



Síntesis del (S)-Naproxeno mediante Biotocatálisis

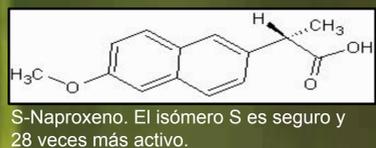
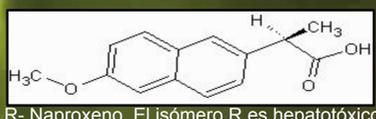
Hernández Serrano, Jorge Jesús.
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
Trabajo de Fin de Grado. Junio 2018.

1. Introducción:

El naproxeno es un medicamento correspondiente al grupo de los Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

La biocatálisis se define como el uso de enzimas en la síntesis química que se pueden encontrar en preparados aislados o en forma de célula completa.

Presenta dos isómeros



2. Objetivos.

Realizar una revisión bibliográfica de diferentes métodos de síntesis del isómero S del naproxeno mediante procesos biocatalíticos.

3. Metodología

Para la realización de la revisión bibliográfica se han revisado diversos artículos buscados en bases de datos.



4. Resultados y discusión

Hay diferentes estrategias para la síntesis selectiva del isómero S del naproxeno por medio de procesos 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.

Ventajas

- Elevada regioselectividad, enantioselectividad y quimioselectividad.
- Procesos económicos.
- Elevada reutilizabilidad.
- Reacción en condiciones suaves.
- Respetuoso con el medio ambiente.
- Las enzimas son biodegradables.
- La inmovilización de las enzimas aumenta su actividad.

Desventajas

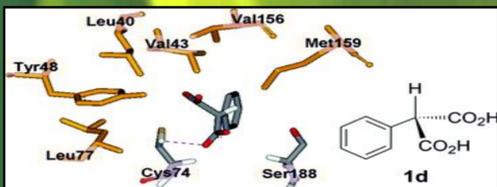
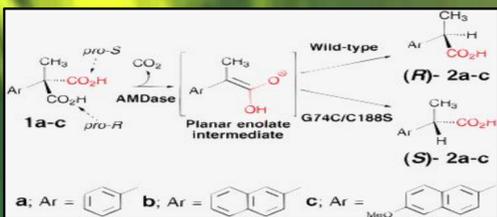
- Las enzimas son sensibles a las condiciones de pH y temperatura.
- Las enzimas presentan su mayor actividad en medios acuosos.
- Las enzimas pueden ser inhibidas, ya sea por sustrato o por producto final.

La mayoría de los medicamentos quirales se comercializan en forma de racematos, pero como podemos observar, en algunos casos solo uno de ellos se puede usar en terapéutica debido a que presentan diferentes actividades biológicas, farmacológicas, toxicológicas, etc. Debido a esto es importante, en algunos casos, separar los enantiómeros. Para ello se han desarrollado diferentes métodos, entre ellos la biocatálisis.

4.1 Evolución dirigida de la Arilmalonato descarboxilasa.

La evolución dirigida consiste en la evolución directa de las enzimas en el laboratorio. Estas nuevas enzimas comparten el mismo mecanismo de acción que las iniciales.

La reacción consiste en una descarboxilación enantioselectiva del sustrato y una protonación de la cara enantioselectiva de enolato plano.



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.

Se realizaron tres rondas de evolución dirigida por estructura:

- 1ª. Enfocada en la Ser 188.
- 2ª y 3ª. Enfocadas en Leu40, Val43, Tyr48, Leu77, Val156 and Met159 en el bolsillo hidrofóbico.

Variante	Actividad específica/ mg ⁻¹ con una concentración de sustrato de 20 mM				exceso enantiomérico (%)		
	1a	1b	1c	1d	2a	2b	2c
G74C/C188S	0.0015	0.055	0.023	0.040	98(S)	91(S)	91(S)
G74C/C188G	0.010	0.46	0.18	0.1	>99(S)	>99(S)	>99(S)
Y48F/G74C/C188G	0.014	0.26	0.13	0.82	>99(S)	>99(S)	>99(S)
G74C/M159L/C188G	1.3	9.8	5.1	6.2	>99(S)	>99(S)	>99(S)
G74C/Y48F/M159L/C188G	0.63	1.7	0.91	24	>99(S)	>99(S)	>99(S)
Enzima de tipo salvaje	13	120	66	550	>99(R)	>99(R)	>99(R)

Como se puede ver, las variantes mostraron una enorme mejora en su actividad y se mejoró su enantioselectividad hacia el isómero S. La variante que mostró la mayor actividad específica fue la G74C/M159L/C188G.

5. Conclusiones

En ambos procedimientos se obtiene de forma eficaz el isómero S del naproxeno debido a la elevada enantioselectividad y a la mayor actividad de la enzima con respecto a la enzima sin modificar que han demostrado ambos procedimientos. Son muy económicos gracias a la capacidad de reutilización que han demostrado tener, siendo además respetuoso con el medio ambiente pudiendo realizar las reacciones en condiciones suaves de temperatura y pH.

4.2 Inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa*.

Las lipasas son enzimas que catalizan una gran cantidad de reacciones químicas y son interesantes en biocatálisis por su elevada enantioselectividad.



Se inmovilizan las enzimas para que la hidrólisis sea enantioselectiva.

Se realiza por medio del método sol-gel que atrapa mecánicamente a la enzima estabilizando su estructura terciaria.

Para ello son necesarios

- Calixarenos: Bloques de construcción importantes en química supramolecular. Son fáciles de sintetizar y se pueden funcionalizar de forma selectiva los OH fenólicos y las posiciones para del anillo.
- Nanopartículas de magnetita: permiten que la enzima mantenga su alta actividad y tenga además facilidad de procesamiento.

Se han utilizado diferentes aditivos para la encapsulación y se han estudiado sus características

Aditivos usados	carga de proteínas (mg/g de sol-gel)	actividad catalítica	actividad específica	Conversión X (%)	eep	E
Calix- MN-SE-lipasa	37,8	227.7	6.0	50.0	>98%	460
Lipasa libre	28,6	95.1	3.3	37.9	>98%	166
Fe-Calix-N(COOH)	23.6	112	4.7	41.0	>98%	189
Fe-Calix-P	19.1	133	6.98	44.0	>98%	246
Lipasa encapsulada sin aditivos	28.5	95	3.3	20	>98%	137
Enc-C(8)-C4-COOH@Fe ₃ O ₄	22.0	35	1.6	49	>98%	371
Enc-NP-C[8]-C4-COOH	15.5	43	2.8	46	>98%	265
Calix[4]-COOH-MN	28.5	28	1.0	43	>98%	224
Calix[4]-COOH	21.9	112	9.6	50	>98%	525

En todos los casos nos encontramos que la inmovilización de la lipasa conduce a una mayor enantioselectividad y a una conversión superior con respecto a la enzima libre o encapsulada sin aditivos. Además cabe destacar que estas enzimas siguen manteniendo parte de su actividad tras varios ciclos de uso.

6. Bibliografía

- Aköz, E., O.Y. Akbulut, and M. Yılmaz, *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.
- Miyachi, Y., et al., *Dramatically improved catalytic activity of an artificial (S)-selective arilmalonate decarboxylase by structure-guided directed evolution*. Chem Commun (Camb), 2011. 47(26): p. 7503-5.
- Ozyilmaz, E., M. Bayraktar, and M. Yılmaz, *Improvement of catalytic activity of Candida rugosa lipase in the presence of calix[4]arene bearing iminodiacetic/phosphonic acid complexes modified iron oxide nanoparticles*. Bioorg Chem, 2016. 65: p. 1-8.
- Sayin, S., E. Aköz, and M. Yılmaz, *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.
- 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.
- Yilmaz, E., M. Sezgin, and M. Yilmaz, *Enantioselective hydrolysis of racemic 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.