



TRABAJO DE FIN DE GRADO:

# Aplicaciones farmacéuticas de las lipasas microbianas

Sara GARCÍA ESTEBAN

**Tutor:** Raúl Rivas González

**Departamento:** Microbiología y Genética

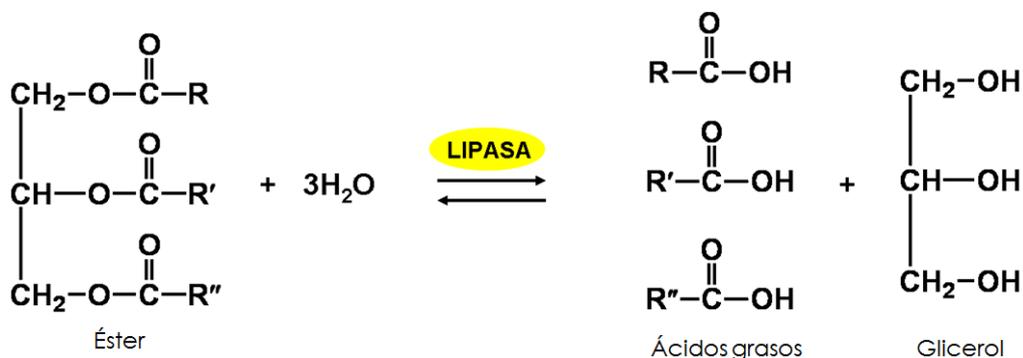
**Convocatoria:** Septiembre 2015

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....   | 3  |
| <b>2. OBJETIVO</b> .....   | 4  |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....                                       | 4  |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....   | 5  |
| 4.1. Síntesis química .....  | 6  |
| 4.1.1. Resolución de compuestos químicos racémicos .....                   | 6  |
| 4.1.1.1. Resolución de ácidos carboxílicos racémicos .....                 | 7  |
| 4.1.1.2. Resolución de ésteres racémicos .....                             | 8  |
| 4.2. Cosmética y perfumería .....  | 8  |
| 4.2.1. Catalizadores de la síntesis de compuestos químicos racémicos ..... | 8  |
| 4.2.2. Componentes de productos cosméticos .....                           | 9  |
| 4.3. Otras aplicaciones .....  | 9  |
| 4.3.1. Herramientas de diagnóstico .....                                   | 9  |
| 4.3.2. Biosensores .....   | 9  |
| <b>5. CONCLUSIONES</b> .....   | 10 |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | 11 |

# 1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas se consideran catalizadores naturales. Las lipasas son triacilglicerol hidrolasas. Todas ellas comparten un mismo sitio activo (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly). Actúan en enlaces éster carboxílicos catalizando la hidrólisis de ésteres formados por glicerol y ácidos grasos de cadena larga (Figura 1). También catalizan reacciones de esterificación, interesterificación, acidolisis, alcoholisis y aminolisis. Son enzimas que muestran buena quimioselectividad, regioselectividad y enantioselectividad. Se trata de enzimas muy versátiles cuyo uso se ha incrementado notablemente en los últimos años. (1, 2, 3, 4)



**Figura 1.** Acción catalítica de las lipasas. Un triglicérido puede hidrolizarse en glicerol y ácidos grasos, pero también puede sintetizarse combinando glicerol y ácidos grasos. (3)

Las lipasas son el tercer grupo de enzimas en volumen de ventas, por detrás de proteasas y carbohidrasas, y representan el grupo de biocatalizadores más importantes para aplicaciones industriales. Su uso comercial es un negocio de millones de dólares que incluye una amplia variedad de aplicaciones como: producción de fármacos, cosméticos, síntesis de biopolímeros y biodiesel, industria alimentaria, etc. (1, 5, 6)

Se trata de enzimas muy ubicuas que se encuentran ampliamente en la naturaleza, ya que son producidas por plantas, animales y microorganismos, pero únicamente las microbianas son comercialmente significativas. (7, 8, 9)

Normalmente, se prefiere utilizar enzimas microbianas antes que las procedentes de plantas y animales. Ello se debe a la gran variedad de actividades catalíticas que presentan, los altos rendimientos que ofrecen, la facilidad de manipulación genética, el suministro regular debido a la ausencia de fluctuaciones estacionales y su rápido crecimiento en medios de cultivo de bajo coste. Además, las enzimas microbianas son más estables que las enzimas vegetales y animales correspondientes. (6, 10)

## 2. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica para reunir y analizar información y así conocer qué lipasas microbianas tienen o pueden tener alguna aplicación en el campo de la Farmacia y cuáles son dichas aplicaciones.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo es una revisión bibliográfica. La información que en él aparece se ha obtenido de artículos científicos que se han encontrado en distintas bases de datos: ScienceDirect, Google Scholar y PubMed. En las búsquedas no ha habido restricción con respecto al idioma. En cuanto a la fecha, la búsqueda se ha restringido a aquellos artículos publicados en los 10 últimos años, si bien también se han revisado artículos publicados con anterioridad que aparecían en la bibliografía de los primeros y con información relevante.

Se realiza una primera búsqueda bibliográfica con el fin de tener una visión general de las investigaciones realizadas sobre las distintas aplicaciones de las lipasas. Se han utilizado palabras clave como: *microbial lipases*, *lipases applications*, *lipases & pharmaceutical applications*, etc.

Una vez hecho esto, se pasa a una segunda fase de búsqueda bibliográfica, centrándose ya en buscar artículos científicos que traten sobre lipasas microbianas concretas que se nombraban en los artículos seleccionados tras la primera búsqueda. Esta vez, en la búsqueda se utilizan palabras como: *Pseudomonas cepacia lipase applications*, *Candida antarctica lipase applications*, *Serratia marcescens lipase*, etc.

En ambas fases, los artículos se seleccionan según se ajuste el título a la información que se busca y también teniendo en cuenta la información que proporciona el resumen de cada uno de ellos.

Por otro lado, se utilizan herramientas informáticas para adaptar las figuras que aparecen (ChemSketch, Photoshop).

## 4. RESULTADOS

Las lipasas microbianas son biocatalizadores versátiles que atraen la atención de la industria debido a su capacidad para soportar temperaturas y pH extremos. También son interesantes por su estabilidad en diferentes solventes orgánicos y porque son activas sin la ayuda de cofactores. <sup>(2, 11)</sup>

Las lipasas que encuentran aplicaciones industriales en la actualidad son producidas principalmente por bacterias y hongos, pero también hay algunas procedentes de levaduras. Algunos ejemplos aparecen en la tabla 1. <sup>(7)</sup>

**Tabla 1.** Ejemplos de microorganismos productores de lipasas. <sup>(7, 9, 12)</sup>

| Fuente            | Género                   | Especie              |
|-------------------|--------------------------|----------------------|
| Bacteria (gram +) | <i>Bacillus</i>          | <i>B. subtilis</i>   |
|                   |                          | <i>B. cereus</i>     |
|                   | <i>Staphylococcus</i>    | <i>S. aureus</i>     |
|                   |                          | <i>S. xylosus</i>    |
|                   | <i>Propionibacterium</i> | <i>P. acnes</i>      |
| Bacteria (gram -) | <i>Pseudomonas</i>       | <i>P. aeruginosa</i> |
|                   |                          | <i>P. cepacia</i>    |
| Hongo             | <i>Mucor</i>             | <i>M. racemosus</i>  |
|                   | <i>Rhizomucor</i>        | <i>R. miehei</i>     |
| Levadura          | <i>Candida</i>           | <i>C. rugosa</i>     |
|                   |                          | <i>C. antarctica</i> |
|                   | <i>Saccharomyces</i>     | <i>S. cerevisiae</i> |
|                   | <i>Yarrowia</i>          | <i>Y. lipolytica</i> |
|                   | <i>Galactomyces</i>      | <i>G. geotricum</i>  |
|                   | <i>Rhodosporidium</i>    | <i>R. babjevae</i>   |
|                   | <i>Cryptococcus</i>      | <i>C. diffluens</i>  |
| <i>C. albidus</i> |                          |                      |

El uso de lipasas en la industria farmacéutica se ha incrementado en los últimos años. La mayoría de las lipasas microbianas encuentran aplicación como catalizadores en la síntesis de fármacos. También tienen importancia en la industria cosmética y pueden utilizarse como herramientas de diagnóstico y biosensores. <sup>(13, 14)</sup>

## 4.1. Síntesis química

En la síntesis química, la biocatálisis con lipasas ofrece numerosas ventajas: enantio y regioselectividad; condiciones suaves que impiden la isomerización, racemización, epimerización y reacciones de transposición; sobreexpresión de enzimas; reutilización de biocatalizadores inmovilizados; economía del proceso; y mutagénesis de las enzimas para funciones específicas. (3, 10)

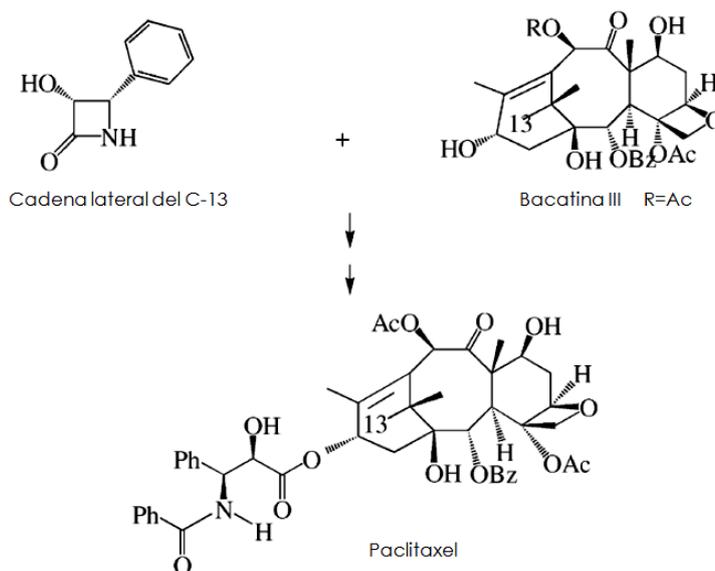
En la actualidad, la capacidad de las lipasas para resolver mezclas racémicas por la síntesis de un solo enantiómero se aprovecha en la producción de fármacos. De hecho, solo uno de los enantiómeros de un fármaco es responsable del efecto terapéutico deseado y aparecen menos efectos secundarios cuando se usan compuestos ópticamente puros que si se emplean mezclas racémicas. (3, 10)

Algunas lipasas se utilizan en la síntesis de enantiómeros puros. Estas moléculas se utilizan en antiinflamatorios (ibuprofeno, naproxeno), anticancerígenos (paclitaxel), antivirales (lobucavir), antihipertensivos (IECAs), bloqueantes de canales de calcio (diltiazem), antihipercolesterolémicos, etc. (7)

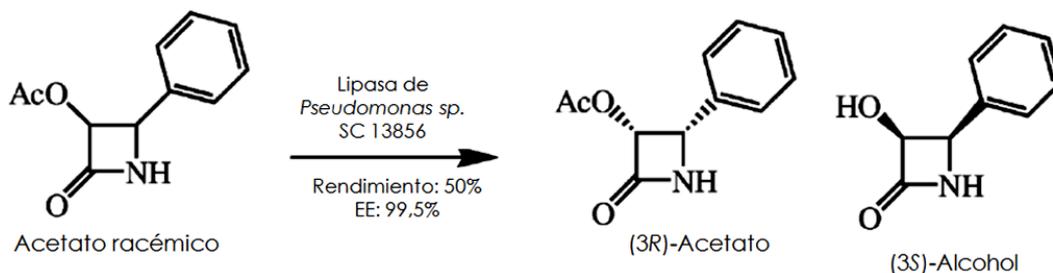
### 4.1.1. Resolución de compuestos químicos racémicos

El paclitaxel es un agente antimitótico que inhibe el proceso de despolimerización de la microtubulina durante la mitosis. (11)

Se obtiene por un proceso semisintético en el que se une bacatina III (paclitaxel sin la cadena lateral del C-13) o 10-diacetilbacatina II (paclitaxel sin la cadena lateral del C-13 y sin el acetato del C-10) a la cadena lateral del C-13 (Figura 2). Dicha cadena lateral se obtiene de la hidrólisis enantioselectiva de acetato-*cis*-3-(acetoxi)-4-fenil-2-azetidiona racémico en el correspondiente (3*S*)-alcohol y el (3*R*)-acetato que se desea (Figura 3). (11, 15)



**Figura 2.** Semisíntesis de paclitaxel mediante la unión de los sintones de bacatina III y la cadena lateral del C-13. (15)



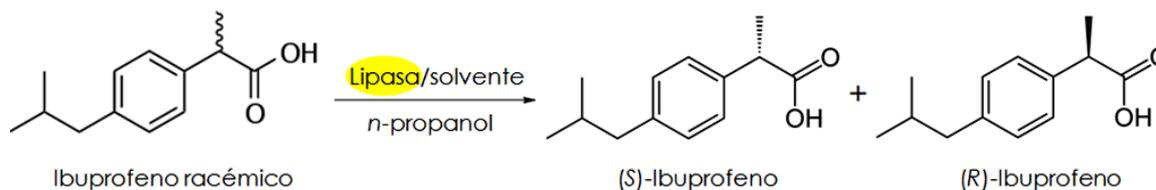
**Figura 3.** Hidrólisis enantioselectiva de acetato-*cis*-3-(acetoxi)-4-fenil-2-azetidiona necesaria para la síntesis de la cadena del C-13 catalizada por la lipasa de *Pseudomonas* sp. SC 13856.<sup>(15)</sup>

Esta hidrólisis es catalizada por la lipasa PS-30 de *Pseudomonas cepacia* o por la lipasa Bristol-Myers Squibb (BMS) de *Pseudomonas* sp. SC13856. Se obtiene un exceso enantiomérico superior al 99,5% para el (3R)-acetato con rendimientos de reacción del 50%.<sup>(15)</sup>

#### 4.1.1.1. Resolución de ácidos carboxílicos racémicos

El ibuprofeno: ácido-2-(4-isobutilfenil)-propiónico, un antiinflamatorio no esteroideo, constituye otro ejemplo de las aplicaciones de las lipasas microbianas. Se trata de una mezcla racémica de dos enantiómeros. La molécula (S)-ibuprofeno es 160 veces más potente inhibiendo la síntesis de prostaglandinas que la molécula (R)-ibuprofeno.<sup>(11, 16)</sup>

Todos los profenos tienen un centro estereogénico, que es el carbono del grupo carboxílico. Como aplicación potencial, puede considerarse la resolución de ibuprofeno racémico por esterificación de (S)-ibuprofeno con metanol o butanol en medio orgánico utilizando una lipasa específica, que conduce a la síntesis del (S)-éster correspondiente. Las lipasas que se utilizan con más frecuencia son la lipasa de *Candida rugosa*, la lipasa de *Rhizopus oryzae* y la lipasa de *Rhizomucor miehei*. Este éster se transforma químicamente en (S)-ibuprofeno, quedando completamente separado del (R)-ibuprofeno (Figura 4).<sup>(7, 16, 17)</sup>



**Figura 4.** Esterificación enantioselectiva de ibuprofeno racémico catalizado por lipasa.<sup>(17)</sup>

### 4.1.1.2. Resolución de ésteres racémicos

La resolución racémica de epoxiésteres representa un paso clave en la producción de un intermedio esencial en la síntesis de diltiazem, un bloqueante de los canales de calcio que constituye una aplicación industrial de las lipasas microbianas importante económicamente. <sup>(11)</sup>

La hidrólisis enantioespecífica es catalizada por una lipasa de *Serratia marcescens* (SmL) (Figura 5). El producto de la reacción, 2(R),3(S)-metil-p-metoxifenilglicidato, se encuentra en un exceso enantiomérico superior al 98% y posteriormente se convierte en diltiazem. <sup>(18)</sup>

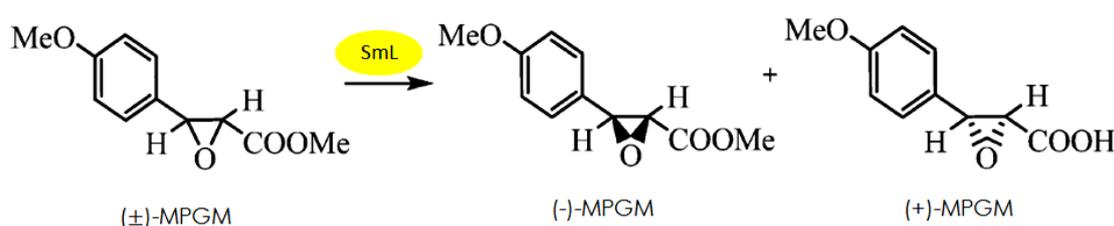


Figura 5. Hidrólisis enantioespecífica de (±)-MPGM catalizada por SmL. <sup>(18)</sup>

## 4.2. Cosmética y perfumería

### 4.2.1. Catalizadores de la síntesis de compuestos cosméticos

La lipasa de *Rhizomucor meihei* se utiliza como biocatalizador en la síntesis de miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo y 2-etilhexilpalmitato, que se emplean como emolientes en protectores solares o aceites de baño. La utilización de esta enzima hace que se obtengan productos de síntesis de mayor calidad, por lo que requieren menos refinamiento. <sup>(5)</sup>

La lipasa inmovilizada de *Staphylococcus xylosus* se utiliza para catalizar la transesterificación de tirosol y acetato de etilo y así obtener acetato de tirosol, que es un antioxidante que se utiliza en productos antienviejimiento y en protectores solares. <sup>(19)</sup>

Por otra parte, los retinoides son productos importantes en el cuidado de la piel y algunos derivados solubles se preparan mediante una reacción catalítica en la que participa una lipasa. <sup>(2)</sup>

### 4.2.2. Componentes de productos cosméticos

Se ha conseguido purificar una lipasa extracelular de *Mucor racemosus* formulándose en carbopol 934 y siendo utilizada en el tratamiento tópico de la celulitis con resultados positivos. <sup>(20)</sup>

También se han utilizado lipasas como componentes de cremas antiobesidad. <sup>(5)</sup>

Además, las lipasas microbianas tienen aplicaciones potenciales en cosmética y perfumería porque muestran actividad en surfactantes y en la producción de aroma. <sup>(2, 14)</sup>

## 4.3. Otras aplicaciones

### 4.3.1. Herramientas de diagnóstico

Las lipasas pueden considerarse como importantes marcadores enzimáticos, por lo que pueden utilizarse como herramientas de diagnóstico. Su presencia o su incremento en el organismo pueden ser indicativos de infección o enfermedad. <sup>(2, 5)</sup> También pueden actuar como factores de virulencia en determinadas patologías. <sup>(21)</sup>

Se ha examinado la presencia de la lipasa de *Propionibacterium acnes* en diversas enfermedades de la piel. <sup>(2,5)</sup> La producción de ácido butírico en dermatitis seborreica axilar (ASD, del inglés *axillary seborrheic dermatitis*) es mayor que en otros tipos de dermatitis. También es mayor en casos de acné que en controles. Se sabe que la cantidad de lipasa de *P. acnes* está estrechamente relacionada con el grado de erupción cutánea en los pacientes que sufren acné. <sup>(22)</sup>

La lipasa de *P. acnes* es el factor patogénico en acné vulgar y los ácidos grasos producidos por dicha lipasa pueden serlo en ASD, por lo que ha sido considerada una diana terapéutica muy importante para los inhibidores de lipasa. <sup>(21, 22)</sup>

### 4.3.2. Biosensores

La utilización de lipasas como biosensores es un campo nuevo y prometedor. La determinación de lípidos con propósito clínico es un uso analítico importante de las lipasas. <sup>(1, 3)</sup>

El fundamento es utilizar una lipasa para generar glicerol a partir de triacilglicerol y cuantificar el glicerol generado, ya sea por un método químico o por un método enzimático. <sup>(11)</sup>

Con este fin, se ha seleccionado una lipasa no específica procedente de *Candida rugosa* para permitir la liberación rápida de glicerol. <sup>(3)</sup>

## 5. CONCLUSIONES

Tras esta revisión bibliográfica se puede llegar a varias conclusiones.

Por un lado, se aprecia que las lipasas microbianas encuentran cada vez más aplicaciones en la industria farmacéutica. Esto puede deberse a diversas razones: presentan gran quimio, regio y enantioselectividad; pueden conseguirse grandes cantidades, ya que son producidas por microorganismos con gran rendimiento; se van conociendo estructuralmente, lo que facilita el diseño racional; y no requieren cofactores.

La importancia de sus aplicaciones ha llevado a la optimización de las reacciones catalizadas por lipasas, a mejoras en la producción y purificación de estas enzimas, así como a la obtención de lipasas con nuevas propiedades catalíticas o una mayor estabilidad, modificando enzimas ya existentes o aislando nuevas lipasas.

El interés en la búsqueda de nuevos inhibidores también puede mejorar el conocimiento sobre las lipasas.

Por otro lado, también es importante destacar que es necesario reducir sus costes de producción para que puedan ser utilizadas más ampliamente. Se trata de enzimas que deben ser activas y estables en determinadas condiciones, para lo cual han de ser inmovilizadas. Por tanto, habrá que desarrollar técnicas que faciliten esta operación y posibiliten el uso de lipasas microbianas en los diferentes procesos de la industria farmacéutica.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Joseph B., Ramteke P.W., Thomas G. *Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments*. *Biotechnology Advances*. 2008; 26:457-470.
2. Nagar M., Dwivedi S.K., Shrivastava D. *A review on industrial application in microbial lipases*. *IJPRS*. Abril 2013; 2(4):631-641.
3. Jaeger KE, Reetz MT. *Microbial lipases form versatile tools for biotechnology*. *Trends biotechnology*. Septiembre, 1998; 16(9):396-403.
4. Verma N., Thakur S., Bhatt A.K. *Microbial lipases: industrial applications and properties. A review*. *IRJBS*. Diciembre, 2012; 1(8):88-92.
5. Hasan F., Shah A. A., Hameed A. *Industrial applications of microbial lipases*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 39:235-251.
6. Momsia T., Momsia P. *A review on microbial lipase-versatile tool for industrial applications*. *IJLBPR*. Octubre 2013; 2(4).
7. Sharma R., Chisti Y., Banerjee UC. *Production, purification, characterization, and applications of lipases*. *Biotechnology advances*. Diciembre, 2001; 19(8):627-662.
8. Thakur S. *Lipases, its sources, properties and applications. A review*. *IJSER*. Julio, 2012; 3(7):1-29.
9. Gupta R., Kumari A., Syal P., Singh Y. *Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology*. *Progress in Lipid Research*. 2015; 57:40-54.
10. Jaeger K.E., Eggert T. *Lipases for biotechnology*. *Current opinion in biotechnology*. 2002; 13 :390-397.
11. Houde A., Kademi A., Leblanc D. *Lipases and their industrial applications. An overview*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2004; 118(1-3):155-170.
12. Arpigny J.L., Jaeger K.E. *Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties*. *Biochem. J*. 1999; 343:177-183.
13. Messias J.M. et. al. *Lipasas microbianas: produção propriedades e aplicações biotecnológicas*. *Semina*. 2011; 32(2):213-234.
14. Fickers P., Destain J., Thonart P. *Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. 2008; 12(2):119-130.
15. Patel R.M. *Microbial/Enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals*. *Enzyme and Microbiological Technology*. 2002; 31:804-826.
16. Navarro-González I., Periago M.J. *Enzimas lipolíticas bacterianas: propiedades, clasificación, estructura, aplicaciones tecnológicas y aspectos legales*. *An. Vet*. 2012; 28:45-65.

17. Yousefi M., Mohammadi M., Habibi Z. *Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Junio, 2014; 104:87-94.
18. Hu B., Pan J., Yu H.L, Liu J.W, Xu J.H. *Immobilization of Serratia marcescens lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of diltiazem intermediate*. Process Biochemistry. 2009; 44:1019-1024.
19. Horchani H., Aissa I., Ouertani S., Zarai Z. Gargouri Y., Sayari A. *Staphylococcal lipases: biotechnological applications*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2012; 76126-132.
20. Mohamed S.A., Abdel-Mageed H.M., Tayel S.A., El-Nabrawi M.A., Fahmy A.S. *Characterization of Mucor racemosus lipase with potential application for the treatment of cellulite*. Process Biochemistry. 2011; 46:642-648.
21. Rueda C. *Microbial lipases with interest in biotechnology and infection diseases*. Universitat de Barcelona. 2005.
22. Higaki S. *Lipase inhibitors for the treatment of acne*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2003; 22:377-384.