

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 1199-1236

————— *Artículo original* —————

Biocatálisis aplicada a la Química Farmacéutica

Recibido el 24 de septiembre de 2007

**JOSÉ MARÍA SÁNCHEZ-MONTERO* Y JOSÉ VICENTE
SINISTERRA GAGO**

*Grupo de Biotransformaciones. Departamento de Química Orgánica
y Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense.
Madrid 28040*

RESUMEN

La Industria Farmacéutica se enfrenta en la actualidad, forzada por la normativa de la UE a reducir la producción de residuos (200 Kg) por kilogramo de producto. Ello implica el desarrollo de procesos de síntesis más eficaces y selectivos, utilizando mejores catalizadores. Por ello la Biocatálisis y las Biotransformaciones, como aplicación de la misma a la Síntesis Orgánica, están adquiriendo un papel importante en el diseño de las nuevas síntesis de fármacos. En la presente revisión se comentan algunas de las metodologías desarrolladas por el Grupo de Biotransformaciones de la UCM en este campo. Se abordan las metodologías desarrolladas para la mejora de los biocatalizadores: nuevas técnicas de inmoviliza-

* Información de contacto:

Grupo de Biotransformaciones. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Ciudad Universitaria. 28040. Madrid.

Dr. José María Sánchez-Montero. e-mail: jsanchez@farm.ucm.es

Dr. José Vicente Sinisterra Gago. e-mail: jvsgago@farm.ucm.es

La actividad investigadora del grupo se inicia en 1988 cuando el Prof. Sinisterra se traslada a Madrid creando grupo de investigación con los Prof. Alcántara y Sánchez Montero, incorporándose posteriormente la Prof. Hernaiz y la Prof. Fernández constituyendo el núcleo principal del grupo. Actualmente el Grupo de Biotransformaciones de la Universidad Complutense es un grupo interuniversitario e interdepartamental que fue reconocido como primer grupo de calidad de la CAM en el campo de la Biocatálisis en 2004/2005, siendo además un grupo de referencia a nivel europeo en el campo de las Biotransformaciones.

www.biotransformaciones.com.

ción o de modificación química, control de la actividad de agua etc. Se describen algunos procesos de interés desarrollados en el grupo como la resolución de racémicos y su aplicación a la obtención de ácidos *S*-2-arilpropiónicos o de β -bloqueantes adrenérgicos; la reducción estereoselectiva de cetonas proquirales, la síntesis en un paso de nucleósidos con actividad farmacológica etc. En todos los casos se comentan las ventajas de las nuevas metodologías de síntesis en sintonía con la nueva normativa de obligado cumplimiento de la UE sobre eliminación de disolventes contaminantes (CH_2Cl_2 , TCE), inflamables (hexano, isooctano), compuestos orgánicos volátiles (COV) etc, y de reactivos contaminantes v.g.: catalizadores órgano metálicos.

Palabras clave: Biocatálisis, Biotransformaciones, fármacos racémicos, química verde.

ABSTRACT

Enzymes and microorganisms as catalysts in the synthesis of products of pharmaceutical interest.

Pharmaceutical industries are nowadays facing the challenge of lowering the ratio (kg of residues/kg of product) to levels below 200, as required by the European legislation. This fact is demanding the implementation of more selective and efficient synthetic procedures, so that new and better catalysts are needed. For this purpose, Applied Biocatalysis, and more specifically Biotransformation (the use of the former in Organic Synthesis), are becoming more prominent in the design of new strategies for drugs synthesis. In this review, some of the methodologies applied inside the Biotransformations Group of the Complutense University are presented; thus, the employ of different methodologies (such as immobilization and/or modification of biocatalysts, or the control of water activity of the reaction media) for improving the biocatalyst performance are described. The biocatalyzed resolution of racemates for obtaining enantiopure *S*-2-aryl propionic acids (profens) or cardiotonic β -blockers, the estereoselective carbonyl reduction of prochiral ketones, or the one-step semi-synthesis of therapeutically significant nucleosides will be discussed. In all cases, a special emphasis is set on the environmental advantages of the biocatalyzed processes, as demanded by EU legislation on substitution of contaminant solvents (CH_2Cl_2 , TCE) or reagents (organo metallic catalysts), as well as highly flammable compounds (*n*-hexane, isooctane), or promoting VOCs release.

Key words: Biocatalysis, Biotransformations, racemics drugs, green chemistry.

1. INTRODUCCIÓN

La Industria Farmacéutica se enfrenta en la actualidad a dos retos fundamentales. Por un lado debe reducir al menos en un orden de magnitud la producción de residuos por kilogramo de producto y por otro desarrollar terapias donde las dosis sean menores pasando de las dosis actuales de miligramos al nivel de μg (1) y que éstas sean cada vez más selectivas y menos tóxicas. Ello implica el desarrollo de procesos de síntesis más eficaces y selectivos utilizando mejores catalizadores y/o biocatalizadores disminuyendo la generación de subproductos, el desarrollo de todas las terapias basadas en las células equipotentes y en el desarrollo de nuevos productos bioterapéuticos como vacunas u hormonas. Todo ello nos lleva a plantearnos el papel preponderante que tendrá en un futuro a medio y largo plazo la Biotecnología en la Terapéutica sustituyendo en gran medida a la Química en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

El interés práctico del empleo de biocatalizadores en uno o varios pasos de la síntesis de un fármaco reside en que dada su especificidad, no es necesaria la utilización de grupos protectores, disminuyendo así los pasos de la síntesis, aumentando el rendimiento y reduciendo la producción de residuos contaminantes. Como ejemplo citaremos la producción de Ribavirina desarrollada en un proceso *one-pot* usando células enteras (2). La síntesis se hace empleando células enteras productoras de nucleósido fosforilasas que permiten el cambio de uracilo por el triazol del antiviral.

Otro aspecto interesante a considerar y de gran importancia en la Industria Farmacéutica es la capacidad que tienen las enzimas para resolver mezclas racémicas. Gran parte de los principios activos farmacéuticos son moléculas que poseen uno o varios centros estereogénicos, de cuya correcta configuración depende su bioactividad. Los procesos de síntesis química se caracterizan en general por la obtención de mezclas de isómeros, que son además difíciles de purificar. En este sentido, los procesos biocatalíticos presentan una gran ventaja, ya que las enzimas producen de un modo específico y selectivo únicamente uno de los isómeros posibles. No obstante, las enzimas son catalizadores solubles en agua, sensibles a los cambios del medio y que sufren inhibiciones por sustratos y productos. Además, las enzimas muchas veces no poseen

todas las propiedades ideales (actividad, selectividad, etc.) cuando queremos que catalicen procesos distintos de los naturales (*v.g.* síntesis en lugar de hidrólisis), sobre substratos no naturales, en condiciones experimentales no convencionales (*v.g.* en disolventes orgánicos no tóxicos).

No obstante dado el elevado coste de las enzimas y en algunos casos de la dificultad de llevar a cabo un proceso fermentativo cuando se utilizan células enteras es conveniente establecer una estrategia para abordar todos los inconvenientes que se pueden presentar en un proceso. Estas estrategias se pueden afrontar desde tres perspectivas distintas:

1. Mejoras basadas en aspectos fundamentales de la Biocatálisis.
2. Biotransformaciones catalizadas por enzimas.
3. Biotransformaciones catalizadas por células enteras.

2. MEJORAS BASADAS EN ASPECTOS FUNDAMENTALES DE LA BIOCATÁLISIS

Este punto requiere conocimientos específicos de los procesos fisicoquímicos en los que están implicadas las enzimas o células y en este sentido existen diferentes metodologías para aumentar el rendimiento y la pureza enantiomérica. Dentro de estas metodologías es muy importante definir con precisión los siguientes aspectos:

- 2.1. Control de las variables técnicas.
- 2.2. Control de la pureza de la enzima.
- 2.3. Selección adecuada de microorganismos para llevar a cabo un proceso.
- 2.4. Selección del disolvente de la biotransformación.
- 2.5. Control de la cantidad de agua en aquellos procesos en los que ésta participe en la reacción.
- 2.6. Efecto de los aditivos como agentes estabilizantes de enzimas.

2.1. Control de las variables Técnicas

Respecto al control de las variables técnicas, pH, temperatura, cantidad de catalizador, tiempo, concentración de sustrato, etc., la cantidad de catalizador tiene un efecto notable sobre la reproducibilidad del proceso teniendo en cuenta que en la mayoría de las ocasiones se utilizan preparaciones comerciales. Domínguez de María *y col.* (3) desarrollaron un método con el objeto de conocer la cantidad real de enzima en la muestra definiendo el «*Factor Lipásico*» basado en la velocidad inicial de diferentes reacciones de esterificación.

La temperatura está considerada como una variable importante pero sujeta a las limitaciones impuestas por la mayoría de las enzimas y células de trabajar en condiciones suaves. Cuando las reacciones han de desarrollarse a temperaturas superiores a los 50° C las enzimas procedentes de organismos termófilos constituyen una herramienta esencial en Biocatálisis y especialmente a escala industrial ya que pueden trabajar a altas temperaturas en los casos en el que el proceso así lo demande y donde no se pueden usar las enzimas convencionales. Así este tipo de enzimas son interesantes en las industrias de alimentos, del papel, de los detergentes, farmacéutica, en la eliminación de desechos tóxicos, etc (4). No obstante el uso de estas enzimas a altas temperaturas requiere la utilización de disolventes de elevado punto de ebullición lo que conlleva la evaporación de estos con los consiguientes problemas medioambientales. La utilización de líquidos iónicos puede resolver este inconveniente ya que estos permanecen en estado líquido en un amplio rango de temperaturas (5). En la Figura 1 se muestra un ejemplo de utilización de la lipasa termófila de *Bacillus thermocatenuatus* catalizando la reacción de esterificación del ácido mandélico con etanol a 90° C de temperatura y donde se consiguen tasas de esterificación muy elevadas a cortos tiempos de reacción en relación a la misma reacción llevada a cabo en Isooctano.

2.2. Control de la pureza de la enzima.

Otra estrategia posible para resolver mezclas racémicas es abordando el problema desde el punto de vista de la pureza de la prepa-

ración enzimática. En ocasiones la purificación de una proteína mejora la enantioselectividad de un proceso químico. Así por ejemplo en la esterificación del ácido (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propiónico con 1-propanol utilizando isooctano como disolvente, puede observarse como la purificación de la enzima —lipasa de *Candida rugosa*— mejora la conversión y enantioselectividad. De las dos isoformas —Lipasas A y B— (6) la B conduce a los mejores resultados (Tabla 1) (7).

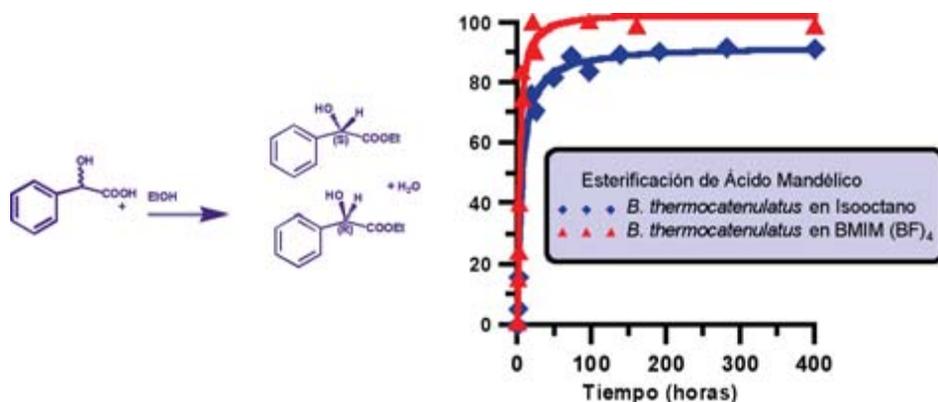


FIGURA 1. *Reacción de esterificación del ácido mandélico con etanol a 90° C utilizando lipasa de Bacillus thermocatenulatus.*

TABLA 1. *Efecto del grado de purificación sobre la enantioselectividad del proceso.*

Enzima	α_w^a	C(%) ^b	t(h)	e(%) ^c
Lipasa Comercial <i>C. rugosa</i>	≈1	37	24	43
Lipasa Semipurificada <i>C. rugosa</i>	≈1	50	24	60
Lipasa A <i>C. rugosa</i>	≈1	47	24	74,2
Lipasa B <i>C. rugosa</i>	≈1	49	24	>98

^a500 ml de agua añadida; ^bConversion a éster; ^c Exceso enantiomérico de el ácido remanente.

[S (+)] < [R(-)], ácido 66 mM. 1-propanol en 5 ml de isooctano; T^a = 30 ° C; [Lipasa Comercial o Semipurificada] = 20 mg Proteína/ml y [Lipasas A o B] = 2 mg Proteína/ml.

Otra estrategia de purificación sería la utilización de disolventes orgánicos ya que las lipasas presentan una hidrofobicidad elevada. Así, siguiendo un simple y rápido tratamiento basado en disolver el preparado comercial de lipasa de *C. rugosa* en diferentes porcentajes de disolventes orgánicos polares como metanol, etanol, acetona, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, y 2-butanol conduce a preparados más activos y con una estabilidad térmica mejorada (8, 9).

En la Tabla 2 mostramos los resultados obtenidos en la esterificación de S o R ketoprofeno al comparar la lipasa comercial con las enzimas obtenidas por el tratamiento con los diferentes disolventes. La actividad enzimática en la esterificación de ambos enantiómeros ha sido cuantificada a través de la actividad específica obtenida de la velocidad inicial de reacción. Para comprobar la validez de los experimentos se hicieron con dos lotes diferentes habida cuenta de la poca reproducibilidad de estas preparaciones comerciales. Puede verse como la relación S/R se incrementa en las lipasas tratadas con respecto a la comercial. También mostramos en la Tabla 3 la estabilidad térmica de estas preparaciones donde vemos que el tiempo de vida media es en la mayoría de los casos superior a la lipasa comercial.

2.3. Selección adecuada de microorganismos para llevar a cabo un proceso.

Existen muchos procesos de interés en la industria farmacéutica donde podrían utilizarse las enzimas pero debido a la diferente selectividad y especificidad mostrada por estas, hace que debamos explorar nuevas fuentes productoras de enzimas. Para ilustrar lo dicho baste como ejemplo el cribado (screening) realizado sobre 2000 cepas microbianas, las cuales se hicieron crecer sobre diferentes medios para buscar nuevas fuentes productoras de lipasas (10). La distribución taxonómica se muestra en la Figura 2.

Asimismo se determinó su actividad lipolítica utilizando sustratos cromogénicos para diferenciar las cepas que poseían actividad. La estereoselectividad de las lipasas obtenidas se ensayó en la resolución de los ácidos 2-aril-propiónicos así como en la resolución del (*R,S*) 1-fenil etanol, acilación de ciclopropilmetanol y en la síntesis

de carbamatos por acilación de aminas (Esquema 1). A modo de ejemplo mostramos los resultados obtenidos en la síntesis de N-1-feniletíl- butil carbamato (11) (Tabla 4). Esquema 1:

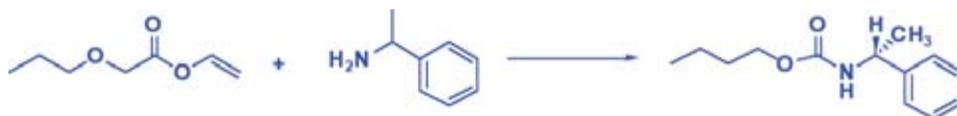


TABLA 2. *Efecto de los disolventes orgánicos sobre la enantioselectividad.*

Entrada	Lipasa	S(+) Ketoprofeno		R(-) Ketoprofeno		S/R ^a
		Actividad específica ^b	χ	Actividad específica ^b	χ	
1	CRL(L54) ^{d,e}	6,9	5	11,5	9	0,6
2	CRL(L85) ^{f,g}	17,1	8	28,9	17	0,6
3	SA-CRL ^{h,e}	15,3	7	15,2	5	1,0
4	E-CRL ^{i,e}	15,9	2	28,1	7	0,6
5	1P-CRL ^{j,e}	27,6	6	30,7	8	0,9
6	2P-CRL ^{k,e}	30,2	8,5	26,1	7,5	1,2
7	A-CRL ^{l,g}	20,4	5	18,2	5	1,1
8	M-CRL ^{m,g}	22,5	5	20,7	5	1,1
9	2B-CRL ^{n,g}	41,3	7,5	14,2	3	2,9
10	1B-CRL ^{o,g}	18,1	3	22,1	3	0,8

^aRelación entre las actividades específicas obtenidas con cada enantiómero en la reacción de síntesis. ^bActividad específica sintética (mM U⁻¹h⁻¹)10⁷. ^cRendimiento (%) a 200 h. ^dLipasa cruda de *C. rugosa*, lote 54HO260 de Sigma. ^eObtenida por tratamiento Lot 54. ^fLipasa cruda de *C. rugosa*, lote lot 85HO260 de Sigma. ^gObtenida por tratamiento Lot 85. ^h60% sulfato amónico sobre CRL. ⁱ40 % (v/v) etanol sobre CRL. ^j30% (v/v) 1-propanol sobre CRL. ^k40% (v/v) 2-propanol sobre CRL. ^l30% (v/v) acetona sobre CRL. ^m30% (v/v) metanol sobre CRL. ⁿ30%(v/v) 2-butanol sobre CRL. ^o60%(v/v) 1-butanol sobre CRL.

TABLA 3. *Efecto de los disolventes sobre la vida media de los biocatalizadores.*

Fracción	$t_{1/2}$ (h) ^a	F^b
CRL(L54) ^{c,d}	4,5	1
SA-CRL ^{e,d}	0,6	0,1
2P-CRL ^{f,d}	5,9	1,3
1P-CRL ^{g,d}	10,6	2,3
E-CRL ^{h,d}	8,2	1,8
CRL(L85) ^{i,j}	3,9	1
A-CRL ^{k,j}	10,8	2,8
M-CRL ^{l,j}	47,2	12,1
2B-CRL ^{m,j}	7,9	2,0
1B-CRL ^{n,j}	3,1	0,8

^aTiempo de vida media. ^bFactor de estabilización relacionado con la enzima nativa. ^cLipasa cruda de *C. rugosa*, lote 54HO260 de Sigma. ^dObtenido tratando el lote 54 °60 % sulfato amónico en CRL. ^e40% (v/v) 2-propanol en CRL. ^f30% (v/v) 1-propanol en CRL. ^g40 % (v/v) etanol en CRL. ^h40 % (v/v) etanol en CRL. ⁱLipasa cruda de *C. rugosa*, lote 85HO260 de Sigma. ^jObtenida tratando el lote 85 ^k30%(v/v) de acetona en CRL ^l30%(v/v) metanol en CRL ^m30%(v/v) 2-butanol en CRL.

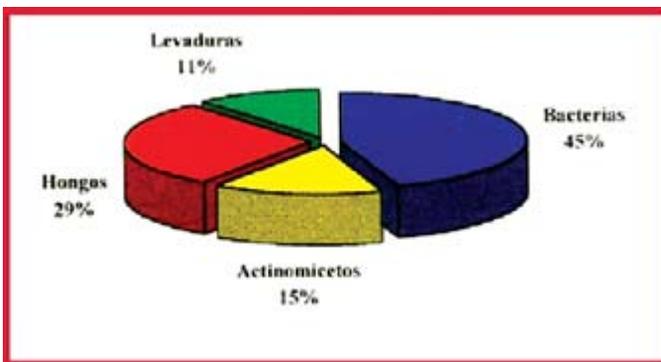
FIGURA 2. *Distribución taxonómica de especies encontradas en el screening.*

TABLA 4. *Selectividad mostrada por las diferentes lipasas en la síntesis de N-1-feniletíl-butíl carbamato.*

Lipasa	Rendimiento (%) ^a	e.e. (%) ^b	Configuración preferida
<i>O.sulphureo-ochraceum</i>	6	99	S>R
<i>F.oxysporum</i>	58	95	R>S
<i>F.solani</i>	46	99	R
<i>F.poa</i>	47	85	R>S
<i>Monascus sp</i>	80	>10	R>S
<i>M. mucoroides</i>	80	10	R>S
<i>P.chrisogenum</i>	38	99	R
<i>A.ciferri</i>	25	40	R>S
<i>R.aracauriae</i>	21	19	R>S
<i>P.cepacia</i>	53	70	S>R
<i>B.linens</i>	10	99	R>S
<i>S.halstedii</i>	61	95	R>S

^aDeterminado por HPLC. ^bDeterminado por RMN-¹H usando sales de Eu (III).

Por otra parte modificando el inductor así como la velocidad de crecimiento se produce la alteración de la composición en iso-enzimas así como el contenido en carbohidratos de la lipasa de *C. rugosa* (12). Este hecho va a condicionar la selectividad de la enzima como se puede ver en la Tabla 5 donde se comparan dos preparaciones de *C. rugosa* con diferente composición de iso-enzimas. Este hecho también ha sido puesto de manifiesto por Domínguez y col. (13, 14) como se muestra en la Tabla 6 ya que al cambiar el inductor o las condiciones de fermentación se modifica la proporción de iso-enzimas en relación a preparaciones obtenidas por nosotros y distintos proveedores.

2.4. Selección del disolvente de la biotransformación.

La elección del disolvente puede ejercer dos efectos principales sobre la biotransformación:

- a) Control de la solubilidad del sustrato en el medio orgánico, dependiente de los valores del log P del disolvente y del sustrato (15).

TABLA 5. *Selectividad de lipasas de C. rugosa en función de su perfil iso-enzimático* utilizando como reacción test la esterificación de los ácidos S y R-2-fenil-propiónico y del S y R-ketoprofeno.

Enzima	Acido	Velocidad inicial específica (x 10 ⁶) (mmol de éster sintetizado por mg proteína por h)
Sigma CRL	(S)-2-Fenil propiónico	227±9
CRL-UAB	(S)-2-Fenil propiónico	552±21
Sigma CRL	(R)-2-Fenil propiónico	Despreciable
CRL-UAB	(R)-2-Fenil propiónico	Despreciable
Sigma CRL	(S)-ketoprofeno	4±0,15
CRL-UAB	(S)-ketoprofeno	218±9
Sigma CRL	(R)-ketoprofeno	Despreciable
CRL-UAB	(R)-ketoprofeno	64±2,5
Sigma CRL ^a	(S)-ketoprofeno	Despreciable
CRL-UAB ^a	(S)-ketoprofeno	241±10
Sigma CRL ^a	(R)-ketoprofeno	Despreciable
CRL-UAB ^a	(R)-ketoprofeno	200,8

^a sin agua añadida.

TABLA 6. *Proporción de iso-enzimas en diferentes muestras de lipasa de C. rugosa excretada en diferentes condiciones de fermentación.*

Lipasa	Fermentación/Inductor	Composición en Isoenzimas		
		Lip 1	Lip 2	Lip 3
Sigma	Desconocido	73±5	8±1	19±2
Roche	Desconocido	66±5	13±2	21±2
UCM-I	Batch/Acido oleico	—	30±5	40±4
UCM-II	Batch/Acido oleico	—	73±5	27±3
UCM-III	Batch/Aceite girasol	—	73±5	27±3
UCM-IV	Batch/1-dodecanol	22±3	34±3	44±4
UCM-V	Batch/1-glicerol	< 1%	< 1%	< 1%
UAB-II	Fed-Batch Q baja/Acido oleico	—	56±5	44±5
UAB-III	Fed-Batch Q baja /Acido oleico	—	56±5	44±5
UAB-IV	Fed-Batch Q alta/Acido oleico	33±3	40±4	27±3

- b) Solvatación selectiva de cada enantiómero del sustrato racémico por las moléculas del disolvente.

El primer efecto controla, fundamentalmente, el rendimiento mientras que el segundo tiene que ver con la enantioselectividad vía formación de dos diaesteroisómeros entre el disolvente y las moléculas *R* o *S* del sustrato. Este aspecto ha sido comprobado en la esterificación de *R* o *S* ketoprofeno con 1-propanol utilizando *R* o *S*-carvona como disolvente quiral, catalizada por lipasa B de *Candida antarctica*. Podemos ver como las moléculas de disolvente quiral

juegan un importante papel en la estereoselectividad de la enzima. Esto es la (+)S-carvona mantiene la S-estereopreferencia observada en los disolventes aquirales mientras la (-) R-carvona cambia la enantioselectividad a largos tiempos de reacción (16) (Figura 3).

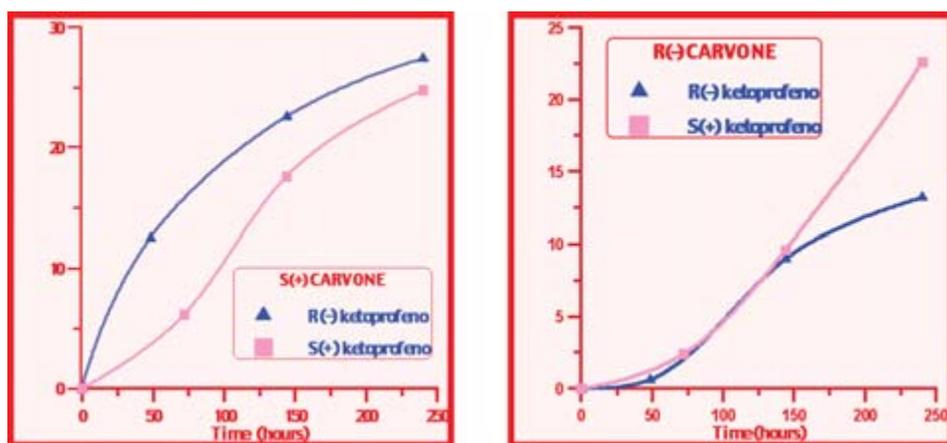


FIGURA 3. *Esterificación de (+)S-ketoprofeno y (-)R-ketoprofeno con n-propanol en presencia de (+)S-carvona y (-)R-carvona catalizada por lipasa B de C. antártica.*

Sin embargo uno de los factores que más afecta al rendimiento final de reacción cuando trabajamos en medios orgánicos usando lipasas, es el contenido en agua y más concretamente la cantidad de agua unida a la proteína. Las características de esta agua unida han atraído un gran interés debido a que estas moléculas mantienen la estructura de la proteína en el medio orgánico (17). Esto está apoyado por la idea de que un nivel mínimo de hidratación se requiere para que una enzima sea activa y éste varía con el tipo de enzima como demostramos con la técnica de RMN de agua (18). En el caso de enzimas liofilizadas el agua juega un papel fundamental ya que ayuda a mantener la conformación activa y por otra parte favorece la síntesis frente a la hidrólisis. Dada la necesidad de controlar la cantidad de agua del sistema la determinación del parámetro a_w a partir de la isoterma de adsorción de agua ha dado excelentes resultados (19). Esta se ha de determinar con la lipasa en aire y en el disolvente y por último solo con el disolvente (19). Por otra parte el

valor de log P del disolvente va a condicionar enormemente el reparto de agua entre la enzima y el disolvente. Un ejemplo de lo anteriormente dicho se muestra en la Figura 4 donde se representa la esterificación de (R,S)-ibuprofeno catalizada por lipasa de *C. antártica* inmovilizada. Puede comprobarse como el control del agua añadida inicialmente ejerce un efecto crítico en el transcurso de la reacción (19). La máxima conversión se obtiene a $a_w=0,85$ que es el valor de equilibrio obtenido a partir de la isoterma mientras que a valores superiores o inferiores la conversión baja drásticamente.

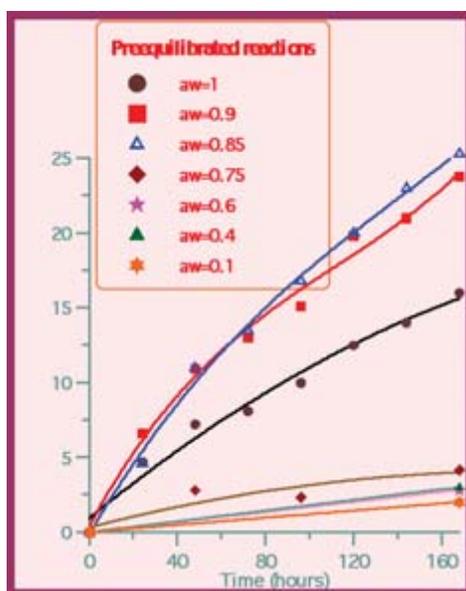


FIGURA 4. *Esterificación de ibuprofeno catalizado por CALB inmovilizado sobre sílice-activada con triclorotriazina. Condiciones 66 mM ácido + 66 mM 1-propanol. 37° C; 300 rpm; 200 mg de derivado/ml isoctano (15.6 mg SP525/g derivado).*

2.6. Efecto de los aditivos como agentes estabilizantes de enzimas.

Las enzimas comerciales de *C. rugosa* se encuentran estabilizadas con lactosa que juega un papel muy importante como reservorio de

agua (20). El porcentaje de agua asociada a la superficie de la enzima puede ser modificada por la presencia de aditivos. A continuación mostramos el efecto que tiene sobre la actividad enzimática la adición de dextransos de diferente peso molecular a una preparación comercial de lipasa de *C. rugosa* a la que previamente se había eliminado la lactosa por diálisis, y en la que la cantidad de proteína permanece prácticamente constante en todas las preparaciones. En la Figura 5 se emplean 5 microlitros de agua por gramo de dextrano. En cuanto a la velocidad de reacción esta se incrementa notablemente en todos los casos. Las velocidades de reacción de los derivados preparados con dextransos son superiores en todos los casos respecto de la enzima comercial y la enzima semipurificada sin lactosa (21).

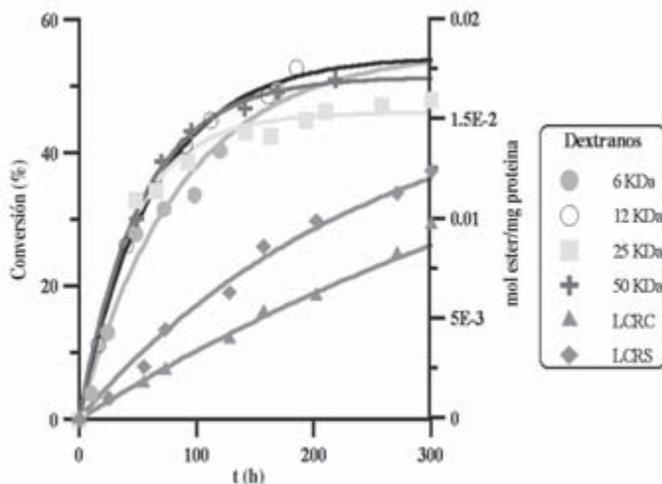


FIGURA 5. Esterificación del ácido $(R,S)2-(4-sobutilfenil)propiónico$ con $n-propanol$ catalizado por lipasa de *C. rugosa* estabilizada con dextransos de diferente peso molecular ($5\mu l$ de agua/mg de preparado).

3. BIOTRANSFORMACIONES CATALIZADAS POR ENZIMAS

Una de los problemas mas importantes que se pueden presentar a las generaciones futuras es la escasez de alimentos debido a la disminución de las superficies de cultivo y al aumento de la población. Las proteínas procedentes de organismos unicelulares, espe-

cialmente levaduras (single cell protein, SCP) podrían utilizarse para complementar y equilibrar ciertas dietas, tradicionalmente pobres en proteínas. Además de los problemas técnicos que conlleva la extracción de la proteína, la principal dificultad que impide la generalización de la utilización de concentrados de proteínas de levadura y otros microorganismos en alimentación humana es su alto contenido en ácidos nucleicos (hasta un 20%). La ingesta prolongada de estos produciría un aumento en el contenido plasmático los cuales serían metabolizados a ácido úrico poco soluble a los pHs de los fluidos corporales y con mala excreción por el riñón. De los métodos existentes el más interesante desde el punto de vista industrial podría ser la utilización de nucleasas exógenas, pues conducen a procesos de hidrólisis de ácidos nucleicos a temperatura ambiente y sin alteración de las proteínas.

La hidrólisis de las SCP se llevó a cabo utilizando derivados inmovilizados de nucleasas. Se utilizaron tres fuentes de *Saccharomyces cerevisiae*, dos de ellas comerciales MC 40, YSC y la tercera, ECC, proveniente de una industria cervecera (22).

Como se ve de los datos de la Tabla 7 en los tres casos se redujo el porcentaje de ácidos nucleicos a valores inferiores al 0.5 % perfectamente tolerables por el ser humano con una pérdida de proteína media del 6%.

TABLA 7. *Eliminación del contenido de ADN y ARN en SCP utilizando nucleasas inmovilizadas.*

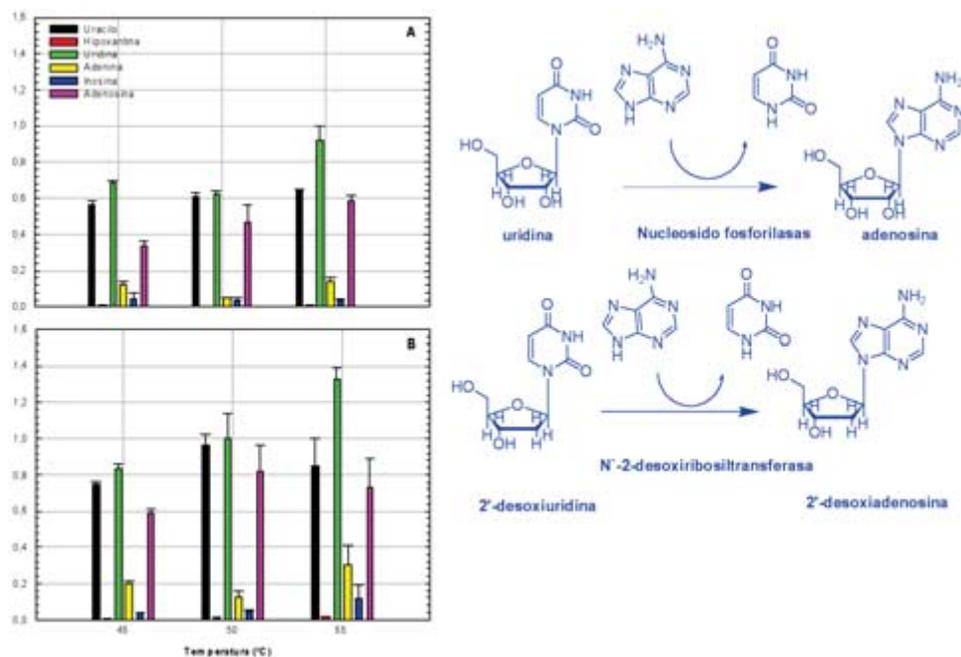
SCP	Relación inicial ácido nucleico/proteína (%)	Total hidrolizado		Relación final ácido nucleico/proteína (%)	Pérdida de proteína (%)
		ADN	ARN		
MC-40	4,2	97	98	0,13	5
YSC	3,0	99	89	0,46	11
ECC	0,7	99	69	0,16	2

4. BIOTRANSFORMACIONES CATALIZADAS POR CÉLULAS ENTERAS

4.1. Síntesis en un solo paso de nucleósidos.

Los análogos de nucleósidos son una familia de compuestos con diferentes actividades farmacológicas entre las cuales destacan su actividad como agentes antivirales, antitumorales y como moléculas inmunosupresoras. Al ser moléculas lábiles, polifuncionales y quirales su síntesis química requiere de multitud de pasos, incluidos los de protección-desprotección. En 1999, Utagawa (23) presentó un proceso enzimático que ocurría en un solo paso utilizando las nucleósido fosforilasas o las N-desoxiribosiltransferasas. Estas enzimas son intracelulares y multiméricas por lo cual el proceso de síntesis se realiza con células enteras. El principal problema reside en que se ha de trabajar a $T > 60^{\circ} \text{C}$ para evitar la acción de la adenosín deaminasa que descompone los nucleósidos de 6-amino purina (24).

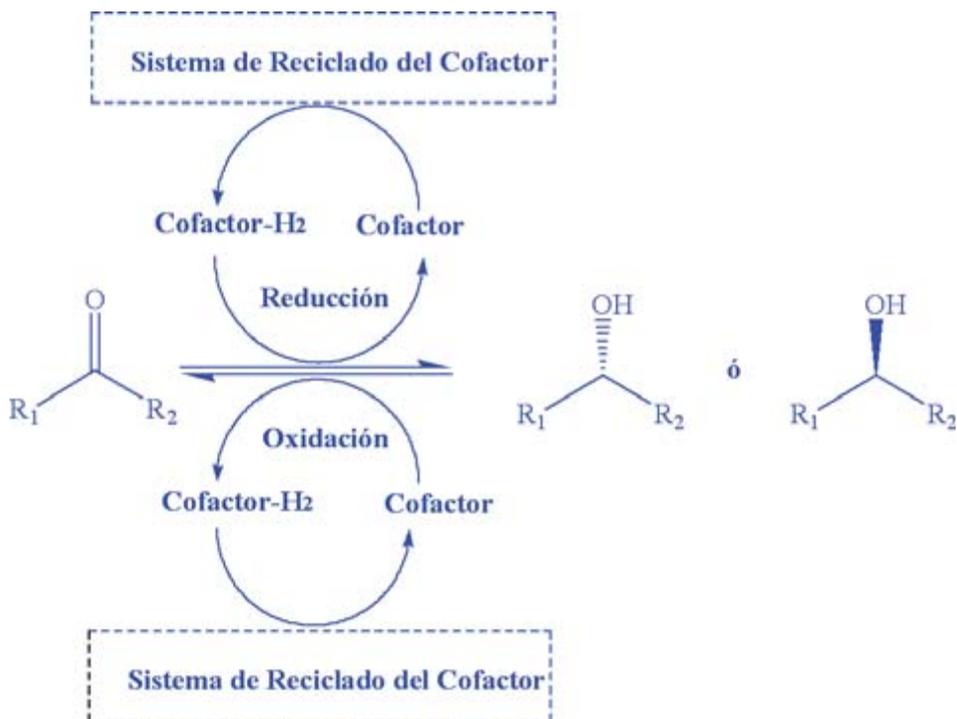
Para encontrar nuevos microorganismos que evitaran este problema se han realizado una serie de búsquedas taxonómicas de bacterias de distintas colecciones habiéndose seleccionado una serie de cepas interesantes utilizando como reacciones test la síntesis de adenosina a partir de uracilo y adenina (microorganismos productores de nucleósido fosforilasas) y la síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxiuracilo y adenina (2'-deoxiribosiltransferasas) tal y como se muestra en el esquema. En la Figura 6 se muestra el efecto de la temperatura sobre la reacción de biosíntesis de adenosina catalizada por bacterias productoras de nucleósidos (A), *B. atrophaeus* (CECT 4071) y (B) *X. translucens* (CECT 4643). Los valores representan el promedio de tres experimentos (25). Las condiciones de reacción fueron: relación molar de sustratos = 3 (15 mM de uridina como donador de ribosa y 5 mM de adenina como aceptor, ambos disueltos en tampón fosfato de potasio de 25 mM (pH=7)), velocidad de agitación 200 r.p.m y 1 hora de reacción.



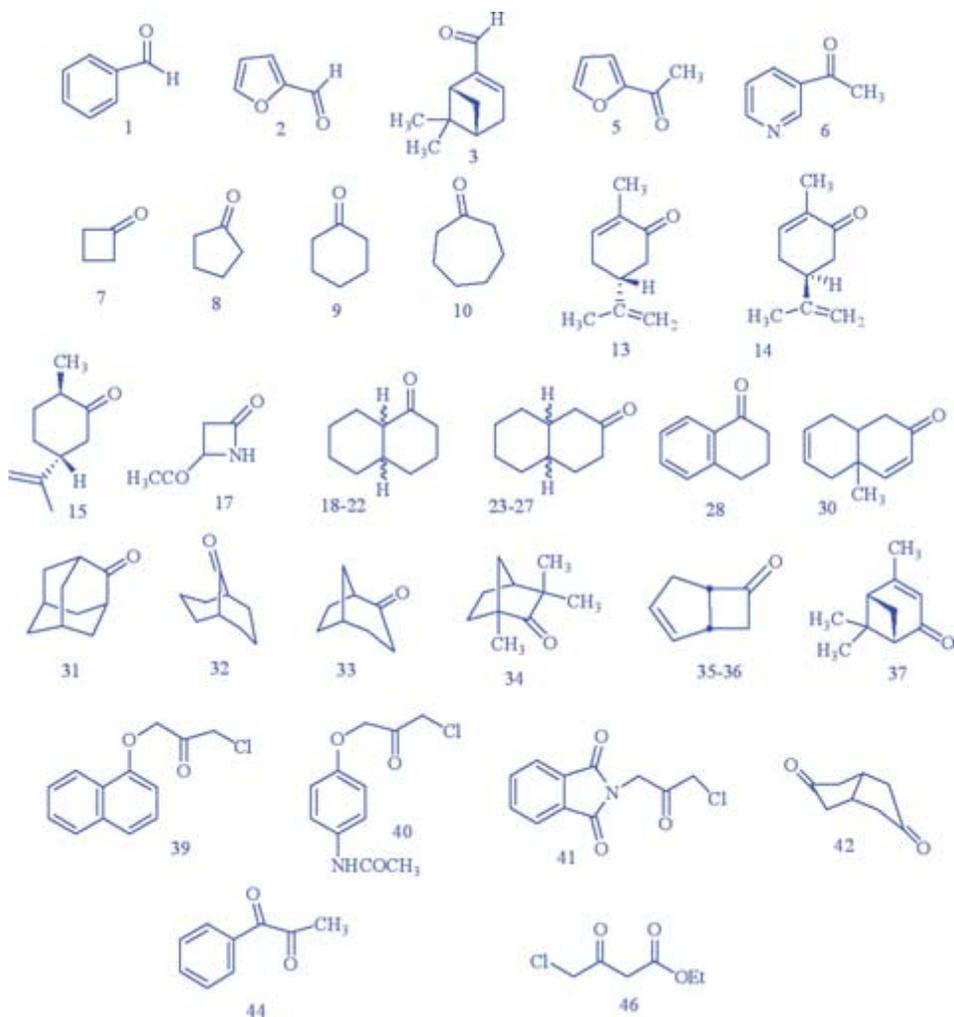
4.2. Reducción estereoselectiva de cetonas

Otras enzimas muy interesantes y de gran proyección industrial son las alcohol deshidrogenadas (ADH) que catalizan las reacciones red-ox y que son enzimas intracelulares. Estas enzimas tienen gran número de aplicaciones en el campo de las Biotransformaciones. El proceso permite la creación de alcoholes homoquiales de gran interés como intermedios de síntesis. Al ser enzimas intracelulares, dependen de una coenzima como NAD(P)H, PPQ, etc. que se consume en cantidades equimoleculares respecto al sustrato a reducir. Esto implica que la regeneración de la coenzima hace al proceso económicamente inviable con enzimas libres sin la regeneración del cofactor (el precio aproximado de un mol de NADH es de 3.000\$ USA y el de un mol de NADPH 25.000\$ USA).

Es por ello por lo que se utilizan células enteras como biocatalizadores ya que éstas poseen sistemas para la regeneración de la coenzima. El único problema existente es que dentro de las células suele haber más de una enzima que cataliza el proceso, obteniéndose en algunos casos bajos e.e. La reacción se puede escribir:



Para aislar nuevas ADHs se realizó una búsqueda taxonómica de microorganismos que presentaran una buena actividad enzimática en la reducción de ciclohexanona, que se tomó como reacción test. Se seleccionaron en un primer estadio 31 cepas y finalmente se seleccionaron después de un *screening* secundario tres hongos filamentosos: *Gongronella (absidia) butleri*, *Monascus kaoliang*, y *Diplogelasinospora grovesii*, una levadura *Schizosaccharomyces octosporus*, y una levadura fungiforme *Geotrichum candidum*, caracterizados por primera vez como productores de ADHs (26-28). Estos microorganismos son capaces de reducir cetonas hidrófobas como las indicadas en el Esquema siguiente y en la Tabla 8 (29).



Una de las contribuciones principales del grupo, en el campo de las Biotransformaciones catalizadas por células enteras, ha sido la introducción de la metodología CoMFA para predecir la actividad de un biocatalizador frente a un sustrato o la estereoselectividad del proceso de reducción (29, 30). Los fundamentos de la metodología están descritos en la bibliografía QSAR (31, 32) pero no habían sido aplicados con éxito en el campo de las biotransformaciones.

El modelo CoMFA desarrollado se basa en considerar la conversión o el exceso enantiomérico como variables independientes frente

a una alineación predeterminada de los confórmers de mínima energía de los sustratos (Figura7).

TABLA 8. **Resultados obtenidos en la reducción de distintas cetonas a sus alcoholes correspondientes**, usando los mejores microorganismos seleccionados (29) [Cetona]=2.5 mM, 250 rpm, 28° C, 48 h.

Cetona	<i>D. grovesii</i>	<i>G. butleri</i>	<i>S. octosporus</i>	<i>G. candidum</i>
Benzaldehído	0	95	98	0
2-furaldehído	98	98	0	0
<i>R</i> -mirtenal	73	90	42	0
Tetradecanal	0	0	0	0
2-acetilfurano	0	11	39	80
2-acetylpiridina	14	13	73	0
Ciclobutanona	77	67	10	0
Ciclopentanona	14	33	2	0
Ciclohexanona	85	96	87	36
Cicloheptanona	9	26	8	0
Ciclooctanona	0	18	0	0
Ciclododecanona	0	25	0	0
4 <i>R</i> -carvonea	90	87	65	77
4 <i>S</i> -carvonea	93	51	60	82
(1 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-dihidrocarvonea	79	88	75	76
2-azetidina	10	6	0	0
4-acetoxi-azetidina-2-ona	12	0	0	0
1-decalonea	90	65	34	76
(4 <i>aR</i> , 8 <i>aR</i>)- <i>cis</i> -1-decalona	43	36	3	86
(4 <i>aS</i> , 8 <i>aS</i>)- <i>cis</i> -1-decalona	86	77	11	90
(4 <i>aR</i> , 8 <i>aS</i>)- <i>trans</i> -1-decalona	96	71	8	41
(4 <i>aS</i> ,8 <i>aR</i>)- <i>trans</i> -1-decalona	96	86	14	92
2-decalonea	65	57	75	72
(4 <i>aR</i> ,8 <i>aS</i>)- <i>cis</i> -2-decalonea	81	0	86	20
(4 <i>aS</i> ,8 <i>aR</i>)- <i>cis</i> -2-decalona	24	65	90	26
(4 <i>aR</i> ,8 <i>aR</i>)- <i>trans</i> -2-decalona	70	26	72	25
(4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i>)- <i>trans</i> -2-decalona	73	12	18	5
α -tetralona	0	6	9	5
4-metil-deca-2-en-1-ona	3	1	0	0
4 <i>aR</i> -metil-deca-2-ona	3	2	0	0
2-adamantanona	58	98	22	12
biciclo-[3.3.1]-nonan-9-ona	39	95	32	16
biciclo-[3.2.1]-octan-2-ona	74	32	10	0
<i>R</i> -fenchona	0	0	0	0
<i>cis</i> -biciclo-[3.2.0]-hept-2-en-6-ona	20	44	24	0

Cetona	<i>D. grovesii</i>	<i>G. butleri</i>	<i>S. octosporus</i>	<i>G. candidum</i>
Trans-biciclo-[3.2.0]-hept-2-en-6ona	1	7	4	0
Verbenona	0	0	0	0
2-aza-biciclo[2.2.1]hept-5-en-3-ona	0	2	0	0
1-cloro-3-(1-naftiloxi)-propan-2-ona	99	0	93	9
N-[4-(3-cloro-2-oxo-propiloxi)-fenil]acetamida	99	98	0	0
1-cloro-3-(ftalimidil)-propan-2-ona	68	0	0	0
Cis-biciclo[3.3.0]octan-3,7-diona	0	0	0	0
acetil-ferroceno	0	0	0	0
1-fenyl-propan-1,2-diona	93	2	0	0
Colest-3-en-2-ona	0	0	0	0
4-cloro-etil-aceto-acetato	0	95	98	0

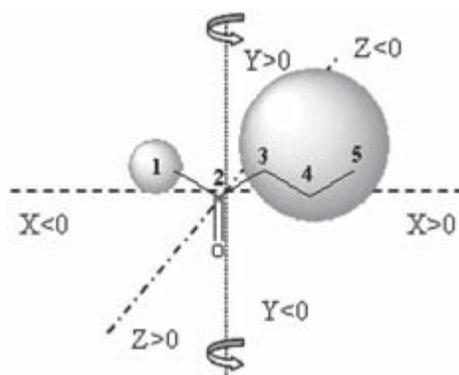


FIGURA 7. Modelo de alineamiento de los conformeros de mínima energía de las cetonas de la Tabla 8 utilizados en el diseño del modelo CoMFA (26).

Una vez realizados los cálculos se obtienen los modelos CoMFA como los indicados, a modo de ejemplo, en la Figura 8. Este modelo puede considerarse como el complemento del centro activo desconocido de la ADH, cuya interpretación nos ayuda a explicar los resultados obtenidos en la Tabla 8.

En la Figura 8 se muestran los modelos CoMFA de *G. candidum* y *S. octosporus*. El código de colores es el que sigue: i) *Zonas de bajo impedimento estérico* (verde). Son zonas donde la presencia de restos químicos del sustrato favorece la interacción enzima-sustrato. ii) *Zonas de alto impedimento estérico* (amarillo). Son zonas donde la presencia de grupos en el sustrato disminuye la afinidad de la ADH por el sustrato. iii) *Zonas electrostáticas*: rojas, donde una elevada densidad electrónica favorece la interacción, y azules, donde una elevada densidad de carga negativa desfavorece la interacción (29).

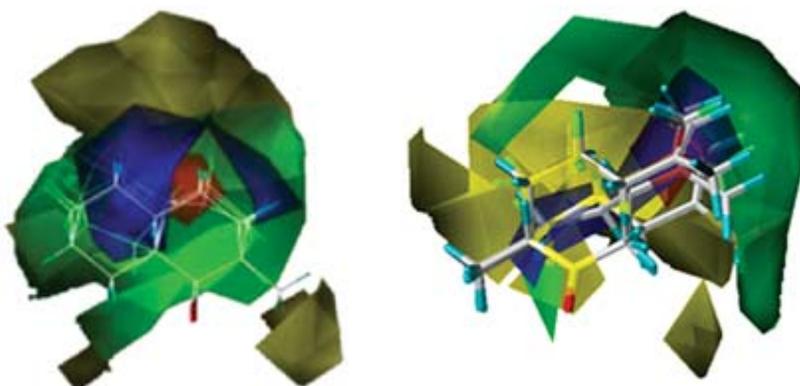
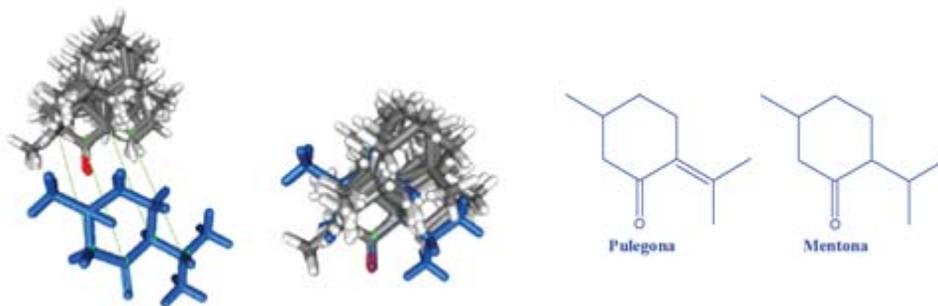


FIGURA 8. Modelos CoMFA de las ADHs de *G. candidum* y *S. octosporus*.

La principal ventaja de nuestra metodología para modelizar el centro activo de una enzima desconocida es que estamos ante un método puramente químico que permite predecir, sin conocer la estructura primaria de la enzima y sin siquiera haberla aislado. Por otro lado, nuestra metodología ha sido utilizada en el grupo del Dr. Reetz para sus estudios de evolución dirigida (32, 33). Finalmente los modelos CoMFA son predictivos como se demuestra por ejemplo en el caso de la reducción de la pulegona y de la mentona (28).

El alineamiento de los sustratos según el modelo (Figura 7) muestra que mientras la mentona se alinea perfectamente (Figura 9) y por eso se reduce en un 52% dando solo el mentol como alcohol predicho, la pulegona no se reduce. Ello se debe a que el doble enlace se coloca en la zona electrostática donde la presencia de alta densidad electrónica desfavorece el reconocimiento del sustrato por parte de la enzima como puede apreciarse en la figura.

FIGURA 9. **CoMFA. Alineamiento de A) mentona y B) pulegona** en el modelo de ajuste de los sustratos seleccionados en el modelo CoMFA (29).



Usando este modelo hemos podido explicar por ejemplo, los resultados de Ni y Yu (34) que indican que la acetofenona (50 mM) y la 2-bromo-acetofenona (2 mM) se reducen por *Rhodotorula* sp AS 2241 dando (*S*)-1-feniletanol (34,7% rendimiento, > 99.5% e.e) y (*R*)-2-bromo-1-feniletanol (20% rendimiento > 99% e.e.). Este y otros resultados indican una conservación evolutiva en el centro activo de las ADHs.

Hay muchas aplicaciones sintéticas de la reducción estereoselectiva de cetonas que tienen interés para la industria farmacéutica. Un ejemplo representativo es la reducción estereoselectiva de 3-halo-1-ariloxi 2-propanonas (35-37), precursores de los bloqueantes β -adrenérgicos.

La enantioselectividad depende del microorganismo y el rendimiento del estado fisiológico de las células. Los mejores resultados se obtuvieron con células en estado de no crecimiento como se muestra en la Tabla 9 mientras que las células liofilizadas no dieron actividad. Los mejores e.e. se obtuvieron con las levaduras *Y. lipolytica* y *P. mexicana*, así como con el hongo *D. grovesii*. Estos microorganismos conducen a mejores rendimientos y e.e. que la levadura de panadero de Sigma en las mismas condiciones experimentales (34, 36). *Y. lipolytica* CECT 1240 y *P. mexicana* CECT 11015 producen los enantiómeros opuestos con buenos rendimientos y e.e. Así *P. mexicana* conduce al isómero-*R* usado en la preparación del β -bloqueante adrenérgico de configuración *S* (activo farmacológicamente) mientras *Y. lipolytica* produce la *S*-halohidrona que daría el *R*-isómero del

bloqueante adrenérgico sin actividad farmacológica. Este resultado es muy interesante porque las ADHs siguen generalmente la regla de *Prelog* dando el alcohol-S y muy pocas ADHs dan el alcohol-R (*anti-Prelog*) como es el caso de *P. mexicana*.

Para facilitar el escalado del proceso, es necesaria la inmovilización de las células para una vez acabada la reacción separar el biocatalizador del medio de reacción por simple filtración. En esta línea se han inmovilizado algunas de las levaduras descubiertas por nosotros, activas en la reducción de halo-cetonas. La inmovilización se ha realizado por atrapamiento en agares o en agarosas, de distinto origen (38).

Más novedoso ha sido el desarrollo de una nueva metodología de inmovilización de hongos filamentosos en espumas de poliuretano (39). El proceso desarrollado es simple y se realiza sembrando esporas del hongo en una suspensión de la espuma previamente sumergida en el medio de cultivo. En la Figura 10 se muestra el aspecto de la espuma de poliuretano antes y después de la inmovilización del hongo *M. kaoliang*.

TABLA 9. Reducción de 1-cloro-3-(1-naftiloxi)-2-propanona usando diferentes microorganismos (35).

Microorganismo	Condiciones de fermentación ^a Células en reposo ^b					
	Rend. (%)	Enantioipre ^d	Rend. (%)	e.e. ^c (%)	Enantioipre ^d	e.e. ^c (%)
<i>M. kaoliang</i>	55	<i>R>S</i>	1	5	<i>R>S</i>	10
<i>N. hiratsukae</i>	39	<i>R>S</i>	6	10	<i>R>S</i>	90
<i>Y. lipolytica</i> CECT 1240	20	<i>S>>R</i>	99	87	<i>S>>>R</i>	99
<i>P. mexicana</i> CECT 11015	19	<i>R>>S</i>	85	85	<i>R>>>S</i>	95
<i>S. bayanus</i> CECT 1969	15	<i>R>S</i>	52	40	<i>R>>S</i>	87
<i>S. cerevisiae</i> (Type II)	12	<i>S>R</i>	70	30	<i>S>>R</i>	70
<i>S. cerevisiae</i> CECT 1317	13	<i>R>S</i>	70	27	<i>R>S</i>	71

^a Reducciones fueron realizadas con células en crecimientos (48 hrs.).

^b Reducciones fueron realizadas usando 0,19 mmol de sustrato y 4 g de sacarosa en 25 mL de medio reacción (0.1M tampón fosfato, pH 8.0). Incubaciones se realizaron a t 30° C durante 48 h.

^c Conversion Molar y e.e. determinados por HPLC quiral.

^d Configuración absoluta de la halohidrina fue determinada por el valor de la rotación específica.

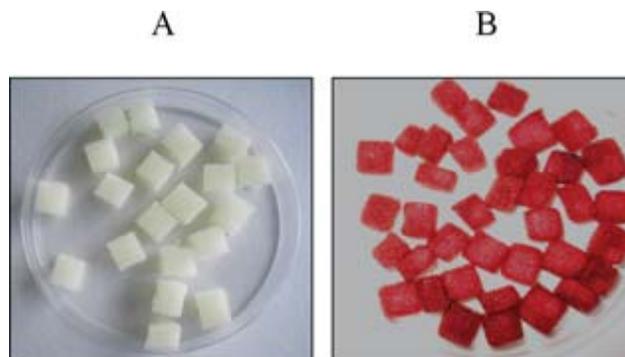


FIGURA 10. *Espumas de poliuretano A) antes y B) después de la inmovilización del hongo M. kaoliang.*

Puede observarse claramente que la actividad del hongo inmovilizado en espumas de poliuretano es muy similar a las del hongo libre en estado de no crecimiento, por lo que se podría decir que las espumas de poliuretano constituyen un buen soporte para este hongo ya que el proceso de inmovilización no disminuye su actividad catalítica como ocurría en el caso del agar (39) (Figura 11).

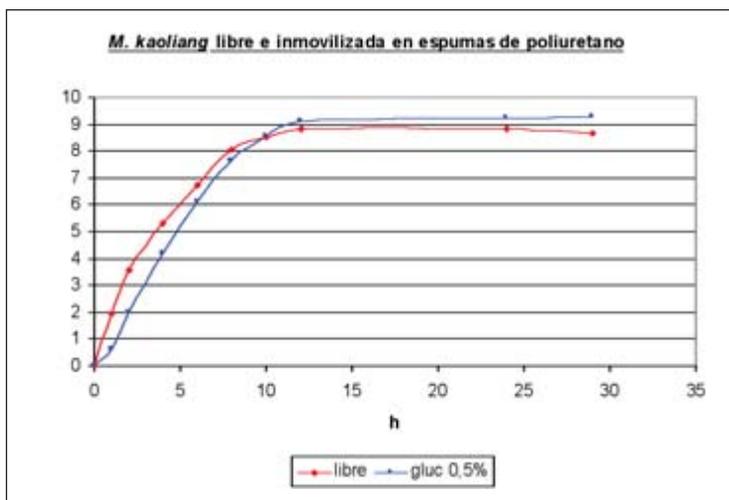


FIGURA 11. *Comparación de la actividad de M. kaoliang libre e inmovilizado en espumas de poliuretano en la reducción de ciclohexanona. Crecimiento del hongo 7 días. [ciclohexanona] = 10 mM, T = 28° C; 200 rpm., V = 100 ml tampón fosfato pH 6,5.*

Esto se debe atribuir a que el hongo está adherido a la superficie externa de las espumas y no presenta problemas difusionales por encontrarse expuesto directamente al medio de reacción como en el caso de las hifas libres en estado de no crecimiento, hecho que se pudo corroborar con las microfotografías de microscopía electrónica (Figura 12). Puede verse que las hifas del hongo se unen a la espuma de poliuretano. El hongo sigue manteniendo su capacidad reproductora como se deduce de la aparición de ascocarpios en este estado. Un aumento en el número de aumentos nos permite observar las ascas del ascomiceto a la izquierda sobre una parte de la espuma (Figura 12) y una cadena de conidios (Figura 13), a la derecha de la foto en la parte superior.

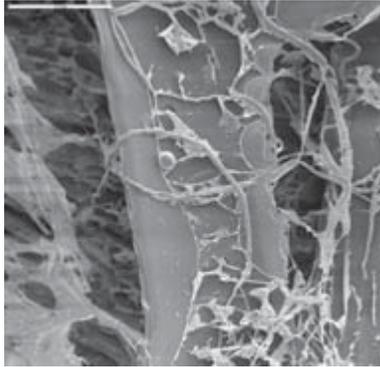


FIGURA 12. *M. kaoliang* inmovilizado en espumas de poliuretano. Microfotografía electrónica de barrido a baja temperatura (500 aumentos).

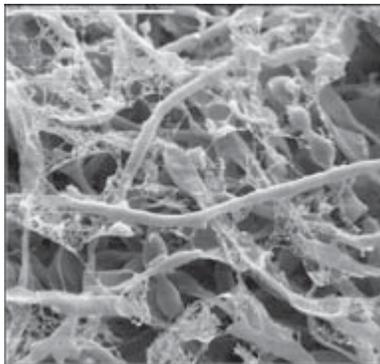


FIGURA 13. *M. kaoliang* inmovilizado en espumas de poliuretano. Microfotografía electrónica de barrido de baja temperatura. (2.000 aumentos).

Este catalizador es activo y puede ser reutilizado al menos 21 veces en la reducción de ciclohexanona usando *iso*-propanol como segundo sustrato para regenerar la coenzima NADH (Figura 14). Puede observarse que el catalizador obtenido es más activo y reutilizable que los obtenidos en agar o en agarosa al no presentar restricciones difusionales (39).

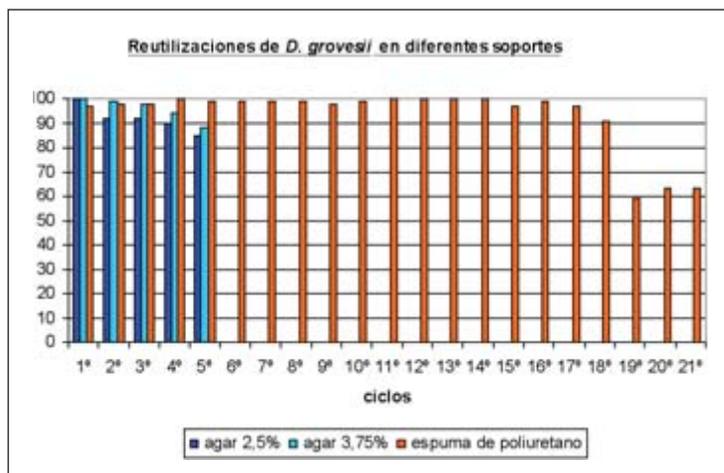


FIGURA 14. *Reutilización de D. grovesii* inmovilizado en diferentes soportes en la reducción de ciclohexanona. *iso*-PrOH como segundo sustrato.

4.3. Oxidación de alcoholes utilizando alcohol deshidrogenadas.

La oxidación de alcoholes primarios y secundarios catalizada por deshidrogenasas para dar lugar a aldehídos o cetonas son reacciones que no aparecen con frecuencia en la bibliografía (40, 41) al contrario que las reacciones de reducción, ya que este tipo de reacciones no suelen presentar grandes problemas cuando se abordan por métodos tradicionales de Química Orgánica.

Las razones que han limitado hasta ahora el uso de las deshidrogenasas en el proceso han sido:

i) Las oxidaciones utilizando ADH NAD(P) dependientes son termodinámicamente desfavorables. Como consecuencia el reciclado

del cofactor se vuelve complicado, siendo esta la razón por la que la mayoría de los ensayos descritos en bibliografía se realizan con células enteras. Se encuentra descrito el uso de cepas de *Acetobacter* (40, 41) y *Gluconobacter* (42) entre otras.

ii) Debido a que los aldehídos o cetonas formados están unidos de un modo más fuerte a la zona hidrofóbica del sitio activo de la enzima que cualquier alcohol, la inhibición por acumulación de producto suele ser un fenómeno común en este tipo de reacciones (43).

iii) La oxidación de alcoholes normalmente transcurre de un modo más favorable a elevados pH. En estas condiciones los cofactores y los productos (particularmente los aldehídos) son inestables.

Dentro de una colaboración con el grupo del Dr. Molinari hemos llevado a cabo la oxidación de alcoholes primarios a aldehídos sin producción de ácidos carboxílicos (44, 45). Como ejemplo diremos que se han obtenido conversiones de 2-feniletanol en 2-fenilacetaldehído próximas al 60% empleando células de *Acetobacter aceti* inmovilizadas en agarosa y en poliacrilamida (45).

La oxidación de alcoholes secundarios racémicos con fines de lograr la desracemización se ha realizado con una serie de microorganismos descritos por el grupo por primera vez (Tabla 10). En esta tabla se comparan los resultados obtenidos con los microorganismos en las condiciones de crecimiento y reposo y con las células liofilizadas.

TABLA 10. *Actividad comparada de los microorganismos seleccionados, en diferentes estados fisiológicos (46).*

<i>Microorganismo</i>	Código	Ferment. (% X)	No Crecim. (% X)	Liofilizada (% X)
<i>Williopsis californica</i>	CBS 2158	94	74	12
<i>Williopsis saturnus</i>	NCYC 23	78	50	15
<i>Fellomyces sp.</i>	CBS 8616	61	41	9
<i>Pachysolen tannophilus</i>	NCYC 1597	60	53	13
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CBS 2896	56	28	6
<i>Arthroascus fermentans</i>	CBS 7830	56	36	11
<i>Tetracladium setigerum</i>	IMI 94061	23	15	4
<i>Coniochaeta velutina</i>	CBS 981.68	23	20	9

Puede observarse que las células liofilizadas no son activas en el proceso. Esto puede deberse a que el periodo de liofilización empleado de 72 horas es demasiado largo como para mantener la estructura de las enzimas red-ox intracelulares de nuestros microorganismos. Otra posibilidad es que dado que el paso limitante de la velocidad de reacción es el transporte a través de las membranas (39), la liofilización debe alterar las membranas de manera notable limitando el proceso de difusión del ciclohexanol o del oxígeno encargado de regenerar el NAD(P)⁺ (47, 48).

Las células en estado de no crecimiento conducen a menores rendimientos en cetona aislada (previa extracción del medio con acetato de etilo) que el proceso realizado con las células en estado de crecimiento. Los mejores resultados de oxidación se consiguieron con levaduras del género *Williopsis*, lo que resulta de gran interés ya que esta capacidad de oxidar alcoholes, en el caso del género *Williopsis*, no aparece descrita en la bibliografía hasta nuestro trabajo (46). Las únicas cepas con las que se consiguieron al menos 50% de conversión de sustrato en condiciones de reposo son *W. californica*; *W. saturnus* y *P. tannophilus*. Estas levaduras se inmovilizaron en cuatro soportes por diferentes métodos inmovilización (49):

- a) método de atrapamiento en geles: soportes ensayados, agar de *Pterocladia* A27/03 (2.5% p/v y 3.75% p/v); y poliacrilamida 15% p/v,
- b) método de adsorción: soporte ensayado, espumas de poliuretano,
- c) método de enlace covalente: soporte ensayado, resina Lewatit.

Cabe destacar que con los soportes, espumas de poliuretano y resina Lewatit, no se obtuvieron resultados satisfactorios en el proceso de inmovilización de estas levaduras. En la Tabla 11 se muestran de manera comparativa los resultados obtenidos para la reacción de oxidación de ciclohexanol.

En esta tabla se puede observar en todos los casos que los derivados inmovilizados requieren tiempos largos de reacción comparados con las células libres recogidas a 48 horas. Esto indica una clara influencia del proceso de inmovilización en la actividad catalítica del microorganismo.

TABLA 11. *Influencia del soporte en la productividad. T = 28° C, 200 rpm.*

Levadura	Estado	T _{ind} h	[células] ^a 10 ⁶ cel/ml	T _{max} ^b h	X _{max} %	Carga ^c 10 ⁶ cel/ gcat	Prod* 10 ⁶ mM/(h . millón cell)
<i>P. tannophilus</i>	Fermentación	0	1.374	96	99		1,50
	No crecimiento	0	1.346	131	89		1,01
	Agar 2,5%	0	1.502	262	73	1.679	0,37
	Agar 3,75%	0	1.384	355	75	1.682	0,31
	Poliacrilamida 15%	30	1.554	468	83	1.746	0,23
<i>W. saturnus</i>	Fermentación	0	1.431	96	99		1,44
	No crecimiento	0	1.185	38	82		3,64
	Agar 2,5%	0	1.502	206	72	1.725	0,47
	Agar 3,75%	0	1.346	247	61	1.641	0,37
	Poliacrilamida 15%	30	1.521	433	100	1.691	0,30
<i>W. californica</i>	Fermentación	0	1 256	120	99		1,32
	No crecimiento	0	1 124	145	95		1,17
	Agar 2,5%	0	1 549	196	71	1.808	0,47
	Agar 3,75%	0	1 426	280	71	1.743	0,36
	Poliacrilamida 15%	0	1 658	637	32	1.863	0,06

^a Concentración de células del cultivo.

^b Tiempo al que se alcanza la máxima conversión.

^c carga del catalizador expresada en 10⁶ cel/g. cat húmedo.

A fin de comparar la actividad específica de los catalizadores inmovilizados con la obtenida con las células en condiciones fermentativas o de «no crecimiento» se determinaron los valores de productividad (P). En todos los casos al aumentar la concentración de agar (mayor reticulación), la productividad disminuye debido a que aumenta el tiempo de reacción. No obstante, las conversiones obtenidas son similares o ligeramente inferiores en el caso del agar (3,75%) comparadas con el agar (2,5%).

La inmovilización en poliacrilamida conduce a catalizadores activos en el caso de *P. tannophilus* y *W. saturnus*, aunque necesitan de tiempos de inducción (30 horas) para iniciar la biotransformación. Se alcanzan buenas conversiones y sus productividades son similares a las obtenidas con agar de *Pterocladia* (A27/03) (Figura

ra 13), sin embargo, sus tiempos de reacción son muy elevados, lo que la hace poco interesante como soporte para estas levaduras (49).

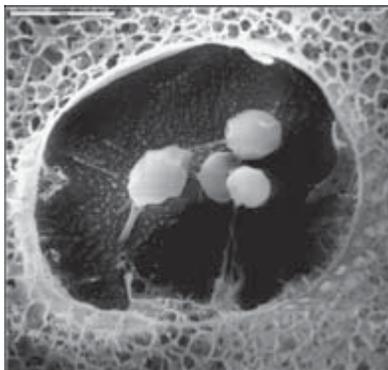


FIGURA 13. *Williopsis californica* inmovilizada en agar de *Pterocladia*. Microfotografía electrónica de barrido a baja temperatura (5.000 aumentos).

En el caso de *W. californica*, donde la ADH parece ser menos abundante en condiciones estacionarias que en las otras cepas, es el microorganismo más sensible a este proceso de inmovilización, así tenemos que es el único que no presenta tiempo de inducción al estar inmovilizado en poliacrilamida, sin embargo, la conversión es muy baja (32%) a pesar de la gran cantidad de biomasa. Esto quizás deba atribuirse a una destrucción de la ADH intracelular por efecto de la polimerización radicalica.

5. LAS BIOTRANSFORMACIONES DENTRO DE LA QUÍMICA SOSTENIBLE Y SU IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

Las diversas formas de contaminación ambiental, así como los graves accidentes ocurridos en diversas plantas químicas de todo el mundo han creado una conciencia de que la Química es generadora de contaminación lo cual ha ocasionado un rechazo de la misma que se muestra además en la disminución del interés de los alumnos universitarios por los estudios de Química en todas su vertientes. Este sentimiento *anti*-Química es más bien visceral pues en un diálogo social más reposado es evidente la percepción positiva de los

grandes beneficios originados por la Química en el campo del diseño de fármacos, de nuevos materiales e incluso en la lucha contra la contaminación producida por otras industrias distintas de la Química como son la del automóvil, las centrales térmicas, la polución debida al aumento de las ciudades, etc.

Todo lo expuesto hizo que a principios de los años setenta del siglo pasado una serie de investigadores en USA y en UK inicialmente (51, 52) y más tarde en Italia (53), España (54), etc. hayan desarrollado un cuerpo de doctrina que ya ha cristalizado tanto en aspectos de desarrollo de nuevas metodologías de síntesis respetuosas con el medio ambiente como en el diseño de las nuevas plantas industriales (55, 56) y que ha sido recogido por las autoridades de la UE, tan sensibilizadas a los problemas medioambientales por sus opiniones públicas, en una serie de normativas de obligado cumplimiento relacionadas con la regulación en el manejo y utilización de los productos químicos reflejadas en las normativas REACH, VOC, SEVESO. Este cuerpo de doctrina se resume en los doce principios de la Química Sostenible (54) cuya aplicación a la síntesis química va a revolucionar el desarrollo futuro de la síntesis orgánica así como su forma de explicarla y su desarrollo industrial tanto en la Industria Farmacéutica como en la de la Química Fina.

Es bien conocido que a pesar del pequeño tonelaje de las plantas que se dedican a la producción de intermedios de síntesis o de fármacos, son las industrias más contaminantes, estimándose que por cada kilogramo de producto acabado, la Industria Farmacéutica produce 200 kg de residuos potencialmente contaminantes (55). De ellos la parte principal lo constituyen los disolventes usados en la síntesis. La moderna normativa de la UE hace que ya la Industria Farmacéutica deba abandonar, para cumplir las nuevas normativas legales de la UE (REACH, VOC) haya de abandonar disolventes tan utilizados en la síntesis orgánica tradicional como son el CH_2Cl_2 (hepatotóxico y poco biodegradable), el hexano (inflamable) etc. así como los catalizadores tradicionales basados en metales de transición de difícil eliminación del medio ambiente. Los disolventes deberán ser sustituidos por disolventes no contaminantes o derivados de fuentes renovables (49-51) y los catalizadores metálicos por otras más eficaces y menos contaminantes como son los biocatalizadores —enzimas o células— más selectivos y eficaces que aquéllos.

De todo lo dicho anteriormente puede deducirse la importancia de la Biocatálisis así como de las Biotransformaciones encontrando un amplio campo de acción en la Industria Farmacéutica. Por tanto una de las mayores aportaciones que se espera de la utilización de enzimas y células es que ayude a reducir el impacto de la industria en el medio ambiente, consiguiendo que los procesos industriales sean mucho más eco-eficientes.

En esta línea es donde se enmarca el trabajo de investigación que se desarrolla en el Grupo de Biotransformaciones (con mención de la calidad en la CAM). Para ello no solo hemos trabajado en la investigación aplicada sino que también nos hemos implicado en el campo de la docencia participando en el Doctorado de Calidad Interuniversitario de Química Sostenible y en el Master del mismo nombre y en la transferencia de tecnología a las pequeñas y medianas empresas españolas través del Servicio de Biotransformaciones Industriales del Parque Científico de Madrid.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer de manera muy especial a los doctores que se han formado en el grupo, alumnos colaboradores y alumnos internos la labor realizada, ya que ellos son los artífices de que se lograran muchas veces los objetivos propuestos. Asimismo desean agradecer las colaboraciones que el Grupo de Biotransformaciones ha tenido por parte de investigadores de otros laboratorios como del Instituto de Catálisis, Instituto de Biomedicina (CSIC), Facultad de Ciencias (UAB), Facultad de Ciencias (UAM), Facultad de Ciencias (Universidad de Salamanca), Facultad de Farmacia (UCM) etc., que han permitido desarrollar nuevas líneas de trabajo y abrir nuevos campos de investigación.

5. REFERENCIAS

- (1) BOTT, P.D. (2004) Features, attributes and technology impact in Pharmaceutical Industry of Biotechnology. *Green Chemical Technology*. Edited by Crystal Faraday Partnership. 165-189 Railway Terrace, Rugby, CV21 2HQ, UK.
- (2) CONDEZO, L.A.; FERNÁNDEZ-LUCAS, J. Y SINISTERRA, J.V. Procedimiento para síntesis de nucleósidos mediante la utilización de microorganismos psicófilos y psicrotrofos. Patente Española, solicitud P200400817, PCT/ES2005/00166.

- (3) HAKI, G.D. AND RAKSHIT, S.K. (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 89: 17-34.
- (4) DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P.; XENAKIS, A. AND SINISTERRA, J.V. (2004) *Enz. Microb. Technol.* 35: 277-283.
- (5) RAMOS MARTÍNEZ, J.; SINISTERRA, J.V. AND SÁNCHEZ-MONTERO, J.M. (2003) Esterification and transesterification catalysed by lipases of thermophilic microorganisms using liquid ionic as solvent. 9 th FECS Conference and 2nd SFC meeting on Chemistry and the Environment. Behaviour of Chemicals in the Environment. Olomouc (República Checa).
- (6) RÚA, M.L.; DÍAZ-MAURIÑO, T., FERNANDEZ, V.M.; OTERO, C. Y BALLESTEROS, A. (1993) Purificación and Characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1078: 181-189.
- (7) HERNÁIZ, M.J.; SANCHEZ-MONTERO, J.M. Y SINISTERRA, J.V. (1997) New Differences between Isoenzymes A and B from *Candida rugosa* Lipase. *Biothechnology Letters*. 19: 303-306.
- (8) CHAMORRO, S.A.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; ALCÁNTARA, A.R. AND SINISTERRA J.V. (1998) Treatment of *Candida rugosa* Lipase with short-chain polar organic solvents enhances its hydrolytic and synthetic activities. *Biotechnology Letters*. 5: 499-505.
- (9) CHAMORRO, S.; ALCÁNTARA, A.R.; DE LA CASA, R.M.; SINISTERRA J.V. AND SANCHEZ-MONTERO J.M. (2001) Small Water Amounts Increase the Catalytic Behaviour of Polar Organic Solvents Pretreated *Candida rugosa* Lipase. *Journal Molecular Catalysis B:Enzymatic*. 11: 939-947.
- (10) CÁRDENAS, F.; ÁLVAREZ, E.; DE CASTRO-ÁLVAREZ, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W. AND SINISTERRA J.V. (2001) Screening and Catalytic activity in Organic Synthesis of Novel Fungal and Yeast Crude Lipases. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*. 14: 11-123.
- (11) CÁRDENAS, F.; CASTRO, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; VALMASEDA, M S.; ELSON, E. AND ÁLVAREZ, E. (2001) Screening of Lipase Producing Microorganisms and Preliminary Characterisation of the Lipases in Organic Reactions. *Enzyme and Microbial Technology*. 28: 145-154.
- (12) SÁNCHEZ, A.; FERRER, P.; SERRANO, A.; VALERO, F., SOLÀ, C.; PERNAS, M.; RÚA, M.L.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M.; DE LA CASA, R.M.; SINISTERRA, J.V. AND SÁNCHEZ-MONTERO, J.M. (1999) A Controlled Fed-Batch Cultivation for the Production of New Crude Lipases from *Candida Rugosa* with Improved Properties in Fine Chemistry. *Journal of Biotechnology*. 69: 169-182.
- (13) DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P.; ALCÁNTARA, A.R.; CARBALLEIRA, J.D.; DE LA CASA, R.M.; GARCÍA-BURGOS, C.A.; HERNÁIZ, M.J.; SÁNCHEZ-MONTERO, J.M. AND SINISTERRA, J.V. (2006) *Candida rugosa* lipase: A traditional and complex biocatalyst. *Current Organic Chemistry*. 10: 1053-1066.
- (14) DOMÍNGUEZ DE MARIA, P.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA J.V. AND ALCÁNTARA. A.R. (2006) Understanding *C. rugosa* lipases: an overview. *Biotechnol. Advances*. 24: 180-196.
- (15) HERNÁIZ, M.J.; SANCHEZ-MONTERO J.M. AND SINISTERRA. J.V. (1999) Modification of Purified Lipases from *Candida rugosa* with Polyethylene Glycol: A Systematic Study. *Enzyme Microbial Technology*. 24: 182-190.

- (16) ALCÁNTARA, A.R.; SANCHEZ-MONTERO, J.M. AND SINISTERRA J.V. (2000) Chemoenzymatic Preparation of Enantiomerically Pure S(+)-2-Arylpropionic Acids with Anti-Inflammatory Activity Stereoselective Biocatalysis, Ed. Marcel Dekker. Inc. Chapter 22: 659-702.
- (17) HUNT, N.T.; KATTNER, L.; SHANKS, R.P. AND WYNNE, K. The Dynamics of Water-Protein Interaction Studied by Ultrafast Optical Kerr-Effect Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 129: 2007-2031.
- (18) DOMINGUEZ DE MARIA, P.; ALCÁNTARA, A.R.; CARBALLEIRA, J.D.; DE LA CASA, R.M.; GARCIA-BURGOS, C.; HERNANIZ, M.J.; SÁNCHEZ-MONTERO, J.M. AND SINISTERRA, J.V. (2006) *Candida rugosa* lipase: A traditional and complex biocatalyst. *Current Organic Chemistry.* 10: 1053-1066.
- (19) ARROYO, M.; SANCHEZ-MONTERO, J.M. AND SINISTERRA J.V. (1999) Thermal Stabilization of Immobilized Lipase B from *Candida antarctica* on Different Supports: Effect of Water Activity on Enzymatic Activity in Organic Media. *Enzyme and Microbial Technology.* 24: 3-12.
- (20) SÁNCHEZ-MONTERO, J.M.; HAMON, V.; THOMAS, D. AND LEGOY, M.D. (1991) Modulation of lipase hydrolysis and synthesis reactions using carbohydrates. *Biochim. Biophys. Acta.* 1078: 345-350.
- (21) DE LA CASA, R.; GUISÁN, J.M., SANCHEZ-MONTERO, J.M. AND SINISTERRA. J.V. (2002) Modification of the activities of two different lipases from *Candida rugosa* with dextrans. *Enzyme Microbial Technology.* 30: 30-40.
- (22) MARTINEZ, M.C.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA J.V. Y BALLESTEROS, A. (1990) New Insolubilized Derivatives of Ribonuclease and Endonuclease for Elimination of Nucleic Acids in Single Cell Protein Concentrates (S.C.P.) *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 12: 643-652.
- (23) UTAGAWA, T. (1999) Enzymatic preparation of nucleoside antibiotics. Review. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 6: 215-222.
- (24) YOKOZEKI, K. AND TSUJI, T. (2000) A novel enzymatic method for the production of purine 2'-deoxyribonucleosides. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 10: 200-213.
- (25) TRILLES, J.A.; FERNANDEZ-LUCAS, J.; CONDEZO, L.A. AND SINISTERRA, J.V. (2004) Nucleoside synthesis by immobilised bacterial whole cells. *J. Mol. Catal. B. Enzymatic* 35: 219- 227.
- (26) CARBALLEIRA, J.D.; ALVAREZ, E.; CAMPILLO, M.; PARDO, L. AND SINISTERRA, J.V. (2004) *Diplogelasinospora grovesii* IMI 171018, a new whole cell biocatalyst stereoselective reduction of ketones. *Tetrahedron Asymmetry.* 15: 951-962.
- (27) CARBALLEIRA, J.V.; ALVAREZ, E. AND SINISTERRA, J.V. (2004) Biotransformation of cyclohexanone using *Geotrichum candidum* NCYC49. Factors affecting the selectivity of the process. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 28: 25-32.
- (28) CARBALLEIRA, J.D.; VALMASEDA, M.; ALVAREZ, E. AND SINISTERRA, J.V. (2004) *Gongronella buileri*, *Schizosaccharomyces octosporus*; *Diplogelasinospora grovesii*: Novel microorganisms useful for the stereoselective reduction of ketones. *Enzyme Microbial Technology.* 34: 611-623.
- (29) CARBALLEIRA, J.D.; ALVAREZ, E. AND SINISTERRA, J.V. (2006). 3D-QSAR/CoMFA Models as a tool for Biocatalysis and protein engineering. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 20: 173-181.

- (30) CARBALLEIRA, J.D.; QUEZADA, V.; ALVAREZ, E. AND SINISTERRA J.V. (2004) High throughput screening and QSAR-3D/CoMFA: Useful tools to design predictive models of substrate specificity for biocatalysts. *Molecules*. 9: 673-693.
- (31) CRAMER, R.D.; BUNCE, J.D. Y PATTERSON D.E. (1988) Crossvalidation, bootstrapping and partial least squares compared with multiple regression in conventional QSAR studies. *Quant. Struct.-Act. Relat.* b. 7: 18-25.
- (32) CORNELL, W. D.; CIEPLAK, P.; BAYLY, C.; GOULD, I.R.; MERZ, K.M.; FERGUSON, D.M.; SPELLMEYER, D.C.; FOX, T.; CALDWELL, J.W. Y KOLLMAN P.A. (1995) A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 5179-5197.
- (33) REETZ, M. T. (2004) Controlling the enantioselectivity of enzymes by directed evolution: Practical and theoretical ramifications. PAS 101: 5716-5722.
- (34) NI, Y. AND XU, J.H. (2002) Asymmetric reduction of aryl ketones with a new isolate *Rhodotorula* sp AS.2241. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 18: 233-241.
- (35) MARTINEZ-LAGOS, F. Y SINISTERRA, J.V. (2005) Enantioselective production of halohydrin precursor of propranolol catalysed by immobilized yeasts. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 36: 17.
- (36) MARTINEZ-LAGOS, F.; CARBALLEIRA, J.D.; BERMUDEZ, J.L.; ALVAREZ, E. AND SINISTERRA, J.V. (2004) Highly stereoselective reduction of haloketones using three new yeasts: application to the synthesis of (S) — adrenergic β -blockers related to propranolol. *Tetrahedron Asymmetry*. 15: 763-770.
- (37) MARTINEZ-LAGOS, F.; DEL CAMPO, C.; LLAMA, E. AND SINISTERRA J.V. (2002) New yeast strains for enantioselective production of Halohydrine precursor of (S)-Propranolol. *Enzyme & Microb. Technol.* 30: 895-901.
- (38) MARTINEZ-LAGOS, F. AND SINISTERRA, J.V. (2005) Enantioselective production of halohydrin precursor of propranolol catalysed by immobilised yeasts. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 36: 1-7.
- (39) QUEZADA, M.A. (2006) Reacciones estereoselectivas de reducción de cetonas y de oxidación de alcoholes empleando células enteras inmovilizadas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense Madrid.
- (40) LEON, R.; PRAZERES, D.M.F.; MOLINARI, F. AND CABRAL, J.M.S. (2002) Microbial Stereoselective Oxidation of 2-methyl-1,3-propanediol to (R)-g-hydroxyisobutyric Acid in Aqueous/organic Biphasic Systems. *Biocatalysis & Biotransformation*. 20: 201-207.
- (41) ROMANO, A.; GANDOLFI, R.; NITTI, P.; ROLLINI, M. AND MOLINARI, F. (2002) Acetic acid bacteria as enantioselective biocatalysts. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 17: 235-240.
- (42) VILLA, R.; ROMANO, A.; GANDOLFI, R.; SINISTERRA, J.V. AND MOLINARI, F. (2002) Chemoselective oxidation of primary alcohols to aldehydes with *Gluconobacter oxydans*. *Tetrahedron Letters*. 43: 6059-6061.
- (43) LEMIERRE; G.L.; LEPOIVRE, J.A. AND ALDERWEIRELDT, F.C. (1985) H₂LAD-catalyzed oxidations of alcohols with acetaldehyde as a coenzyme recycling substrate. *Tetrahedron Lett.* 26: 4527-4528.
- (44) VILLA, R.; ROMANO, A.; GANDOLFI, R.; SINISTERRA, J. V. AND MOLINARI, F. (2002) Chemoselective oxidation of primary alcohols to aldehydes with *Gluconobacter oxydans*. *Tetrahedron Letters*. 43: 6059-6061.

- (45) GANDOLFI, A.; BORROMETI, A.; ROMANO, A.; SINISTERRA, J. V. AND MOLINARI F. (2002) Enantioselective oxidation of (\pm)-2-phenyl-1-propanol to (S)-2-phenyl-1-propionic acid with *Acetobacter aceti*: influence of medium engineering and immobilization. *Tetrahedron Asymmetry*. 13: 2345-2349.
- (46) CARBALLEIRA, J.D.; GARCÍA-BURGOS, C.; QUEZADA, M.A.; ALVAREZ, E. AND SINISTERRA, J.V. (2004) *Williopsis californica*, *Williopsis saturnus* and *Pachisolen tannophilus* : Novel microorganisms for stereoselective oxidation of secondary alcohols. *Biotechnol. Bioeng.* 87: 632-640.
- (47) QUINTANA, M.G. AND DALTON, H. (1998) Production of toluene *cis*-diol by immobilized *Pseudomonas putida* UV4 cells in barium alginate beads. *Enz. Microb. Technol.* 22: 713-720.
- (48) HUANG, J.; HOOIJMANS, C.M.; BRIASCO, C.A.; GERAATS, S.G.M.; LUYBEN, K.; CH, A.M.; THOMAS, D. AND BARBOTIN, N. (1990) Effect of free-cell growth parameters on oxygen concentration profiles in gel-immobilized recombinant *Escherichia coli*. *Enz. Microb. Technol.* 33: 619-623.
- (49) CARBALLEIRA, J.D.; GARCIA-BURGOS, C.A.; QUEZADA, M.A.; ALVAREZ, E. AND SINISTERRA, J.V. (2006) Immobilized derivatives of *Williopsis californica*, *Williopsis saturnus*, *Pachisolen tannophilus*: New biocatalysts useful in the stereoselective oxidation of 1-tetralol. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 949-957.
- (50) INFORME AFAQUIM-SOLVSAFE elaborado para la UE, 2005.
- (51) ANASTAS, P.T. AND WILLIAMS, T.C. EDS. (1998) «*Green Chemistry Frontiers in Begin Chemical Synthesis and processes*» Oxford University Press, Oxford.
- (52) ANASTAS; P.T.; HEINE, L.G. AND WILLIAMS T.C. EDS. (2000) «*Green chemical syntheses and processes*» ACS Symposium Series 767, American Chemical Society.
- (53) TUNDO, P. AND ANASTAS, P.T. EDS. (2000) «*Green Chemistry, challenging perspectives*» Oxford University Press, Oxford.
- (54) MESTRES, R. (2003) Hacia la calidad ambiental a través de la Química. *An. Quim.* 99: 58-65.
- (55) CLARK, J. AND MACQUARRIE, D. EDS. (2002) «*Handbook of Green chemistry and Technology*» Blackwell Publishing Oxford.
- (56) AGUADO, J. AND SERRANO, D. EDS. (1999) «*Feedstock recycling of plastics wastes*» The Royal Society of Chemistry.