-2-aril propiónicos puros.

3. Objetivos:

El objetivo principal de esta revisión bibliográfica ha sido estudiar los diferentes procesos biocatalíticos para la obtención de compuestos con actividad antiinflamatoria, en concreto la obtención de derivados del ácido arilpropiónico o profenos. En concreto se han estudiado los procesos catalizados por las lipasas de *Candida rugosa* y *Candida antarctica* para la obtención de los eutómeros del Ibuprofeno, Ketoprofeno y Naproxeno.

4. Metodología:

Para la localización de los documentos bibliográficos se utilizaron varias fuentes documentales. Se realizó una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos como PubMed y ScienceDirect utilizando palabras clave como: dolor, antiinflamatorios no esteroideos, ciclooxigenasa, profenos, química verde, biocatálisis, enzimas, hidrolasas y lipasas. También se realizó una búsqueda en internet en el buscador “Google académico” con los mismos términos. Se seleccionaron aquellos artículos que informasen de los antiinflamatorios no esteroideos, en concreto de los profenos y de las formas de obtención de los mismos, que utilizasen técnicas relacionadas con la biocatálisis.

5. Resultados y discusión:

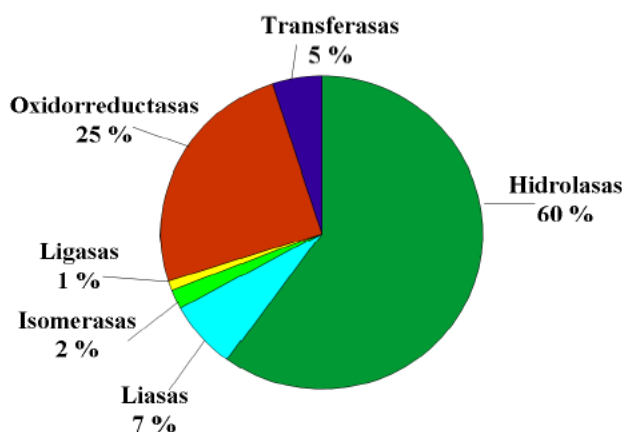
Tal y como se ha mencionado anteriormente, hay un notable interés de la industria farmacéutica en la obtención de compuestos quirales y por tanto de AINEs ópticamente activos. Hoy en día, la biocatálisis se está posicionando como una alternativa realmente eficaz para la obtención de moléculas enantiopuras, ofreciendo además la posibilidad de desarrollar procesos sintéticos más respetuosos con el medio ambiente.

La biocatálisis se puede entender como una disciplina que hace referencia al uso de enzimas aisladas o a complejos multienzimáticos como catalizadores de procesos

altamente estereoselectivos. Las enzimas al ser biocatalizadores de naturaleza proteica tienen como función específica llevar a cabo la catálisis de las reacciones biológicas exhibiendo una gran especificidad y eficiencia termodinámica. Tienen la ventaja de desactivarse y descomponerse en productos más simples totalmente biodegradables. La enantioselectividad, la actividad y la estabilidad de estas enzimas son unos factores esenciales que afectan a la eficacia y costo del proceso. Las enzimas pueden mostrar tres tipos de selectividad⁷:

- *Quimioselectividad*, que consiste en la discriminación selectiva entre dos grupos funcionales de similar reactividad en una molécula frente a un sustrato dado.
- *Regioselectividad*, es la distinción entre dos o más grupos funcionales idénticos y transformación de uno de ellos en función de su posición en una molécula.
- *Estereoselectividad*, transformación preferencial de un estereoisómero frente a otro. En el caso de que el enzima discierna un enantiómero de su imagen especular en una mezcla racémica, se denomina *enantioselectividad*. Si la distinción se produce entre varios diastereoisómeros, se dice que el proceso es *diastereoselectivo*.

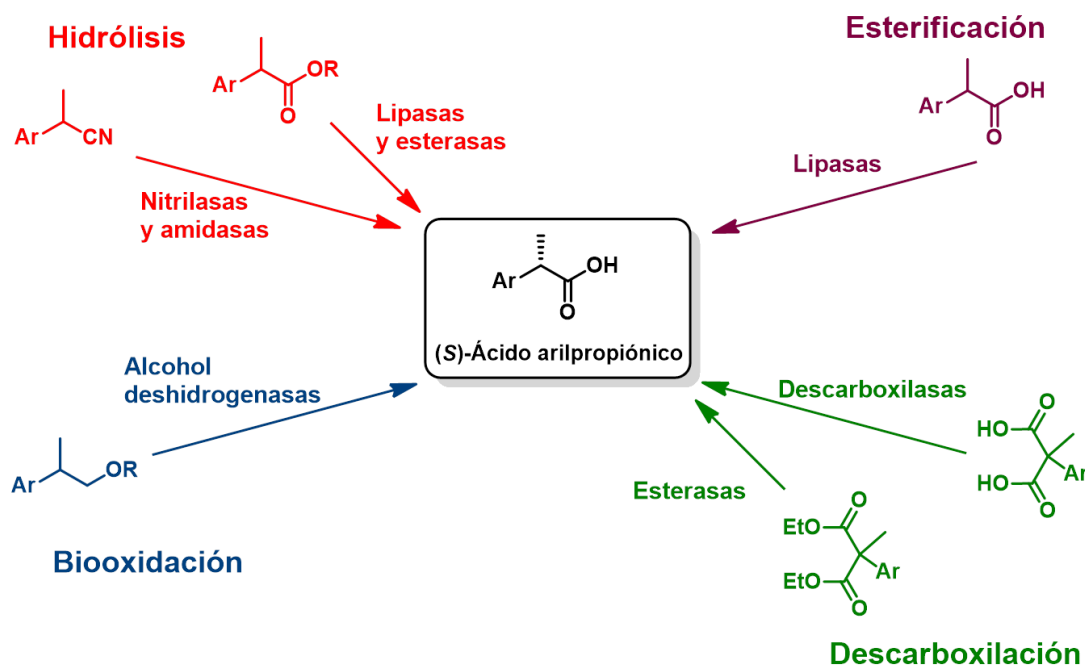
Las enzimas utilizadas como catalizadores de reacciones orgánicas se pueden dividir en seis grupos: oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. Como se muestra en el Esquema 1, la mayoría de los procesos biocatalíticos se desarrollan con la utilización de hidrolasas (60%), seguido de oxidorreductasas (25%), los otros cuatro grupos de enzimas constituyen el 15% restante, pero adquiriendo cada vez mayor importancia⁸.



Esquema 1: Frecuencia del uso de las diversas enzimas como catalizadores químicos.

Existen diversos procesos biocatalíticos descritos que conducen a la preparación de derivados del ácido 2-arilpropiónico de forma estereoselectiva mediante el uso de diferentes enzimas, tal y como se muestra en el Esquema 2. Dado que las hidrolasas constituyen el grupo más extenso de biocatalizadores empleados en la industria, a continuación se discutirá su aplicación en la preparación de enantiómeros puros de los AINEs más utilizados. En concreto se comentarán los procesos más destacados catalizados por lipasas, ya que son los más eficaces en este ámbito.

Dentro del grupo de las hidrolasas, una de las más representativas son las lipasas, enzimas cuya función biológica consiste en catalizar la hidrólisis de ésteres insolubles en agua, de forma regio- y enantioselectiva. Las lipasas se diferencian del resto de hidrolasas en que incrementan su actividad catalítica cuando se encuentran en una interfase agua/lípido. Este fenómeno se conoce como *activación interfacial*. Cuando se utilizan en medios orgánicos, su nucleófilo natural (el agua) puede ser reemplazado por otros como alcoholes, peróxidos o amoníaco, lo que permite llevar a cabo con éxito una gran cantidad de transformaciones sintéticas.



Esquema 2: Procesos biocatalíticos para la obtención de ácidos arilpropiónicos quirales.



Algunas de las lipasas microbianas más utilizadas para la obtención de productos de interés farmacéutico como los AINEs, son las lipasas de *Candida antártica* y *Candida rugosa* o *Candida cylindracea*.

La utilización de este tipo de biocatalizadores en síntesis presenta una serie de ventajas:

1. Son catalizadores eficientes, que actúan en intervalos de temperatura moderada (20-40°C) y presión atmosférica, minimizando los problemas de epimerización, racemización e isomerización que puedan ocurrir.
2. Presentan una elevada regio-, quimio- y enantioselectividad.
3. Su actividad no queda restringida a sus sustratos naturales.
4. Pueden catalizar un extenso abanico de reacciones, incluso llevar a cabo reacciones sobre grupos no activados del sustrato.
5. Principalmente las hidrolasas, presentan actividad catalítica en medios orgánicos, lo que permite la transformación de sustratos hidrofóbicos.
6. Los biocatalizadores pueden ser inmovilizados, lo que aumenta su actividad en determinados casos, y reutilizados en diferentes ciclos.
7. Las reacciones biocatalizadas son altamente compatibles con el medio ambiente, cumpliéndose los principios de la Química Sostenible.
8. Contribuyen al desarrollo de procesos ambientalmente benignos para la obtención de productos de alto valor añadido.
9. Los biocatalizadores son biodegradables.
10. Las enzimas pueden ser sobreexpresadas, haciendo los procesos biotecnológicos económicamente eficientes. La sostenibilidad de un proceso incluye la energía y materia prima utilizadas, las pérdidas de rendimiento son productos secundarios, la seguridad del proceso y la calidad del producto.

A pesar del gran desarrollo que ha experimentado la biocatálisis durante los últimos años, existen algunos inconvenientes, como la baja estabilidad que experimenta la enzima en condiciones drásticas (temperaturas elevadas, pHs extremos o presencia de disolventes orgánicos), o la necesidad de utilizar un cosustrato o cofactor, lo que aumenta el coste del proceso. Estos son factores que han de tenerse en cuenta.



Sin embargo, estos problemas pueden solucionarse gracias a técnicas como la inmovilización enzimática, sistemas eficientes de regeneración del cofactor y el desarrollo de nuevas enzimas más estables mediante ingeniería genética.

La inmovilización de las lipasas sobre soportes insolubles permite un fácil control de la reacción, evitando la contaminación del producto y, permitiendo su reutilización a lo largo de muchos ciclos de reacción, ya que al quedar inmovilizado en un soporte sólido su recuperación del medio de reacción resulta sencilla. Por tanto, un adecuado proceso de inmovilización puede convertirse en un prometedor método para mejorar las propiedades catalíticas de las lipasas. Dentro de los tipos de inmovilización, la adsorción física de las lipasas sobre soportes hidrófobos se caracteriza por ser un método eficiente y simple.

Además, los avances en biología molecular e ingeniería genética han permitido el desarrollo de técnicas como procesos de *evolución dirigida*, mediante los que se consiguen biocatalizadores más específicos, aumentando su actividad, su resistencia y su enantioselectividad. La utilización de enzimas puras mejoraría también los catalizadores industriales, pues permitiría obtener derivados inmovilizados mucho más activos. Todo esto hará que en un futuro se incremente enormemente la implementación de procesos biocatalíticos en la industria.

La entrada de este tipo de rutas alternativas a la química tradicional es muy atractiva tanto desde el punto de vista económico como por motivos medioambientales de la Química Sostenible (*Green Chemistry*)⁹. Según la *US Environmental Protection Agency* (EPA), la química sostenible consiste en “*el uso de la química para la prevención de la contaminación, y el diseño de productos químicos y procesos benéficos para el ambiente*”. Se plantearon una serie de principios para conseguir objetivos como: utilizar materias primas renovables, catalizadores, disolventes y condiciones seguras de reacción.

A parte de la biocatálisis, hay varios métodos ampliamente utilizados para obtener compuestos puros: a partir de fuentes naturales, síntesis asimétrica y resolución de mezclas racémicas¹⁰.



En la síntesis a partir de fuentes naturales (reserva quiral, “*chiral pool*”), se emplean como sustancias de partida compuestos enantiopuros de origen natural relativamente baratos y renovables, cuya quiralidad se retiene en los productos finales a través de sucesivas reacciones con reactivos quirales en procesos de estereoquímica controlada. El principal inconveniente está relacionado con la disponibilidad en la mayoría de los casos de un único enantiómero de las sustancias de partida, siendo el contrario normalmente extremadamente caro o no asequible.

Por otro lado, la síntesis asimétrica consiste en la generación preferente de un enantiómero cuando se forma un nuevo centro estereogénico en reacciones llevadas a cabo en un ambiente quiral. Sintetizar un compuesto con un rendimiento químico alto y con una pureza enantiomérica elevada, rebajando los costes del proceso (reduciendo los tiempos y los requerimientos energéticos de la reacción o disminuyendo el número de pasos de la ruta sintética), son factores que en su conjunto expresan la rentabilidad y eficiencia en la obtención del producto deseado. Teniendo en cuenta estos parámetros, si bien la síntesis asimétrica de los ácidos *S* (+) 2-arilpropiónicos es técnicamente viable, la metodología no resulta rentable ya que requiere reactivos de elevado coste, consume mucho tiempo y no proporciona un rendimiento aceptable del enantiómero puro para su comercialización posterior.

Por último, la resolución cinética (KR, *Kinetic resolution*), consiste en la separación total o parcial de dos enantiómeros de una mezcla racémica. Se basa en la diferente velocidad de reacción de cada uno de los dos enantiómeros de un racemato con un agente quiral (un reactivo, un biocatalizador, etc). La diferencia de la velocidad de reacción es tan elevada que uno de los enantiómeros reacciona rápidamente para dar el producto correspondiente mientras que el otro enantiómero no reacciona y puede ser recuperado al final de la reacción. El rendimiento máximo que se puede obtener en una resolución cinética es de tan sólo el 50%. Aunque en la mayoría de ellas, la reacción no para sino que solamente se ralentiza. Se han realizado diferentes esfuerzos para superar esta limitación y obtener productos con la misma pureza enantiomérica pero con un rendimiento mejorado, lo que ha llevado a la evolución de la resolución cinética hasta la resolución cinética dinámica (DKR, *Dynamic kinetic resolution*), que combina la



resolución con la racemización *in situ* del enantiómero sin reaccionar de modo que puede sobrepasarse el 50% del rendimiento máximo de la KR.

Los procesos de KR catalizados por lipasas han sido las metodologías biocatalíticas empleadas con mayor éxito en la obtención de ácidos 2-arilpropiónicos quirales. Están descritas diferentes estrategias biocatalíticas para la obtención del enantiómero *S* puro mediante el empleo de distintos tipos de enzimas. Como se detallará en los siguientes apartados, de manera general, se pueden considerar dos mecanismos para la obtención del ácido *S* mediante una resolución enzimática:

- *Esterificación* estereoselectiva directa en un medio orgánico. El isómero *S* biológicamente activo se convertiría al éster *S*, seguida de una hidrólisis adicional para recuperar el compuesto activo en forma ácida.
- *Hidrólisis* estereoselectiva del éster sintetizado químicamente. El enantiómero *S* se produce selectivamente a partir del éster racémico sintetizado químicamente.

Ambos procesos involucran dos pasos para la obtención del isómero *S*. La hidrólisis, es un proceso relativamente sencillo, mientras que la esterificación, está limitada a escala de laboratorio porque la actividad enzimática y el grado de conversión son muy sensibles al contenido de agua presente en la reacción.

A continuación, se explican una serie de ejemplos de procesos biocatalíticos catalizados por las lipasas anteriormente citadas para la obtención de distintos ácidos 2-arilpropiónicos, como ibuprofeno, ketoprofeno y naproxeno.

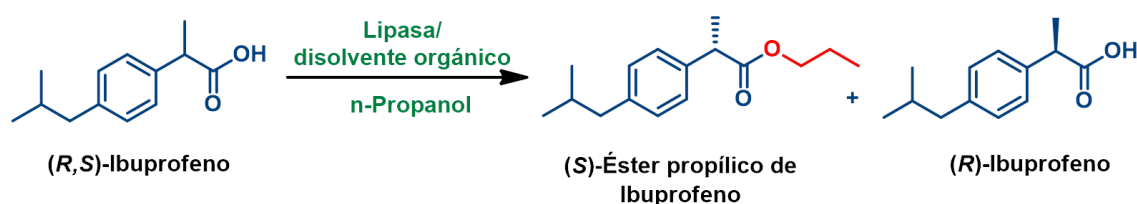
5.1. Ibuprofeno:

El ibuprofeno es un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (AINE), usado en el tratamiento de dolor de cabeza, artritis reumatoide, cefalea y tensión muscular. El enantiómero *S* del ibuprofeno posee el efecto terapéutico deseado, siendo 160 veces más activo que su enantiómero *R*, además este último puede causar efectos secundarios que afectan al tracto gastrointestinal¹¹.

Numerosos estudios tienen como objetivo principal la producción del enantiómero *S* del ibuprofeno, destacando para ello el método que emplea la inmovilización de la lipasa de

Candida rugosa en un polímero de sefarosa mediante adsorción física. La inmovilización sobre el polímero desencadena una hiperactivación de la enzima, lo cual, se puede atribuir a la fijación de la estructura abierta de la enzima a la superficie hidrófoba del soporte. Se consigue un rendimiento excelente en la inmovilización, proporcionando una actividad siete veces mayor a la del enzima libre.

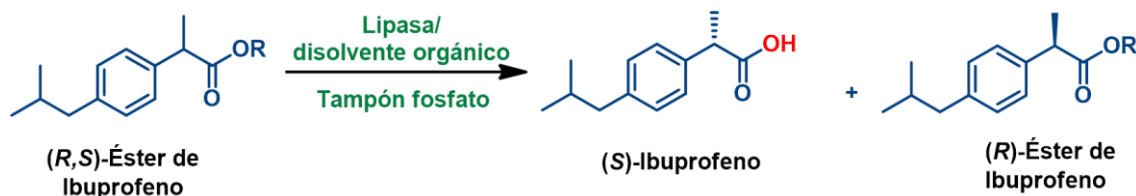
Este derivado inmovilizado es utilizado en la obtención del enantiómero *S* mediante las dos reacciones anteriormente citadas (esterificación e hidrólisis). Para desarrollar la *esterificación estereoselectiva* el ibuprofeno racémico es disuelto en isooctano en presencia de *n*-propanol y la lipasa inmovilizada de *Candida rugosa*. Este biocatalizador lleva a cabo la esterificación del ácido *S*, de manera que se obtienen como productos el *R*-ibuprofeno y el *S*-éster propílico de ibuprofeno (Esquema 3). De la hidrólisis posterior de éste último se obtiene el producto deseado.



Esquema 3: Esterificación enantioselectiva del ibuprofeno racémico catalizado por la lipasa.

Por otro lado en la *hidrólisis estereoselectiva* se utilizan como sustrato ésteres racémicos de ibuprofeno, disueltos en tampón fosfato, en presencia de un disolvente orgánico y la lipasa inmovilizada, obteniendo el *S* ibuprofeno deseado directamente y el *R* éster de ibuprofeno (Esquema 4). El disolvente orgánico y el tampón fosfato como fase acuosa hacen que se forme la interfase agua/lípido aumentando de esta forma la actividad catalítica de la enzima. Además, hay que destacar la importancia de la influencia de la longitud de la cadena del éster en la optimización de la reacción de hidrólisis. Se realizaron diversos estudios con diferentes longitudes de cadenas de ésteres para ver el efecto que producían en los parámetros de la reacción tales como la conversión y la enantioselectividad. Obteniendo que a medida que las cadenas eran más largas, la enzima poseía mejor enantioselectividad. Este hecho se debe a que los sustratos naturales de las lipasas son ácidos grasos de cadena larga, y por lo tanto cuanto

más se asemeje la estructura del éster del ibuprofeno a su sustrato natural mejor actividad tendrá la enzima.



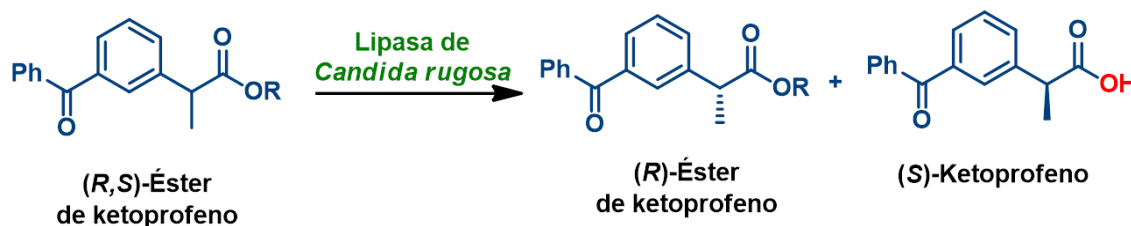
Esquema 4: Hidrólisis enantioselectiva de esteres racémicos catalizado por la lipasa.

La ventaja que tiene la hidrólisis frente a la esterificación estereoselectiva es que en la primera se obtiene un mayor porcentaje del *S* ibuprofeno mientras que en la segunda al tener que realizar un posterior proceso de hidrólisis del éster existe la posibilidad de perder el compuesto enantioméricamente puro y con ello que disminuya el rendimiento de la reacción.

5.2. Ketoprofeno:

El ketoprofeno (ácido 2-(3-benzoilfenil) propiónico), al igual que el ibuprofeno, pertenece a la familia de los profenos, cuyos dos enantiómeros presentan diferentes actividades biológicas. Su actividad antiinflamatoria se debe principalmente al enantiómero *S*, mientras que el *R* además de tener muy poca actividad, en algunos casos, incluso tiene efectos secundarios. Actualmente, se produce por síntesis química en grandes cantidades y se comercializa como una mezcla de sus estereoisómeros¹².

Hay distintos enfoques para la obtención del *S* ketoprofeno, entre ellos destaca, la hidrólisis enantioselectiva del éster de ketoprofeno, utilizando la lipasa inmovilizada de *Candida rugosa* (Esquema 5). Se han realizado numerosos intentos para incrementar la actividad, enantioselectividad y estabilidad, como la purificación de la lipasa usando aditivos, tratando la lipasa con disolventes orgánicos e inmovilizando la lipasa. En los últimos estudios encontrados, se plantea un nuevo método en la inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa*, sobre un soporte sensible al pH, mediante el cual, se mejora la actividad, enantioselectividad y estabilidad de la lipasa.



Esquema 5: Hidrólisis enantioselectiva del éster de ketoprofeno.

Existen dos factores en este proceso y que van a condicionar la cantidad de S-ketoprofeno obtenido: el pH del soporte en el que se inmovilice la lipasa y la conformación de la enzima.

La lipasa de *Candida rugosa* presenta solubilidad reversible dependiente del pH. Valores por debajo del valor crítico de pH producen una mayor cantidad de enzima inmovilizada soluble, con lo que se tiene una mayor enantioselectividad. Para obtener ese pH ácido por debajo del valor crítico se emplean soportes sensibles al pH como son el tercpolímero de ácido metacrílico, acrilamida o anhídrido maleico que permiten variar el pH hasta obtener el deseado y con ello aumentar la actividad de la enzima produciendo la hidrólisis del R,S-éster de ketoprofeno obteniendo enantioselectivamente el S-ketoprofeno.

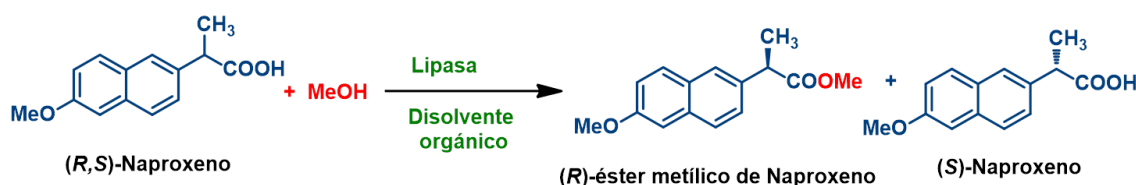
El segundo factor que nos va a afectar es la conformación que adopte la enzima durante la inmovilización ya que puede dar lugar a pérdidas de actividad. En el caso de tener los polímeros citados anteriormente, se produce una unión covalente entre los grupos anhídridos del polímero y los grupos amino de la enzima que dan lugar a la conversión de la conformación cerrada de la enzima a la abierta favoreciendo así su actividad.

Por lo tanto empleando este método de inmovilización de la lipasa en un soporte pH sensible se muestra una mejora significativa de la enantioselectividad en la hidrólisis biocatalítica de ésteres de ketoprofeno. El uso de la enzima inmovilizada como biocatalizador, hace que el proceso para la obtención del S ketoprofeno enantiopuro sea más simple y práctico. Este es un método selectivo de inmovilización donde la actividad de la lipasa es fuertemente dependiente del pH, exhibiendo una mayor actividad bajo condiciones ácidas.

5.3 Naproxeno:

El naproxeno (ácido 2-(6-metoxi-2-naftil) propiónico), es también un antiinflamatorio no esteroideo que pertenece a la familia de los ácidos 2-arilpropiónicos. La actividad fisiológica del enantiómero *S* del naproxeno es 28 veces mayor que la del enantiómero *R*, por tanto, sólo la forma *S* es activa en los seres humanos¹³.

Diversos equipos de investigación han estudiado la esterificación directa del naproxeno en un disolvente orgánico, en presencia de la lipasa con estereopreferencia *R* (Esquema 6). Éste es un método destacable, porque no requiere derivatizaciones preliminares y el eutémero se recupera como sustrato sin reaccionar. Sin embargo, este método necesita alcanzar valores de conversión mayores del 50% y por tanto, son necesarias unas condiciones irreversibles, es decir haciendo reaccionar el racémico del naproxeno con las lipasas en un disolvente orgánico. De lo contrario, el agua producida en la reacción de esterificación, favorece la hidrólisis de la forma enantiomérica preferencial provocando un descenso del exceso enantiomérico del éster (forma *R*) y del ácido sin reaccionar (forma *S*).

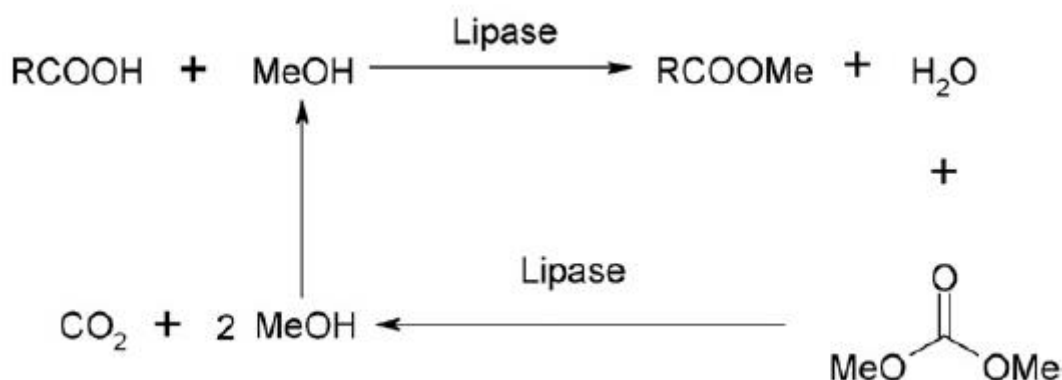


Esquema 6: Esterificación biocatalítica del naproxeno.

Para conocer que lipasa posee *R* estereopreferencia, se sometió al naproxeno a una esterificación en presencia de las lipasas inmovilizadas de *Candida antártica* (Novozym 435®) y *Mucor meihei* y de las lipasas no inmovilizadas de *Candida rugosa* y *Rhizomucor meihei*, utilizando éter isopropílico como disolvente y metanol como agente acilante. Las lipasas catalizaron la esterificación del naproxeno, pero solo Novozym 435® mostró la estereopreferencia *R* deseada.

Con la intención de mejorar la enantioselectividad de Novozym 435® en la esterificación del naproxeno, la reacción se llevó a cabo en diferentes disolventes; de las reacciones realizadas en acetonitrilo y cloroformo se obtuvieron los mejores resultados en términos de enantioselectividad. Aunque en cloroformo la velocidad de reacción es mayor que en acetonitrilo, éste último fue elegido como disolvente para otros experimentos por su menor toxicidad.

El procedimiento irreversible contempla el uso de un carbonato de dialquilo para que se consuma el agua producida durante la reacción de esterificación. Al reaccionar el carbonato de dimetilo con el agua se forma metanol, éste es el reactivo utilizado para esterificar el grupo ácido y obtener el producto deseado. El acoplamiento de las dos reacciones catalizadas por la lipasa trabajando de manera sinérgica permite un mayor rendimiento, se lleva a cabo como se muestra en la Esquema 7.



Esquema 7: Representación del proceso de esterificación irreversible.

En una etapa inicial, la lipasa cataliza la esterificación reversible del ácido, generando el éster y agua. Al mismo tiempo, el agua producida hidroliza el carbonato de dialquilo en presencia de la lipasa y como consecuencia se generan CO₂ y dos moléculas de metanol permitiendo la progresión del proceso de esterificación de manera irreversible.

Con esta intención se añadió el carbonato de dimetilo a una solución de naproxeno en acetonitrilo. Este proceso se ha aplicado con éxito para obtener el *S*-Naproxeno. En estas condiciones de reacción, ni la formación del éster de naproxeno ni la hidrólisis de carbonato de dimetilo se observó en ausencia de Novozym 435®.



6. Conclusiones:

En los últimos años, se han desarrollado multitud de procesos biocatalíticos en la obtención de profenos empleando como base metodologías ya conocidas, pero aumentando la eficiencia en la síntesis de compuestos enantioenriquecidos de interés. Las lipasas de *Candida antarctica* y *Candida rugosa* han sido muy utilizadas. Debido a sus propiedades, estas lipasas permiten obtener fármacos con una alta pureza enantiomérica. Adicionalmente, se prefiere la aplicación de la resolución cinética enzimática desde un punto de vista ambiental y económico, debido a que las reacciones catalizadas enzimáticamente no requieren condiciones de reacción tan drásticas, lo que las hace significativamente menos tóxicas.

En resumen, hay muchos factores de reacción diferentes que influyen en la eficacia de la esterificación e hidrólisis de profenos. Es necesario optimizar los métodos de resolución cinética de profenos para obtener productos enantioméricamente puros. Sin embargo, no hay posibilidad de encontrar un sistema catalítico universal para todas las síntesis, y por lo tanto cada proceso enzimático requiere una solución individual.

7. Bibliografía:

1. Mendoza Patiño, N. (2008). Farmacología media/ Medical Pharmacology. Editorial Médica Panamericana.
2. Igarza, L., & Soraci, A. (2007). Ácidos aril-2-propiónicos o profenos. *Médicas UIS*, 20, 31-46.
3. Vargesson, N. (2015). Thalidomide induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*.
4. Álvarez, C. Á., & Durán, J. J. T. (2002). Influencia del enantiomorfismo en la solubilidad y velocidad de disolución de distintos fármacos racémicos (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
5. José, C. (2013). Resolución biocatalítica de enantiómeros del ibuprofeno (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas).



6. Fernández, R. F., de la Real, E. S. P., & de Sevilla, A. S. D. C. La catálisis asimétrica en el marco de la química sostenible del siglo XXI.
7. Cuetos Fernández, A. (2013). Empleo de polifosfacenos como soportes enzimáticos. Preparación de compuestos enantioenriquecidos mediante procesos biocatalíticos tándem o dinámicos.
8. Hernáiz, M. J. (2012). Biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos (I) enzimas hidrolíticas. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.
9. Castro, N. P. P., & Verbel, J. T. O. (2011). Química verde: un nuevo reto. Ciencia e Ingeniería Neogranadina, 21(2), 9.
10. Matute, B. M. (2006). Resolución cinética dinámica catalizada por enzimas y metales de transición. In Anales de la Real Sociedad Española de Química (No. 4, pp. 46-52). Real Sociedad Española de Química.
11. Yousefi, M., Mohammadi, M., & Habibi, Z. (2014). Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 104, 87-94.
12. Liu, Y. Y., Xu, J. H., Wu, H. Y., & Shen, D. (2004). Integration of purification with immobilization of *Candida rugosa* lipase for kinetic resolution of racemic ketoprofen. Journal of biotechnology, 110(2), 209-217.
13. Morrone, R., D'Antona, N., Lambusta, D., & Nicolosi, G. (2010). Biocatalyzed irreversible esterification in the preparation of S-naproxen. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, 65(1), 49-51.