



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

Síntesis del S-Naproxeno mediante biocatálisis

Autor: Jorge Jesús Hernández Serrano

Tutor: Andrés R. Alcántara

Convocatoria: junio

1. Resumen.

En el mercado encontramos una gran cantidad de medicamentos de los que solamente se puede comercializar uno de sus isómeros. Entre estos encontramos el naproxeno. Para la síntesis enantioselectiva del isómero S del naproxeno hay diversos métodos biocatalíticos.

La utilización de la lipasa de *Candida rugosa* que se ha inmovilizado de diversas formas, una de ellas es mediante la utilización de nanopartículas magnéticas con derivados de calixareno, confiriéndole propiedades que facilitan su separación y posterior reutilización y por otro lado tenemos la evolución dirigida que introduce mutaciones en enzimas, como la AMDasa aunque se sigue manteniendo la similitud con la enzima inicial y por tanto compartiendo mecanismo de acción. En ambos casos se consigue una mejora de la actividad, del rendimiento y de la enantioselectividad hacia el isómero S, además de poder realizar estas reacciones en condiciones suaves, permitiendo con todo ello que estos métodos sean viables económicamente.

2. Introducción.

El naproxeno es un medicamento correspondiente al grupo de los antiinflamatorios no esteroideos. Estos medicamentos están indicados para el tratamiento del dolor leve o moderado con componente inflamatorio, especialmente en aquellos de origen osteomuscular, en artritis reumatoide, osteoartritis en episodios agudos de gota, síndromes reumatoides y dolores músculo-esqueléticos. También están indicados en la dismenorrea. En el tratamiento de los episodios agudos de migraña como tratamiento sintomático y en la menorragia primaria y secundaria debida a un dispositivo intrauterino, entre otras indicaciones como se indica en su ficha técnica.

El mecanismo exacto no se ha establecido de forma clara, pero está asociado con la inhibición de prostaglandinas, ya que el naproxeno inhibe la síntesis de prostaglandinas al inhibir la ciclooxigenasa. Específicamente inhibe las isoenzimas COX-1 y la COX-2, también conocidas como prostaglandinas G/H sintasa 1 y 2 respectivamente, las cuales catalizan la producción de prostaglandinas por medio de la vía del ácido araquidónico. La actividad terapéutica se produce por inhibición de la

COX-2 mientras que los efectos adversos que se producen sobre la mucosa gastrointestinal y sobre la agregación plaquetaria están relacionados con la inhibición de la isoenzima COX-1.

De la misma forma, se desconoce el mecanismo por el cual el naproxeno y el resto de AINEs disminuyen la temperatura corporal en estados febriles, aunque parece que este efecto antipirético puede estar relacionado con la inhibición de prostaglandinas en el Sistema Nervioso Central (específicamente en el hipotálamo).

Además, cabe destacar que esta inhibición de la síntesis de prostaglandinas puede producir una disminución de la frecuencia y de la intensidad de la contractilidad uterina. En mujeres embarazadas las prostaglandinas E_2 y $F_{2\alpha}$ aumentan tanto la amplitud como la frecuencia de las contracciones y según evidencias actuales la dismenorrea primaria también está mediada por estas prostaglandinas, aunque aún se desconoce si el aumento de las prostaglandinas debido a la dismenorrea primaria se debe a las COX-1 y 2, pero se ha evidenciado la efectividad del naproxeno para aliviar los dolores menstruales y reduce la pérdida de sangre en mujeres con menorragia.

El uso del naproxeno en la artritis reumatoide ha demostrado aliviar el dolor y la rigidez, reduciendo la hinchazón y mejorando la movilidad, pero este tratamiento únicamente es paliativo.

Algo importante a tener en cuenta sobre el naproxeno es que es una molécula quiral. La mayoría de los medicamentos quirales se comercializan en forma de racematos, es decir, contienen ambos isómeros.

A pesar de tener la misma estructura, los isómeros presentan grandes diferencias en cuanto a sus actividades biológicas, farmacológicas, toxicológicas, en su metabolismo, en su farmacocinética etc.

En el caso del naproxeno es especialmente importante separar los enantiómeros ya que, no solo tienen diferencias en cuanto a las propiedades anteriormente mencionadas, sino que, además, el isómero R es hepatotóxico, siendo de esta forma el isómero S el seguro y además 28 veces más actividad antiinflamatoria.[1].

Se han desarrollado técnicas para separar los enantiómeros con el objetivo de utilizar únicamente el isómero más activo[2].

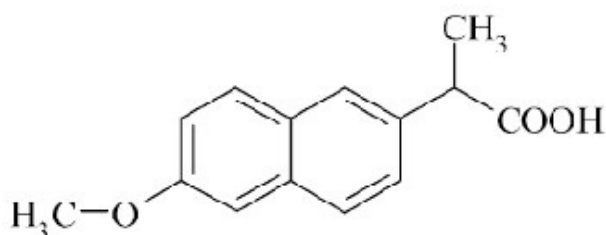


Figura 1: Estructura molecular del naproxeno.

La biocatálisis se define como el uso de enzimas en la síntesis química. Estas enzimas se pueden encontrar en preparados aislados o en forma de células completas, pudiendo estar preparadas tanto en su célula nativa como en una proteína expresada por recombinación en células hospedadoras alternativas.

Es muy útil gracias a la regio y estereoselectividad de las enzimas catalíticas y, además permite que esta catálisis se pueda realizar generalmente en condiciones suaves de reacción, a temperatura ambiente y en muchos casos usando agua como medio de reacción[3], de forma que no son necesarios tantos pasos intermedios de protección y desprotección en la reacción.

Además, es una alternativa económica puesto que el coste es predecible y estable y es respetuosa con el medio ambiente ya que estas enzimas se pueden extraer de fuentes renovables las cuales son biodegradables[4] [5].

3. Objetivos.

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica para poder estudiar diferentes formas de sintetizar el isómero S del naproxeno selectivamente por medio de procesos de biocatálisis que sean respetuosos con el medio ambiente, asequibles económicamente y altamente selectivos

4. Metodología.

Para la realización de esta revisión bibliográfica se han revisado diversos artículos publicados que han sido obtenidos a partir de bases de datos como PubMed, Google académico, Web of Science y Scopus.

Las primeras búsquedas se han realizado introduciendo campos sobre el tema general, empleando términos como biocatalysis, Green chemistry y naproxen. Las siguientes búsquedas han sido destinadas a obtener una información más específica sobre la biocatálisis del isómero S del naproxeno, para ello se han

introducido filtros en la búsqueda, para que esta contuviera tanto Naproxen como Biocatalysis, y Naproxen, synthesis y Biocatalysis.

Las publicaciones obtenidas de estas búsquedas han sido revisadas y se han seleccionado aquellas más relevantes para este trabajo.

Además, se realizó una búsqueda complementaria de los artículos citados en el material utilizado para esta revisión bibliográfica.

5. Resultados y discusión.

Se han recopilado diferentes estrategias de los artículos revisados para la síntesis del isómero S del naproxeno por medio de métodos biocatalíticos, entre los que cabe destacar la inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* por medio de diferentes métodos y la evolución dirigida de la enzima AMDasa.

Para entender los procedimientos de inmovilización de la lipasa que se explicarán a continuación, tenemos que definir ciertos elementos que son comunes en estos.

5.1 Lipasas.

Las lipasas son enzimas que catalizan una gran cantidad de reacciones siendo, además, muy selectivas por lo que son muy utilizadas en los procesos de biocatálisis pudiendo sintetizar intermedios de fármacos quirales.

Se suelen utilizar como soluciones acuosas lo que dificulta su reutilización y recuperación además de que puede contaminar el producto[6].

Una de ellas es la correspondiente a *Candida rugosa*, que se encarga de catalizar reacciones de hidrolisis y esterificación. Cuando se encuentra inmovilizada es muy fácil de separar, mezclar, almacenar y reutilizar.

En esta revisión se estudiará su capacidad para catalizar la hidrolisis enantioselectiva de naproxeno metil éster en diferentes condiciones de pH y temperatura que afectarán a su estado conformacional y por tanto a su actividad.

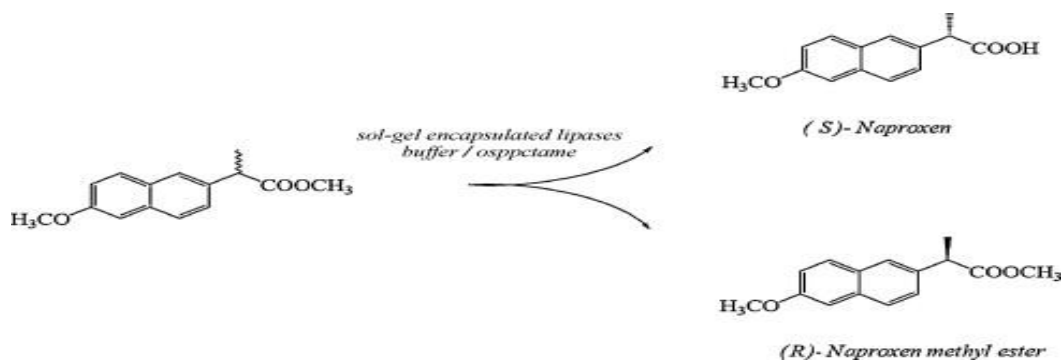


Figura 2: Hidrólisis del (R, S)-Naproxeno metil éster[7].

5.2 Calixarenos.

Los calixarenos son bloques de construcción muy importantes en química supramolecular debido a que son muy fáciles de sintetizar y por la diferencia entre los grupos químicos que tiene; los grupos OH fenólicos y las posiciones para del anillo, que pueden ser funcionalizadas de forma selectiva con diferentes grados de sustitución en cualquier cara y de forma controlada.

Son moléculas con forma de cono que tienen una cavidad hidrofóbica que puede acomodar una gran cantidad de grupos funcionales y además tiene un gran potencial como ligandos de proteínas[8, 9].

Estos pueden cristalizar solos, en presencia de iones o moléculas.

Como desventaja encontramos que se sintetizan a partir de materiales tóxicos y nocivos como el formaldehído, terc-butilfenol entre otros[9].

5.3 Nanopartículas de magnetita.

Una de las desventajas de las enzimas inmovilizadas es su pequeño tamaño de partícula, pero un tamaño de partícula elevado también es una desventaja porque puede producir limitaciones de transferencia de masa.

Para poder mantener la alta actividad que presentan las partículas pequeñas y la facilidad de procesamiento de las partículas grandes, evitando las anteriores desventajas se sintetizan híbridos enzimáticos ferromagnéticos de partículas que se puede separar fácilmente a escala industrial. De esta forma combinamos la biocatálisis con el procesamiento posterior. Para ello se han diseñado catalizadores recuperables magnéticamente que se basan en magnetita (Fe₃O₄)[10] o maghemita (γ-Fe₂O₃)[11].

Las nanopartículas de hierro han demostrado tener efectividad en diversas aplicaciones como en la hipertermia, en la bioseparación, en tumores entre otras muchas[12]. En esta revisión vamos a fijarnos preferentemente en su capacidad para ser utilizados como material de soporte para algunos derivados de calixareno en la inmovilización de biomoléculas.

Las biomoléculas adquieren de esta forma propiedades magnéticas que facilitan la separación y los procesos de reutilización debido a la especiación magnética.

5.4 Método sol-gel.

El método sol-gel es útil para la inmovilización de la lipasa, ya que sirve para el atrapamiento mecánico de enzimas permitiendo la estabilización de la estructura terciaria de las proteínas debido a la estrecha red de gel[13].

En este método se utilizan derivados de éter y ciclodextrinas que se usan como compuestos macrocíclicos que atrapan a la enzima[14, 15].

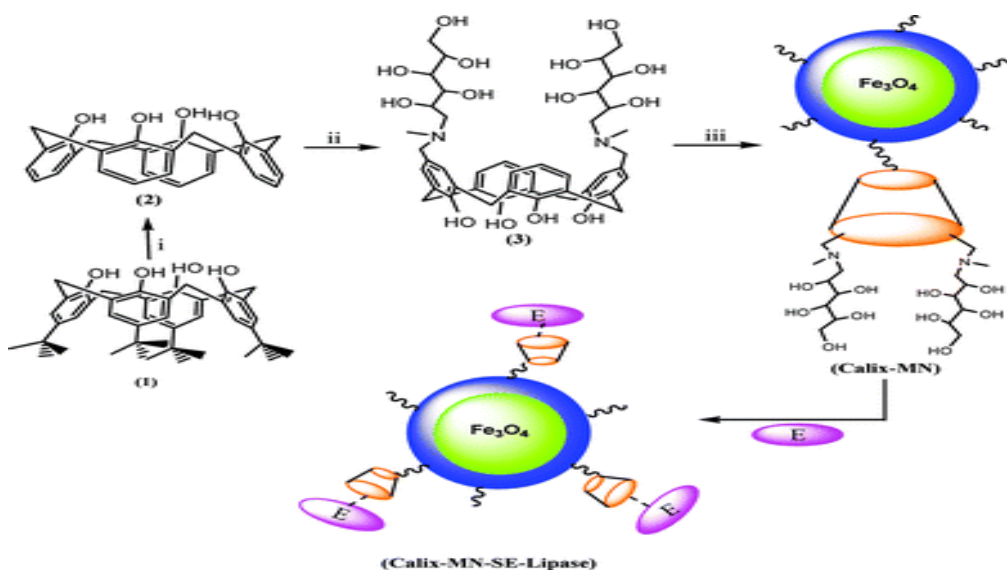


Fig. 3 El procedimiento de encapsulación de sol-gel de Calix-MN-SE-Lipasa. Condiciones de reacción: (i) $AlCl_3$, fenol, tolueno; (ii) N-metilglucamina, formaldehído, CH_3COOH , THF; (iii) EPPTMS-MN, K_2CO_3 , CH_3CN [13].

Una de las mejoras de las propiedades de la lipasa de *Candida rugosa* consiste en su encapsulación con un soporte sol-gel, que ha demostrado ser un método que ha dado una gran homogeneidad, pureza y bajo coste en la síntesis de nanopartículas de magnetita, Fe_3O_4 [10]. Este soporte se puede preparar por condensación de diferentes materiales.

Posteriormente se utilizará el método de Bradford para la determinación de la cantidad de proteína en la solución y en el soluto de elución utilizando como patrón la albúmina de suero bovino[16].

- **Procedimientos que utilizan calixarenos:**

-Uno de los métodos de preparación fue por medio de una policondensación de tetraetoxisilano (TEOS) y octiltrióxido de silano (OTES) en presencia de nanopartículas magnéticas de Calix-4-areno con base de N-metilglucamina y a su conjunto lo denominaremos Calix-MN-SE-Lipasa.

La presencia de estas nanopartículas magnéticas de Calix-4-areno con base de N-metilglucamina permite que la hidrólisis del naproxeno metil éster sea enantioselectiva dando como resultado que las lipasas encapsuladas con nanopartículas magnéticas de Calix-4-areno fueron más eficientes que la lipasa libre. Esto se explica porque los grupos OH y amino, muy abundantes en las nanopartículas, son grupos complejantes muy eficientes que interactúan con la lipasa por medio de enlaces de hidrógeno y de interacciones electrostáticas.

El estudio de la capacidad de conversión y la enantioselectividad sobre el naproxeno metil éster se estudió a partir de HPLC, por lo que la reacción se mantuvo en un sistema discontinuo de fase acuosa-fase orgánica en la que el disolvente es el isooctano y una solución tampón que incluye a la lipasa encapsulada (Calix-MN-SE-Lipasa).

La enantioselectividad se expresa como la relación enantiomérica (E) que se calcula a partir de la conversión (X) y el exceso enantiomérico del sustrato (ees) tal y como se explica en la literatura[17].

La reacción de resolución se determinó tras 24 horas, dando como resultado Naproxeno metilado (R-éster) y el correspondiente ácido eep> 98% a una conversión del 50% y con una enantioselectividad de 460 siendo está muy elevada, mientras que las reacciones de resolución con lipasa libre encapsulada dieron unos resultados de Naproxeno (R-éster) y su correspondiente ácido eep> 98% de una conversión del 37,9% y la enantioselectividad de 166 por lo que la inmovilización dio lugar a una alta enantioselectividad, alta conversión y una rápida recuperación de los productos

combinados con la enzima libre encapsulada. Esto se puede deber a una distorsión en la conformación de las proteínas que reduce su flexibilidad[13].

Además, este procedimiento ha demostrado que las lipasas encapsuladas siguen manteniendo un 28% de sus niveles de conversión tras su quinto ciclo de utilización, haciendo que este procedimiento sea viable económicamente, gracias a la facilidad que tiene de recuperación y reutilización que se facilita gracias a las propiedades magnéticas[13].

-Otro método para la encapsulación de la lipasa de *Candida rugosa* mediante el método sol-gel fue por medio de policondensación de TEOS y OTES tanto en presencia como en ausencia del ácido octavalérico funcionalizado con Calix (8) areno con las nanopartículas de magnetita. Se utilizaron dos tipos diferentes de nanopartículas como aditivos:

- Utilizando un derivado de ácido octa valérico Calix-8-areno que se une covalentemente a las nanopartículas dando lugar a las nanopartículas de magnetita Calix-8-areno (NP-C (8) C₄COOH) que es usado como aditivo en el método sol-gel.
- Utilizando directamente las nanopartículas de óxido de hierro que interaccionan electrostáticamente tanto con la lipasa de *Candida rugosa* como con NP-C (8) C₄COOH dando lugar a dos nuevas lipasas encapsuladas por un lado a la Enc-NP-C[8]-C₄-COOH y por el otro Enc-C[8]-C₄-COOH@ Fe₃O₄[6].

El p-terc-butylcalix (8) areno se trató con 5-bromo valerato para obtener el derivado octa valerato de C(8)-C₄-COOEt que fue hidrolizado para obtener el C(8)-C₄-COOH. Este último se trató de forma selectiva con 1-hidroxibenzotriazol para proporcionar el C (8)-C₄-COOBaz, que fue injertado en las nanopartículas modificadas de magnetita modificadas con aminosilica que sirvieron para la producción de NP-C(8)-C₄-COOH que se utilizó como aditivo en la encapsulación de la lipasa.

Se utilizó un procedimiento de sol-gel para encapsular la lipasa y se realizó tanto con aditivos como sin ellos. Se midió la actividad catalítica de las lipasas encapsuladas en presencia y en ausencia de C-(8)-COOH, nanopartículas de magnetita y Enc-C-(8)-C₄-COOH@ Fe₃O₄ (se refiere a la molécula encapsulada en presencia de nanopartículas de hierro).

Los resultados obtenidos mostraron una clara mayor afinidad de la lipasa encapsulada con C (8)-COOH que la lipasa encapsulada sin aditivos, pero no mostró diferencias entre la C-(8)-COOH y la ENC-C(8)-C4-COOH@ Fe₃O₄. Además, la lipasa encapsulada únicamente con nanopartículas de hierro mostró una menor actividad lo que nos indica que la actividad y estabilidad de la lipasa se incrementan por las interacciones iónicas, los enlaces de hidrógeno y las interacciones huésped-hospedador[9]. La lipasa encapsulada Enc-NP-C(8)-C4-COOH mostró una mayor actividad catalítica y enantioselectividad que las demás[6].

Estas propiedades se ven afectadas por el pH y la temperatura. Por ello la actividad se determinó entre pH 4 y 9 en tampón fosfato de 50mM de concentración, obteniendo que a pH de 7 tiene una mayor capacidad de hidrólisis tanto la lipasa libre como la encapsulada mientras que el pH de máxima eficacia para la NP-C(8)-C4-COOH fue de 6.

Lo mismo se hizo con la temperatura utilizando un rango de 30-60 °C para observar la inactivación térmica de las lipasas dando como resultado que la lipasa encapsulada sin aditivos mostró mayor actividad a 35°C, mientras que en la encapsulada y en la que se utilizaron solamente nanopartículas de magnetita fue de 45°C y siendo de 40 °C para la ENC-NP-C(8)-C4-COOH. Esto se debe a los efectos que tiene tanto el pH como la temperatura en la limitación tanto del estado conformacional de la enzima como en su movilidad[6].

Los resultados de la hidrólisis del naproxeno (R/S) metil éster por las lipasas encapsuladas se observaron tras 24 horas de tratamiento en solución acuosa tamponada e isooctano produciendo el R-naproxeno metil-éster y su correspondiente ácido eep>98% con un porcentaje de conversión del 49% para la Enc-C(8)-C4-COOH@ Fe₃O₄ y un 46% para la ENC-NP-C(8)-C4-COOH. Además la enantioselectividad resultante fue de 371 para la primera y de 265 para la segunda[17], lo que demuestra que la inmovilización de la lipasa con derivados de calixareno aumentan la conversión, la estereoselectividad y una rápida recuperación gracias a las propiedades magnéticas de las lipasas encapsuladas[10]. Esto se explica por la gran eficiencia de los grupos COOH libres como complejantes que forman puentes con los grupos de lisina de la lipasa.

Este método incrementa la recuperación y reutilizabilidad de la enzima que, tras el quinto ciclo de uso la lipasa encapsulada mantiene un 42% de ratio de conversión, lo cual es importante para que el uso de la enzima pueda ser viable económicamente[6].

-Otra de las posibilidades que nos encontramos es recubriendo, con ácido fosfónico y con ácido iminocarboxílico derivados del Calix-4-areno, las nanopartículas de magnetita de óxido de hierro, que fueron preparadas por coprecipitación consiguiendo la inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* en el interior de las nanopartículas. El uso de dos tipos de ácidos diferentes en el recubrimiento de las nanopartículas se realizó para modular su superficie con diferentes grupos. Para realizar este procedimiento se recurrió de nuevo al ya mencionado método sol-gel[10], en el que se utilizaron octiltrimetoxisilano y tetrametoxisilano para la policondensación con el derivado del calixareno inmovilizado en las nanopartículas de magnetita.

Para todo esto fue necesario sintetizar el Calix-4-areno que contiene los grupos fosfonatos en el borde superior. Esto se realizó por medio de una reacción entre el derivado clorometilado del Calix-4-areno y trimetil fosfito en cloroformo, realizando la reacción en reflujo. Por otro lado, el Calix-4-areno que contenía los grupos carboxilo se sintetizó con ácido iminoacético y el derivado clorometilado del Calix-4-areno. Se inmovilizaron en nanopartículas de magnetita y dieron lugar al Fe-Calix-N(COOH) y al Fe-Calix-P por medio de la policondensación de anillo abierto de los epóxidos de las nanopartículas de magnetita de bisglicidil y el grupo hidroxil fenólico de cada una de las moléculas de Calix-4-areno [8].

Cuando se midieron las propiedades enantioselectivas y la actividad catalítica en la hidrólisis de naproxeno R/S metil éster, los resultados mostraron que la actividad y enantioselectividad de la lipasa aumentaban de forma muy elevada cuando esta estaba encapsulada en presencia de aditivos basados en el calixareno, con respecto a la lipasa encapsulada sin aditivos. Esto se debe a la interacción entre huésped-anfitrión y a la afinidad cooperativa que hay entre los grupos ácido carboxílico (Fe-Calix-N(COOH)) y el ácido fosfónico (Fe-Calix-P) con los grupos guanidinil de la arginina, imidazol de la histidina, el amino de la lisina y el indolil del triptófano[9].

La actividad hidrolítica de la lipasa se evaluó utilizando p-nitrofenilpalmitato y dio como resultado que las formas con ácido derivados de calixarenos eran más eficientes que las lipasas libres debido a que los grupos carboxil y fosfonil son agentes complejantes muy efectivos que interactúan con el centro activo de la lipasa por interacciones electrostáticas y por enlaces de hidrógeno.

Se evaluó el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad catalítica. El pH óptimo se ve afectado por la inmovilización, que produce un cambio conformacional en la enzima lo cual afecta a la actividad catalítica. Los pHs óptimos se encontraron en 5

para el Fe-Calix-P y en 6 para el Fe-Calix-N(COOH), mostrando de esta forma una mayor estabilidad a pH ácido que la lipasa encapsulada libre. Tras la inmovilización se desplazó el pH óptimo de las reacciones catalizadas por la lipasa libre hacia un valor ácido.

Con respecto a la temperatura óptima; la lipasa encapsulada mostró una mayor eficacia a una temperatura de 35°C, mientras que rondó los 40 para Fe-Calix-P y Calix-N(COOH) debido a que la enzima encapsulada tiene una estructura más rígida y a la limitación conformacional de movimientos debido a la mejora de la resistencia a la desnaturalización.

Estos derivados de los calixarenos sustituidos con iminodicarboxílico y fosfónico mejoraron la enantioselectividad y la actividad de la lipasa en la hidrólisis del metil éster naproxeno racémico. La reacción se realizó en un medio acuoso tamponado con isooctano a pH y temperatura óptimas. El uso de Fe-calix-P muestra una alta conversión y enantioselectividad a pH y temperatura óptima. La reacción de resolución de la lipasa encapsulada con derivados de ácido fosfónico; el Fe-calix-P fue analizada tras 24 horas a un pH y T óptimas, la reacción tuvo lugar con el R-éster del metil éster naproxeno y su correspondiente ácido >98% con una conversión del 48,1% con una enantioselectividad de E=350 mientras que en las reacciones de resolución con la lipasa encapsulada sin los aditivos dio un porcentaje de conversión del 20% con una enantioselectividad de E=137[17], lo que nuevamente nos muestra el aumento de la enantioselectividad, el alto grado de conversión y la rápida recuperación con respecto a la enzima libre.

Además, se realizaron estudios de reutilización tanto con el Fe-Calix-P como con el Fe-Calix-N(COOH), siempre teniendo en cuenta que fueron lavadas con PBS tras cada uso. El porcentaje de conversión y el ratio enantiomérico de la lipasa encapsulada disminuía después del segundo uso. La lipasa encapsulada mantenía un 39 y 35 % de ratios para lipasas encapsuladas base usando naproxeno como sustrato.

-En otro de los casos se inmovilizó nuevamente la lipasa de *Candida rugosa* con el sistema sol-gel en presencia y ausencia de un derivado de ácido carboxílico calix [n] areno injertado en nanopartículas magnéticas o en presencia del derivado de ácido carboxílico calix [n] areno con nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ como aditivo[18].

Para ello se emplearon dos métodos distintos.

- Por el método A se prepararon las lipasas encapsuladas sol-gel con y sin las nanopartículas magnéticas injertadas con Calix (4, 6 y 8) areno. Para ello mezcló la lipasa de *Candida rugosa* con una solución de tampón

fosfato. Posteriormente se añadió una mezcla de los Calix (4, 6 u 8) COOH-MN con alcohol polivinílico y con NaF y se homogeneizó. Después se añadió OTES (octiltrióxido de silano) y TMOS (tetrametoxisilano) para dar lugar al gel. Toda la reacción se produjo en agitación.

- Por el método B se utilizaron derivados de ácido carboxílico de Calix (4, 6 u 8) areno que no habían sido inmovilizadas en nanopartículas magnéticas (Calix (4, 6 u 8) COOH). Las lipasas fueron encapsuladas por el sistema sol-gel con y sin derivados del calixareno[15]. Para ello, se mezclaron la lipasa de *Candida rugosa* con PBS a pH 7. Después se añadió una mezcla Calix (4, 6 u 8) COOH con nanopartículas de Fe₃O₄ como aditivo y se realizaron los mismos pasos que en el caso anterior.

La síntesis de derivados del ácido carboxílico p-terc-butilcalix (4, 6 u 8) areno se realizó mediante la preparación de los p-terc-butilcalix (4, 6 u 8) arenos por medio de una reacción de condensación basada en catalizadores (figura 4) [19].

Los derivados del p-terc-butilcalix (4, 6 y 8) arenos fueron sintetizados[20] mediante la reacción de p-terc-butilcalix (4, 6 u 8) arenos con metil bromoacetato en acetona diluida en presencia de carbonato de potasio anhidro.

Los derivados de éster fueron convertidos en derivados ácido carboxílico utilizando NaOH en EtOH.

Las nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄, utilizadas como aditivos en la reacción de hidrólisis, se prepararon mediante la coprecipitación química de los iones Fe³⁺ y Fe²⁺ y se emparejó la relación de la concentración de estos iones con la relación estequiométrica de 1:2[18]. Las nanopartículas de Fe₃O₄ modificadas con APTMS (APTMS-MN) se formaron mediante la reacción entre APTMS y los grupos hidroxilo en la superficie de la magnetita. Posteriormente las nanopartículas se modificaron directamente mediante APTMS para introducir los grupos reactivos en la superficie de las partículas[21].

Por último, los derivados de ácido carboxílico Calix (4, 6 u 8) areno se inmovilizaron en la superficie de las nanopartículas modificadas en presencia de DCC en DCM[22].

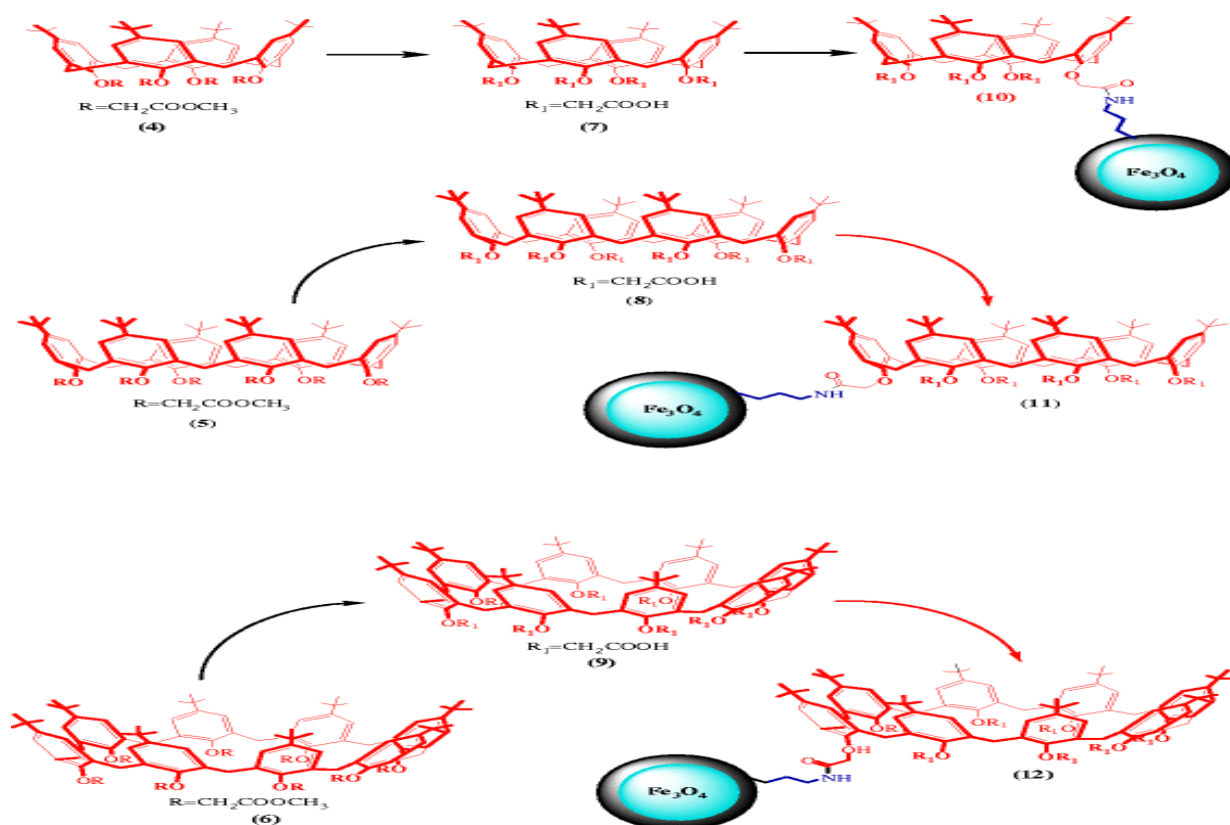


Fig 4. Representación esquemática de la síntesis de calix [n] areno ácidos carboxílicos y calix [n] areno ácido carboxílico injertado nanopartículas magnéticas[18].

La lisina catiónica forma complejos con los Calix(n)arenos y todos sus derivados[23].

Para la reacción de hidrólisis del R/S naproxeno metil éster se utilizaron como catalizadores las lipasas de *Candida rugosa* encapsuladas en presencia y ausencia de derivados de ácido carboxílico Calix(n)areno que han sido injertados dentro de nanopartículas magnéticas (Calix (4, 6 y 8) COOH-MN) o dentro de derivados de ácido carboxílico Calix(n)areno (Calix (4, 6 y 8) COOH) con Fe_3O_4 como aditivo.

Los resultados mostraron que la lipasa encapsulada con Calix (4) COOH era más eficiente con respecto a la expresión de la actividad de la lipasa encapsulada y a la actividad específica. Esto es debido a que los derivados de calixareno más grandes como el Calix (6) COOH y Calix (8) COOH contienen varios grupos COOH que cubren el sitio activo de la lipasa.

La comparación de la lipasa encapsulada con Calix (4) COOH-MN, que se inmovilizó covalentemente con Fe_3O_4 con el Calix (4) COOH dio como resultado que esta última es generalmente más eficaz que la lipasa encapsulada con Calix (4) COOH-MN. El Calix (4)- COOH-MN contiene grupos amino libres que establecen enlaces de

hidrógeno intramoleculares con el grupo carboxilo de Calix-(4)-COOH. Por ello, se produce una interacción más débil con la enzima que la de Calix (4)- COOH[18].

El efecto del pH se midió modificando el pH de 4 a 9 y estudiando la modificación de la actividad de la lipasa libre y la inmovilizada en la reacción de hidrolisis. El pH óptimo de la lipasa encapsulada con Calix (4, 6 y 8) COOH- MN fue de 5 y de 7 para el Calix (4, 6 y 8) COOH. Este cambio del pH óptimo de la lipasa encapsulada con Calix (4, 6 y 8) COOH- MN hacia valores ligeramente ácidos se debe a la inmovilización de la enzima con soportes policatiónicos[24]. El cambio de pH depende principalmente del método de inmovilización y la interacción de las enzimas con los soportes.

Con respecto a la temperatura, las enzimas encapsuladas libres muestran temperaturas óptimas más altas. La temperatura óptima para la lipasa encapsulada con Calix (4, 6 y 8) COOH-MN rondó los 35°C mientras que en la lipasa con Calix (4, 6 y 8) COOH cambió a 40°C[18].

La reacción de hidrolisis del naproxeno metil éster se realizó a un pH de 5 y de 7 a una temperatura de 35°C durante 24 horas en una solución acuosa tamponada con isooctano. La reacción de resolución con la lipasa encapsulada con Calix (4) COOH fue analizada tras 24 horas a un pH de 7. Esta reacción tuvo lugar con el R-éster y su correspondiente ácido (eep)>98 % con una conversión del 50% y una enantioselectividad de E=525 para el naproxeno metil éster. Por otro lado, la reacción de resolución con derivados del calixareno de mayor tamaño, el Calix (6 y 8) COOH con su correspondiente ácido, eep>98% para el naproxeno, dieron como resultado un 43 y 38 % de conversión y sus enantioselectividades fueron de E= 221 y 183 respectivamente[17]. Además, el Calix (4) COOH mostró una mayor enantioselectividad y una conversión en comparación con el derivado del ácido Calix (4) areno carboxílico injertado en nanopartículas magnéticas (Calix (4) COOH-MN).

La variación del pH en la resolución quiral que usa enzimas como catalizadores influye sobre la selectividad quiral porque la conformación de la enzima depende de su estado de ionización. Para probar la dependencia del porcentaje de conversión (X) de la reacción de hidrolisis por la lipasa encapsulada con Calix (4, 6 u 8) COOH, se realizaron los experimentos a dos diferentes temperaturas, a 35 y a 40. Los resultados indican que el grado de conversión se incrementa a sus valores de temperatura óptima.

La reusabilidad de las enzimas inmovilizadas es muy importante en su reutilización. Se realizaron estudios complementarios para comprobar la reusabilidad de

las lipasas encapsuladas. Los resultados obtenidos muestran un mantenimiento del 32% de su ratio de conversión para la lipasa encapsulada con Calix (4) COOH-MN tras su quinto uso a un pH de 5. Además la lipasa inmovilizada mantiene un 42, 43 y 26% de los ratios de conversión cuando la lipasa encapsulada con Calix (4)COOH, Calix(6)COOH y Calix(8)COOH tras el quinto uso, respectivamente para cada una de ellas. Esto se debe a la inactivación de la enzima causada por la desnaturalización de la proteína y la fuga de la proteína de los soportes después del uso.

La inmovilización de los derivados de ácido carboxílico del Calix (n) areno con Fe_3O_4 como aditivo dio como resultado una alta conversión (49%) y una enantioselectividad de $E=525$ y una rápida recuperación del producto en comparación a las lipasas encapsuladas con derivados de ácidos carboxílicos de Calix (n)areno más grandes y a la lipasa encapsulada con Calix (4, 6 u 8) COOH-MN. Se ha observado que la lipasa encapsulada con derivados de ácido carboxílico con Calix (4) areno y Fe_3O_4 como aditivo a pH de 7 y a una temperatura de 35°C fueron las condiciones de hidrolisis más efectivas.

Además, se pueden fabricar lipasas encapsuladas muy económicas gracias a sus propiedades magnéticas, siendo estos factores importantes para la elección del sistema enzimático apropiado para diferentes aplicaciones biotecnológicas. El uso de derivados de ácido carboxílico para inmovilizar enzimas por Calix(n)areno por la síntesis de reacción bifásica podría proporcionar mejoras apreciables en la fabricación de productos intermedios farmacéuticos, productos químicos finos e ingredientes alimentarios funcionales[18].

- **Procedimiento de la evolución dirigida:**

-En este caso, la síntesis del isómero S del naproxeno se ha realizado por medio de otro método; la evolución dirigida. Este método consiste en la evolución directa de las enzimas en el laboratorio de forma que nos puedan ser útiles, a pesar de que no lo serían para la bacteria[25].

La evolución dirigida logra resultados funcionales deseados, pero desconociendo aún como la secuencia los codifica. La evolución dirigida imita la evolución mediante selección artificial, y se acelera centrándose en genes individuales expresados en microorganismos de crecimiento rápido. Se introducen mutaciones que mejoran la actividad de enzimas y posteriormente se utilizan estas enzimas mejoradas

para la siguiente ronda de mutación. De esta forma, la evolución dirigida puede producir enzimas nuevas que son muy parecidas a las iniciales, de forma que comparten mecanismos, pero con una nueva actividad. Pero para crear nuevas enzimas primero hay que identificar el potencial catalítico novedoso en las proteínas de partida que tienen niveles bajos de esta actividad, que posteriormente se mejorará en el laboratorio[25].

Se han realizado tres rondas de evolución dirigida guiada por estructura[26] que han demostrado que la actividad de la arilmalonato descarboxilasa S selectiva G74C/C188S podría incrementarse hasta 920 veces. La mejor variante tenía una actividad incrementada 220 veces en la producción del Naproxeno S con una enantioselectividad (ee) del 99%, el cual es un valor excelente.

Como se ha explicado anteriormente, las enzimas con alta regio y enantioselectividad son adecuadas para la síntesis de compuestos ópticamente puros y dando pocos subproductos en el proceso[27].

La enzima que se utilizó es la arilmalonato descarboxilasa que escinde el α aril- α -metil malonato en alfa arilpropionatos ópticamente puros, que son más conocidos como profenos, un grupo muy activo fisiológicamente usados como AINEs. El S naproxeno se ha preparado por recristalización de mezclas diastereoméricas[2]. La resolución cinética de la carboxil esterasa del naproxeno racémico metil éster da como resultado una pureza óptica del producto muy elevada, > 99% de ee[27].

La reacción catalizada por la AMDasa consiste en una descarboxilación enantioselectiva del sustrato y una protonación de la cara enantioselectiva del intermedio de enolato plano por la cys 188.

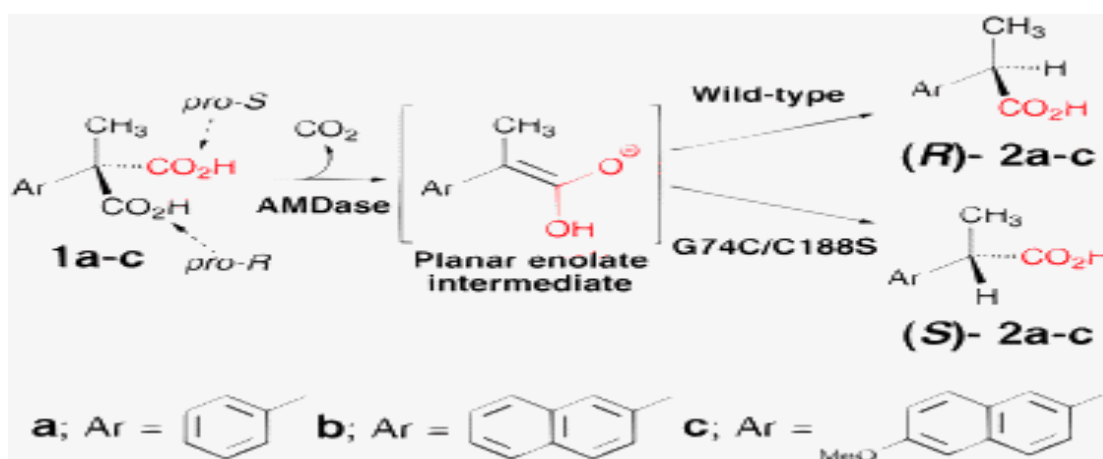


Fig. 5 Descarboxilación asimétrica catalizada por AMDasa[27].

Como la AMDasa tiene un 30% de homología con respecto a al cofactor independiente de las racemasas se diseñó una variante, designada como G74C/C188S que

proporciona los S-enantiómeros con una enantioselectividad del 94% [28]. En el sitio activo del doble mutante, la Cys74 dona un protón a la cara del intermedio del enolato lo que lleva a una inversión en la enantioselectividad de la enzima de tipo salvaje. El problema es que esta variante tan solo tiene un 0,005% de actividad catalítica comparada con la enzima de tipo salvaje.

Los experimentos de mutagénesis aleatoria dieron como resultado una variante S36N que incrementaba la actividad 10 veces, pero a pesar de este resultado, la actividad seguía siendo baja, por lo que se mejoró la actividad de la variante de la AMDasa S-selectiva.

El mecanismo de esta enzima se basa en estructuras tridimensionales y entre sus sitios activos nos encontramos con el agujero llamado oxianión, el bolsillo hidrofóbico, el donador de protones y el bolsillo de unión arilo.

La enantioselectividad de la reacción de descarboxilación se inició por la estabilización del carboxilato pro-S por el agujero oxianión y por la desestabilización del carboxilato pro-R por el bolsillo hidrofóbico. La actividad de los mutantes G74 cisteína y C188 serina fue mucho más baja que la de la enzima nativa, debido a la descarboxilación, que es el paso limitante de la reacción de la AMDasa. Por ello se mejoró la interacción entre el sustrato con la cisteína y la serina por medio de la modificación del bolsillo hidrofóbico, que como ya se ha comentado, desestabiliza el carboxilato pro-R. Se siguió una estrategia de tres generaciones de mutagénesis: la primera se centró en la Ser188 y las otras dos en el bolsillo hidrofóbico [27].

Una vez realizada la mutagénesis se obtuvieron diversas variantes, de las cuales la que tenía la actividad específica más alta frente al α -aril- α -metilmalonato era la G74C/M159L/C188G. Estas mostraron una actividad específica 220 veces superior dando el S-naproxeno con una pureza óptica excelente. Además, esta variante mostró una mayor actividad frente la mutante G74C/C188S debiéndose esto al descenso de la actividad AMDasa por el impedimento estérico del hidroxilo de la Ser188. Pero esta variante mostró menor enantioselectividad por la interacción del Ser188 con el intermedio enolato.

La mutación M159L causó un efecto estérico en la posición α del sustrato, de modo que alteró su modo de unión. Además, el intercambio de Tyr48 por Phe redujo la polaridad de la bolsa hidrofóbica. Estas dos modificaciones desestabilizan el carboxilato pro-R. La estructura cristalina (código APB 3IXL) indica que Tyr48 puede formar enlaces de hidrógeno con el grupo hidroxilo de Ser76 en el bolsillo oxianión. La mutación Y48F

posiblemente cambia la orientación de Ser76, dando como resultado una unión de sustrato desfavorable para la descarboxilación[27].

El incremento de la actividad depende en gran medida de la degradación de la estructura del sustrato.

Como podemos observar la mejora de la actividad de los mutantes fue muy elevada pudiendo utilizarse este procedimiento para la optimización de biocatalizadores. Además, como se produjo una mejora de la enantioselectividad hacia las variantes S se obtuvo un catalizador muy útil para la producción del naproxeno y otros análogos con una alta enantiopureza y un excelente rendimiento en unas condiciones sostenibles[27].

6. Conclusiones.

Como hemos podido comprobar hay una gran cantidad de métodos biocatalíticos para sintetizar el naproxeno y todos ellos han demostrado ser altamente enantioselectivos y además proporcionan una mayor actividad que la enzima nativa. Con respecto a sus posibilidades de reutilización se ha visto que en todos los métodos la enzima conserva parte de su actividad incluso tras su quinto ciclo de uso, lo que los convierte en métodos muy económicos y además se pueden realizar en condiciones de temperatura y de pH que no dañen al medioambiente.

7. Referencias Bibliográficas.

1. Ragab, M.A.A. and E.I. El-Kimary, *High performance liquid chromatography with photo diode array for separation and analysis of naproxen and esomeprazole in presence of their chiral impurities: Enantiomeric purity determination in tablets*. Journal of Chromatography A, 2017. **1497**: p. 110-117.
2. Harrington, P.J. and E. Lodewijk, *Twenty Years of Naproxen Technology*. Organic Process Research & Development, 1997. **1**(1): p. 72-76.
3. <Curr Green Chem 2014 1(2) 155-181.pdf>.
4. Truppo, M.D., *Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed*. ACS Med Chem Lett, 2017. **8**(5): p. 476-480.
5. Schmid, A., et al., *Industrial biocatalysis today and tomorrow*. Nature, 2001. **409**: p. 258.
6. Sayin, S., E. Akoz, and M. Yilmaz, *Enhanced catalysis and enantioselective resolution of racemic naproxen methyl ester by lipase encapsulated within iron oxide nanoparticles coated with calix[8]arene valeric acid complexes*. Org. Biomol. Chem., 2014. **12**(34): p. 6634-6642.
7. Yilmaz, E., M. Sezgin, and M. Yilmaz, *Enantioselective hydrolysis of rasemic naproxen methyl ester with sol-gel encapsulated lipase in the presence of sporopollenin*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010. **62**(2): p. 162-168.
8. Ozyilmaz, E., M. Bayrakci, and M. Yilmaz, *Improvement of catalytic activity of Candida rugosa lipase in the presence of calix[4]arene bearing iminodicarboxylic/phosphonic acid complexes modified iron oxide nanoparticles*. Bioorg Chem, 2016. **65**: p. 1-8.

9. Perret, F. and A.W. Coleman, *Biochemistry of anionic calix[n]arenes*. Chem Commun (Camb), 2011. **47**(26): p. 7303-19.
10. Xu, J., et al., *Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles by sol-gel method*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2007. **309**(2): p. 307-311.
11. Sheldon, R.A. and J.M. Woodley, *Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry*. Chem Rev, 2018. **118**(2): p. 801-838.
12. Huber Dale , L., *Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles*. Small, 2005. **1**(5): p. 482-501.
13. Sayin, S., E. Yilmaz, and M. Yilmaz, *Improvement of catalytic properties of Candida rugosa lipase by sol-gel encapsulation in the presence of magnetic calix[4]arene nanoparticles*. Org Biomol Chem, 2011. **9**(11): p. 4021-4.
14. Sheldon Roger , A., *Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2007. **349**(8- 9): p. 1289-1307.
15. Reetz Manfred , T., et al., *Second Generation Sol- Gel Encapsulated Lipases: Robust Heterogeneous Biocatalysts*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2003. **345**(6- 7): p. 717-728.
16. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1): p. 248-254.
17. Chen, C.S., et al., *Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers*. Journal of the American Chemical Society, 1982. **104**(25): p. 7294-7299.
18. Akoz, E., O.Y. Akbulut, and M. Yilmaz, *Calix[n]arene Carboxylic Acid Derivatives as Regulators of Enzymatic Reactions: Enhanced Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Hydrolysis of (R/S)-Naproxen Methyl Ester*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013. **172**(1): p. 509-523.
19. Arnaud-Neu, F., et al., *Synthesis, x-ray crystal structures, and cation-binding properties of alkyl calixaryl esters and ketones, a new family of macrocyclic molecular receptors*. Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**(23): p. 8681-8691.
20. Chang, S.-K. and I. Cho, *New metal cation-selective ionophores derived from calixarenes: their syntheses and ion-binding properties*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1986(0): p. 211-214.
21. Wang, R., et al., *Calix[4]arene based selective fluorescent chemosensor for organic acid recognition*. Frontiers of Chemistry in China, 2008. **3**(3): p. 348-352.
22. Chiou, S.-H. and W.-T. Wu, *Immobilization of Candida rugosa lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups*. Biomaterials, 2004. **25**(2): p. 197-204.
23. Oshima, T., et al., *Liquid membrane transport of cytochrome c using a calix[6]arene carboxylic acid derivative as a carrier*. Journal of Membrane Science, 2008. **307**(2): p. 284-291.
24. Pereira, E.B., et al., *Kinetic Studies of Lipase from Candida rugosa*, in *Twenty-Second Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, B.H. Davison, J. McMillan, and M. Finkelstein, Editors. 2001, Humana Press: Totowa, NJ. p. 739-752.
25. Arnold, F.H., *Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life*. Angew Chem Int Ed Engl, 2018. **57**(16): p. 4143-4148.
26. Okrasa, K., et al., *Structure- Guided Directed Evolution of Alkenyl and Arylmalonate Decarboxylases*. Angewandte Chemie International Edition, 2009. **48**(41): p. 7691-7694.
27. Miyauchi, Y., et al., *Dramatically improved catalytic activity of an artificial (S)-selective arylmalonate decarboxylase by structure-guided directed evolution*. Chem Commun (Camb), 2011. **47**(26): p. 7503-5.
28. Terao, Y., et al., *Inversion of enantioselectivity of arylmalonate decarboxylase via site-directed mutation based on the proposed reaction mechanism*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007. **45**(1-2): p. 15-20.