

Lezione 1

Introduzione alle Biotrasformazioni

Biotrasformazioni

Le biotrasformazioni sono trasformazioni chimiche che vengono effettuate mediante l'uso di enzimi o organismi.

Consentono di ridurre il numero di stadi sintetici e consentono in alcuni casi di effettuare reazioni che non sono ottenibili con metodiche di chimica classica (produzione di vitamina C, steroidi eg. Anticoncezionali).

Sono utilizzati nell'industria farmaceutica per effettuare reazioni stereoselettive.

Il mercato dei biocatalizzatori è in aumento.

pH di attività dei biocatalizzatori è quello dell'organismo (spesso fisiologico).

Questo è importante sia per la funzionalità che per lo smaltimento dei reflui. Reflui a pH neutro necessitano meno passaggi per lo smaltimento (non è necessario neutralizzare).

Se effettuo una idrolisi di una amide, con le tecniche di chimica classica, sono necessari un ambiente basico e una temperatura alta.

Le proteine hanno un legame ammidico, e resistono sicuramente alla temperatura dell'organismo umano. Nell'idrolisi chimica si può arrivare a 60-70-80 gradi (controllare reazioni di idrolisi chimica e biochimica legame ammidico), in base al solvente ed alla struttura dell'amide.

Scaldare reattori industriali da decine di migliaia di litri è costoso.

Fare reazioni a temperatura più bassa (fisiologica) è conveniente.

Inoltre con l'uso di enzimi industriali psicrofili si possono eseguire reazioni a basse temperature.

Le reazioni possono essere:

- stereoselettive
- chemoselettive
- regioselettive

Le condizioni chimiche in cui avvengono le bioreazioni sono sostenibili dal punto di vista ambientale e possono essere definiti chimica verde.

I limiti della biocatalisi

Disponibilità dell'enzima

Le reazioni enzimatiche sono catalizzate in maniera ottimale quando l'enzima agisce sul suo substrato naturale in una specifica reazione. Non è detto però che al livello industriale i substrati su cui si vuole fare agire l'enzima corrispondano al substrato naturale dell'enzima. Anzi, in genere il substrato da processare al livello industriale è diverso dal substrato naturale dell'enzima.

Si ha quindi un problema di **disponibilità dell'enzima**. Ci sono tecniche di ingegneria genetica che permettono di modificare l'enzima. I costi di produzione dell'enzima devono sempre essere sostenibili al livello industriale.

La specificità di substrato dell'enzima è un fattore importante e va di pari passo con la biodisponibilità. Da considerare è la stabilità dell'enzima in condizione operative.

Spesso il chimico organico ha da trasformare prodotti organici, che in genere non sono solubili in acqua. Gli enzimi in genere lavorano invece in soluzione acquosa. Vanno trovate quindi condizioni di reazione diverse da quelle della chimica classica.

In genere per prodotti organici si usa un solvente organico. Purtroppo, questo non è sostenibile dal punto di vista ambientale.

Derivati del *limonene* (prodotti per mezzo di biotecnologie) possono essere usati come solventi organici (ricerca recente).

Cambiare solvente senza alterare resa o qualità del prodotto della reazione non è un compito banale.

Reazioni chemoselettive

In una molecola con gruppi funzionali differenti (con reattività differente) una reazione è detta chemoselettiva se la reazione avviene chemoselettivamente su uno di questi.

Esempio:

glicolipidi sono formati da:

un legame acetalico

legami esterei

legami ammidici

Voglio idrolizzare solo il legame estereo.

La saponificazione di un estere porta all'idrolisi dell'estere ed alla formazione di uno ione carbossilato.

Se uso una reazione chimica sarà possibile idrolizzare chemoselettivamente il legame estereo, lasciando inalterato il legame acetalico. Quindi anche chimicamente riesco a fare una reazione chemoselettiva.

Se si utilizzano condizioni acide verranno idrolizzati contemporaneamente sia il legame acetalico che il legame estereo, perché gli esteri si possono idrolizzare anche in condizioni acide.

Non sono però in grado di idrolizzare chemoselettivamente il legame acetalico lasciando inalterato il legame estereo.

Se però il chimico ha a disposizione degli enzimi, si può usare:

glicosidasi: che tagliano chemoselettivamente solo il legame glicosidico acetalico

lipasi: idrolizzano selettivamente il legame estereo

In poche parole, specifici enzimi riescono a separare i legami presenti in maniera stereoselettiva.

Reazioni Regioselettive

Se in presenza di numerosi gruppi funzionali identici, riesco a modificarne selettivamente solo uno di questi in una posizione specifica della mia molecola

Esempio:

In chimica organica: se uso condizioni basiche idrolizzo gli esteri. Non si può idrolizzare il legame acetalico mantenendo il legame estereo.

Una sialidasi (glicosidasi) taglierà in maniera specifica il legame glicosidico.

La produzione di alcuni nuovi vaccini si basa su una formulazione della parte oligosaccaridica legata alla proteina che fa da antigene. La modulazione della corretta risposta anticorpale viene fatta con enzimi glicosidici.

Reazioni Stereoselettive

Chimicamente, con la sintesi classica, avere delle reazioni stereoselettive è difficile e costoso. Gli enzimi invece funzionano bene. Un disaccaride del glucosio (il cellobiosio) ha un legame beta.

Un legame alfa è invece si trova nel maltosio, che è sempre un disaccaride del glucosio.

Ciò che cambia è la stereochimica dello stereocentro.

La reazione è detta stereoselettiva se in presenza di due o più stereoisomeri, la reazione avviene in maniera selettiva solo su uno di essi.

Questa distinzione la sperimentiamo ogni giorno. L'amido che ingeriamo viene idrolizzato da specifiche *alfa amilasi* (alfa glucosidasi) mentre non digeriamo per nulla la cellulosa (perché non abbiamo delle beta-glicosidasi).

La cellulosa è uno dei componenti principali della fibra vegetale, che è uno dei nutrienti di base del nostro organismo.

La stereoselezione è importante nella produzione di tessuti.

Le cellulasi sono utilizzate nella produzione di tessuti.

Quali sono i settori che maggiormente applicano le biotrasformazioni?

Oltre il 50% del settore pharma è interessato alle biotrasformazioni

Poi l'agroalimentare, cosmetica, polimeri.

Che composti ottengo con le biotrasformazioni?

Carboidrati, amminoacidi, peptidi e beta-lattamici, steroidi, derivati lipidici, alcoli secondari, nucleotidi, molecole chirali e non chirali.

Che enzimi si usano?

Le idrolasi sono gli enzimi più usati. Sono versatili, non richiedono cofattori e sono di facile reperibilità.

Ossido reduttasi necessitano di cofattori e sono in genere catalizzate da cellule intere, perché i cofattori sono difficili da reperire e costosi. Il loro utilizzo come enzimi puri è ridotto.

Le cellule intere hanno invece tutto ciò che serve per far funzionare l'enzima.

La chiralità nelle biotrasformazioni

Le biotrasformazioni vengono utilizzate per effettuare la risoluzione cinetica, cioè per separare coppie di enantiomeri. L'evoluzione moderna è la risoluzione dinamica.

Le biotrasformazioni vengono utilizzate per eseguire sintesi asimmetriche. Parto da un precursore non chirale, effettuo una biotrasformazione ed ottengo uno stereoisomero solo tra quelli possibili.

Altre biotrasformazioni si occupano di ottenere precursori enantiopuri. O li trasformo con gli enzimi in modo tale da mantenere l'identità stereochimica o utilizzo il mio enzima per sintetizzare in maniera pura dei precursori che serviranno per fare altro.

Da ricordare è che gli enzimi e biocatalizzatori (cellule intere) sono strumenti di elezione per la produzione di stereoisomeri puri.

Altro aspetto importante è la legislatura, che richiede che ogni volta che un farmaco possa esistere in diverse forme stereoisomeriche, vanno accuratamente analizzati ciascuno degli stereoisomeri, e soprattutto va valutata la teratogenicità del farmaco.

Se il farmaco può esistere in forme stereoisomeriche diverse, il farmaco deve essere sintetizzato in forma pura, con purezza > 98%

Perché?

Nasce tutto dal Talidomide. Il Talidomide ha due stereocentri.

Viene utilizzato come racemo. Il Talidomide in vivo racemizza nello stomaco.

Racemizzazione vuol dire che il carbonio sp^3 diventa sp^2 e poi ritorna sp^3 (equilibrio di conversione).

Come mai?

Il Talidomide è una base (tautomeria chetoenolica). La base è un ossigeno con 2 doppietti. Viene protonato. L'ossigeno positivo richiama il legame π , lascerebbe una lacuna che viene stabilizzata per perdita da un protone.

Carbonio sp^3 ha struttura tetraedrica, mentre il carbonio sp^2 ha una struttura planare.

Racemi

Negli ultimi anni le molecole raceme immesse sul mercato sono pari a zero. Di fatto tutte le entità chimiche che possono essere in forma stereoisomerica sono immesse come singolo enantiomero. Quando non sono immesse come enantiomero, tutte le varianti isomeriche della molecola devono essere analizzate.

I punti chiave che consentono di sviluppare un processo di biotrasformazione.

Va conosciuta la reazione che interessa effettuare tramite biotrasformazione (reazione chimica)

Serve un processo biotecnologico. Cerchiamo un biocatalizzatore che effettua la trasformazione di interesse (idrolisi, ossidazione, disidratazione?).

Non ho un catalizzatore attualmente? Faccio uno screening tra biocatalizzatori.

Caratterizzazione del biocatalizzatore: specificità di substrato, proprietà cinetiche, analisi strutturale

Evoluzione catalizzatore: miglioramento delle proprietà del catalizzatore

Ottimizzare recupero del prodotto.

Sostenibilità economica del progetto.

Enzimi utilizzati al livello industriale.

Bisogna sempre tener conto del prodotto della reazione, se questo può presentarsi come racemo o meno.

Le industrie che utilizzano biocatalizzatori sono le più diverse:

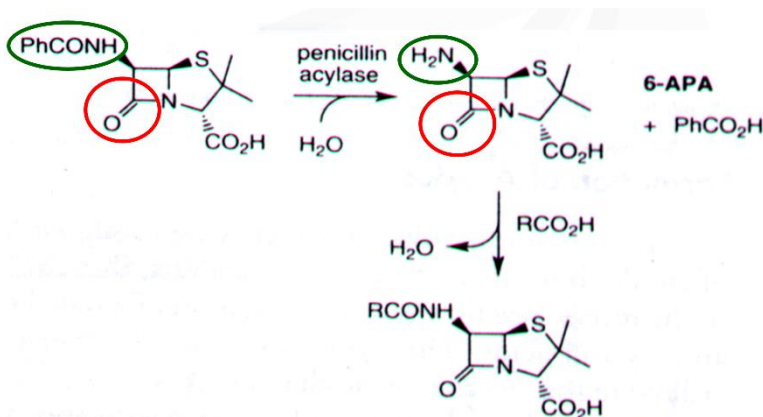
- Detergenti, biocarburanti, alimentazione (succhi di frutta, pectinasi per togliere fibre alimentari).
- Panificazione, distillati, prodotti della fermentazione (vino, birra). Mangimi, bevande, industria tessile, industria della carta, produzione di oli.
- Nella produzione dell'olio ci sono processi di filtrazione. I filtri si intasano e per mantenerne l'efficacia questi vanno puliti. Le fosfolipasi possono essere utilizzate per il processo di degumming.
- Nella sintesi organica vengono usati vari enzimi, principalmente le lipasi, nitrilati.
- L'industria conciaria è particolarmente inquinante per via dei processi chimici utilizzati. Alcuni di questi processi possono essere sostituiti con trattamenti enzimatici. Ci sono finanziamenti per progetti di ricerca al fine di rendere maggiormente sostenibili i processi industriali dell'industria tessile e conciaria.
- Cura della persona e cosmetica.

Prodotti ottenuti con biotrasformazioni su scala industriale:

- Acrilammide, migliaia di tonnellate l'anno
- Aspartame
- Nicotinammide, intermedio della sintesi di alcuni concimi
- Aminoacidi
- Acido cefalosporinico
- Acido aminopenicillanico
- Naproxene, fans
- Vitamina C
- Acido citrico

La produzione di antibiotici beta lattamici necessita di biocatalizzatori. Viene utilizzato un microorganismo per la produzione della molecola.

La penicillina ha la seguente struttura:



Ha un core biciclico ed una catena laterale, che nella penicillina originale è un anello aromatico (Ph, fenile)

Negli anni si è scoperto che sostituendo la catena laterale aromatica con altri gruppi funzionali, si varia lo spettro antibatterico su cui il farmaco agisce.

Gli antibiotici semisintetici si basano quindi sulla struttura del core della penicillina (acido 6 amino penicillanico (6-

APA)), con la variazione del gruppo R.

Il problema è che la nostra molecola di partenza è sempre la penicillina, che va realizzata mediante processi biotecnologici.

La 6-APA ha 3 stereocentri, si devono quindi usare metodi per realizzare reazioni stereoselettive.

Dopo aver ottenuto la penicillina con mezzi biotecnologici, voglio sostituire il gruppo fenilico con un'altra catena laterale per modificare lo spettro antibatterico.

Il gruppo fenilico è unito al core 6-APA per mezzo di un legame ammidico $\text{NH}=\text{CO}$. Il gruppo ammidico è presente anche nel core, che devo mantenere intatto. Nella stessa struttura ho quindi due gruppi ammidici, uno esociclico (fuori dal core ciclico) ed uno endociclico (dentro il core ciclico).

Devo quindi effettuare una reazione regioselettiva per modificare il legame esociclico.

Se effettuo una reazione chimica classica, trattando con basi la penicillina, il primo legame che si idrolizza è quello endociclico.

Il motivo è il legame è all'interno di una struttura sotto tensione angolare.

La risonanza che va dal doppietto dell'azoto al carbonile può stabilizzare il legame esociclico. L'idrolisi delle ammidi in condizioni basiche prevede come primo passaggio un attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico, che in entrambi i casi è ibridato sp^2 e porta 2 sostituenti.

Un carbonio sp^2 prevede che gli angoli di legame sia di 120° . Qui abbiamo un ciclo a 4 termini. Normalmente i cicli a 4 termini sono planari, per cui la struttura tridimensionale è simile a come la disegniamo, cioè piana. Quindi il prodotto che deriva dall'idrolisi del gruppo ammidico porta ad un prodotto più stabile perché rompo la tensione angolare. Il doppio legame sp^2 in un ciclo a quattro termini porta il carbonio ad assumere un angolo di legame di circa 90° .

Questo legame ammidico è infatti particolarmente instabile, motivo per cui gli antibiotici betalattamici vengono venduti in polvere e vanno tenuti in frigorifero. L'idrolisi del legame ammidico è legata all'attività antibatterica del composto; quando il legame viene idrolizzato la molecola perde di attività.

La tensione angolare di questo carbonio sp^2 fa sì che la tensione angolare del legame ammidico endociclico sia maggiore rispetto a quella del legame ammidico esociclico, rendendo il legame instabile e favorendo l'idrolisi di questo legame prima del legame esociclico. La regioselettività della reazione è quindi necessaria per idrolizzare il legame esociclico.

Esiste un enzima, la penicillina acilasi, che effettua in maniera specifica l'idrolisi del legame ammidico esociclico, portando l'ammina corrispondente e lasciando inalterato il legame ammidico endociclico.

Questo enzima può lavorare anche a basse temperature, per cui risulta molto utile per realizzare derivati della penicillina in ambienti acquoso a basse temperature, preservandone l'attività biologica.

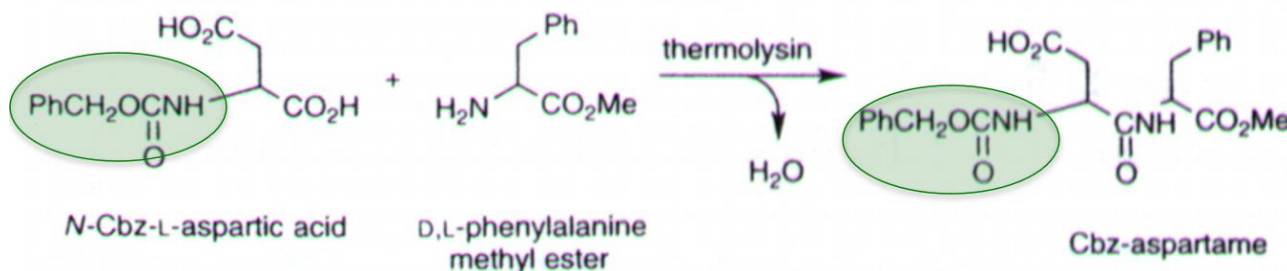
Utilizzando l'enzima arrivo all'acido 6-amino penicillanico, libero acido benzoico (anello aromatico- COOH).

Effettuo poi una reazione di acilazione con una catena R diversa rispetto a quella iniziale, si elimina H_2O (condensazione), e si ottiene l'antibiotico semisintetico. Semisintetico perché ci sono dei passaggi di sintesi, ma la gran parte delle reazioni sono catalizzate da un microorganismo o un enzima.

La reazione di acilazione può essere effettuata tramite biocatalisi.

Aspartame

L'aspartame è un dipeptide, formato dalla condensazione di 2 L-aminoacidi: Acido Aspartico e Fenilalanina Metilestere.



L'aspartame nasce per sbaglio in un laboratorio dove si stavano studiando analoghi peptidici come potenziali farmaci. (la prof dice) "Un dottorando di origine orientale, cinese forse, sintetizza finalmente questo dipeptide. Il suo prof gli dice "Test it!", lui capisce "Taste it!", e l'ha assaggiato, accorgendosi che era molto dolce".

Nell'aspartame si ha la condensazione tra l'acido aspartico, che sull'azoto del gruppo aminico porta un gruppo carbossi benzilossi (cbz) che condensa con la fenilalanina metilestere, che porta un gruppo amminico alfa libero, ed il gruppo carbossilico come derivato estereo con un gruppo metilico.

Il prodotto di condensazione è il dipeptide che prevede la condensazione tra gruppo amminico alfa della fenilalanina e il gruppo carbossilico amminoacidico dell'acido aspartico, che porta il gruppo cbz. Questo gruppo cbz va eliminato per ottenere la struttura finale dell'aspartame.

Se effettuassimo la sintesi chimica dell'aspartame dovremmo fare in modo di annullare la reattività del gruppo carbossilico della catena laterale dell'acido aspartico, in modo da favorire la condensazione unica tra gruppo amminico della fenilalanina ed il gruppo carbossilico amminoacidico dell'acido aspartico.

Anche qui è utile l'intervento della biotecnologia, perché la produzione dell'aspartame per sintesi chimica non è efficiente.

È stato messo appunto un processo industriale per la produzione di aspartame, abbandonando la chimica classica ed introducendo la biocatalisi. È stato utilizzato un enzima, la termolisina, che condensa in maniera regioselettiva il legame peptidico tra acido aspartico e fenilalanina.

Per rendere il processo industriale più efficiente ed ottenere entrambi gli aminoacidi in forma L si sono prodotti *acido L aspartico* con biotecnologie a partire dall'acido fumarico.

La fenilalanina ancora non si riesce ad averla pura a basso costo. Si decide quindi di fare il racemo, miscela equi molare dei due enantiomeri. La termolisina è però sia regioselettiva che stereoselettiva. L'enzima riconosce solo la L fenilalanina, quindi la reazione avverrà solo tra gruppo amminico della L-fenilalanina e gruppo carbossilico (non della catena laterale) dell'acido aspartico.

Solo in queste condizioni il processo è economicamente sostenibile.

L'aspartame è una molecola molto dolce, quindi ne basta pochissimo rispetto allo zucchero. La tossicità dell'aspartame deriva dal fatto che affinché la molecola sia dolce, il gruppo carbossilico della fenilalanina deve essere mantenuto come metil estere.

L'aspartame viene degradato dal nostro organismo attraverso il metabolismo del dipeptide. Questo viene inizialmente idrolizzato nel suo legame peptidico e nel gruppo metil estere della fenilalanina, che rilascia metanolo. La tossicità dell'aspartame deriva dal metanolo rilasciato.

Il metanolo è tossico perché viene ossidato dalle alcol deidrogenasi, prima a formaldeide e poi ad acido formico. L'acido formico non può essere metabolizzato, si accumula nel sangue ed abbassa il pH fisiologico. Questo ci ricorda lo scandalo del vino all'etanolo, dove il vino era stato allungato con metanolo per aumentarne il grado alcolico.

Il problema dell'aspartame è anche il metabolismo del metanolo in formaldeide, che è una aldeide che può reagire con tutti i nucleofili, quali gruppi amminici e acidi nucleici, quindi potenzialmente cancerogeno. L'aspartame è molto usato come dolcificante nelle bevande gassate e zuccherate, e questo può causare problemi quando si hanno alti consumi di queste bevande.

Aminoacidi

Ci si deve ricordare la struttura, soprattutto della catena laterale, perché importante per il meccanismo di reazioni degli enzimi.

Soprattutto catene laterali che hanno gruppi funzionali che possono partecipare alla catalisi enzimatica.

- Acido aspartico
- Acido glutammico
- Arginina
- Istidina
- Prolina
- Serina
- Lisina
- Tutti...a memoria