

Biocatálisis aplicada. Las enzimas como herramientas útiles en síntesis orgánica

Vicente Gotor Fernández y María José Hernáiz Gómez-Dégano

Resumen: La Biocatálisis juega hoy en día un papel relevante en el diseño de procesos sostenibles para la preparación de moléculas orgánicas. El descubrimiento de la actividad enzimática en disolventes orgánicos, así como la posibilidad de modificar los biocatalizadores a través de métodos de inmovilización en su superficie, o bien su secuencia de aminoácidos mediante métodos de biología molecular, ha permitido el diseño de catalizadores robustos y atractivos para el sector industrial. Así, distintos biocatalizadores pueden trabajar en condiciones similares de reacción, lo que ha dado lugar al desarrollo de procesos concurrentes acortando rutas químicas existentes. Esto se ha traducido en el diseño de estrategias sintéticas más directas que transcurren con excelentes rendimientos y selectividades. La implementación de las biotransformaciones en empresas químicas multinacionales, así como la aparición de compañías biotecnológicas desde inicios del siglo XXI presenta hoy en día a las enzimas como herramientas útiles en procesos sintéticos.

Palabras clave: Biocatálisis; Biotransformaciones Industriales; Enzimas; Química Sostenible; Síntesis Orgánica.

Abstract: Biocatalysis plays a fundamental role in the design of sustainable processes for the preparation of relevant organic molecules. The discovery of enzymatic activity in organic solvents together with the possibility of modifying their surface through immobilization techniques, or alternatively their amino acid sequence by using molecular biology techniques, provide access to robust and attractive catalysts for the industrial sector. The compatibility of different biocatalysts under similar reaction conditions has led to the development of concurrent processes, which allow the design of straightforward chemical routes with excellent yield and selectivity values. Nowadays enzymes are considered as versatile catalysts for synthetic transformations since the implementation of biotransformations has been possible in many chemical multinational enterprises, while the creation of biotechnological companies has suffered an exponential growth since the early XXI century until now.

Keywords: Biocatalysis; Enzymes; Industrial Biotransformations; Organic Synthesis; Sustainable Chemistry.

INTRODUCCIÓN

El empleo de biocatalizadores en el beneficio del ser humano data de varios milenios atrás cuando en el antiguo Egipto se empleaban enzimas para la fermentación de azúcares. Tiempo más tarde estos procesos se extendieron a la elaboración de productos de uso diario como el pan o el queso. En su génesis, la Biocatálisis se basaba en el

uso de células enteras donde las bacterias o levaduras eran usadas para llevar a cabo los procesos químicos. En 1858 Louis Pasteur alcanzó un hito histórico al realizar la resolución cinética del ácido tartárico en su forma racémica. Así, empleando un medio de cultivo donde estaba presente el hongo *Penicillium glaucum*, la fermentación cesaba tan pronto como el enantiómero (*R,R*) se había consumido, aislando inalterada su antípoda de configuración (*S,S*).^[1] Desde este momento el uso de los biocatalizadores comenzó a desarrollarse a través de modelos enzimáticos dejando las aproximaciones empíricas poco a poco a un lado.

A lo largo de los años el empleo de las enzimas en síntesis orgánica fue alcanzando su madurez, desarrollándose las primeras biotransformaciones industriales en la década de los 50 del siglo pasado. En estos casos el estudio de procesos redox fue mayoritario, dirigido especialmente hacia la hidroxilación selectiva de esteroides, los cuales son procesos difícilmente de desarrollar de un modo selectivo mediante métodos químicos convencionales.^[2]

Sin lugar a duda, el descubrimiento por parte de Zaks y Klibanov de que algunas enzimas,^[3] especialmente las hidrolasas, pueden llevar a cabo transformaciones en medios anhidros, ha marcado un antes y un después en el transcurrir de la Biocatálisis. Este hallazgo ha permitido el uso de biocatalizadores en medios orgánicos y neotéricos, los cuales han permitido el desarrollo de nuevas rutas químicas permitiendo la transformación de sustratos insolubles en agua, así como la posibilidad de desarrollar reacciones alternativas a los procesos hidrolíticos como son las síntesis



Vicente Gotor
Fernández¹



M. J. Hernáiz
Gómez-Dégano²

¹ Universidad de Oviedo.
Avenida Julián Clavería s/n. Oviedo 33006 (España)
C. e.: vicgotfer@uniovi.es

² Universidad Complutense de Madrid
Plaza Ramón y Cajal s/n. Madrid 28040 (España)
C. e.: mjhernai@ucm.es

Recibido: 12/02/2017. Aceptado: 13/03/2017.

sis de ésteres, amidas y otras familias de compuestos orgánicos, imposibles de ocurrir en agua.^[4] La selectividad de los procesos se ha visto también altamente influenciada, ya que en estas condiciones es posible evitar reacciones indeseadas de hidrólisis y/o racemización, pudiendo obtener un compuesto orgánico con excelentes rendimientos. Además la posibilidad de inmovilizar las enzimas ha permitido en algunos casos su recuperación y posterior reutilización durante varios ciclos dependiendo del tiempo y las condiciones de reacción.^[5]

Históricamente el éxito de una transformación química venía determinado por el rendimiento alcanzado en el producto obtenido. Sin embargo, el esfuerzo de las agencias mundiales para la protección del medioambiente ha sido el detonante para presentar a la Química como un medio de bienestar en lugar de un problema social. De esta manera, se ha concienciado a los científicos para el desarrollo de procesos sintéticos dentro de las pautas que marca la Química Sostenible y sus 12 principios,^[6] los cuales vienen recogidas intencionadamente bajo el término inglés *productively* (de manera productiva):^[7] Prevent wastes; Renewable materials; Omit derivatization steps; Degradable chemical products; Use safe chemical methods; Catalytic reagents; Temperature, Pressure ambient; In process monitoring; Very few auxiliary substances; E-factor, maximise feed in products; Low toxicity of chemicals products; Yes, it is safe.

La Biocatálisis no ha sido indiferente a esta tendencia, presentando soluciones químicas y económicamente viables. En un simple análisis medioambiental de los procesos enzimáticos podemos darnos cuenta que por norma general las biotransformaciones:

- a) Emplean biocatalizadores que son biodegradables, fácilmente accesibles a partir de nuestro entorno natural y que pueden ser reutilizados en muchos casos, especialmente cuando son usados en su forma inmovilizada.
- b) Transcurren con una elevada selectividad en condiciones suaves de reacción, lo que les conduce a evitar el desarrollo de estrategias sintéticas basadas en tediosos pasos de protección y desprotección de grupos funcionales, dando lugar a transformaciones más simples y seguras para el investigador y equipamiento empleado.
- c) Se desarrollan con una alta eficacia empleando cantidades catalíticas de biocatalizador, siendo en muchos casos procesos altamente competitivos en términos económicos, y pudiendo acoplar sistemas de regeneración del cofactor enzimático cuando este es necesario para el correcto funcionamiento del enzima.
- d) Presentan una excelente economía atómica minimizando la formación de productos secundarios, los cuales en caso de formarse para un correcto desplazamiento del equilibrio químico son fácilmente eliminables del medio de reacción. Este es el caso de la acetona formada a partir de acetato de isopropanilo, isopropanol o isopropilamina en procesos

catalizados por hidrolasas, oxidorreductasas o aminotransferasas respectivamente.

- e) Permiten desarrollar procesos químicos previniendo la formación de residuos, como en el caso del agente antiepiléptico Talampanol, donde el empleo de una estrategia quimioenzimática permite ahorrar 340.000 litros de disolventes y 3.000 kilogramos de cromo por cada tonelada de fármaco producida.

Todo ello conlleva que los procesos biocatalíticos desempeñen un creciente rol en síntesis orgánica, ofreciendo alternativas sostenibles a los procesos químicos convencionales. Esto se determina a través de herramientas sencillas para la medida del impacto ecológico de las biotransformaciones, pudiendo tener en cuenta los reactivos y disolventes empleados, así como todos los productos involucrados.^[8]

CLASES DE ENZIMAS

La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular ha diseñado una clasificación de los biocatalizadores en función de su actividad principal. Esto permite agruparlos en 6 grandes grupos como son las oxidorreductasas (EC 1), transferasas (EC 2), hidrolasas (EC 3), liasas (EC 4), isomerasas (EC 5) y ligasas (EC 6), donde el acrónimo EC representa las siglas de la Comisión Enzimática (*Enzyme Commission*).^[9] Sin lugar a duda, los 4 primeros grupos son las que presentan una mayor aplicabilidad en la síntesis de moléculas de interés.^[10]

Las oxidorreductasas (EC 1) son enzimas que catalizan reacciones redox. Han sido históricamente las más empleadas por su papel en procesos de fermentación. Su uso más habitual incluye tanto la reducción de dobles enlaces^[11] como el proceso reversible de oxidación tanto de alcoholes como de aminas, extendiéndose a muchos otros procesos selectivos de oxigenación de enlaces C-H no activados, compuestos aromáticos o heteroátomos entre otros. Todas ellas son transformaciones difíciles de desarrollar selectivamente mediante métodos químicos convencionales.^[12] La mayoría de estas enzimas requieren el uso de cofactores redox como el NAD(P), FMN o FAD o sus formas reducidas, los cuales donan los equivalentes químicos para el paso de oxidación u reducción estudiados. Si bien estos cofactores se comercializan con altos precios, la posibilidad de acoplar sistemas de reciclaje del cofactor eficientes ha sido desarrollada con éxito en años recientes.^[13]

Las transferasas (EC 2) como su propio nombre indica catalizan la transferencia de grupos funcionales como el metilo, cetonas, aldehídos, glicosílicos etc. Sin lugar a dudas han llegado a su pleno apogeo con el desarrollo de reacciones de transferencia de grupos amino. En este campo las aminotransferasas, y dentro de ellas las transaminasas han liderado una corriente científica que ha permitido la implementación de procesos biocatalíticos en numerosas empresas químicas y biotecnológicas al

convertir cetonas en aminas enantioméricamente puras con excelentes rendimientos.^[14]

Las hidrolasas (EC 3) son los biocatalizadores más empleados al permitir no solo la hidrólisis de numerosas clases de moléculas orgánicas (ésteres, carbonatos, epóxidos, nitrilos, amidas...), sino también los procesos reversibles de síntesis al sustituir el nucleófilo empleado, el agua, por otros como alcoholes, aminas, amoníaco, hidracinas, tioles o perácidos.^[15] Para su correcta actuación no necesitan la adición de cofactores, lo que simplifica el desarrollo de los procesos y rebaja su coste.

Las liasas (EC 4) son biocatalizadores altamente selectivos que catalizan entre otros la formación de enlaces carbono-carbono y carbono-heteroátomo.^[16] Su mecanismo difiere de aquellos de hidrólisis y oxidación, al ocurrir a través de una secuencia de adición-eliminación que permite en algunos casos la creación de varios centros estereogénicos en un solo paso de reacción como ocurre en ciertas reacciones catalizadas por aldolasas.^[17]

Tanto las isomerasas (EC 5) como las ligasas (EC 6) poseen una gran versatilidad y aplicabilidad. Por un lado las isomerasas catalizan reacciones de racemización, epimerización e isomerización, y han sido empleadas en transformaciones de azúcares. Por otro lado, las ligasas están involucradas en procesos de unión de dos moléculas con la concomitante hidrólisis del enlace de un grupo difosfato o trifosfato del ATP. Sin embargo, hasta la actualidad su aplicación en rutas sintéticas quimioenzimáticas no ha recibido niveles de atención tan altos como las clases anteriores de enzimas.

Actualmente, existe un creciente interés por el descubrimiento de nuevas actividades biocatalíticas, y que se ha dado a conocer con el término de promiscuidad biocatalítica. Así, el hecho de que enzimas hidrolíticos como las lipasas catalicen reacciones de formación de enlaces carbono-carbono o carbono-nitrógeno, ha despertado una inusitada curiosidad por estudiar los aspectos mecanísticos que hacen que las triadas catalíticas de estas hidrolasas favorezcan estos procesos no convencionales.^[18]

HERRAMIENTAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCATALIZADORES MEJORADOS

Desarrollar biocatalizadores con propiedades que se ajusten a las condiciones de trabajo en los procesos industriales es una necesidad importante dentro de la Biocatálisis. Como ya hemos indicado, la utilización de los biocatalizadores en la industria química presenta una serie de ventajas respecto a otros tipos de catalizadores. Sin embargo, el uso de enzimas en procesos industriales no ha alcanzado su completa madurez, ya que es común encontrar que las condiciones para la biotransformación en pequeña escala no son las más apropiadas para el proceso industrial. Así, las enzimas o células pueden ser inestables, presentar una baja especificidad por el sustrato, baja actividad y estabilidad o no actuar con la enantioselectividad requerida. Esto obliga a buscar o desarrollar nuevos biocatalizadores con las propiedades requeridas, es decir, hechas a la medida del proceso.

En los últimos 40 años se ha experimentado un gran avance científico y tecnológico en la ingeniería de proteínas y en las estrategias dirigidas a generar el biocatalizador deseado para cada bioproceso.^[19] Así, son numerosas las estrategias que se han ensayado para obtener nuevos y mejores catalizadores, aunque se pueden agrupar fundamentalmente en tres categorías: 1. Búsqueda de nuevas enzimas naturales a través de screening de organismos y metagenómica; 2. Obtención de biocatalizadores mediante mutagénesis y evolución dirigida; 3. Diseño de novo, enzimas a la carta.^[19, 20]

Los métodos tradicionales para identificar nuevas enzimas están basados en el aislamiento de nuevos microorganismos a partir de muestras ambientales o de colecciones de cepas. Los microorganismos son una fuente muy versátil de enzimas, pudiéndose aislar nuevos microorganismos productores mediante cribado o “screening” a partir de distintas fuentes naturales y/o de colecciones tipo. Sin embargo, estos métodos de cultivo de microorganismos han limitado el análisis sólo a aquellos que pueden crecer en condiciones de laboratorio, y que representan a una muy pequeña parte de la gran diversidad microbiana, dejando una gran cantidad de microorganismos por explorar.^[20]

Dentro de las estrategias para el descubrimiento de biocatalizadores mejorados, las técnicas metagenómicas son consideradas hoy en día como potentes herramientas. Esta aproximación consiste en aislar directamente el ADN de muestras ambientales (ADN metagenómico), secuenciarlo y, mediante el análisis de las secuencias obtenidas, identificar genes y su posible función. Una vez que se identifica la actividad enzimática deseada, se aísla el gen respectivo y se clona para sobreexpresarlo, lo que permite producir la enzima en grandes cantidades.

La mutagénesis racional y la evolución dirigida de enzimas son también dos estrategias que permiten mejorar distintas propiedades de los biocatalizadores, tales como el aumento de la eficacia catalítica y/o estabilidad, modificación de las condiciones óptimas de reacción, mayor reconocimiento de sustratos o búsqueda de nuevas actividades (Figura 1). La primera de ellas se basa en la modificación justificada de residuos concretos de la estructura de la

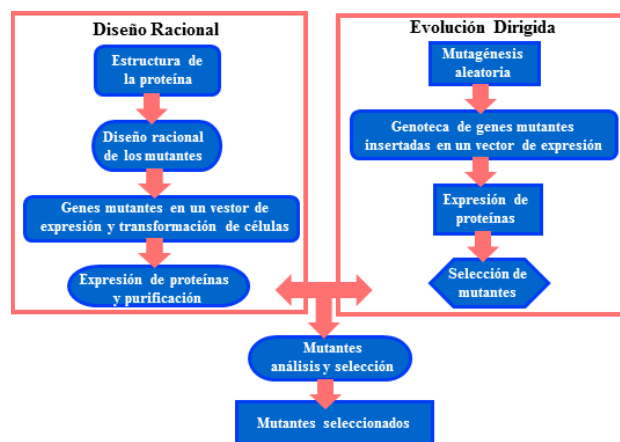


Figura 1. Diseño racional y evolución dirigida

enzima. Por otro lado, la evolución dirigida ha sido una herramienta alternativa poderosa para modificar la función enzimática y, específicamente, para ajustar las propiedades catalíticas a las condiciones deseadas. La evolución dirigida, “evolución *in vitro*” o “diseño no racional” de enzimas no difiere mucho de la hipótesis evolutiva sugerida por Darwin. En la evolución *in vitro* se aplican procesos mutagénicos aleatorios a un gen, generándose cierta diversidad representada en una genoteca de mutantes. Esta genoteca de variantes de la secuencia original es sometida a un proceso de selección, del cual se obtienen candidatos mejorados que serán nuevamente sometidos a procesos de mutación. Una combinación apropiada y repetida de los distintos métodos de generación de variabilidad acoplados a buenos métodos de selección puede producir enzimas con las propiedades catalíticas deseadas.^[21]

INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

A pesar de las ventajas que las enzimas presentan frente a los catalizadores tradicionales, el empleo de estos biocatalizadores no se ha generalizado en la industria, debido a varias razones como son su limitada estabilidad, ya que son proteínas que se pueden desnaturalizar y perder totalmente su actividad, o bien la dificultad que entraña su separación de los sustratos y productos en el medio de reacción, lo que impide su reutilización.

La inmovilización de enzimas ha logrado superar estos inconvenientes, permitiendo que aumente la productividad del catalizador (medida como kg de producto obtenidos por kg de enzima) y que muchos procesos industriales sean rentables económicamente en la actualidad.^[22] Este proceso restringe o reduce en mayor o menor medida la movilidad conformacional de las enzimas por su unión a un soporte, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas.

En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes categorías: la retención física y la unión química. En los primeros no hay formación de enlaces covalentes mientras que esta sí ocurre en los segundos. La adsorción y el atrapamiento de enzimas en soportes porosos o confinamiento de enzimas en membranas semi-permeables son los principales métodos de inmovilización por retención física, mientras que la unión covalente de la enzima al soporte y el entrecruzamiento son los métodos por unión química más destacados (Figura 2).^[5, 23]

La unión covalente de una enzima a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La unión covalente a soportes sucede tras el ataque nucleofílico de determinados aminoácidos expuestos hacia el exterior de la superficie de la enzima sobre grupos químicos reactivos de un soporte previamente funcionalizado.

Aunque se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a numerosos enzimas, se reconoce que no existe un método universal válido. No obstante, gracias a toda la información disponible en la actualidad, se podría seleccionar la técnica más adecuada para

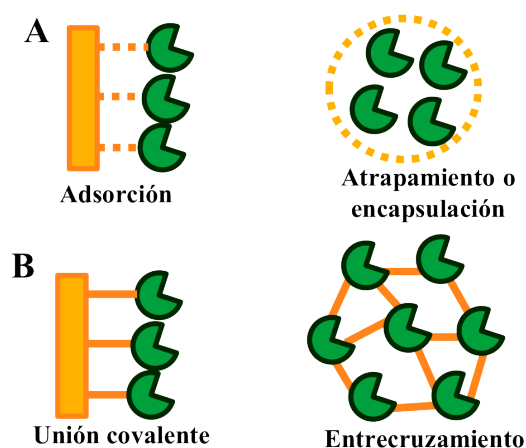


Figura 2. Métodos de inmovilización de enzimas: A) Retención física; B) Unión química

utilizar una enzima destinada a una aplicación concreta. Entre otros factores, la elección del método de inmovilización ha de tener en cuenta las condiciones de la reacción, el tipo de reactor que se vaya a utilizar y el tipo de sustrato que tenga que ser procesado.^[5, 23]

INGENIERÍA DEL MEDIO DE REACCIÓN

El uso de enzimas para lograr reacciones muy específicas en medios no acuosos es de gran utilidad en la industria química y farmacéutica. La mayoría de los bioprocesos se llevan a cabo en reactores bajo condiciones extremas de reacción, muy distintas de las que se dan en el ambiente natural de las enzimas. Por eso, la ingeniería del medio de reacción se define como el conjunto de herramientas que diseñan las condiciones adecuadas para que una enzima pueda catalizar en sus niveles de máxima actividad y estabilidad una reacción química en cualquier medio, ya sea el convencional (agua), o no convencional (disolventes orgánicos, neotéricos o bien sin disolvente).^[24]

Bajo la denominación de medios no convencionales se agrupan a los disolventes orgánicos miscibles o inmiscibles con el agua, lo cual dependerá de su valor de log P. Por ello dependiendo de la concentración de agua que exista en el medio y la naturaleza del disolvente orgánico, las reacciones enzimáticas pueden llevarse a cabo en tres sistemas diferentes:

1. Sistema monofásico, formado por agua y un cosolvente orgánico miscible con ella. Los disolventes más utilizados son los alcoholes de cadena corta (MeOH, EtOH o PrOH) o disolventes polares (DMSO, DMF, acetona, dioxano y THF entre otros). En general la mayor parte de los cosolventes se emplean hasta aproximadamente un 10% (v/v) sin observarse una pérdida de la actividad enzimática, pudiendo en algunos casos usarse proporciones ligeramente superiores al 50%. Si la proporción alcanza un cierto umbral, el agua esencial unida es eliminada conduciendo a la desnaturalización del

biocatalizador. Este hecho es debido a que estos disolventes polares son capaces de competir con los puentes de hidrógeno formado entre la proteína y la capa de agua fuertemente unida. Estos sistemas monofásicos formados por agua y un codisolvente polar son especialmente útiles cuando uno de los sustratos es muy polar y el otro apolar, siendo ambos sustratos solubles en la mezcla agua-disolvente polar elegida.^[25]

2. Bifásico o sistema de dos fases. El sistema está compuesto por una fase acuosa que contiene a la enzima disuelta y otra donde se encuentra el disolvente inmiscible con el agua. El sustrato y/o producto suelen presentar características hidrofóbicas por lo cual pueden localizarse en la fase orgánica, si solo el producto se localiza en la fase orgánica facilitará su extracción y separación. Entre la fase acuosa y la fase orgánica se forma una interfase donde se situará el enzima y habrá una concentración limitada de compuestos orgánicos (sustrato y producto) alrededor de la misma, por lo que se evita la inhibición enzimática. La biotransformación solo se produce en la fase acuosa y la presencia de las dos fases facilita la eliminación del producto de la superficie de la enzima y por ello que se complete la reacción con mayor rapidez. Sin duda es necesaria, una correcta transferencia de masa de sustrato(s), producto(s) y biocatalizador entre las dos fases, por lo que es crucial la agitación.^[26]
3. Disolvente orgánico puro. Las enzimas en su forma nativa son insolubles en disolventes orgánicos, por lo tanto, el enzima estará suspendido en la presencia del disolvente orgánico (enzima en polvo liofilizada o enzima inmovilizada). En estos sistemas la cantidad de agua es un parámetro muy importante para la actividad enzimática, ya que para mantener su actividad se necesita de una mínima cantidad de agua. Esta cantidad de agua suele ser una monocapa alrededor de las moléculas de enzima y el resto del medio puede ser el disolvente no convencional. El agua se distribuye entre las distintas fases presentes en el sistema. Parte de ella se une a la enzima, otra parte se disuelve en el disolvente y una tercera en el soporte, polímeros u otras sustancias. El grado de hidratación de la enzima es el parámetro clave (actividad de agua), debiendo ser este valor < 1.

ENZIMAS EN DISOLVENTES NEOTÉRICOS

Los disolventes constituyen el mayor porcentaje de residuos que se genera en la industria química y farmacéutica, teniendo un gran impacto en el aumento del factor E.^[27] Por ello muchas compañías se han centrado en minimizar el uso o sustituir los disolventes tóxicos tradicionales por disolventes neotéricos, desarrollando guías para ayudar a los químicos en la selección de disolventes más sostenibles.^[28] Entre dichos solventes los más utilizados en Biocatálisis son: fluidos supercríticos (FSCs),

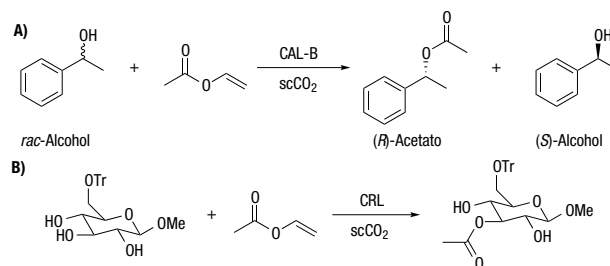
líquidos iónicos (LIs) y biodisolventes (disolventes que provienen de biomasa).^[29]

Fluidos supercríticos. El concepto de FSC hace referencia a un estado de la materia en el cual el compuesto se comporta como un fluido, mostrando propiedades al mismo tiempo de gas y líquido. Así, presentan unas propiedades muy interesantes para su aplicación en procesos de reacción y extracción, siendo reutilizables con la simple presurización del sistema para volver a las condiciones supercríticas. La elección de un FSC para realizar un proceso enzimático viene impuesta, en primer lugar, por las condiciones de presión y temperatura críticas del propio fluido, de manera que sean compatibles con la actividad de los catalizadores biológicos. Asimismo, es necesario que el fluido no inactive la enzima por reacción química con la misma. Desde el punto de vista industrial, la selección del fluido también viene determinada por criterios económicos y de seguridad, si bien el elevado coste de los equipos no ha permitido una aplicación más extendida de los FSCs en procesos enzimáticos industriales.

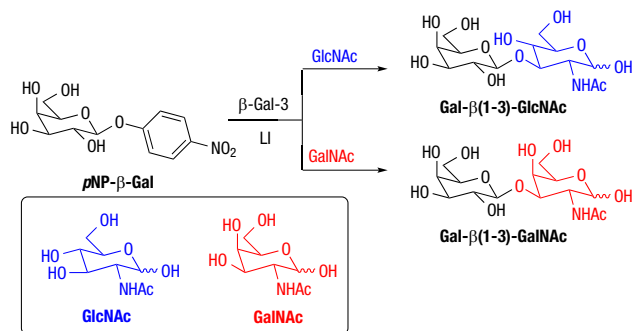
Existen numerosos ejemplos de reacciones enzimáticas en presencia de fluidos supercríticos.^[30] De entre todos los FSCs, el dióxido de carbono (CO₂) es el FSC más utilizado en reacciones enzimáticas, ya que puede acelerarlas en varios órdenes de magnitud, siendo además sencillamente eliminable al final del proceso. Así, diferentes hidrolasas han sido utilizadas en este medio, especialmente lipasas, proteasas y glicosidasas. Existen numerosos ejemplos donde se ha observado un mejor comportamiento de las enzimas en FSC que en disolventes orgánicos tradicionales, como han descrito Matsuda *et al.* para la resolución cinética del 1-feniletanol catalizada por la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B) inmovilizada en un soporte cerámico y comercializada en su forma Novozyme 435.^[31] Así, es posible obtener el producto deseado con un 99% de *ee* y un 50% de rendimiento (Esquema 1A).

Por otro lado, Polacci *et al.*^[32] han descrito como el scCO₂ puede modular la acilación regioselectiva de azúcares usando la lipasa de *Candida rugosa* (CRL). Así, en el ejemplo mostrado en el Esquema 1B, se obtiene exclusivamente un derivado de la glucosa acilado en la posición 3 con un 91% de conversión.

Líquidos iónicos. Los LIs son sustancias líquidas a temperatura ambiente formadas exclusivamente por iones. Entre sus características destacan su baja presión de vapor, gran estabilidad tanto térmica como química, bajo punto de fusión, reciclabilidad y capacidad para disolver gran variedad



Esquema 1. Procesos catalizados por lipasas empleando scCO₂ como disolvente: **A)** Acilación enantioselectiva del 1-feniletanol; **B)** Acilación regioselectiva de un azúcar



Esquema 2. Reacciones de transglicosidación catalizadas por la β -gal-3 de *Bacillus circulans* empleando LIs o biodisolventes derivados del glicerol

de compuestos orgánicos, lo que facilita su empleo en Biocatálisis. La estructura del catión y anión modulan sus propiedades físico-químicas, e influyen a su vez notablemente en las reacciones enzimáticas mediante la alteración de la estructura, actividad, selectividad y estabilidad de las enzimas.

Durante los últimos años, el empleo de distintas clases de LIs en reacciones enzimáticas está teniendo un enorme auge, tanto industrial como a nivel de laboratorio, ya que se han postulado como sustitutos adecuados de los disolventes orgánicos volátiles, al no causar problemas de desactivación enzimática, aumentar la selectividad del biocatalizador y evitar los efectos medioambientales perjudiciales derivados de la alta volatilidad de estos últimos. Por ejemplo, se ha estudiado el efecto de LIs sobre la actividad de diferentes β -galactosidasas para la síntesis del disacáridos, destacando el caso de la β -Gal-3 de *Bacillus circulans* (Esquema 2), donde se observó que el uso de [Bmin][PF₆] conduce a un aumento importante del rendimiento de la reacción de transglicosilación, manteniendo la regioselectividad hacia la formación de enlaces β (1-3).^[33]

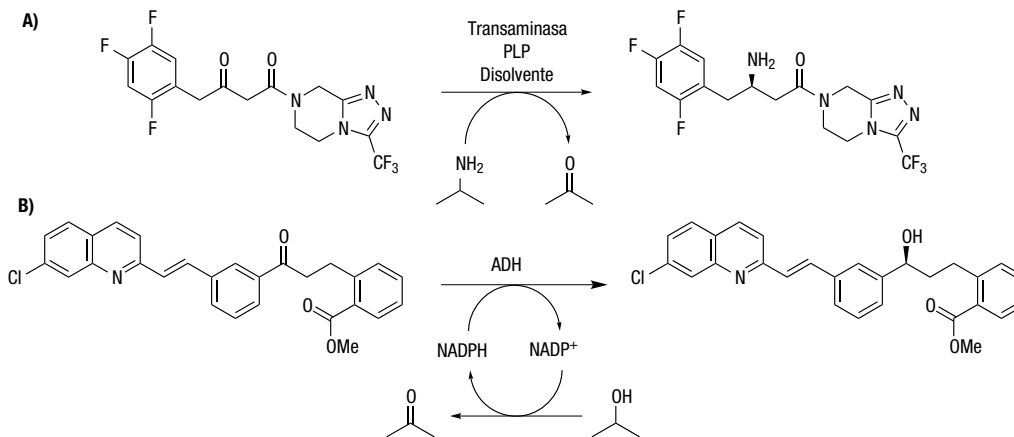
Biodisolventes. Proviene de fuentes renovables por lo que constituyen en sí mismos una forma de evitar residuos, convirtiendo lo que sería un potencial residuo en un nuevo disolvente. Los biodisolventes más conocidos y utilizados son el etanol y el metanol, aunque existen otros

comerciales como el ciclopentenil metil éter, el lactato de etilo, el 2-metil tetrahidrofurano o el glicerol.^[34] Este tipo de disolventes han sido ampliamente empleados, como por ejemplo en la síntesis regioselectiva de Gal- β (1 \rightarrow 3)GalNAc y Gal- β (1 \rightarrow 3)GlcNAc (Esquema 2), obteniéndose los disacáridos con rendimientos cuantitativos y completa regioselectividad.^[33, 34]

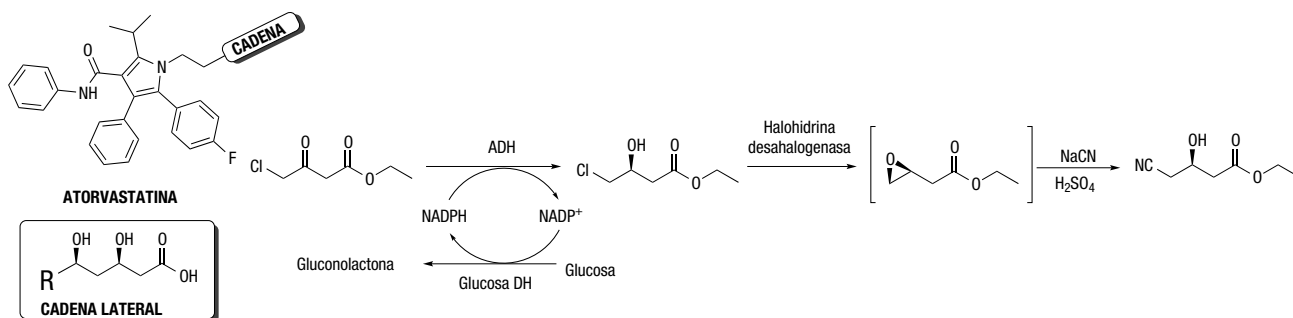
BIOTRANSFORMACIONES INDUSTRIALES

Las principales clases de enzimas que permiten el pleno desarrollo de la Biocatálisis en síntesis orgánica son las oxidorreductasas,^[35] transaminasas^[36] e hidrolasas.^[37] Sin duda alguna, la modificación de la secuencia de aminoácidos de una proteína ha permitido la implementación de procesos enzimáticos industriales más eficaces, destacando en esta década la colaboración entre Merck & Co. y Codexis en la producción de (*R*)-sitagliptina, el principal ingrediente activo de Januvia, medicamento empleado en el tratamiento de la diabetes de tipo II. Así, fue posible evolucionar una transaminasa con escasa pero medible actividad hacia pro-sitagliptina permitiendo una síntesis eficiente de la (*R*)-sitagliptina tras 27 mutaciones de la enzima nativa (Esquema 3A).^[38] En el proceso optimizado a 40°C es posible obtener el producto final en forma enantiopura con un rendimiento aislado del 92%, tolerando una concentración de sustrato de 200 g/L al emplear DMSO como cosolvente. Sin duda alguna, la ruta quimioenzimática propuesta supera las limitaciones de los métodos químicos descritos como el empleo de la reacción de inversión de Mitsunobu o hidrogenaciones selectivas con catalizadores de rodio.^[39]

La empresa Codexis ha desarrollado un proceso de biorreducción eficaz para la producción del antiasmático Montelukast, el cual se conoce en el mercado con distintos nombres como Singulair, Everest o Senovital entre otros. La evolución de una alcohol deshidrogenasa (ADH) ha conseguido aumentar 3000 veces la actividad de la enzima nativa, obteniéndose el alcohol en forma enantiopura y cuantitativa (Esquema 3B). Este proceso



Esquema 3. Reacción de interés en la preparación de fármacos: A) Biotransaminación en la síntesis del antidiabético Januvia; B) Biorreducción en la síntesis del antiasmático Montelukast



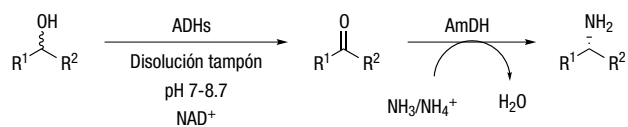
Esquema 4. Estructura de diversas estatinas y aplicación de una síntesis quimioenzimática que emplea una alcohol deshidrogenasa y una halohidrina deshalogenasa en la preparación de un fragmento de su cadena lateral

se lleva a cabo a 45°C, con una concentración inicial de sustrato de 100 g/L en una mezcla de isopropanol (que cumple también el papel de sustrato auxiliar para la regeneración del cofactor), agua y tolueno, lo que favorece la solubilidad de tanto de la cetona de partida como del alcohol, que finalmente se purifica por una simple filtración.^[40]

Otro ejemplo ilustrativo lo encontramos en la producción del sintón quiral de la cadena lateral de estatinas como la Atorvastatina (Esquema 4), empleada para disminuir los niveles de colesterol en sangre y así evitar dolencias cardiovasculares.^[41] La estructura común de las estatinas está formada por un núcleo central heterocíclico nitrogenado, y una cadena lateral derivada del ácido (3*R*,5*R*)-3,5-dihidroheptanoico. Codexis ha desarrollado un proceso enzimático para la síntesis de la cadena lateral que permite su producción a gran escala en un proceso de dos pasos enzimáticos. En el primero se utiliza una ADH para reducir el 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo, obteniendo en forma enantiopura el (*S*)-4-cloro-3-hidroxi-3-oxobutanoato de etilo con un 96% de rendimiento. En un segundo paso se utiliza una halohidrina deshalogenasa para llevar a cabo la sustitución nucleofílica del cloro por un grupo ciano a temperatura ambiente y pH neutro. Inicialmente en ambas reacciones la actividad de la enzima nativa era muy baja y mediante su modificación evolutiva se consiguió aumentar la actividad en ambos casos, resultando un excelente ejemplo de diseño de un proceso biocatalítico benigno.^[28b, c]

REACCIONES CONCURRENTES

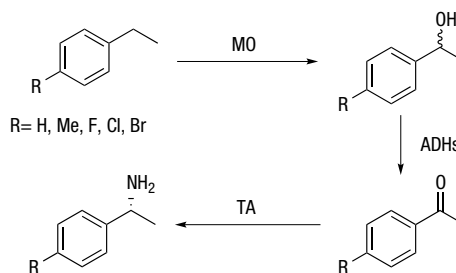
El diseño de procesos catalíticos y asimétricos se basa principalmente en el uso de tres tipos de catálisis, la metálica, la organocatálisis y la Biocatálisis.^[42] La compatibilidad de las enzimas con distintos tipos de catalizadores ha sido demostrada largamente a lo largo de los años, principalmente en



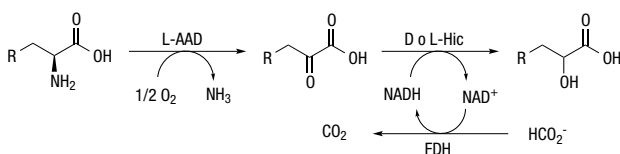
Esquema 5. Diseño de un proceso en cascada y *one-pot* para la transformación de alcoholes racémicos en aminas ópticamente activas

el diseño de procesos de resolución cinética dinámica de alcoholes y aminas.^[43] En estos procesos, la combinación de un paso de acilación catalizado por una lipasa con la racemización *in situ* del enantiómero que reacción más lentamente, permite obtener ésteres y amidas con excelentes excesos enantioméricos y rendimientos aislados. Sin embargo, en los últimos años es creciente el empleo de enzimas en procesos que ocurren de manera concurrente, permitiendo obtener moléculas de alto valor y complejidad tras una biotransformación que se desarrolla en varios pasos.^[44]

Existen muy diversas maneras para llevar a cabo estos procesos concurrentes, ya sea utilizando varias enzimas en forma aislada o bien co-inmovilizadas, empleando un microorganismo que contenga diversas actividades enzimáticas, o bien co-expresando diversos genes en un solo plásmido. Así, recientemente, Turner y colaboradores han descrito la transformación de alcoholes racémicos en aminas ópticamente activas a través de un proceso en cascada donde ambos enantiómeros del alcohol son inicialmente oxidados hacia el intermedio cetona empleando dos alcohol deshidrogenasas (ADHs) de opuesta selectividad (Esquema 5).^[45] El grupo carbonilo resultante experimenta una posterior reacción de aminación reductiva desarrollada en el mismo recipiente (*one-pot*), que es catalizada por una amino deshidrogenasa (AmDH), empleando el amoníaco como donador del grupo amino. Destaca el hecho de que el agua es obtenida como inocuo producto secundario global de la reacción, siendo una cascada redox autosuficiente ya que los cofactores para ambos procesos enzimáticos simples se van regenerando en *one-pot*. De esta manera se han obtenido una se-



Esquema 6. Co-expresión de una monooxigenasa, dos alcohol deshidrogenasas de selectividad opuesta y una transaminasa para la transformación de etilbencenos en (*R*)-1-feniletanaminas



Esquema 7. Cascada redox para la preparación de (*R*)- y (*S*)-hidroxiácidos a partir de L-aminoácidos

rie de aminas de configuración *R* con alta pureza óptica en reacciones a 30°C y tras 48 horas de reacción, abriéndose la posibilidad de diseñar procesos alternativos para la obtención de aminas de configuración opuesta.^[46]

La síntesis de aminas ópticamente activas es un reto de gran interés para el químico orgánico hoy en día, y otras rutas están siendo exploradas. Por ejemplo, el propio grupo de investigación de Turner, ha descrito recientemente un proceso de C-H aminación empleando un sistema de células enteras donde actúan una monooxigenasa (MO), dos alcohol deshidrogenasas de selectividad opuesta (ADHs) y una transaminasa (TA) para obtener una serie de (*R*)-1-feniletanaminas ópticamente activas a partir de etilbencenos (Esquema 6).^[47] Este es un proceso elegante que se basa en la co-expresión de cuatro genes distintos en un solo catalizador.

La co-expresión de varios catalizadores en un solo plásmido ha sido también aplicada por Kroutil y colaboradores permitiendo la transformación cuantitativa de L-aminoácidos tanto en (*R*)- como en (*S*)-hidroxiácidos a una concentración de 200 mM.^[48] Esta biotransformación implica la preparación de un triple biocatalizador que contiene las actividades de una L-aminoácido desaminasa (L-AAD) responsable de la conversión de los aminoácidos en cetoácidos, los cuales son posteriormente reducidos por una 2-hidroxiisocaproato deshidrogenasa (Hic) requiriendo de una formiato deshidrogenasa (FDH) para la regeneración del cofactor NADH. La preparación de este tipo de construcciones enzimáticas simplifica su uso individual y la optimización de las etapas sucesivas (Esquema 7).^[49]

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El diseño de nuevas moléculas orgánicas más efectivas en el tratamiento de diversas enfermedades o la preparación de materiales químicos con una mayor aplicabilidad son sencillamente algunas de las tareas que el químico orgánico debe afrontar. Para estos y otros fines, el vertiginoso avance de muchas áreas científicas ha permitido que actualmente se dispongan de numerosas herramientas sintéticas. Entre todas ellas, la Biocatálisis se presenta como una alternativa a tener en cuenta para el desarrollo y la mejora de procesos químicos muy diversos.

Los avances alcanzados gracias a la modificación del biocatalizador, presentan a las enzimas como aceleradores útiles de un gran número de reacciones químicas. Así, por

un lado, el empleo de técnicas de inmovilización ha conducido a enzimas más estables y resistentes a medios orgánicos mientras que, por otro, su diseño racional, basado en técnicas de modelización molecular y de evolución dirigida, ha permitido una mejora de las actividades enzimáticas. Su compatibilidad con otros biocatalizadores y catalizadores no enzimáticos ha permitido a su vez el diseño de procesos altamente complejos pero que transcurren con una excelente selectividad y alta eficacia tanto energética como atómica.

Sin lugar a dudas, la Biocatálisis tiene un largo camino que recorrer debido a la complejidad de la estructura proteica de los enzimas,^[50] pero que sin embargo es modulable debido a la sencillez para modificar hoy en día esas cadenas aminoácidas y a la posibilidad de llevar a cabo un diseño racional de las mismas a través de cálculos computacionales.^[51] Todo ello se traduce en la generación de catalizadores más eficaces y selectivos, que además pueden ser compatibles con el uso de otras metodologías. A lo largo de años recientes, han ido apareciendo sus primeras aplicaciones en la química de flujo^[52] o el empleo de irradiación por microondas,^[53] todo ello hace que la Biocatálisis se presenta ante el químico orgánico como una herramienta útil de síntesis y con una aplicación evidente en el sector industrial.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad (CTQ2016-75752-R y CTQ2015-66206-C2-1-R).

BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. Pasteur, *Ann. Chim. Phys.*, **1848**, *24*, 442-459.
- [2] K Drauz, H. Groeger, O. May O, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2012.
- [3] a) G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072; b) A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, *82*, 3192.
- [4] G. Carrea, S. Riva, *Organic Synthesis with Enzymes in non-Aqueous Media*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [5] R. A. Sheldon, S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223-6235.
- [6] P. T. Anastas, L. G. Heine, T. C. Williamson, *Green Chemical Synthesis and Processes*. American Chemical Society, Washington D. C. (USA), **1994**.
- [7] S. L. Y. Tang, R. L. Smith, M. Poliakoff, *Green Chem.*, **2005**, *7*, 761-762.
- [8] Y. Ni, D. Holtmann, F. Hollmann, *ChemCatChem*, **2014**, *6*, 930-943.
- [9] <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>
- [10] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*. 6ª Ed.; Springer, Berlín (Alemania), 2011.

- [111] J. Magano, J. R. Dunetz, *Org. Process Res. Dev.*, **2012**, *16*, 1156-1184.
- [112] S. Schulz, M. Girhard, V. B. Urlacher, *ChemCatChem.*, **2012**, *4*, 1889-1895.
- [113] a) C. E. Paul, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ACS Catal.*, **2014**, *4*, 788-797; b) W. Hummel, H. Gröger, *J. Biotechnol.*, **2014**, *191*, 22-31.
- [114] a) W. Kroutil, E.-M. Fischereder, C. S. Fuchs, H. Lechner, F. G. Mutti, D. Pressnitz, A. Rajagopalan, J. H. Sattler, R. C. Simon, E. Siirola, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 751-759; b) R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.*, **2014**, *4*, 129-143.
- [115] A. Ghanem, *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 1721-1754.
- [116] a) M. Müller, *Adv. Synth. Catal.*, **2012**, *354*, 3161-3174; b) K. Fesko, M. Gruber-Khadjawi, *ChemCatChem.*, **2013**, *5*, 1248-1272.
- [117] C. L. Windle, M. Müller, A. Nelson, A. Berry, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2014**, *19*, 25-33.
- [118] a) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504-4523; b) M. López-Iglesias, V. Gotor-Fernández, *Chem. Rev.*, **2015**, *15*, 743-759.
- [119] T. Davids, M. Schmidt, D. Bottcher, U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2013**, *17*, 215-220.
- [120] G. A. Behrens, A. Hummel, S. K. Padhi, S. Schatzle, U. T. Bornscheuer, *Adv. Synth. Catal.*, **2011**, *353*, 2191-2215.
- [121] a) J. L. Porter, R. A. Rusli, D. L. Ollis, *ChemBioChem.*, **2016**, *17*, 197-203; b) H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 3351-3367.
- [122] R. DiCosimo, J. McAuliffe, A. J. Poulouse, G. Bohlmann, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 6437-6474.
- [123] a) I. Es, J. D. G. Vieira, A. C. Amaral, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2015**, *99*, 2065-2082; b) S. Cantone, V. Ferrario, L. Corici, C. Ebert, D. Fattor, P. Spizzola, L. Gardossi, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 6262-6276; c) U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 453-468.
- [124] a) P. Adlercreutz, P. *Biocatalysis in non-conventional media. Second Edition of Applied Biocatalysis*, Australia: Harwood Academic Publishers, **2000**; b) N. Doukyu, H. Ogino, *Biochem. Eng. J.*, **2010**, *48*, 270-282.
- [125] A. Bertrand, S. Morel, F. Lefoulon, Y. Rolland, P. Monsan, M. Remaud-Simeon, *Carbohydr. Res.*, **2006**, *341*, 855-863; b) P. Torres, A. Poveda, J. Jiménez-Barbero, J. L. Parra, F. Comelles, A. O. Ballesteros, F. J. Plou, *Adv. Synth. Catal.*, **2011**, *353*, 1077-1086.
- [126] a) J. L. Lopez, S. A. Wald, S. L. Matson, J. A. Quinn, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1990**, *613*, 155-166; b) T. Shibatani, K. Omori, H. Akatsuka, E. Kawai, H. Matsumae, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2000**, *10*, 141-149.
- [127] a) R. A. Sheldon, *Green Chem.*, **2007**, *9*, 1273-283; b) R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2017**, *19*, 18-43.
- [128] a) W. J. W. Watson, *Green Chem.*, **2012**, *14*, 251-259; b) R. A. Sheldon, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 1437-1451; c) C. Jimenez-Gonzalez, D.J.C. Constable, C. S. Ponder, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 1485-1498.
- [129] M. J. Hernáiz, A. R. Alcántara, J. I. García, J. V. Sinisterra, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 9422-9437.
- [130] a) A. J. Mesiano, E. J. Beckman, A. J. Russell, *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 623-634; b) T. Matsuda, *J. Biosci. Bioeng.*, **2013**, *115*, 233-241.
- [131] T. Matsuda, K. Watanabe, T. Harada, K. Nakamura, Y. Arita, Y. Misumi, S. Ichikawa, T. Ikariya, T. *Chem. Commun.*, **2004**, 2286-2287.
- [132] C. Palocci, M. Falconi, L. Chronopoulou, E. Cernia, E. J. *Super-crit. Fluids*, **2008**, *45*, 88-93.
- [133] C. Bayón, A. Cortés, J. Berenguer, M. J. Hernáiz, *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 4973-4978.
- [134] A. Farran, C. Cai, M. Sandoval, Y. M. Xu, J. Liu, M. J. Hernáiz, R. J. Linhardt, *Chem. Rev.*, **2015**, *115*, 6811-6853.
- [135] a) J. Magano, J. R. Dunetz, *Org. Process Res. Dev.*, **2012**, *16*, 1156-1184; b) K. Robins, A. Osorio-Lozada, *Catal. Sci. Technol.*, **2012**, *2*, 1524-1530.
- [136] M. Fuchs, Judith E. Farnberger, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.*, **2015**, 6965-6982.
- [137] M. B. Ansorge-Schumacher, O. Thum, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 6475-6490.
- [138] C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science*, **2010**, *329*, 305.
- [139] A. A. Desai, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 1974-1976.
- [140] J. Liang, J. Lalonde, B. Borup, V. Mitchell, E. Mundorff, N. Trinh, D. A. Kochrekar, R. N. Cherat, G. G. Pai, *Org. Process Res. Dev.*, **2010**, *14*, 193-198.
- [141] S. K. Ma, J. Gruber, C. Davis, L. Newman, D. Gray, A. Wang, J. Grate, G. W. Huisman, R. A. Sheldon, *Green Chem.*, **2010**, *12*, 81-86.
- [142] a) C. A. Denard, J. F. Hartwig, H. Zhao, *ACS Catal.*, **2013**, *3*, 2856-2864; b) H. Pellissier, *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 7171-7210.
- [143] a) B. Martín-Matute, *An. Quim.*, **2006**, *102*, 46-52; b) O. Verho, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3996-4009.
- [144] a) V. Köhler, N. J. Turner, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 450-464; b) J. Muschiol, C. Peters, N. Oberleitner, M. D. Mihovilovic, U. T. Bornscheuer, F. Rudroff, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 5798-5811.
- [145] F. G. Mutti, T. Knaus, N. S. Scrutton, M. Breuer, N. J. Turner, *Science*, **2015**, *349*, 1525-1529.
- [146] J.-B. Wang, M. T. Reetz, *Nat. Chem.*, **2015**, *7*, 948-949.
- [147] P. Both, H. Busch, P. K. Kelly, F. G. Mutti, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*, 1511-1513.
- [148] G. Gourinchas, E. Busto, M. Killinger, N. Richter, B. Wilschi, W. Kroutil, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 2828-2831.
- [149] E. Busto, N. Richter, B. Grischek, W. Kroutil, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 11225-11228.
- [150] M. T. Reetz, *Chem. Rec.*, **2016**, *16*, 2449-2459.
- [151] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature*, **2012**, *485*, 185-194.
- [152] N. N. Rao, S. Lütz, K. Würges, D. Minör, *Org. Process Res. Dev.*, **2009**, *13*, 607-616.
- [153] C. Wiles, P. Watts, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 6512-6535.