



INTRODUCCIÓN

BIOCATÁLISIS

- Estructura complicada de nuevos P.A., preocupación ambiental
- Necesidad de síntesis innovadoras, económicas, "Química verde" → biocatálisis, el uso de enzimas en reacciones
- Importancia → cinética de enzimas, estabilidad de proteínas en condiciones de la reacción, función en la célula

DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN

- Razones**
- Adaptar a sustratos no naturales → ↑ rango de sustratos
 - ↑ Estabilidad en condiciones de reacción ≠ condiciones celulares
 - Incorporar en nuevas reacciones → nuevos productos

Optimizaciones

- Cambio del sustrato → sustrato no ideal → Ej. Presencia de grupo protector
- Purificación de solventes → conformación de la enzima
- Regular [c] sustrato y producto → saturación e inhibición enzimática
- Evolución dirigida → mejora de enzimas silvestres → ↑ reactividad, ↑ selectividad
- Ingeniería genética → enzimas a la carta

ENZIMAS

- Maquinas moleculares, catalizadores de reacciones bioquímicas
- Afectado por pH, Tº, solvente, [c] sustrato y productos
- Regioselectividad → única posición, estereoselectividad → único estereoisómero
- Uso en uno o mas pasos en la síntesis del P.A.
- Más frecuentes → lipasas, hidrolasas, redox, etc.

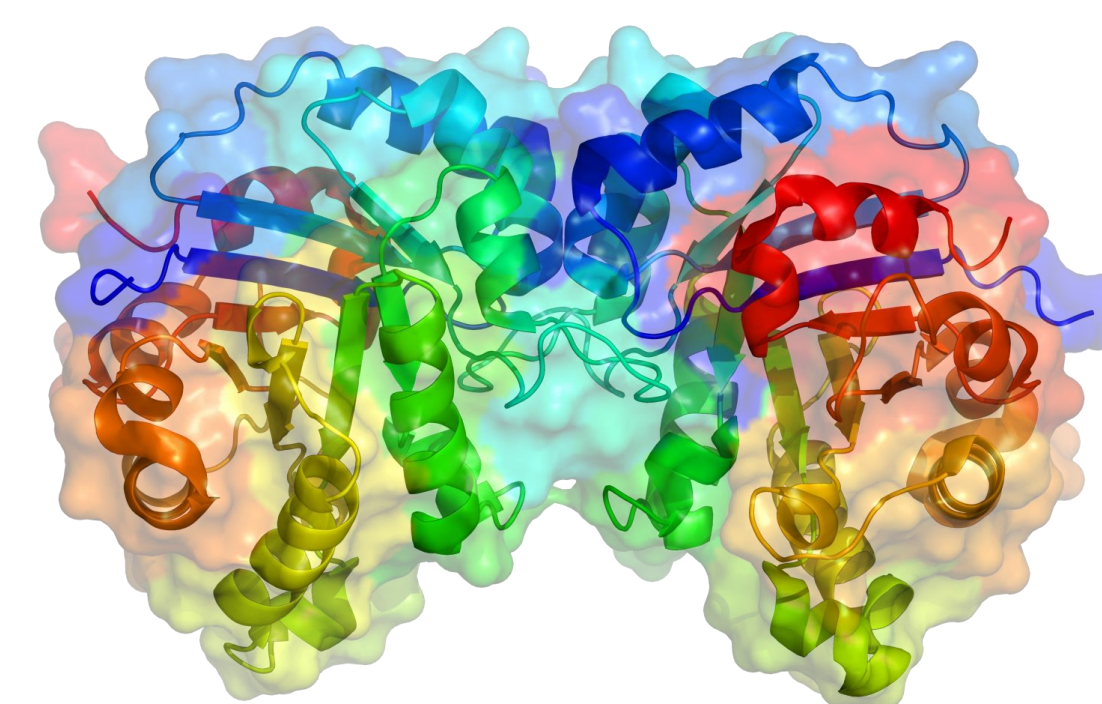


Figura 1. Enzima

DESARROLLO DEL BIOCATÁLISIS

Inicio

- Enzimas o producto de interés → descrita o no
- Necesidad de cofactor → mejor célula entera
- Condiciones de reacción → enzima

Enzimas en disolventes orgánicos

- ↑ solubilidad del sustrato
- Reversión de las reacciones hidrolíticas
- Nuevas actividades enzimáticas
- ↓ Actividad → solución con solventes orgánicos puros

Enzimas en sustancias tóxicas

- Sustancias tóxicas e insoluble en agua
 - Dos fases líquidas (emulsión) → acuosa célula, apolar con tóxicos
 - Multifásica → sólida y gas
 - Alimentación a velocidades limitadas
- Extracción y purificación de productos**
- Numerosas técnicas
 - Precipitación de productos de reacción insolubles
 - Recuperación de productos in situ → destilación, cristalización

Procesamiento de residuos

- Principalmente del medio acuoso → aguas residuales, sales y biomasa
- Tratamiento de aguas residuales convencional
- Tratamiento de la biomasa → inactivación

OBJETIVOS

Los **objetivos** principales de este trabajo son describir:

- 1) La biocatálisis, sus características y uso
- 2) Característica, uso y propiedades de silibina y derivados
- 3) La rutas de biocatálisis de silibina y derivados

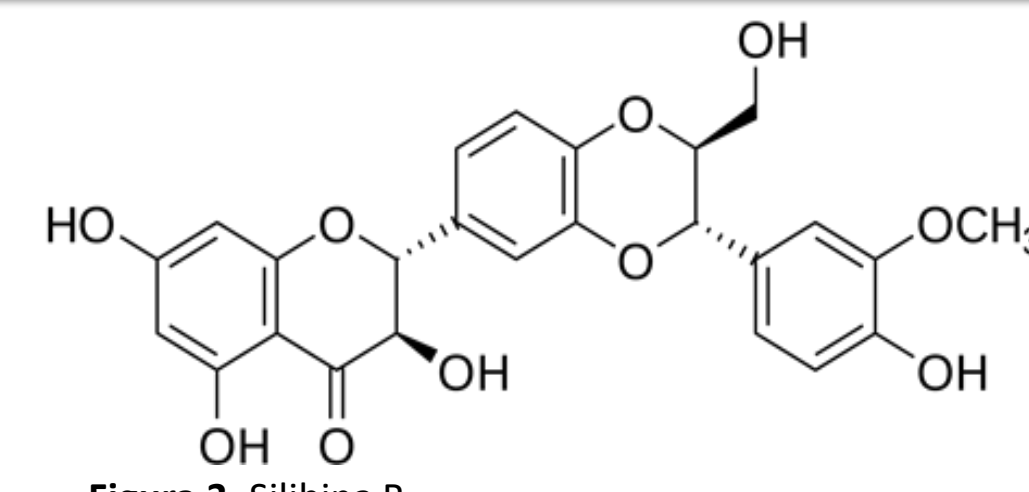
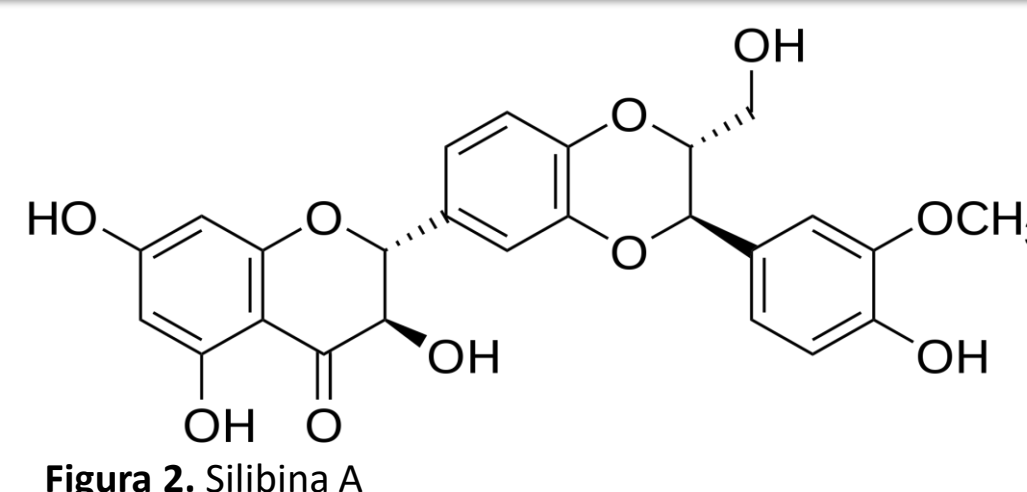
METODOLOGÍA

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, silybin derivative**.

RESULTADO Y DISCUSIÓN

SILIBINA

- Suplemento dietético
- Forma parte del extracto de semilla de *Silybum marianum*
- Dos isómeros ópticos, **silibina A** y **silibina B**
- ↓ Biodisponibilidad, ↓ solubilidad, ↑ efecto de primer paso ← Mejorar con derivados



EFFECTOS PRINCIPALES

Efecto anticancerígeno

- Actividad frente a los radicales
- Inhibición de productos químicos carcinogénicos → Nitrosamina
- Modulación de reguladores mitogénicos, de señalización y del ciclo celular

Efecto hepatoprotector

- Uso tradicional → trastornos hepáticos
- Antiinflamatoria, antioxidante y proapoptótica → **tríada funcional** → evitar progresión de daños hepáticos
- Uso clínico → necesidad de más ensayos y estudios

Efecto neuroprotector

- Antioxidante, otros mecanismos actualmente **desconocidos**
- Protege neuronas dopaminérgicas → neurotoxicidad de lipopolisacáridos (**LPS**)
- Inhibe la producción de factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) y el óxido nítrico → ↓ daño neuronal

Modulación de funciones endocrinas

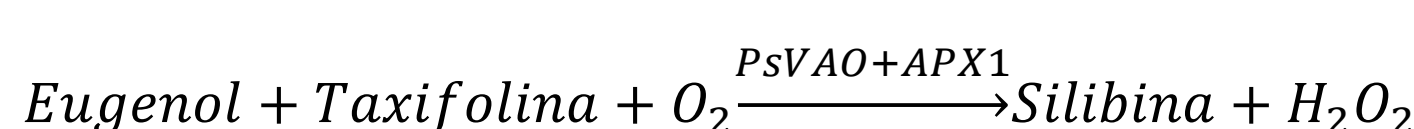
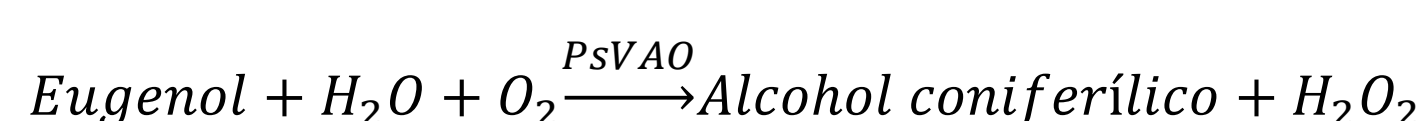
- Interacción con el receptor de estrógeno (ER) → la silibina B, responsable
- Grupo **carboxilo** o **acetilo** en la posición 23 → ↓ actividad
- Grupo **pivaloilo** en posición 23 → ↑ actividad

Modulación de transportadores de fármacos

- Resistencia a múltiples fármacos (MDR) → cáncer y bacterias → exposición prolongada a un solo fármaco
- Inhibe el flujo celular mediado por **Glicoproteína P (Pgp)**
- Inhibe proteína 1 asociada a la resistencia a múltiples fármacos (**MRP1**)

BIOCATÁLISIS DE SILIBINA Y DERIVADOS

Biocatálisis de silibina



- **APX1** → peroxidasa de ascorbato de cardo mariano *Silybum marianum*
- **PsVAO** → vanillil alcohol oxidasa de *Penicillium simplicissimum*
- pH y la temperatura óptimos → 7.0 y 37°C
- O₂ disuelto → factor importante → velocidad de rotación → máximo a 250 rpm
- Relación eugenol : taxifolina 5 : 1 → ↑ rendimiento → ↑ ↑ eugenol inhibe PsVAO

Biocatálisis de derivados acilados de silibina

- Disolventes orgánicos o en líquidos iónicos
- Lipasa B inmovilizada de *Candida antarctica* → biocatalizador → regioselectividad a OH primarios
- Donador de acilo → los ácidos carboxílicos y sus ésteres
- Silibina → mezcla de A y B
- Ésteres sintetizados → algunos casos ↑ efectividad

1. Disolver la silibina y agente de acilación en disolvente
2. Reacciones de esterificación → inmediatamente tras la adición de la lipasa
3. Las mezclas de reacción → matraces de fondo redondo sellados → agitar en un agitador orbital (250rpm, 50°C)
4. Muestras → metanol y filtrar → analizar por TLC y HPLC.
5. TLC → Silica gel 60 F254
6. HPLC → detecta a 275 nm, UV, Tº ambiente → purificar al mismo tiempo

Figura 4. Síntesis de silibina e isosilibina

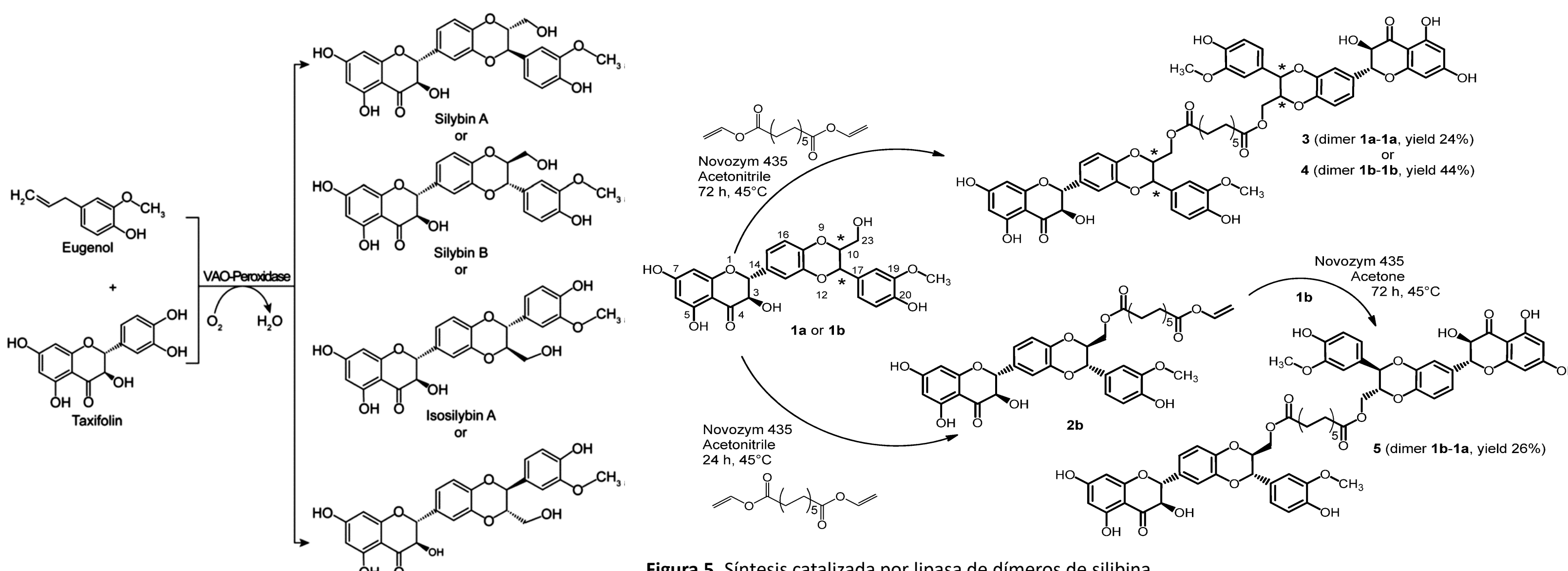


Figura 5. Síntesis catalizada por lipasa de dímeros de silibina

Tabla 1. Conversión total de silibina (%) y la fracción de monoésteres usados

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

CONCLUSIÓN

- La silibina y sus derivados están utilizándose actualmente como medicamentos y productos dietéticos por sus efectos hepatoprotector, quimioprotector, anticancerígeno, etc. Debido a esta demanda se recurre a la síntesis de silibina
- La biocatálisis destaca por su alto rendimiento y menor coste comparado la síntesis químicas, además de ser eficaz en el proceso y de tener posibilidad de mejorar los efectos de la silibina
- Se observa una necesidad de más investigación en este campo para una mejora de todo el proceso de síntesis y para su uso clínico.

BIBLIOGRAFÍA DESTACADA

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. Gamenara D. Redox biocatalysis: fundamentals and applications. 2012.
5. Kfen 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. Plišková M, Vondráček J, Kren V, Gazak R, Sedmera P, Walterová 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, Kfen V, N. Kolisis 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. Kolisis 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.