CIENCIA EN REVOLUCIÓN

Silva et al., Vol. 6, N° 19, 161–168, septiembre–diciembre, 2020.

Tech note:

Alternative Precursors of Acetaminophen Synthesis

Jhorbelis Silva, Milgreidi La–Porte, Ibelise Peña, Natasha Tellería–Mata*
Centro Nacional de Tecnología Química, Caracas, Venezuela

Recibido: noviembre, 2020
Aceptado: diciembre, 2020
*Autor para correspondencia: N. Tellería e–mail: publicacionesgpidi.cntq@gmail.com.
DOI: https://doi.org/10.5281/zenodo.4626140

Abstract

This work presents a review of the activity of patents for the synthesis of acetaminophen, with the aim of identifying inventions related to different synthetic routes and alternative precursors that are cheaper, safer and more sustainable compared to traditional syntheses, which generally involve high-risk reagents for the health of the operators as well as for the environment. The methodology used consisted in the review of various patents through the PatentInspiration platform, for which a search equation was used which yielded sixteen results related to the synthesis of acetaminophen, three of these being the most interesting for research since They present alternative biosynthetic routes to commercial or industrial syntheses. Through the research, it was possible to identify two methods that include the production of acetaminophen and its intermediates (in vitro) from recombinant microorganisms, one used chorismic acid as a precursor and the other used 4-amino-4-deoxychorismate. Finally, a biosynthetic method based on the production of paracetamol from biomass was also identified using as precursor p-hydroxybenzamide extracted specifically from the plant species poplar, aspen, willow and palm.
Keywords: acetaminophen; paracetamol; chorismic acid; p-hydroxybenzamide; biosynthesis.

Nota técnica:

Precursores alternativos para la síntesis de acetaminofén

Resumen

Este trabajo expone una revisión de la actividad de patentes para la síntesis de acetaminofén, con el objetivo de identificar invenciones relacionadas con distintas rutas sintéticas y precursores alternativos más económicos, seguros y sustentables comparados con las síntesis tradicionales, las cuales generalmente involucran reactivos de alto riesgo para la salud de los operarios así como para el medio ambiente. La metodología empleada consistió en la revisión de diversas patentes a través de la plataforma PatentInspiration, para ello se utilizó una ecuación de búsqueda la cual arrojó dieciséis resultados relacionados con la síntesis de acetaminofén, siendo tres de estos los de mayor interés para la investigación puesto que presentan rutas biosintéticas alternativas a las síntesis comerciales o industriales. A través de la investigación se logró identificar dos métodos que comprenden la producción de acetaminofén y sus intermediarios (in vitro) a partir de microorganismos recombinantes, uno empleó como precursor el ácido corísmico y el otro utilizó 4-amino-4-deoxicorismato. Por último, también se identificó un método biosintético basado en la producción de paracetamol a partir de biomasa utilizando como precursor p-hidroxibenzamida extraída específicamente de las especies de plantas álamo, álamo temblón, sauce y palma.
Palabras clave: acetaminofen; paracetamol; ácido corísmico; p-hidroxibenzamida; biosíntesis.

1. Introducción

El acetaminofén (o también conocido como paracetamol) es un fármaco de amplio uso que presenta propiedades analgésicas, antipiréticas y en combinación con otros principios activos disminuye dolores severos [1], así como también puede ser utilizado como alternativa en pacientes alérgicos a la aspirina [2]. Aunque este fármaco no posee actividad antiinflamatoria, sus pocos efectos secundarios lo hace más seguro que la aspirina, ya que tampoco produce cambios ácido–base, irritación estomacal y además no posee efecto en el conteo de plaquetas, tiempo de sangrado ni excreción de ácido úrico [3].

Existen diversas rutas químicas sintéticas para la obtención de paracetamol, la mayoría de las cuales comienzan con un anillo bencénico o algún derivado de este compuesto, que en muchos casos tienden a ser carcinógenos. Usualmente los pasos de síntesis incluyen nitración de fenol con ácido sulfúrico y ácido nítrico o nitrato de sodio, lo que origina una mezcla de isómeros los cuales deben separarse por destilación de arrastre con vapor. Posteriormente, el grupo nitro se debe reducir a un grupo amino, con hidrógeno y catalizadores metálicos y este último ser acetilado con anhídrido o ácido acético al correspondiente paracetamol. Todas estas rutas sintéticas involucran agentes peligrosos no solo para el personal de producción, sino también para el medio ambiente debido a que adicionalmente se requiere el uso de cantidades considerables de solventes orgánicos. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la industria química y farmacéutica de un esquema de síntesis más seguro, sostenible y económico para la producción de acetaminofén [4, 5].

La razón de esta nota técnica fue la búsqueda de métodos alternativos para la obtención de los precursores de este compuesto, trabajo que es de gran interés en el ámbito científico.

2. Metodología

La búsqueda para determinar los precursores alternatinos al acetaminofén utilizó la plataforma de patentes PatentInspiration®, empleando la estrategia presentada en la Tabla 1. La ecuación de palabras claves fue aplicada en el campo título, seleccionando una patente por familia y excluyendo aquellas patentes sin título o resumen vacío. También, se excluyeron algunos códigos de Clasificación Internacional de Patentes (IPC), cuya descripción se encuentra en la Tabla 2, ya que proporcionaban documentos no relacionados directamente a la síntesis del acetaminofén y se incluyeron otros códigos de interés. Por último, la búsqueda fue acotada se acotó entre los años 2014–2018.

3. Discusión de resultados

La estrategia de búsqueda arrojó dieciséis registros de solicitudes y concesiones de patentes, de los cuales tres de ellos resultaron de interés para el desarrollo de la investigación y son descritos a continuación.

La solicitud de patente US20170211104A1 [5] titulada “Producción biosintética de acetaminofén, p-aminofenol y ácido p-aminobenzoico” describe un método a partir del cual células huésped microbianas recombinantes con al menos una molécula de ADN con la capacidad de codificar una enzima que catalice la conversión de un sustrato en acetaminofén, p-aminofenol, poli(p-aminofenol) y ácido p-aminobenzoico (PABA). La empresa 20n Labs, Inc. indica en su solicitud que el organismo huésped puede ser cualquiera genéticamente tratable como plantas, animales, bacterias u hongos. Entre las levaduras, las especies *S. pombe*, *P. pastoris* y S. cerevisiae son alternativas plausibles. En la ruta biosintética el ácido corísmico o corismato, es transformado a ácido p-aminobenzoico (PABA) mediante la acción de dos proteínas, la arginina descarboxilasa sintasa (ADC) y la aminodesoxicorismato liasa (*Saccharomyces cerevisiae*). Luego, el ácido p-aminobenzoico es convertido a p-aminofenol en una reacción catalizada por la enzima 4-aminobenzoato 1-monoigenasa (4ABH (*Agaricus bisporus*)). Por último, el p-aminofenol es acetilado mediante la acetil coenzima A (acetil-CoA) para producir acetaminofén, como se muestra en la Figura 1.

La invención involucra el uso de cepas de levadura, como la *S. cerevisiae*, manipuladas con genes nativos y/o bacterianos para producir acetaminofén,

Tabla 1: Estrategia de búsqueda

Fecha de búsqueda	17/06/2019
Ecuación de búsqueda	`(synthe* or prepara* or Biosynte* or obtaining or produc* or manufact* OR design* OR react* OR method* OR proces*) and (paracetamol or acetaminophen or ''p-acetoaminophenol'')) NOT (formula* OR isomer* OR activity or detection or dimer* or (farmac* AND composi*) or ''o-acetaminophen'' or injection or ''alpha-acetaminophen'' OR composition or Ankahuangmin or adsorbent or adsorption or granul* OR intermediate or decolo* or liquor)`
Período	01/01/2014–31/12/2018
Filtros IPC	NOT A; C02F1/00; C02F101/00; C12Q1/00; C07C229/00; C08G8/00; B01D9/00; B01D3/00 AND C; B01J19/00; B01J31/00; B01J35/00; B01J23/00
Otros filtros	*Solo título *1 por familia *Patente sin título o resumen vacío

Tabla 2: Descripción de códigos IPC empleados en la ecuación de búsqueda

Código IPC	Descripción
B	Mejora continua de operaciones; fenómenos de transporte.
B01D3/00	Destilación o procesos de intercambio relacionados en los que los líquidos entran en contacto con medios gaseosos.
B01D9/00	Cristalización (cristalización directamente en la fase de vapor B01D 7/02; obtención de monocristales C30B).
B01J19/00	Procesos químicos, físicos o fisicoquímicos en general.
B01J23/00	Catalizadores que comprenden metales u óxidos o hidróxidos de metales, no comprendidos en el grupo B01J 21/00.
B01J31/00	Catalizadores que comprenden los elementos o compuestos de halógenos, azufre, selenio, telurio, fósforo o nitrógeno; catalizadores que comprenden compuestos de carbono.
B01J35/00	Catalizadores, en general, caracterizados por su forma o propiedades físicas.
C	Química; metalurgia.
C07C 229/00	Compuestos que contienen grupos amino y carboxilo unidos a la misma estructura carbonada.
C02F1/00	Tratamiento de agua, aguas residuales.
C02F 101/00	Naturaleza del contaminante.
C08G8/00	Polímeros de condensación de aldehídos o cetonas con fenoles únicamente.
C12Q1/00	Procesos de medición o prueba que involucran enzimas, ácidos nucleicos o microorganismos (aparatos de medición o prueba con medios de medición o detección del estado, por ejemplo, contadores de colonias, C12M 1/34) composiciones para los mismos; procesos de preparación de tales composiciones.

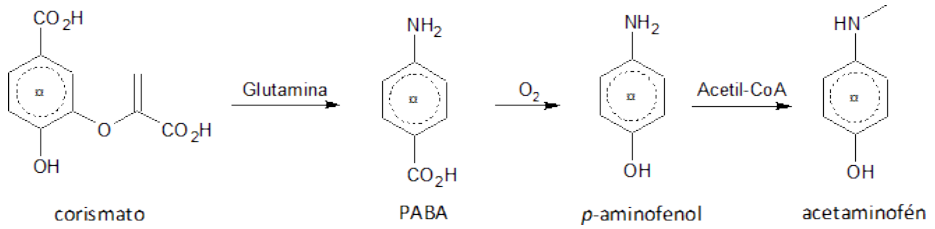


Figura 1: Biosíntesis de acetaminofén a partir de ácido corísmico (o corismato)
Fuente: Solicitud de patente US20170211104A1 [5]

a partir de ácido corísmico (o corismato) por fermentación o a partir de ácido p-aminobenzoico añadido externamente por biotransformación. Las cepas pueden ser cultivadas en un reactor y producir p-aminofenol. El método de biosíntesis comprende los siguiente pasos:

- Proporcionar un medio de fermentación que comprende un sustrato de carbono.
- Poner en contacto dichos medios con un microorganismo de levadura recombinante que exprese la ruta biosintética de acetaminofén mencionada previamente.
- Cultivar la levadura en condiciones en las cuales se produce acetaminofén (pH del medio de cultivo, fuerza ionica, contenido nutritivo, temperatura, oxígeno, CO2, contenido de nitrógeno, humedad, entre otras. Debe contener 2 % de rafinosa suplementado con 1 % de galactosa).
- Purificación del acetaminofén: se filtra la muestra líquida que comprende acetaminofén derivado biológicamente con un filtro de ósmosis inversa para producir un retenido. El retenido se calienta a 80 °C para evaporar el líquido, se enfría la solución restante, se recogen los cristales de acetaminofén y se secan para obtener acetaminofén puro. El producto también puede ser solubilizado en agua para recristalizarlo o purificar por adsorción utilizando resinas especializadas para aislar y recuperar el acetaminofén producido o por extracción de fase sólida. La extracción de fase sólida comprende centrifugar el caldo de fermentación, decantar y retener el sobrenadante, agregarle resina adsorbente, mezclar la solución, decantar, lavar la resina con metanol para eluir el acetaminofen, decantar el metanol, secar la solución metanol-acetaminofén para formar los cristales del producto y filtrarlos.

Sobre los trámites de propiedad intelectual, la solicitud US20170211104A1 [5] está declarada como abandonada debido a que el solicitante no enmendó la observación del examinador, el cual expresó que la empresa 20n Labs, Inc. “no eligió correctamente una sola especie (*S. cerevisiae*) como se establece en el requisito de restricción”.

La solicitud de patente (con una primera revisión) US2017260555A1 [6] “Método para la biosíntesis de acetaminofén” publicada en 2017, también propone la producción biosintética del principio activo de forma *in vitro* o *in vivo*. El método consiste en cultivar una célula huésped procariota recombinante *in vitro* en un medio de cultivo y condiciones expresadas en los términos 4ABH y NhoA (ver Figura 2), en donde la célula produce ácido p-aminobenzoico (PABA); 4ABH cataliza la conversión de PABA para producir p-aminofenol y NhoA cataliza la conversión de p-aminofenol para producir N-acetil-p-aminofenol.

En algunos casos, la metodología empleada requiere de la purificación del N-acetil-p-aminofenol producido por la célula huésped, para lo cual pueden utilizarse células procarióticas, como la *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*; bacterias probióticas, como por ejemplo, *Bifidobacterium*, cepa de *E. coli Nissle*, *Lactobacillus* y similares, o células huésped eucariotas tales como células de levadura, células de insectos, células vegetales, células fúngicas y células de algas. Las células huésped eucariotas adecuadas incluyen *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*,

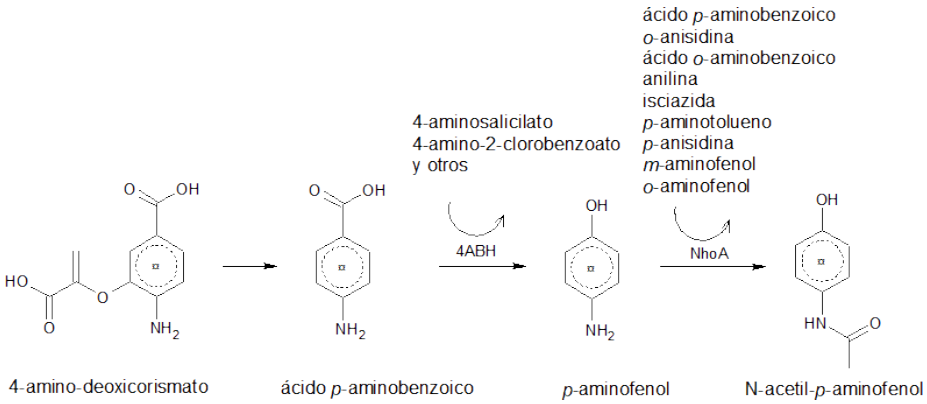


Figura 2: Síntesis de acetaminofén a partir de 4-amino-4-deoxicorismato
Fuente: Solicitud de patente US2017260555A1 [6]

Pichia koclamae, *membranaefaciens Pichia*, *Pichia opuntiae*, *thermotolerans Pichia*, entre otras.

El producto N-acetilaminofenol se puede purificar del medio de cultivo, del lisado celular o de ambos. La purificación del 90 – 99 % es realizada mediante las técnicas de extracción con solventes, membranas porosas, cromatografía preparativa, precipitación con sal, solventes o polímeros, extracción en fase sólida, electroforesis, cristalización, liofilización o una combinación de estas técnicas.

En el año 2017, la patente US10286504B2 [7] proporciona un método para la conversión de p-hidroxibenzamida a p-aminofenol y luego la acetilación del p-aminofenol. Se sabe que la p-hidroxiamida es un derivado de ésteres naturales de p-hidroxibenzoato encontrados en varias fuentes de biomasa, donde las especies más significativas son álamo, álamo temblón, sauce y palma. La p-hidroxibenzamida es producida cuando la biomasa (lignina) es tratada en el proceso de expansión de fibra con amoniaco (AFEX), o el proceso extractivo con amoniaco (EA), como se muestra en la Figura 3.

Proceso AFEX

El proceso AFEX es un método de pretratamiento de material agrícola usualmente para la producción de bioenergía. En el proceso, la biomasa se mezcla con amoniaco bajo presión moderada (100–400 psi) y temperatura entre 70 y 200 °C. Los parámetros mas importantes del proceso son la temperatura de reacción, tiempo de residencia, cantidad de amoniaco y de agua. Este método descristaliza la celulosa, hidroliza la hemicelulosa, remueve y despolimeriza la lignina e incrementa el tamaño y el número de microporos en la pared de las células. Como resultado, la velocidad de hidrólisis enzimática aumenta.

Proceso EA

El proceso extractivo con amoníaco (EA) consiste en un método de cuatro pasos (reacción, extracción, producción y recuperación de solvente). En la fase de reacción, el amoniaco líquido y la biomasa son combinados en un reactor a temperatura y tiempo de residencia definidos, en ausencia de agua. Cuando el amoniaco ebulle en el reactor, se forma un complejo celulosa-amoniaco, los enlaces de los ésteres son clivados y la lignina es parcialmente solubilizada en la fase líquida del amoniaco. La biomasa pretratada es filtrada para separar los componentes solubles de los sólidos residuales.

Durante esta fase, se extrae la lignina y se forma el complejo celulosa-amoniaco alomorfo. El amoniaco es continuamente removido de la corriente de productos y reciclado. Una sobrepresión de nitrógeno es utilizada para mantener el amoniaco en estado líquido a temperatura constante. El proceso EA convierte la celulosa cristalina a celulosa alomorfa digerible, y selectivamente extrae cerca del 45 % de la lignina proveniente de biomasa lignocelulósica con alta retención de todos los polisacáridos.



Figura 3: Conversión de Lignina a p-hidroxibenzamida mediante el método AFEX o EA

Fuente: Patente US10286504B2 [7]

La invención presentada en la solicitud de patente US2017260555A1 [6] propone la conversión de la p-hidroxibenzamida obtenida a partir de biomasa a través del esquema de síntesis detallado a continuación:

- *p-hidroxibenzamida a p-aminofenol*
  La conversión de p-hidroxiamida a p-aminofenol se da a través del rearreglo de Hoffman, disolviendo la p-hidroxibenzamida en agua alcalina a pH entre 10-14, para lo cual se sugiere el uso de una solución de NaOH 0,6 M (pH $\sim$ 12,8). A dicha solución alcalina se le añade un ligero exceso de NaOCl, NaOBr, NaOI (1,1 eq.). La reacción puede ser llevada acabo a temperaturas en el rango 20–100 °C, mostrando los mejores resultados a 80 °C, donde se obtiene 18 % de rendimiento de producto y una recuperación del 76 % del material de partida utilizando un tiempo de residencia de 1,7 horas. Esta reacción puede producir una cantidad significativa de material polimérico, especialmente en el almacenaje. Si se añade una mayor cantidad de polihaluro se obtiene mayor cantidad del polímero. La reacción es detenida con un agente reductor (preferiblemente bisulfito de sodio al 10 %). La mezcla de reacción se neutraliza con una cantidad equimolar de HCl con respecto a la cantidad de NaOH añadido en el primer paso. La mezcla de reacción es extraída 3 veces con acetato de etilo (extracción líquido–líquido) y la fase orgánica es secada con sulfato de sodio anhidro y concentrada aplicando vacío.

- *p-aminofenol a paracetamol*
  El p-aminofenol resultante es convertido a paracetamol mediante una reacción de acetilación utilizando anhídrido acético y agua a 115 °C por 10 min. La reacción se enfría para producir

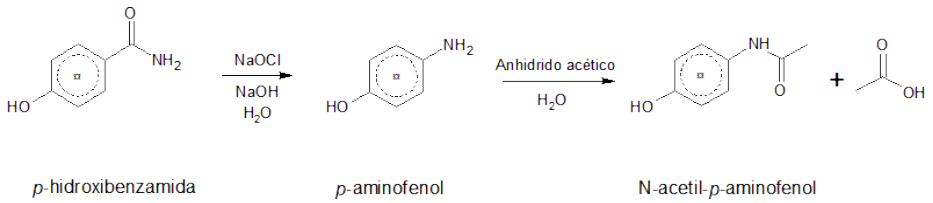


Figura 4: Obtención de paracetamol a partir p-hidroxibenzamida proveniente del proceso AFEX o EA
Fuente: Patente US10286504B2 [7]

los cristales que luego se filtran y se lavan con agua. Se obtiene un rendimiento del 82 % (técnica de gravimetría), ver Figura 4.

- *Purificación paracetamol*
  El sólido crudo de acetaminofén contiene impurezas oscuras debido al p-aminofenol que queda sin reaccionar. Estas impurezas, las cuales son colorantes de estructuras desconocidas, se forman por oxidación del material de partida. La cantidad de impurezas es pequeña pero suficientemente intensa para impartir color al sólido crudo. La mayoría son destruidas por calentamiento con tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$) a 100 °C por 15 min, luego se enfría la mezcla, se precipita, se filtra y el producto puede ser recristalizado en una mezcla metanol–agua.

Es importante resaltar que la solicitud de patente de Anderson *et al.* US20170211104A1 [5] proporciona un nuevo método de obtención de acetaminofén, siendo un gran aporte para la industria farmacéutica ya que proporciona un nuevo precursor proveniente de fuentes naturales con un proceso no agresivo para el medio ambiente y para el ser humano, mediante una metodología sencilla que podría complementar en un futuro los métodos tradicionales.

Por otra parte, las dos solicitudes de patentes de Anderson *et al.* (US20170211104A1 [5] y US2017260555A1 [6]) pueden permitir conocer el tipo de innovación que se esta llevando a cabo en función de precursores alternativos y métodos diferentes a los tradicionales de producción de acetaminofén. De implementarse los métodos biosintéticos como los propuestos en estas solicitudes de patentes, se tendría como resultado que el costo teórico del producto biológico pudiese ser tan bajo como la mitad del costo del producto existente, además de minimizar otros costos industriales; también disminuye el impacto en el medio ambiente, mejora la seguridad de los trabajadores y reduce las impurezas en los productos finales.

4. Conclusiones

A través de la búsqueda y el análisis de los registros de patentes fue posible identificar tres innovaciones que describen nuevas rutas biosintéticas para la producción de acetaminofén. Se logró identificar nuevos precursores y métodos alternativos menos tóxicos, más económicos y sustentables. La producción biosintética de acetaminofén y sus intermediarios puede ser obtenida de forma *in vitro* a partir de microorganismos recombinates, específicamente cepas de levaduras *S. cerevisiae*, genéticamente modificadas, empleando un organismo huésped genéticamente tratable como plantas, animales, bacterias u hongos.

La síntesis de paracetamol puede ser obtenida de manera *in vitro* o *in vivo* a partir del cultivo de una célula huésped procariota recombinante, generalmente *Escherichia coli*, o célula de levadura como *S. cerevisiae*, entre otras y células eucariotas como células de levadura, células de insectos, células vegetales, células fúngicas y células de algas.

El paracetamol puede ser obtenido a partir de p-hidroxibenzamida derivada de lignina extraída del álamo, álamo temblón, sauce o palma, a partir del tratamiento con amoniaco en el proceso de expansión de fibra (AFEX) o mediante proceso extractivo con amoniaco (EA).

Referencias

[1] A. Dueñas, F. Álvarez, B. Izquierdo, H. Gonzáleaz, and J. Aldana. Manejo de

la intoxicación aguda por paracetamol. *Boletín de Pediatría*, 31:19–27, 1990.

[2] M. Kowalski and J. Makowska. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in patients with aspirin hypersensitivity: safety of cyclo-oxygenase-2 inhibitors. *Treatments in Respiratory Medicine*, 5(6):399–406, 2006.

[3] J. Piola y R. Mastandrea. *Guía práctica para el monitoreo de fármacos y drogas de abuso*. Ediciones Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, 2003.

[4] S. Morocho, S. Cuesta, and L. Meneses. Caracterización de los productos intermedios en la ruta sintética del acetaminofén. *infoANALÍTICA*, 5:25–39, 2017.

[5] J. Anderson, S. Srivastava, M.T. Daly, P. Poon, and T. Revak. Biosynthetic production of acetaminophen, p-aminophenol, and p-aminobenzoic acid. Patente US20170211104A1, 2017.

[6] J.C. Anderson, T. Hsiau, S. Srivastava, and P. Ruan. Method for biosynthesis of acetaminophen. Patente US2017260555A1, 2017.

[7] J. Ralph, S. Karlen, and J. Mobley. Synthesis of paracetamol (acetaminophen) from biomass-derived p-hydroxybenzamide. Patente US10286504B2, 2018.