



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
“BIOCATÁLISIS COMO HERRAMIENTA EN
EL DESARROLLO SOSTENIBLE DE
FÁRMACOS”

Autor: Morales Biezma, Inmaculada

Fecha: Junio 2019

Tutor: Hoyos Vidal, María Pilar

ÍNDICE

Resumen.....	3
Introducción.....	3
Objetivos.....	7
Materiales y métodos.....	7
Resultados y discusión.....	8
1. Oxidorreductasas.....	8
1.1. Atazanavir.....	9
1.2. Atorvastatina.....	10
1.3. Buspirona.....	12
1.4. Inhibidor de la proteasa de rinovirus.....	12
2. Hidrolasas.....	14
2.1. Atenolol.....	14
2.2. Atorvastatina.....	15
2.3. Captopril.....	15
2.4. Clopidrogel.....	16
2.5. Profenos.....	17
Conclusiones.....	18
Bibliografía.....	19

RESUMEN

Desde finales del siglo XX hasta hoy se ha hecho más presente la palabra biocatálisis en el entorno científico, y, aunque aún muchas personas desconocen su significado, supone una alternativa verde a la química orgánica tradicional. No solo la industria farmacéutica ha hecho una gran acogida a este método, sino también la agroquímica, la industria cosmética o la alimentaria entre otras. La catálisis enzimática reúne una serie de ventajas que la hacen muy atractiva, ecológica y sosteniblemente, como: el uso de enzimas procedentes de microorganismos, mayor enantio- y regioselectividad, aumento en la seguridad tanto del producto final como durante la reacción, menor generación de residuos y productos secundarios, mayor aprovechamiento de los recursos y disminución de la duración de los procesos. Además, el uso de esta técnica cumple la mayoría de los doce principios establecidos por la química sostenible.

Las enzimas más empleadas en la industria de la síntesis de ingredientes farmacológicamente activos, hidrolasas y oxidorreductasas, son las que se investigan en este trabajo. Por ejemplo, las lipasas, herramientas muy versátiles con las que actualmente se producen fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antihipertensivos o beta- bloqueantes cardiosselectivos, favorecen la formación de la molécula con actividad y evitan la que acarrea efectos no deseados.

Palabras clave: *biocatálisis; enzimas; química sostenible; oxidorreductasas; lipasas; selectividad.*

INTRODUCCIÓN

En los años ochenta del siglo pasado surgió una inquietud sobre la enorme cantidad de residuos generados por la industria farmacéutica. La producción de fármacos se distingue desde ese momento hasta nuestros días por dos objetivos principales: la necesidad imperiosa de disminuir la proporción de desechos, al menos en un orden de magnitud, y la obtención de nuevas moléculas, cada vez más complejas, que reúnan las siguientes características: menor dosis necesaria, menor toxicidad y mayor selectividad.¹

El concepto de "química sostenible o química verde" nace ante la exigencia de disminuir el impacto ambiental en los procesos de fabricación de fármacos.

Esta nueva metodología de una química sostenible se sostiene en 12 principios básicos, nombrados a continuación:

- 1.- Prevención antes que remediación: evitar la formación del residuo, ya que, *a posteriori* es más difícil la eliminación o el reciclaje de este.
- 2.- Economía atómica: maximizar la eficiencia del proceso aprovechando los reactivos y completando, también, el objetivo del punto 1.
- 3.- Métodos que conduzcan a una menor toxicidad: los productos obtenidos tienen que suponer un menor riesgo para el hombre y para el medio ambiente.
- 4.- Originar moléculas eficaces y seguras.

- 5.- Reducir el uso de reactivos y auxiliares: prescindir de aquellos que se pueda y garantizar la inocuidad de los empleados.
- 6.- Eficiencia del proceso: disminuir el consumo energético.
- 7.- Uso de materias primas renovables preferiblemente.
- 8.- Síntesis corta: evitar la derivatización (formación de derivados).
- 9.- Reactivos catalíticos antes que reactivos estequiométricos: se potenciará la catálisis.
- 10.- Diseño de productos biodegradables.
- 11.- Metodologías analíticas para evitar la contaminación: monitorización de la reacción controlando los puntos críticos.
- 12.- Minimizar los potenciales accidentes químicos.^{2,3}

Para que esta idea sea factible son necesarios métodos que puedan hacer realidad estos requerimientos, y la biocatálisis es una opción que engloba muchos de los principios anteriores. Este término hace referencia al uso de enzimas para llevar a cabo algunos pasos de las reacciones de síntesis de moléculas, concluyendo siempre en una química alternativa, más limpia, capaz de aprovechar mejor los recursos y producir menos material de deshecho.⁴

Los procesos biocatalíticos son más respetuosos con el medio ambiente, sostenibles y rentables, por lo que, la biocatálisis está probando ser la clave para la llamada 'bieconomía'.⁵ Está considerada como una tecnología verde capaz de distinguir entre isómeros en una mezcla racémica y bajo condiciones suaves de reacción, en comparación con la química orgánica tradicional donde las resoluciones de sales incluyen contaminantes y son costosas. Además de la enantio- y regioselectividad de esta técnica, los cursos de las reacciones se hacen más cortos, al ser prescindibles los pasos de protección y desprotección de algunos grupos.⁶

Las enzimas, por tanto, son la solución emergente a causa de su elevada capacidad para activar las reacciones y llevar a cabo la resolución de sustratos racémicos. La enantioselectividad es uno de los puntos clave en la obtención del producto deseado, ya que, la selección hacia un enantiómero u otro va a afectar a la farmacocinética, farmacodinamia y toxicidad del fármaco.⁶

La quiralidad es un factor clave en la eficacia y la seguridad de muchos fármacos y por ello la obtención de tan solo uno de los enantiómeros en los pasos intermedios, el que interaccionará con el receptor (Figura 1)⁷, se ha convertido cada vez en un requisito más importante en la química farmacéutica.⁷ Esta demanda está incentivada por algunos sucesos acaecidos en el siglo XX debido a la falta de enantioselectividad y seguridad como es el caso de la talidomida.

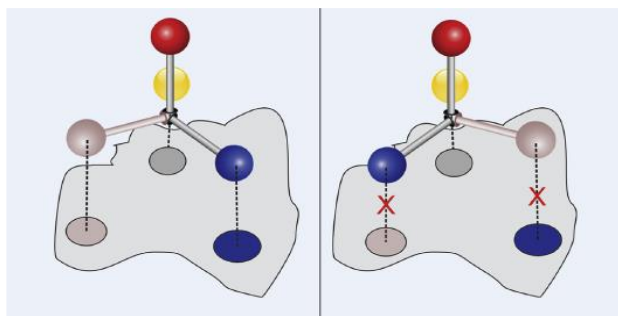


Figura 1. Molécula quiral interaccionado con el sitio activo del receptor. El enantiómero de la izquierda tiene mayor afinidad que el de la derecha. ⁷

Un compuesto quiral es aquel que está conformado por uno o más centros estereogénicos. La diferencia entre los distintos enantiómeros es la situación espacial de los átomos dispuestos alrededor del centro en cuestión.¹ Son cada vez más las síntesis que incorporan procesos biocatalíticos, ya que, a través de estos se consiguen alcanzar las propiedades de regioselectividad y estereoselectividad requeridas sobre todo en los procesos de obtención de moléculas complejas.

Existen tres métodos para crear moléculas ópticamente puras:

1. Desde compuestos naturales quirales enantioméricamente puros.
2. Resolución de mezclas mediante el uso de reactivos de la química orgánica tradicional.
3. Síntesis asimétrica a partir de moléculas proquirales y un biocatalizador, uso de la biocatálisis.

Es verdaderamente importante que una enzima sea capaz de reconocer y transformar compuestos diferentes a los que estrictamente se consideran sus sustratos naturales, así como ser capaces de llevar a cabo transformaciones diferentes a las que desarrollan en la naturaleza.⁸

Algunos beneficios de los que la industria se favorece al emplear la biocatálisis son:

- Las enzimas son unos grandes catalizadores porque consiguen acelerar enormemente la reacción y permiten a la vez recortar la cantidad de catalizador necesario para llevarla a cabo. Consecuentemente hacen más efectivo y sostenible el proceso.
- Altas tasas de reacción.
- Son reactivos medioambientalmente benignos por ser completamente degradables.
- Tienen capacidad de actuar en condiciones de reacción suaves, trabajando en rangos de pH de 5-8 y temperaturas que no exceden los 40°C. De esta forma, se evitan transformaciones secundarias.
- Existe compatibilidad para que unas enzimas puedan trabajar con las otras.
- Normalmente el medio de reacción es agua lo que procura condiciones seguras.
- Permiten la elaboración de ingredientes activos quirales.⁹

Los biocatalizadores, enzimas biológicas, han estado siempre acusados de ser sensibles a las condiciones de reacción, ser costosos económicamente, inactivos cuando no se trata del sustrato natural e inútiles fuera de su medio convencional.⁹ Esto ha propiciado su tardía aplicación a escala industrial. Pero realmente, las enzimas ofrecen una serie de ventajas que les permiten ser objeto de una alternativa más eficiente y ecológica. Su poder se resume en

que muestran elevada especificidad, estereoselectividad y regioespecificidad, y, proporcionan gran actividad a temperatura ambiente y presión atmosférica.^{9, 10}

A escala industrial se emplean altas temperaturas, pH más agresivos, los tiempos suelen ser más largos y aparecen elevadas concentraciones de sustrato y de producto.¹¹ Esto implica que las enzimas deben adaptarse al medio de reacción sin perder sus propiedades. Para sobrepasar estas limitaciones enzimáticas, sobretodo a la hora de trasladarse del laboratorio a la aplicación industrial, se han desplegado una serie de opciones con el objetivo de hacerlo plausible. Las técnicas se condensan en la inmovilización y la ingeniería molecular.

La inmovilización permite el reciclaje de la enzima, aumenta la estabilidad de esta frente a la desnaturalización por calor o por disolventes orgánicos y aumenta el abanico de elección de medios de reacción. Tradicionalmente, se puede llevar a cabo por la unión de la enzima a un soporte prefabricado, de resina o sílice o mediante intercalado en el polímero de una matriz orgánica o inorgánica.¹²

La otra opción es la ingeniería molecular que consiste en realizar mutaciones en la enzima que se va a utilizar para hacer más eficiente el proceso.

Cuando estamos ante un proceso biocatalítico existen dos formas de aplicar las enzimas, o bien como células enteras o bien como enzimas aisladas. La elección depende las ventajas económicas que demuestre para el proceso que va a emplearlo.

- Las enzimas aisladas han sido producidas y después separadas de la célula en la que han crecido; de esta forma los sustratos superan el problema de difusión, hacia el interior celular, que puede aparecer al usar células enteras. Las enzimas son más solubles en medio acuoso y suelen destinarse a reacciones de tipo hidrolítico.¹²
- Se opta por el uso de células enteras cuando la enzima es dependiente de un cofactor, ya que este último puede regenerarse gracias al metabolismo inherente en la célula y supone un beneficio. Aún así uno de los problemas de trabajar con este tipo de sistema es la reactividad cruzada con los metabolitos celulares. Otro lo constituye la posible destrucción parcial de los sustratos por reacciones celulares competitivas internas.^{6, 12}

El origen de la mayoría de los biocatalizadores empleados se remonta a distintos tipos de microorganismos como: bacterias, hongos o arqueas.¹³ Una vez encontrados son sometidos a clonación mediante técnicas de PCR en células de cultivo como *Escherichia coli*, estudios de genómica o proteómica, mejoras de estabilidad, actividad o regeneración de cofactor a través de mutaciones, etc.⁵

El medio de reacción, es decir, el disolvente, es un aspecto crucial a tener en cuenta a la hora de realizar transformaciones biocatalíticas, para alcanzar la sostenibilidad del proceso. Generalmente la habilidad de las enzimas para trabajar en el agua es percibida como una ventaja, pero si el sustrato no es soluble en medio acuoso puede resultar un impedimento. De hecho, las amidaciones y transesterificaciones sólo se pueden sostener en otros disolventes por razones de equilibrio e hidrólisis. La biocatálisis alcanza un punto de inflexión en el que puede diferenciarse de la química orgánica tradicional al emplear disolventes menos perjudiciales para el medio ambiente.

Cabe mencionar brevemente la gama de posibilidades a la hora de seleccionar el disolvente. Por un lado, el agua representa el medio en el que se producen la mayoría de reacciones, pero

un problema que aparece al usarla es la solubilidad de la molécula deseada en el medio. Ésta debe estar en elevada concentración para así evitar pérdidas al separarla. Además, la eliminación del agua constituye un paso costoso debido a los altos puntos de ebullición de muchos productos.¹²

Los disolventes orgánicos destacan con algunos beneficios como que muchos sustratos sólo son solubles en estos, la fácil recuperación del producto al finalizar el proceso y la contaminación microbiana queda solventada. Sin embargo, surgen inconvenientes medioambientales y la tasas de actividad disminuyen. Por esto, la mejor solución parece ser hacer uso de un medio bifásico conformado por agua y medio orgánico.¹²

Por otro lado, gracias a los avances en investigación, han aparecido distintos disolventes que representan buenas alternativas a los medios tradicionales siendo: más baratos, no inflamables y no tóxicos. Primero, el CO₂ supercrítico, que como desventaja al juntarse con agua presenta una bajada de pH con la consecuente formación de ácido carbámico y carbamatos. Segundo, líquidos iónicos, los cuales adquieren elevada utilidad en la transformación de carbohidratos y nucleósidos. Y como tercera opción, los solventes eutécticos profundos, formados por una mezcla entre una sal de amonio o fosfonio y un alcohol, un ácido carboxílico o una amida, que pueden ser una elección para aquellas síntesis en las cuales los compuestos sean insolubles en agua.¹²

OBJETIVOS

Este trabajo centra el objetivo principal en discernir la importancia de la biocatálisis dentro de la industria farmacéutica como instrumento alternativo que agiliza los pasos en la síntesis de ingredientes activos y compuestos intermedios de fármacos, suponiendo un resultado favorable, tanto económica como en terapéuticamente, para la eficacia de los procesos.

Para esto se agrupan algunos ejemplos de síntesis de medicamentos presentes en el mercado, en cuyo curso se necesita tratar la quiralidad, y para solventar esto se emplea la biocatálisis como herramienta para el desarrollo sostenible de fármacos. Las principales rutas biosintéticas estudiadas son aquellas que aplican uno de los dos grupos de enzimas más utilizados a escala industrial: hidrolasas u oxidorreductasas. Dentro de cada grupo de biocatalizadores se muestran diversos ejemplos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo ha sido elaborado mediante una revisión bibliográfica. La obtención de la información necesaria para el desarrollo del tema ha resultado posible a través del manejo de artículos, revistas, tesis doctorales y fragmentos de libros pertenecientes al dominio científico. Para estas búsquedas el acceso a diferentes bases de datos como: PubMed, Sciencedirect o Scielo ha sido decisivo.

Una vez agrupada y analizada toda la recopilación de lectura científica se ha llevado a cabo una tarea de síntesis aunando los conocimientos y reflejándolos como muestras de las distintas aplicaciones actuales de la biocatálisis en la esfera industrial para la creación de compuestos quirales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para comprender los diferentes tipos de biocatalizadores existentes es conveniente hacer un breve recordatorio sobre su clasificación organizada en función de la acción catalítica. Las enzimas están constituidas por varios dominios, como el de unión a sustrato o el catalítico.

- I. Oxidorreductasas: catalizan reacciones de oxidación y reducción y están divididas a su vez en hidrogenasas, monooxigenasas, reductasas, etc.
- II. Hidrolasas: catalizan reacciones de hidrólisis y comprenden entre otras las lipasas, estererasas, acilasas, epoxidasas o nitrilasas.
- III. Transferasas: catalizan transferencias de grupos como aldehídos, cetonas, metilos, acilos, fosforilos y azúcares.
- IV. Liasas: reacciones de adición – eliminación de moléculas pequeñas.
- V. Isomerasas: enantiomerización o diastereoisomerización.
- VI. Ligasas: catalizan la formación de enlaces carbono – carbono, carbono – oxígeno, carbono – sulfuro o carbono – nitrógeno.²

Las de mayor aplicación en la industria farmacéutica hoy en día son las primeras y las segundas. Las segundas son capaces de resolver mezclas racémicas y, con ello, agilizar las síntesis elevando el rendimiento, la selectividad y abaratando costes.¹⁴ Son estos dos grupos de enzimas los que se van a explicar y ejemplificar a continuación.

1. Oxidorreductasas.

Las oxidorreductasas son enzimas capaces de oxidar un compuesto (donador de electrones o agente reductor) a la vez que, correspondientemente se reduce otro (un agente oxidante o un aceptor de electrones). La gama de sustratos sobre los que pueden actuar es amplia, desde alcoholes, aminas o cetonas hasta sustratos inorgánicos como pequeños aniones o metales.⁸

Estas enzimas pueden estar acopladas a un cofactor, en este caso NADH/NAD⁺ o NADPH/NADP⁺. El mecanismo de esta enzima cuando se encuentra acoplada es oxidando una molécula gracias a la transferencia de un hidruro (H⁻) al cofactor, NAD⁺ o NADP⁺, correspondiente, obteniéndose la forma reducida NADH o NADPH, o llevando a cabo la reducción mediante transferencia del hidruro desde el cofactor.⁸

La aplicación de las oxidorreductasas supone un gran provecho en la industria, ya que:

- Participan en pasos de síntesis complejas llevándolos a cabo en unas condiciones suaves.
- Otras distinciones que las hacen alternativas muy atractivas a la química tradicional son: la estereoselectividad, regioespecificidad o la posibilidad de alcanzar los parámetros cinéticos apropiados y la adquisición óptima de especificidad de sustrato.
- Su empleo es una buena opción desde el punto de vista medio ambiental comparándolo con el uso de las enzimas de la química redox, que normalmente contienen metales de transición.⁸

En esta situación, usar células enteras supone la elección más apropiada, ya que la regeneración del cofactor es posible a través del mismo metabolismo intracelular.

Dentro de las oxidorreductasas, las deshidrogenasas o reductasas, se encargan de la eliminación de átomos de hidrógeno de las moléculas siendo un proceso reversible, y, pueden usarse para reacciones oxidativas y reductoras. Sin embargo, las oxidasas, peroxidasas oxigenasas trabajan de forma irreversible debido a su alto poder de entalpía.¹⁵

Las oxigenasas son los biocatalizadores oxidativos que más interés suponen para la obtención de fármacos. Estas enzimas catalizan la incorporación de moléculas de oxígeno al sustrato bajo condiciones de reacción suaves obteniendo agua como subproducto. Este método tan específico de oxigenación es muy interesante en la industria, ya que, esto puede resultar más tedioso si se lleva a cabo a través de la química clásica.¹⁵

Algunos de los fármacos ampliamente empleados y sintetizados gracias a estas enzimas se detallan a continuación.

1.1. Atazanavir

Medicamento utilizado para el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA). Esta enfermedad se adquiere por la infección con el retrovirus de inmunodeficiencia humana (VIH), el cual causa una afección crónica y daña el sistema inmunitario. Para el tratamiento se han desarrollado diversos antivirales, entre ellos el presentado en este caso. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la endopeptidasa del VIH y para ello debe presentar una estructura de peptidomimético acíclico. La endopeptidasa se encarga de hidrolizar enlaces peptídicos y permitir la reproducción del virus.

Se ha desarrollado un proceso enzimático para la preparación de un intermedio sintético. La obtención de quiralidad en los dos centros que presenta supone un punto clave de la síntesis. Gracias a una reducción diastereoselectiva llevada a cabo por las cetorreductasas de *Rhodococcus erythropolis* SC13845, *Brevibacterium* y *Hansenula* se obtiene el producto intermedio quiral clave en la preparación de Atazanavir (Figura 2)¹⁶. Tras varios intentos la reacción se ha conseguido llevar a cabo en un solo paso con la enzima de *R. erythropolis* SC13845, reduciendo la cetona con un 95% de rendimiento, un 98% de pureza diastereoisómera y 99,4% ee. Al probar el proceso mediante el uso de células enteras y modificaciones genéticas se observa que el rendimiento mejora en un 5% y también la eficacia del proceso.¹⁶

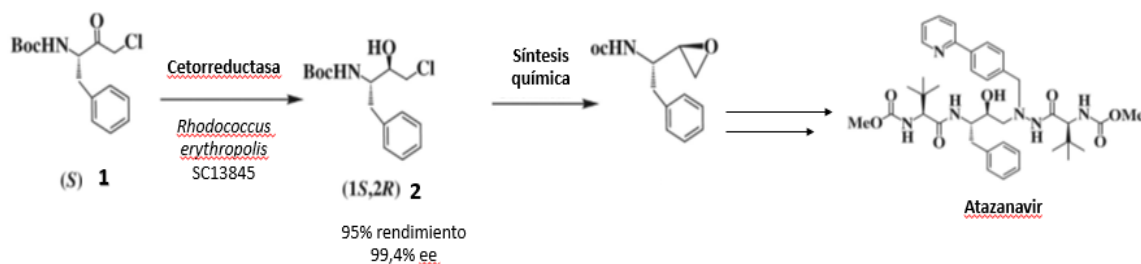


Figura 2. Reducción estereoselectiva de la cetona.¹⁶

En la síntesis química tradicional el empleo de reactivos como el NaBH_4 en reacciones reductoras conlleva la aparición de productos indeseados. La industria evita estos gracias al paso biocatalítico detallado arriba.

En la producción industrial de este antiviral es fundamental la obtención de otra molécula en la que se hace uso de la biocatálisis. En este otro paso la enzima utilizada es una leucina deshidrogenasa recombinante elaborada a partir de *Candida boidinii*. Esta cataliza la aminación reductora de un alfa- cetoácido (Figura 3). Para que este biocatalizador desempeñe su función el medio debe estar provisto con amonio y NADH como cofactor. El reciclaje del cofactor, NAD^+ a NADH es posible por la presencia de otra enzima microbiana, formiato deshidrogenasa de *Pseudomonas pastoris* recombinada en *Escherichia coli*.¹⁷

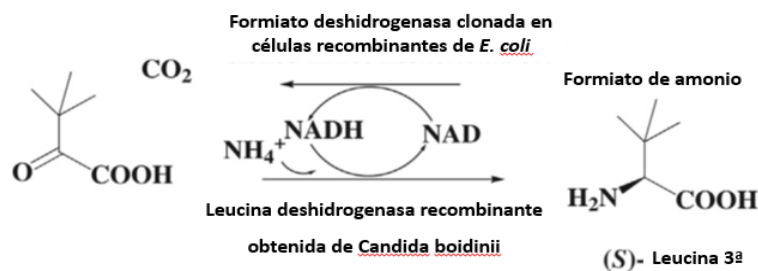


Figura 3. Síntesis enzimática de (S)- Leucina 3.¹⁷

Este método constituye un ejemplo de producción industrial de L-aminoácidos ópticamente activos, pero presenta un pequeño inconveniente: es imprescindible la participación de enzimas asiladas y puras.¹⁷

1.2. Atorvastatina

La atorvastatina pertenece al grupo de las estatinas, conjunto de fármacos inhibidores de la reductasa 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA). El primer medicamento comercializado de este grupo fue Lipitor® a través de la compañía Pfizer. Los lípidos, incluido el colesterol, son transportados por la sangre mediante lipoproteínas de baja densidad (LDL), de alta densidad (HDL) o de muy baja densidad (VLDL). La reductasa, que se inhibe con el uso de estos medicamentos, es la encargada de fabricar colesterol en el hígado. El resultado de dicha acción termina en la disminución de la síntesis de colesterol, bajando los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en el organismo.

Este grupo de medicamentos es ampliamente consumido, sobre todo, entre la población más mayor, ya que, se sabe que los niveles plasmáticos de colesterol aumentan con la edad. Unos niveles elevados y mal regulados pueden concluir en complicaciones como formación de placa de ateroma, aumento de la presión sanguínea, ictus o infarto de miocardio.

Para la consecución del producto final hay unas etapas críticas de síntesis de la cadena lateral, debido a la presencia de dos centros quirales. La elaboración clásica comprende demasiados pasos, lo cual supone largos y costosos procesos, además del uso de algunos reactivos que crean unas drásticas condiciones de reacción como son: los complejos de rodio, rutenio o ácido L-málico. Por ello se ha optado por utilizar biocatalizadores que permitan menor consumo de energía y menor producción de subproductos.¹⁰

Una de las enzimas biocatalíticas dedicada a la obtención de una de las partes más complejas para la síntesis de este antiolesterolémico es la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH de *Lactobacillus brevis*, sobreexpresada en una cepa de *E. coli* recombinante. Esta enzima lleva a cabo la reducción estereoselectiva de la figura 4 en tan solo 24 horas, con un rendimiento del 72% y un exceso enantiomérico superior al 99%. Incluso la presencia de esta enzima en el medio produce una regeneración del cofactor, lo que hace más eficiente el proceso.¹⁸



Figura 4. Reducción estereoselectiva del dicetoester.¹⁸

En la preparación del enantiómero *R* de un ácido clave en la síntesis de este fármaco se utilizan dos enzimas biocatalíticas. Este proceso fue desarrollado primeramente por Codexis. Primero se reduce la cetona a través de la acción una cetorreductasa NADPH dependiente obtenida de *Candida magnoliae*. Como solución a la regeneración del cofactor, durante el cultivo de la enzima deseada, se usan células de *E. coli* para clonar una glucosa deshidrogenasa que lo hace posible. Como segundo paso, una halohidrina deshalogenasa (HHDH) de *Agrobacterium tumefaciens* elimina el átomo el cloro terminal para introducir un grupo ciano. Este último producto (3)¹⁸ de la figura 5 posibilita la obtención final de la molécula estereoselectiva de atorvastatina.^{18, 19}

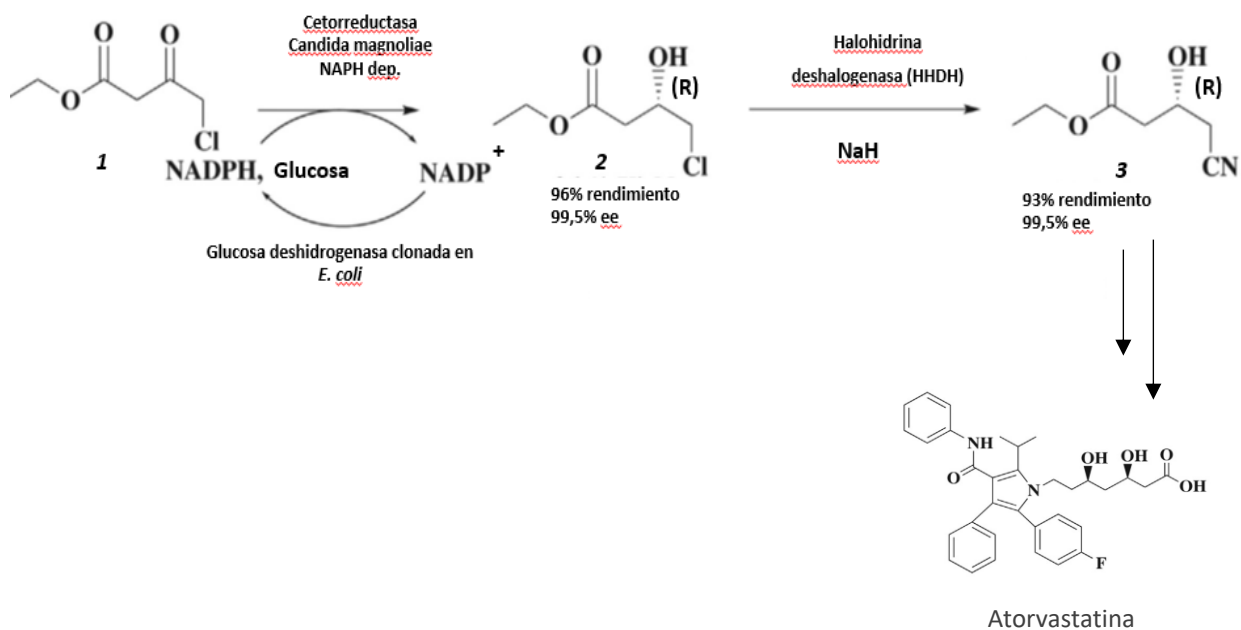


Figura 5. Preparación enzimática del producto intermedio clave para la síntesis.¹⁸

1.3. Buspirona

La buspirona es un medicamento indicado para trastornos de la ansiedad, con o sin depresión, a corto plazo. Las ventajas que presenta es que no da sueño, no altera la vigilia ni produce relajación muscular. Su mecanismo se desarrolla por la unión al receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}. El agonismo parcial hacia esos receptores presinápticos (rafe dorsal) y postsinápticos (hipocampo y corteza) provoca un aumento del funcionamiento del neurotransmisor serotonina.

Debido al metabolismo hepático (citocromo P450 CYP3A4), en el organismo el efecto es de corta duración, pero se ha observado que un metabolito mayoritario, (*R*) 6-hidroxibuspirona, muestra unas altas concentraciones a nivel sanguíneo (figura 6)¹⁸. Para la mejora de la acción de este ansiolítico se han llevado a cabo estudios tanto del producto racémico como de ambos enantiómeros.

El objetivo se ha enfocado hacia la búsqueda de una enzima reductora microbiana que trabaje de forma enantioselectiva. Finalmente se ha elucidado una (*R*) reductasa NADPH dependiente procedente de *Hansenula polymorpha*, expresada en *E. coli*. Como solución para la regeneración del cofactor se introduce un gen de 6-fosfato deshidrogenasa en células recombinantes de *E. coli*.^{17, 18}

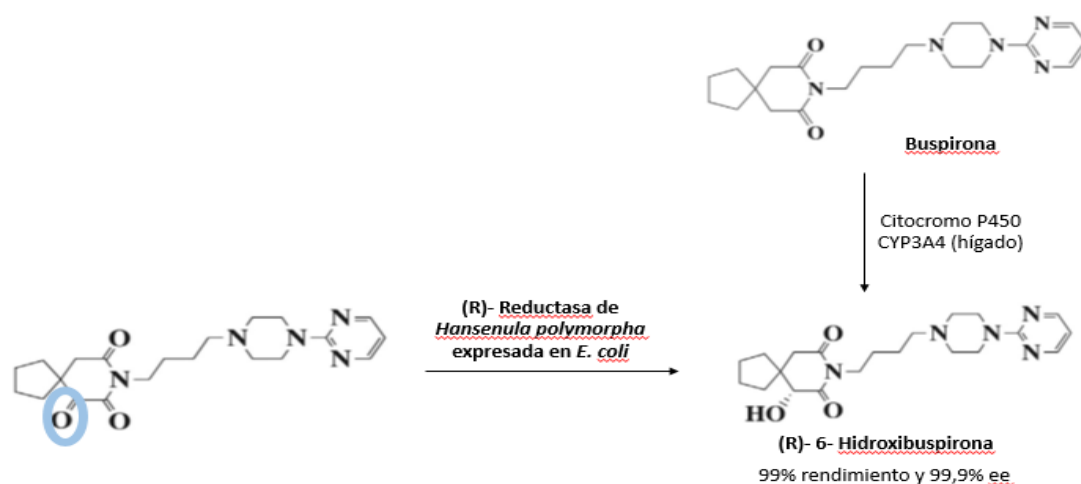


Figura 6. Proceso biocatalítico para la obtención del metabolito activo de la buspirona.¹⁸

1.4. Inhibidor irreversible proteasa rinovirus

El constipado común supone una de las enfermedades más habituales entre los pacientes durante las épocas de frío. Este es causado por infecciones de rinovirus en el sistema respiratorio. La proteasa de este microorganismo se encarga de un proceso proteolítico con el que obtienen las proteínas necesarias para la replicación viral. La inhibición de la proteasa detiene el progreso de la enfermedad.

En la síntesis industrial se lleva a cabo un paso biocatalítico. Resulta ser el paso clave, ya que, se produce una reducción enzimática en medio acuoso obteniéndose el (*R*)-hidroxiácido mediante el empleo de una deshidrogenasa D-lactato (D-LDH) y una formiato deshidrogenasa (FDH), la cual favorece la regeneración del cofactor oxidando amonio a CO₂. El proceso resulta muy eficiente, con un 70% de rendimiento y un 99,9% ee. Las enzimas usadas pertenecen a *Leuconostoc mesenteroides*, D-LDH, y a *Candida boidinii*, FDH.^{16, 17}

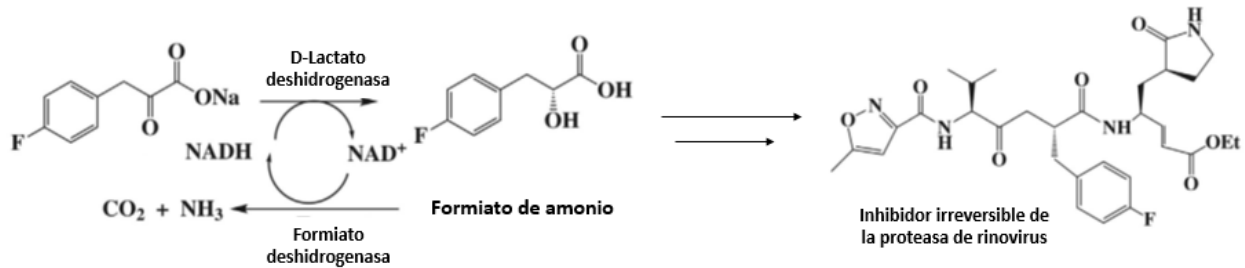


Figura 7. Preparación biocatalítica de un ácido fundamental para la síntesis de este inhibidor.¹⁶

Para alcanzar el beneficio económico de este paso, los biocatalizadores implicados en la reacción están anclados a un reactor de membrana, el cual permite el reciclaje de las enzimas. El principal logro de esta membrana se obtiene debido a un sistema de ultrafiltración (Figura 8)²⁰ que permite el paso de moléculas pequeñas, pero no lo hace para moléculas grandes como son las enzimas. El mecanismo consiste en un flujo que va pasando a través de la membrana, la cual es capaz de retener las enzimas en la fase acuosa, mientras que el producto es recogido continuamente en un efluente de fase orgánica.²⁰

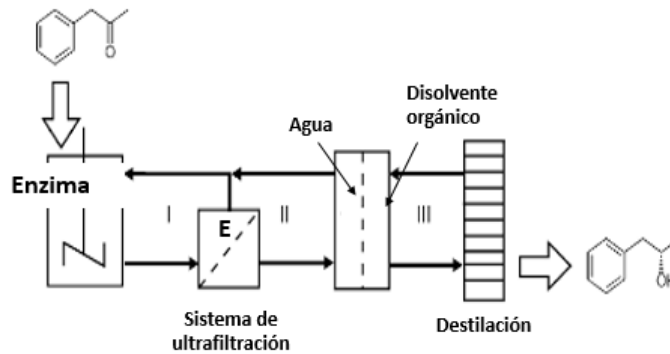


Figura 8. Sistema de regeneración del cofactor a través de un sistema de ultrafiltración.²⁰

2. Hidrolasas.

Otro grupo de enzimas muy utilizadas a nivel industrial está constituido por las hidrolasas, dentro de las cuales se encuentran varios tipos de enzimas. Este conjunto presenta unas ventajas diferentes sobre otros biocatalizadores:

- No necesitan cofactores para ejercer su acción.
- Se pueden emplear en medios acuosos y en disolventes orgánicos.
- Su fácil comercialización y manejo les hace ser el biocatalizador de elección a la hora de sintetizar compuestos quirales.
- Exhiben poca especificidad de sustrato, es decir actúan en presencia de distintos.
- Elevada regio-, quimio- y enantioselectividad que provoca que aumente el interés hacia estas enzimas.^{2, 21}

Entre ellas, las lipasas presentan un uso sustancial en la industria farmacéutica. La mayoría de lipasas se obtienen de microorganismos, como se ha comentado con anterioridad. Su importancia en el ámbito de los fármacos se centra en la creciente demanda sobre la quiralidad de los procesos de obtención de moléculas enantioméricamente puras, sobre todo en los antihipertensivos y los antiinflamatorios. Estas enzimas son capaces de resolver mezclas racémicas y de la desimetrización de compuestos proquirales. En este caso, se usan predominantemente las enzimas de forma aislada.¹⁴

Algunos de los medicamentos comercializados que se detallan seguidamente muestran las ventajas de las que se nutre la industria farmacéutica al utilizar esta tecnología.

2.1. Atenolol

El atenolol es un beta-bloqueante cardiosselectivo, concretamente de los receptores β_1 del corazón encargados de controlar la frecuencia y la fuerza del latido cardiaco. Hasta hace poco se ha utilizado para el tratamiento de la hipertensión arterial, pese a que actualmente su uso supone un tema controvertido. También se emplea para tratar la angina de pecho, arritmias cardiacas e infarto de miocardio. Se ha determinado que son, verdaderamente, los (S)-enantiómeros los que muestran actividad farmacológica y que los (R) pueden presentar efectos adversos. Tras esto se han buscado rutas biocatalíticas que permitan alcanzar el producto con una enantioselectividad pura.

Hasta el año 2011, muchos fármacos estaban en el mercado en forma de racematos, pero a partir de este año la cantidad de productos racémicos aprobados disminuye hasta solo haber un 5%.

La resolución es llevada a cabo por una lipasa de *Candida antarctica B* (CALB) o Novozym 435 como se observa en la figura 9.²² La reacción se mantiene durante 27h a 30°C, obteniéndose ambos enantiómeros con un 99% ee.²²

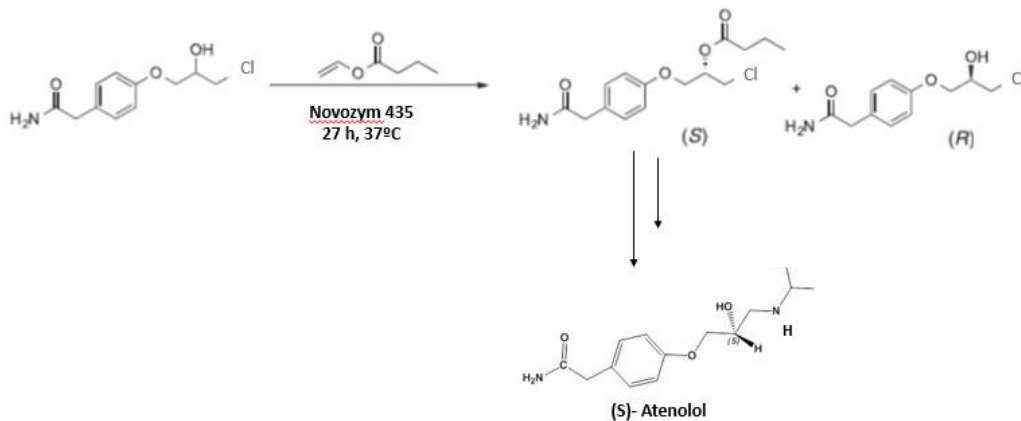


Figura 9. Resolución del alcohol racémico por Novozyme 450.²²

2.2. Atorvastatina

Como se ha comentado previamente este fármaco ha sido ampliamente comercializado con el pretexto de reducir los niveles circulantes de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL) en circulación sanguínea.

Asimismo en la elaboración de este fármaco participa otro tipo de enzima, una nitrilasa perteneciente a las hidrolasas y modificada genéticamente mediante técnicas de evolución dirigida. Esta nitrilasa escogida permite la desimetrización del sustrato proquiral para obtener el enantiómero *R*, precursor de la atorvastatina.¹⁸

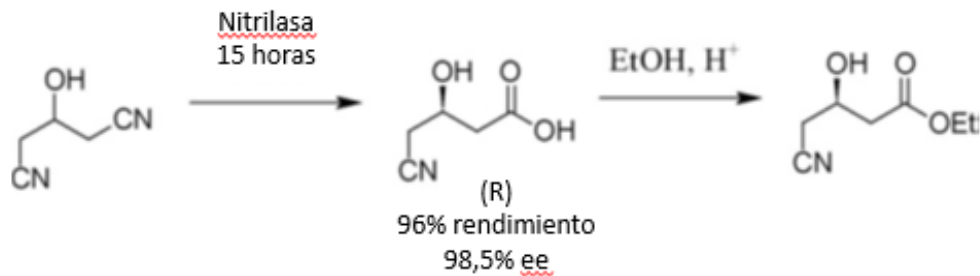


Figura 10. Desimetrización de un alcohol por la acción de una nitrilasa.¹⁸

2.3. Captopril

El captopril fue el primer inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) lanzado al mercado y evita la conversión de la angiotensina I en la II. Suprime el sistema aldosterona-renina-angiotensina. De este modo se propicia el descenso de las acciones de la angiotensina permitiendo el correcto flujo de sangre y bajando la presión arterial. Se utiliza para tratar la hipertensión y la insuficiencia cardiaca. Los altos valores de tensión pueden generar daños cardiovasculares a nivel de vasos sanguíneos, riñones y otras zonas del organismo.

La obtención del enantiómero *S*, cien veces más activo que el enantiómero *R*, es decisiva para que se produzca esta inhibición.²³

La síntesis de este fármaco se puede llevar a cabo mediante esterificación enantioselectiva catalizada por una lipasa (figura 11)¹⁶. Para este paso se utilizaron lipasas obtenidas de diferentes microorganismos, pero la resolución del compuesto racémico no llegaba a ser selectiva. Aplicando la lipasa PS-30 producida por *Pseudomonas cepacia* en un medio que contiene tolueno como solvente se obtiene el ácido deseado.^{16, 17}

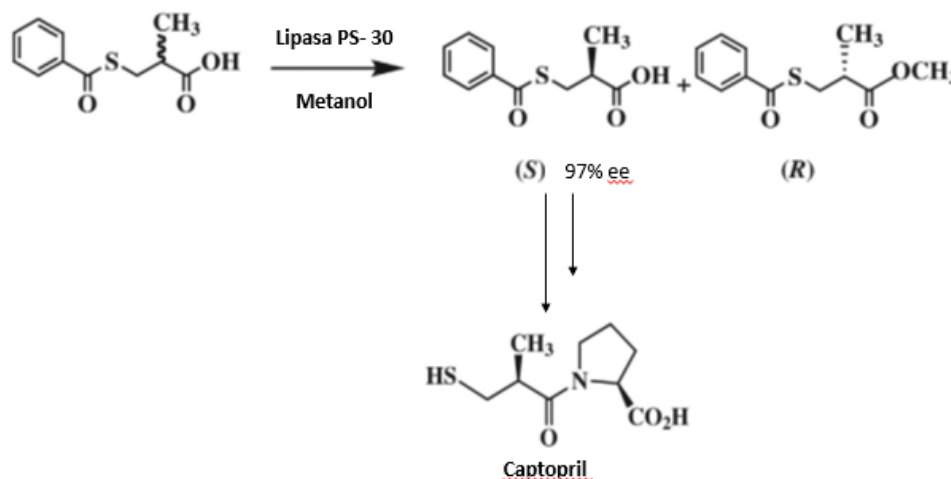


Figura 11. Obtención del enantiómero (S), 100 veces más activo que el (R).¹⁶

2.4. Clopidogrel

Este fármaco es un inhibidor de la agregación plaquetaria enmarcado como agente antitrombótico alternativo en el caso de contraindicaciones con el ácido acetilsalicílico. Se trata de un antagonista del receptor adenosindifosfato, ADP, utilizado por pacientes con aterosclerosis para disminuir la incidencia de infarto de miocardio, de bloqueo isquémico o muerte vascular. Evita el reclutamiento de plaquetas y la formación de coágulos.

Con la finalidad de resolver de manera eficiente el compuesto racémico formado durante la producción, se ha desarrollado la transesterificación de la figura 12²⁴, llevada a cabo por una lipasa proveniente de *Candida antarctica* (CAL-A) demostrando una alta enantioselectividad hacia la molécula con configuración (R). Tras repetir este proceso trece ciclos, el biocatalizador sigue manteniendo su actividad sin mostrar ni un leve descenso en cuanto a la enantioselectividad. Así se demuestra la eficacia del proceso y el beneficio económico que supone el uso de la biocatálisis.^{24, 25}

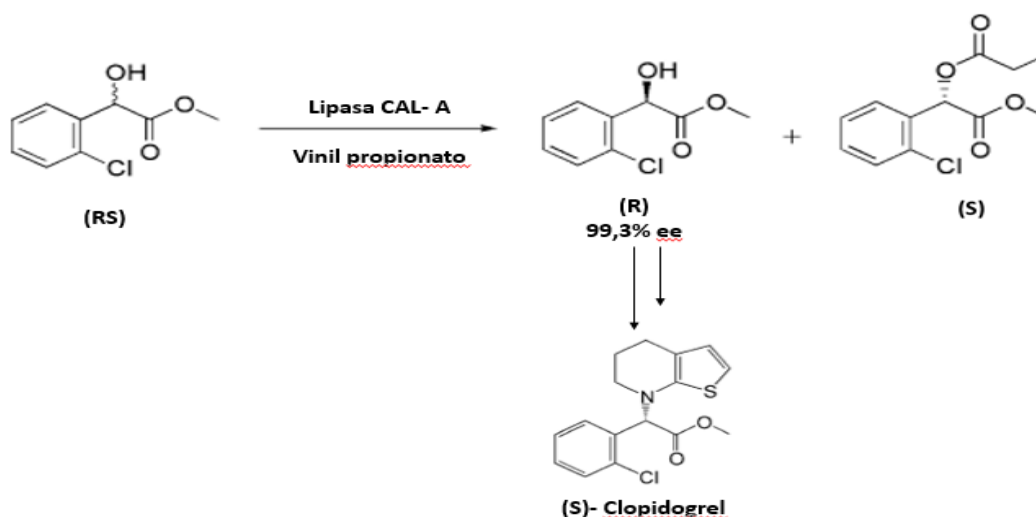


Figura 12. Resolución de la molécula (RS) mediante transesterificación. ²⁴

2.5. Profenos

Un ejemplo ampliamente usado a nivel industrial, es la preparación de los ácidos (S)-2-arilpropionicos, también conocidos como profenos. Algunos ejemplos representativos de este grupo son: ibuprofeno, flurbiprofeno, ketoprofeno o naproxeno. Se trata de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) empleados ampliamente para el alivio del dolor y la inflamación en casos de lesión tisular. Es conocido que la enantioselectividad en este grupo de fármacos es muy importante debido a que es el enantiómero S el que inhibe la ciclooxigenasa (COX), enzima responsable de la creación de los intermediarios de la inflamación. Hasta hace poco se han comercializado como racematos, pero hoy en día se puede desempeñar un proceso biocatalítico como el uso de lipasas microbianas procedentes de *Candida antartica* o *Candida rugosa* para alcanzar esta deseada estereoselectividad.

El primer proceso biocatalítico en este caso fue desarrollado por la compañía americana Pfizer, a través de la utilización de la lipasa obtenida de *C. rugosa* e inmovilizada en una membrana, capaz de catalizar la hidrólisis del ester racémico con preferencia por el (S) enantiómero, figura 13 ⁴. Para llevar a cabo esta reacción es necesario un medio ligeramente ácido para disminuir la solubilidad del ibuprofeno y evitar la posible inhibición de la enzima producida por el exceso de producto. Las condiciones adecuadas son medio acuoso, 20°C y pH 5. La inmovilización de la enzima en la membrana solventa el problema de la baja solubilidad del sustrato en agua, debido a la creación de una bifase acuosa y orgánica. La lipasa hidroliza el sustrato en la fase orgánica y el producto se solubiliza en el agua, quedando de esta forma el ácido quiral separado. ^{4, 6, 11}

La evolución dirigida de enzimas ha demostrado la utilidad hidrolítica y enantioselectiva de la lipasa de *C. antartica* B (CALB) para resolver mezclas racémicas en el caso de flurbiprofeno y ketoprofeno.

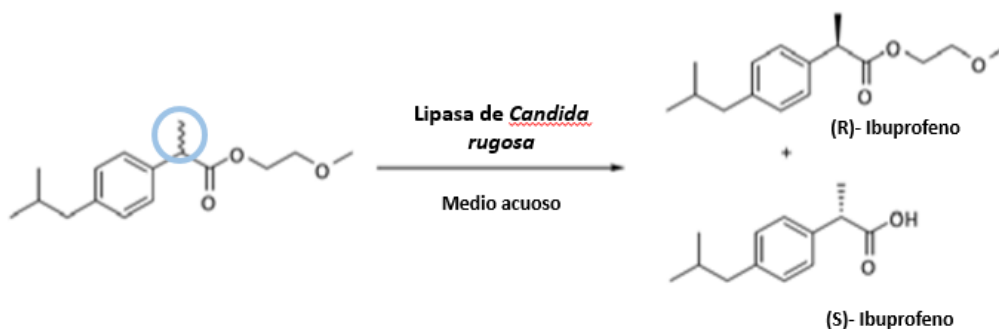


Figura 13. Resolución de los profenos catalizadas por lipasas. ⁴

CONCLUSIONES

Los ejemplos mostrados sitúan en el mapa la aplicación de la biocatálisis en la industria farmacéutica. Se observa como cada vez más supone una opción a tener en cuenta cuando se diseña la síntesis de un fármaco, y, también en otras áreas de la industria como en la obtención de productos químicos, ingredientes farmacológicos activos, alimentarios o pesticidas.

¿Por qué su empleo se podría decir que está en auge? Pues bien, la respuesta a esta pregunta converge en varios resultados: debido a la acusada enantio- y regioselectividad el uso de biocatalizadores es la mejor opción cuando ese es el objetivo de la síntesis de un bloque quiral de fármaco, por sus suaves condiciones de reacción y por el empleo de agua como disolvente en la mayoría de las biotransformaciones. Además la creciente presión económica de producir de una forma más eficiente empleando recursos menos costosos y el crecimiento entre la sociedad de la conciencia medioambiental han supuesto en las industrias más contaminantes un cambio en su política de gestión de síntesis para generar menores cantidades de residuos. El empleo de esta técnica supone una de las posibles soluciones para lograr la sostenibilidad real a través del aprovechamiento de recursos. Todo esto no sería posible sin los avances en el área de la bioquímica, ingeniería enzimática, secuenciación de genes o métodos de clonación que han propiciado un aumento en la seguridad, tanto a la hora del consumo como de la producción.

Esta alternativa verde ha permitido, asimismo, superar algunas de las limitaciones de la química orgánica gracias a la amplia variedad de enzimas que se pueden elegir hoy en día y los cambios que se pueden inducir en ellas.

Dentro del mundo de la biocatálisis se observa como las hidrolasas son las principales enzimas que han permitido su uso extendido en la industria, sobre todo las lipasas debido a su amplia versatilidad de sustratos. La elaboración de fármacos tan utilizados como el atenolol, el captopril o el ibuprofeno son meros ejemplos de esto.

Por último la biocatálisis centra sus perspectivas de futuro en conseguir síntesis que requieran un único paso, en la capacidad de combinarse interdisciplinariamente con otras tecnologías, el desarrollo de mayores campos de mutación e ingeniería y la exploración de nuevas fuentes de enzimas en puntos calientes o ambientes extremos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Montero J, Gago J. Biocatálisis aplicada a la Química Farmacéutica [Internet]. Analesranf.com. 2007 [consultado 14 mayo 2019]. 73 (4). Disponible en: <https://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/view/136>.
2. Sun H, Zhang H, Ang E, Zhao H. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018; 26 (7): 1275-1284.
3. Doria Serrano M. Química verde: un nuevo enfoque para el cuidado del medio ambiente. *Educación Química*. 2009; 20 (4): 412-420.
4. Hoyos P, Pace V, Hernaiz M, Alcantara A. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry. A Greener Future. *Current Green Chemistry*. 2014; 1 (2): 155-181.
5. Arroyo M, Acebal C, Mata I. Biocatálisis y biotecnología [Internet]. *Arbor.revistas.csic.es*. 2014 [consultado 14 mayo 2019]. 190 (768): a156. Disponible en: <http://arbor.revistas.csic.es/index.php/arbor/article/view/1958/2290>.
6. Arroyo M, de la Mata I, García J, Barredo J. Biocatalysis for Industrial Production of Active Pharmaceutical Ingredients (APIs). *Biotechnology of Microbial Enzymes*. 2017; 17: 451-473.
7. Sanganyado E, Lu Z, Fu Q, Schlenk D, Gan J. Chiral pharmaceuticals: A review on their environmental occurrence and fate processes. *Water Research*. 2017; 124: 527-542.
8. Sellés Vidal L, Kelly C, Mordaka P, Heap J. Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2018; 1866 (2): 327-347.
9. Patel R. *Stereoselective biocatalysis*. 1ª edición. New Brunswick. Marcel Dekker, Inc. 2000.
10. Choi J, Han S, Kim H. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*. 2015. 33 (7): 1443-1454.
11. Muñoz Solano D, Hoyos P, Hernáiz M, Alcántara A, Sánchez-Montero J. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresource Technology*. 2011; 115: 196-207.
12. Sheldon R, Woodley J. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chemical Reviews*. 2018; 118 (2): 801-838.
13. Madhavan A, Sindhu R, Binod P, Sukumaran R, Pandey A. Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. *Bioresource Technology*. 2017; 245: 1304-1313.
14. Angajala G, Pavan P, Subashini R. Lipases: An overview of its current challenges and perspectives in the revolution of biocatalysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2016; 7: 257-270.
15. Dong J, Fernández-Fueyo E, Hollmann F, Paul C, Pesic M, Schmidt S et al. Biocatalytic Oxidation Reactions: A Chemist's Perspective. *Angewandte Chemie International Edition*. 2018; 57 (30): 9238-9261.
16. Patel R. Applications of Biocatalysis for Pharmaceuticals and Chemicals. *Organic Synthesis Using Biocatalysis*. 2016; 11: 339-411.

17. Patel R. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coordination Chemistry Reviews*. 2008; 252 (5-7): 659-701.
18. Patel J. Biocatalytic synthesis of atorvastatin intermediates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009; 61 (3-4): 123-128.
19. Blamey J, Fischer F, Meyer H, Sarmiento F, Zinn M. Enzymatic Biocatalysis in Chemical Transformations. *Biotechnology of Microbial Enzymes*. 2017; 14: 347-403.
20. Tao J, Xu J. Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2009; 13 (1): 43-50.
21. Huisman G, Collier S. On the development of new biocatalytic processes for practical pharmaceutical synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2013; 17 (2): 284-292.
22. Lund I, Bøckmann P, Jacobsen E. Highly enantioselective CALB-catalyzed kinetic resolution of building blocks for β -blocker atenolol. *Tetrahedron*. 2016; 72 (46): 7288-7292.
23. Zaks A, Dodds D. Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals. *Drug Discovery Today*. 1997; 2 (12): 513-531.
24. Uhm K, Lee S, Kim H, Kang H, Lee Y. Enantioselective resolution of methyl 2-chloromandelate by *Candida antarctica* lipase A in a solvent-free transesterification reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2007; 45 (1-2): 34-38.
25. Zheng G, Xu J. New opportunities for biocatalysis: driving the synthesis of chiral chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011; 22 (6): 784-792.