

# Química verda: l'ús de lipases per a la producció de compostos d'interès industrial

Vicente Gotor-Fernández

Universitat d'Oviedo. Institut Universitari de Biotecnologia d'Astúries. Departament de Química Orgànica i Inorgànica. 33006 Oviedo (Spain). A/e: vicgotfer@uniovi.es

Una de les tendències en el camp de la química sostenible, la *green chemistry*, és la d'emprar biocatalitzadors en comptes de metalls pesants en la catàlisi de diferents reaccions químiques. En aquest treball es descriuen les propietats de les lipases com a biocatalitzadors, les seves propietats i limitacions, així com estratègies per superar-les.

One of the main trends in the green chemistry field is to use biocatalysts instead of organometallic catalysts in order to catalyse different chemical reactions. In this work, lipases are described as ideal biocatalysts and their properties, limitations and strategies to overcome them are reviewed.

**E**s indubtable que la química té molts detractors, però per molt que se la intenti menysprear, podem afirmar, sense cap dubte, que la vida moderna i qualsevol dels aspectes que la caracteritzen serien impossibles sense els coneixements que proporciona la química com a ciència i l'aplicació que d'ells fa la indústria per a la preparació de productes bàsics per poder tenir una qualitat de vida que es correspongui amb les necessitats de cada època. Al principi dels anys noranta, l'Agència de Protecció del Medi Ambient dels Estats Units (EPA), conscient de l'augment continu de nous processos químics, va començar a elaborar unes directrius sobre la producció química amb unes metodologies més netes, amb la qual cosa va néixer un nou camp, la *green chemistry*, que posteriorment ha anat evolucionant cap a allò que els països de l'Europa continental hem definit com a *química sostenible*.

En els últims anys es va observar la preocupació de les nacions per evitar la generació de contaminació i de residus utilitzant alternatives netes per a la preparació de productes necessaris per millorar la nostra qualitat de vida. Actualment, una definició acceptada de *química sostenible* és l'orientació de la química, com a conjunt de coneixements teòrics i aplicats, que té com a objectiu específic la prevenció de la contaminació ambiental i dels riscos causats per les substàncies químiques, mitjançant la introducció o la potenciació de processos nets i segurs de producció i de productes químics menys tòxics i contaminants, sense menysprear la seva aportació al benestar i al progrés tecnològic. Els objectius que s'intenten aconseguir a través d'aquestes alternatives són la reducció de la generació i de l'ús de substàncies contaminants en el procés químic; no utilitzar, quan sigui possible, substàncies perilloses en el procés químic; obtenir productes finals sense restes de substàncies nocives, i un factor d'una gran importància: la reducció de la utilització de matèries primeres no renovables.

Per això algunes de les línies de recerca en síntesi orgànica més actuals persegueixen la utilització de: a) noves tipologies de dissolvents, com líquids iònics o fluids, en condicions supercrítiques en comptes dels dissolvents orgànics convencionals; b) biocatalitzadors en lloc de metalls pesants; c) condicions de reacció més suaus de pressió i temperatura; d) el reciclatge del catalitzador, i e) l'ús de noves alternatives com l'electroquímica, les microones, la sonicació o d'altres. Aquestes millores aporten el desenvolupament de nous processos químics de baix risc ambiental que consumeixen poca energia i que disminueixen els residus.

Les biotransformacions són aquells processos en els quals s'utilitzen enzims aïllats o microorganismes com a catalitzadors per convertir un substrat en producte. Aquests biocatalitzadors s'han agrupat tradicionalment en sis diferents grups depenent de les reaccions que són capaços de catalitzar: oxidoreductases, hidrolases, liases, transferases, isomerases i lligases, d'entre els quals són les oxidoreductases i les hidrolases, especialment lipases, les que presenten una major versatilitat per a la producció industrial d'interessants precursors o compostos d'alt valor afegit.

Les lipases, que formen part del grup de les hidrolases, són els enzims més utilitzats pel químic orgànic per preparar productes d'alt valor afegit. Aquests biocatalitzadors són molt versàtils perquè:

- 1) Són proteïnes amb una gran activitat catalítica, que augmenten en diversos ordres les velocitats de reaccions de processos duts a terme sense catalitzador.
- 2) Són catalitzadors específics de processos quimioselectius, regioselectius i estereoselectius.
- 3) Actuen en condicions suaus de reacció tant de temperatura com de pH.
- 4) Tenen una àmplia tolerància de substrats i de processos que poden catalitzar.

- 5) Són biodegradables, per la qual cosa presenten una baixa toxicitat per al medi ambient.
- 6) Són en molts casos reciclables, especialment si es fan servir enzims immobilitzats en dissolvents orgànics.

Si bé la seva funció natural és la de catalitzar la digestió hidrolítica dels lípids, el seu ús en síntesi orgànica està plenament estès des que, l'any 1985, Zaks i Klivanov van demostrar la seva activitat en dissolvents orgànics. Aquest fet ha permès obtenir excel·lents selectivitats en diferents processos enzimàtics, però les lipases més utilitzades són la de *Candida antarctica* tipus B (CAL-B) i la de *Pseudomonas cepacia* (PSL), principalment a causa del fet que accepten una gran varietat de substrats diferents a l'aigua, com alcohols, amines o tiols, a més de la seva disponibilitat comercial a baix cost i la seva elevada activitat tant en dissolvents orgànics com aquosos.

Les reaccions més importants catalitzades per lipases en dissolvents orgànics es basen en la formació inicial d'un complex acil-enzim a partir del biocatalitzador i un grup èster (figura 1). D'aquesta manera s'inicia la catàlisi, que destaca sobre el conjunt de les reaccions, les de transesterificació per reacció amb un alcohol. L'any 1988 van ser descobertes les reaccions d'amonòlisi, que permeten la modificació o la resolució enzimàtica d'amides i d'èsters; posteriorment, l'any 1993, es va desenvolupar dins el grup de recerca de bioorgànica de la Universitat d'Oviedo el primer exemple d'una reacció d'amonòlisi enzimàtica catalitzada per lipases emprant com a nucleòfil l'amoníac. Menys conegudes, però no per això menys importants, són les reaccions amb hidrazines i peròxids. A més, avui dia, el descobriment de noves activitats enzimàtiques d'aquests biocatalitzadors ha donat lloc al concepte de *promiscuïtat catalítica* d'un enzim, basat en l'habilitat que té el centre actiu d'aquest biocatalitzador per dur a terme més d'una transformació química; els exemples de reaccions aldòliques o d'addició tipus Michael, per exemple, són molt recents.

Podem agrupar les biotransformacions estereoselectives catalitzades per les lipases en tres grans grups:

- 1) Resolucions cinètiques basades en la transformació d'un dels enantiòmers de la barreja racèmica en un nou compost, de manera que és possible separar fàcilment els dos enantiòmers que componen la barreja racèmica. Això comporta una limitació pràctica, i és que quan tan sols es necessita pur

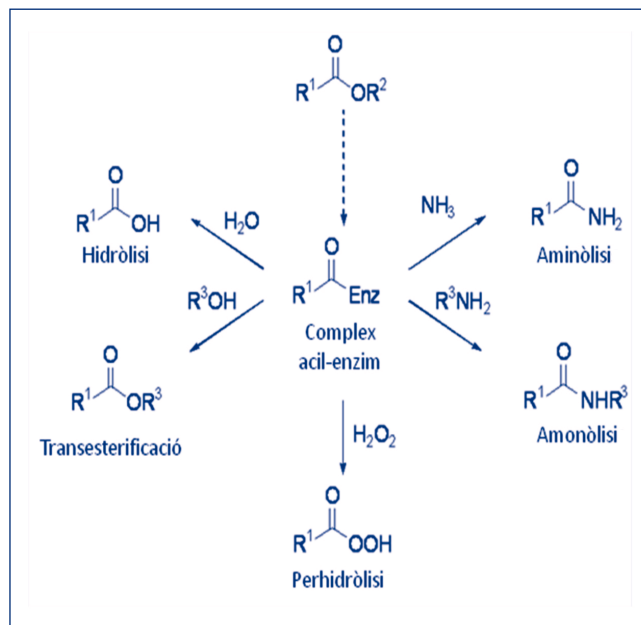


FIGURA 1. Reaccions típiques catalitzades per lipases.

enantiomèricament un dels dos enantiòmers, la meitat del material de partida es perd, o el que és el mateix, solament es pot arribar a conversions de com a màxim el 50 %.

- 2) Per superar aquesta limitació, existeixen estratègies que permeten transformar completament els dos enantiòmers de la barreja en un únic estereoisòmer, la qual cosa permet obtenir idealment un rendiment del 100 %. El més comunament acceptat són les resolucions cinètiques dinàmiques on actuen conjuntament amb la lipasa, un complex organometàl·lic, generalment de ruteni o de pal·ladi, que permet la racemització de l'enantiòmer, que reacciona més lent en el procés enzimàtic.

- 3) Finalment, existeix una altra alternativa: les desimetritzacions enzimàtiques enantioselectives, que permeten aconseguir en aquesta mena de processos rendiments del 100 % i que són aplicables a compostos quirals o a formes *meso*.

Tant les resolucions cinètiques de barreges racèmiques com les resolucions dinàmiques, així com els processos de desimetrització enantioselectius, s'han aplicat amb èxit a reaccions de transesterificació i a hidròlisi, la qual cosa ha permès la preparació d'un gran número de compostos oxigenats quirals. No obstant això, encara que s'hagin resolt i que es realitzin, amb una major o menor eficàcia, síntesis d'amines enantiomèricament pures mitjançant processos de resolució cinètica, els exemples existents de resolucions cinètiques dinàmiques i

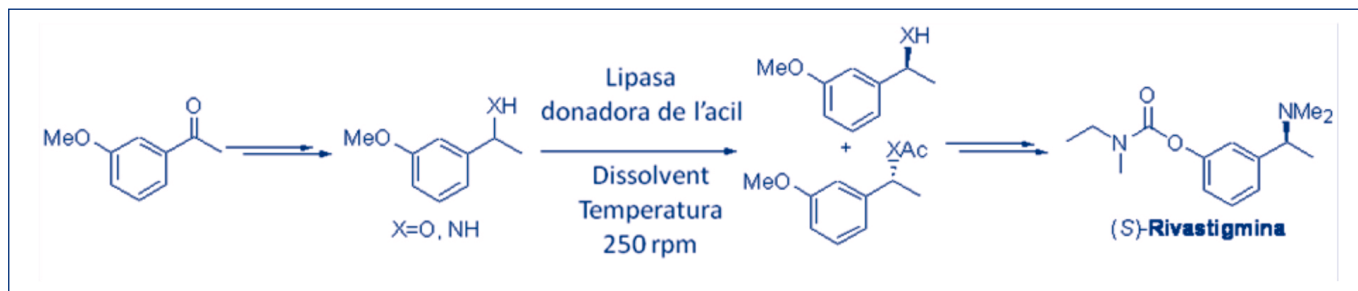


FIGURA 2. Síntesi quimioenzimàtica de la (S)-Rivastigmina.

de desimetrització enzimàtica enantioselectiva en la preparació de compostos quirals nitrogenats són escassos.

Analitzant els processos de transesterificació o d'amoniolisi enzimàtica (que, tal com ja s'ha mencionat, són els més emprats en l'actualitat per part del químic orgànic), cal destacar que, per tal que els processos de resolució enzimàtica d'alcohols i d'amines es realitzin amb èxit, és necessari que aquestes reaccions siguin irreversibles, per la qual cosa és fonamental l'elecció d'un bon donador d'acil. Així, per exemple, en el cas dels alcohols, s'acostumen a utilitzar èsters de vinil, perquè en reaccionar desprenen acetaldehid, que fa irreversible el procés. En el cas de les amines i a causa del seu poder nucleòfil, no és necessari emprar èsters activats i per això els èsters d'alquil, com l'acetat d'etil o el metoxiacetat d'etil, són els més emprats, i s'utilitzen generalment carbonats com el carbonat de dial·lil per a les resolucions d'amines secundàries.

El grau d'eficàcia d'un procés de resolució enzimàtic ve donat per un paràmetre adimensional com és l'enantioselectivitat, una relació en la qual un enantiòmer reacciona més ràpid que l'altre, el qual ve donat per la mesura de tres variables: els excessos enantiomèrics de substrat i de producte i la conversió de la reacció, paràmetres d'una biotransformació que poden ser calculats mitjançant tècniques com la ressonància magnètica nuclear, la cromatografia de gasos o la cromatografia líquida d'alta eficàcia. La selectivitat d'una lipasa és conseqüència de la distribució dels aminoàcids al voltant del centre actiu de l'enzima i és possible predir la selectivitat fent ús de la denominada *regla empírica de Kazlauskas*, la qual es basa en un model en el qual s'assumeix que el centre actiu de la lipasa consta de dos forats: un de dimensió mitjana on se situarà el substituent menys voluminós i un altre de dimensió gran on se situarà el substituent de més gran volum. Assumint que el substituent més voluminós té prioritat sobre el mitjà a l'hora d'assignar l'estereoquímica, reaccionarà preferentment

l'enantiòmer de configuració *R* tant en les reaccions de transesterificació com en les d'hidròlisi. Aquesta s'ha aplicat amb èxit a un gran nombre de lipases i la seva aplicació és molt estesa en el camp de la biocatàlisi.

Cal destacar l'avantatge que presenten les lipases en poder actuar estereoselectivament sobre una barreja racèmica; això representa una interessant alternativa per al sector farmacèutic, on, tal com és ben conegut, són molt diferents i fins i tot en alguns casos contraposades les propietats dels enantiòmers d'un fàrmac (talidomida, cloramfenicol, propranolol, verapamil, etambutol, etc.). En aquest context hem realitzat recentment la síntesi estereoselectiva de compostos farmacèutics òpticament actius, com la Dapoxetina i la Rivastigmina.

La Rivastigmina és un medicament utilitzat en el tractament de la demència en persones amb la malaltia d'Alzheimer (un trastorn cerebral que lentament destrueix la memòria, la capacitat per pensar, aprendre, comunicar-se i realitzar les activitats diàries); l'activitat d'aquesta droga resideix en l'enantiòmer de configuració *S*. Una estratègia retrosintètica senzilla ens permet observar, després de diferents desconexions, que la 3-metoxi-acetofenona és un substrat de partida ideal per a la preparació d'aquest compost, pel fet de ser comercial a baix cost econòmic i de no necessitar de moltes etapes químiques per aconseguir el producte final. Per això es va realitzar la preparació de precursors racèmics adequats com el 3-metoxi-feniletanol o la 3-metoxi-feniletanamina, els quals poden ser subjectes a reaccions de resolució enzimàtica catalitzades per lipases en dissolvents orgànics [1].

Les reaccions de resolució cinètica enzimàtica es van realitzar emprant un èster activat com l'acetat de vinil, el *tert*-butilmetil èter (TBME) com a dissolvent i a 30° C en un agitador orbital variant el biocatalitzador emprat i la proporció del ma-

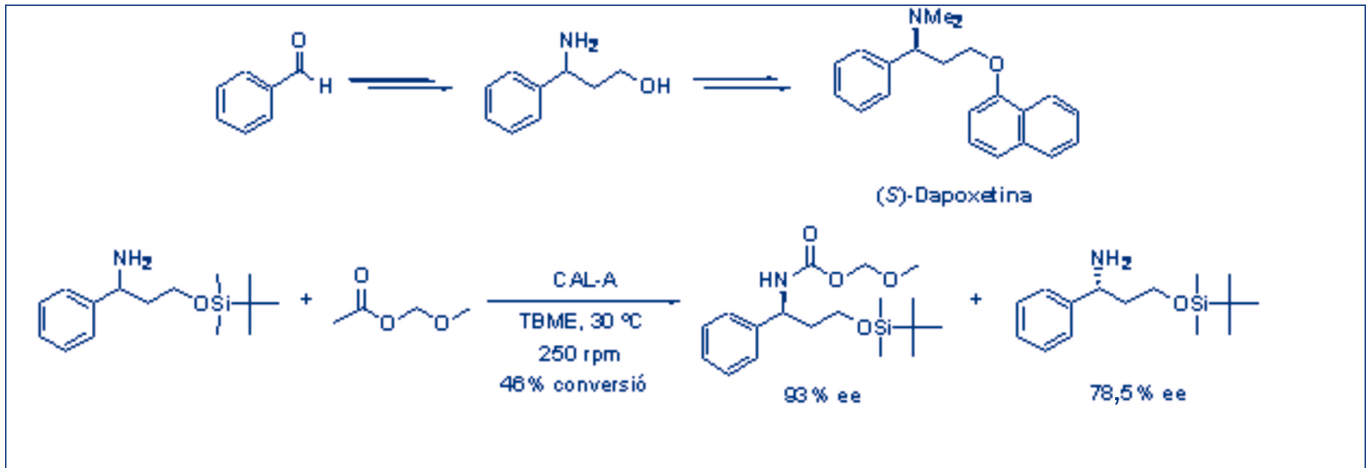


FIGURA 3. Preparació de la (S)-Dapoxetina mitjançant metodologies quimioenzimàtiques.

teix respecte al producte de partida. Tant la CAL-B com la PSL van catalitzar amb una gran eficiència l'acetilació estereoselectiva de l'isòmer *R* i es va obtenir, en el cas de la CAL-B, després de quatre hores, tant l'alcohol com el producte pur enantiomèricament i amb uns excel·lents rendiments aïllant-los per cromatografia de columna amb gel de sílice. Una vegada obtingut satisfactòriament el (*R*)-acetat, es va decidir estudiar aspectes relacionats amb els costos del procés, com ara el reciclatge i la reutilització de l'enzim, i es van observar valors d'activitats molt similars després de com a mínim cinc cicles de reacció.

Mitjançant una aproximació similar però una mica més complexa, vàrem decidir estudiar la preparació de la Dapoxetina òpticament enriquida [2]. Aquest fàrmac s'utilitza actualment en el tractament de malalties tan diferents com l'ansietat, la

bulímia, l'anorèxia i l'ejaculació precoç, en tant que l'isòmer *S* és molt més actiu que el *R*. En aquest cas, l'estratègia retrosintètica que ens vàrem plantejar consistia a partir d'un  $\alpha$ -aminoalcohol que podria ser obtingut a partir de benzal·hid. Aquest aminoalcohol presenta un doble avantatge, que és que es pot resoldre bé pel grup amino- a través d'una reacció d'amonòlisi o bé pel grup alcohol mitjançant un procés de transesterificació.

Per tal d'aconseguir un bon rendiment en aquest procés, es va utilitzar un precursor en el qual s'ha protegit químicament el grup alcohol amb el clorur de *tert*-butildimetilsilil i s'ha realitzat la resolució enzimàtica a través del grup amino-; d'aquesta manera, s'ha aconseguit evitar la possible migració del grup acilo- entre les restes amino- i alcohol. Els millors resultats es van obtenir emprant la CAL-A com a biocatalitza-

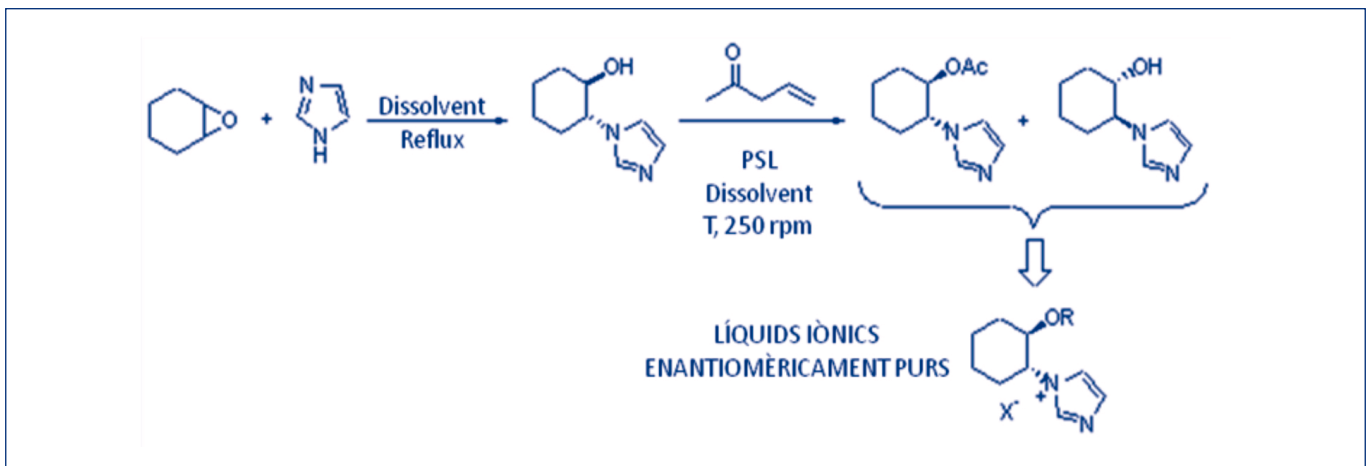


FIGURA 4. Síntesi de líquids enantiomèricament purs derivats de l'imidazol.

dor, el TBME com a dissolvent i cinc equivalents de metoxiacetat d'etil a 30° C i 250 rpm. Després de vint-i-set hores, és possible d'obtenir l'amida de configuració S amb un 93 % d'excés enantiomèric, precursor adequat per a la formació de la (S)-Dapoxetina.

Finalment, creiem que una aportació d'interès en el camp de la biocatàlisi per part del nostre grup ha estat la preparació de líquids iònics quirals [3, 4], els quals són una alternativa als dissolvents orgànics convencionals fonamentalment per motius econòmics i ecològics; a més, la presència d'un grup imidazol a la molècula els proporciona unes interessants propietats en organocatàlisi.

S'ha realitzat la seva síntesi química i la resolució enzimàtica utilitzant acetat de vinil com a agent acilant i THF o *tert*-butilmetil èter (TBME) com a dissolvent; amb l'objectiu de trobar les millors condicions de reacció, s'han variat diferents paràmetres, com ara el tipus de biocatalitzador i la temperatura. Tant la CAL-B com la PSL varen catalitzar d'una manera completament enantioselectiva la reacció de transesterificació de l'alcohol, però la cinètica més ràpida va ser per a la PSL.

Una vegada realitzada la resolució enzimàtica dels derivats de l'imidazol, es va fer la síntesi de diferents líquids iònics enantiomèricament purs utilitzant diferents halogenurs d'alquil i d'aril. A més de les propietats físiques dels líquids iònics, es poden també modular modificant tant el seu catió com (i més especialment) el seu anió; així, d'aquesta manera, es va realitzar la reacció de metàtesi que permet intercanviar els halogenurs per anions hexafluorofosfat o tetrafluoroborats aïllant-los amb uns excel·lents rendiments després de senzills processos de rentat.

Com a conclusió final, podem afirmar que la biocatàlisi és una metodologia important en el camp de la química sostenible. Així, emprant lipases com a biocatalitzadors, és possible aconseguir processos molt menys contaminants, obtenir productes sense la barreja d'altres productes nocius, realitzar la reacció en condicions suaus de pressió i temperatura, es pot recuperar el biocatalitzador i reciclar-lo per a un nou procés i es poden obtenir altres avantatges. No obstant això, l'activitat, l'estabilitat o, sobretot, l'enantioselectivitat que mostren les lipases no són sempre satisfactòries, raó per la qual aquestes propietats s'han optimitzat tradicionalment ajustant la temperatura i/o el pH del medi, utilitzant additius, mitjançant l'ús de líquids iònics en comptes de dissolvents convencionals o bé emprant molts diversos suports polimèrics per a la immobilització de l'enzim. En els últims anys, s'han desenvolupat diferents tècniques per a la modificació de les estructures enzimàtiques amb l'objectiu de dissenyar nous biocatalitzadors amb millors propietats.

## Referències bibliogràfiques

- [1] MANGAS-SÁNCHEZ, J.; RODRÍGUEZ-MATA, M.; BUSTO, E.; FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. J. *Org. Chem.*, 74 (2009): 5304-5310.
- [2] Seria la referencia previamente numerada con el número 1: *Tetrahedron: Asymmetry*, 17 (2006): 860-866.
- [3] Seria la referencia previamente numerada con el número 2: *Tetrahedron Lett.*, 48 (2007): 5251-5254.
- [4] RÍOS-LOMBARDÍA, N.; BUSTO, E.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V.; PORCAR, R.; GARCÍA-VERDUGO, E.; LUIS, S. V.; ALFONSO, I.; GARCÍA-GRANDA, S.; MENÉNDEZ-VELÁZQUEZ, A.; *Chem. Eur. J.*, 16 (2010): 836-847.