

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

**APLICACIÓN DE LIPASAS DE *Candida rugosa* COMO BIOCATALIZADOR
ENANTIOSELECTIVO PARA LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (S)-KETOPROFENO.**

POR:

Q.B.P. Daniela Estrada Valenzuela

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestro en Ciencias en Biotecnología

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

ENERO 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., a 9 de diciembre de 2021.

Oficio: 101/CA/SIP/21

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
P R E S E N T E

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **“APLICACIÓN DE LIPASAS DE *Candida rugosa* COMO BIOCATALIZADOR ENANTIOSELECTIVO PARA LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (S)-KETOPROFENO”**, presentada por la **Q.B.P. Daniela Estrada Valenzuela**, alumna del programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología.

Después de la revisión, indicamos a la tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

A t e n t a m e n t e
“Por la ciencia para bien del hombre”



Dr. David Chávez Flores
Co-Director de tesis



Dr. Gerardo Zaragoza Galán
Asesor de tesis



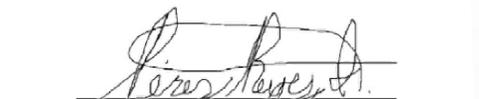
Dra. María de Lourdes Ballinas Casarrubias
Asesora de tesis



Dra. María del Rosario Peralta Pérez
Asesora de tesis



Dra. Beatriz Adriana Rocha Gutiérrez
Directora de tesis



Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado



**El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Circuito Universitario
Campus Universitario #2 C.P. 31125
Tel. +52 (614) 236 6000
Chihuahua, Chihuahua, México
<http://www.fcq.uach.mx>



Chihuahua, Chih., a 17 de Noviembre 2021

DR. JAIME RAÚL ADAME GALLEGOS
COORDINADOR ACADÉMICO, SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

Por medio de la presente me permito saludarle y hacerle de su conocimiento que he leído y revisado el trabajo de tesis “**APLICACIÓN DE LIPASAS DE *Candida rugosa* COMO BIOCATALIZADOR ENANTIOSELECTIVO PARA LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (S)-KETOPROFENO.**” que presenta la estudiante Daniela Estrada Valenzuela de la Maestría en Ciencias en Biotecnología con número de matrícula 291826.

Después de leerlo y sugerir cambios, por medio de la presente libero este trabajo para que sea revisado por sus asesores y esperar sus sugerencias.

Sin más por el momento, agradeciendo la atención prestada.

DRA. BEATRIZ ADRIANA ROCHA GUTIERREZ
DIRECTORA DE TESIS

DR. DAVID CHAVEZ FLORES
CO-DIRECTOR DE TESIS



DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a mi hermano Marco A. Valenzuela Ruiz.

Te amo y te extraño siempre.



AGRADECIMIENTOS

A mi familia, quienes siempre serán el pilar más importante en la construcción de la persona que soy ahora, pendientes siempre de mis necesidades y de que no me faltaran las fuerzas para alcanzar lo inalcanzable. Agradecer a mi madre de quien conocí que la fuerza sobrenatural existe y de quien aprendí que la vida tiene muchos más caminos de los que uno cree.

Agradezco a mis amigos, mis hematoamigos y compañeros de maestría así como a mis compañeros de laboratorio porque este trabajo es tan mío como suyo, son un gran equipo y una gran familia para mí.

También Agradezco a los Doctores que participaron en este proyecto así como a mis directores de tesis la Dra. Beatriz Rocha el Dr. David Chávez por su motivación y sobre todo por hacer que todo parezca fácil, por guiarme y tener la paciencia de enseñarme, de usted aprendí la importancia de hacer las cosas por uno mismo y a ver la ciencia con pasión.

A la Dra. Isaura por brindarme la oportunidad de saber como hacer ciencia fuera de México pero sobre todo por ser tan humana y abrirme las puertas de su casa.

Y por último a una persona que en poco tiempo se ha ganado mi amor y mi respeto, Mauricio. Quien me ha motivado a seguir cuando los días parecen ser difíciles y me enseñó a siempre querer crecer como persona.

Las personas que me rodearon durante todo este tiempo hasta alcanzar mis metas y cada uno de ellos fue una parte fundamental para lograrlo.

Infinitas gracias a Dios y al universo.



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1 MOLÉCULAS QUIRALES.....	4
2.2 FÁRMACOS QUIRALES.....	4
2.3 RESOLUCIÓN QUIRAL	5
2.4 CATÁLISIS ENZIMÁTICA.....	7
2.5 ESTRUCTURA, NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS.	9
2.5.1. ESTRUCTURA DE ENZIMAS.	9
2.5.2 NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS.....	10
2.6 LIPASAS	12
2.6.1. FUNCIÓN BIOLÓGICA.....	12
2.6.2. ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACCIÓN.....	13
2.6.3 REACCIONES CATALIZADAS POR LIPASAS.....	13
2.7 <i>Cándida rugosa</i> lipasa	13
2.8 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS	14
2.8.1 CLASIFICACIÓN DE LOS AINES	15
2.8.2. GENERALIDADES DE LOS PROFENOS (PROs).....	16
2.8.3. KETOPROFENO (KTP).....	18
2.9 ENANTIOSELECTIVIDAD (<i>E</i>)	18
2.10 EXCESO ENANTIOMÉRICO (<i>ee</i>)	19
III. ANTECEDENTES	21



IV. OBJETIVOS	24
4.1 GENERAL	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
V. JUSTIFICACIÓN.....	25
6.1 EXTRACCIÓN DE KETOPROFENO	26
6.2 CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.	27
6.3 SELECCIÓN DE ALCOHOL Y SOLVENTE PARA LA REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN.....	27
6.4 SÍNTESIS DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO.....	28
6.5 HIDRÓLISIS DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO.....	28
6.5.1 HIDRÓLISIS ÁCIDA DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO EN REFLUJO.	28
6.5.2 HIDRÓLISIS BÁSICA DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO EN REFLUJO.	28
6.5.3 HIDRÓLISIS BÁSICA DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO POR MICROONDAS.....	29
6.5.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO.	29
6.5.5 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO POR MICROONDAS.	30
6.5.6 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO POR SONICACIÓN	30
6.6 RACEMIZACIÓN DE (S)-KETOPROFENO	30
6.6.1 RACEMIZACIÓN ÁCIDA DE (S)-KETOPROFENO EN REFLUJO	30
6.6.2 RACEMIZACIÓN BÁSICA DE (S)-KETOPROFENO EN REFLUJO	31
6.6.3 RACEMIZACIÓN BÁSICA DE (S)-KETOPROFENO EN SONICACIÓN....	31
6.6.4 RACEMIZACIÓN BÁSICA DE (S)-KETOPROFENO EN MICROONDAS..	31



6.7 SINTESIS DE ESTERES TERPENICOS DE (S)-KETOPROFENO (SKP, SKG Y SKF).....	32
6.8 MODELADO MOLECULAR.....	33
6.8.1 PREPARACIÓN DEL LIGANDO Y DE LAS ENZIMAS	33
6.8.2 ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	34
6.9 EVALUACIÓN IN SILICO DE ESTERES TERPENICOS DE KETOPROFENO	34
6.9.1 PASS (Predicción del Espectro de Actividad Biológica Para Sustancias)..	34
6.9.2 SwissADME: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción	34
6.9.3 AdmetSAR: Predicción de las propiedades farmacocinéticas.....	35
VII. RESULTADOS.....	35
7.1 EXTRACCIÓN DE KETOPROFENO.....	35
7.2 CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.....	36
7.3 SELECCIÓN DE ALCOHOL Y SOLVENTE PARA LA REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN.....	37
7.5 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO.....	39
7.6 RACEMIZACIÓN DE (S)-KETOPROFENO.....	42
7.7 SINTESIS DE ESTERES TERPENICOS DE (S)-KETOPROFENO (SKP, SKG Y SKF).....	42
7.8 MODELADO MOLECULAR.....	45
7.9 EVALUACIÓN IN SILICO DE ESTERES TERPENICOS DE KETOPROFENO	56
6.9.3 AdmetSAR: Predicción de las propiedades farmacocinéticas.....	61
VII. CONCLUSIÓN.....	64
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	65



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Métodos para la obtención de enantiómeros puros (modificado de toledo, 2015).	6
Figura 2. Niveles estructurales de proteínas. a) primaria, b) secundaria, c) terciaria y d) cuaternaria (josé, 2013).	9
Figura 3. Función biológica de lipasas: hidrólisis de triglicéridos (modificado de toledo, 2015).	12
Figura 4. Estructura 3D de cándida rugosa lipasa (obtenida de cygler & schrag, 1999).	14
Figura 5. Clasificación de aines (modificado de rodríguez bernardino, 2005).	16
Figura 6. Estructura general de los ácidos 2-arilpropionicos (ibáñez, 2018).	17
Figura 7. Molécula de Ketoprofeno.	18
Figura 8. Secuencia de la extracción de Ketoprofeno a partir de tabletas comerciales.	26
Figura 9. Hidrolisis ácida del (s)-decil éster de Ketoprofeno.	28
Figura 10. Hidrolisis básica del (s)-decil éster de Ketoprofeno.	28
Figura 11. Tubos de 10 mL para reacciones de síntesis en microondas.	29
Figura 12. Reacción de hidrolisis enzimática del (S) decil éster de Ketoprofeno.	30
Figura 13. Reacción de racemización por formación de enolato.	32
Figura 14. Síntesis de esteres terpenicos (S)-Ketoprofenato de prenilo [a], (S)-Ketoprofenato de geranilo [b] y (S)-Ketoprofenato de farnesilo [c].	33
Figura 15. Programa computacional pass online (http://www.way2drug.com/passonline).	34
Figura 16. Programa computacional swissadme (http://www.swissadme.ch/).	35
Figura 17. Plataforma admesar (http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/predict/).	35
Figura 18. a) Identificación de (S)-Ketoprofeno, enantiómero puro tr 12.5 min. b) identificación de (R, S)-ketoprofeno tr (R)-Ketoprofeno 9.5 min (S)-Ketoprofeno 12.5 min análisis por HPLC.	36
Figura 19. Cromatograma de la síntesis de (S)-decil éster de ketoprofeno monitoreado durante 72 horas.	39



Figura 20. Monitoreo de la esterificación del (S)-Ketoprofenato de prenilo.	43
Figura 21. monitoreo de la esterificación del (S)-Ketoprofenato de geranilo.	44
Figura 22. Monitoreo de la esterificación del (S)-Ketoprofenato de farnesio.	45
Figura 23. Interacción molecular COX-1 y (R)- Ketoprofeno.....	46
Figura 24. Interacción molecular COX-2 y (R)-Ketoprofeno.....	47
Figura 25. Interacción molecular COX-1 y (S)-Ketoprofeno.....	48
Figura 26. Interacción molecular COX-2 y (S)-Ketoprofeno.....	49
Figura 27. Interacción molecular COX-1 Y SKP.....	50
Figura 28. Interacción molecular COX-2 Y SKP.....	51
Figura 29. Interacción molecular COX-1 Y SKG.	52
Figura 30. Interacción molecular COX-2 Y SKG.	53
Figura 31. Interacción molecular COX-1 Y SKF.....	54
Figura 32. Interacción molecular COX-2 Y SKF.....	55
Figura 33. Estructura molecular del (S)-Ketoprofenato de prenilo (SKP).....	57
Figura 34. Estructura molecular del (S)-Ketoprofenato de geranilo (SKG).	58
Figura 35. estructura molecular del (S)-Ketoprofenato de farnesilo (SKF).	58



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de enzimas según su actividad biocatalítica y grupos funcionales sobre el que interactúa. (modificado de José, 2013)	11
Tabla 2. Selectividad del fármaco hacia COX (modificado de Rodríguez Bernardino, 2005).	17
Tabla 3. Reacciones de esterificación de AINES empleando diversas lipasas.	22
Tabla 4. Porcentaje de conversión en la reacción de esterificación variando alcohol y solvente.	38
Tabla 5. Hidrólisis de (S)-decil éster de Ketoprofeno.	41
Tabla 6. Racemización de (S)-Ketoprofeno.	42
Tabla 7. Energía libre de unión (ΔG) en las interacciones moleculares entre las COX y los fármacos de investigación (Kcal/mol).	56
Tabla 8. Predicción de la actividad biológica del SKP determinada por Pass online.	57
Tabla 9. Predicción de la actividad biológica del SKG determinada por Pass online.	58
Tabla 10. Predicción de la actividad biológica del SKF determinada por Pass online.	59
Tabla 11. Propiedades fisicoquímicas del SKP, SKG Y SKF.	61
Tabla 12. Propiedades farmacocinéticas del SKP, SKG y SKF.	62

RESUMEN

El Ketoprofeno comercializado a nivel mundial principalmente como mezcla racémica, pertenece a la familia de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) conocidos como profenos. Los estudios demuestran que el (S)-Ketoprofeno es 160 veces más potente que el (R)-Ketoprofeno in vitro, mientras que la acumulación de (R)-Ketoprofeno puede causar efectos secundarios graves, como dolor gastrointestinal. Se utilizaron lipasa de *Candida rugosa* para esterificar enantioselectivamente el Ketoprofeno racémico con etanol, 1-butanol y 1-decanol en 2,2,4-trimetilpentano como disolvente obteniendo una relación enantiomérica (*E*) de hasta 63.17 con conversiones de 44.6%. La separación por extracción líquido-líquido de (R)-Ketoprofeno y alcohol residual del enantioselectivamente esterificado (S)-alquil éster de Ketoprofeno fue posible mediante la adición de solución de carbonato de sodio para inducir la producción de sal de sodio soluble en fase acuosa. Se desarrolló la hidrólisis enzimática del éster de (S)-alquil Ketoprofeno utilizando Tween 80 el cual es un surfactante empleado como agente solubilizante en una solución tampón de fosfatos a pH 7. Finalmente, el (R)-Ketoprofeno no reaccionado o discriminado por la enzima en la reacción de esterificación enantioselectiva se racemizó mediante un tratamiento con una solución alcalina por un equilibrio enólico. La esterificación enantioselectiva, la racemización y la hidrólisis del éster de Ketoprofeno combinadas representan un ciclo de reacciones respetuosas con el medio ambiente y a través de las cuales se puede obtener (S)-Ketoprofeno con un exceso enantiomérico superior al 99% y en rendimientos teóricos de 100% ya que todo el (R, S)-Ketoprofeno se puede convertir en (S)-Ketoprofeno.



I. INTRODUCCIÓN

La quiralidad es un fenómeno muy importante dentro del área de la química farmacéutica debido a la gran cantidad de fármacos que poseen dicha característica (Álvarez Álvarez, 2006). Algunos fármacos que presentan enantiómeros suelen crear interacciones dentro del organismo no solo con proteínas, sino también con tejidos y lípidos intramembranales (Ortega et al., 2015).

Actualmente numerosos fármacos son administrados clínicamente en forma de mezcla racémica con una proporción al 50:50 de los dos enantiómeros. Generalmente solo uno de los dos enantiómeros es quien presenta la actividad biológica deseada y es denominado como eutómero, mientras que el distómero se define como el enantiómero quien puede inhibir el efecto biológico deseado del eutómero, puede presentar un efecto inocuo o por otro lado puede presentar un efecto indeseado para el organismo (Álvarez Álvarez, 2006).

El Ketoprofeno, 2-(3-benzoilfenil) ácido propiónico, es un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (NSAID) inhibiendo la síntesis de prostaglandinas a través de la inhibición de la Ciclooxygenasa de tipo II (COX-2). Ketoprofeno ha demostrado una alta eficiencia en el tratamiento de artritis reumatoide así como también para tratamiento contra la osteoartritis (Huang et al., 2006). Reportes demuestran que el efecto terapéutico deseado se le atribuye al enantiómero *S*, mientras que el enantiómero *R* es quien puede presentar efectos indeseados a nivel sistema nervioso central, gastrointestinal y renal. Aunque por otro lado diversos estudios reportan que el *R*-enantiómero es eficaz contra el dolor de muelas (Ong et al., 2006a).

Sin embargo, la administración de enantiómeros puros demuestra tener ventajas sobre el uso de racémicos, con respecto a eficiencia y la efectividad que estos puedan aportar.

Actualmente el 56% de los fármacos que se comercializan son drogas quirales y el 86% son distribuidas como mezclas racémicas. La resolución cinética enzimática es uno de los métodos más populares para la generación o síntesis de compuestos químicos ópticamente puros (Ong et al., 2006). En recientes años, algunas lipasas se han aplicado con éxito para la resolución del (*R*, *S*)-Ketoprofeno mediante



esterificación enantioselectiva principalmente, directa en medios orgánicos o hidrólisis enantioselectiva de su éster racémico sintetizado químicamente (Erick Henke et al., 2000). Las lipasas de *cándida rugosa* y de páncreas de puerco son enzimas lipolíticas intracelulares que han evidenciado (S)-preferencia en la resolución de Ketoprofeno racémico (Chávez-Flores & Salvador, 2009).



II. ANTECEDENTES

2.1 MOLÉCULAS QUIRALES

El término de la quiralidad ha sido empleado en la química aproximadamente desde 1870 (Leffingwell, 2003). La quiralidad se le atribuye a la molécula cuando su imagen especular no es superponible (Sánchez & Vidal, 2017) y las dos imágenes no superponibles especularmente resultantes de la molécula quiral, son llamadas enantiómeros (Nguyen et al., 2006) los cuales se presentan cuando la molécula cuenta con la presencia de un carbono α contiguo al carbono carboxílico, que cuenta con cuatro sustituyentes diferentes, el cual es nombrado “carbono quiral” (Singh & Sharma, 2018). Sin embargo, el carbón no es el único átomo que puede tomar la función de centro estereogénico, átomos como el nitrógeno, el azufre y el fósforo, también pueden fungir como centros quirales. El giro de la molécula es determinado por la importancia de los sustituyentes, la cual se asigna según el número atómico. Y son denominadas como levógiro o dextrógiro. Dependiendo de si la desviación se da a la derecha (D-isómero) o a la izquierda (L-isómero) en el plano de polarización de la luz (Nguyen et al., 2006). Esta propiedad es determinada mediante la técnica de polarimetría. Cuando la cantidad del isómero (+) es igual a la cantidad del isómero (-) se dice que existe una mezcla racémica 50-50% y no se produce una desviación en el plano de luz polarizada. Actualmente según las reglas de Cahn-Ingold-Prelog la forma más apropiada de nombrar a un enantiómero es *R/S*. Si la molécula tiene sus sustituyentes con un orden de decreción con respecto al sentido horario, la molécula se denomina *R* (del latín *Rectus*, derecha), por otro lado, cuando los sustituyentes de la molécula decrecen en sentido contrario al reloj se denominan *S* (del latín *Sinister*, izquierda). Sin embargo, la denominación *R/S* no es directamente proporcional al sistema +/- . Un isómero *R* o *S* puede ser tanto dextrógiro como levógiro (Ibáñez, 2018).

2.2 FÁRMACOS QUIRALES

Debido al hecho de que los organismos vivos presentan mayormente un entorno conformado por macromoléculas asimétricas ordenadas, es fácil entender el efecto



que tienen diferentes enantiómeros de un mismo compuesto sobre el medio biológico. Ya que es esa asimetría quien proporciona la información precisa para diferenciar entre sustratos monoméricos y sus isómeros ópticos. Como lo son aminoácidos y azúcares. En la mayoría de los casos la actividad farmacológica se asocia solo a uno de los isómeros ópticamente activos. Es decir, solo uno de los enantiómeros presenta actividad terapéutica mientras que el otro puede o no presentar actividad, ya el mecanismo de acción implica interacciones específicas que se crean entre el enantiómero y los receptores naturales o enzimas del medio biológico. Es por esto que uno de los principales objetivos del área farmacológica abarca la síntesis de compuestos enantioméricamente puros, lo cual hasta el momento representa grandes desafíos en la química orgánica desde el punto de vista académico y comercial (Jiménez Blanco, 1996; Williams & Lee, 1985).

La acción terapéutica de un fármaco es el resultado de procesos tanto farmacocinéticos como farmacodinámicos mediante los cuales el fármaco al entrar en contacto con el organismo es metabolizado, ejerce su función y posteriormente sale del organismo. Por otro lado algunos fármacos pueden experimentar una inversión quiral unidireccional, donde el enantiómero inactivo pasa al enantiómero activo en sistemas in vivo, esto debido a los procesos metabólicos que se desencadenan en el sistema biológico quiral, sin embargo este fenómeno es ampliamente variable según diversos factores como lo son el fármaco, la especie y el estado fisiológico (Carvalho et al., 2006; Martínez Pérez, 2012).

Dentro de las ventajas que pueden ofrecer el uso de enantiómeros puros se encuentra la alta selectividad del perfil farmacológico en el fármaco, un mayor índice de eficacia terapéutica, así como una disminución toxicológica al organismo (Martín & Hoyos Vidal, 2017).

2.3 RESOLUCIÓN QUIRAL

La resolución quiral o también denominada, separación quiral es en la actualidad la forma de obtener los dos enantiómeros de un mismo compuesto racémico en la industria química. En la Figura 1 podemos observar los diversos métodos que en la actualidad se efectúan con la finalidad de la obtención de enantiómeros puros.

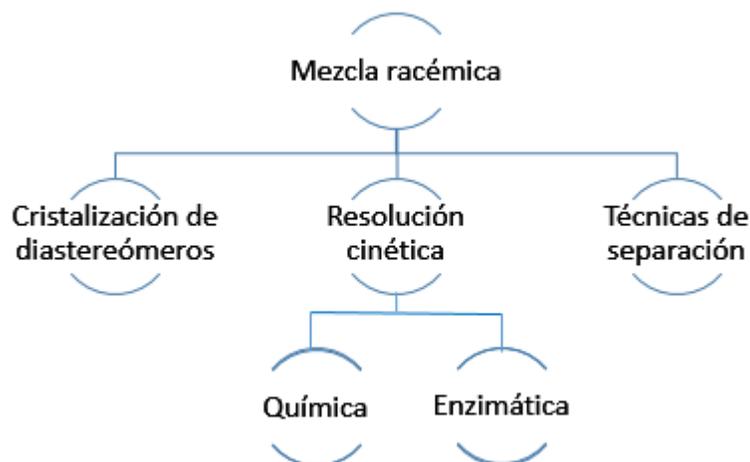


Figura 1. Métodos para la obtención de enantiómeros puros (modificado de toledo, 2015).

Los principales métodos de resolución enantiomérica son cristalización, resolución cinética y cromatografía. Sin embargo, no son los únicos métodos capaces de la separación de isómeros. También se explotan técnicas como electroforesis capilar, extracción con solventes y resoluciones que emplean el uso de un receptor, por otra parte el costo del proceso puede ser un factor importante en la selección del método que se utilizara, así como la cantidad de desechos generados durante el proceso (Toledo, 2015).

La cristalización es uno de los principales sistemas en la industria para la obtención de enantiómeros puros, durante su proceso se emplean técnicas como la cristalización de diastereómeros, la cual requiere de un agente de resolución y la cristalización preferencial. En la cristalización por formación de sales diastereoméricas se da la separación de ambos productos para posteriormente ser tratados con solventes y de esa manera obtener los enantiómeros puros. Por otra parte, la cristalización por preferencia se da sin la presencia de agentes de resolución. Esta técnica consiste más bien en la sobresaturación de un enantiómero para de esa forma lograr una cristalización y del enantiómero deseado y una posterior separación.

A pesar de la gran importancia que representa para la industria farmacéutica la



cristalización para la obtención de enantiómeros puros, está representa grandes desventajas con respecto al uso de solventes que en esta se emplean al momento de realizar la extracción y lavados para la obtención de las sales, sin embargo los rendimientos obtenidos por esta metodología suelen ser no lo suficientemente buenos, por otra parte, esta sistemática representa altos gastos de energéticos dado que durante el proceso, es necesaria la aplicación de altas y bajas temperaturas para la solubilizarían de dichas sales formadas. En resumen esta técnica supone un alto consumo energético y empleo de tiempo sin la obtención de altos rendimientos de extracción (Ong et al., 2006a).

Por otra parte, la síntesis asimétrica se lleva a cabo en un entorno quiral dando paso a que un material proquiral o no quiral se convierta en un material quiral, sin embargo, requiere de catalizadores químicos convencionales para llevar a cabo la reacción, los cuales generalmente suelen ser tóxicos dando como resultado productos no aptos para el contacto humano. Además de representar un riesgo para la salud, los catalizadores químicos suelen ser difíciles de preparar, las reacciones suelen ser de alto riesgo y tienen un elevado costo en el mercado.

En cuanto a la resolución por cromatografía se emplea el uso de una fase estacionaria quiral que generalmente se puede emplear de dos diversas maneras, en la primera se selecciona una adecuada fase estacionaria quiral y en la segunda se lleva a cabo por medio de una derivatización del soluto racémico seguido de la selección de a fase estacionara quiral. Generalmente el uso de resolución por cromatografía suele ser poco común debido a los bajos rendimientos de reacción y a que el tiempo invertido durante el proceso suele ser alto. Preferentemente la cromatografía por HPLC se emplea como método analítico (Ong et al., 2006; Toledo, 2015).

Actualmente una de las metodologías más empleadas suele ser la biocatálisis enzimática o también conocida como catálisis, dada su amabilidad con el ambiente y sus altos rendimientos de reacción.

2.4 CATÁLISIS ENZIMÁTICA

La biocatálisis hace referencia al uso de sustancias de origen biológico como



catalizadores para de esa forma desarrollar transformaciones químicas con interés industrial, este método ofrece grandes ventajas respecto a reacciones con una alta selectividad y un proceso más limpio, seguro y ambientalmente responsable (García Galán, 2014).

Los catalizadores enzimáticos se han empleado a lo largo de la historia y han sido de un gran apoyo para la humanidad hablando no solo específicamente del área industrial, ha sido tal el impacto de dichos catalizadores que se han empleado en procesos de producción y conservación de productos cotidianos como lo son el vino, la cerveza, el queso y los vinagres. Sin embargo, fue hasta 1858 que se emplearon estos catalizadores biológicos en el área del conocimiento. Narrado en sus memorias, Pasteur escribió *“La mayoría de los productos naturales, los productos esenciales para la vida son asimétricos y poseen tal asimetría que sus imágenes no son superponibles. Esto establece tal vez la única línea de demarcación que al presente puede trazarse entre la química de la materia sin vida y la química de la materia viviente”*. Considerado desde entonces como un precursor de la resolución cinética empleando enzimas. Todo esto no fue más que gracias a su trabajo en la resolución de ácido tartárico racémico catalizado por enzimas del hongo *Penicillium glaucum*.

Fue hasta 1897 que Eduard Buchner derroco la idea de que se requerían células viables para los procesos biocatalíticos, dando paso a lo actualmente implementado, donde se usan extractos celulares o enzimas parcialmente purificadas. En el área farmacéutica generalmente se trabaja con moléculas lábiles y en una gran cantidad de veces se trabaja con moléculas quirales, se considera que el 10% de los fármacos que actualmente se comercializan, son producto de una síntesis catalizada por enzimas. Donde no conviene trabajar a altas temperaturas y se requiere una alta especificidad de sustrato. Las enzimas permiten la obtención de fármacos una elevada pureza debida a que cuentan con una definida estructura tridimensional asimétrica, lo cual ofrece ventajas sobre la obtención de moléculas puras ya sean fármacos, hormonas o antibióticos (Arroyo, 1998; Guevara-Pulido et al., 2017).

2.5 ESTRUCTURA, NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS.

2.5.1. ESTRUCTURA DE ENZIMAS.

Las enzimas son proteínas que suelen provenir de organismos vivos como los son los microorganismos, sin embargo, también pueden ser de procedencia animal o vegetal. Estas proteínas tienen la principal función de llevar a cabo procesos de catálisis de reacciones *in vivo* involucrando sustratos tanto vivos como no vivos.

La estructura de las enzimas al igual que como el resto de las proteínas suele ser primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. En las cuales la primaria está conformada por una secuencia de aminoácidos unidos por un enlace peptídico, la estructura secundaria está constituida por una cadena polipeptídica unida por puentes de hidrógeno y le dan una conformación denominada alfa-hélice o beta-plagada. Casi por último la estructura terciaria hace referencia al acomodo de la proteína en forma globular la cual se forma debido a enlaces disulfuro entre grupos tiol adyacentes e interacciones entre grupos carboxilo libres y grupos amino unidos por enlaces iónicos. Mientras que la conformación de varias subunidades unidas de manera no covalente da como resultado la conformación de la estructura cuaternaria (Figura 2).

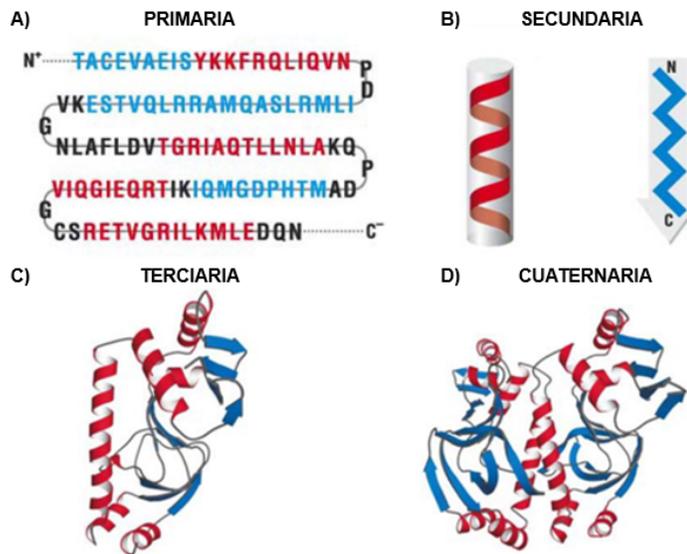


Figura 2. Niveles estructurales de proteínas. a) primaria, b) secundaria, c) terciaria y d) cuaternaria (José, 2013).



Es por su estructura proteica que las enzimas suelen tener diversos cambios dependiendo del entorno. Generalmente cuando se presentan pequeños cambios de pH o variaciones en la temperatura apta para el desarrollo de funciones de la enzima, no suele desnaturalizarse, pero sin embargo si suele haber una disminución en la actividad enzimática. Por otra parte, los cambios extremos respecto a la concentración de sales, presencia de disolventes orgánicos, un pH o temperaturas extremas pueden llevar a la desnaturalización enzimática, perdiéndose por completo las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria dando como resultado la perdida de funcionalidad de la enzima. Por lo general el pH óptimo de actividad enzimática es neutro, mientras que la temperatura oscila entre los 37 y 45°C (Arroyo Sánchez, 1995).

2.5.2 NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS.

Según la comisión internacional de enzimas se recomienda una nomenclatura sistémica (Tabla 1) en la cual cada enzima recibe un nombre recomendado (corto y de uso cotidiano), nombre sistemático (reacción que cataliza) y un número único para cada enzima. Este es designado por la comisión de enzimas y se designa según la clase, subclase y sub-subclase a la que pertenece la enzima (José, 2013).

Tabla 1. Clasificación de enzimas según su actividad biocatalítica y grupos funcionales sobre el que interactúa.
(modificado de José, 2013)

<p>1.- OXIDO REDUCTASAS Catalizan reacciones de óxido-reducción</p>	<p>1.1 - Sobre alcoholes >-OH 1.2 - Sobre cetonas > C= O 1.3 - Sobre alquenos > =CH- 1.4 - Sobre grupos amino -NH₂ 1.5 - Sobre grupos imino =NH</p>
<p>2.- TRANSFERASAS Catalizan la transferencia de grupos funcionales</p>	<p>2.1 - Grupos de un átomo de C 2.2 - Grupos aldehídicos o cetónicos 2.3 - Grupos acilo 2.4 - Grupos glucosilo 2.5 - Grupos fosfato 2.6 - Grupos que contienen azufre</p>
<p>3.- HIDROLASAS Catalizan reacciones de hidrólisis</p>	<p>3.1 - Ésteres 3.2 - Enlaces glucosídicos 3.4 - Enlaces peptídicos 3.5 - Otros enlaces C-N 3.6 - Anhídridos de ácido</p>
<p>4. LIASAS Catalizan la adición a dobles enlaces</p>	<p>4.1 - >C=C< 4.2 - >C=O 4.3 - >C=N-</p>
<p>5.- ISOMERASAS</p>	<p>5.1 – Racemasas y Epimerasas</p>
<p>6.- LIGASAS Catalizan la formación de enlaces con escisión de ATP</p>	<p>6.1 - Entre átomos de C-O 6.2 - Entre átomos de C-S 6.3 - Entre átomos de C-N 6.4 - Entre átomos de C-C</p>

Dentro de estos 6 grupos únicamente 3 han sido reportados para catalizar reacciones de polimerización in vitro (hidrolasas, óxido-reductasas y transferasas). Las hidrolasas han sido de mayor estudio dentro de reacciones de síntesis in vitro.

Dentro de esta clase se encuentran las glicosidasas ampliamente usadas en la síntesis de polisacáridos, las proteasas enzimas cuya función es la formación de enlaces peptídicos y por ultimo las lipasas que son las encargadas de llevar a cabo reacciones de síntesis e hidrólisis de ácidos grasos (Herrera Kao, 2014).

2.6 LIPASAS

2.6.1. FUNCIÓN BIOLÓGICA

Las lipasas (triacilglicerol ésterhidrolasas, EC 3.1.1.3) son enzimas hidrolíticas responsable de la hidrólisis de triglicéridos de grasas tanto vegetales como animales dando como resultado ácidos grasos libres y glicerol. Dentro de los productos intermedios se encuentran mono y diglicéridos como se muestra en la Figura 3.

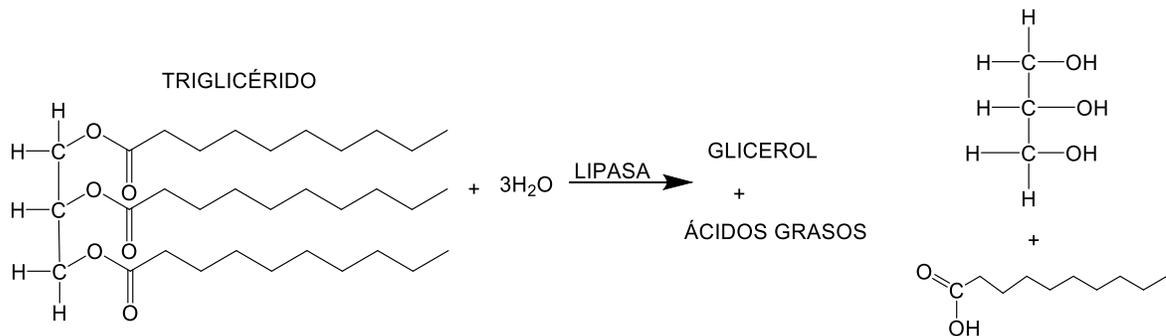


Figura 3. Función biológica de lipasas: hidrólisis de triglicéridos (modificado de toledo, 2015).

La actividad interfacial es un fenómeno denominado así por la activación de la lipasa en un medio orgánico-acuoso dando como resultado una emulsión formada por el sustrato de los triglicéridos.

Generalmente en medios acuosos homogéneos el sitio activo de la enzima se encuentra en un estado cerrado o cubierto por algo denominado tapadera, la cual impide el paso de los sustratos, sin embargo, en presencia de un medio orgánico-acuoso, la enzima se modifica desplazando el recubrimiento y permitiendo el libre paso del sustrato al sitio activo. Algunas características específicas de la enzima tales como la estabilidad, enantioselectividad, actividad y la modulación se podrían verse influenciadas debido a dicho recubrimiento (José, 2013; Toledo, 2015).



2.6.2. ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACCIÓN.

Generalmente el tipo de cinética de reacción de las lipasas no se ajusta al modelo de Michaelis Menten si no que es mucho más complejo (Vivero, 2008).

La estructura de las lipasas suele estar conformada por un modelo α/β hidrolasa en el que el núcleo está conformado por laminas beta paralelamente ordenadas, a su vez estas beta laminas están rodeadas por alfa hélices. Generalmente las lipasas tienen una triada catalítica con una conformación aminoacídica de serina que actúa como nucleófilo, histidina que funciona como estabilizante y un ácido ya sea glutámico o aspártico.

Por lo general, excepto en la cutinasa (enzima encargada de la hidrólisis de polímeros lipídicos de cutina) el sitio activo de las lipasas se encuentra impedido para el sustrato ya que la conformación estructural de la lipasa cuenta con una plegación en arreglo de bucle que interfiere con el disolvente. Este fenómeno se asocia al contacto interfacial lípido-agua (José, 2013; Martínez Pérez, 2012). Dado que el sustrato natural de las lipasas son las grasas y aceites es necesaria la interface para el correcto funcionamiento de la lipasa.

2.6.3 REACCIONES CATALIZADAS POR LIPASAS.

Las lipasas a pesar de su amplia especificidad respecto al enlace químico sobre el cual actúan, pueden realizar reacciones como la hidrólisis, esterificación, amidación, tioesterificación por las cuales a su vez se dividen en alcoholólisis (alcohol-éster), acidólisis (éster-ácido carboxílico) e interesterificación (éster-éster). Estas se pueden llevar a cabo en medios acuosos libres o no de solventes orgánicos, es la concentración de agua quien determina si se da una reacción de hidrólisis o síntesis del enlace éster. Es por ello que son consideradas promiscuas y se les han atribuido grandes beneficios respecto a su uso en el área farmacéutica (Martínez Pérez, 2012).

2.7 *Cándida rugosa* lipasa

Cándida rugosa es una de las levaduras con mayor capacidad de producir lipasas esta levadura posee ciertas características dentro de las que se encuentran:

- No esporogénica
- Hemiascomiceto
- Unicelular
- No patogénica

Esta lipasa extracelular es considerada una glicoproteína de 60 kDa constituida por 4,2% de manosa y rica en aminoácidos hidrófobos (Leucina e isoleucina) (Figura 4) (Vivero, 2008).



Figura 4. Estructura 3D de *Candida rugosa* lipasa (obtenida de cygler & schrag, 1999).

Con el uso de las lipasas dentro del área industrial se han logrado la obtención de productos de interés farmacéutico dentro de los que destacan el grupo de los antiinflamatorios no esteroideos, grupo de fármacos también conocidos como profenos (ácidos 2-arilpropionicos) de estructura genérica (Hernáiz, 2012).

2.8 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

Los fármacos denominados como antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son un amplio grupo de fármacos caracterizados por eliminar el dolor sin bloquear impulsos



nerviosos. Este grupo se caracteriza por presentar propiedades antiinflamatorias, analgésicas, antiagregantes, así como también antipiréticas y son de los grupos terapéuticos más ampliamente empleados a nivel mundial. Se estima que aproximadamente por día se consumen por más de 30 millones de habitantes a nivel mundial. Por otra parte, suelen presentarse efectos adversos principalmente a nivel gastrointestinal y renal. Es posible suponer que estos efectos son provocados por una mala dosificación y suelen desaparecer tras suspender el tratamiento (Ibáñez, 2018).

Los AINES tienen como función principal la inhibición de las prostaglandinas que son las encargadas de la modulación de la fiebre, dolor e inflamación. Por medio de la inhibición enzimática de la ciclooxigenasa por ello también son denominadas como fármacos anticiclooxigenasa (Toledo, 2015).

2.8.1 CLASIFICACIÓN DE LOS AINES

Existen diversos criterios en cuanto a la clasificación de los AINES dentro de los que se encuentran la acción terapéutica y el mecanismo de acción, en la Figura 5 se da una breve clasificación de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos más relevantes.

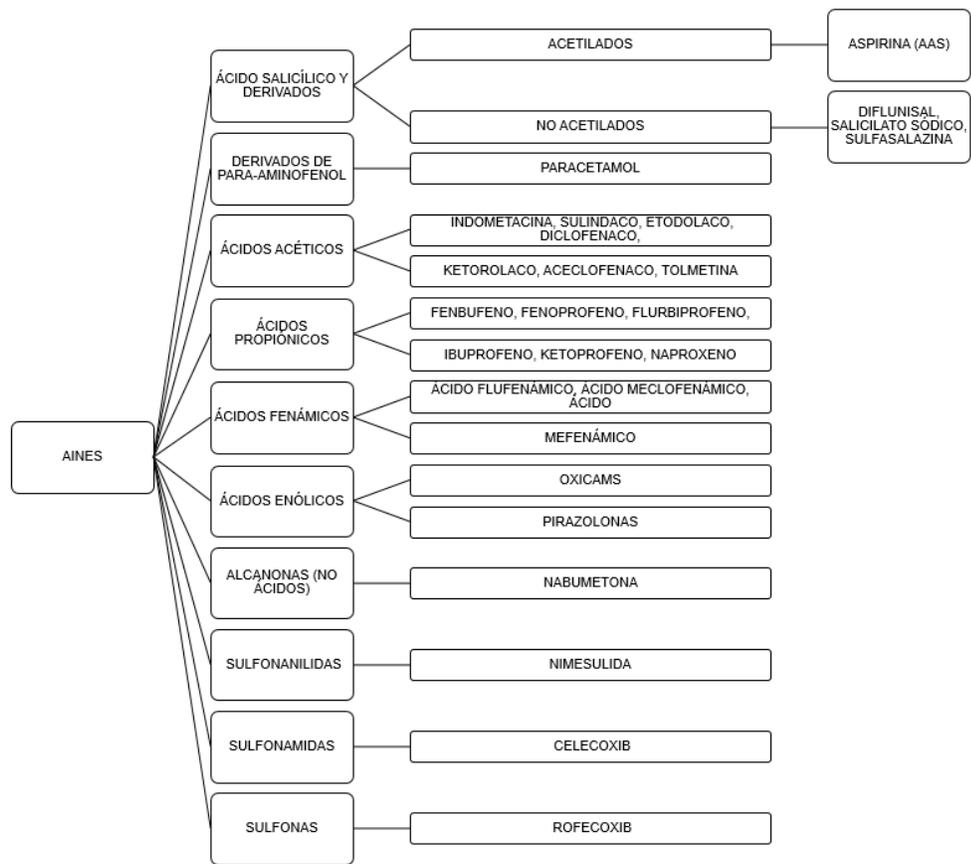


Figura 5. Clasificación de aines (modificado de rodríguez bernardino, 2005).

2.8.2. GENERALIDADES DE LOS PROFENOS (PROs)

Los profenos también denominados ácidos 2-arilpropionicos ya que derivan del ácido propiónico, estos fármacos contienen características antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Los fármacos más destacados de este grupo son tres, los cuales reciben el nombre de Ketoprofeno (KTP), Ibuprofeno (IBU) y Naproxeno (NAP).

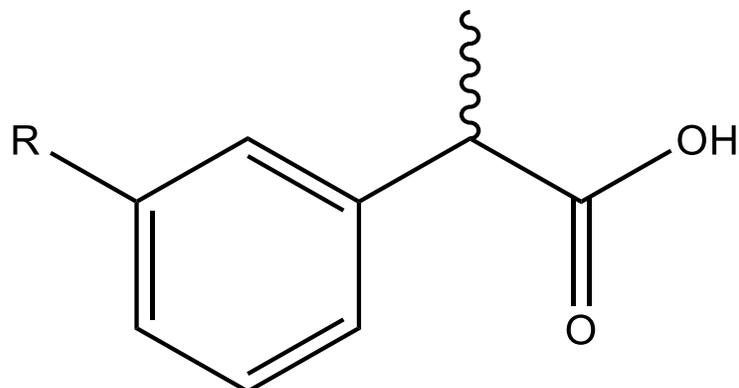


Figura 6. Estructura general de los ácidos 2-arylpropionicos (ibáñez, 2018).

Estos fármacos están compuestos por un carbono asimétrico, el cual le da propiedades enantioméricas las cuales pueden tener efectos sobre los procesos farmacodinámicos y farmacocinéticos (Figura 6). Estos fármacos tienen su efecto debido a la inhibición que presentan sobre la ciclooxigenasa 1 y 2. La inflamación disminuye con la inhibición de la COX-2 sin embargo la mayoría de los AINES suelen inhibir ambas isoformas de la enzima ciclooxigenasa dando como resultado efectos indeseados.

Tabla 2. Selectividad del fármaco hacia COX (modificado de rodríguez bernardino, 2005).

NO SELECTIVOS	INHIBICIÓN PREFERENTE DE COX-2	INHIBICIÓN PREFERENTE DE COX-1
Ibuprofeno Naproxeno Ketorolaco Tolmetina	Diclofenaco Etodolaco Nabumetona Meloxicam	Aspirina Indometacina Ketoprofeno Piroxicam Salicilatos Sulindaco

Es por lo expuesto en la Tabla 2 que el fármaco ideal para el tratamiento de pacientes con enfermedades crónicas debe ser aquel que presente selectividad hacia la COX-2 y nula o poca actividad sobre la COX-1 (Ibáñez, 2018).

2.8.3. KETOPROFENO (KTP)

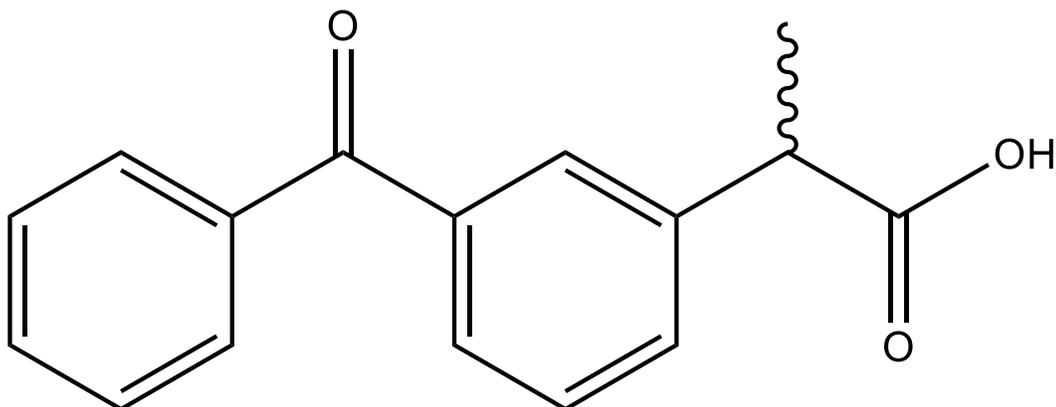


Figura 7. Molécula de Ketoprofeno.

En la Figura 5 podemos observar la molécula de Ketoprofeno racémico, sin embargo, el efecto antiinflamatorio de dicho fármaco reside únicamente en el enantiómero (*S*), también conocido como dexketoprofeno. Por otra parte el enantiómero (*R*)-KTP no suele presentar dichas características antiinflamatorias únicamente en el caso en que se presenta la bioinversión quiral en la cual solo se ha demostrado tiene lugar en ratones, con respecto a humanos la bioinversión no es un proceso que se lleve a cabo de (*S*)-KTP a (*R*)-KTP, pero este proceso si es llevado a cabo inversamente, tras administrar (*R*)-KTP es posible que se dé un limitada bioinversión y de esa manera obtener (*S*)-KTP, este proceso se ha demostrado tras encontrar bajas cantidades de (*S*)-KTP en sangre y orina. Según diversos reportes el (*R*)-KTP ha demostrado tener propiedades analgésicas en cirugía dental, con un efecto 10 veces más potente que un acetaminofeno (Ibáñez, 2018).

Sin embargo, la administración de enantiómeros puros demuestra tener ventajas sobre el uso de racematos, con respecto a eficiencia y la efectividad que estos puedan aportar, es por eso que en este trabajo de tesis se planteó como objetivo principal estudiar la resolución cinética enzimática de Ketoprofeno racémico.

2.9 ENANTIOSELECTIVIDAD (*E*)

El parámetro de la enantioselectividad depende la conversión total de (*x*) con el exceso enantiomérico sustrato-producto tal como se describe en la siguiente ecuación:



$$E = \frac{\ln[(1-x)(1-ees)]}{\ln[(1-x)(1+ees)]}$$

$$E = \frac{\ln[(1-x)(1+eep)]}{\ln[(1-x)(1-eep)]}$$

donde:

ees: Exceso enantiomérico de sustrato

eep: Exceso enantiomérico del producto

El avance de la reacción suele ser independiente del valor de *E* ya que este se describe como un parámetro independiente por ser una propiedad intrínseca de la enzima.

Un factor a considerar para obtener un correcto cálculo del valor de *E*, es el empleo de enzimas puras ya que el empleo de isoenzimas o enzimas con características disfunciónales pueden repercutir en dicho valor (Toledo, 2015).

Uno de los escenarios requeridos para que la reacción enzimática se considere eficiente es una alta enantioselectividad, valores de por arriba de $E > 20$ son apreciados como buenos (Méndez Sánchez, 2015).

2.10 EXCESO ENANTIOMÉRICO (*ee*)

La cantidad en exceso de un enantiómero sobre otro representa un desequilibrio respecto a la actividad de óptica con respecto a la polarización de la luz, y se define como una mezcla asimétrica. La importancia de estudiar dicha mezcla asimétrica reside en determinar el exceso de un enantiómero sobre otro, de un mismo compuesto.

El exceso enantiomérico se define como un indicador de la eficiencia de una reacción enantioselectiva (Collado Lozano, 2004; Jaramillo & María Belén Cevallos Ludeña, 2018).

Para determinar el exceso enantiomérico se relaciona la distribución enantiomérica que resulto con anterioridad por medio de la siguiente ecuación:



$$ee(\%) = \frac{[R - S]}{[R + S]} * 100$$

donde:

ee (%): exceso enantiomérico

R: enantiómero (+)

S: enantiómero (-)



III. ANTECEDENTES

En la obtención química de (S)-(+)-Ketoprofeno se han empleado diversas técnicas tales como cristalización de diastereómeros, resolución cinética, síntesis asimétrica, separación cromatográfica y cristalización preferencial (Toledo, 2015). Sin embargo, se ha demostrado el gran potencial que tienen las lipasas en la biocatálisis para la obtención de fármacos o de intermedios homocirales empleados posteriormente para la síntesis de estos. Este potencial se debe principalmente a la gran versatilidad de las lipasas, capaces de catalizar diferentes reacciones en función de los sustratos o disolventes (acuosos u orgánicos) empleados en las síntesis. La mayoría de las lipasas de origen microbiano presentan una actividad máxima a intervalos amplios de pH que van de 5.6 a 8.5, presentando su máxima estabilidad a pH neutro o cercano. Además, son activas en intervalos amplios de temperatura, que varían de 20 a 45 °C, si bien el intervalo óptimo es de 30 a 45 °C (Álvarez Álvarez, 2006; Toledo, 2015). Asimismo las enzimas son fáciles de recuperar y mantienen su actividad catalítica mientras no sufran deshidratación (Koskinen & Klibanov, 2013).

Las lipasas son enzimas que se encuentran en numerosos organismos vivos. En los seres humanos, intervienen en el metabolismo de las grasas, más concretamente en el de los triglicéridos, dando lugar a la formación de glicerol y ácidos grasos, además de su actividad hidrolítica natural pueden catalizar reacciones químicas distintas de la hidrólisis como esterificación, interesterificación, alcoholisis, acidólisis y aminólisis, en función del disolvente orgánico que se emplee (Álvarez Álvarez, 2006).

Cándida rugosa lipasa es probablemente el biocatalizador más tradicional en síntesis química. *Cándida rugosa* lipasa (anteriormente *Cándida cylindracea*) es una levadura no esporogénica, pseudofilamentosa, unicelular y no patogénica, que sintetiza y secreta una mezcla de isoenzimas de lipasa en diferentes proporciones, dependiendo tanto del procedimiento de fermentación como del inductor. Una característica de las lipasas de *Cándida rugosa* es que reaccionan con sustratos insolubles y solubles en agua.

Existen reportes de lipasa de *Cándida rugosa* en resoluciones enantioselectivas de naproxeno, suprofeno y fenoprofeno. También se ha utilizado para esterificar enantioselectivamente ibuprofeno racémico (Chávez-Flores & Salvador, 2009).

Tabla 3. Reacciones de esterificación de AINES empleando diversas lipasas.

LIPASA	ESTADO	NSAID	CONDICIONES DE ESTERIFICACIÓN	(%)CONVERSIÓN	ENANTIOSELECTIVIDAD (ee _s)	REFERENCIA
Novozym 435 de <i>Candida antártica</i>	Inmovilizada	IBU	Lipasa, n-hexanol, metil terc-butil éter (MTBE), (R, S)-IBU a 70°C y 400rpm por 30h	56	93.78	(Yuan et al., 2019)
<i>Candida rugosa</i> tipo VII	Inmovilizada	IBU	Lipasa, Decanol, ciclohexano, (R,S)-IBU a 40°C por 48h en agitación.	46	99	(Chávez-Flores & Salvador, 2009b)
Lipasa B de <i>Candida antártica</i> (CALB)	inmovilizada	KTP	CALB, 20/80 (v/v) dicloropropano/hexano, (R,S)-KTP de 40°C en agitación por 24h	40.5	59.4	(Ong et al., 2006b)
Novozym 435 de <i>Candida antártica</i>	inmovilizada	KTP	Lipasa, (R,S)-KTP etanol, 1-2 dicloropropano incubado por 47h	30	96	(D'Antona et al., 2002)
Lipasa OF de <i>Candida rugosa</i>	inmovilizada	IBU	Lipasa, ciclohexano 1 o 2 propanol y (R,S)-IBU Incubada a 37°C, 600rpm por 96h	38	98	(Tomasz Siodmiak & Jan K. Ruminski and Michal P. Marszall, 2012)



En recientes años, algunas lipasas se han aplicado con éxito para la resolución del NSAIDS mediante esterificación enantioselectiva como se muestra en la tabla 3 (Erik Henke et al., 2000). Las lipasas de *Candida rugosa* y de páncreas de puerco son enzimas lipolíticas intracelulares que han evidenciado (S)-preferencia en la resolución de KTP e IBU racémico (Chávez-Flores & Salvador, 2009a). Yuan y colaboradores (Yuan et al., 2019) reportaron hasta un 56% de conversión empleando Novozym 435 de *Candida antártica* sobre la resolución de enantiómero de Ibuprofeno.



IV. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Desarrollar una metodología ambientalmente amigable para la resolución de los enantiómeros de Ketoprofeno utilizando lipasas como catalizador enantioselectivo, así como sintetizar (S)-esteres terpénicos de Ketoprofeno y su evaluación *in sillico*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar una metodología de alta eficiencia de esterificación enantioselectiva de (S)-Ketoprofeno a partir de su mezcla racémica comercialmente disponible.
2. Emplear energías alternas (microondas y sonicación) para inducir una reacción de racemización de (R)-Ketoprofeno residual para su reutilización como reactivo inicial o materia prima.
3. Desarrollar una metodología de alta eficiencia de hidrolisis catalizada por lipasas del (S)-alquil éster de Ketoprofeno para obtener el deseado (S)-Ketoprofeno con una alta pureza enantiomérica.
4. Sintetizar enzimática y enantioselectivamente los esterres de prenilo, geranilo y farnesilo de (S)-Ketoprofeno.
5. Evaluar *in sillico* los esterres y su interacción con las enzimas COX-1 y COX-2 para predecir su posible aplicación como antiinflamatorios.



V. JUSTIFICACIÓN

Múltiples investigaciones han demostrado que solo uno de los enantiómeros de una mezcla racémica es el que presenta actividad terapéutica y en el caso del comercialmente disponible (*R, S*)-Ketoprofeno, el (*S*)-enantiómero es el de interés ya que es el único que tiene los efectos terapéuticos antiinflamatorios. El consumo de un solo enantiómero representa por ende una disminución en la cantidad de material a administrar al paciente y esto desde el punto de vista de toxicidad representa un beneficio para el paciente. Es por eso que el nuestro grupo de investigación pretende llevar a cabo el desarrollo de una metodología ambientalmente amigable para la resolución del comercialmente disponible (*R, S*)-Ketoprofeno para obtener el deseado (*S*)-Ketoprofeno utilizando catálisis enzimática y fuentes de energía amigables con el ambiente.

VI. METODOLOGÍA

6.1 EXTRACCIÓN DE KETOPROFENO

Ketoprofeno fue extraído en acetona a partir de tabletas comercialmente disponibles en el mercado (100 mg/ capsula de la marca Painsik) debido a su bajo costo en el mercado. (30 pesos MN / gramo Ketoprofeno racémico Vs. 800 pesos MN / gramo dexketoprofeno). Diagrama de flujo mostrado en la Figura 8.

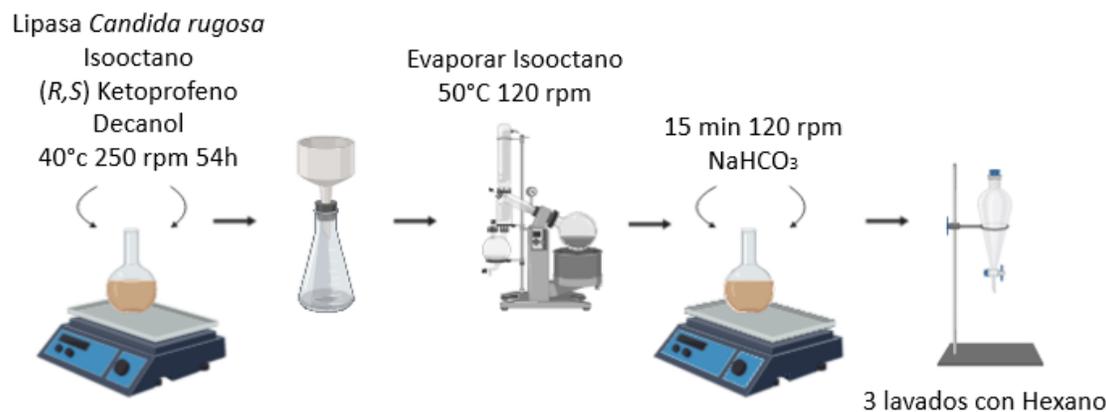


Figura 8. Secuencia de la extracción de Ketoprofeno a partir de tabletas comerciales.

Las tabletas comercialmente disponibles fueron trituradas para posteriormente ser suspendidas en 30 mL de acetona grado reactivo (Marca Fermont, México), se dejaron por 12 minutos a temperatura ambiente y en agitación a 250 rpm. Para después remover el excipiente por filtrado al vacío, empleando papel filtro Whatman No. 40 y un embudo Buchner (Marca VG Modelo 3-3504, México). Finalmente, el filtrado se evaporó al vacío en un rotavapor (marca Buchi modelo R-215, Suiza).

Se llevó a cabo el mismo procedimiento para la extracción del estándar o compuesto deseado, donde se partió de tabletas de patente comercialmente disponibles de (S)-Ketoprofeno de la marca Stadium® (25 mg/tableta) del laboratorio Sanfer.

Los cristales obtenidos fueron caracterizados mediante resonancia magnética nuclear de protón y por cromatografía líquida de alta resolución quiral.



6.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Para monitorear el desarrollo de las reacciones enantioselectivas de esterificación e hidrólisis enzimática así como la separación de los productos de reacción se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 equipado con una bomba analítica cuaternaria Dionex LPG-3400D, desgasificador de disolvente, compartimiento de columna con control de temperatura, automuestreador, detector de arreglo de diodos y software Chromeleon Software CM-PCS-1. Como fase estacionaria se utilizó una columna quiral chiralcel OJ (Diacel Chemical Industries) y como fase móvil una mezcla hexanos / isopropanol (90 : 10 % v / v). La longitud de onda del detector de UV se estableció en 254 nm, la velocidad de flujo fue de 1.0 mL / min con temperatura de columna de 30 ° C (Enríquez-Núñez et al., 2015).

6.3 SELECCIÓN DE ALCOHOL Y SOLVENTE PARA LA REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN.

Para seleccionar el alcohol que permita la obtención de un éster con eficiencia, exceso enantiomérico y enantioselectividad altas se llevaron a cabo los siguientes procedimientos. En una reacción típica, se añadieron 1,273 g (5 mmol) de KTP racémico, 0.9 g (5 mmol) de alcohol, 25 mL de disolvente (ciclohexano, hexano o isooctano) y 2 g de lipasa de *Candida rugosa* en un matraz seco de fondo redondo de 250 mL antes de agitar y calentar a 40°C. La suspensión de reacción se controló durante 48 h mediante HPLC quiral. Después de alcanzar el 46% de conversión (c), la lipasa se filtró y se lavó con hexanos. El filtrado se analizó mediante HPLC quiral y el disolvente se evaporó a presión reducida para recuperar el ácido y el éster de KTP. La mezcla se agitó a 25°C durante 30 min agregando 50 mL de una solución saturada de bicarbonato de sodio. La mezcla de reacción se extrajo con hexano (3 x 20 mL). Se utilizó el mismo procedimiento para esterificar KTP con octan-1-ol, butal-1-ol y metan-1-ol en 96 h. Finalmente la lipasa reciclada se lava con terbutanol para su almacenamiento en refrigeración.

6.4 SINTESIS DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO

En un matraz bola de 250 mL se agregaron 6.352 g (2.4 molar) de Ketoprofeno racémico, 3.956 g (2.4 molar) de deca-1-ol, 70 mL de isooctano y una barra de agitación magnética de la marca Teflón®, la mezcla se agito por 2 minutos hasta homogeneizarse y posteriormente se añadieron 10 g de liasas de *Candida rugosa* y se mantuvo a una temperatura constante de 40° C con una agitación de 250 rpm durante 72 h, posteriormente la reacción fue pausada y filtrada en un embudo Buchner para retirar la enzima la cual fue lavada con hexanos. El filtrado restante fue rota evaporado para su futura hidrolisis.

6.5 HIDRÓLISIS DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO.

6.5.1 HIDROLISIS ÁCIDA DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO EN REFLUJO.

La reacción de hidrolisis básica fue llevada a cabo empleando una solución de H₂SO₄ (3 mL) en un medio acuoso 30 mL añadiendo 10 Mm de (S)-decil éster de Ketoprofeno. La mezcla se mantuvo en reflujo por hasta 24 h.

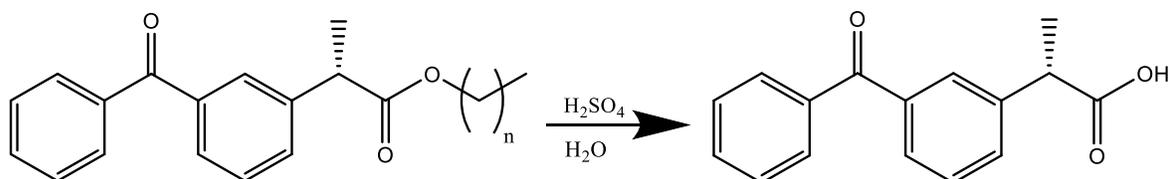


Figura 9. Hidrolisis ácida del (s)-decil éster de Ketoprofeno.

6.5.2 HIDROLISIS BÁSICA DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO EN REFLUJO.

La reacción de hidrolisis básica fue llevada a cabo empleando una solución 0.1 M de KOH en un medio acuoso añadiendo 10 Mm de (S)-decil éster de Ketoprofeno. La mezcla se mantuvo en reflujo por hasta 24 h.

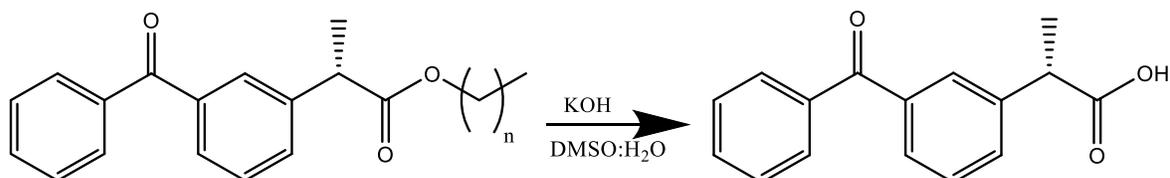


Figura 10. Hidrolisis básica del (s)-decil éster de Ketoprofeno.

6.5.3 HIDROLISIS BÁSICA DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO POR MICROONDAS

Las reacciones realizadas utilizando energía de microondas se llevaron a cabo utilizando tubos especiales para síntesis en microondas de 10 mL como se muestra en la Figura 11. La reacción de hidrolisis básica se llevó empleando una solución 0.1 M de KOH en un medio acuoso añadiendo 10 Mm de (S)-decil éster de Ketoprofeno. La mezcla se fracciona en diferentes viles para su análisis en diferentes tiempos (15 seg, 30 seg, 1 min, 3 min y 6 min) de microondas de síntesis CEM Discover SP® a una potencia de 250 W, agitación media y a 85° C. El ácido carboxílico se extrajo en 2 ml de hexanos y se sometió a análisis por HPLC. La misma reacción fue llevada a cabo empleando un medio acuoso con dimetilsulfóxido (DMSO) en relación 1:4.



Figura 11. Tubos de 10 mL para reacciones de síntesis en microondas.

6.5.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO.

A un matraz de fondo plano de 125 mL se añadieron 40 mL de tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 a 500 mg de decil éster de Ketoprofeno, 3 g de lipasa de *Candida rugosa*. Se añadió tensioactivo Tween 80 al sistema con diferentes concentraciones (5,10,15%). La mezcla se mantuvo a 45° C en un agitador rotatorio a 160 rpm. Se

extrajeron periódicamente muestras de 1 mL. Luego, el ácido carboxílico se extrajo en 2 mL de hexanos y se sometió a análisis por HPLC.

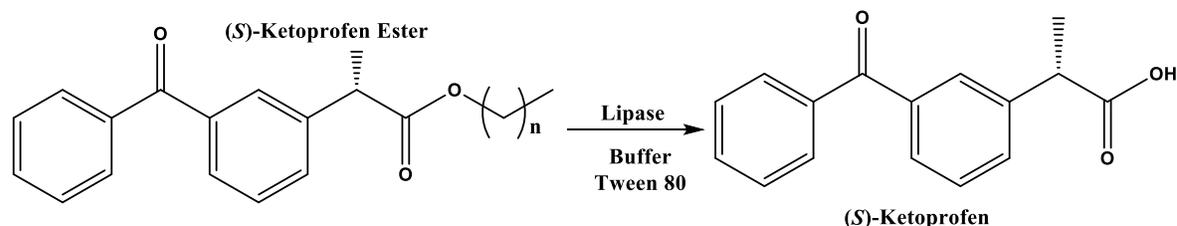


Figura 12. Reacción de hidrolisis enzimática del (S) decil éster de Ketoprofeno.

6.5.5 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO POR MICROONDAS.

Se mezclaron 40 mL de tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 a 500 mg de (S)-decil éster de Ketoprofeno, 3 g de lipasa de *Candida rugosa*. Se añadió tensioactivo Tween 80 al sistema en una concentración del 10%. La mezcla se fraccionó en diferentes tubos de microondas para su análisis en diferentes tiempos (15 seg, 30 seg, 1 min, 3 min y 6 min) de microondas de síntesis CEM Discover SP® a una potencia de 250 W, agitación media y a 45° C. El ácido carboxílico se extrajo en 2 mL de hexanos y se sometió a análisis por HPLC.

6.5.6 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO POR SONICACIÓN

Se preparó una reacción tipo batch. Añadiendo 40 mL de tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 a 500 mg de (S) decil éster de Ketoprofeno, 3 g de lipasa de *Candida rugosa*. Se añadió tensioactivo Tween 80 al sistema en una concentración del 10%. La mezcla se fracciona en diferentes viles para su análisis en diferentes tiempos (1 min, 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h y 24 h) de sonicación a una potencia media y a 45° C el ácido carboxílico se extrajo en 2 mL de hexanos y se sometió a análisis por HPLC.

6.6 RACEMIZACIÓN DE (S)-KETOPROFENO

6.6.1 RACEMIZACIÓN ÁCIDA DE (S)-KETOPROFENO EN REFLUJO



La reacción de racemización se llevó a cabo en medio ácido utilizando H_2SO_4 en medio acuoso. Se añadieron 10 mM de (*R*)-Ketoprofeno se llevaron a cabo en ebullición constante en un sistema de reflujo. Se tomaron muestras en diferentes intervalos de tiempo. Después de la acidificación, el (*R*)-Ketoprofeno racemizado se extrajo con hexanos para análisis por HPLC quiral para el exceso enantiomérico residual (*ee*).

6.6.2 RACEMIZACIÓN BÁSICA DE (*S*)-KETOPROFENO EN REFLUJO

En un matraz bola de 125 mL, se añadieron 10 mM de (*R*)-Ketoprofeno y 0.1 M de base (NaOH y KOH) a 5 mL de DMSO-agua (4 : 1, v / v). Todas las reacciones de racemización se llevaron a cabo a ebullición en un sistema de reflujo. Se tomaron muestras en diferentes intervalos de tiempo. Después de la acidificación, el (*R*)-Ketoprofeno racemizado se extrajo con hexano para análisis por HPLC quiral.

6.6.3 RACEMIZACIÓN BÁSICA DE (*S*)-KETOPROFENO EN SONICACIÓN

Se preparó una reacción batch. Añadiendo se añadieron 10 mM de (*R*)-Ketoprofeno y 0.1 M de base (KOH) a 5 mL de DMSO-agua (4: 1, v / v). La mezcla se fraccionó en diferentes viles para su análisis en diferentes tiempos (1 min, 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h y 24 h) de sonicación a una potencia media y a una potencia Alta y a 50° C. El ácido carboxílico se extrajo acidificando en medio con una solución de HCl al 5% y haciendo lavados en 2 mL de hexanos posteriormente la fase orgánica se sometió a análisis por HPLC.

6.6.4 RACEMIZACIÓN BÁSICA DE (*S*)-KETOPROFENO EN MICROONDAS

Se preparó una reacción tipo batch. Se añadieron 10 mM de (*R*)-Ketoprofeno y 0.1 M de base (KOH) a 5 mL de DMSO-agua (4 : 1, v / v). La mezcla se fracciono en diferentes viles para su análisis en diferentes tiempos (15 seg, 30 seg, 1 min, 3 min y 6 min) de microondas de síntesis CEM Discover SP® a una potencia de 250 W, agitación media y a 85° C. El ácido carboxílico se extrajo acidificando en medio con una solución de HCl al 5% y haciendo lavados en 2 mL de hexanos posteriormente la fase orgánica se sometió a análisis por HPLC. La figura 13 muestra como se lleva a cabo la formación del enolato en la reacción de racemización, el cual adopta una

conformación trigonal plana por la presencia de un medio básico, sin embargo, esta es una molécula inestable y al protonarse nuevamente robando hidrógenos de las moléculas de agua presentes en el medio, un 50% lo hace como (*R*) y 50% lo hace como (*S*) teniendo nuevamente una mezcla racémica (*R*, *S*)-Ketoprofeno.

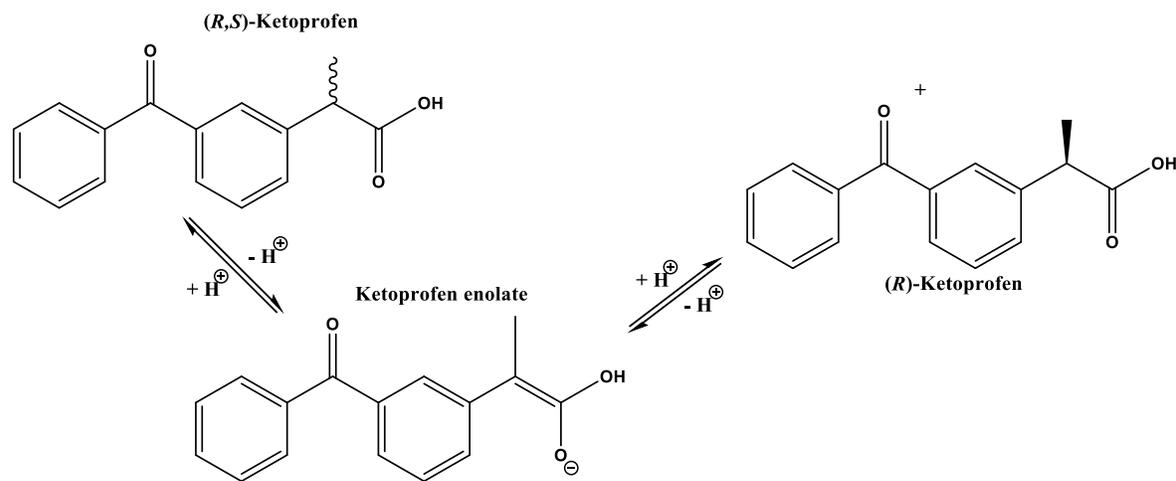
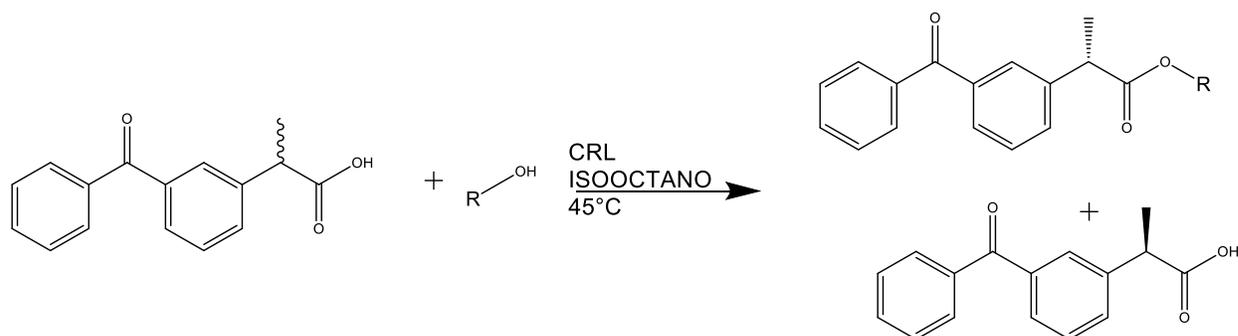


Figura 13. Reacción de racemización por formación de enolato.

6.7 SINTESIS DE ESTERES TERPENICOS DE (*S*)-KETOPROFENO (SKP, SKG Y SKF).

En un matraz bola de fondo plano de 125 mL se colocó 10 mmol (2.546 g) de (*R*, *S*)-Ketoprofeno y 5 mmol de prenol (0.4307 g) para el (*S*)-Ketoprofenato de prenilo (SKP), geraniol (0.7713 g) para el (*S*)-Ketoprofenato de geranilo (SKG) y farnesol (1.1 g) para el (*S*)-Ketoprofenato de farnesilo (SKF) respectivamente para cada esterificación. Luego se adicionaron al matraz 4 g de lipasa de *Candida rugosa* (CRL) en 40 mL de 2,2,4-trimetilpentano. Dichas reacciones se llevaron a cabo a 40°C en agitación por 48 horas y para su monitoreo se tomaron alícuotas de 1 mL a las 2, 8, 24 y 48 horas de reacción donde se añadió 1.5 mL de hexano para su separación. Las muestras se centrifugaron y la fase orgánica se analizó por HPLC. La figura 14 muestra como se lleva a cabo la reacción de esterificación empleando alcoholes terpénicos (prenol, geraniol y farnesol) y se logra observar como la enzima se comporta selectiva hacia el enantiómero (*S*) dando lugar a esteres enantioméricamente puros y dejando de residuo el ácido carboxílico (*R*).



a R=-CH₂CHC(CH₃)CH₃

b R=-CH₂CHC(CH₃)CH₂CH₂CHC(CH₃)CH₃

c R=-CH₂CHC(CH₃)CH₂CH₂CHC(CH₃)CH₂CH₂CHC(CH₃)CH₃

Figura 14. Síntesis de ésteres terpénicos (S)-Ketoprofenato de prenilo [a], (S)-Ketoprofenato de geranilo [b] y (S)-Ketoprofenato de farnesilo [c].

6.8 MODELADO MOLECULAR.

Se realizó un estudio de modelado molecular para predecir la afinidad de los ésteres terpénicos de Ketoprofeno con los sitios de unión de las enzimas COX-1 y COX-2.

6.8.1 PREPARACIÓN DEL LIGANDO Y DE LAS ENZIMAS

Las estructuras tridimensionales de los ésteres terpénicos de Ketoprofeno (SKP, SKG y SKF) se construyeron en el software ChemDraw Pro 17 y se extrajo cada documento en formato pdb. Luego la conformación mínima del Ketoprofeno y los ésteres terpénicos se optimizó mediante la Teoría Funcional de la Densidad (DFT) empleando el modelo híbrido de tres parámetros de Becke, el método funcional de correlación Lee-Yang-Parr (B3LYP) en el nivel 6-311G (d, p), esto en el software químico-cuántico Gaussian-03.

Las estructuras de las proteínas COX-1 Y COX-2 (código PDB: GY3C y 5IKR respectivamente) fueron tomadas del Protein Data Bank (<http://www.rscb.org/pdb>) en formato pdb. Con el software PyMOL se limpió cada enzima, removiendo los ligandos que contenían, además de las moléculas de agua unidas a la proteína.

6.8.2 ACOPLAMIENTO MOLECULAR

El acoplamiento molecular de las enzimas COX-1 y COX-2 con los ésteres terpénicos de (S)-Ketoprofeno se llevó a cabo en el software AutodockAk 4.2 con una interfaz gráfica ADT 1.4.5.

6.9 EVALUACIÓN IN SILICO DE ESTERES TERPENICOS DE KETOPROFENO

6.9.1 PASS (Predicción del Espectro de Actividad Biológica Para Sustancias)

El programa computacional PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) es una herramienta online para evaluar mecanismos de interacción sobre ligandos y nuevas moléculas de interés biológico. Pass es capaz de predecir más de 300 efectos farmacológicos y mecanismos basado en la estructura molecular de una sustancia (Filimonov et al., 2014a; Lagunin et al., 2000) . En dicho programa se obtuvieron los valores de probabilidad de actividad (P_a) y probabilidad de inactividad (P_i) de SKP, SIG y SKF.



Figura 15. Programa computacional Pass online (<http://www.way2drug.com/passonline>).

6.9.2 SwissADME: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción

SwissTargetPrediction es una herramienta en línea que se puede utilizar para predecir los objetivos de pequeñas moléculas bioactivas en humanos y otros vertebrados mientras que SwissADME es una herramienta quimio-informática que permite calcular las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y la similitud con los fármacos y

compatibilidad con la química medicinal de compuestos que se pretenden sintetizar y evaluar como compuestos con actividad biológica (Thomas et al., 2020).

Utilizando el software químico ChemDraw Pro 17 se obtuvo el código SMILES de SKP, SKG y SKF el cual se ingresó en la plataforma SwisstargetADME, para obtener las propiedades anteriormente descritas.

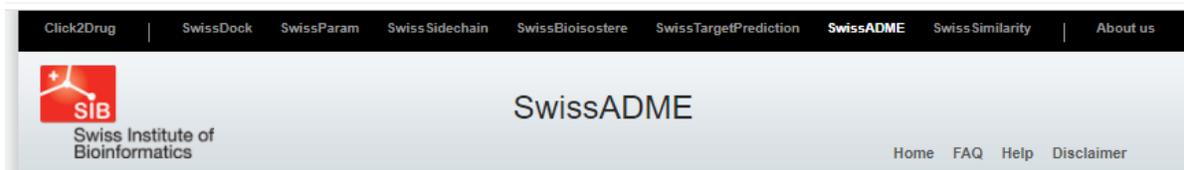


Figura 16. Programa computacional Swissadme (<http://www.swissadme.ch/>).

6.9.3 AdmetSAR: Predicción de las propiedades farmacocinéticas

Esta plataforma, como sus siglas lo indican, es una herramienta para determinar las propiedades de Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación y Toxicidad (ADMET) de los fármacos. En esta plataforma se evaluaron las propiedades ADMET de SKP, SKG y SKF.



Figura 17. Plataforma admesar (<http://lmm.d.ecust.edu.cn:8000/predict/>).

VII. RESULTADOS

7.1 EXTRACCIÓN DE KETOPROFENO

La extracción de Ketoprofeno se llevó a cabo con una eficiencia del 94% en base a la cantidad esperada según la etiqueta del producto comercialmente disponible. Este rendimiento se consideró exitoso y con una alta eficiencia de extracción ya que el disolvente, en este caso acetona suelen presentar buenos rendimientos de extracción dada la miscibilidad de los AINES en disolventes orgánicos (Ghambarian et al., 2020).

7.2 CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Con la intención de hacer un correcto monitoreo de la cinética de la reacción enzimática, los tiempos de retención tanto para (*R*)-Ketoprofeno, así como para (*S*)-Ketoprofeno fueron determinados mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución en donde se corrió un estándar del enantiómero puro (*S*)-Ketoprofeno y uno de (*R, S*)-Ketoprofeno

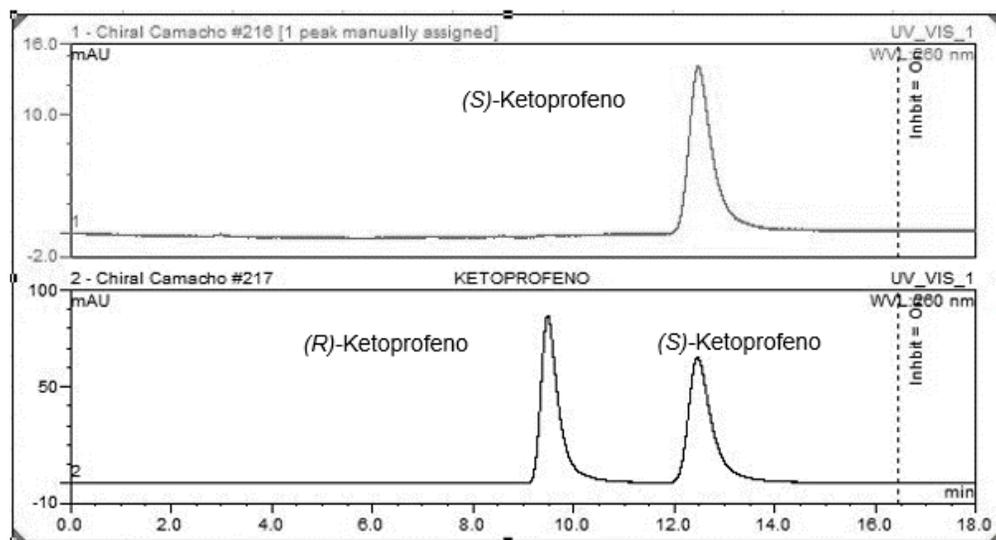


Figura 18. a) Identificación de (*S*)-Ketoprofeno, enantiómero puro tr 12.5 min. b) identificación de (*R, S*)-ketoprofeno tr (*R*)-Ketoprofeno 9.5 min (*S*)-Ketoprofeno 12.5 min análisis por HPLC.

En la Figura 18 A (arriba) se muestra el estándar de (*S*)-Ketoprofeno (dexketoprofeno) con un tiempo de retención de 12.5 min. Por otro lado, en la Figura 18B (abajo) se hace referencia a la muestra de Ketoprofeno racémico y la separación de sus picos. A un tiempo de retención de 9.5 min se logra identificar (*R*)-Ketoprofeno mientras que al minuto 12.5 se logra apreciar (*S*)-Ketoprofeno. Estos resultados concuerdan adecuadamente con algunos reportes que nos indican que con el uso de columnas con fases estacionaras empacadas con derivados de polisacáridos inmovilizados, las cuales emplean fases móviles constituidas por metanol, 2-propanol, acetonitrilo en combinación con ácido trifluoroacético (Tong Zhang, 2011) se puede lograr como resultado la optimización de los tiempos de retención, esto puede deberse en parte a



la presencia de TFA en la fase móvil, el ácido trifluoroacético puede suprimir ligeramente la interacción aquiral

indeseable entre moléculas ácidas y la matriz de sílice, de tal manera que se aumenta la resolución enantiomérica.

7.3 SELECCIÓN DE ALCOHOL Y SOLVENTE PARA LA REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN.

Después de llevadas a cabo las reacciones de esterificación con diferentes alcoholes se arrojaron como resultado que el solvente que brinda a la reacción mayor velocidad de reacción, así como mejores valores de enantioselectividad fue el Decanol ya que con este se alcanzó a esterificar un 44.65% de (S)-Ketoprofeno en 72 h (Tabla 4). Mientras que los demás solventes mostraron valores menores de conversión y enantioselectividad por unidad de tiempo (Tabla 4). En base a este resultado se pudo determinar que a mayor tamaño de la cadena alquílica del alcohol mayor es la velocidad de reacción del catalizador y mayor enantioselectividad y exceso enantiomérico del producto deseado como consecuencia. Por otra parte, la lipasa Tipo VII de *Candida rugosa* demuestra tener una mayor conversión de éster de Ketoprofeno que Novozym 435 de *Candida antártica* en 47 h empleando alcoholes con diferente tamaño en la cadena alquílica según lo reportado por D'Antona y colaboradores (D'Antona et al., 2002).

Tabla 4. Porcentaje de conversión en la reacción de esterificación variando alcohol y solvente.

ALCOHOL/SOLVENTE	HEXANO	CICLOHEXANO	ISOCTANO
DECANOL	<i>C</i> =27.07% <i>ee</i> = 23.29% <i>E</i> = 17.64%	<i>C</i> = 16.09% <i>ee</i> = 11.58% <i>E</i> = 57.38%	<i>C</i> = 44.65 % <i>ee</i> = 50.53% <i>E</i> = 63.17%
OCTANOL	<i>C</i> = 28.22% <i>ee</i> = 18.52% <i>E</i> = 4.76%	<i>C</i> = 18.43% <i>ee</i> = 16.61% <i>E</i> = 53.87%	<i>C</i> = 26.20% <i>ee</i> = 23.92% <i>E</i> = 6.46%
BUTANOL	<i>C</i> = 4.22% <i>ee</i> = 0.98% <i>E</i> = 0.99%	<i>C</i> = 3.64% <i>ee</i> = 0.78% <i>E</i> =1.53%	<i>C</i> = 7.48% <i>ee</i> = 3.56% <i>E</i> = 2.67%
METANOL	<i>C</i> = 7.19% <i>ee</i> = -0.01% <i>E</i> = 0.99%	<i>C</i> = 2.88% <i>ee</i> = -0.49% <i>E</i> = 0.71%	<i>C</i> = 8.22% <i>ee</i> = 8.22% <i>E</i> = 0.75%

Conversión enantiomérica (*c*), exceso enantiomérico (*ee*) y enantioselectividad (*e*).

7.4 SINTESIS DE (S)-DECIL ESTER DE KETOPROFENO

Esta reacción fue determinada como la de mayor velocidad, enantioselectividad y exceso enantiomérico del producto deseado. Como se muestra en la figura 18 fue posible esterificar hasta un 44.65% en un tiempo máximo de 72 h obteniendo un (S)-decil Ketoprofeno con un exceso enantiomérico de hasta 50.53%. En base a este resultado se puede determinar que a mayor tamaño de la cadena alquílica del alcohol mayor es la velocidad de reacción del catalizador y mayor enantioselectividad y exceso enantiomérico del producto.

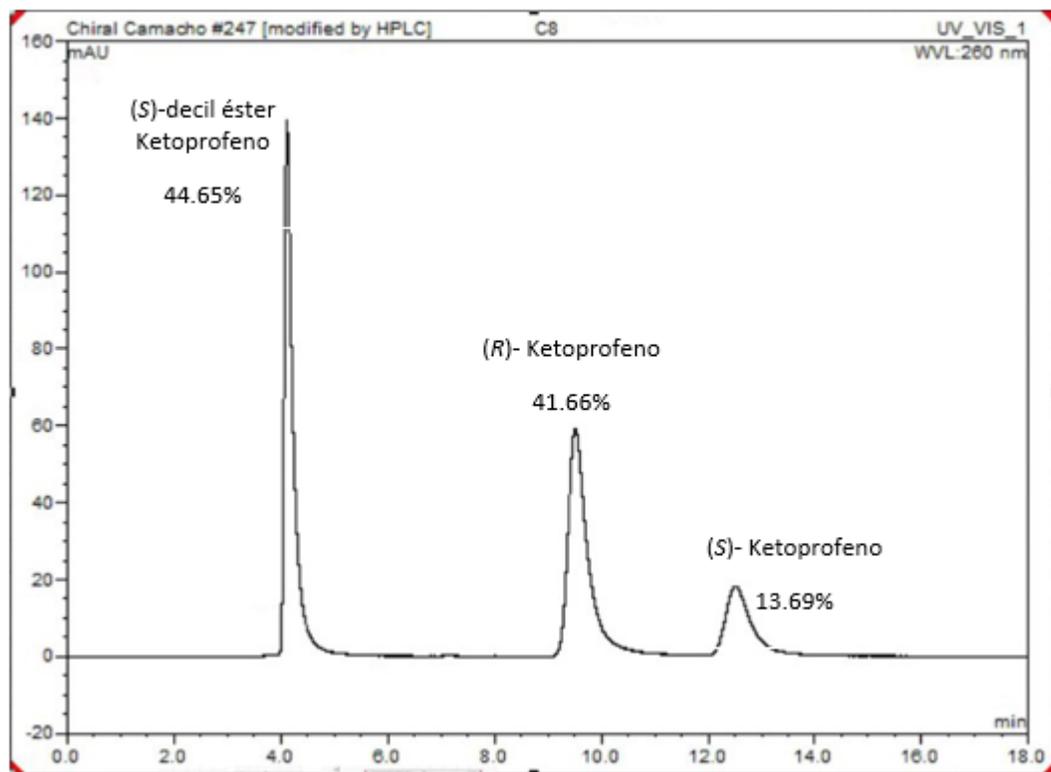


Figura 19. Cromatograma de la síntesis de (S)-decil éster de ketoprofeno monitoreado durante 72 horas.

7.5 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE (S)-DECIL ÉSTER DE KETOPROFENO.

Diferentes concentraciones de tensoactivo fueron empleadas en la reacción de Hidrolisis esto con el fin de estimular la actividad de la lipasa. Empleando una concentración del 10% de Tween 80 se logó un porcentaje de conversión del decil éster de Ketoprofeno del 88.59 (\pm 0.175) en un tiempo de 56 h mientras que después de varios intentos de hidrolisis sin emulsificante no fue posible conseguir más de un 8% de hidrólisis (tabla 5). Estos resultados nos llevan a concluir que la nula solubilidad del éster de Ketoprofeno en el solvente acuoso evito las colisiones entre la enzima y el sustrato. Según lo reportado por (Liu et al., 2000) el Tween 80 tiene múltiples roles en la reacción dentro de los que se encuentran la estimulación para dar un sustrato estable, y aumentar un área interfacial mayor, por su naturaleza el Tween 80 proporciona un ambiente en la reacción en el que se ve mayormente activada la lipasa



y por ultimo potencia la enantioselectividad en la reacción permitiendo el aumento de la conversión de decil éster al acido carboxílico puro.

Tabla 5. Hidrólisis de (S)-decil éster de Ketoprofeno.

EX	R1	R2	Método de hidrolisis	Calentamiento	Temperatura (°C)	Tiempo	Conversión (%)
1	(S)-Ester de Ketoprofeno	H ₂ SO ₄	acida	Reflujo	110	48 h	7.95
2	(S)-Ester de Ketoprofeno	KOH (0.1 M)	básica	Reflujo	110	48 h	4.88
3	(S)-Ester de Ketoprofeno	KOH (0.1 M)	básica	Microondas	85	1 min	5.01
4	(S)-Ester de Ketoprofeno	KOH/DMSO (0.1 M)	básica	Microondas	85	6 min	49.77
5	(S)-Ester de Ketoprofeno	Tween 80 (5%) /Buffer pH 7	Enzimático (CRL)	Térmico	45	56 h	53.56
6	(S)-Ester de Ketoprofeno	Tween 80 (10%) / Buffer pH 7	Enzimático (CRL)	Térmico	45	56 h	88.59
7	(S)-Ester de Ketoprofeno	Tween 80 (15%) / Buffer pH 7	Enzimático (CRL)	Térmico	45	56 h	76.68
8	(S)-Ester de Ketoprofeno	Tween 80 (10%) / Buffer pH 7	Enzimático (CRL)	microondas	45	9 min	NR
9	(S)-Ester de Ketoprofeno	Tween 80 (10%) / Buffer pH 7	Enzimático (CRL)	Sonicación	45	24 h	16.65
10	(S)-Ester de Ketoprofeno	Tween 80 (15%) / Buffer pH 7	Enzimático (<i>M. javanicus</i>)	Térmico	45	24 h	NR
11	(S)-Ester de Ketoprofeno	Tween 80 (15%) / Buffer pH 7	Enzimático (<i>Páncreas de puerco</i>)	Térmico	45	24 h	41.35

(NR) No reaccionó, (CRL) *Candida rugosa* lipasa.

7.6 RACEMIZACIÓN DE (S)-KETOPROFENO

Después de tratar de hacer una racemización por medio de ácido sulfúrico en un lapso de 48 horas la máxima conversión obtenida fue de 1.28% lo cual demuestra ser un bajo rendimiento. Esto puede deberse a la baja o nula formación del enol de Ketoprofeno. Posteriormente la solución fue tratada por medio de una racemización básica añadiendo Hidróxido de sodio (0.1 M) por 24 horas donde los valores resultantes mostraron una máxima conversión de 82% sin embargo empleando una solución de Hidróxido de potasio 0.1 M por 4 h se logró 99% de conversión (tabla 6).

Tabla 6. Racemización de (S)-Ketoprofeno.

EX	R1	R2	Método de racemización	Potencia	Temperatura (°C)	tiempo	Conversión (%)
1	(S)-Ketoprofeno	KOH (0.01 M)	Reflujo	NA	140	24 H	82%
2	(S)-Ketoprofeno	KOH (0.01 M)	Sonicación	Alta	50	3 H	NR
3	(S)-Ketoprofeno	KOH (0.01 M)	Microondas	250 W	120	6 min	59
4	(S)-Ketoprofeno	KOH/DMSO (0.01 M)	Reflujo	NA	140	4 h	100
5	(S)-Ketoprofeno	KOH/DMSO (0.01 M)	Sonicación	Alta	50	3 h	NR
6	(S)-Ketoprofeno	KOH/DMSO (0.01 M)	Microondas	250 W	120	6 min	64

7.7 SINTESIS DE ESTERES TERPENICOS DE (S)-KETOPROFENO (SKP, SKG Y SKF).

El monitoreo de las reacciones se llevó a cabo mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) como se describió anteriormente en el apartado de metodología. En la Figura 20 se muestra el monitoreo de la síntesis de SKP. La reacción fue monitoreada a 2, 8, 24, 48 y 72 horas. Los cromatogramas evidencian la disminución

del reactivo (*S*)-Ketoprofeno, mientras que la señal correspondiente al producto (SKP) aumenta con respecto al tiempo. La primera señal del cromatograma que aparece en un tiempo de retención de 4.5 min corresponde al (*S*)-Ketoprofenato de prenilo (producto), la señal en un tiempo de 7 min corresponde al (*R*)-Ketoprofeno y la señal en el minuto 9 corresponde al (*S*)-Ketoprofeno (reactivo).

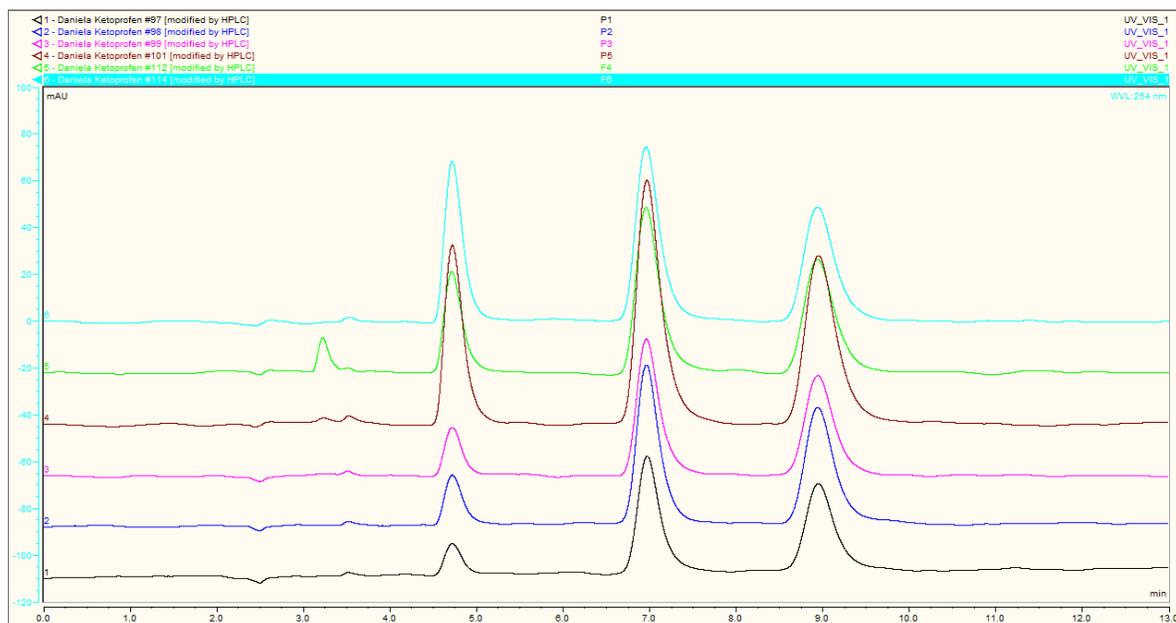


Figura 20. Monitoreo de la esterificación del (*S*)-Ketoprofenato de prenilo.

El monitoreo de las reacciones se llevó a cabo mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) como se describió anteriormente en el apartado de metodología. En la Figura 21 se muestra el monitoreo de la síntesis de SKG. La reacción fue monitoreada a 2, 8, 24, 48 y 72 horas. Los cromatogramas evidencian la disminución del reactivo (*S*)-Ketoprofeno, mientras que la señal correspondiente al producto (SKG) aumenta con respecto al tiempo. La primera señal del cromatograma que aparece en un tiempo de retención de 4.5 min corresponde al (*S*)-Ketoprofenato de geranilo (producto), la señal en un tiempo de 7 min corresponde al (*R*)-Ketoprofeno y la señal en el minuto 9 corresponde al (*S*)-Ketoprofeno (reactivo). Diferentes reportes evidencian la preferencia de la enzima hacia el enantiómero (*S*) es por eso que el (*R*)-Ketoprofeno se mantiene igual de principio a fin en la reacción de esterificación.

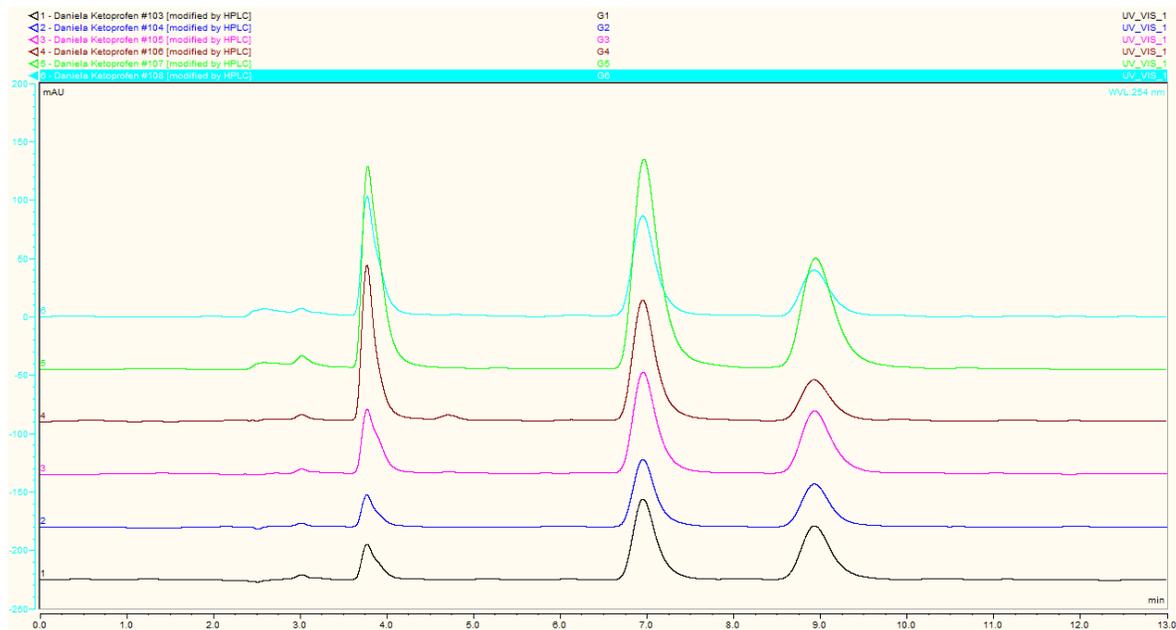


Figura 21. monitoreo de la esterificación del (S)-Ketoprofenato de geraniolo.

El monitoreo de las reacciones se llevó a cabo mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) como se describió anteriormente en el apartado de metodología. En la Figura 22 se muestra el monitoreo de la síntesis de SKF. La reacción fue monitoreada a 2, 8, 24, 48 y 72 horas. Los cromatogramas evidencian la disminución del reactivo (S)-Ketoprofeno, mientras que la señal correspondiente al producto (SKF) aumenta con respecto al tiempo. La primera señal del cromatograma que aparece en un tiempo de retención de 4.5 min corresponde al (S)-Ketoprofenato de Farnesio (producto), la señal en un tiempo de 7 min corresponde al (R)-Ketoprofeno y la señal en el minuto 9 corresponde al (S)-Ketoprofeno (reactivo). Sin embargo, en esta reacción se muestra como la enzima disminuye su pierde su enantioselectividad y (S) preferencia, esterificando ahora a ambos enantiómeros.

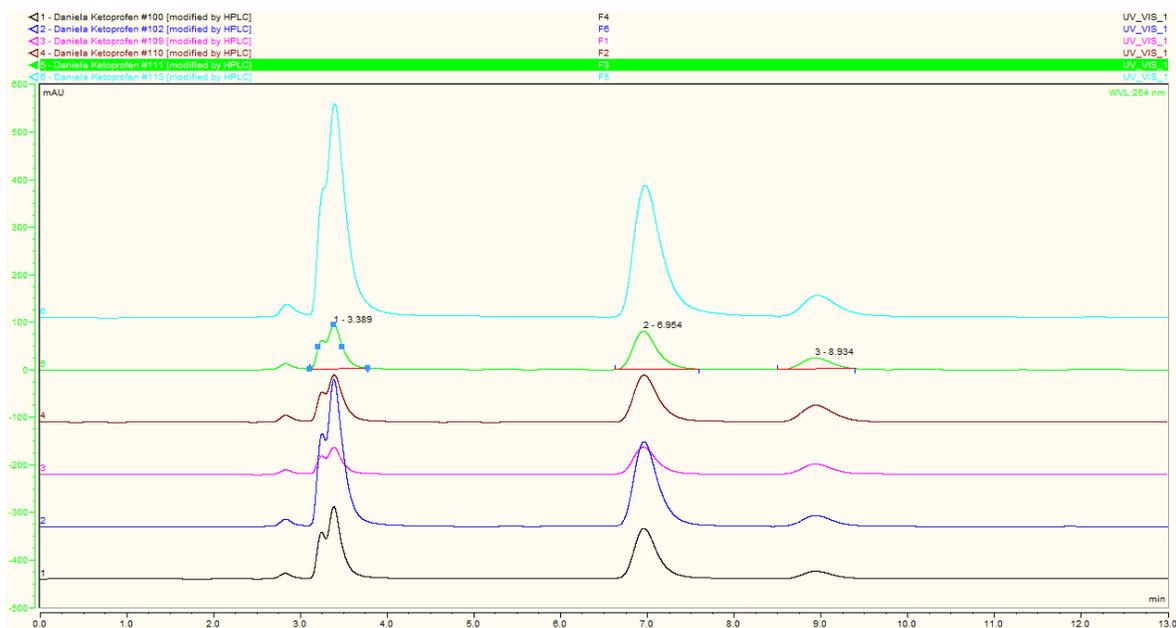


Figura 22. Monitoreo de la esterificación del (S)-Ketoprofenato de farnesio.

7.8 MODELADO MOLECULAR.

Las COX son enzimas clave en los procesos de regulación de la inflamación ya que son las encargadas de la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas. Específicamente la COX-2 es una importante diana terapéutica en el área farmacéutica, ya que llevando a cabo el bloqueo específico de esta enzima es posible la regulación de procesos inflamatorios (Choi et al., 2009). El efecto analgésico del Ketoprofeno actualmente se le atribuye al enantiómero (S) (Foster et al., 1988) y según diversos reportes la ingesta del enantiómero puro suele disminuir la toxicidad en el organismo así como aumentar el efecto antiinflamatorio comparado con otros fármacos como lo es el diclofenaco (Cabré et al., 1998). Sin embargo, algunos autores atribuyen diferentes efectos ulcerativos al hecho de el fármaco posee un grupo carboxílico libre, eso por eso que se ha llevado a cabo la síntesis de diferentes co-fármacos (Sehajpal et al., 2019) esterificando la molécula con algunos antioxidantes que hasta el momento mostraron una significativa reducción en el índice de úlceras gástricas. Es por eso que en la actualidad el modelado molecular proporciona información importante sobre la interacción de nuevas moléculas de interés biológico son moléculas diana en el organismo (Allawi et al., 2019). En el presente trabajo se realizó el acoplamiento molecular de los ésteres (S)-Ketoprofenato de prenilo, geranilo y farnesilo, así como la

interacción del (*S*)-Ketoprofeno y el (*R, S*)-Ketoprofeno con ambas isoformas de la Ciclooxygenasa: COX-1 Y COX-2 código PDB: GY3C y 5IKR respectivamente.

La Figura 23 muestra la interacción del (*R*)-Ketoprofeno con la COX-1, en donde se logran apreciar los residuos aminoacídicos que interaccionan el sitio activo TYR130, LEU152, CYS47, PRO153, TYR39, CYS41, GLU465, LYS468, GLN44, ILE48, ARG469 Y ILE 151. Se observan interacciones por puente de hidrógeno (línea punteada en color verde) entre los aminoácidos Ile48, Leu152 y el ligando. La energía libre de unión (ΔG) es de -8.85 Kcal/mol.

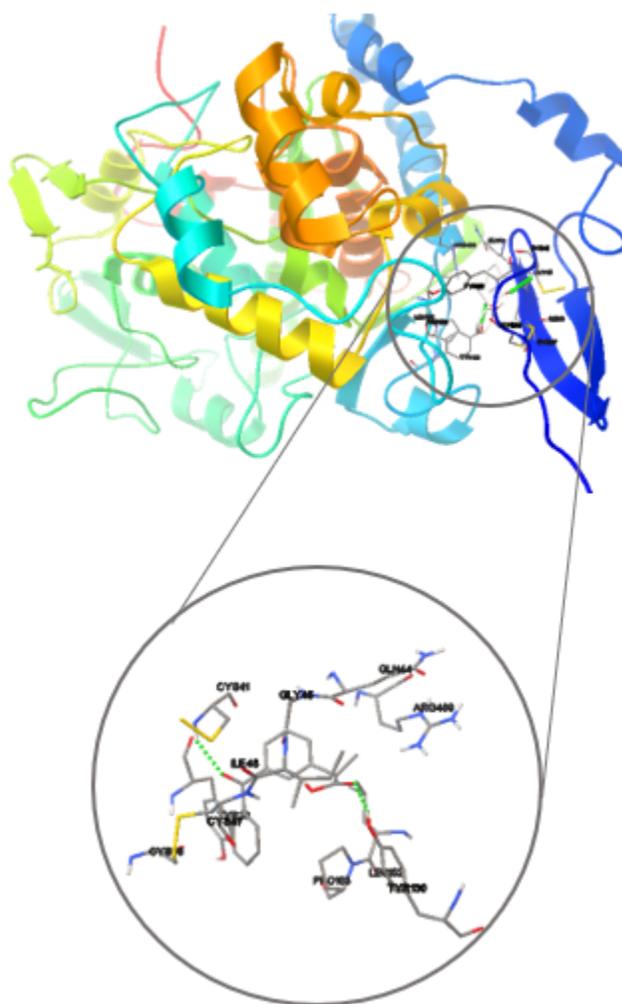


Figura 23. Interacción molecular COX-1 y (*R*)- Ketoprofeno.

La Figura 24 muestra la interacción del (S)-Ketoprofeno con la COX-1, en donde se logran apreciar los residuos aminoacídicos que interaccionan el sitio activo ASN375, GLY536, VAL538, PHE143, GLY225, LEU224 y SER143. Se observan interacciones por puente de hidrógeno entre el residuo ASN375 y el ligando, los enlaces de hidrogeno se observan en la imagen como líneas punteadas en color verde. La energía libre de unión (ΔG) es de -8.84 Kcal/mol.

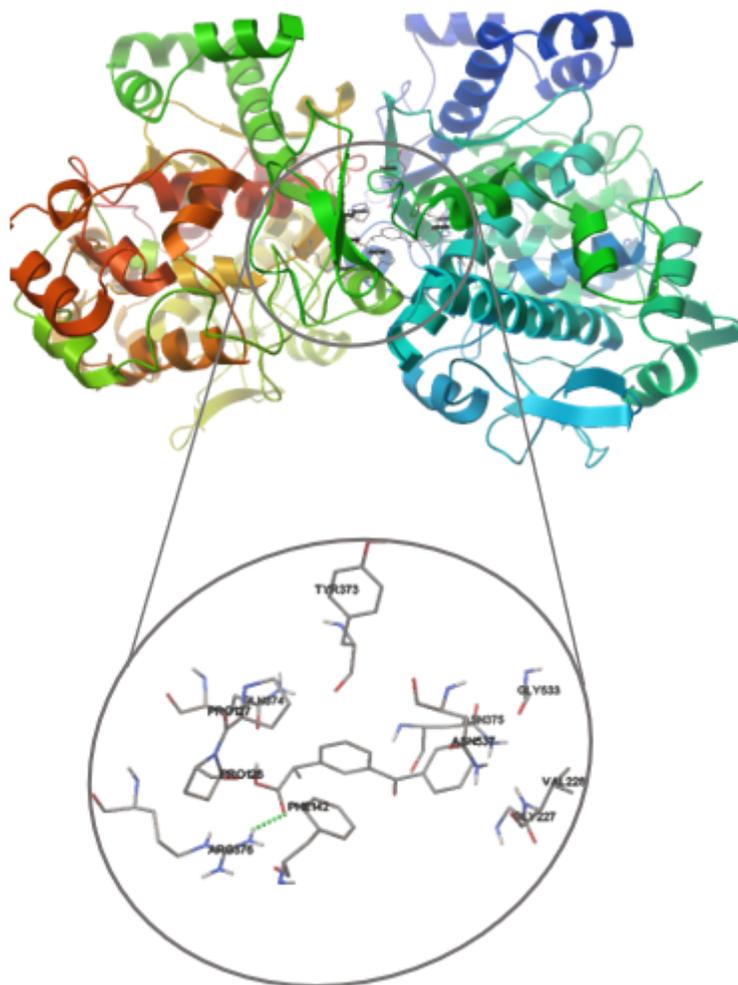


Figura 24. Interacción molecular COX-2 y (R)-Ketoprofeno.

La Figura 25 muestra la interacción del (S)-Ketoprofeno con la COX-1, en donde se logran apreciar los residuos aminoacídicos que interaccionan el sitio activo HIS442, LEU445, ARG179, HIS443, GLN175 y VAL449. Se observan interacciones por puente de hidrógeno entre el residuo LEU445 y el ligando, los enlaces de hidrogeno se observan en la imagen como líneas punteadas en color verde. La energía libre de unión (ΔG) es de -6.76 Kcal/mol.

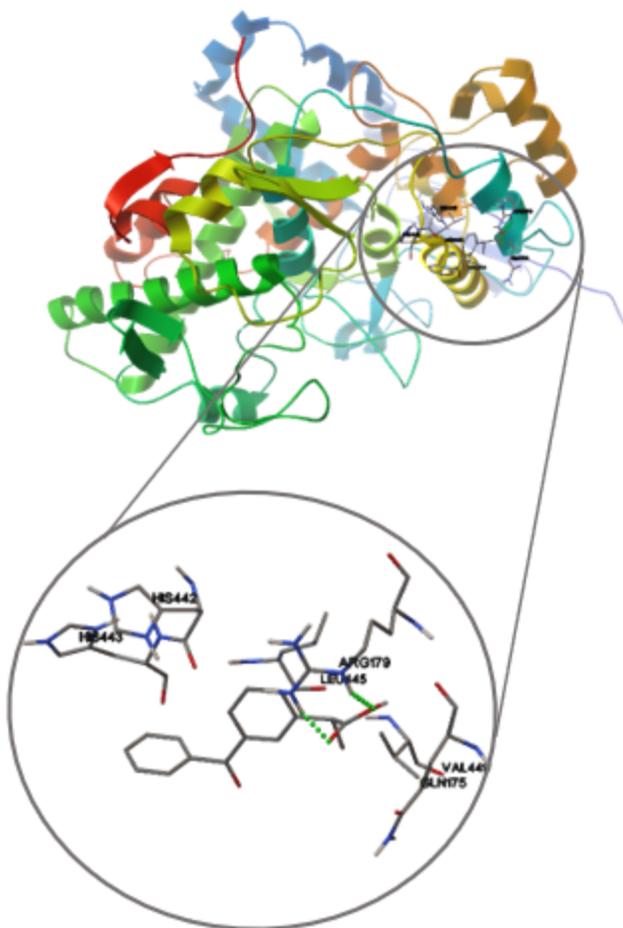


Figura 25. Interacción molecular COX-1 y (S)-Ketoprofeno.

La Figura 26 muestra la interacción del (S)-Ketoprofeno con la COX-2, en donde se logran apreciar los residuos aminoacídicos que interaccionan el sitio activo LEU472, MET471, LYS83, LEU80, GLN42, ASN43 y LYS468. Se observan interacciones por puente de hidrógeno entre el residuo LYS468 y el ligando, los enlaces de hidrogeno se observan en la imagen como líneas punteadas en color verde. La energía libre de unión (ΔG) es de -8.17 Kcal/mol.

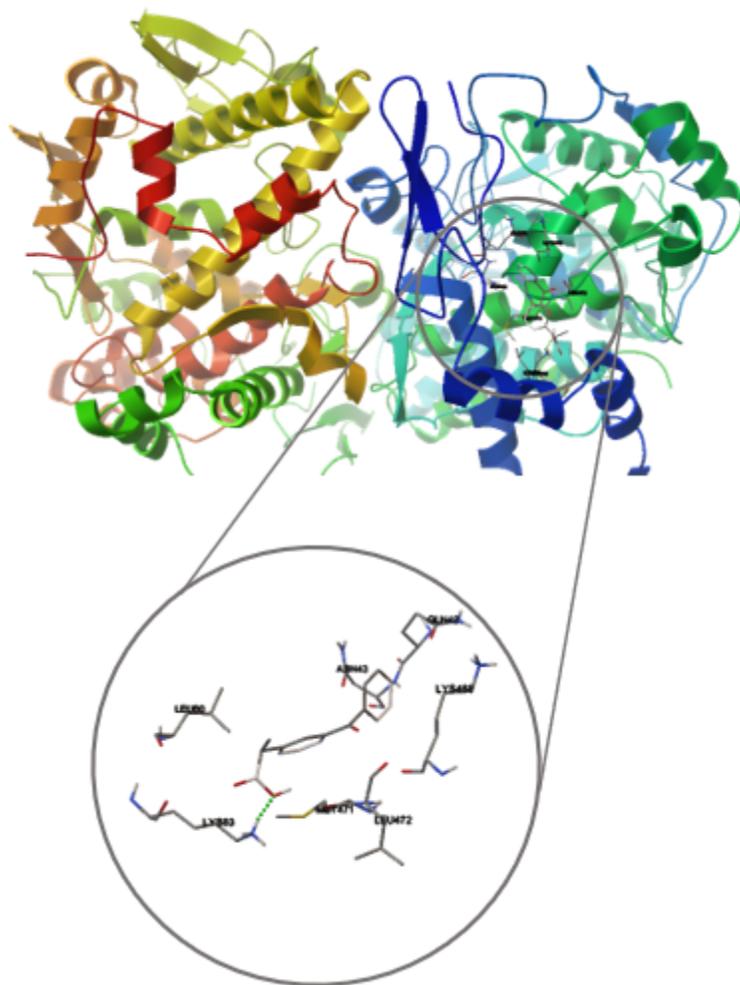


Figura 26. Interacción molecular COX-2 y (S)-Ketoprofeno.

La Figura 27 muestra la interacción del SKP con la COX-1, en donde se logran apreciar los residuos aminoacídicos que interaccionan el sitio activo ILE337, ILE539, PRO538, ASN537, ARG374, GLY225, ASP229 y TYR544. Los enlaces de hidrogeno se observan en la imagen como líneas punteadas en color verde, la energía libre de unión (ΔG) es de -7.0 Kcal/mol.

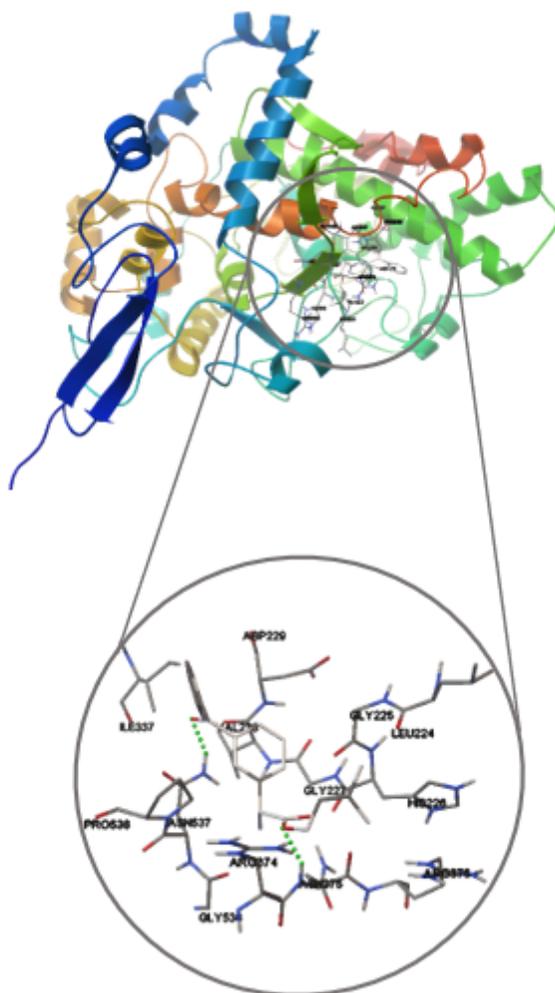


Figura 27. Interacción molecular COX-1 Y SKP.

La Figura 28 muestra la interacción del SKP con la COX-2, en donde se logran apreciar los residuos aminoacídicos que interaccionan el sitio activo LEU294, VAL291, GLN289, LYS211, HIS209, THR212, HIS388, HIS386, ASN382 y PHE210. Se observan interacciones por puente de hidrógeno como líneas punteadas en color verde entre el residuo ASN382 y el ligando. La energía libre de unión (ΔG) es de -9.04 Kcal/mol.

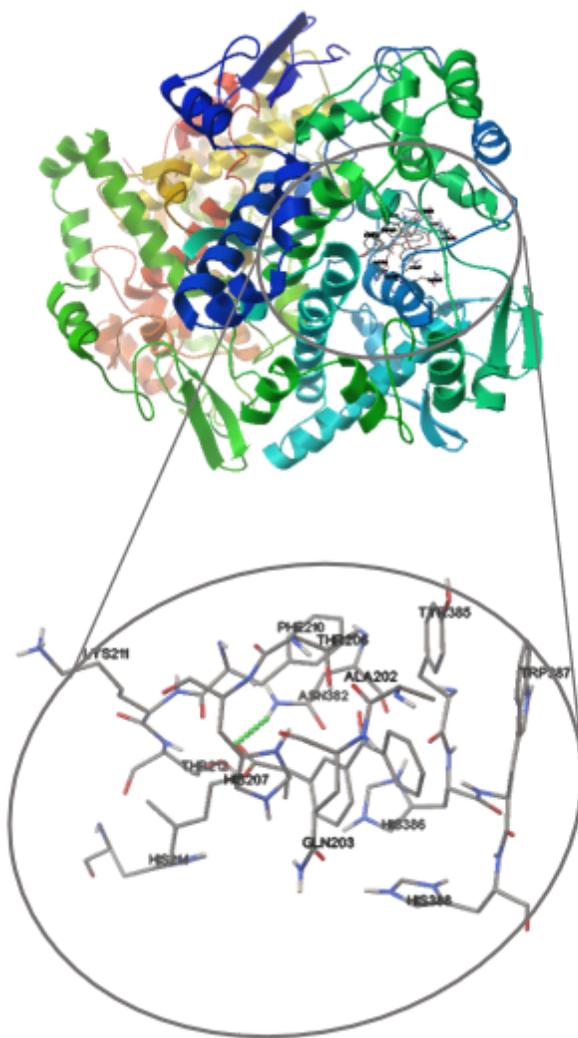


Figura 28. Interacción molecular COX-2 Y SKP.

La Figura 29 muestra la interacción del SIG con la COX-1, en donde se observa que el sitio de unión de la COX-2 está compuesto por los siguientes aminoácidos GLY45, CYS47, CYS41, GLU465, PRO40, TYR39, CYS36 y PRO153. Se observa interacciones por puente de hidrógeno entre el residuo CYS41 y el ligando, los enlaces de hidrogeno se observan en la imagen como líneas punteadas en color verde, sin embargo, también hay interacciones del tipo intermolecular. La energía libre de unión (ΔG) es de -5.02 Kcal/mol.

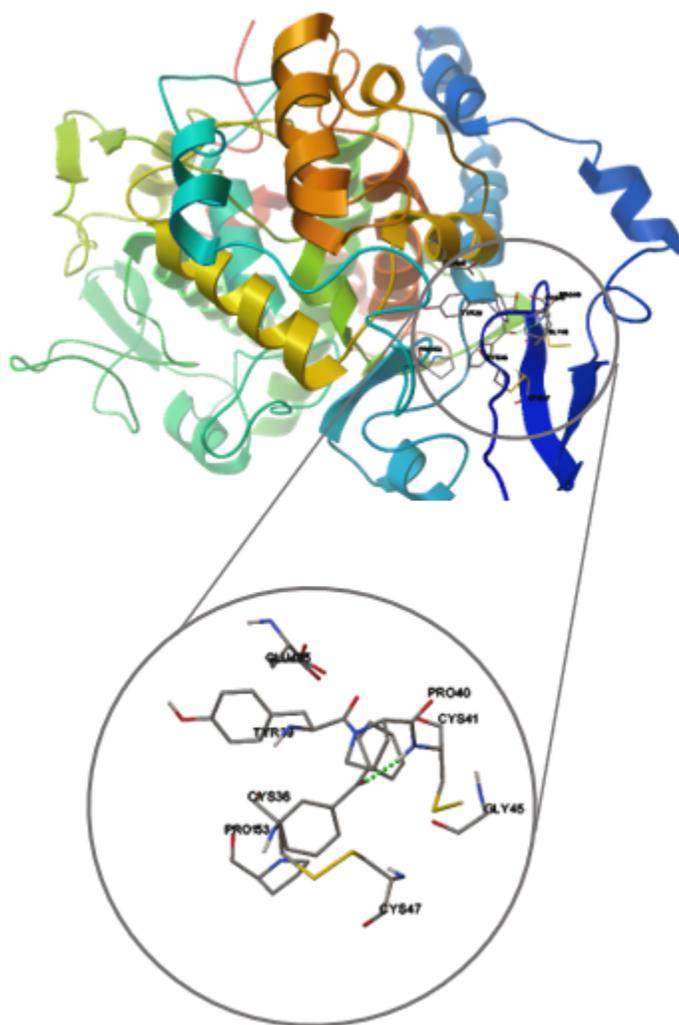


Figura 29. Interacción molecular COX-1 Y SKG.

La Figura 30 muestra la interacción del SIG con la COX-2, en donde se observa que el sitio de unión de la COX-2 está compuesto por los siguientes aminoácidos: HIS388, HIS386, ASN382, THR212, VAL291, LEU294, HIS207, GLN289, LYS211 y PHE210. No se observan interacciones por puente de hidrógeno entre los aminoácidos y el ligando, sin embargo, hay interacciones del tipo intermolecular. La energía libre de unión (ΔG) es de -4.94 Kcal/mol.

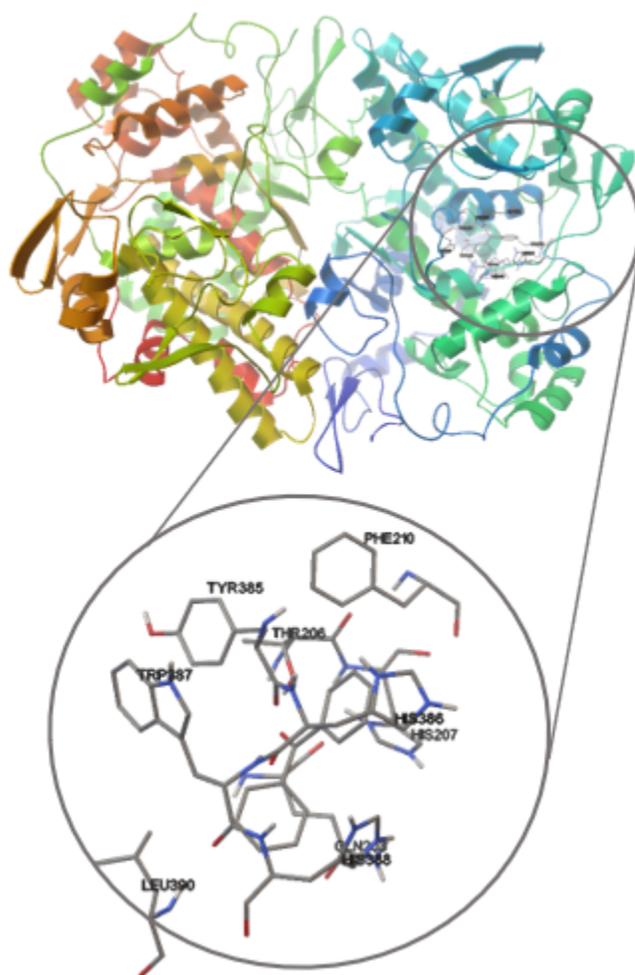


Figura 30. Interacción molecular COX-2 Y SIG.

La Figura 31 muestra la interacción del SKF con la COX-1, en donde se logran apreciar los residuos aminoacídicos que interaccionan el sitio activo SER399, GLN398, ASP424, ALA421, TYR417, PRO676, GLU260, GLU420, THR574 y LYS573. La energía libre de unión (ΔG) es de -4.97 Kcal/mol.

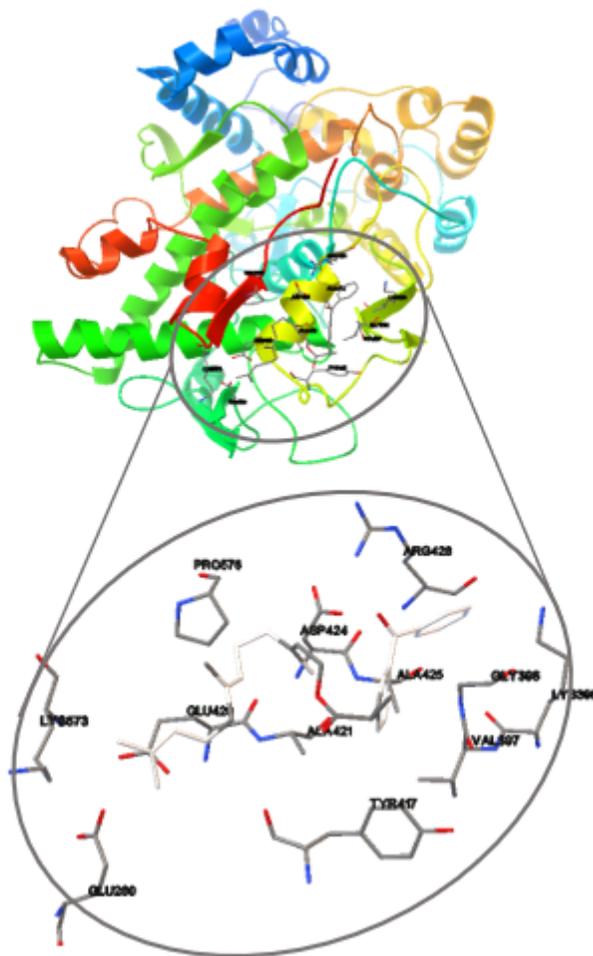


Figura 31. Interacción molecular COX-1 Y SKF.

La Figura 32 muestra la interacción del SKF con la COX-2, en donde se logran apreciar los residuos aminoacídicos que interaccionan el sitio activo ARG456, LYS459, ALA132, ASP133, GLN457, ARG456, PRO216 y ALA219. La energía libre de unión (ΔG) es de -6.38 Kcal/mol.

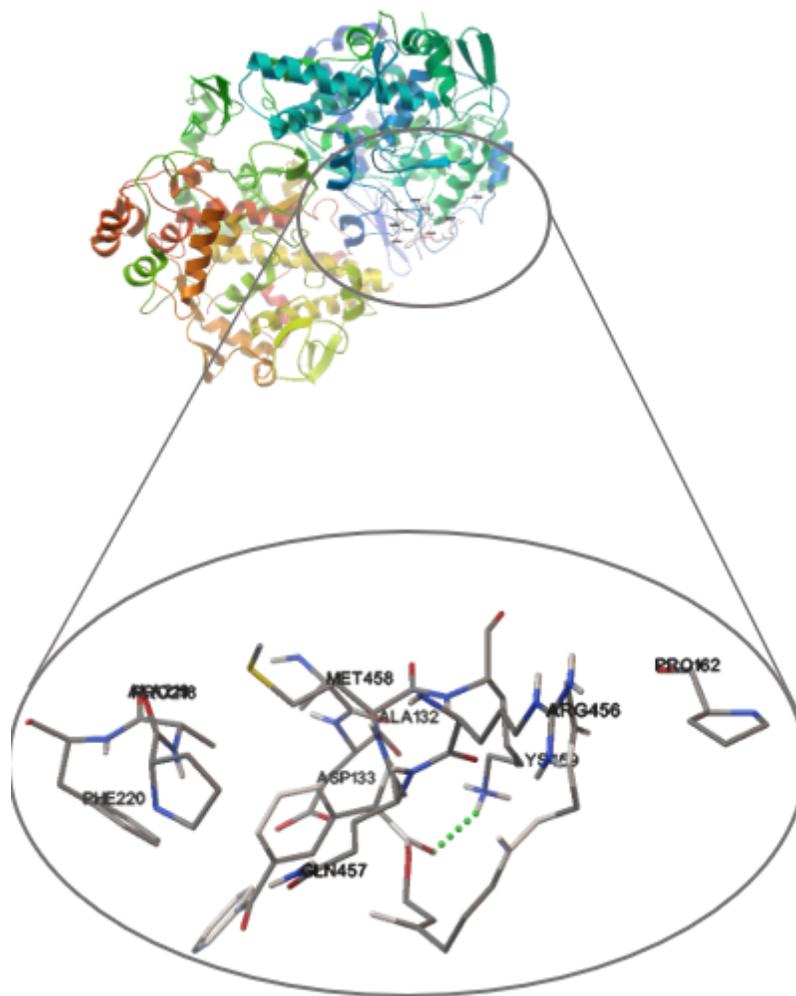


Figura 32. Interacción molecular COX-2 Y SKF.

Tabla 7. Energía libre de unión (ΔG) en las interacciones moleculares entre las COX y los fármacos de investigación (Kcal/mol).

	COX-1	COX-2
(R)-KETOPROFENO	-8.85	-8.84
(S)-KETOPROFENO	-6.76	-8.17
SKP	-7.0	-9.04
SKG	-5.02	-4.97
SKF	-4.97	-6.38

El acoplamiento molecular de dichas macromoléculas con diferentes profármacos demuestra que es posible facilitar el diseño de moléculas más selectivas y que a su vez disminuyan la energía de enlace (Ahmed et al., 2016), como lo es el caso del SKP en su interacción con la COX-2 respecto al *R* o al *S* Ketoprofeno como se observa en la tabla 7. Por lo tanto, es posible obtener moléculas de interés terapéutico que brinden una mejor inhibición selectiva de la COX-2.

7.9 EVALUACIÓN IN SILICO DE ESTERES TERPENICOS DE KETOPROFENO

Se realizó una evaluación de los ésteres terpénicos sintetizados utilizando diferentes herramientas quimio-informáticas, esto para predecir el comportamiento de las moléculas, sus propiedades farmacocinéticas, farmacodinámicas y su toxicidad.

7.9.1 PASS (Predicción del Espectro de Actividad Biológica Para Sustancias)

El sistema de predicción Pass online actualmente proporciona información que puede ayudar a saber si algún pre fármaco va a presentar algún efecto indeseado en la molécula previo a su síntesis o a su comercialización (Parasuraman, 2011) la figuras 32, 33 y 34 muestran la estructura de unas molécula propuestas como pre fármacos antiinflamatorios que a su vez disminuyan los efectos secundarios gastrointestinales que actualmente el comercializado (*R*, *S*)-Ketoprofeno presenta.

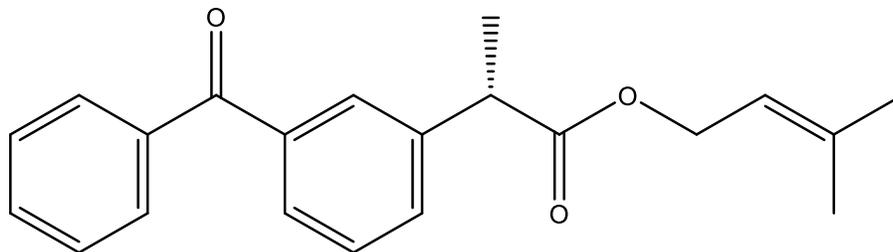


Figura 33. Estructura molecular del (S)-Ketoprofenato de prenilo (SKP).

La tabla 8 muestra la Pa corresponde a la probabilidad de la molécula de ser activo, mientras que Pi pertenece a la probabilidad de la molécula a ser inactivo, y cuando se obtienen $Pa > 70\%$ las posibilidades de encontrar actividad experimental son bastante altas (Filimonov et al., 2014b). En la tabla se observa que el compuesto SKP presenta una alta actividad como antiinflamatorio, así como también anti ulcerativo y una alta probabilidad de ser protector mucomembranoso.

Tabla 8. Predicción de la actividad biológica del SKP determinada por Pass online.

Actividad	Pa (%)	Pi (%)
Antiinflamatorio	0.928	0.008
Protector mucomembranoso	0.854	0.003
Regulador de metabolismo de lípidos	0.926	0.004
Anti ulcerativo	0.600	0.011
anti carcinogénico	0.333	0.047

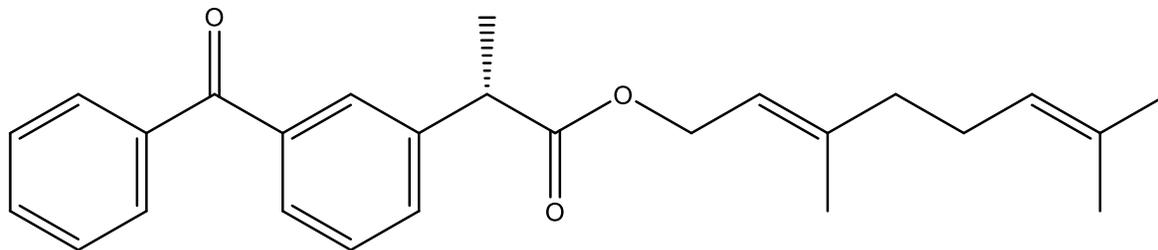


Figura 34. Estructura molecular del (S)-Ketoprofenato de geranilo (SKG).

En la tabla 9 se observa que el compuesto SKG presenta una alta actividad como antiinflamatorio, así como también anti ulcerativo y una alta probabilidad de ser protector mucomembranoso.

Tabla 9. Predicción de la actividad biológica del SKG determinada por Pass online.

Actividad	Pa (%)	Pi (%)
Antiinflamatorio	0.914	0.004
Protector mucomembranoso	0.939	0.004
Regulador de metabolismo de lípidos	0.964	0.002
Anti ulcerativo	0.746	0.004
Anti carcinogénico	0.431	0.026

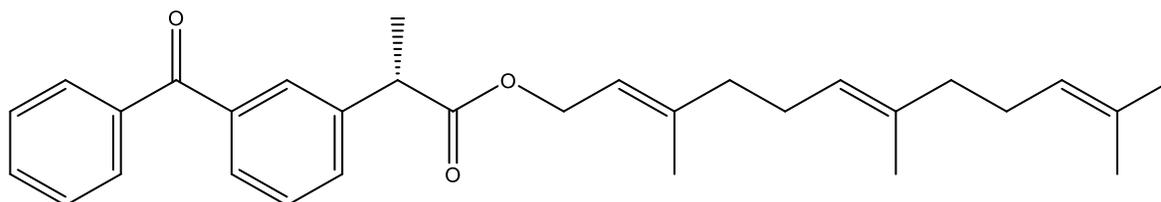


Figura 35. estructura molecular del (S)-Ketoprofenato de farnesilo (SKF).



En la tabla 10 se observa que el compuesto SKF presenta una alta actividad como antiinflamatorio, así como también anti ulcerativo y una alta probabilidad de ser protector mucomembranoso.

Tabla 10. Predicción de la actividad biológica del SKF determinada por Pass online.

Actividad	Pa (%)	Pi (%)
Antiinflamatorio	0.915	0.004
Protector mucomembranoso	0.939	0.004
Regulador de metabolismo de lípidos	0.964	0.002
Anti ulcerativo	0.746	0.004
anticariogénico	0.431	0.026

Con respecto a los 3 fármacos propuestos como antiinflamatorios y a demás protectores del sistema gastrointestinal el SKP es quien presenta mayores porcentajes de actividad antiinflamatoria y los tres esteres presentan una alta actividad de ser protectores mucomembranoso. Sin embargo, tanto SKG como SKF presentan una probabilidad arriba del 70% de además de ser protectores mucomembranoso y antiinflamatorios tambien pueden ser anti ulcerativos.

7.9.2 SwissADME: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción

Las reglas de Lipinski sirven para detectar y predecir el comportamiento de las sustancias relacionado a la permeabilidad en membranas biológicas. Los postulados son:

- Peso molecular menor a 500 g/mol.
- Coeficiente de partición menor o igual a 4.15.
- Número de aceptores de hidrógeno menor o igual a 10.
- Número de donadores de hidrógeno menor o igual a 5.



Mientras que los postulados de Veber determinan si la posible biodisponibilidad de un fármaco si se administra vía oral:

- Enlaces rotables menores o iguales a 10.
- Área de superficie polar topológica menor o igual a 140 \AA^2

En la Tabla 11 se muestran las características necesarias para determinar si los compuestos cumplen con las reglas de Lipinski y las reglas de Veber las cuales determinan la biodisponibilidad de los compuestos. Es posible observar que tanto SKG como SKF tienen una violación a los postulados de Lipinski y este hace referencia al logP o coeficiente de partición el cual hace referencia a si una molécula es o no soluble en solventes polares. Sin embargo, el hecho de que exista una violación a la regla no impide que una molécula sea un buen candidato a fármaco, más de una violación si podría indicar que una molécula puede no ser del todo apta para su síntesis. Por otra parte, cabe resaltar que estos programas son solo predictores y sus resultados deben ser corroborados con métodos experimentales en moleos *in vivo*.

Tabla 11. Propiedades fisicoquímicas del SKP, SKG Y SKF.

NOMBRE	SKP	SKG	SKF
ESTRUCTURA			
Peso Molecular	322.40	390.51	458.63
Donadores de Enlace por puente de Hidrogeno (HBD)	0	0	0
Aceptores de Enlace por puentes de Hidrogeno (HBA)	3	3	3
tPSA (Å ²)	43.37	43.37	43.37
LogP	3.73	4.79	5.74
LogS	-4.87	-6.19	-7.66
Lipinski	ACEPTADO	1 VIOLACIÓN	1 VIOLACIÓN
Veber	ACEPTADO	ACEPTADO	1 VIOLACIÓN
Egan	ACEPTADO	1 VIOLACIÓN	1 VIOLACIÓN
Accesibilidad sintetica	4.05	4.10	4.65

6.9.3 AdmetSAR: Predicción de las propiedades farmacocinéticas

De acuerdo con los datos de la Tabla 12, en la parte de absorción SKP, SKG y SKF presentan arriba de un 99% de probabilidad de absorberse en el intestino humano; así como una alta probabilidad de no ser sustratos de la glicoproteína P la cual está

relacionada a la resistencia a fármacos. En la parte de metabolismo se observa que los tres compuestos presentan buenas probabilidades de no interactuar con CYP450 (Citocromo P450), la cual predice interacciones fármaco-fármaco. Mientras que dentro de las predicciones relacionadas a toxicidad SKP, SKG y SKF presentan altas probabilidades de no estar relacionados con mutagenicidad y carcinogénesis.

Tabla 12. Propiedades farmacocinéticas del SKP, SKG y SKF.

NOMBRE	SKP	SKG	SKF
ESTRUCTURA			
	Valor/porcentaje (%)	Valor/porcentaje (%)	Valor/porcentaje (%)
Barrera hematoencefálica (+)	0.8655	0.8601	0.8601
Absorción intestinal humana (+)	0.9963	0.9972	0.9972
Permeabilidad Caco-2 (+)	0.7576	0.7132	0.7132
glicoproteína (Sustrato) (-)	P 0.5148	0.6011	0.6011
glicoproteína (Inhibidor) (+)	P 0.7647 0.6336	0.7376 0.9200	0.7376 0.9200
Localización subcelular	Mitocondria / 0.9044	Mitocondria / 0.8729	Mitocondria / 0.8729
CYP450 (Sustrato) (+)	2C9 0.8189	0.8306	0.8306
CYP450 (Sustrato)(-)	2D6 0.9079	0.8901	0.8901
CYP450 (Sustrato) (+)	3A4 0.5834	0.6210	0.6210



CYP450 (Inhibidor) (-)	1A2	0.5939	0.5453	0.5453
CYP450 (Inhibidor) (-)	2C9	0.6140	0.6360	0.6360
CYP450 (Inhibidor) (-)	2D6	0.8501	0.8482	0.8482
CYP450 (Inhibidor) (+)	2C19	0.5805	0.6133	0.6133
CYP450 (Inhibidor) (+)	3A4	0.7847	0.7061	0.7061
Promiscuidad inhibidora de CYP (+)		0.8735	0.7626	0.7626
Toxicidad AMES (-)		0.7247	0.9228	0.9228
No Carcinógenos (-)		0.5771	0.7346	0.7346
Biodegradación (-)		0.7580	0.8341	0.8341
Toxicidad oral aguda		0.7104	0.6039	0.6039
Carcinogenicidad (-)		0.6540	0.5507	0.5507



VII. CONCLUSIÓN

Empleando *Candida rugosa* lipasa como catalizador enantioselectivo, para llevar a cabo la reacción de esterificación de (S)-Ketoprofeno, isooctano como disolvente y decanol como alcohol esterificante fue posible esterificar hasta un 44.65 % con un valor máximo de enantioselectividad de 63.17% y un exceso enantiomérico del producto deseado de hasta 50.53%. El Tween 80 en la reacción de hidrolisis sirve como un emulsionante para amplificar el área interfacial enzima/sustrato y activador enzimático. Empleando una concentración al 10% de Tween 80 es posible obtener un 88% de conversión en 56 h. Empleando KOH 0.1 M en la reacción de racemización es posible obtener una conversión de hasta el 99% en 4 h y aumentar el rendimiento de producción del (S)-Ketoprofeno hasta un 98%.

En las síntesis de ésteres de alcoholes terpénicos se consiguió con éxito cuando se utilizaron 4 g de CRL en 5mmoles del alcohol, manteniendo la reacción por 48 h y usando 2,2,4-trimetilpentano como solvente. El (S)-Ketoprofenato de prenilo fue quien mostro tener mejores valores de conversión (48.82 %) así como un ee y E de 24.97 % y 75.49 % respectivamente. Esto posiblemente se debe a la presencia de dobles enlaces lo cuales interfieren con el acomodo de las cadenas alquílicas en el sitio activo de la enzima mostrando una baja enantioselectividad en la reacción con el largo de la cadena del alcohol, farnesilo y prenilo.

Además, los análisis *in silico* de estas moléculas muestran que la posibilidad de que el éster (S)-geranilo de Ketoprofeno tenga buenas características como antiinflamatorio además de ser buen candidato para la disminución de los efectos secundarios a nivel gastrointestinal según los acoplamientos moleculares analizados por Autodock así como los predictores PASS online mientras que SwissADME y AdmetSAR lo colocan como un pre-fármaco con buenas características fisicoquímicas que le aportan una buena biodisponibilidad en el organismo y una baja probabilidad de toxicidad.



VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, M., Azam, F., Gbaj, A., Zetrini, A., Abodlal, A., Rghigh, A., Mohamed, I., Amel, M., Salama, M., & Saber, S. (2016). Ester Prodrugs of Ketoprofen: Synthesis, In Vitro Stability, In Vivo Biological Evaluation and In Silico Comparative Docking Studies Against COX-1 and COX-2. *Current Drug Discovery Technologies*, 13.
<https://doi.org/10.2174/1570163813666160119092807>
- Allawi, M. M., Mahdi, M. F., & Rauf, A. M. R. (2019). Synthesis, anti-inflammatory, molecular docking and ADME studies of new derivatives of ketoprofen as cyclooxygenases inhibitor. *Al-Mustansiriyah Journal of Pharmaceutical Sciences (AJPS); Vol 19 No 4 (2019): volume19, Issue4.2019*. <http://ajps.uomustansiriyah.edu.iq/index.php/AJPS/article/view/644>
- Álvarez Álvarez, C. (2006). *Influencia del enantiomorfismo en la solubilidad y velocidad de disolución de distintos fármacos racémicos: Memoria para optar al grado de doctor*. [Universidad Complutense], Servicio de Publicaciones.
- Arroyo, M. (1998). *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*. 17.
- Arroyo Sánchez, M. (1995). "SÍNTESIS DE ÁCIDOS 2-ARIL-PROPIÓNICOS HOMOQUIRALES MEDIANTE ESTERIFICACIÓN ENANTIOSELECTIVA CATALIZADA POR LIPASAS INMOVILIZADAS". UNIVERSIDAD COMPLUTENSE.
- Cabré, F., Fernández, M. F., Calvo, L., Ferrer, X., García, M. L., & Mauleón, D. (1998). Analgesic, Antiinflammatory, and Antipyretic Effects of S(+)-Ketoprofen In Vivo. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 38(S1), 3S-10S. <https://doi.org/10.1002/jcph.1998.38.s1.3>
- Carvalho, P. O., Cass, Q. B., Calafatti, S. A., Contesini, F. J., & Bizaco, R. (2006). Review- Alternatives for the separation of drug enantiomers: Ibuprofen as a model compound. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23(3), 291-300. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322006000300003>



- Chávez-Flores, D., & Salvador, J. M. (2009a). Commercially viable resolution of ibuprofen. *Biotechnology Journal*, 4(8), 1222-1224. <https://doi.org/10.1002/biot.200900078>
- Chávez-Flores, D., & Salvador, J. M. (2009b). Commercially viable resolution of ibuprofen. *Biotechnology Journal*, 4(8), 1222-1224. <https://doi.org/10.1002/biot.200900078>
- Choi, S.-H., Aid, S., & Bosetti, F. (2009). The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: Implications for translational research. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(4), 174-181. PubMed. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.01.002>
- Collado Lozano, M. (2004). *AMINOÁCIDOS NATURALES COMO MATERIALES DE PARTIDA EN LA PREPARACIÓN DE NUEVOS REACTIVOS Y CATALIZADORES ENANTIOSELECTIVOS*. UNIVERSIDAD JAUME I DE CASTELLÓN.
- D'Antona, N., Lombardi, P., Nicolosi, G., & Salvo, G. (2002). Large scale preparation of enantiopure S-ketoprofen by biocatalysed kinetic resolution. *Process Biochemistry*, 38, 373-377. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00100-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00100-0)
- Enríquez-Núñez, C. A., Camacho-Dávila, A. A., Ramos-Sánchez, V. H., Zaragoza-Galán, G., Ballinas-Casarrubias, L., & Chávez-Flores, D. (2015). Chemoenzymatic Kinetic resolution of (R)-malathion in aqueous media. *Chemistry Central Journal*, 9(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13065-015-0119-y>
- Filimonov, D. A., Lagunin, A. A., Glorizova, T. A., Rudik, A. V., Druzhilovskii, D. S., Pogodin, P. V., & Poroikov, V. V. (2014a). Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50(3), 444-457. <https://doi.org/10.1007/s10593-014-1496-1>
- Filimonov, D. A., Lagunin, A. A., Glorizova, T. A., Rudik, A. V., Druzhilovskii, D. S., Pogodin, P. V., & Poroikov, V. V. (2014b). Prediction of the biological activity spectra of organic compounds



using the pass online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50(3), 444-457.

<https://doi.org/10.1007/s10593-014-1496-1>

Foster, R. T., Jamali, F., Russell, A. S., & Alballa, S. R. (1988). Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in healthy subjects following single and multiple doses. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77(1), 70-73. <https://doi.org/10.1002/jps.2600770113>

García Galán, C. (2014). *DISEÑO DE BIOCATALIZADORES DE LIPASAS Y SU APLICACIÓN EN BIOPROCESOS*. Universidad Autónoma de Madrid.

Ghambarian, M., Tajabadi, F., Yamini, Y., Behbahani, M., Sobhi, H. R., & Esrafil, A. (2020). An efficient sample preparation method based on dispersive liquid–liquid microextraction associated with back extraction for trace determination of acidic pharmaceuticals. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 1924-1932. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.02.010>

Guevara-Pulido, J. O., Caicedo, J., David, F., & González, J. (2017). CATÁLISIS ASIMÉTRICA, UNA NUEVA ERA EN LA SÍNTESIS DE FÁRMACOS: HISTORIA Y EVOLUCIÓN. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12.

Henke, Erick, Yang, H., & Schuster, S. (2000). Lipase-Catalyzed Resolution of Ibuprofen. *Monatshefte fuer Chemie*, 131(6), 633-638. <https://doi.org/10.1007/s007060070091>

Henke, Erik, Schuster, S., Yang, H., & Bornscheuer, U. T. (2000). Lipase-Catalyzed Resolution of Ibuprofen. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*, 131(6), 633-638. <https://doi.org/10.1007/s007060070091>

Hernáiz, M. J. (2012). BIOCÁTALISIS APLICADA A LA SÍNTESIS DE FÁRMACOS (I) ENZIMAS HIDROLÍTICAS. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 44.

Herrera Kao, W. A. (2014). *“Síntesis enzimática y propiedades térmicas de Poli(lactonas) y sus copolímeros obtenidos vía polimerización por apertura de anillo”* [Doctoral]. Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S. C.



- Huang, K., Jiao, F., Liu, S., Li, X., & Huang, D. (2006). ENANTIOSELECTIVE EXTRACTION OF KETOPROFEN ENANTIOMERS USING ESTER ALCOHOL R, R-DI-TARTARATES OR S, S-DI-TARTARATES AS CHIRAL SELECTOR. *Latin American Applied Research*, 5.
- Ibáñez, M. P. (2018). *Determinación simultánea de los enantiómeros de mezclas de ketoprofeno, naproxeno e ibuprofeno en fármacos y muestras de agua mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en modo heart-cut*. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE.
- Jaramillo, J. V. M., & María Belén Cevallos Ludeña. (2018). *ANÁLISIS ENANTIOMERICO Y OLFATOMÉTRICO DEL ACEITE ESENCIAL DE LA PLANTA Hedysmum purpurascens CON FLORES FEMENINAS EN LA PROVINCIA DE LOJA*. UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA.
- Jiménez Blanco, J. L. (1996). *TIOCARBAMATOS Y TIOUREAS DE CARBOHIDRATOS. SÍNTESIS DE 1,3-O,N-HETEROCICLOS ENANTIOPUROS, RECEPTORES QUIRALES Y GLICOMIMÉTICOS*. UNIVERSIDAD DE SEVILLA.
- José, C. (2013). *“RESOLUCIÓN BIOCATALÍTICA DE ENANTIÓMEROS DEL IBUPROFENO”*. Universidad Nacional de La Plata.
- Koskinen, A. M. P., & Klibanov, A. M. (2013). *Enzymatic Reactions in Organic Media*. Springer Verlag.
- Lagunin, A., Stepanchikova, A., Filimonov, D., & Poroikov, V. (2000). PASS: Prediction of activity spectra for biologically active substances. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 16, 747-748.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.8.747>
- Leffingwell, J. C. (2003). *Chirality & Bioactivity I.: Pharmacology*. 3(1), 27.
- Liu, Y.-Y., Xu, J.-H., & Hu, Y. (2000). Enhancing effect of Tween-80 on lipase performance in enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10(5), 523-529. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00093-X](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00093-X)



- Martín, S., & Hoyos Vidal, P. (2017). *“EMPLEO DE LIPASAS EN LA PREPARACIÓN DE MOLECULAS QUIRALES COMO INTERMEDIOS EN LA SÍNTESIS DE FÁRMACOS I”*: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE.
- Martínez Pérez, R. B. (2012). *LIPASAS DIGESTIVA E INTRACELULAR DE *Penaeus vannamei* ESPECIFICIDAD Y ACTIVIDAD EN PRESENCIA DE SULFACTANTES*. CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.
- Méndez Sánchez, D. (2015). *DESARROLLO DE PROCESOS BIOCATALITICOS PARA LA PREPARACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS DE ALTO VALOR AÑADIDO EMPLEANDO HIDROLASAS Y OCIDORREDUCTASAS. DISEÑO DE REACCIONES EN CASCADA*. UNIVERSIDAD DE OVIEDO.
- Nguyen, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2006). *Chiral Drugs. An Overview*. 2(2), 16.
- Ong, A. L., Kamaruddin, A. H., Bhatia, S., Long, W. S., Lim, S. T., & Kumari, R. (2006a). Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (R)-ketoprofen. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 924-929.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.01.029>
- Ong, A. L., Kamaruddin, A. H., Bhatia, S., Long, W. S., Lim, S. T., & Kumari, R. (2006b). Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (R)-ketoprofen. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 924-929.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.01.029>
- Ortega, A. A., Callejas-Yañez, D., & Cano Tapia, E. (2015). *SÍNTESIS CATALÍTICA ASIMÉTRICA: UNA VISIÓN INTEGRAL DE LOS ENANTIOMEROS*. UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS.
- Parasuraman, S. (2011). Prediction of activity spectra for substances. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 2(1), 52-53. PubMed. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.77119>



- Rodríguez Bernardino, Á. (2005). *Asociación entre el consumo de antiinflamatorios no esteroideos y la aparición o descompensación de insuficiencia cardiaca congestiva: Estudio de casos y controles*. [Universidad Complutense], Servicio de Publicaciones.
- Sánchez, C. S., & Vidal, M. P. H. (2017). *EMPLEO DE LIPASAS EN LA PREPARACIÓN DE MOLÉCULAS QUIRALES COMO INTERMEDIOS EN LA SÍNTESIS DE FÁRMACOS*. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE.
- Sehajpal, S., Prasad, D. N., & Singh, R. K. (2019). Novel ketoprofen–antioxidants mutual codrugs as safer nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Synthesis, kinetic and pharmacological evaluation. *Archiv der Pharmazie*, 352(7), 1800339. <https://doi.org/10.1002/ardp.201800339>
- Singh, N., & Sharma, L. (2018). Enantioseparation of D- and L- isomers of Chiral Drugs for Improving their Bioavailability: Some Techniques Including Micellization with Gemini Surfactants. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 52(3), 334-341. <https://doi.org/10.5530/ijper.52.3.39>
- Thomas, L., Mathew, S., & Johnson, S. (2020). In-silico prediction of role of chitosan, chondroitin sulphate and agar in process of wound healing towards scaffold development. *Informatics in Medicine Unlocked*, 20, 100406. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2020.100406>
- Toledo, M. (2015). *RESOLUCIÓN CINÉTICA ENZIMÁTICA ECO-COMPATIBLE DE R/S-KETOPROFENO* [DOCTORAL]. UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA.
- Tomasz Siodmiak & Jan K. Ruminski and Michal P. Marszall. (2012). Application of Lipases from *Candida rugosa* in the Enantioselective Esterification of (R,S)-Ibuprofen. *Current Organic Chemistry*, 16(8), 972-977. <https://doi.org/10.2174/138527212800194728>
- Tong Zhang. (2011). *Enantiomer separation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs Using Daicel immobilized polysaccharide-derived chiral columns and the Agilent 1260 Infinity Analytical SFC System*. 8.



- Vivero, M. R. A. (2008). *Producción de la lipasa LIP2 de Candida rugosa en el sistema Pichia pastoris: Caracterización y aplicación en reacciones de síntesis*. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Williams, K., & Lee, E. (1985). Importance of Drug Enantiomers in Clinical Pharmacology: *Drugs*, 30(4), 333-354. <https://doi.org/10.2165/00003495-198530040-00003>
- Yuan, X., Wang, L., Liu, G., Dai, G., & Tang, K. (2019). Resolution of (R , S)-ibuprofen catalyzed by immobilized Novozym40086 in organic phase. *Chirality*, 31. <https://doi.org/10.1002/chir.23070>