



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
TÍTULO: EMPLEO DE BIOCATALIZADORES
PARA LA SINTESIS DE SILIBINA Y
DERIVADOS

Autor: Ruihao Mu

Fecha: Julio 2019

Tutor: Andrés R. Alcántara León

RESUMEN

La biocatálisis es el empleo de enzimas para la síntesis de diversas sustancias, se trata de una técnica de elevado rendimiento y con un menor contaminación comparado con la síntesis química tradicional. Por lo cual esta técnica de biocatálisis ha sido empleada en la síntesis de silibina y sus derivados.

La silibina es una de los muchos compuestos que forma parte de la silimarina que es el extracto de la semilla del cardo mariano *Silybum marianum*. Por sus propiedades hepatoprotectoras, quimioprotectoras, antioxidantes entre otras muchas características ha sido actualmente estudiados y empleados en el tratamientos de algunos enfermedades, como cirrosis hepática, cáncer, etc.

En las últimas décadas han habido grandes avances en la forma de síntesis de silibina para facilitar su obtención y descubrir al mismo tiempo de nuevos derivados de silibinas con nuevos y mejores propiedades terapéuticas.

Palabras claves: silibina, biocatálisis, derivados silibina

ABSTRACT

Biocatalysis is the use of enzymes for the synthesis of various substances, it is a high performance technique and with a lower contamination compared to the traditional chemical synthesis. Therefore, this technique of biocatalysis has been used in the synthesis of silybin and its derivatives.

Silybin is one of the many compounds that is part of the silymarin that is the extract of the seed of the milk thistle *Silybum marianum*. Due to its hepatoprotective, chemoprotective and antioxidant properties, among many other characteristics, it has been studied and used in the treatment of some diseases, such as liver cirrhosis, cancer, etc.

In the last decades there have been great advances in the form of synthesis of silybin to facilitate its obtaining and at the same time to discover new derivatives of silybins with new and better therapeutic properties.

Keywords: silybin, biocatalysis, silybin derivatives

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL COMIENZO DE BIOCATÁLISIS

En la industria farmacéutica, gran parte de las actividades de descubrimiento de p.a. es encontrar fármacos más potentes, más selectivos y menos tóxicos que los p.a. de los años anteriores. Por lo que cada vez las estructuras de los nuevos p.a. son más complicado, con más de un C quiral, junto con que cada vez hay más preocupación ambiental sobre las contaminaciones producidos por las diferentes industrias, especialmente la farmacéutica ya que es una de las más contaminantes. Esto conlleva a que la síntesis de los p.a. necesitan técnicas más innovadoras, competitivas y económicas y que sea una “Química verde”. [2]

Entre ellas se encuentra la biocatálisis que es una de las técnicas favoritas en las nuevas síntesis de p.a. utilizando enzimas como catalizadores.

Las enzimas son unas catalizadores buenas por ser capaces de catalizar una amplia gama de sustratos, y en el proceso no necesitan reacciones de protección y desprotección muy común en reacciones orgánicas tradicionales. Además son reacciones muy eficaces que generan muy pocos residuos por lo que es una alternativa ecológica comparado con catalizadores químicos tradicionales. [2]

Aunque en el mercado actual hay una gran cantidad de enzimas comercializadas pero solo un pequeño grupos de ellos son utilizadas en biocatálisis, ya que existe otras industrias que los utilizan.

1.1. ENZIMA Y PRINCIPIO ACTIVO

Las enzimas son potentes máquinas moleculares que han evolucionado millones de años mediante la selección natural para catalizar miles de reacciones bioquímicas de toda la vida en el Tierra. Son catalizadores de los procesos biológicos en condiciones fisiológicas, pueden acelerar las reacciones de hasta 10 veces mayor comparada con las reacciones no catalizadas. Sin embargo debido a que su actividad depende mucho de las condiciones que la rodea, es decir puede ser afectado por el pH, la temperatura, los solventes, los sustratos y productos que generan, su aplicación industrial es muy complicada. [4] Por lo tanto, las enzimas naturales requieren cierto grado de optimización para que puedan funcionar adecuadamente como biocatalizadores industriales.

La fuente de la enzima que se emplea puede ser cualquier célula viva. Entre ellos los microorganismos destacan por ser relativamente fáciles de cultivar. Pero también existen enzimas de origen vegetal o animal que se emplean para la biocatálisis. [2]

Los tipos de enzimas más utilizados actualmente en la biocatálisis de p.a. son las enzimas de: hidrólisis, esterificación, transesterificación y amidación de éster, amida, alcohol, ácido; reducción de la cetona al alcohol; conversión de cetoácido a aminoácido; reacción de hidroxilación; reacción de formación de enlaces C-C. [12]

El principio activo (PA o API) es el componente responsable de la actividad farmacológica de un medicamento.

La síntesis de un PA generalmente está formada generalmente por varias reacciones de diferentes tipos, que parten de sustratos disponibles en el mercado, y el biocatalizador se puede utilizar en uno o más pasos de la ruta sintética del PA. El hecho de que la síntesis de PA sea un proceso de múltiples etapas y la biocatálisis puede formar parte de estos pasos son factores importantes para recordar durante el diseño y la ejecución del proceso. Los pasos del proceso que utilizan biocatálisis a menudo requieren consideraciones y tácticas diferentes frente a la síntesis química tradicional.

La selectividad de las reacciones enzimáticas es una de sus características más importantes para su aplicación a la síntesis del p.a. Esta selectividad es una selectividad de grupo que es cuando la reacción solo ocurre en un grupo específico sin afectar a un grupo químicamente similar o igual y se puede diferenciar en:

- La regioselectividad: la reacción ocurre únicamente en una posición específica del sustrato entre múltiples sitios posibles que existe.[12]
- La estereoselectividad: el producto formado solo es de un único estereoisómero entre varios estereoisómeros posibles, porque la reacción ocurre con un único estereoisómero del sustrato.[12]

Esto es muy importante en los fármacos debido a que en muchos casos los distintos enantiómeros de un único compuesto pueden tener o no actividad, que uno es más activo o incluso que tiene actividades totalmente distintas.

1.2. MEJORA Y OPTIMIZACIÓN DE ENZIMAS

Una de las razones para mejorar enzimas es para que adáptese mejor a los sustratos no naturales. Algunas enzimas de determinadas rutas como las lipasas son capaces de catalizar reacciones de sustratos muy distintos del natural. Al contrario, las enzimas del metabolismo primario, como las del glucólisis, su rango de sustrato es estrecho.[12] La ampliación del rango de sustratos de muchas enzimas es muy importante para su utilidad porque permite su uso en una gran cantidad de reacciones distintas a la del natural.

Otra razón es para aumentar su estabilidad en las condiciones de reacción, debido a que estas pueden ser muy distintas de las condiciones de las células, pudiendo haber altas temperaturas, pH extremos, elevado [c] de sustrato y producto, el medio de reacción, etc.[12] Por lo tanto la enzima debe ser capaz de funcionar correctamente en estas condiciones durante todo el proceso de reacción.

Una tercera razón para mejorar enzimas es que al modificar las enzimas es capaz de formar parte de nuevas reacciones que sintetice un nuevo producto.

Una vez que ya se ha diseñado toda la ruta sintética y determinado los biocatalizadores que se va a utilizar, a menudo es necesario la optimización de todos los pasos de la reacción, donde la reactividad, la selectividad, la inhibición y la desactivación se estudia de forma minuciosamente. Algunas optimizaciones que se realizan son:

- Cambio del sustrato: se modifican los sustratos en el caso de que no son ideales para la biocatálisis porque afecta a la eficacia de la reacción.[2] Esto se puede deber que hay un grupo protector en el sustrato que dificulta la actuación de la enzima y su modificación podría cambiar significativamente la eficacia de la reacción.
- Purificación de disolventes: Para las reacciones enzimáticas, los medios de reacción que incluyen pH, tipos y contenidos de disolventes y otros componentes, tienen una gran importancia en la conformación que va a tener las enzimas debido a que son proteínas.[2] Por lo tanto, tener un disolvente puro también es muy importante.
- Inhibición o saturación de enzimas: Las enzimas en una situación con una elevada cantidad de sustrato o producto, pueden inhibirse o saturarse bajando su eficacia. Para evitar esta situación lo mejor es que el proceso sea continuo,[8] entonces no habrá producto que lo sature o sino habrá que extraer el producto en cada determinado tiempo para evitar la saturación o inhibición de la enzima
- Evolución dirigida: La evolución dirigida actualmente es una técnica muy importante para mejorar enzimas silvestres que tras procesos de optimización no se consigue mejorar la eficacia de la ruta sintética.[2] Esta técnica a menudo puede lograr una mejora de más de 10 a 30 veces en la reactividad y enantioselectividad de la enzima en un plazo de 6 a 12 meses.
- Ingeniería genética: Los avances de la ingeniería genética permite ahora crear enzimas según las necesidades del proceso (enzimas a la carta), o introducir el gen de la enzima en un microorganismo que se ha estudiado mucho su empleo industrial como es el caso de *Escherichia coli*. [2]

1.3. DESARROLLO DEL BIOCATÁLISIS

La biocatálisis se diferencia de las reacciones químicas tradicionales principalmente en que se debe tener en cuenta la cinética de las enzimas, la estabilidad de las proteínas en condiciones de la reacción y las características del biocatalizador por su función en la célula, como el crecimiento, la inducción de actividades enzimáticas o la participación en vías metabólicas.[2]

El punto de partida del desarrollo de un proceso biocatalítico generalmente es el producto, que deber ser posible producirlo por una reacción biocatalítica. Posteriormente uno o más biocatalizadores deben ser identificado, desarrollado y establecido en un proceso, en última instancia, la biocatálisis tendrá que ser económicamente. Los aspectos limitantes del proceso biocatalítico se va mejorando, llegando finalmente a un proceso industrial eficiente.[2]

La viabilidad económica del proceso biocatalítico depende de varios factores: el tipo de biocatalizador utilizado, la necesidad de reactores y equipos especializados, parecido a los procesos químicos.[8] La mayoría de los biocatalizadores utilizados son en formas inmovilizadas que pueden ser recuperadas y reutilizadas posteriormente. Sin embargo, también hay procesos basados en células o enzimas en suspensión homogénea, que son lo suficientemente económicos para permitir un solo uso, sin recuperaciones ni reutilizaciones.

1.3.1. INICIO DEL PROCESO

El desarrollo de nuevos procesos se basa normalmente en que hay una nueva enzima de interés o que se ha encontrado unos productos deseados, que luego mediante el empleo de un biocatalizador se pueden sintetizar.

Las enzimas que se van a utilizar pueden estar disponible comercialmente, o pueden haber sido descrita en libros o revistas científicas. O sino es necesario detectarlos en los organismos o se desarrollan actividades enzimáticas completamente nuevas de antiguas enzimas mediante el diseño de proteínas o la evolución dirigida.[8]

En caso de reacciones que no necesita regeneraciones de coenzimas, como las reacciones de isomerización o hidrólisis, se puede elegir en este caso tanto enzimas como células enteras. Pero cuando se requieren cofactores, las células enteras son mejores porque permiten la regeneración del cofactor.[8]

Las condiciones de reacción para el funcionamiento enzimática óptima, una alta reactividad y una larga vida útil de la enzima se seleccionan en función de las características de la enzima.[8] El medio de reacción puede tratarse de una fase acuosa, una fase orgánica o un sistema de dos fases líquidas, se optimiza para disolver los sustratos y productos manteniendo la actividad enzimática.[8]

El biocatalizador y el proceso biocatalítico serán diseñados para obtener el mejor rendimiento posible, al nivel de la enzima, la célula huésped y el proceso.

1.3.2. ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

Gracias a los avances en la proteómica y la ingeniería enzimática ahora es bien sabido que las enzimas funcionan en los solventes orgánicos y en muchos solventes puros, incluso en fluidos supercríticos en ausencia de agua agregada. Dichos entornos producen muchas ventajas, incluida una mayor solubilidad del sustrato, la reversión de las reacciones hidrolíticas y la especificidad enzimática se modifica dan como resultado nuevas actividades enzimáticas que antes solo eran posibles usando modificaciones genéticas o vías complejas de múltiples etapas dentro de células completas. Como resultado, las aplicaciones de la biocatálisis en solventes orgánicos van desde la resolución quiral de principios activos, productos químicos y sus productos intermedios hasta la polimerización enantio y regioselectiva.[4,8]

Pero a pesar de las ventajas de los medios no acuosos para la biocatálisis, las enzimas suelen presentar una actividad baja en estos medios comparado con el medio acuoso. Aunque desarrollos recientes han demostrado que los biocatalizadores pueden diseñarse para que funcionen en solventes orgánicos puros con actividades y selectividades similares que en el medio acuoso, ya que en presencia de bajas concentraciones de un surfactante adecuado, las enzimas son capaces de disolverse en disolventes orgánicos hidrófobos, donde permanecen activas y con estructuras secundarias y terciarias casi idénticas a las del medio acuoso.[8] Estas enzimas solubilizadas se han utilizado para generar plásticos biocatalíticos, donde las enzimas se incorporan a polímeros vinílicos en crecimiento para obtener al final enzimas inmovilizadas homogéneas.

1.3.3. ENZIMAS EN SUSTANCIAS TOXICAS

Actualmente también se han estado investigando reacciones biocatalíticas que contengan sustratos y productos apolares, como compuestos alifáticos, aromáticos y heterocíclicos. Estos compuestos son generalmente insolubles en agua y, a menudo, muy tóxicos para las células,[8] Por lo tanto, no pueden simplemente añadirse a un medio acuoso para que reaccionen.

Un enfoque prometedor es utilizar medios de dos fases líquidas (emulsión): una fase acuosa que contiene las células en crecimiento, otra fase del disolvente apolar que contiene el sustrato y el producto recién formado. Esta biocatálisis en emulsiones que se ha estudiado en los laboratorios de investigación y se espera que sea igualmente aplicable en escalas más grandes.[8]

Otro enfoque para reacciones multifásicas es la biocatálisis en fase gaseosa. Las enzimas o las células forman una fase sólida y los reactivos se disuelven en la fase gaseosa en este caso. Este concepto es bueno en casos de que el reactivo se puede disolver en fase gaseosa en condiciones de reacción y tiene la ventaja de que el procesamiento posterior es simple y la transferencia de masa es eficiente, y se puede evitar el uso de solventes tóxicos o inhibidores.[8]

Un tercer enfoque para el manejo de compuestos tóxicos es alimentarlos en el biorreactor a velocidades limitadas,[8] de modo que dichos sustratos se transformen sin acumularse primero, manteniendo así concentraciones de sustrato muy bajas y a niveles no tóxicas. Los productos se pueden eliminar de forma continuo mediante técnicas de extracción continua.

1.3.4. EXTRACCION Y PURIFICACION DE PRODUCTOS

Hoy en día la mayoría de las reacciones biocatalíticas todavía se realizan en medios acuosos y con bajas concentraciones de producto, esto requiere el desarrollo de métodos especiales para la extracción de productos. La recuperación del producto del medio de reacción es generalmente después de la etapa de biotransformación y la separación de la biomasa de la mezcla de reacción por centrifugación o filtración.[8]

Existe numerosas técnicas de separación, incluso técnicas tan simples como la precipitación de productos de reacción insolubles se han utilizado en la separación de productos. También existe procesos de recuperación de productos in situ, en los que el producto se separa de la mezcla de reacción durante la biotransformación.[8] Estas técnicas de recuperación de productos in situ se basan en parámetros fisicoquímicos de los reactivos y van desde la cristalización hasta la destilación y un posterior extracción en fase sólida o en fase líquida. En general, la recuperación in situ del producto evita las limitaciones tradicionales de los procesos biocatalíticos, como la inhibición de sustrato o producto y la descomposición del producto en mezclas de reacción acuosas.

1.3.5. PROCESAMIENTO DE RESIDUOS

Los principales productos de desecho de biocatálisis en medio acuoso son aguas residuales, sales y biomasa. Los disolventes orgánicos representan productos de desecho menores si se

utilizan en procesos de emulsión o reacciones en disolventes orgánicos puros que se pueden reciclar después, salvo la obtención una fracción menor de emulsión insoluble. Los principales productos de desecho se tratan en sistemas convencionales de tratamiento de aguas residuales industriales. Para procesos basados en microorganismos recombinantes y viables, el tratamiento de la biomasa incluye la inactivación de las células modificadas genéticamente.[8]

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son describir:

- 1) La biocatalisis, sus características y uso
- 2) Característica, uso y propiedades de los derivados de silibina
- 3) La rutas biocatalíticas de la síntesis de silibina

3. METODOLOGÍA

Para realizar este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica utilizando como fuente de información Web of Science, Pubmed, Scopus, Scifinder y la biblioteca online de Facultad de Farmacia usando el acceso institucional de UCM junto con las distintas revistas científicas encontradas utilizando Google Scholar. La búsqueda de información de se ha basado en las palabras claves: **biocatalysis, synthesis, silybin derivative.**

4. RESULTADO Y DISCUSIÓN

4.1. SILIBINA Y DERIVADOS

La silibina o silibinina es un suplemento dietético aislado de las semillas de *Silybum marianum* conocido como cardo mariano.

La silibina se encuentra en el extracto de cardo mariano (silimarina) que tiene una larga historia en la medicina tradicional y ahora se emplea con frecuencia para la prevención y/o tratamiento de trastornos hepáticos,[5] incluyendo hepatitis viral, cirrosis hepática asociada con abuso de alcohol, daño hepático por sustancias tóxicas, también es considerado como un antídoto eficaz contra el envenenamiento por *Amanita phalloides*. Además, la silibina también es un fuerte antioxidante en la eliminación de los radicales hidroxilos y la inhibición de la peroxidación lipídica.

En estudios recientes, la silibina también ha mostrado ser un anticontaminante en los cultivo de células preclínicas y quimiopreventiva en modelos animales de varios cánceres epiteliales, como piel, vejiga, colon, próstata, pulmón. etc. Sobre estos resultados, la silibina también se ha hecho ensayos clínicos de fase I y II en pacientes humanos con cáncer, donde se muestra bien tolerada y con biodisponibilidad en plasma y tejido diana.[5]

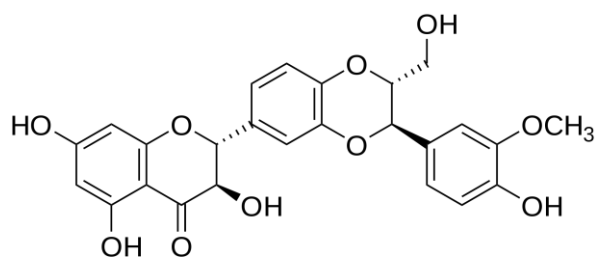


Figura 1. Silibina A

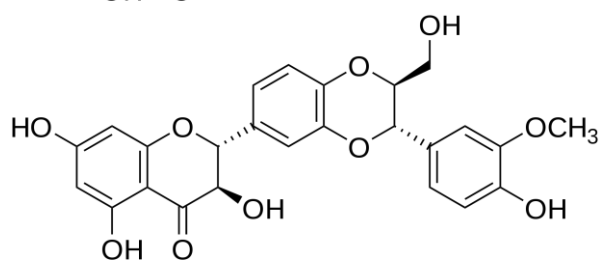


Figura 2. Silibina B

En los últimos años, se ha estado estudiando sobre la estructura química detallada de la silibina para identificar y sintetizar sus estereoisómeros, así como para evaluar su eficacia biológica, y se ha confirmado que silibina en realidad es una mezcla 1:1 de dos isómeros ópticos, **silibina A** y **silibina B**. [5] Además ha sido posible identificar detalladamente los restos hidroxilos de la estructura química de silibina, esta información permite realizar diseño y síntesis de nuevos derivados de silibina evitando afectar a su actividad.

Con respecto a la farmacocinética, la silibina es un compuesto de baja biodisponibilidad si se administra por vía oral, y con una baja solubilidad en agua. Esto se debe a que casi no se absorbe en el intestino y al mismo tiempo sufre un elevado efecto del primer paso por el hígado después de su absorción. Sin embargo, esto se soluciona gracias a la formación de complejos con fosfatidilcolina que permite una mejor absorción y nuevos gluco-conjugados de silibina (gluco, mano, galacto y lacto-conjugados), que tienen una alta solubilidad en agua y un fuerte poder antioxidante. Esta absorción elevada permite al mismo tiempo evaluar la seguridad de la silibina en su uso terapéutico.[5]

4.1.1. EFECTO ANTICANCERIGENO

El cáncer hoy en día es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Con los nuevos avances tecnológicos, muchos cánceres se diagnostican en etapas tempranas donde los tratamientos son muy limitados con muchos efectos secundarios. En estos pacientes, la quimioprevención y/o la intervención del cáncer a través de agentes no tóxicos como la silibina podría ser una alternativa atractiva.[1] Además, en la quimioterapia contra el cáncer a menudo existe una toxicidad aguda, especialmente la hepatotoxicidad, que conlleva a una reducción de dosis y retraso en la terapia, lo que aumenta el riesgo de recaídas.

La silibina presenta efectos hepatoprotectores por lo que permite su uso junto con agentes quimioterapéuticos. Además la silibina también puede aumentar la eficacia de los fármacos quimioterapéuticos para el cáncer, por ejemplo se han demostrado que la silibina produce una sinergia intensa con la inhibición del crecimiento inducida por doxorubicina, cisplatino, carboplatino y mitoxantrona y la muerte apoptótica en las células del carcinoma de próstata humano, esto también se ha visto en otros tipos de cáncer.[1,5]

La silibina también se puede emplear como un agente quimio protector y anticancerígeno principalmente debido a su actividad frente a los radicales que genera un efecto citoprotector, antioxidante. Esto es cierto, sin embargo no es el único acción que realiza ya que inhiben también la acción carcinógena de muchos productos químicos, por ejemplo: disminuye significativamente la incidencia de neoplasias de vejiga urinaria y lesiones preneoplásica en la fase de inicio y postiniciación debido a N-butil-N-(4-hidroxbutil)nitrosamina; reducir la carcinogénesis de colon inducida por azoximetano en ratas y carcinogénesis cutánea inducida por el peróxido de benzoilo o el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato[1].

Además la silibina actúa a nivel de los receptores relacionado con la carcinogénesis y la evolución del cáncer.[5] Se ha visto que es capaz de modular varios reguladores mitogénicos, de señalización y del ciclo celular. Ejemplo en el carcinoma de próstata humano, la silibina inhibe las vías de señalización mitógenas y altera los reguladores del ciclo celular, lo que lleva a la inhibición del crecimiento y la muerte de las células del carcinoma de próstata independiente de andrógenos.

4.1.2. MODULACIÓN DE FUNCIONES ENDOCRINAS

La silibina es un compuesto que puede ser eficaz para la prevención y el tratamiento del daño hepático o el cáncer de piel. Sin embargo, existe algunos posibles efectos secundarios, como la modulación de las funciones endocrinas a través de la interacción con el receptor de estrógeno (ER).[7]

En estudios recientes se ha estudiado los posibles efectos de la silibina y derivados sobre la función endocrina. Se encontró que varios compuestos comportan como agonistas parciales o completos de ER, esto provoca la activación parcial de ER, siendo la silibina B la responsable de la mayor parte de la actividad mientras que la silibina A y otros flavonolignanos son inactivos en este aspecto.[7]

La actividad estrogénica de los sibilinas semisintéticos permite llegar a algunas conclusiones generales con respecto a las relaciones estructura-actividad. Los compuestos en los que se ha introducido grupos carboxi o acetilo en la posición 23, no ejerce actividad estrogénica, mientras que la presencia de pivaloilo en lugar del grupo 23-O-acetilo conduce a una activación significativa del RE. Esto sugiere que es posible desarrollar derivados de silibina sintéticos sin actividad estrogénica u otros derivados que se quiera potenciar esta actividad.[7]

4.1.3. EFECTO HEPATOPROTECTOR

La silibina es utilizado tradicionalmente en el tratamiento de distintos trastornos hepáticos, especialmente en enfermedades hepáticas crónicas, cirrosis y carcinoma hepatocelular[3].

De hecho, la silibina tiene tres actividades importantes: antiinflamatoria, antioxidante y proapoptótica, que representan una "tríada funcional" [3] que permite contrarrestar desde el principio en los mecanismos de daño que son los responsables de la progresión de la hepatitis a la cirrosis y al CHC. En las etapas finales de las patologías hepáticas, la silibina puede actuar limitando la fibrosis hepática y antagonizando los mecanismos carcinogénicos que causan el carcinoma hepática. Sin embargo, el tratamiento con silibina en la práctica clínica es muy limitado, ya que es necesario obtener más datos científicos derivados de ensayos bien estructurados basados en grandes poblaciones de pacientes y también necesita una estandarización de los métodos utilizados para evaluar la eficacia terapéutica.[3,5]

4.1.4. EFECTO NEUROPROTECTOR

La silibina puede ser útiles en el tratamiento y prevención de algunos procesos neurodegenerativos y neurotóxicos, en parte debido a su actividad antioxidante, pero al parecer presenta otros mecanismos actualmente desconocidos que le da esta actividad neuro protectora.[5]

Se ha demostrado que la silimarina proteger eficazmente las neuronas dopaminérgicas contra la neurotoxicidad inducida por los lipopolisacáridos (LPS) al inhibir la activación de la microglía que son células cerebrales de tipo macrófago que actúa en la defensa y la reparación del tejido del SNC[5]. Existe evidencias de que una microglía activada contribuye a los cambios neuropatológicos en varias enfermedades del SNC (esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, demencia por SIDA). La silibina también inhibe la producción de agentes inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y el óxido nítrico y, por lo tanto, reduce el daño a las neuronas dopaminérgicas.[5]

4.1.5. MODULACION DE TRANSPORTADORES DE FARMACOS

La resistencia a múltiples fármacos (MDR) es un problema importante en la actualidad especialmente en los tratamientos del cáncer e infecciones bacterianas, se caracteriza por una resistencia a una serie de compuestos no relacionados estructuralmente. A menudo aparece después de una exposición prolongada de las células a un solo fármaco.

Un importante mecanismo de resistencia es la salida del fármaco de la célula diana por bombas de eflujo, el más representativo es la glicoproteína P (Pgp).

Pgp es una glicoproteína fosforilada responsable de la distribución sistémica de numerosos fármacos lipófilos y anfipáticos, carcinógenos, toxinas y otros xenobióticos no relacionados estructural y farmacológicamente en muchos órganos, como el intestino, el hígado, el riñón y el cerebro.[5]

Se descubre actualmente que la silibina es un inhibidor de la Pgp, se ha visto que la silibina es capaz de aumentar la concentración de daunomicina en células Pgp positivas, pero no en células Pgp negativas, de una manera dependiente de la concentración de fármaco y de la expresión de Pgp, además de potenciar la citotoxicidad de doxorubicina en células Pgp positivas[5]. Estos hallazgos indican que la silibina y sus derivados pueden inhibir el flujo celular mediado por Pgp, lo que aumenta la posibilidad de interacciones farmacológicas con los sustratos de Pgp.

La silibina también interactúa con otros transportadores de fármacos, por ejemplo, con la proteína 1 asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP1).[5]

La silimarina y otros flavonoides se ha visto que también puede tener efectos en los transportadores, se ha probado en la línea celular de adenocarcinoma pancreático humano (Panc-1) en el transporte de daunomicina y vinblastina y se ha encontrado que la silimarina aumenta significativamente la acumulación de ambos fármacos en las células, lo que indica la inhibición de MRP1 y parece ser que la regeneración de GSH está involucrada en este proceso.[5]

4.2. BIOCATALISIS DE SILIBINA Y DERIVADOS

4.2.1. NECESIDAD DE BIOCATALISIS DE SILIBINA

El uso de la silibina como un principio activo tiene el problema de que es un compuesto con una baja solubilidad tanto en disolventes hidrófilos como lipófilos, lo que disminuye significativamente su biodisponibilidad y absorción después de la administración oral[6].

Teniendo en cuenta el potencial terapéutico que tiene la silibina, no es de extrañar que se ha intentado utilizar numerosas técnicas con el objetivo de mejorar su disolución y la biodisponibilidad. Dichas técnicas se basan en la preparación del complejo de silibina-fosfatidilcolina, la incorporación en sistemas de administración de fármacos por auto-microemulsificación por dispersión sólida y la modificación de la molécula de silibina.

La síntesis de silibina y derivados se puede lograr a través de reacciones químicas; sin embargo, la reacción biocatalítica es preferido, ya que requiere condiciones de reacción más suaves, permitiendo un aislamiento más fácil del producto y reduce o elimina el uso y la generación de sustancias peligrosas.

4.2.2. BIOCATÁLISIS DE SILIBINA

La biocatálisis de silibina se trata principalmente de una oxidación de un alcohol precursor que es el alcohol coniferílico por la peroxidasa de ascorbato de cardo mariano (APX1) y un posterior acoplamiento con taxifolina[6]. Sin embargo debido al elevado coste y limitaciones de suministro del alcohol coniferílico, la producción es muy baja. Pero el eugenol se podía usar como un sustrato sustituto más barato para la producción de silibina.

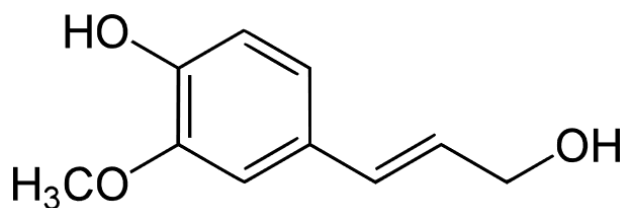


Figura 3. Alcohol coniferílico

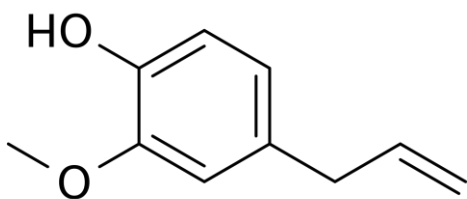


Figura 4. Eugenol

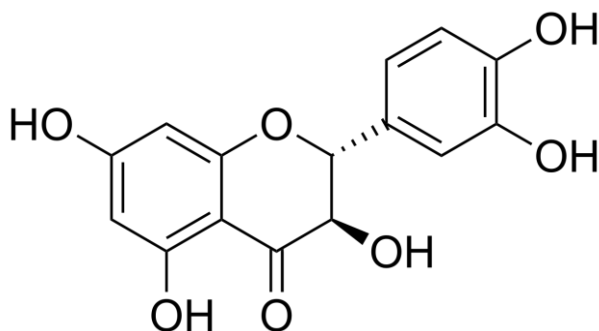
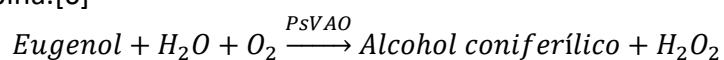
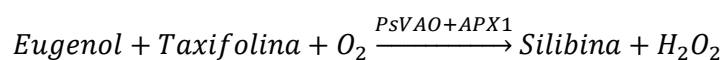
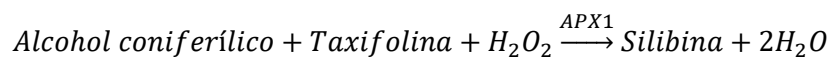


Figura 5. Taxifolina

Proceso de síntesis

En el síntesis, el primer paso es la transformación del eugenol al alcohol coniferílico. Este paso se realiza a través del empleo de la enzima vanillil alcohol oxidasa (PsVAO) de *Penicillium simplicissimum*. En este proceso hay una producción de H₂O₂ que inhibe a la propia enzima PsVAO, pero en el siguiente paso del proceso de síntesis de silibina donde se utiliza la peroxidasa (APX1) para una oxidación se va a emplear H₂O₂ como una aceptor de electrón para que se forma el radical de alcohol coniferílico que posteriormente se acopla con taxifolina para formar la silibina.[6]





Por lo tanto el empleo de dichas enzimas juntas se forma una cascada enzimática ideal donde no se produce subproductos tóxicos que inhibe o reduce la actividad enzimática.

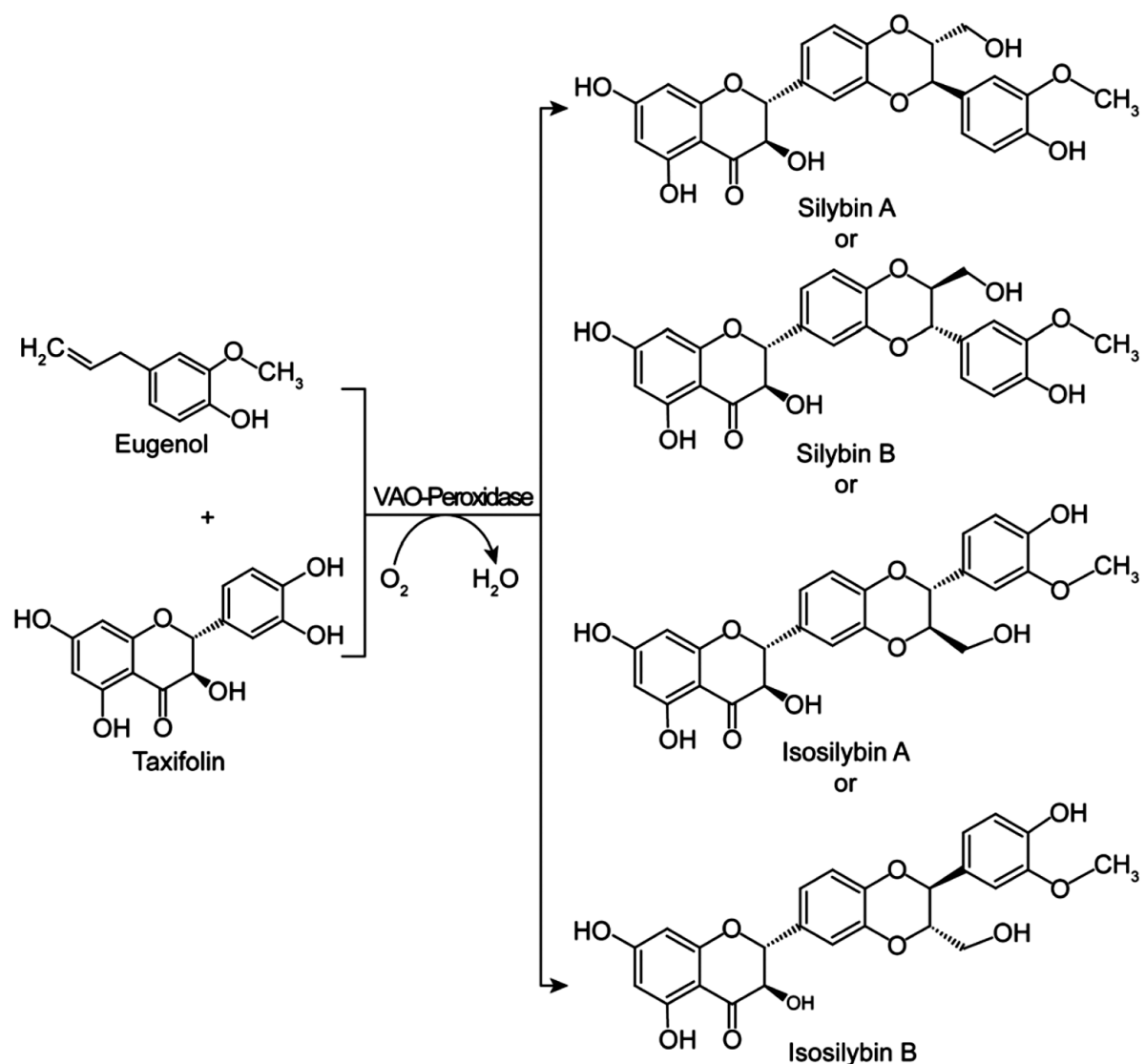


Figura 6. Demostración de la transformación de eugenol y taxifolina en silibina e isosilibina

Características importantes de la síntesis de silibina

- El uso específico de la enzima APX1, ya que es la misma enzima que utiliza la propia planta para sintetizar la mezcla de silibinas.[6]
- H₂O₂ actual como aceptor de electrones en la biocatálisis de la silibina catalizada por la peroxidasa. Una cantidad insuficiente de H₂O₂ disminuye la tasa de producción, mientras que el exceso de H₂O₂ tiene un efecto perjudicial sobre la actividad enzimática y la viabilidad celular. Como resultado, la cantidad H₂O₂ debe ser controlada con precisión durante toda la reacción. Pero esto se ha solucionado gracias al empleo de la cascada enzimática en la que la cantidad de H₂O₂ consumido es exactamente el mismo que el producido.[6]

- El pH y la temperatura óptimos en la síntesis es 7.0 y 37°C.[6]
- En la cascada se utiliza O₂ como el aceptor de electrones por PsVAO para la reacción de formación de alcohol coniferílico, por lo tanto el oxígeno disuelto es un factor importante. Esto se controla con la velocidad de rotación y se ha visto que se alcanza un máximo a 250 rpm.[6]
- En cuando la relación molar de eugenol:taxifolina se ha demostrado que a 5: 1 el rendimiento es 2.65 veces mayor que la obtenida cuando la relación eugenol:taxifolina es de 1:1,[6] y hay que tener en cuenta que un alto nivel de eugenol es inhibidor para PsVAO.

4.2.2. BIOCATALISIS DE DERIVADOS ACILADOS DE SILIBINA

La biocatálisis de derivados acilados de silibina se hace en disolventes orgánicos o en líquidos iónicos a base de imidazolio y que contiene los aniones BF⁻⁴ o PF⁻⁶[9], utilizando la lipasa B de *Candida antarctica* como biocatalizador y como donantes de grupos acilo son los ácidos monocarboxílicos y sus ésteres. En todo el proceso se ha estudiado los diferentes parámetros de reacción que puede afectar a la síntesis de silibina, como el tipo de disolvente orgánico y el donador de acilo utilizado.[10]

Los ésteres sintetizados mantienen la función biológica de la silibina y en algunos casos son más efectivos, lo que indica que esta biocatálisis puede generar nuevos compuestos con actividades antitumorales y antiangiogénicas mejoradas.[9,10]

En este proceso de síntesis la lipasa que se utiliza es la lipasa B de *C. antartica* inmovilizada, la silibina es en una mezcla aproximadamente 1: 1 de los diastereoisómeros A y B, los ácidos dicarboxílicos (hexanodioico, dodecanodioico y hexadecanodioico) y ácido protocatéquico que se utiliza debe ser de la más alta pureza, igual que los disolventes utilizados.[10]

Proceso de síntesis

Esta biocatálisis se trata de una reacción de acilación típica, primero se disuelve la silibina mezclada sin separación de A y B (30–90mM) en 10 ml de disolvente orgánico (acetona, acetonitrilo, 2-metil-2-butanol o 2-metil-2-propanol) previamente deshidratado con tamices moleculares 3Å (30g/L durante al menos cinco días). La relación molar del agente de acilación con silibina puede variar de 1 a 15.[10]

Las reacciones de esterificación se inician inmediatamente tras la adición del preparado de la lipasa (5mg/mL) a la mezcla anterior. Y se utiliza tamices moleculares activados de 3Å (30mg/mL) para eliminar el agua generada de la reacción de esterificación. Las mezclas de reacción se colocan en matraces de fondo redondo sellados, y se agita en un agitador orbital (250rpm, 50°C). [10]

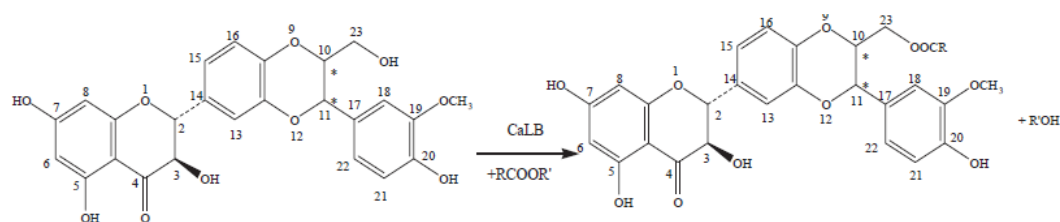


Figura 7. Síntesis de derivados de silibina con Lipasa B de *Candida antartica* (CaLB)

Análisis de muestras

Para la recogida de muestras para análisis, se extrae en diferentes tiempos de incubación, luego se disuelve en 980ml de metanol y se filtra, posteriormente este filtrado se puede analizar por TLC y HPLC.

Para el análisis de las muestras de reacción, en el caso de TLC se realiza en Silica gel 60 F254 utilizando cloroformo -tolueno -acetona- ácido acético (12:1:2:1, v/v/v/v) como sistema de revelado. Posteriormente se visualiza pulverizando sobre la placa solución de etanol y ácido sulfúrico (10%, v/v) y se calienta a 100°C durante 10min.[10]

Si el análisis se realiza a través del sistema de HPLC, los ésteres de silibina y silibina se detecta a 275 nm con detector de UV a temperatura ambiente y la elución se realiza con dos sistemas, el sistema A de acetonitrilo- ácido acético- agua (10: 2: 88, v/v/v) y el sistema B de acetonitrilo- ácido acético-agua (90:2:8, v/v/v),[10] con esto también se puede purificar al mismo tiempo los esteres formados utilizando un sistema de gradientes.[10]

Tabla 1. Conversión total de silibina (%) y la fracción de éster presente en forma de monoéster para la acilación de silibina.

Disolvente	Conversión total de silibina (%) – Monoésteres empleados (%)		
	C6	C12	C16
Acetona	34,2 – 31,3	26,7 – 23,3	50,1 – 45,5
Acetonitrilo	36,9 – 30,9	29,9 – 22,1	25,8 – 17,4
2-Metil-2-butanol	23,9 – 22,4	23,4 – 19,9	31,2 – 24,9
2-Metil-2-propanol	14,2 – 12,9	12,0 – 10,5	13,8 – 12,2

El empleo de la lipasa B de *Candida antartica* en esta biocatálisis es por su regioselectividad hacia los grupos hidroxilos primarios, ya que la molécula de silibina presenta cinco grupos hidroxilo de tres tipos diferentes, tres son fenólicos, uno es alifático primario y el otro es alifático secundario[9]. Y lo que se quiere realizar es únicamente la esterificación del grupo hidroxilo primario en la posición C23, que es el único grupo hidroxilo primario de este flavonolignano.

Aunque hay una gran cantidad de estudios que demuestran que la lipasa B de *C. antartica* muestra selectividad hacia los grupos hidroxilo primarios, pero también hacia los secundarios. Sin embargo la lipasa B acila el alcohol primario con menos impedimento estérico, y el alcohol secundario se acila solo cuando no hay alcohol primario disponible.

Como se observa en la tabla el uso de acetona y acetonitrilo condujo a una mayor conversión total de silibina, mientras que con el 2-metil-2-propanol, la conversión total de silibina fue menor en todos los casos. Este alto rendimiento de reacción observado en los disolventes orgánicos mencionados anteriormente está probablemente relacionado con la solubilidad relativamente alta de la silibina en estos medios.[9,10]

Cuando se utiliza acetona como medio de reacción se observa que el producto más elevado de la silibina es cuando se usa ácido hexadecanodioico (50,1%) como donador de acilo y en el caso de acetonitrilo es cuando se utiliza ácido hexanodioico (36,9%) como donador de acilo, esto se podría deberse a que la lipasa B de *C. antartica* adopta una configuración muy diferente en presencia de acetonitrilo en comparación con la acetona, por lo cual actúa de forma diferente a los distintos sustratos[10]. Igual ocurre con el uso de 2-metil-2-butanol que dio lugar a un aumento del rendimiento de reacción de 23.9% a 31.2% cuando el número de carbonos aumenta de 6 a 16, mientras que no hubo efecto de la longitud de la cadena del donante de acilo en el caso de 2-metil-2-propanol.[9,10]

Otro factor importante que afecta el rendimiento de las reacciones enzimáticas es la concentración de los sustratos. Se observa que una relación de concentración 10:1 de donador de acilo con silibina incrementa el rendimiento de reacción comparado con una relación de 1:1. Este incremento se debe a un cambio termodinámico del equilibrio a favor de la síntesis del derivado de silibina debido al exceso de donante de acilo igual que los casos de acilación enzimática de azúcares y glucósidos en medios orgánicos convencionales.[9,10]

4.2.3. BIOCATALISIS DE DIMEROS DE SILIBINA

Las moléculas dímeros o polímeros de un compuesto a menudo presentan una actividad biológica mejorada comparado con los monómeros. Además los parámetros farmacocinéticos también se ven afectados. A veces incluso se genera un compuesto con una actividad completamente nueva por dimerización.[11]

Proceso de síntesis

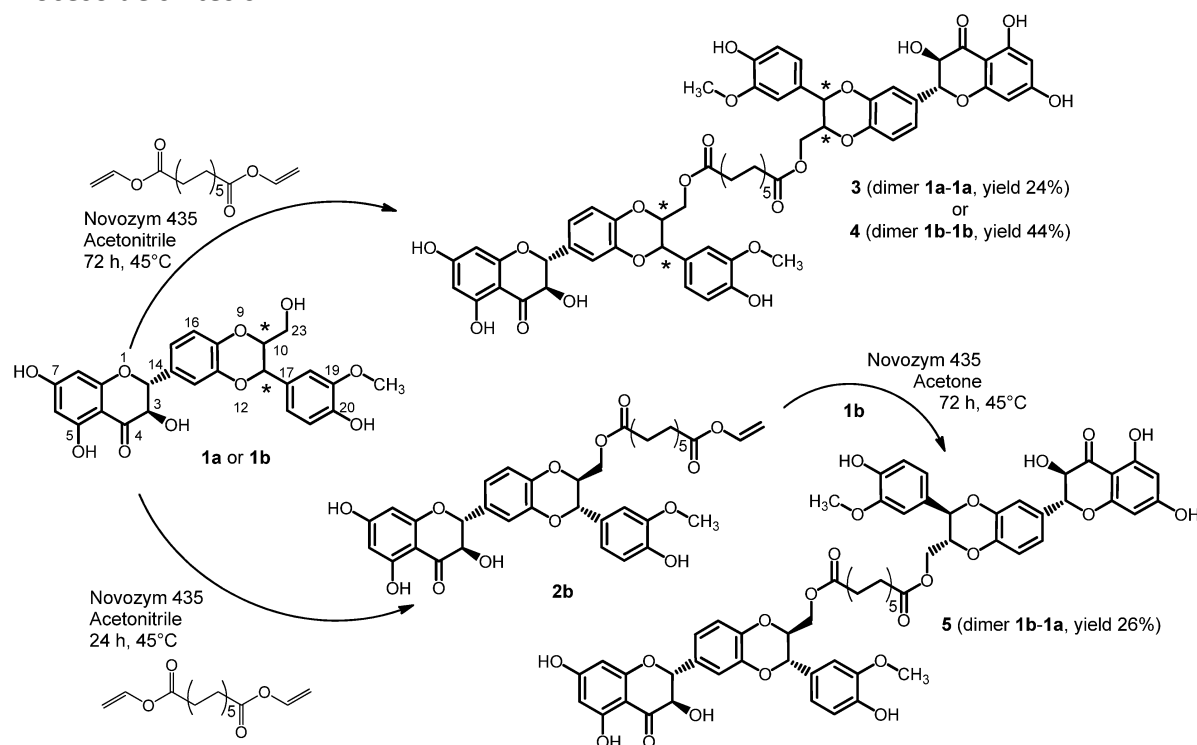


Figura 8. Síntesis catalizada por lipasa de dímeros de silibina

Esta biocatálisis también utiliza a la lipasa B de *C. antartica* como biocatalizador aprovechando su selectividad específica ya que es muy eficaz para la acilación selectiva de grupos hidroxilo primarios en medios no acuosos como visto anteriormente y al mismo tiempo su manejo es muy sencillo.

En el caso de síntesis de dímeros se utiliza los ésteres divinílicos de los ácidos dicarboxílicos como donantes debido a que la reacción catalizada por la lipasa es más rápida y el equilibrio de la reacción está más desplazado en favor de la transesterificación que en las reacciones con ácidos libres, además de que lo que se quiere es la dimerización de la silibina. En este caso la lipasa B de *Candida antartica* se encuentra inmovilizada en una resina acrílica. Las reacciones se realizan en acetonitrilo seco, en el que la silibina es completamente soluble, aunque al principio la silibina no se solubiliza completamente, pero a la medida de que se va avanzando la reacción se va disolviendo poco a poco.[11]

- La síntesis de los derivados C-23 de los dímeros simétricos de silibina **3** y **4** implica una acilación catalizada por lipasa del grupo hidroxilo primario de la silibina. La relación de los coeficientes estequiométricos de los reactivos silibina y diviniléster de ácido dodecanodioico es de 2.7: 1. El ácido dodecanodioico primero se convierte en su éster divinílico en presencia de acetato de vinilo y una cantidad catalítica de acetato de mercurio (II) antes de la esterificación y dimerización de la silibina.

Proceso de realización: lo primero es disolver la silibina (**1a** o **1b**) y el divinildodecanodioato (0,230 mmol, 1eq) en acetonitrilo anhidro (9ml). Posteriormente se añade la lipasa B (150mg) y tamices moleculares de 4Å (50mg). La mezcla de reacción se incuba a 45°C, 500 rpm. Después de 72 h, la reacción se detiene y se filtra la enzima, y se deja evaporar el disolvente a presión reducida. El producto crudo se purifica finalmente por filtración en gel.[11]

- La síntesis del dímero asimétrico **5** está compuesta por dos etapas. En primer lugar, la síntesis del donante de acilo activado (12-vinildodecanodioato-23-O-silibina B, **2b**) que se realiza a través de la esterificación mediada por lipasa del C-23 de **1b**. Después de tener el compuesto **2b** preparado ya se puede realizar la dimerización del compuesto.

Proceso de realización:

Paso 1. La silibina B (**1b**, 1 mmol, 1eq.) y el éster divinílico del ácido dodecanodioico (2,624 mmol, 2.6eq.) se disuelven en acetonitrilo anhidro (15ml). La lipasa B (200mg) y tamices moleculares de 4Å (200mg) se añade a la solución. La mezcla de reacción se incuba a 45°C, 500 rpm. Después de 24 h, la reacción se termina filtrando la enzima y el disolvente se evapora a presión reducida y el producto bruto **2b** se purifica por cromatografía en gel de sílice.[11]

Paso 2. Para que ocurra esta dimerización es necesario el empleo de éster divinílico de ácido dodecanodioico (C12) en el anterior reacción ya que otros ésteres divinílicos con el de ácido succínico (C4), glutárico (C5) y ácido adípico (C6) no se forman dímeros de silibina porque la cadena alifática corta no permitió el enlace de dos unidades de silibina, a pesar de que se formaron ésteres monovinílicos o ésteres hidrolizados de silibina.[11]

Se disolver la silibina (1a o 1b) y producto **2b** obtenido en acetonitrilo anhidro (9ml). Posteriormente se añade la lipasa B (150mg) y tamices moleculares de 4Å (50mg). La mezcla de reacción se incuba a 45°C, 500 rpm. Después de 72 h, la reacción se detiene y se filtra la enzima, y se deja evaporar el disolvente a presión reducida. El producto crudo se purifica finalmente por filtración en gel.[11]

5. CONCLUSIONES

La silibina y sus derivados están utilizándose actualmente como medicamentos y productos dietéticos. Debido a esta demanda su obtención a través del propio cultivos de cardo mariano es poco eficiente por lo que se ha recurrido a la síntesis de silibina.

En este trabajo se ha hecho una revisión bibliográfica de la biocatálisis y efectos de silibina y sus derivados y se ha visto que el motivo del empleo de biocatálisis es principalmente su alto rendimiento y menor coste comparado con el empleo de sustancias más caras en la síntesis químicas, además de que hay una necesidad de un método de obtención eficaz de silibina y sus derivados. Esta necesidad se debe principalmente a que la silibina tiene diverso efectos en el que destaca su efecto hepatoprotector, quimioprotector, anticancerígeno, modulador hormonal y de transporte de fármacos entre muchos otros propiedades.

En la síntesis de silibina y derivados se ha visto que principalmente es en su propio síntesis, sus derivados acilados y dímeros en el que se realiza principalmente en disolventes orgánicos donde la silibina es más soluble y que su rendimiento es mucho mayor comparado con la síntesis química.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agarwal C, Wadhwa R, Deep G, Biedermann D, Gazak R, Kren V et al. Anti-Cancer Efficacy of Silybin Derivatives - A Structure- Activity Relationship. PLoS ONE. 2013.
2. Biocatalysis for green chemistry and chemical process development. Hoboken, N.J.: Wiley; 2013.
3. Federico A, Dallio M, Loguercio C. Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. Molecules. 2017;(22).
4. Gamnara D. Redox biocatalysis: fundamentals and applications. 2012.
5. Křen V, Walterová D. SILYBIN AND SILYMARIN – NEW EFFECTS AND APPLICATIONS. Biomed Papers. 2005;(149(1):29-41.
6. Lv Y, Xu S, Lyu Y, Zhou S, Du G, Chen J et al. Engineering enzymatic cascades for the efficient biotransformation of eugenol and taxifolin to silybin and isosilybin. Green Chemistry. 2019.
7. Pliskova M, Vondracek J, Kren V, Gazak R, Sedmera P, Walterova D et al. Effects of silymarin flavonolignans and synthetic silybin derivatives on estrogen and aryl hydrocarbon receptor activation. Toxicology. 2005;(215):80-89.
8. Schmid A, Dordick J, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. NATUR. 2001;(409):258-268.
9. Theodosiou E, H. Katsoura M, Loutrari H, Purchartová K, Křen V, N. Kollis F et al. Enzymatic preparation of acylated derivatives of silybin in organic and ionic liquid media and evaluation of their antitumor proliferative activity. Biocatalysis and Biotransformation. 2009;(27(3):161-169.
10. Theodosiou E, Loutrari H, Stamatis H, Roussos C, N. Kollis F. Biocatalytic synthesis and antitumor activities of novel silybin acylated derivatives with dicarboxylic acids. New Biotechnology. 2011;(28(4):343-348.
11. Vavříková E, Vacek J, Valentová K, Marhol P, Ulrichová J, Kuzma M et al. Chemo-Enzymatic Synthesis of Silybin and 2,3-Dehydrosilybin Dimers. Molecules. 2014;(19):4115-4134.
12. Yeh W, Yang H, R McCarthy J. Enzyme technologies: metagenomics, evolution, biocatalysis, and biosynthesis. 2008.