

## Tesis de Posgrado

# Acilación quimioselectiva de hidroxialcanotioles catalizada por lipasas en medio orgánico

Iglesias, Luis Emilio

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Iglesias, Luis Emilio. (1996). Acilación quimioselectiva de hidroxialcanotioles catalizada por lipasas en medio orgánico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2856\\_Iglesias.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2856_Iglesias.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Iglesias, Luis Emilio. "Acilación quimioselectiva de hidroxialcanotioles catalizada por lipasas en medio orgánico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2856\\_Iglesias.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2856_Iglesias.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA

---

**ACILACION QUIMIOSELECTIVA DE HIDROXIALCANOTIOLES  
CATALIZADA POR LIPASAS EN MEDIO ORGANICO**

---

**Luis Emilio Iglesias**

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE  
DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
ORIENTACION CIENCIAS QUIMICAS

1996

2856  
y 2



*Lipase-catalyzed chemoselective acylation of hydroxyalkanethiols in organic media*

Luis E. Iglesias, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1996

**Key words:** lipases; organic media ; hydroxyalkanethiols ; selective acylation ; transesterification

**Abstract:** Various bi- and polifunctional hydroxyalkanethiols were chemospecifically acylated to O-acylestere by lipase-catalyzed transesterifications in organic media. In addition, hydroxyalkanethiols with two hydroxyl groups exhibited regiospecificity or regioselectivity, depending on the nature of both the substrate and the lipase. As the chain length of the  $\alpha,\omega$ -hydroxyalkanethiol increased, the reaction was limited to smaller acyl moieties. Experimental conditions under which enzymatic acylations were carried out and their results are presented and discussed. Biocatalyzed transesterifications allowed the preparation of twenty-four new esters. The preparation of some  $\alpha,\omega$ -hydroxyalkanethiols and the mass spectra of substrates and products are also presented and discussed.



11/16/20



**Felices los que tienen alma de pobres, porque a ellos les pertenece el  
Reino de los Cielos.**

**Felices los pacientes, porque recibirán la tierra en herencia.**

**Felices los afligidos, porque serán consolados.**

**Felices los que tienen hambre y sed de justicia, porque serán saciados.**

**Felices los misericordiosos, porque obtendrán misericordia.**

**Felices los que tienen un corazón recto, porque verán a Dios.**

**Felices los que trabajan por la paz, porque serán llamados hijos de Dios.**

*Mateo 5, 3-9*



1. *Epiphyllum*

2. *Epiphyllum*

3. *Epiphyllum*

4.

5.

El rudimentario laboratorio -sin contar una profusión de cazuelas, embudos, retortas, filtros y coladores- estaba compuesto por un atanor primitivo; una probeta de cristal de cuello largo y angosto, imitación del *huevo filosófico*, y un destilador construido por los propios gitanos según las descripciones modernas del alambique de tres brazos de María la judía. Además de estas cosas, Melquíades dejó muestras de los siete metales correspondientes a los siete planetas, las fórmulas de Moisés y Zósimo para el doblado del oro, y una serie de apuntes y dibujos sobre los procesos del *Gran Magisterio*, que permitían a quien supiera interpretarlos intentar la fabricación de la piedra filosofal. Seducido por la simplicidad de las fórmulas para doblar el oro, José Arcadio Buendía cortejó a Úrsula durante varias semanas, para que le permitiera desenterrar sus monedas coloniales y aumentarlas tantas veces como era posible subdividir el azogue. Úrsula cedió, como ocurría siempre, ante la inquebrantable obstinación de su marido. Entonces José Arcadio Buendía echó treinta doblones en una cazuela, y los fundió con raspadura de cobre, oropimente, azufre y plomo. Puso a hervir todo a fuego vivo en un caldero de aceite de ricino hasta obtener un jarabe espeso y pestilente más parecido al caramelo vulgar que al oro magnífico. En azarosos y desesperados procesos de destilación, fundida con los siete metales planetarios, trabajada con el mercurio hermético y el vitriolo de Chipre, y vuelta a cocer en manteca de cerdo a falta de aceite de rábano, la preciosa herencia de Úrsula quedó reducida a un chicharrón carbonizado que no pudo ser desprendido del fondo del caldero.

Gabriel García Márquez, *Cien años de soledad*

0 0

11

12

13

14

15

16

17

18

Quiero expresar mi agradecimiento a las siguientes personas e instituciones que facilitaron la realización de este trabajo:

A la Universidad de Buenos Aires, por haberme otorgado las Becas de Investigación de Iniciación y de Perfeccionamiento, y por generar, a pesar de las dificultades, un ámbito para la formación y el crecimiento profesional.

Al Dr. Eduardo Gros, director de esta Tesis y de las Becas anteriormente mencionadas, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este trabajo y por el apoyo brindado durante estos años a la realización del mismo.

A la Dra. Alicia Baldessari, que me sugirió el tema del presente trabajo y supervisó su desarrollo, por el apoyo cotidiano, las frecuentes discusiones y la lectura de esta Tesis.

A UMYMFOR, y en particular, al Dr. Eduardo Gros, por haberme facilitado la utilización personal de los cromatógrafos gaseosos Hewlett Packard 5830 A y 5840 A.

A las Lic. María Rivero y María M. de Moglia, por su amable colaboración en la realización de los análisis por cromatografía gaseosa.

Al Sr. Jorge Aznarez, por la realización de los espectros de masa y las cromatografías gaseosas acopladas a espectrometría de masa.

A los Dres. Juan B. Rodríguez, Gerardo Caballero y Gustavo Revelli y al Sr. Gustavo Arabethy, por los espectros de resonancia magnética nuclear efectuados.

A la Dras. Rosa M. de Lederkremer y María Leonor Cantone (Departamento de Química Biológica, FCEyN), por haberme permitido el empleo de los agitadores rotatorios.

A la Dra. Miriana Biondic, por la ayuda recibida para la edición de esta Tesis.

A los Dres. Vicente Gotor (Universidad de Oviedo, España) y Rosa Erra Balsells, por haberme conseguido algunas referencias bibliográficas.

A mis actuales compañeros de laboratorio: Lic. Andrea Bruttomesso, Dra. Lydia Galagovsky, Dra. María Alejandra Ponce, Dr. Juan B. Rodríguez, Lic. Andrea Schvartzapel y Lic. Osvaldo Teme Centurión, por tantas horas compartidas en el laboratorio y por su

paciencia durante la redacción de esta Tesis; también a los recientes Lic. Javier Ramírez y Lic. Constanza Mangone y al visitante Dr. Luis D'Anna.

También quiero mencionar:

A los que me acompañaron en este camino con su afecto, especialmente a: Alicia Baldessari, Miriana Biondic, Sergio Bonesi, Andrea Bruttomesso, Alejandro Chioconi, Rosa Erra Balsells, Lydia Galagovsky, Enrique Hughes, Fabiana Makler, María Cristina Matulewicz, María Nélica Mazzini, Daniel Murgida, Alejandro Nin, Alejandra Ponce, Andrea Schvartzapel, Eduardo Sproviero, Jorge Sproviero, Osvaldo Teme Centurión, María Cristina Tettamanzi y Patricia Zunszain.

A Luis Rodríguez, por tantos años de amistad.

A Elena, Javier, Juan José, Mario, Raquel, Silvia y Susana, por su afecto y el tiempo compartido.

A mis padres y a mi hermana, por su cariño de siempre.

## INDICE

pág.

### **CAPITULO I**

#### Introducción

1. Biotransformaciones .....	1
2. Propiedades catalíticas de las enzimas .....	2
3. Tipos de selectividad en reacciones orgánicas .....	5
4. Comportamiento selectivo de las enzimas .....	9
5. Clasificación de las enzimas .....	14
6. Aplicaciones de las enzimas en síntesis orgánica .....	16
7. Enzimas en medio orgánico .....	19
8. Lipasas en medio orgánico .....	24
9. Transesterificaciones catalizadas por lipasas en medio orgánico .....	28
Objetivos y reseña sobre las lipasas utilizadas en el presente trabajo .....	39

### **CAPITULO II**

1. Estudio de la reacción de 2-mercaptoetanol con acetato de etilo catalizada por lipasa pancreática porcina .....	49
2. Reacciones de 2-mercaptoetanol con otros agentes acetilantes catalizadas por lipasa pancreática porcina .....	59
3. Extensión del estudio de la reacción biocatalizada de 2-mercaptoetanol con acetato de etilo .....	62

4. Alcohólisis de acetato de 2-tioacetoxietilo en presencia de n-butanol y de n-octanol catalizada por lipasas .....	65
---	----

### **CAPITULO III**

1. Acilación de 2-mercaptoetanol mediante transesterificaciones catalizadas por lipasas .....	75
2. Acilación de otros $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles catalizada por lipasas .....	85
3. Discusión del comportamiento quimioespecífico de las acilaciones biocatalizadas de $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles .....	91

### **CAPITULO IV**

1. Acilación de 3-mercapto-1,2-propanodiol catalizada por lipasas .....	99
2. Discusión del comportamiento de dioles en reacciones de acilación catalizadas por lipasas .....	113

### **CAPITULO V**

1. Acilación biocatalizada de ditiotreitol y de ditioeritritol .....	121
2. Aproximación al estudio del curso enantioselectivo de las acilaciones biocatalizadas de ditiotreitol y de ditioeritritol .....	127

### **CAPITULO VI**

Preparación de $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles bifuncionales .....	137
---	-----

## **CAPITULO VII**

<b>Espectrometría de masa de sustratos y productos de acilaciones biocatalizadas .....</b>	<b>155</b>
--	------------

## **CAPITULO VIII**

### **Parte experimental**

<b>1. Generalidades .....</b>	<b>195</b>
<b>2. Preparación de compuestos obtenidos sin catálisis enzimática .....</b>	<b>199</b>
<b>3. Preparación de compuestos mediante catálisis enzimática .....</b>	<b>212</b>

<b>RESUMEN .....</b>	<b>239</b>
----------------------	------------

<b>INDICE DE TABLAS .....</b>	<b>245</b>
-------------------------------	------------

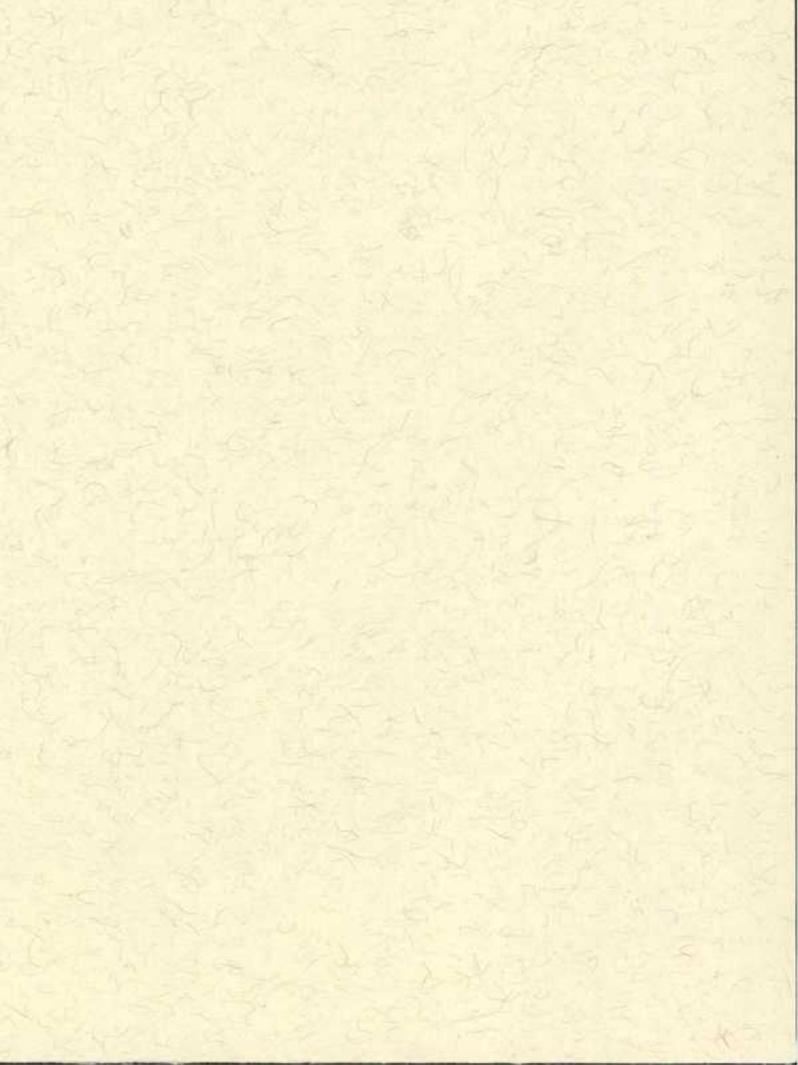


## Abreviaturas

[ $\alpha$ ]D	rotación óptica específica
Å	angstrom
Ac	acetilo, CH <sub>3</sub> CO-
Bu	butirilo, C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO-
Bz	benzoilo, C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> CO-
CAL	lipasa de <i>Candida antarctica</i>
CCL	lipasa de <i>Candida cylindracea</i>
CG/EM	cromatografía gaseosa / espectrometría de masa
d	días
DNA	ácido desoxirribonucleico
ee	exceso enantiomérico
Et	etilo
h	horas
iPr	isopropilo
LAH	hidruro de aluminio y litio
LIP	Lipozyme <sup>R</sup> (Lipasa de <i>Mucor miehei</i> )
min	minutos
Me	metilo
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato
Ph	fenilo
PPL	lipasa pancreática porcina
<i>p</i> -TsOH	ácido <i>p</i> -toluensulfónico
Py	piridina
RMN	resonancia magnética nuclear
SAM	S-adenosilmetionina

<b>SMEA</b>	<b>hidruro de <i>bis</i> (2-metoxietoxi) aluminio y sodio</b>
<b>t</b>	<b>tiempo</b>
<b><math>\gamma</math>-TBL</b>	<b><math>\gamma</math>-tiobutirrolactona</b>
<b>THF</b>	<b>tetrahidrofurano</b>

***CAPITULO I***



# *Introducción*



## 1. Biotransformaciones

Se conoce con el nombre de biotransformaciones a las reacciones químicas catalizadas por entidades biológicas, siendo las más utilizadas los microorganismos y las enzimas<sup>1,2</sup>.

Los microorganismos participan en dos tipos principales de biotransformaciones: la fermentación y las transformaciones microbianas<sup>2</sup>.

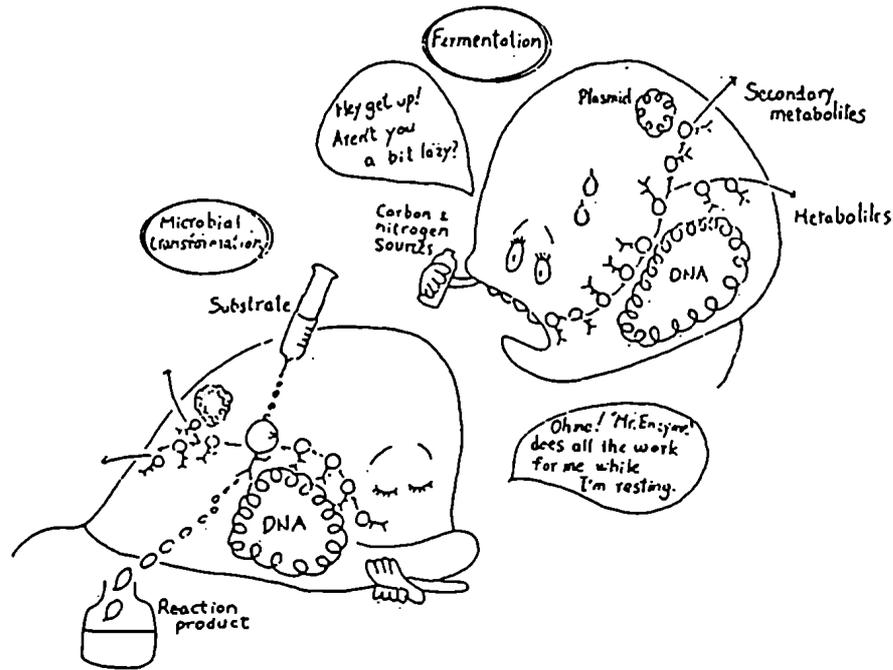
La fermentación es conocida por el hombre desde tiempos muy antiguos: más de cinco mil años antes de Cristo, los sumerios ya preparaban bebidas alcohólicas por fermentación de cereales. Los procesos fermentativos requieren la existencia de células vivas que, a partir de fuentes sencillas de carbono y nitrógeno, originan productos que son siempre naturales.

En contraste con la fermentación, las transformaciones microbianas necesitan, en lugar de una fuente de carbono y nitrógeno, un sustrato, no necesariamente natural. Tampoco es imprescindible que las células se encuentren vivas: sólo se requiere que el microorganismo viva el tiempo suficiente para producir las enzimas necesarias. Desde este punto de vista, es posible ver al microorganismo como si fuese un recipiente que contiene las enzimas que participan en la biotransformación ( Figura 1.1 ).

Puede considerarse entonces que las biotransformaciones son reacciones químicas catalizadas por enzimas presentes dentro de las células o que originariamente fueron producidas por células<sup>2</sup>.

Para transformaciones que ocurren en una o en dos etapas, es probable que las enzimas sean superiores a los microorganismos, porque su empleo evita las reacciones laterales y los problemas experimentales asociados con las fermentaciones, permitiendo también condiciones de uso más sencillas que las requeridas para operar con microorganismos<sup>1,3</sup>.

Estas razones pueden ayudar a entender por qué las enzimas son el tipo de biocatalizador natural que más ha prosperado en el área de la síntesis orgánica.



**FIGURA 1.1** - Ilustración acerca de las diferencias esenciales entre la fermentación y las transformaciones microbianas (Referencia 2)

## **2. Propiedades catalíticas de las enzimas**

Las enzimas son proteínas altamente especializadas que poseen actividad catalítica. Se conocen más de dos mil de estos biocatalizadores<sup>4</sup>, que participan virtualmente en todas las reacciones que ocurren *in vivo*, ya que catalizan los millones de reacciones químicas que, colectivamente, constituyen el metabolismo intermediario de las células<sup>5</sup>. La Unión Internacional de Bioquímica divide a las enzimas en seis grupos y les asigna un número y un nombre basado en su función *in vivo*<sup>6</sup> (Tabla 1.1).

TABLA 1.1 - Clasificación funcional de las enzimas ( Unión Internacional de Bioquímica )

---

**1. OXIDO REDUCTASAS**

Actúan sobre:

- 1.1. -CH-OH
- 1.2. -C=O
- 1.3. -C=CH-
- 1.4. -CH-NH<sub>2</sub>
- 1.5. -CH-NH-
- 1.6. NADH ; NADPH

**2. TRANSFERASAS**

Transfieren grupos:

- 2.1. De un átomo de carbono
- 2.2. Aldehídicos o cetónicos
- 2.3. Acilos
- 2.4. Glicosilos
- 2.7. Fosfato
- 2.8. Que contienen azufre

**3. HIDROLASAS**

Hidrolizan:

- 3.1. Esteres
- 3.2. Uniones glicosídicas
- 3.4. Uniones peptídicas
- 3.5. Otras uniones C-N
- 3.6. Anhídridos de ácido

**4. LIASAS**

Adición a dobles enlaces:

- 4.1. -C=C-
- 4.2. -C=O
- 4.3. -C=N-

**5. ISOMERASAS**

- 5.1. Racemasas

**6. LIGASAS**

Formación de uniones con ruptura de ATP

- 6.1. -C-O
  - 6.2. -C-S
  - 6.3. -C-N
  - 6.4. -C-C
-

Tres características principales hacen a las enzimas excepcionales si se las compara con otros catalizadores<sup>4,7</sup> :

versatilidad

eficiencia

selectividad

La **versatilidad** de las enzimas se manifiesta en su capacidad de catalizar un espectro sumamente amplio de reacciones de moléculas que se hallan en los seres vivos, cuyas estructuras son muy diversas. Para la mayoría de las reacciones orgánicas existe un equivalente catalizado por enzimas<sup>4</sup> (algunas de las excepciones más importantes son la reacción de Diels-Alder y el reordenamiento de Cope). Esta versatilidad es la que hace posible la catálisis enzimática de reacciones que no transcurren *in vivo*. De hecho, está ampliamente demostrado que las enzimas son activas *in vitro*.

Por medio de las enzimas las velocidades de reacción pueden acelerarse en factores de hasta  $10^{12}$  comparando con velocidades en ausencia de catalizador<sup>4</sup>. Este hecho ocurre aun operando bajo condiciones de reacción suaves, con frecuencia a temperatura ambiente y a pH cercano al neutro, lo que da una pauta de su alta **eficiencia** catalítica. Bajo estas condiciones suaves de reacción, se hacen mínimos los problemas de isomerización, racemización y epimerización que pueden afectar los resultados cuando se utiliza la metodología tradicional en síntesis<sup>4</sup>.

Más allá de estas ventajas, la **selectividad** puede considerarse, sin duda, como una de las características más sobresalientes del comportamiento de las enzimas. En general, son muy selectivas en términos del tipo de reacción catalizada y con respecto a la estructura y a la estereoquímica del sustrato y del producto de la reacción. Justamente, estas dos últimas propiedades, el comportamiento frente a la estructura y a la estereoquímica, constituyen de modo conjunto la especificidad de una enzima<sup>4</sup>, que es su rasgo característico más

importante y efectivo para su empleo en síntesis orgánica, tanto para transformaciones selectivas como para síntesis asimétrica<sup>4,6</sup>.

Otra particularidad caracteriza también al comportamiento catalítico de las enzimas: están sujetas a regulación, por lo que la actividad catalítica puede ser influenciada fuertemente por las concentraciones de sustratos, productos u otras especies presentes en solución<sup>6</sup>.

### **3. Tipos de selectividad en reacciones orgánicas**

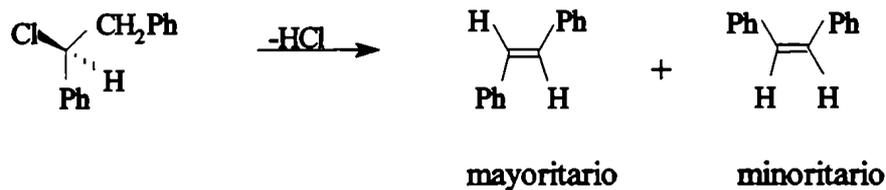
La modificación de un solo grupo de una molécula polifuncional suele requerir previamente la utilización de grupos protectores. Por otra parte, en la actualidad, la química orgánica sintética se enfrenta a la preparación de moléculas de gran complejidad estructural y estereoquímica, por lo que el desarrollo de la síntesis asimétrica es un objetivo central. Frente a estas exigencias, la catálisis enzimática puede simplificar complejos esquemas de síntesis en virtud de su comportamiento altamente selectivo.

Ya que el mayor valor que presenta la catálisis enzimática en síntesis orgánica es la selectividad que confiere a las reacciones<sup>4,6</sup>, antes de proseguir sería conveniente aclarar ciertos términos utilizados para caracterizar la selectividad y la especificidad de una reacción, términos sobre los que a menudo existe confusión o falta de concordancia en literatura<sup>8</sup>.

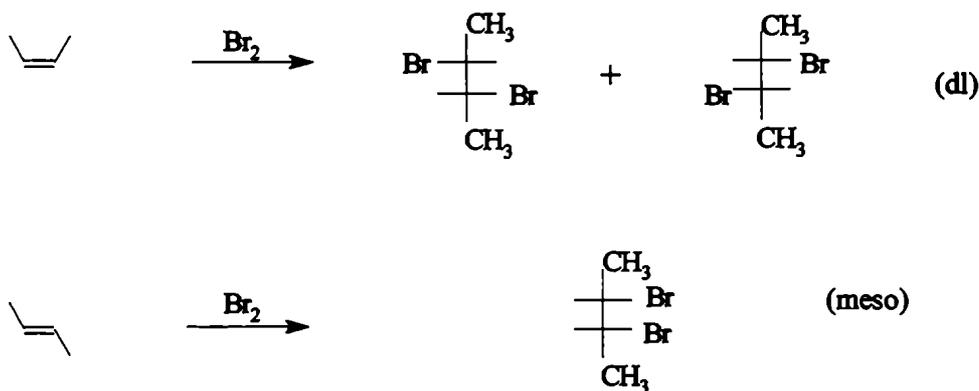
#### **Estereoselectividad**

En orden cronológico, las primeras definiciones sobre selectividad en reacciones químicas se refirieron a estereoselectividad. Así, según Eliel<sup>9</sup>, una reacción es estereoselectiva cuando se forma o rompe un estereoisómero (o un par de enantioméros) con preferencia sobre todos

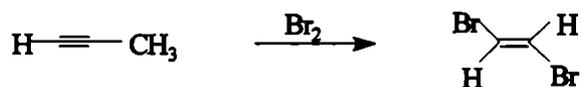
los otros estereoisómeros que pudieran formarse o romperse, como lo ilustra el siguiente ejemplo:



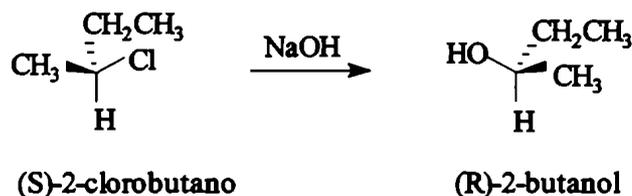
También para Eliel<sup>10</sup>, una reacción estereoespecífica es aquella en que sustratos estereoisómeros dan lugar a diferentes productos estereoisómeros. Un ejemplo clásico es la bromación de alquenos:



La estereoselectividad concierne a los productos, mientras que la estereoespecificidad se refiere a los reactivos. Por eso, las reacciones en las que los reactivos o los productos carecen de estereoisómeros nunca pueden ser estereoespecíficas, aunque transcurran estereoselectivamente, como puede observarse en el siguiente ejemplo:

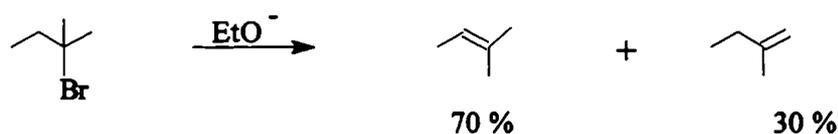


En una reacción **enantioselectiva** un enantiómero se forma o rompe preferencialmente sobre el otro, mientras que si la reacción es **enantioespecífica** dos reactivos enantiómeros generan productos estereoisómeros. Un ejemplo de reacción enantioespecífica es la sustitución nucleofílica bimolecular sobre un carbono quiral<sup>11</sup>:



### Regioselectividad

Según la definición introducida por Hassner<sup>12</sup>, una reacción **regioselectiva** conduce a la obtención predominante de uno o más isómeros estructurales con respecto a todos los posibles isómeros estructurales que pudieran formarse. En una reacción regioselectiva existe una tendencia predominante a reaccionar de uno o varios grupos funcionales iguales o similares sobre todos los grupos presentes en una molécula<sup>13</sup>. La regioselectividad involucra una dirección preferencial en la formación o ruptura de un enlace, lo que se traduce en la producción mayoritaria de uno o más isómeros. La siguiente reacción de eliminación bimolecular constituye un ejemplo de reacción regioselectiva:



Según Hassner, cuando una reacción origina exclusivamente un único isómero estructural de todos los posibles, se dice que es **regioespecífica**. No obstante, actualmente existe tendencia a rechazar este término<sup>8</sup>. Se argumenta que en la realidad, virtualmente ninguna reacción

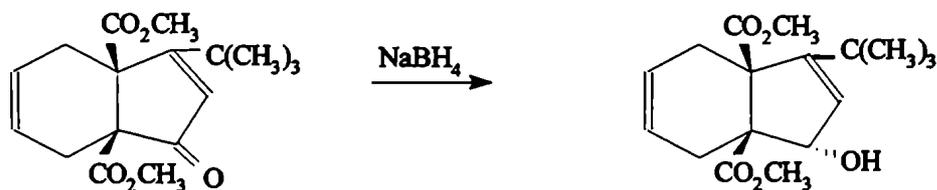
orgánica conduce a un único producto con la exclusión absoluta de los otros. La IUPAC define los términos regioselectividad y enantioespecificidad pero no define regioespecificidad.

Sin embargo, y como podrá apreciarse a lo largo del presente trabajo, cuando las enzimas catalizan reacciones orgánicas, en numerosas ocasiones se forma un isómero estructural con exclusión total de los demás. Consecuentemente, en el área de catálisis enzimática el término regioespecificidad se ajusta realmente a su definición y su uso es conveniente.

### Quimioselectividad

Una reacción es **quimioselectiva** cuando reacciona preponderantemente uno de varios grupos funcionales diferentes de reactividad química similar presentes en una molécula<sup>13</sup>.

Un ejemplo lo constituye la siguiente reducción con borohidruro de sodio de un grupo carbonilo de cetona en presencia de un grupo éster<sup>14</sup>:

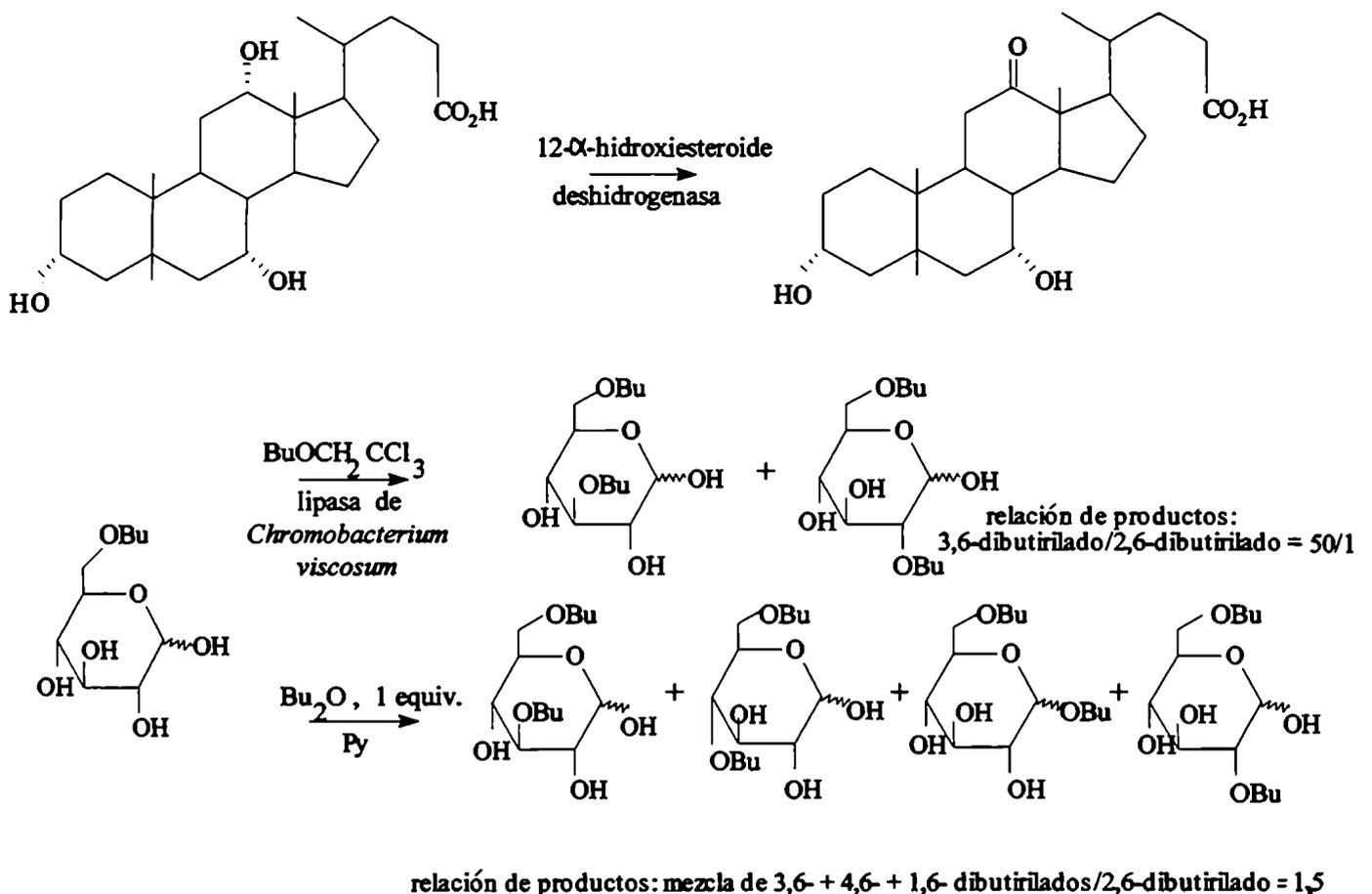


Análogamente al concepto de regioespecificidad, en una reacción **quimioespecífica** reacciona uno de los grupos funcionales con exclusión de los otros grupos presentes en la molécula. Para este término también vale la discusión efectuada al definir la idea de regioespecificidad.

#### 4. Comportamiento selectivo de las enzimas

Relacionado con su comportamiento selectivo, lo que determina la utilidad de las enzimas en síntesis es el grado con que los biocatalizadores discriminan entre factores estructurales y estereoquímicos<sup>4</sup>.

La discriminación estructural de una enzima puede explotarse para llevar a cabo reacciones regioespecíficas sobre una de dos o más funciones químicas iguales presentes en una molécula. La facilidad con la que las enzimas permiten efectuar estas transformaciones es a menudo extremadamente difícil de duplicar a través de métodos químicos tradicionales, en especial por medio de una reacción en una sola etapa, como lo ilustran los siguientes ejemplos<sup>15,16</sup>:



Dos clases de selectividad ponen de manifiesto la discriminación estereoquímica de una enzima: la enantiomérica y la proquiral. Ambas dan lugar a distintas posibilidades de transformaciones estereoselectivas.

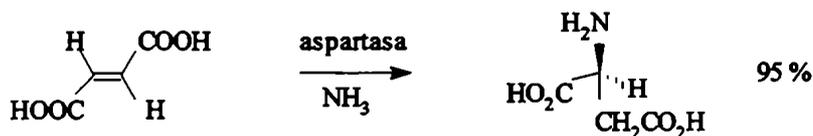
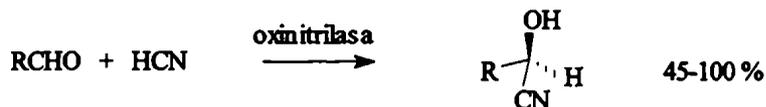
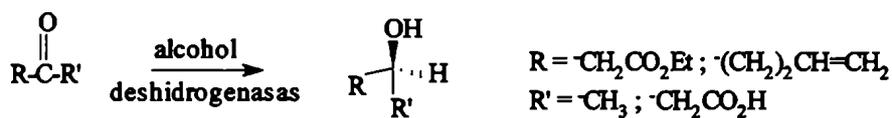
La especificidad enantiomérica, por la que las enzimas discriminan entre los enantiómeros de una mezcla racémica, es una de las aplicaciones más extendidas de la especificidad estereoquímica de las enzimas y ha sido intensamente explotada para la resolución de racematos. En 1954 se describió la resolución de los enantiómeros de varios N-acilaminoácidos mediante hidrólisis catalizadas por acilasa de riñón de cerdo<sup>17</sup>. Desde entonces, las resoluciones mediante reacciones biocatalizadas han sido numerosísimas y se han aplicado a sustratos quirales, naturales o no, de estructuras muy variadas<sup>4,18-20</sup>.

Con una enzima enantioespecífica, la transformación de un racemato se detiene al 50% de conversión, cuando uno de los enantiómeros ha reaccionado totalmente. Esto limita el máximo rendimiento al 50% ; es decir, cuando en síntesis asimétrica se usan racematos, siempre hay una pérdida no inferior al 50%.

Mediante las capacidades de selectividad proquiral de las enzimas un sustrato aquiral simétrico puede ser convertido íntegramente en el producto quiral deseado. Estas capacidades convierten a las enzimas en catalizadores quirales de síntesis asimétrica con perspectivas sumamente atractivas. Pueden señalarse tres líneas de especificidad proquiral<sup>4</sup>:

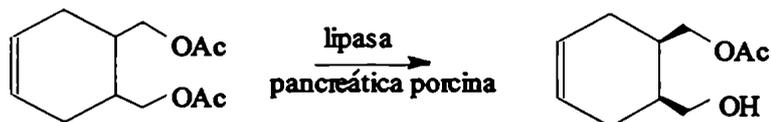
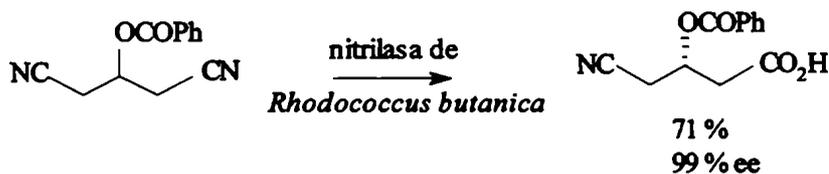
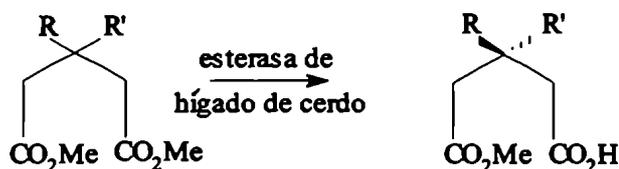
#### I- Adición estereoselectiva a caras estereoheterotópicas de dobles enlaces

Las enzimas son capaces de actuar estereoselectivamente sobre una de las dos caras enantiotópicas o diastereotópicas de grupos planos como C=C, C=O y C=N. Dentro de esta línea se han descrito numerosas transformaciones asimétricas de valor, entre las que pueden citarse los siguientes ejemplos<sup>21-23</sup>:



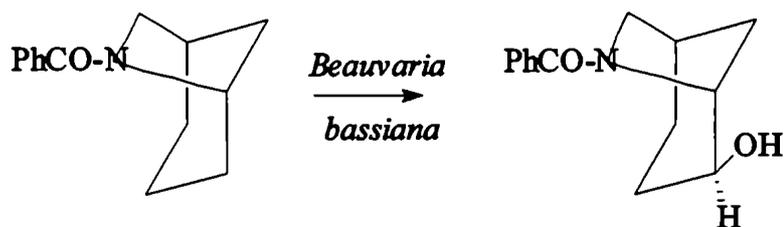
## II- Distinción entre grupos y átomos enantiotópicos

En este aspecto, las enzimas hidrolíticas demostraron hasta el presente la mayor versatilidad sintética. Muchas esterasas tienen variadas aplicaciones, ya sea con sustratos simétricos sin carbono quiral o con sustratos *meso* y admiten una amplia tolerancia en variaciones estructurales de dichos sustratos<sup>24-26</sup>:



### III- Distinción entre grupos y átomos diasterotópicos

En esta línea, los ejemplos predominantes son sustituciones diasterotópicamente específicas de átomos de hidrógeno de metilenos no activados por grupos hidroxilos. Se conocen cientos de hidroxilaciones diastereoselectivas de una gran variedad estructural de sustratos, entre ellos alcaloides<sup>27</sup>:



terpenos<sup>28</sup> y esteroides<sup>29</sup>, reacciones catalizadas fundamentalmente por organismos de origen microbiano.

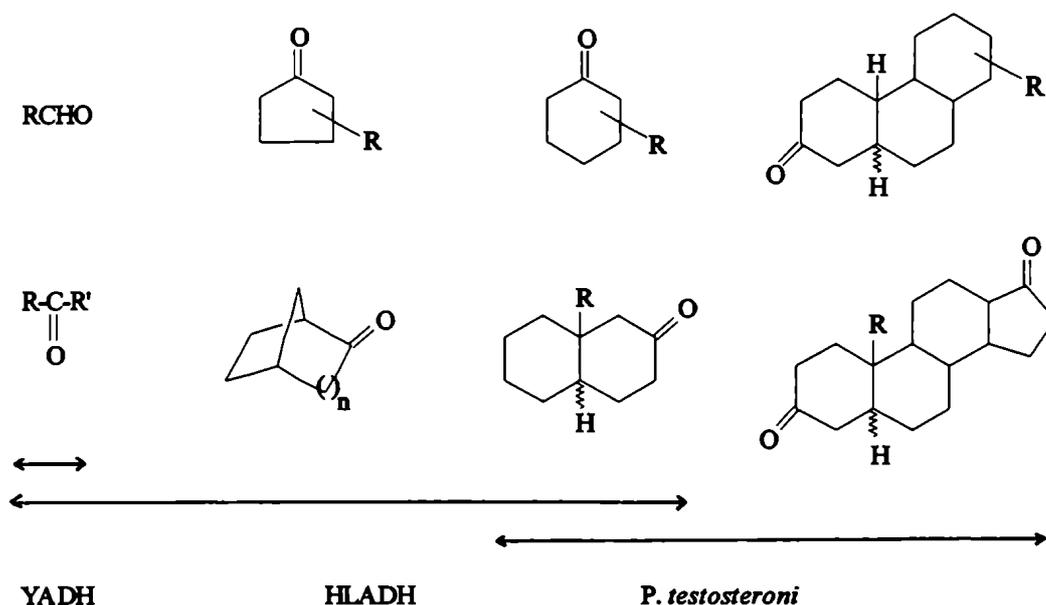
Está considerado que mediante transformaciones biocatalizadas es posible efectuar la hidroxilación estereoselectiva de virtualmente cualquier átomo de carbono de un esteroide<sup>4</sup>.

Una combinación sumamente útil sintéticamente es la especificidad enantiomérica junto con la regio o quimioespecificidad, como puede observarse en los tres últimos ejemplos de la página 11. Es difícil encontrar un reactivo quiral que pueda combinar en un solo paso los diferentes tipos de selectividad de las enzimas.

Uno de los objetivos de la síntesis orgánica tradicional es la producción de métodos de amplia aplicación, por lo que podría creerse que el comportamiento altamente discriminativo de las enzimas limita su utilidad en síntesis. Sin embargo, las enzimas poseen rangos de selectividad desde muy estrechos hasta muy amplios<sup>7</sup>. El criterio de utilidad en síntesis es discriminar estereoquímicamente sobre un amplio rango de estructuras de sustratos; es decir, amplia tolerancia estructural con alta estereoselectividad. Generalmente, las enzimas de

mamíferos se ajustan a este criterio<sup>4</sup>. Las de microorganismos suelen tener tolerancias estructurales más estrechas, hecho que está compensado por la enorme cantidad de microorganismos disponibles.

Otro hecho importante es que, a menudo, un rango muy grande de estructuras es accesible con un número muy reducido de enzimas. La Figura 1.2 muestra una amplia variedad de compuestos carbonílicos de complejidad estructural creciente que puede obtenerse, a partir de alcoholes, mediante el uso de sólo tres alcohol-deshidrogenasas. Estas enzimas presentan especificidades que se superponen y, por otra parte, no son únicas para efectuar la preparación de estas moléculas<sup>4</sup>:



YADH: Alcohol deshidrogenasa de levadura  
 HLADH: Alcohol deshidrogenasa de hígado equino  
*P. testosteroni*: *Pseudomonas testosteroni*

**FIGURA 1.2** - Un amplio rango de estructuras de aldehídos y cetonas es accesible con sólo tres alcohol-deshidrogenasas de especificidades que se superponen

Aún tratándose de enzimas estructuralmente muy específicas, esto puede resultar una notable ventaja si el interés está en una transformación particular que es muy difícil de llevar a cabo por métodos químicos tradicionales.

### **5. Clasificación de las enzimas**

En 1983 Whitesides y Wong<sup>6</sup> propusieron una clasificación de las enzimas en cinco grupos, según un orden de complejidad creciente para su uso en síntesis orgánica ( Tabla 1.2 ).

**TABLA 1.2 - Clasificación de las enzimas para su empleo en síntesis orgánica propuesta por Whitesides y Wong<sup>6</sup>**

- 
1. Enzimas que no requieren cofactores
  2. Enzimas que requieren cofactores no añadidos
  3. Enzimas que requieren regeneración de cofactores
  4. Enzimas que presentan problemas particulares de estabilidad, disponibilidad o que requieren cofactores no comunes
  5. Sistemas complejos multienzimáticos
- 

A los fines sintéticos esta división resulta más conveniente que la clasificación internacional ( Tabla 1.1 ) ya que a menudo aquella no es muy útil para predecir en la práctica la factibilidad de utilizar una enzima en biotransformaciones<sup>6</sup>.

Debido a factores que atañen de manera principal a razones de costo y de accesibilidad, sólo los tres primeros grupos son usados más comúnmente en síntesis orgánica<sup>30</sup>, como se muestra en la Tabla 1.3. El segundo grupo, con excepción de la glucosa oxidasa y de las transaminasas, posee relativamente pocas aplicaciones en síntesis<sup>6</sup>.

TABLA 1.3 - Enzimas más comúnmente usadas en síntesis orgánica

NO REQUIEREN COFACTORES	NO REQUIEREN COFACTORES AÑADIDOS	REQUIEREN COFACTORES
1) <i>Enzimas hidrolíticas</i>	1) <i>Flavoenzimas</i>	1) ATP-quinasas
Esterasas Lipasas Amidasas Fosfolipasas Epóxido hidratasas Nucleósido fosforilasa SAM sintetasa	Glucosa oxidasa Aminoácido oxidasas Diaforasa	2) NAD(P)(H) óxidoreductasas
2) <i>Isomerasas y liasas</i>	2) <i>Piridoxal fosfato enzimas</i>	3) SAM - metil transferasas
Glucosa isomerasa Aspartasa Fenilalanina amoníaco liasa Fumarasa Cianohidrina sintetasa	Transaminasas Tirosinasa $\delta$ -aminolevulinato deshidratasa Cistationina sintetasa	4) Enzimas que requieren CoA
3) <i>Aldolasas</i>	3) <i>Metaloenzimas</i>	5) PAPS- sulfuril liasas
4) <i>Glicosil transferasas</i>	Galactosa oxidasa Monooxigenasas Dioxigenasas Peroxidasas Hidrogenasas Enoato reductasas Aldolasas Carboxiliasas Nitrilo hidratasa	
5) <i>Glicosidasas</i>		
6) <i>Oxinitrilasa</i>	4) <i>Enzimas dependientes de tiamina pirofosfato</i>	
	Transcetolasas Descarboxilasas	
	5) <i>Otras</i>	
	SAH hidrolasa Enzimas dependientes de vitamina B <sub>12</sub> PQQ (metoxatina) enzimas	

## 6. Aplicaciones de las enzimas en síntesis orgánica

Resulta sorprendente que durante décadas las enzimas no hayan sido aprovechadas en química orgánica sintética, en vista de las características y potencialidades anteriormente expuestas. Una explicación puede encontrarse en que hasta hace menos de quince años, algunos problemas relacionados con la naturaleza y utilización de las enzimas fueron sobreevaluados y contribuyeron a formar la idea falsa de que su aplicación como catalizadores en síntesis orgánica era limitada.

Es verdad que las técnicas de aislamiento y purificación de enzimas están fuera del alcance de un laboratorio de síntesis, pero actualmente la mayoría de las sintéticamente útiles son accesibles comercialmente<sup>18-20,31</sup>. A diferencia de las enzimas utilizadas en estudios enzimológicos, se ha visto que las empleadas en síntesis orgánica no necesitan estar particularmente puras<sup>6</sup>, por lo que las preparaciones crudas de origen comercial presentan actividades catalíticas adecuadas para su uso.

El costo de las enzimas comerciales es un factor que puede influir adversamente y explica que el tercer grupo de enzimas que se muestra en la Tabla 1.2, con un gran interés en síntesis, tenga utilización más limitada que el primero. La principal barrera económica está en el elevado costo de los cofactores, que hace necesaria la regeneración *in situ* de los mismos, complicándose así el uso de esta clase de enzimas<sup>6</sup>.

A nivel económico, hay que considerar tanto el costo de una unidad de actividad como la actividad específica<sup>6</sup>. Cabe aquí recordar que la unidad de actividad enzimática empleada más corrientemente se define como la cantidad de enzima que origina la transformación de 1.0  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto a 25°, en condiciones óptimas de medición. La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína y constituye una medida de la pureza del biocatalizador<sup>32</sup>.

Comparadas con otros catalizadores, las enzimas son más inestables y susceptibles de degradarse a través de numerosos mecanismos<sup>33</sup>. La inmovilización es un procedimiento

que permite la conversión de la forma soluble en agua de una enzima en su forma insoluble e inmóvil<sup>3</sup> y ha permitido mejorar la estabilidad de estos biocatalizadores, facilitando además su recuperación y purificación al final de la reacción<sup>6,7,34</sup>. Existen más de cien técnicas de inmovilización de enzimas sobre soportes sólidos<sup>3</sup> (sílica, polímeros metacrílicos, cerámicos, resinas de intercambio aniónico, etc.). Raramente la inmovilización influye sobre la especificidad y el mecanismo del proceso catalítico<sup>4</sup>. La exclusión de proteasas también mejora la estabilidad<sup>6</sup>.

La amplia utilización de varias enzimas pertenecientes al grupo que no requiere cofactores ( Grupo 1, Tabla 1.2 ) se debe a la combinación de su versatilidad de aplicaciones, accesibilidad comercial y buena estabilidad. Esta clase de enzimas presenta especial utilidad para la preparación de sintones quirales<sup>6</sup>.

No resulta exagerado afirmar que el factor más decisivo que limitó durante años la aplicación de las enzimas en síntesis ha sido la excesiva importancia dada al agua como medio natural y óptimo<sup>19</sup> para que desarrollen su poder catalítico frente a sustratos también solubles en agua.

En verdad, el agua no es el medio ideal para la mayoría de los procesos orgánicos, ya que en numerosas reacciones el equilibrio se desplaza desfavorablemente o aparecen reacciones laterales indeseables. Además, muchos compuestos orgánicos se disuelven mejor en medio orgánico que en agua. Al reemplazar el agua por un solvente orgánico se favorece la solubilidad de los sustratos orgánicos y es posible realizar numerosas reacciones que no pueden competir con la hidrólisis cuando se llevan a cabo en medio acuoso. En un medio orgánico las reacciones de hidrólisis catalizadas por hidrolasas se revierten hacia la dirección sintética<sup>19,35</sup>. Además, se suprime la inhibición de la enzima por sustrato o por producto ya que éstos se mantienen mayoritariamente en la fase orgánica<sup>34</sup>.

El reemplazo del agua por un solvente orgánico como medio de una reacción catalizada por enzimas resulta atractivo tanto por los aspectos químicos mencionados como por dos aspectos experimentales importantes. Uno es que el aislar y purificar un producto orgánico

de una solución de solvente orgánico es más fácil y directo que de una solución acuosa; el otro, está relacionado con la solubilidad de las proteínas en solventes orgánicos. En general, las proteínas no son directamente solubles en medio orgánico, salvo que se trate de solventes fuertemente próticos o muy polares, como el dimetilsulfóxido y la dimetilformamida<sup>36</sup>. Por lo tanto, las enzimas son insolubles en la mayoría de los solventes orgánicos y se mantienen en suspensión, hecho que facilita tanto su recuperación y purificación como la de la mezcla de reacción.

En la evolución de las aproximaciones a la enzimología no acuosa<sup>37</sup>, el primer paso consistió en agregar solventes miscibles a soluciones acuosas de enzimas, a menudo con la finalidad de aumentar la solubilidad de sustratos poco solubles en agua. Si bien bajas concentraciones de estos solventes no tuvieron efectos muy adversos (se observó una disminución de la actividad catalítica comparada con soluciones acuosas puras), concentraciones mayores condujeron a la gradual desnaturalización de la proteína. El paso siguiente en la serie de intentos de ubicar a enzimas en un medio diferente al agua fue el uso de mezclas bifásicas: una solución acuosa de una enzima emulsificada en un solvente inmisible en agua, como cloroformo y acetato de etilo. En este procedimiento, los sustratos se añaden al solvente, desde donde difunden a la fase acuosa, en la que tiene lugar la reacción enzimática; concluída ésta, los productos difunden a la fase orgánica. Para facilitar la transferencia de masa, debe reducirse el tamaño de las minúsculas gotas de la emulsión. Una tercera aproximación al problema consiste en estabilizar las microemulsiones resultantes, por agregado de surfactantes con lo que se forman micelas reversas.

En estos tres sistemas las enzimas funcionan dentro de un entorno esencialmente acuoso, donde poseen una capa de moléculas de agua asociadas. Desde el punto de vista sintético ese ámbito básicamente acuoso hace que estos tres sistemas posean las mismas desventajas que los sistemas acuosos puros.

## 7. Enzimas en medio orgánico

El último paso hacia la catálisis en medio no acuoso fue, precisamente, el empleo de solventes orgánicos anhidros, con un contenido de agua menor al 1%,<sup>19</sup> como medio para llevar a cabo las reacciones enzimáticas.

Si bien existen en bibliografía algunos trabajos que se remontan a varias décadas atrás y que pueden considerarse como antecedentes aislados de la catálisis enzimática en medio orgánico<sup>38</sup>, en los últimos quince años la literatura ha mostrado un aumento cada vez más creciente del empleo de enzimas como catalizadores en medio orgánico y en especial, a partir de los trabajos de Klibanov y *col.* publicados entre 1984 y 1986<sup>39-42</sup>.

En medio orgánico, las enzimas presentan nuevas propiedades<sup>37</sup>. Aun en un entorno de solvente orgánico el agua es absolutamente necesaria para la función catalítica de las enzimas<sup>37,42</sup> porque participa en todas las interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals) que mantienen, mediante un delicado balance, la flexibilidad conformacional necesaria para la catálisis. La eliminación total de agua distorsiona dicha conformación<sup>42</sup>.

Klibanov y *col.*<sup>41</sup> encontraron actividad enzimática en solventes orgánicos, en transesterificaciones catalizadas por diferentes lipasas liofilizadas, aun cuando la cantidad de agua de estos medios era igual o inferior al 0,02%. En efecto, la bibliografía testimonia que se han efectuado exitosamente numerosas transformaciones con enzimas de diversa naturaleza en medios orgánicos, en sistemas que contenían cantidades mínimas de agua<sup>20</sup>.

Klibanov ha sugerido que sólo es realmente necesaria la presencia de una monocapa de agua alrededor de la superficie de la enzima, a la que denominó agua esencial<sup>42</sup>. Más que tratarse de una monocapa, esta agua esencial consiste en agregados de moléculas de agua (*clusters*) situados presumiblemente alrededor de los grupos cargados de la proteína<sup>37</sup>. Según esta teoría, una enzima se ve afectada por su agua esencial y no por el agua libre presente en el solvente. Una vez que esta agua esencial se localiza alrededor de las

moléculas de la enzima, reemplazar el resto del agua debe ser posible sin que se afecte adversamente la actividad de la enzima<sup>42</sup>.

En la mayoría de los casos no es necesario medir el contenido de agua del solvente<sup>35</sup>. Los solventes de grado analítico suelen ser adecuados, mientras no sean completamente anhidros. Además, todas las preparaciones crudas de enzimas liofilizadas contienen una cierta cantidad de agua que usualmente alcanza como reguladora de humedad<sup>35</sup>.

### Efecto del solvente

La naturaleza del solvente es una variable crucial para la actividad enzimática. Zaks y Klibanov concluyeron, en base a resultados obtenidos con lipasas<sup>41</sup>, óxidoreductasas<sup>43</sup> y proteasas<sup>37</sup>, que las interacciones entre el agua esencial de la enzima y el solvente son más importantes que las interacciones entre el solvente y la enzima.

La hidrofobicidad del solvente influye para que se mantenga o no el agua esencial en torno a la enzima<sup>42</sup>. Con los solventes más hidrofóbicos, como los hidrocarburos, al no haber partición del agua esencial con ellos, la misma permanece asociada al biocatalizador. Esta teoría está de acuerdo con que la mayoría de las enzimas son inactivas en solventes orgánicos hidrofílicos<sup>42</sup>; probablemente el efecto adverso de estos solventes sea el de promover una desnaturalización<sup>19</sup>.

Para correlacionar la actividad enzimática con la naturaleza del solvente, Laane *et al.*<sup>44</sup> propusieron la utilización del parámetro log P, coeficiente de partición del solvente entre octano y agua, como medida de la hidrofobicidad del solvente. Se ha observado<sup>19,44</sup> que en general la actividad es alta para solventes con log P mayor que 4, intermedia para aquellos con log P entre 4 y 2 y baja para log P menor que 2. Si bien esta generalización demuestra estar en concordancia con los resultados obtenidos en numerosas reacciones enzimáticas descritas en literatura, también se han encontrado numerosas correlaciones no satisfactorias<sup>41,45,46</sup>. Por más que log P sea el único parámetro con sustento mecanístico

para la predicción del nivel de actividad enzimática en medio no acuoso, en verdad aparece como rígido y limitado, porque supone que el efecto del solvente sobre el biocatalizador es independiente de la enzima, e ignora tanto las interacciones del solvente con la enzima como el efecto de la constante dieléctrica sobre la actividad enzimática. La constante dieléctrica también tiene importancia porque todas las interacciones no covalentes de las proteínas son de origen electrostático y se comportan según la ley de Coulomb<sup>47</sup>.

La inmiscibilidad con agua carece de fundamento mecanístico para afectar la actividad enzimática y aparece simplemente como un reflejo limitado de la hidrofobicidad del solvente<sup>47</sup>. Para solventes con igual naturaleza química, la distinta polaridad, evaluada a través del momento dipolar, mostró tener un efecto irrelevante sobre la actividad enzimática<sup>47</sup>.

Probablemente no haya un único parámetro fisicoquímico del solvente que sirva para predecir la actividad enzimática en medio no acuoso, menos aún hasta que se llegue a comprender en detalle el papel molecular de las interacciones enzima-solvente<sup>47</sup>.

Lo cierto es que al presente está bien sentado el hecho de que solventes inmiscibles en agua, con un contenido de agua por debajo del límite de solubilidad, son aptos para que enzimas secas, cristalinas o liofilizadas, sean catalíticamente activas<sup>48</sup>. Dentro de este rango de contenido de agua, la actividad en solventes orgánicos adecuados es comparable a la del medio acuoso y la catálisis sigue una cinética de Michaelis-Menten<sup>48</sup>.

También está comprobado que la naturaleza del solvente puede afectar la enantioselectividad<sup>46,49-51</sup> y la regioselectividad<sup>52</sup>.

### **Estabilidad de las enzimas en medio orgánico**

Un aspecto de sumo interés es la estabilidad de las enzimas en medio orgánico. Los ejemplos presentados en literatura muestran con elocuencia que es posible obtener muy buena estabilidad del biocatalizador en medio orgánico. La estabilidad de la enzima en este medio

varía con el tipo de enzima utilizada, las condiciones de reacción, el solvente y la cantidad de agua <sup>42,53</sup>.

Numerosos investigadores han mostrado que las enzimas se mantienen estables en solventes orgánicos durante tiempos de reacción de hasta cuatrocientas horas<sup>53</sup>, sin pérdida de actividad.

Ya que las proteínas son insolubles en la mayoría de los solventes orgánicos, Klibanov considera que esta insolubilidad elimina la flexibilidad conformacional de las enzimas, lo que evita que adopten conformaciones diferentes a las de la fase acuosa<sup>42</sup>. Una enzima disuelta adquiere la conformación que es termodinámicamente favorable en el solvente, pero que puede ser muy diferente a la conformación en fase acuosa<sup>36</sup>. Esto explicaría el hecho de que una enzima se inactiva en los pocos solventes orgánicos en que puede disolverse (dimetilsulfóxido, dimetilformamida). Al estar conformacionalmente inmóviles en solvente orgánico, las enzimas permanecen como congeladas en la conformación que corresponde a la solución acuosa de la que fueron aisladas<sup>42</sup>. Esta rigidez conformacional de las proteínas en medio orgánico genera altas barreras cinéticas que evitan que la conformación tipo nativa se despliegue<sup>45</sup> y en consecuencia, se mantienen activas en solvente orgánico.

Se ha comprobado que en suspensiones de enzimas en solvente orgánico los sitios activos están accesibles y son comparables a los disponibles en medio acuoso<sup>45,54</sup>. Tomando en cuenta investigaciones mecanísticas, parece ser que la estructura del estado de transición en solvente orgánico no polar es aproximadamente igual que en solución acuosa<sup>48</sup>, lo que indica que el entorno del sitio activo sería el mismo que en agua.

Las enzimas se inactivan mediante una serie de procesos en los que participa el agua y que se ven favorecidos a altas temperaturas<sup>55</sup>, tales como pérdida de estructura terciaria ordenada, destrucción de enlaces disulfuro, deamidación de residuos de asparagina y glutamina, hidrólisis de uniones peptídicas en residuos de ácido aspártico. Por lo tanto, en un medio orgánico, un entorno libre de agua, estos procesos se ven limitados, con lo que la estabilidad del biocatalizador se ve beneficiada. Se ha demostrado que aun a altas

temperaturas enzimas en medio orgánico con un contenido de agua inferior al 1% pueden presentar una estabilidad apreciable, que es también notablemente superior a la estabilidad térmica observada en medio acuoso<sup>39</sup>. Una consecuencia de la estabilidad térmica es la posibilidad de operar a temperaturas superiores a la ambiente. Concretamente, y dependiendo de la enzima, existen numerosas biotransformaciones que han sido llevadas a cabo a temperaturas comprendidas entre 40 y 70°.

La inmovilización aumenta la estabilidad<sup>6,53,34</sup>; en particular, la inestabilidad de las enzimas en solventes polares puede superarse inmovilizándolas sobre soportes hidrofílicos. Esto resulta de gran utilidad cuando se utilizan sustratos altamente hidrofílicos que sólo se disuelven en solventes polares, como piridina o butanol.

Se ha encontrado que la actividad enzimática en solvente orgánico es óptima cuando las enzimas empleadas fueron liofilizadas en una solución de pH óptimo para la actividad en medio acuoso<sup>42</sup>. Según Klibanov, la enzima en medio orgánico mantiene a sus grupos ionogénicos en el estado de ionización adquirido en la última solución acuosa a la que fue expuesta. La enzima retiene la actividad catalítica que corresponde a dicho estado de ionización.

En las suspensiones de enzimas en solventes orgánicos ocurre el mismo problema que frecuentemente se observa en catálisis heterogénea: las reacciones están sujetas al control difusional<sup>42</sup>. Para superar esta limitación, las suspensiones de reacción deben someterse a una agitación vigorosa. El tratamiento con ultrasonido mejora este problema al reducir el tamaño de las partículas de la enzima. Como en cualquier sistema de catálisis heterogénea, cuando la difusión es más rápida que la reacción, el fenómeno de difusión no tiene consecuencias<sup>37</sup>.

Como es posible apreciar, en un ámbito de solvente orgánico las enzimas presentan características especiales. Si bien estos biocatalizadores difieren en estructura, tamaño, origen y función, considerando que todos tienen en común una estructura que surge de la combinación de la misma veintena de aminoácidos, parece coherente afirmar que la mayoría

de las enzimas pueden llegar a ser capaces de actuar en solvente orgánico. La cuestión está en encontrar las condiciones adecuadas para que operen dicha catálisis<sup>34</sup>.

### **8. Lipasas en medio orgánico**

El estudio de las publicaciones aparecidas en la última década permite afirmar que los biocatalizadores más comúnmente utilizados en medio orgánico son las enzimas hidrolíticas<sup>33,56</sup>, pertenecientes al grupo de enzimas que no requieren cofactores (Tabla 1.3, página 15). Hasta el presente, existen pocos ejemplos referidos al empleo de enzimas no hidrolíticas como catalizadores regio y/o estereoselectivos en medio orgánico, entre los que pueden citarse el uso de polifenoloxidasa y mandelonitriloliasa<sup>19,20</sup>.

La capacidad de las lipasas y proteasas para catalizar hidrólisis asimétricas de ésteres racémicos en agua se aplicó durante muchos años<sup>4,6</sup>. En esta estrategia para la resolución, aun si la enantiodiscriminación no es absoluta, ocurre una resolución parcial cuya pureza óptica depende del grado de conversión<sup>20,57</sup>. Los inconvenientes de este tipo de resolución son que la mezcla racémica debe ser convertida en un éster, poco soluble en agua y además, que muchos compuestos orgánicos son inestables en medio acuoso. Por esto, es más conveniente trabajar con estas enzimas en medio orgánico y de hecho, este procedimiento ha sido empleado por la mayoría de los investigadores<sup>20</sup>.

Dado el marco de ausencia de agua propio de un entorno orgánico, las reacciones catalizadas por hidrolasas pueden revertirse hacia la dirección sintética. Es así que enzimas hidrolíticas pueden catalizar reacciones de esterificación<sup>19</sup>, transesterificación<sup>19,20</sup>, aminólisis<sup>20,58</sup>, oximólisis<sup>41</sup> y de formación de péptidos<sup>34,37</sup> que en presencia de agua se suprimirían por hidrólisis. Por ejemplo, la preparación del éster etílico de N-benzoil-L-fenilalanina a partir del ácido y de etanol en cloroformo catalizada por  $\alpha$ -quimotripsina

transcurrió con un rendimiento superior al 80%, mientras que en agua sólo se detectó la formación del éster en un 0,01%<sup>59</sup>.

Las lipasas, triacilglicerol acilhidrolasas, E.C.3.1.1.3, son enzimas que catalizan la hidrólisis de lípidos formados por glicerol y ácidos grasos, actuando en la interfase lípido-agua de una emulsión<sup>19,60</sup>. Estas enzimas presentan poca actividad en soluciones acuosas de sustratos solubles en agua. Si una lipasa se encuentra en una solución saturada de un sustrato y por posterior sobresaturación de la misma se forman partículas emulsificadas, se observa un incremento considerable de su actividad. Esta catálisis interfasial da a las lipasas una afinidad inherente por los entornos hidrofóbicos y las distingue de otras enzimas hidrolíticas; probablemente esta es la propiedad más característica de las enzimas lipolíticas<sup>61</sup>.

Más que su especificidad por sustratos insolubles emulsificados, la diferencia esencial de las lipasas con respecto a otras estererasas es su incapacidad de penetrar en la capa de agua que rodea a los grupos ésteres en un sustrato hidrofílico<sup>61</sup>. Es concebible entonces que las lipasas sean particularmente adecuadas para operar en ambientes ricos en solventes orgánicos.

Otra propiedad especial de las lipasas es que aceptan sustratos naturales o no, de un amplio rango de estructuras, tanto en medio acuoso como orgánico. Esto sugiere que el esqueleto de las lipasas es flexible y puede adoptar una gran variedad de conformaciones para acomodar moléculas de diverso tamaño y complejidad estereoquímica<sup>19</sup>. Esta misma razón hace que sea difícil poder predecir la interacción estereoquímica de las lipasas frente a los sustratos<sup>19</sup>.

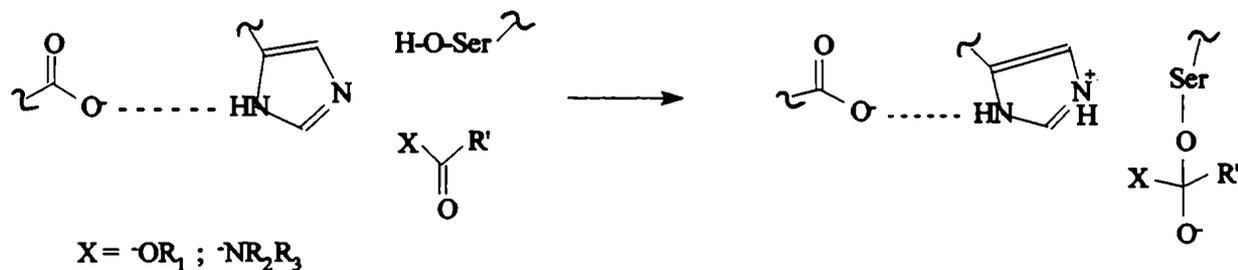
Es notable el hecho de que las lipasas puedan ser hasta el 100% tan activas en solvente orgánico como lo son en sus entornos biológicamente naturales. Este comportamiento apoyaría la idea de que, mientras el agua esencial permanezca unida a la enzima, la conformación de al menos la región del sitio activo se parece estrechamente a la que presenta en solución acuosa<sup>41</sup>.

Actualmente, alrededor de veinte lipasas provenientes de fuentes microbianas, vegetales y animales son accesibles comercialmente y a bajo costo. Junto con algunas proteasas, varias lipasas son producidas en masa debido a que han encontrado numerosas aplicaciones industriales<sup>31</sup>.

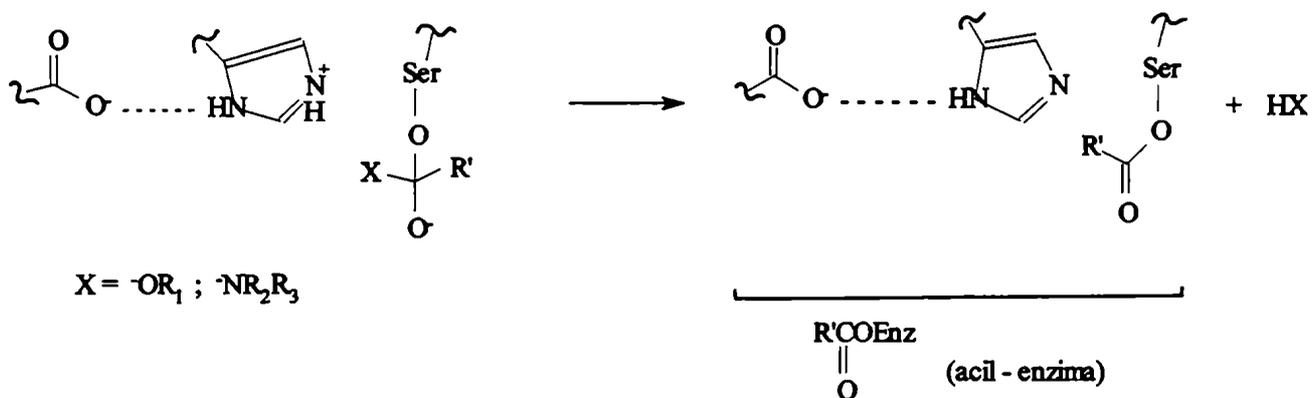
Puede decirse entonces que las características de las lipasas se adecuan a los requerimientos que hacen a una enzima útil para su aplicación como catalizador en química orgánica<sup>4,7,19,33,34,60</sup>:

- 1) Poseen amplia tolerancia estructural con elevada estereoselectividad, lo que las hace útiles para resoluciones y empleo en síntesis quiral.
- 2) Presentan alta actividad y estabilidad en medio orgánico.
- 3) Pueden usarse repetidamente sin perder su actividad o selectividad.
- 4) Son accesibles comercialmente y a costos razonables, ya sea en forma nativa o inmovilizada.
- 5) No necesitan cofactores, lo que facilita su uso.
- 6) Pueden inmovilizarse mediante procedimientos simples.

Desde el punto de vista mecanístico, las lipasas son serina-hidrolasas que contienen en su sitio activo una tríada catalítica compuesta por serina, histidina y un aminoácido con un residuo que posee un carboxilato (aspártico o glutámico)<sup>56,61</sup>. En dicha tríada la serina actúa como nucleófilo, atacando a una molécula portadora de acilo, R'COX<sup>34</sup>:



En una etapa inicial se forma un intermediario O-acilado covalente, la acil-enzima:



En una segunda etapa catalítica la acil-enzima se desacila: el acilo se transfiere a un nucleófilo NuH y se regenera la enzima libre:



Durante las dos etapas del mecanismo se puede reconocer quiralidad tanto en la estructura de R' como en la de Nu<sup>35</sup>.

En medio acuoso el nucleófilo es el agua, lo que conduce a las reacciones de hidrólisis. Cuando el medio de reacción es un solvente orgánico, donde la ausencia de agua minimiza la competencia de la hidrólisis, otros nucleófilos, tales como alcoholes, aminas, tioles e hidroperóxidos son capaces de reaccionar con la acil-enzima para generar, respectivamente, ésteres, amidas, tiolésteres y cetonas (Tabla 1.4).

**TABLA 1.4 - Reacciones de transferencia de acilo más comunes catalizadas por lipasas en medio orgánico**

$$\text{R}'\text{COX} + \text{NuH} \xrightarrow{\text{lipasa}} \text{R}'\text{CONu} + \text{HX}$$

R'COX	Nu	R'CONu	HX	Tipo de reacción
ácido (X= -OH)	alcohol (R <sub>1</sub> OH)	éster (R'CO <sub>2</sub> R <sub>1</sub> )	H <sub>2</sub> O	esterificación
éster (X= -OR)	alcohol (R <sub>1</sub> OH)	éster (R'CO <sub>2</sub> R <sub>1</sub> )	ROH	transesterificación
	amina (NHR <sub>2</sub> R <sub>3</sub> )	amida (R'CONR <sub>2</sub> R <sub>3</sub> )	ROH	aminólisis

### **9. Transesterificaciones catalizadas por lipasas en medio orgánico**

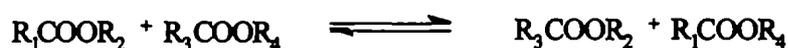
Un número muy elevado de referencias bibliográficas se refieren a esterificaciones y transesterificaciones catalizadas por lipasas suspendidas en medio orgánico y que transcurren con comportamiento regio y/o enantioselectivo<sup>19,20,34,35,37,42</sup>.

En una reacción de esterificación catalizada por lipasas, los solventes lipofílicos (log P > 4), habitualmente adecuados, no pueden acomodar el agua que se produce durante el transcurso de la esterificación, por lo que la misma se acumula en la superficie hidrofílica de la enzima, formando una segunda capa acuosa que conduce finalmente a una interfase que separa a la enzima del sustrato. El resultado es que la reacción se detiene antes de alcanzar la conversión deseada<sup>35</sup>. Para evitar este inconveniente se ha eliminado el agua agregando al

sistema de reacción tamices moleculares o sales inorgánicas que forman hidratos<sup>62</sup>. Ambas técnicas poseen la desventaja de dificultar el aislamiento y posterior purificación de la enzima al final de la reacción<sup>35</sup>.

A diferencia de la esterificación, en una reacción de transesterificación, que no agrega agua al sistema de reacción, el contenido de agua en el medio puede mantenerse a nivel constante.

Las reacciones de transesterificación pueden clasificarse en acidólisis, interesterificación y alcoholólisis<sup>63</sup>:



$R_4 = \begin{matrix} \text{-H} & \text{acidólisis} \\ \text{-alquilo} & \text{interesterificación} \end{matrix}$



### ESQUEMA 1.1 - Reacciones de transesterificación

Las dos primeras se utilizan en modificación de triglicéridos para obtener grasas análogas de manteca de cacao<sup>64</sup>. En biotransformaciones selectivas catalizadas por lipasas en solvente orgánico, la más ampliamente utilizada es la alcoholólisis<sup>63</sup>.

Las transesterificaciones parecen ser más versátiles que las esterificaciones directas tanto en términos de velocidades de reacción como de limitaciones termodinámicas<sup>20</sup>. Con frecuencia, las transesterificaciones catalizadas por lipasas son más enantioselectivas que las correspondientes hidrólisis en agua<sup>19</sup>; por otra parte, en numerosas ocasiones la hidrólisis en agua y la transesterificación en solvente orgánico originan estereoisómeros complementarios<sup>40,65,66</sup>. Todos estos factores contribuyeron a que, desde la primera publicación de un estudio de transesterificación catalizada por lipasas en solvente orgánico,

efectuado por Klibanov y *col.* en 1985<sup>40</sup>, las transesterificaciones hayan desplazado a las esterificaciones<sup>35</sup>.

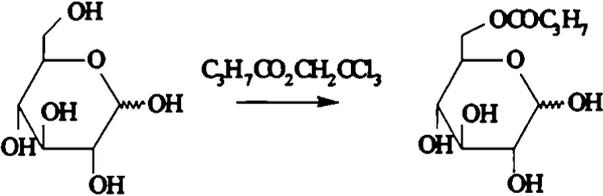
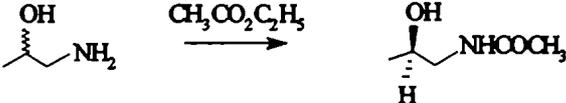
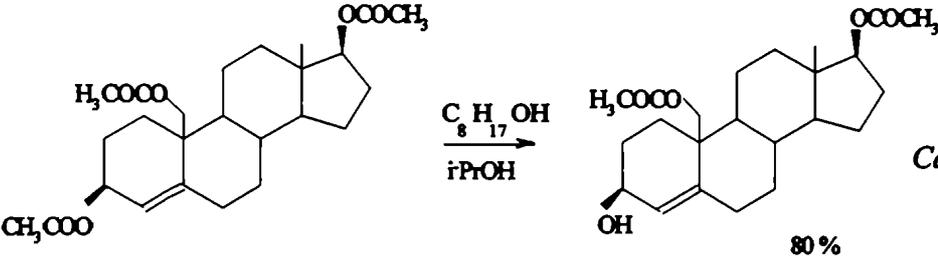
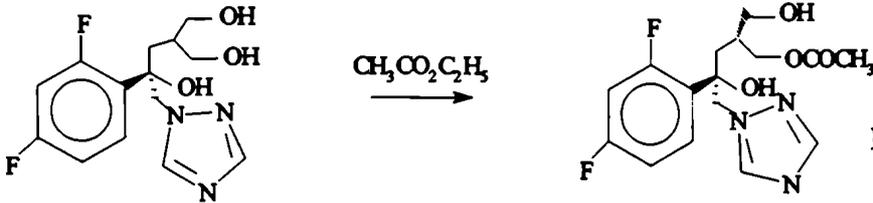
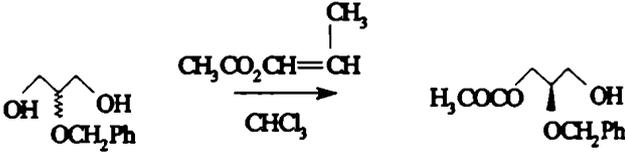
Sin lugar a dudas, los numerosos trabajos descriptos hasta la fecha han contribuido en grado importante a que la biocatálisis no acuosa en medio monofásico orgánico adquiriera cada vez mayor importancia para la preparación de compuestos homoquirales<sup>20,34,35</sup>. Las transesterificaciones catalizadas por lipasas también han demostrado ser una herramienta valiosísima para reacciones regioselectivas de moléculas bi y polifuncionales, como lo ilustran las transformaciones selectivas efectuadas con glicoles, aminoalcoholes, esteroides y alcaloides hidroxilados, hidratos de carbono y en general, con moléculas de estructura muy variada (Tabla 1.5).

Como ya se ha mencionado, en soluciones acuosas y debido al gran exceso de agua, las reacciones de hidrólisis son virtualmente completas, pero en medio orgánico, donde factores cinéticos y efectos de concentración entran en juego, la situación es diferente. Las transesterificaciones son procesos de equilibrio. Tanto el nucleófilo agregado como el nucleófilo liberado,  $R_2OH$ , (Esquema 1.1) pueden competir por la acil-enzima<sup>34</sup>. Por lo tanto, la reversibilidad de la transesterificación no sólo tiene efectos sobre la velocidad y el rendimiento de la reacción, sino que puede afectar la selectividad de la transformación<sup>35</sup>.

Ya que el mismo estereoisómero interviene en ambas direcciones de la transesterificación, el exceso enantiomérico del producto decrece a medida que progresa la reacción inversa, por lo que el equilibrio termodinámico es una condición que debe evitarse en las resoluciones cinéticas<sup>35,57,73</sup>.

Se ha observado que los factores estéricos en la molécula del alcohol influyen más que los electrónicos sobre las transesterificaciones<sup>74</sup>. Los alcoholes secundarios estéricamente impedidos y terciarios voluminosos no reaccionan. Para solucionar esta limitación, se ha descrito con éxito la resolución de alcoholes secundarios a través de la transesterificación de sus acetatos con alcoholes primarios como nucleófilos<sup>75</sup>.

**TABLA 1.5 - Ejemplos de transesterificaciones catalizadas por lipasas en medio orgánico**

Reacción	Lipasa (Referencia)
$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{OH} \xrightarrow{\text{C}_3\text{H}_7\text{CO}_2(\text{CH}_2)_2\text{Cl}} \text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{OCOC}_3\text{H}_7$ <p style="text-align: center;">47%</p>	<i>Aspergillus niger</i> (67)
	Pancreática porcina (68)
	Pancreática porcina (69)
 <p style="text-align: center;">80%</p>	<i>Candida cylindracea</i> (70)
	Pancreática porcina (71)
	<i>Pseudomonas sp.</i> (72)
96% ee	

Con la finalidad de desplazar el equilibrio hacia la acilación completa se han empleado diversas estrategias. Una de ellas, de base más bien física, se basa en atrapar o eliminar el coproducto  $R_2OH$  resultante de la transesterificación, para lo cual pueden agregarse tamices moleculares<sup>76</sup> o llevar a cabo la reacción a presión reducida<sup>77</sup>. Ambos procedimientos presentan sendas desventajas: la dificultad de recuperar y purificar la enzima, y la complicación de las condiciones experimentales.

En algunas situaciones especiales en que el coproducto es volátil, etanotiol, por ejemplo<sup>78</sup>, se han llevado a cabo transesterificaciones en sistemas abiertos, aplicación que se restringe a sustratos que no sean fácilmente oxidables o sensibles a la atmósfera.

La otra estrategia apunta al agente acilante ( $R_1COOR_2$ , Esquema 1.1). Para desplazar el equilibrio, el dador de acilo puede emplearse en un gran exceso<sup>35</sup>. Cuando este procedimiento no es conveniente a causa de su costo, o debido a que aun dicho exceso no es suficiente para alcanzar una actividad catalítica adecuada, puede resultar útil el empleo de agentes acilantes especiales<sup>35</sup> (Tabla 1.6).

Todos estos dadores de acilo poseen en común la característica de que al reaccionar liberan como coproducto de la transesterificación una molécula de capacidad nucleofílica nula o menor que el alcohol  $R_3OH$  (Esquema 1.1) para competir por la acil-enzima. Faber y Riva han dividido a estos agentes acilantes en dos grupos: cuasirreversibles e irreversibles<sup>35</sup>.

Los agentes acilantes cuasirreversibles son ésteres “activados”<sup>40</sup> cuyo resto alcohólico posee sustituyentes atractores de electrones de modo tal que el alcohol liberado,  $R_2OH$ , (Esquema 1.1) posee bajo poder nucleofílico. Los más utilizados son los ésteres de 2-trihaloetilo y los ésteres de oximas<sup>35</sup>.

Cuando el agente acilante es un enoléster, el alcohol liberado  $R_2OH$  es un enol, que tautomeriza instantáneamente a aldehído o cetona, de modo tal que la transesterificación es completamente irreversible<sup>79</sup>. Con enolésteres las reacciones suelen ser de diez a cien veces más rápidas que con los demás ésteres activados<sup>80</sup>. Debido a razones estéricas, los ésteres de vinilo dan mejores resultados que los de isopropenilo.

**TABLA 1.6 - Agentes acilantes especiales más utilizados en transesterificaciones catalizadas por lipasas**

Agente	Tipo	Coproducto liberado
$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_2\text{X} \quad \text{X} = \text{CF}_3; \text{CCl}_3$	cuasiirreversible	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{X}$
$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{N}=\text{C}(\text{R}')_2$	cuasiirreversible	$\text{HO}-\text{N}=\text{C}(\text{R}')_2$
$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{C}(\text{R}')=\text{C}(\text{R})_2 \quad \text{R}' = \text{H}; \text{CH}_3$	irreversible	$\text{HO}-\text{C}(\text{R}')=\text{C}(\text{R})_2 \longrightarrow \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}(\text{R})_2$
$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$	irreversible	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$

Se han empleado también anhídridos como acilantes irreversibles, con selectividades y velocidades similares a las de los enolésteres<sup>81</sup>.

No obstante, todos los agentes acilantes anteriormente descritos poseen distintas desventajas o inconvenientes<sup>35</sup>. Los ésteres de trifluoretilo no son económicamente accesibles; con los de tricloroetilo, el tricloroetanol formado es difícil de eliminar. En el caso de los ésteres vinílicos, se ha comprobado que el acetaldehído liberado durante la reacción puede formar bases de Schiff con los residuos de lisina de la enzima. La reacción con anhídridos genera como coproducto un ácido carboxílico, que varía el pH en el microentorno de la enzima, con la posible disminución de la actividad enzimática. Además, el uso de anhídridos es viable sólo cuando no ocurre acilación química espontánea con el sustrato, en ausencia de enzima<sup>35</sup>.

**Referencias bibliográficas**

1. S.Butt y S.M.Roberts, *Chem. Br.* 23, 127 (1987)
2. H.Yamada y S.Shimizu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27, 622 (1988)
3. A.M.Klibanov, *Science* 219, 722 (1983)
4. J.B.Jones, *Tetrahedron* 42, 3351 (1986)
5. A.L.Lehninger, *Bioquímica*, Ediciones Omega, Barcelona, 1994, Capítulo 8, pág.189.
6. G.M.Whitesides y C.H.Wong, *Aldrichimica Acta* 16, 27 (1983)
7. C.H.Wong y G.M.Whitesides, *Enzymes in synthetic organic chemistry*, Elsevier Science Ltd., Oxford, 1994, pág.1.
8. D.L.Adams, *J.Chem.Educ.* 69, 451 (1992)
9. E.L.Eliel, *Stereochemistry of carbon compounds*, Mc.Graw-Hill, Nueva York, 1962, página 434.
10. Referencia 9, pág. 436.
11. J.March, *Advanced organic chemistry*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1992, pág. 294.
12. A. Hassner, *J.Org.Chem.* 33, 2684 (1968)
13. Referencia 7, pág. 9.
14. E.J.Corey y W.G.Su, *J.Am.Chem.Soc.* 109, 7534 (1987)
15. G.Carrea, R.Bovara, P.Cremonesi y R.Lodi, *Biotechnol.Bioeng.* 26, 560 (1984)
16. M.Therisod y A.M.Klibanov, *J.Am.Chem.Soc.* 109, 3977 (1987)
17. J.P.Greenstein, *Adv.Protein Chem.* 9, 122 (1954)
18. A.Akiyama, M.Bednarski, M.J.Kim, E.S.Simon, H.Waldmann y G.M.Whitesides, *Chem.Br.* 23, 645 (1987)
19. C.S.Chen y C.J.Sih, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* 28, 695 (1989)
20. A.M.Klibanov, *Acc.Chem.Res.* 23, 114 (1990)
21. D.Seebach, M.A.Sutter, R.H.Weber y M.F.Zuger, *Org.Synth.* 63, 1 (1984)

22. E.Hochuli, *Helv.Chim.Acta* 66 , 489 (1983)
23. I.Chibata, T.Tosa y T.Sato, *Meth.Enzym.* 44 , 739 (1976)
24. F.C.Huang, L.F.H.Lee, R.S.D.Mittal, P.R.Ravi Kumar, J.A.Chan, C.J.Sih, E.Caspi y C.R.Eck, *J.Am.Chem.Soc.* 97 , 4144 (1975)
25. H.Takeya, N.Sakai, T.Sugai y H.Ohta, *Tetrahedron Lett.* 32 , 1343 (1991)
26. W.E.Ladner y G.M.Whitesides, *J.Am.Chem.Soc.* 106, 7250 (1984)
27. R.A.Johnson, M.E.Herr, H.C.Murray, L.M.Reineke y G.S.Fonken, *J.Org.Chem.* 33 , 3195 (1968)
28. C.A.Yu y I.C.Gunsalus, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 40 , 1431 (1970)
29. D.H. Peterson y H.C.Murray, *J.Am.Chem.Soc.* 74, 1871 (1952)
30. Referencia 7, pág.2.
31. S.I.West, *Chem.Br.* 24 , 1220 (1988)
32. Referencia 5, Capítulo 8, pág. 215.
33. G.M.Whitesides y C.H.Wong, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* 24, 617 (1985)
34. W.Boland, C.Fröbl y M.Lorenz, *Synthesis* 1049 (1991)
35. K.Faber y S.Riva, *Synthesis* 895 (1992)
36. S.J.Singer, *Adv.Protein Chem.* 17 , 1 (1962)
37. A.M.Klibanov, *TIBS* 14, 141 (1989)
38. Referencia 7, pág.22.
39. A.Zaks y A.M.Klibanov, *Science* 224 , 1249 (1984)
40. G.Kirchner, M.P.Scollar y A.M.Klibanov, *J.Am.Chem.Soc.* 107 , 7072 (1985)
41. A.Zaks y A.M.Klibanov, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82 , 3192 (1985)
42. A.M.Klibanov, *Chemtech* 16 , 354 (1986)
43. A.Zaks y A.M.Klibanov, *J.Biol.Chem.* 263 , 8017 (1988)
44. C.Laane, S.Boeren, K.Vos y C.Veeger, *Biotechnol.Bioeng.* 30 , 81 (1987)
45. A.Zaks y A.M.Klibanov, *J.Biol.Chem.* 263 , 3194 (1988)
46. P.A.Fitzpatrick y A.M.Klibanov, *J.Am.Chem.Soc.* 113 , 3166 (1991)

47. V.S.Narayan y A.M.Klibanov, *Biotechnol.Bioeng.* 41 , 390 (1993)
48. Referencia 7, pág.23.
49. T.Sakurai, A.L.Margolin, A.J.Russell y A.M.Klibanov, *J.Am.Chem.Soc.* 110 , 7236 (1988)
50. H.Kitaguchi, P.A.Fitzpatrick, J.E.Huber y A.M.Klibanov, *J.Am.Chem.Soc.* 111 , 3094 (1989)
51. F.Secundo, S.Riva y G.Carrea, *Tetrahedron: Asymmetry* 3 , 267 (1992)
52. E.Rubio, A.Fernandez-Mayorales y A.M.Klibanov, *J.Am.Chem.Soc.* 113 , 695 (1991)
53. P.Aldercreutz y B.Mattiasson, *Biocatalysis* 1 , 99 (1987)
54. F.R.Dastoli, N.A.Musto y S.Price, *Arch.Biochem.Biophys.* 115 , 44 (1966)
55. T.J.Ahern y A.M.Klibanov, *Science* 228 , 1280 (1985)
56. Referencia 7, pág.41.
57. C.S.Chen, Y.Fujimoto, G.Girdaukas y C.J.Sih, *J.Am.Chem.Soc.* 104 , 7294 (1982)
58. V.Gotor, E.Menéndez, Z.Moulongui y A.Gaset, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.1* 2453 (1991)
59. K.Martinek y A.N.Semenov, *Biochem.Biophys.Acta* 658 , 90 (1981)
60. Referencia 7, pág.70.
61. M.Sémériva y P.Desnuelle, *Adv.Enzymol.Relat.Areas Mol.Biol.* 48 , 319 (1979)
62. L.Kvittingen, B.Sujurnes, T.Anthonsen y P.Halling, *Tetrahedron* 48 , 2793 (1992)
63. L.Kvittingen, *Tetrahedron* 50 , 8253 (1994)
64. S.Bloomer, P.Adlercreutz y B.Mattiasson, *J.Am.Oil Chem.Soc.* 67 , 519 (1990)
65. H.Hemmerle y H.J.Gais, *Tetrahedron Lett.* 28 , 3471 (1987)
66. U.Ader, D.Breitgoff, P.Klein, K.E.Laumen y M.P.Schneider, *Tetrahedron Lett.* 30 , 1793 (1989)
67. N.Chinsky, A.L.Margolin y A.M.Klibanov, *J.Am.Chem.Soc.* 111 , 386 (1989)
68. M.Therisod y A.M.Klibanov, *J.Am.Chem.Soc.* 108 , 5638 (1986)
69. V.Gotor, R.Brieva y F.Rebolledo, *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* 957 (1988)

70. V.C.O.Njar y E.Caspi, *Tetrahedron Lett.* 28 , 6549 (1987)
71. R.G.Lovey, A.K.Saksena y V.M.Girijavallabhan, *Tetrahedron Lett.* 35 , 6047 (1994)
72. Y.F.Wang, J.J.Lalonde, M.Momongan, D.E.Bergbreiter y C.H.Wong, *J.Am.Chem.Soc.* 110 , 7200 (1988)
73. C.S.Chen, S.H.Wu, G.Girdaukas y C.J.Sih, *J.Am.Chem.Soc.* 109 , 2812 (1987)
74. H.S.Bevinakatti y A.A.Banerji, *Biotechnol.Lett.* 10 , 397 (1988)
75. H.S.Bevinakatti, A.A.Banerji y R.V.Newadkar, *J.Org.Chem.* 54 , 2453 (1989)
76. A.M.Janssen, A.J.H.Klunder y B.Zwanenburg, *Tetrahedron* 47 , 7645 (1991)
77. N.Öhner, M.Martinelle, A.Mattson, T.Norin y K.Hult, *Biotechnol.Lett.* 14 , 263 (1992)
78. H.Frykman, N.Öhner, T.Norin y K.Hult, *Tetrahedron Lett.* 34 , 1367 (1993)
79. Y.F.Wang y C.H.Wong, *J.Org.Chem.* 53 , 3129 (1988)
80. Y.F.Wang, J.J.Lalonde, M.Momongan, D.E.Bergbreiter y C.H.Wong, *J.Am.Chem.Soc.* 110 , 7200 (1988)
81. D.Bianchi, P.Cesti, E.Battistel, *J.Org.Chem.* 53 , 5531 (1988)



***Objetivos y reseña sobre las lipasas utilizadas en el presente trabajo***



## 1. Objetivos

Como se discutió en la Introducción, una característica sobresaliente de la selectividad de las enzimas es su capacidad para discriminar entre dos o más grupos funcionales iguales o de comportamiento químico similar presentes en una molécula, en diferentes entornos.

Esta regio o quimioselectividad evita etapas adicionales de protección y resulta muy valiosa en transformaciones de interés sintético que suelen ser difíciles de lograr en un solo paso mediante el empleo de reactivos tradicionales. En particular, las transesterificaciones catalizadas por lipasas en medio orgánico son de suma utilidad para efectuar en un solo paso reacciones de acilación altamente regio o quimioselectivas.

El tiol y el hidroxilo son dos grupos funcionales que poseen reactividad similar<sup>1</sup>. Gracias al átomo de azufre, más voluminoso y menos electronegativo que el de oxígeno, los tioles son más volátiles, más ácidos y mejores nucleófilos que los correspondientes alcoholes, así como también se oxidan y generan radicales libres con mayor facilidad que los alcoholes. Pero más allá de estas diferencias, alcoholes y tioles presentan numerosas analogías en sus reacciones<sup>2</sup>, como se manifiesta en la formación de éteres y tioéteres, y en particular, de ésteres y de tioésteres<sup>3</sup>.

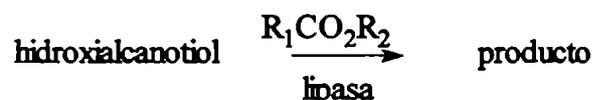
Es de esperar entonces que las reacciones de los **hidroxialcanotioles**, moléculas cuyas estructuras poseen por lo menos un grupo hidroxilo y un grupo tiol, transcurran con baja selectividad frente a reactivos tales como cloruros de acilo y anhídridos. En efecto, la literatura registra algunas reacciones de esterificación de hidroxialcanotioles con dichos agentes acilantes en las que ambos grupos funcionales son acilados, dando lugar a mezclas de productos<sup>4-6</sup>.

Al realizar una búsqueda bibliográfica más detallada, se advirtió que si bien no mucho tiempo atrás se había descrito el comportamiento electroquímico de ciertos hidroxialcanotioles<sup>7-9</sup>, la reactividad de estas moléculas había sido poco estudiada, con la

excepción de las esterificaciones anteriormente mencionadas<sup>4-6</sup>, algunas reacciones de eliminación<sup>10,11</sup> y el empleo de 3-mercapto-1-propanol en reacciones de *umpolung*<sup>12,13</sup>.

De estos antecedentes bibliográficos surgió que los productos de acilación de numerosos hidroxialcanotioles no habían sido descritos hasta el presente, y que su preparación a través de reactivos de esterificación convencionales puede ser poco satisfactoria.

Considerando estos hechos, el objetivo central del presente trabajo consistió en efectuar un estudio sistemático de la acilación biocatalizada de diversos hidroxialcanotioles bi y polifuncionales mediante reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas en medio orgánico:



A través de este objetivo se intentó:

1- Investigar la capacidad de las lipasas para conferir selectividad a estas acilaciones.

Con esta finalidad se utilizaron lipasas de distinto origen: PPL (lipasa pancreática porcina), LIP (lipasa de *Mucor miehei*), CCL (lipasa de *Candida cylindracea*) y CAL (lipasa de *Candida antarctica*), en forma nativa (PPL y CCL) o inmovilizada (LIP y CAL), enzimas cuyas principales características se reseñaron en la Introducción.

2- Estudiar la influencia que posee la estructura de los sustratos sobre dichas acilaciones biocatalizadas.

Para ello, se emplearon hidroxialcanotioles de dos tipos:

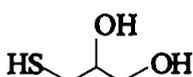
a) bifuncionales: se probó una serie homóloga de cadena lineal ( $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles):



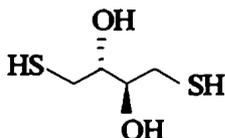
y para  $m = 3$  y  $4$  se ensayó la reactividad de algunos isómeros de posición.

Dentro de la serie homóloga, sólo el 2-mercaptoetanol ( $m = 2$ ) es comercialmente disponible, por lo que los restantes  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles debieron ser preparados en el laboratorio.

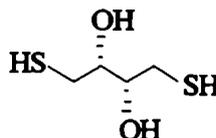
b) polifuncionales: se probaron las siguientes moléculas:



*dl* - 1-tioglicerol



*dl* - ditiotreitol



*dl* - ditioeritritol

3- Investigar la influencia de las condiciones experimentales de reacción sobre el transcurso de estas transesterificaciones.

Con esta finalidad, se variaron condiciones de reacción tales como relación enzima/sustrato, relación agente acilante ( $R_1COOR_2$ ) / sustrato, temperatura, presencia de cosolvente, tipo de agitación, etc, estudiando el efecto de estos parámetros sobre la selectividad, el rendimiento y el tiempo óptimo de la reacción.

4- Obtener mediante dichas acilaciones biocatalizadas compuestos difíciles de preparar selectivamente por métodos químicos tradicionales.

Ya se comentó que en bibliografía no se registran referencias sobre la existencia de numerosos productos de acilación de hidroxialcanotioles, por lo que la eventual selectividad de estas acilaciones constituiría un procedimiento útil para la preparación de moléculas no descritas hasta el presente. Además, debido a que tampoco hay muchos datos espectroscópicos sobre este tipo de compuestos, su caracterización espectroscópica puede ser de interés.

En los capítulos siguientes se detallan y discuten los resultados obtenidos.

## 2. Reseña sobre las lipasas utilizadas en el presente trabajo

A lo largo del presente trabajo se describirá el estudio de reacciones de transesterificación catalizadas por cuatro lipasas. Una proviene de un mamífero: lipasa pancreática porcina (PPL) y las otras tres, de origen microbiano: lipasa de *Mucor miehei* (LIP), *Candida cylindracea* (CCL) y *Candida antarctica* (CAL).

La lipasa pancreática, carboxilesterasa presente en el jugo pancreático de los mamíferos, promueve la conversión intraduodenal de los triglicéridos dietarios a  $\beta$ -monoglicéridos y ácidos grasos libres. De todas las lipasas digestivas, la pancreática es probablemente la más importante y ciertamente la más conocida. Su proporción, que no excede del 1 al 3% del total de las proteínas del jugo pancreático en varias especies, está compensada por el alto valor de actividad molecular de la enzima: una molécula de lipasa pancreática puede romper hasta  $4 \cdot 10^5$  uniones éster por minuto. Se trata de una enzima bastante inespecífica para las posiciones de los triglicéridos, sus sustratos naturales, y que puede atacar numerosos tipos de ésteres, incluyendo monoésteres<sup>14</sup>.

La lipasa pancreática porcina posee un peso molecular de aproximadamente 50.000. La molécula se compone de una cadena única formada por cuatrocientos cuarenta y nueve aminoácidos, entre los cuales hay sólo cuatro metioninas que originan cinco péptidos por ruptura con bromuro de cianógeno. Por degradación de Edman de dichos péptidos, De Caro *et al.*<sup>15</sup> determinaron en 1981 la secuencia completa de los aminoácidos de la lipasa, con lo que la pancreática porcina se constituyó en la primera lipasa cuya estructura primaria fue determinada.

Tanto la lipasa pancreática porcina como la humana son glicoproteínas. Por aislamiento y purificación de la porcina se obtienen dos isolipasas L<sub>A</sub> y L<sub>B</sub> que contienen fucosa, galactosa, manosa y N-acetilglucosamina unida a la proteína mediante una unión glucosamina-asparagina<sup>14</sup>.

Según Sémériva y Desnuelle<sup>14</sup>, el mecanismo de acción de la lipasa pancreática porcina involucra una secuencia de tres etapas: adsorción interfásial, activación interfásial y la catálisis propiamente dicha. La activación interfásial puede resultar de un cambio conformacional de la lipasa como consecuencia de su adsorción en la interfase.

En la etapa catalítica hay participación de una tríada compuesta por serina, un residuo que contiene un carboxilo (ácido aspártico o glutámico) e histidina<sup>14</sup>. Posteriormente se ha encontrado que es posible la participación de un residuo de lisina perteneciente a la región cercana al sitio activo<sup>16</sup>.

La lipasa del hongo *Mucor miehei* es una proteína tipo  $\alpha/\beta$ , ya que posee regiones con hoja  $\beta$  y regiones de  $\alpha$ -hélices. Consta de una única cadena polipeptídica formada por doscientos sesenta y nueve residuos. Su peso molecular es de 29.472 y los aminoácidos que componen la tríada catalítica son Ser 144, His 257 y Asp 203. Dicha tríada no se halla completamente expuesta al solvente, como lo muestra un trabajo basado en la estructura de rayos X de esta lipasa<sup>17</sup>.

Lipozyme<sup>R</sup> es el nombre con que la empresa Novo Nordisk de Dinamarca comercializa una lipasa específica para las posiciones 1 y 3 de los triacilglicéridos, derivada de una cepa seleccionada del hongo. La enzima se encuentra inmovilizada sobre una resina aniónica y usualmente, puede aplicarse en un rango de temperaturas de 40 a 70°<sup>18</sup>.

La lipasa de la levadura *Candida cylindracea* pertenece a la familia de las proteínas  $\alpha/\beta$ . Es una enzima posicionalmente no específica frente a los triglicéridos, compuesta por quinientos treinta y cuatro aminoácidos y con un peso molecular de aproximadamente 60.000. Su tríada catalítica consta de Ser 209, His 449 y Glu 341. Las estructuras cristalinas revelan que la región del sitio activo muestra mayor carácter hidrofóbico que ninguna otra superficie de la molécula expuesta al solvente, con lo que se crea un área amplia para la interacción con la interfase y los sustratos<sup>19</sup>.

De la levadura *Candida antarctica* se han aislado dos diferentes lipasas, A y B. La A es más termoestable, posee un peso molecular de 45.000 y un punto isoeléctrico de 7,5. La B está formada por trescientos diecisiete aminoácidos, tiene un peso molecular de 33273 y un punto isoeléctrico de 6,0; es una proteína globular tipo  $\alpha/\beta$  de dimensiones aproximadas 30Å x 40Å x 50Å. Su secuencia de aminoácidos no muestra homología significativa con respecto a secuencias de otras lipasas ( Figura 1.3 ). Esta lipasa B ha demostrado ser muy estereoespecífica en síntesis orgánica. En los cristales ortorrómbicos de la enzima pudo observarse la presencia de un canal estrecho y profundo que conduce al sitio activo; este último posee la tríada catalítica Ser 105, His 224 y Asp 187. La forma del canal probablemente da cuenta de la estereoespecificidad de la enzima<sup>20</sup>.

La lipasa B de *Candida antarctica* comercial de Novo Nordisk (llamada SP 435) es obtenida mediante tecnología de ADN recombinante. El código genético de la levadura se transfiere de una cepa seleccionada de *Candida antarctica* al organismo huésped, *Aspergillus oryzae*. La enzima resultante (SP 435), posicionalmente inespecífica para sus sustratos naturales, es termoestable y particularmente apta para la síntesis de ésteres<sup>21</sup>.

En la Tabla 1.7 se resumen algunas características de las cuatro lipasas mencionadas.

**TABLA 1.7 - Algunas características de las cuatro lipasas empleadas en este trabajo**

Lipasa	PM aproximado	Tríada catalítica
PPL	50.000	Ser - His - Asp o Glu
LIP	29.500	Ser 144 - His 257 - Asp 203
CCL	60.000	Ser 209 - His 449 - Glu 341
CAL	33.300	Ser 105 - His 224 - Asp 187

met lys leu leu ser leu thr gly val ala gly val leu ala thr cys val ala ala thr  
 -1 1  
 pro leu val lys arg leu pro ser gly ser asp pro ala phe ser gln pro lys ser val  
 21 31  
 leu asp ala gly leu thr cys gln gly ala ser pro ser ser val ser lys pro ile leu  
 41 51  
 leu val pro gly thr gly thr thr gly pro gln ser phe asp ser asn trp ile pro leu  
 61 71  
 ser thr gln leu gly tyr thr pro cys trp ile ser pro pro pro phe met leu asn asp  
 81 91  
 thr gln val asn thr glu tyr met val asn ala ile thr ala leu tyr ala gly ser gly  
 101 111  
 asn asn lys leu pro val leu thr trp ser gln gly gly leu val ala gln trp gly leu  
 121 131  
 thr phe phe pro ser ile arg ser lys val asp arg leu met ala phe ala pro asp tyr  
 141 151  
 lys gly thr val leu ala gly pro leu asp ala leu ala val ser ala pro ser val trp  
 161 171  
 gln gln thr thr gly ser ala leu thr thr ala leu arg asn ala gly gly leu thr gln  
 181 191  
 ile val pro thr thr asn leu tyr ser ala thr asp glu ile val gln pro gln val ser  
 201 211  
 asn ser pro leu asp ser ser tyr leu phe asn gly lys asn val gln ala gln ala val  
 221 231  
 cys gly pro leu phe val ile asp his ala gly ser leu thr ser gln phe ser tyr val  
 241 251  
 val gly arg ser ala leu arg ser thr thr gly gln ala arg ser ala asp tyr gly ile  
 261 271  
 thr asp cys asn pro leu pro ala asn asp leu thr pro glu gln lys val ala ala ala  
 281 291  
 ala leu leu ala pro ala ala ala ala ile val ala gly pro lys gln asn cys glu pro  
 301 311  
 asp leu met pro tyr ala arg pro phe ala val gly lys arg thr cys ser gly ile val  
 thr pro

**FIGURA 1.3** - Secuencia de aminoácidos de la lipasa B de *Candida antarctica*

(CAL B, referencia 20)

**Referencias bibliográficas**

1. S.Patai, *The chemistry of the thiol group*, John Wiley & Sons, Londres, 1974, Partel, Capítulo 1.
2. N.L.Allinger, M.P.Cava, D.C.De Jongh, C.R.Johnson, N.A.Lebel y C.L.Stevens, *Química Orgánica*, Editorial Reverté, Barcelona, 1983, Parte 2, Capítulo 30.
3. T.W.Greene, *Protective groups in organic synthesis*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1981, pág. 194.
4. L.W.C.Miles y L.N.Owen, *J.Chem.Soc.* 817 (1952)
5. G.Renard, J.Grimaud, A.El Zant, M.Pina y J.Graille, *Lipids* 22 , 539 (1987)
6. P.E.Sonnet y G.G.Moore, *ibid.*, 24 , 743 (1989)
7. C.Miller, P.Cuendet y M.Grätzel, *J. Phys. Chem.* 95 , 877 (1991)
8. C.D.Bain, E.B.Troughton, Y.Tao, J.Evall, G.M.Whitesides y R.G.Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.* 111 , 321 (1989)
9. P.E.Laibinis y G.M.Whitesides, *ibid.*, 114 , 1990 (1992)
10. P.L.Robinson, J.W.Kelly y S.A.Evans, *Phosphorus and Sulfur* 31 , 59 (1987)
11. R.A.Sanchez, *Synthesis* 148 (1981)
12. K.Fuji, M.Ueda, K.Sumii y E.Fujita, *Tetrahedron Lett.* 22 , 2005 (1981)
13. K.Fuji, M.Ueda y F.Fujita, *Chem. Commun.* 814 (1977)
14. M.Sémériva y P.Desnuelle, *Adv.Enzymol.Relat.Areas Mol.Biol.* 48 , 319 (1979)
15. J.De Caro, M.Boudouard, J.Bonicel, A.Guidoni, P.Desnuelle y M.Rovery, *Biochim.Biophys.Acta* 671 , 129 (1981)
16. T.N.Kaimal y M.Saroja, *Biochim.Biophys.Acta* 999 , 331 (1989)
17. L.Brady, A.M.Brzozowski, Z.S.Derewenda, E.Dodson, G.Dodson, S.Tolley, J.P.Turkenburg, L.Christiansen, B.Huge-Jensen, L.Norskov, L.Thim y U.Menge, *Nature* 343 ,767 (1990)
18. H.Svanholm, *Enzymatic interesterification and esterification*, presentado en la

AOCS, mayo 1989.

19. P.Grochulski, Y.Li, J.D.Schrag, F.Bouthillier, P.Smith, D.Harrison, B.Rubin y M.Cygler, *J.Biol.Chem.* 268, 12843 (1993)
20. J.Uppenberg, M.Trier Hansen, S.Partkar y T.A.Jones, *Structure* 2, 293 (1994)
21. Especificaciones de Novo Nordisk, sobre lipasa SP 435.



## ***CAPITULO II***

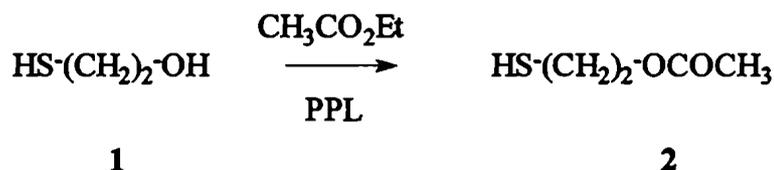


### 1. Estudio de la reacción de 2-mercaptoetanol con acetato de etilo catalizada por lipasa pancreática porcina

La investigación del comportamiento de hidroxialcanotioles frente a reacciones de acilación catalizadas por lipasas comenzó con el estudio de la transesterificación de 2-mercaptoetanol ( 1 , Esquema 2.1 ) con acetato de etilo en presencia de lipasa pancreática porcina (PPL). Al tratarse del primer sistema estudiado, se ensayaron diversas variaciones sobre las condiciones experimentales de la reacción, con la finalidad de optimizarla y determinar qué influencia podían presentar dichas condiciones sobre el curso de la reacción.

En primer lugar, la reacción se llevó a cabo a 25°, empleando una relación acetato de etilo/2-mercaptoetanol (agente acilante/sustrato) igual a 15, una relación enzima/sustrato igual a 1,3 y agitación magnética (para este sistema, condiciones estándar de reacción)<sup>1</sup>.

Los sobrenadantes provenientes de las centrifugaciones de la mezcla de reacción a veinticuatro y cuarenta y ocho horas se analizaron por cromatografía en capa delgada, observándose en ambos casos 2-mercaptoetanol y otra mancha de mayor R<sub>f</sub> que también revelaba con el reactivo de Ellman. Luego de purificar la mezcla de reacción a cuarenta y ocho horas mediante cromatografía flash se aisló un líquido de olor desagradable con 76% de rendimiento, cuyos espectros de masa y de resonancia magnética nuclear protónica y de carbono-13 permitieron identificarlo como acetato de 2-mercaptoetilo ( 2 ) :



**ESQUEMA 2.1**

Cuando la reacción se monitoreó por cromatografía gaseosa, los sobrenadantes provenientes de la centrifugación de alícuotas colectadas a distintos tiempos dieron lugar a

cromatogramas que presentaban siempre el mismo perfil. Se observaban la señal correspondiente al 2-mercaptoetanol y otra de menor tiempo de retención, cuya intensidad aumentaba a medida que transcurría la reacción, que fue asignada al acetato de 2-mercaptoetilo. También se detectó la presencia de ácido acético, explicable por la actividad hidrolítica de la enzima.

En la Figura 2.1 se observa el porcentaje de acetato de 2-mercaptoetilo obtenido en función del tiempo.

En ausencia de enzima no se formó producto aun luego de ocho días de reacción.

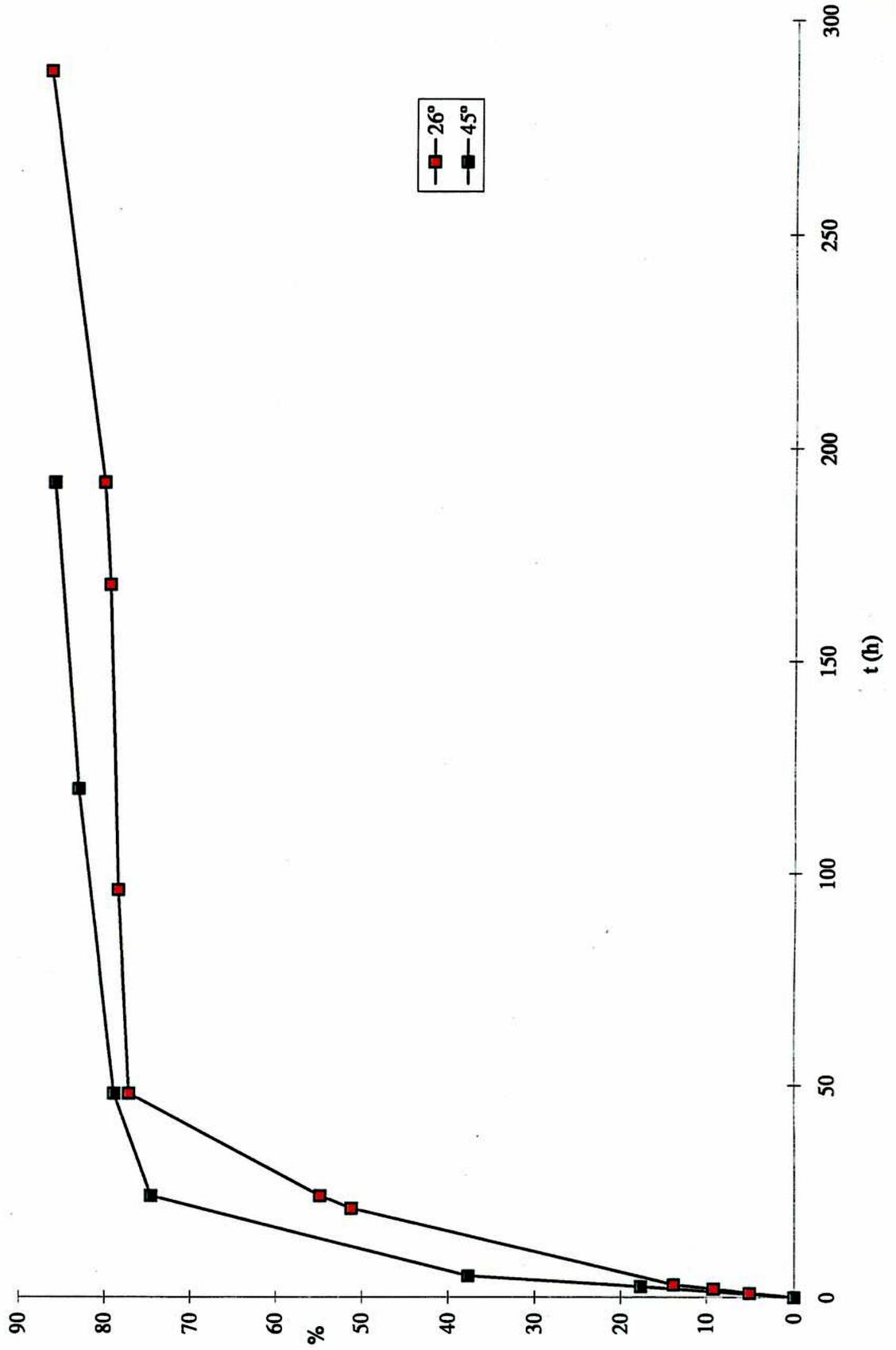
A partir de esta primera reacción, se decidió estudiar la influencia de los siguientes parámetros experimentales:

- temperatura;
- relación agente acilante/sustrato (A/S);
- presencia de cosolvente;
- relación enzima/sustrato (E/S);
- tipo de agitación;
- tratamientos efectuados sobre la lipasa previamente al desarrollo de la reacción

Al efectuar la reacción a 45° pudo comprobarse que, si bien a tiempos cortos la transesterificación ocurrió más rápidamente que a 25°, a tiempos mayores el perfil de la reacción resultó similar al obtenido a menor temperatura ( Figura 2.1 ), manteniéndose el comportamiento quimioespecífico hacia la formación del derivado O-acetilado.

La relación agente acilante/sustrato demostró tener una influencia notable sobre el rendimiento de la reacción, como puede apreciarse en la Tabla 2.1. No obstante, el exceso de acetato de etilo empleado no modificó el curso quimioespecífico de la reacción y en todos

**FIGURA 2.1 - Producción de acetato de 2-mercaptoetilo a 25°  
y a 45° (Esquema 2.1)**



los casos el único producto formado fue el de mono-O-acetilación.

**TABLA 2.1** - Efecto de la relación agente acilante/sustrato (A/S) sobre la reacción de 2-mercaptoetanol con acetato de etilo catalizada por PPL<sup>a</sup> (Esquema 2.1)

A/S	t (h)	% 2 <sup>b</sup>
15	48	77,2
	192	80,2
10	48	59,1
	240	78,5
7,5	24	18,8
	48	39,2
	168	73,2
5	48	37,1
	168	66,0
3	48	36,7
	260	35,9

a- Las reacciones se llevaron a cabo a 25°, empleando una relación enzima/sustrato = 1,3 y mediante agitación magnética.

b- Determinados por cromatografía gaseosa.

En la transformación estudiada, el acetato de etilo cumple una doble función: es el agente acilante del nucleófilo y el solvente de la reacción. La Tabla 2.2 detalla los resultados observados al agregar distintos cosolventes al medio de reacción. La piridina y el acetonitrilo, solventes polares, no resultaron favorables para la actividad enzimática. Sin embargo, el hexano, un solvente poco polar, con  $\log P > 4$  ( página 20 ), aunque no afectó la reacción para una relación acilante/sustrato igual a 5, fue desfavorable cuando la misma se aumentó a 15. Si bien estos hechos indicarían que la influencia del cosolvente aumenta cuando se encuentra en mayor concentración, esto muestra que los solventes típicamente

lipofílicos, considerados con frecuencia adecuados como medio para transesterificaciones catalizadas por lipasas ( página 20 ), no siempre pueden resultar aptos.

De todos modos, los resultados obtenidos con los solventes ensayados no presentan ventajas con respecto a los resultados observados en ausencia de cosolvente.

**TABLA 2.2** - Efecto del cosolvente sobre la reacción de 2-mercaptoetanol con acetato de etilo catalizada por PPL<sup>a</sup> (Esquema 2.1)

A/S	Cosolvente	log P	t (d)	% 2 <sup>b</sup>
15	-----	0,68	2	77,2
	hexano	3,50	2	44,4
			7	61,6
5		0,68	2	37,1
			7	66,0
	hexano	3,50	2	35,3
			7	67,9
	diisopropiléter	0,85	2	51,4
			7	66,9
			2	73,0 <sup>c</sup>
			7	85,3 <sup>c</sup>
	piridina	0,70	2	53,8
			7	49,0
acetonitrilo	-0,33	2	27,1	
		7	49,0	

a- Las reacciones se llevaron a cabo a 25°, empleando una relación enzima/sustrato = 1,3 y agitación magnética.

b- Determinados por cromatografía gaseosa.

c- La reacción se efectuó a 40°.

Se comprobó también que la relación enzima/sustrato influye sobre el rendimiento del producto de transesterificación, como lo muestran la Tabla 2.3 y la Figura 2.2.

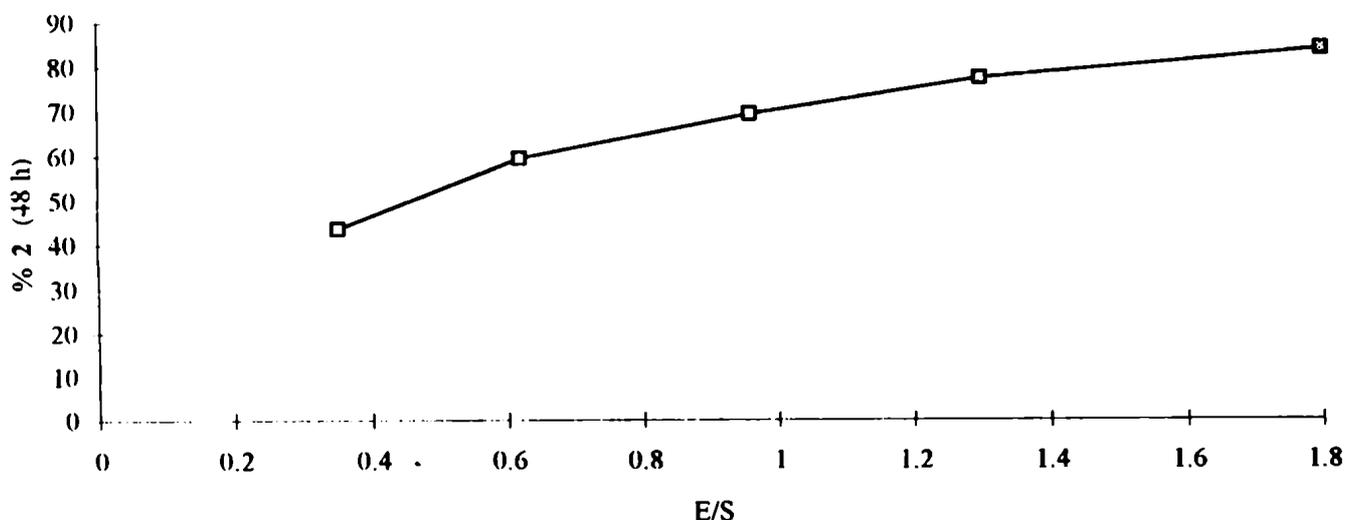
**TABLA 2.3** - Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S) sobre la reacción entre 2-mercaptoetanol y acetato de etilo catalizada por PPL<sup>a</sup> (Esquema 2.1)

t (h)	% 2 para la relación E/S indicada <sup>b</sup>				
	0,35	0,60	1,0	1,3	1,8
2	2,9	5,6	6,9	10,1	17,3
4	6,1	10,2	13,2		
24	19,4	44,1		54,8	77,7
48	43,5	59,3	69,2	77,2	83,6
168	67,1	74,7	76,3	79,6	
192	---	---	79,4	80,2	86,4

a- Condiciones de reacción: 25°, A/S = 15, agitación magnética.

b- Determinados por cromatografía gaseosa.

**FIGURA 2.2** - Influencia de la relación enzima/sustrato (E/S) sobre la transesterificación de 2-mercaptoetanol con acetato de etilo catalizada por PPL (Esquema 2.1)



Desde el punto de vista del rendimiento de la reacción, el empleo de agitación mecánica en lugar de magnética no causó un efecto apreciable:

**TABLA 2.4** - Efecto del tipo de agitación sobre la reacción entre 2-mercaptoetanol con acetato de etilo catalizada por PPL (Esquema 2.1)

t (h)	% 2 <sup>a</sup>	
	Agitación magnética <sup>b</sup>	Agitación mecánica <sup>c</sup>
24	54,8	53,3
48	77,2	78,5
192	80,2	82,7

a- Determinados por cromatografía gaseosa.

b- Condiciones de reacción: 25°, A/S = 15, E/S = 1,3.

c- Condiciones de reacción: 26°, A/S = 15, E/S = 1,3, 180 rpm.

También se llevaron a cabo las reacciones utilizando enzima sometida a algún tratamiento previo (Tabla 2.5). Estos tratamientos no aportaron mejoras con respecto al uso directo de enzima cruda y aun los que alteraron la humedad del biocatalizador no afectaron los resultados obtenidos. De hecho, las transformaciones catalizadas por lipasas en medio orgánico descritas en bibliografía utilizan habitualmente la enzima cruda sin ningún tratamiento previo.

El agregado de tamices moleculares 4Å al medio de reacción tampoco mejoró los resultados: cuando la transesterificación se ensayó bajo condiciones estándar y en presencia de los tamices moleculares, se obtuvo un 69 % de producto sólo luego de siete días de reacción.

**TABLA 2.5** - Efecto de tratamientos previos realizados a la enzima sobre la reacción entre 2-mercaptoetanol y acetato de etilo catalizada por PPL<sup>a</sup> (Esquema 2.1)

Tratamiento	% de humedad de la enzima antes del tratamiento <sup>b</sup>	% de humedad de la enzima luego del tratamiento <sup>b</sup>	% 2 <sup>c</sup>
sin tratamiento		-----	77,2
lavado con acetona y luego secado al vacío <sup>d</sup>	2,23	1,85	72,7
secado al vacío <sup>e</sup>		1,50	78,3
liofilizado		4,66	77,6
sonicado		-----	73,0

a- Condiciones de reacción: 25°, A/S = 15, E/S = 1,3, agitación magnética, t = 48 h.

b- Determinada mediante el método de Karl Fisher.

c- Determinados por cromatografía gaseosa.

d- Según referencia 2 ; ver además Parte Experimental.

e- La lipasa se secó a 4° sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Resulta interesante destacar la buena estabilidad demostrada por la lipasa, que la califica para ser reciclada. Luego de utilizarse durante cuarenta y un días en seis reacciones consecutivas con sustrato y acetato de etilo frescos, sólo se manifestó una pérdida del 18% en el rendimiento del acetato de 2-mercaptoetilo formado ( Tabla 2.6 ).

La temperatura tampoco afectó adversamente la actividad de la enzima, ya que la lipasa recuperada luego de ocho días de reacción a 45° y utilizada para una nueva reacción a 25° originó resultados totalmente concordantes con los obtenidos con enzima fresca.

Es posible apreciar, a la luz de las condiciones experimentales ensayadas, que la acetilación de 2-mercaptoetanol con acetato de etilo catalizada por PPL transcurre manteniendo un comportamiento quimioespecífico hacia el O-acetato. La reacción se lleva a cabo bajo

**TABLA 2.6 - Resultados obtenidos de reacciones consecutivas entre 2-mercaptoetanol y acetato de etilo utilizando enzima reciclada <sup>a</sup>**

Número de reacción consecutiva	% <sup>2 b</sup>
1	79,5
2	69,2
3	68,4
4	73,1
5	76,1
6	62,0

a- Condiciones de reacción: 25°, A/S = 15, E/S = 1,3 ,  
agitación magnética, t = 168 h.

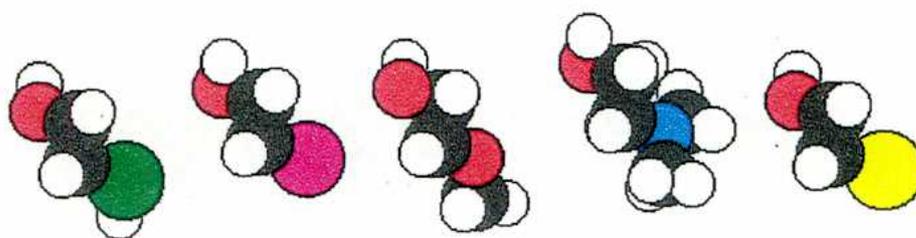
b- Determinados por cromatografía gaseosa.

condiciones suaves y conduce al producto con rendimientos altos sin que la estabilidad de la lipasas se vea afectada adversamente aun luego de períodos de reacción prolongados.

Según Bevinakatti y Banerji<sup>1</sup>, la transesterificación de etanoles  $\beta$ -sustituídos (HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-X) con acetato de etilo catalizada por PPL es afectada por el impedimento estérico causado por el grupo X. Trabajando bajo las condiciones experimentales anteriormente descritas, idénticas a las empleadas en nuestro laboratorio (25°, A/S = 15, E/S = 1,3, 48 horas de reacción), los autores citados obtuvieron los correspondientes productos de transesterificación con 80-90% de rendimiento si X = -Cl, -OCH<sub>3</sub> y -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, mientras que los rendimientos fueron inferiores al 40% para X = -Br, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> y -N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

Los resultados obtenidos con 2-mercaptoetanol se parecen a los provenientes del primer grupo de sustituyentes X. Sin embargo, al determinar las conformaciones moleculares de varios etanoles  $\beta$ -sustituídos mediante minimizaciones de energía a través de cálculos

computacionales utilizando métodos semiempíricos, pudo comprobarse que el efecto estérico no permite interpretar adecuadamente los resultados obtenidos por Bevinakatti y Banerji para cada serie de sustituyentes X. En la Figura 2.3 se puede observar que el efecto de volumen producido por un grupo sulfhidrilo no difiere demasiado del que genera un átomo de bromo y sin embargo, el 2-bromoetanol no dio lugar a rendimientos altos en la transesterificaciones estudiadas.



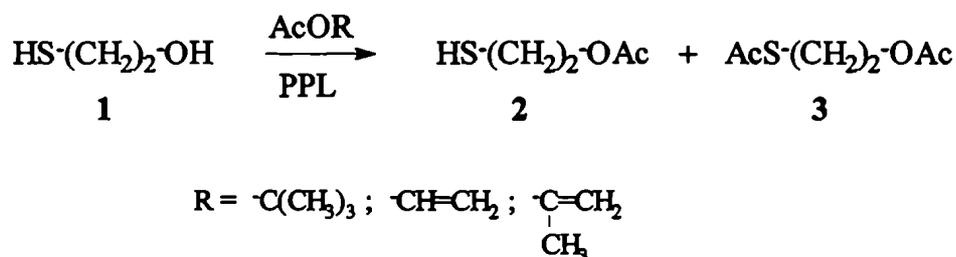
**FIGURA 2.3** - Conformaciones de varios etanoles  $\beta$ -sustituídos obtenidas mediante cálculos semiempíricos para la minimización de la energía molecular. De izquierda a derecha: 2-mercaptoetanol ; 2-cloroetanol ; 2-metoxietanol ; 2-dimetilaminoetanol ; 2-bromoetanol

Utilizando el programa HYPERCHEM Release 3 se determinaron las densidades de carga en el átomo de oxígeno para cada uno de los etanoles  $\beta$ -sustituídos de la Figura 2.3. Los valores obtenidos fueron -0,313 para X = -SH, -OCH<sub>3</sub> y -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y -0,309 para X = -Cl y -Br. Como se puede observar, tampoco pudo encontrarse una correlación satisfactoria para explicar los resultados de Bevinakatti y Banerji. Los dos alcoholes que poseen valores de densidad de carga sobre el átomo de oxígeno que difieren del resto, el 2-bromoetanol y el 2-cloroetanol, presentan distinto comportamiento en estas reacciones de acetilación.

## 2. Reacciones de 2-mercaptoetanol con otros agentes acilantes catalizadas por lipasa pancreática porcina

Habiendo sido analizada la influencia de una serie de parámetros experimentales sobre la reacción descrita por el Esquema 2.1, el estudio se dirigió luego a investigar el efecto de la naturaleza del agente acilante.

Se llevó entonces a cabo la transesterificación utilizando acetatos de resto alcohólico distinto al etilo:



### ESQUEMA 2.2

Los resultados pueden apreciarse en la Tabla 2.7.

Los bajos rendimientos debidos al empleo de acetato de terbutilo ( R = -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> , Esquema 2.2 ) sugieren que el impedimento estérico en la estructura del éster afecta adversamente el proceso biocatalítico.

El acetato de vinilo ( R = -CH=CH<sub>2</sub> , Esquema 2.2 ) y el acetato de isopropenilo ( R = -CH=CH(CH<sub>3</sub>) , Esquema 2.2 ) son dos ésteres activados que actúan como agentes acilantes irreversibles ( página 33 ).

A 25°, con el primero de los enolésteres mencionados se encontró la desaparición completa del 2-mercaptoetanol y la formación del acetato de 2-mercaptoetilo. Sin embargo, ya a tiempos cortos de reacción, se advirtió que la lipasa se oscurecía progresivamente y que la centrifugación de alícuotas de reacción resultaba dificultosa. Estos hechos podrían reflejar

**TABLA 2.7** - Reacción de 2-mercaptoetanol con distintos acetatos en presencia de PPL<sup>a</sup> ( Esquema 2.2 )

R	t (h)	% 2 <sup>b</sup>	% 3 <sup>b</sup>
- C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	48	14,2	----
	168	38,8	----
- CH=CH <sub>2</sub>	24	100,0	----
	48	100,0	----
	24 <sup>c</sup>	79,5	4,6
	48 <sup>c</sup>	72,3	10,0
- CH=CH(CH <sub>3</sub> )	35	18,5	8,4
	72	31,8	----

a- Condiciones de reacción: 25°, 180 rpm, A/S = 15, E/S = 1,3.

b- Determinados por cromatografía gaseosa.

c- La reacción se llevó a cabo a 40°.

que el acetato de vinilo, con su mayor reactividad, afectaba a la enzima<sup>3</sup>, impidiendo su reciclaje. Por otra parte, los cromatogramas gaseosos mostraban cantidades elevadas de ácido acético (superiores al doble de las de acetato de 2-mercaptoetilo) y no es posible descartar que niveles altos de ácido alteren la estabilidad de la lipasa<sup>3</sup>.

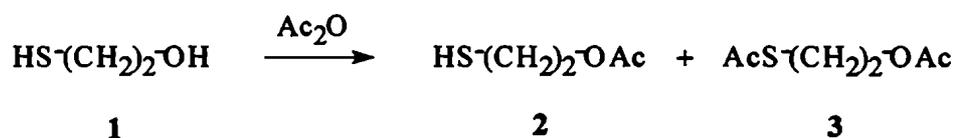
A 40° el comportamiento fue diferente: hubo una disminución muy marcada de la actividad hidrolítica y si bien el producto principal fue nuevamente el O-acetato, los cromatogramas presentaban otra señal. El tiempo de retención de esta señal coincidió con el de una muestra de acetato de 2-tioacetoxietilo, AcS-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OAc ( 3 ), preparada en el laboratorio ( página 66 ). Estos resultados, que muestran pérdida de quimioespecificidad en la reacción estudiada, también se encontraron con acetato de isopropenilo, aunque en este último caso el grado de conversión de 2-mercaptoetanol fue muy pobre.

Como en varias ocasiones la bibliografía registra el uso de anhídridos como agentes acilantes irreversibles en reacciones biocatalizadas ( página 33 ), se probó también el empleo de anhídrido acético.

Para que las conclusiones tengan validez cuando se ensaya el uso de un anhídrido en una esterificación biocatalizada, debe verificarse primero si hay reacción espontánea en ausencia de enzima. La reacción entre 2-mercaptoetanol y un equivalente de anhídrido acético había sido descrita por Miles y Owen<sup>4</sup> en 1952. Mediante esta reacción, los autores informaron la obtención del O-acetato con 71% de rendimiento.

Por lo tanto, en primer lugar se trató 2-mercaptoetanol con un equivalente de anhídrido acético a 25° y luego, la reacción se repitió en presencia de PPL. Ambas reacciones se comparan en la Tabla 2.8.

**TABLA 2.8 - Reacción de 2-mercaptoetanol con anhídrido acético (Esquema 2.3)**



**ESQUEMA 2.3**

t (h)	% 2 <sup>a</sup>		% 3 <sup>a</sup>		% 1 <sup>a</sup>	
	sin PPL	con PPL <sup>b</sup>	sin PPL	con PPL	sin PPL	con PPL
2	43,3	30,1	2,1	5,6	54,6	64,3
24	80,8	42,8	6,4	27,9	12,8	29,3
48	78,5	43,9	6,2	23,4	15,3	32,7

a - Determinados por cromatografía gaseosa.

b - La reacción se llevó a cabo con agitación magnética y empleando E/S = 1,3.

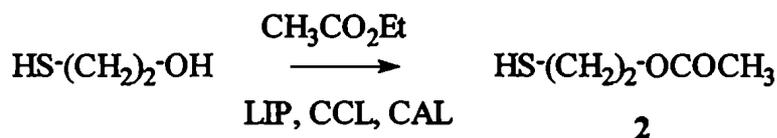
En ausencia de lipasa, la reacción no fue quimioespecífica sino quimioselectiva: a todos los tiempos de reacción se detectó la presencia del producto de diacetilación, cuya existencia no fue informada por Miles y Owen.

Es notable que esta quimioselectividad haya sido pobre cuando la reacción se llevó a cabo con PPL. A lo largo de esta reacción, las alícuotas se centrifugaron con dificultad. Además, el hecho de que aun a siete días de reacción haya quedado una cantidad apreciable de 2-mercaptoetanol sin reaccionar, indicaría que parte del anhídrido reaccionó con la lipasa. Se sabe que la acetilación de PPL con anhídrido acético afecta los grupos aminos de la enzima<sup>5</sup> y consiguientemente, su actividad<sup>6</sup>.

Después de agitar una mezcla de PPL y anhídrido acético a 25° durante siete días, la lipasa se filtró, se lavó y se usó para catalizar la transesterificación entre 2-mercaptoetanol y acetato de etilo en condiciones estándar. Aun luego de siete días se recuperó la mezcla inicial de reacción, notándose que la centrifugación de las alícuotas a diversos tiempos se tornaba dificultosa. Estos hechos sugieren que el anhídrido provoca una fuerte inactivación de la lipasa; si se toma también en cuenta la baja selectividad con que transcurre la reacción, el uso del anhídrido acético para esta acetilación no resulta ser conveniente.

### **3. Extensión del estudio de la reacción biocatalizada de 2-mercaptoetanol con acetato de etilo empleando Lipozyme<sup>R</sup>, lipasa de *Candida cylindracea* y lipasa de *Candida antarctica***

Se extendió el estudio de la reacción mencionada a la catálisis con LIP ( Tabla 2.9 ), CCL ( Tabla 2.10 ) y CAL ( Tabla 2.11 ). En todos los casos se obtuvo quimioespecíficamente el derivado O-acetilado:



#### ESQUEMA 2.4

En estos resultados, se destaca notablemente la eficiencia demostrada por CAL, que cataliza la conversión cuantitativa de 2-mercaptoetanol en su O-acetato y en un tiempo de reacción muy corto. El agregado al sistema de reacción de los cosolventes ensayados resultó desfavorable.

De las cuatro lipasas descritas, CCL presentó el menor poder catalítico bajo las condiciones probadas. Para esta lipasa, la temperatura, el secado de la enzima y la agitación magnética no aportaron beneficios.

Por otra parte, con LIP se observó la mayor actividad hidrolítica de las cuatro enzimas ensayadas.

**TABLA 2.9** - Reacción de 2-mercaptoetanol con acetato de etilo en presencia de LIP<sup>a</sup> ( Esquema 2.4 )

T (°)	Agitación	t (h)	% 2 <sup>b</sup>
25	180 rpm	48	74,8
55	magnética	48	74,5
50	200 rpm	2	40,2
		48	73,1

a- Las reacciones se llevaron a cabo con una A/S = 15, una E/S = 1,3 y empleando lipasa sin tratamiento previo.

b- Determinados por cromatografía gaseosa.

**TABLA 2.10** - Reacción de 2-mercaptoetanol con acetato de etilo catalizada por CCL<sup>a</sup> ( Esquema 2.4 )

T (°)	E/S	Agitación	t (h)	% 2 <sup>b</sup>
25	1,3 <sup>c</sup>	magnética	48	16,1
			144	39,6
45	1,3 <sup>c</sup>	magnética	48	12,6
			120	11,8
25	1,3 <sup>d</sup>	magnética	48	23,3
			240	50,6
25	0,65 <sup>d</sup>	magnética	48	3,2
			240	40,0
25	2,6 <sup>d</sup>	magnética	48	11,8
			120	30,5
25	3,9 <sup>d</sup>	magnética	48	33,3
			168	62,3
26	1,3 <sup>d</sup>	180 rpm	48	20,3
			192	65,3
31	5,7 <sup>d</sup>	180 rpm	42	67,7
			192	80,6

a- Las reacciones se llevaron a cabo empleando una A/S = 15.

b- Determinados por cromatografía gaseosa.

c- La enzima se secó sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a 4° previamente a la reacción.

d- Se utilizó enzima sin tratamiento previo.

**TABLA 2.11 - Reacción de 2-mercaptoetanol con acetato de etilo en presencia de CAL<sup>a</sup> ( Esquema 2.4 )**

Solvente	log P	A/S	E/S	t (h)	% 2 <sup>b</sup>
----		15	1,3	1	100,0
----		15	3,8	1	100,0
				6	100,0
----		5	1,3	2	67,4
hexano	3,50	5	3,9	2,5	61,5
diisopropiléter	0,85	5	3,9	6	42,4
acetonitrilo	-0,33	5	3,9	1	49,2
dioxano	- 1,10	5	3,9	1	47,6

a- Las reacciones se llevaron a cabo a 33° utilizando enzima sin tratamiento previo.

b- Determinados por cromatografía gaseosa.

Dos enzimas que también fueron ensayadas, la lipasa de *Pseudomonas species* y la de *Chromobacterium viscosum* no dieron resultados satisfactorios. Con la primera, operando en condiciones que fueron óptimas para las otras lipasas, sólo se detectó 0,1% del derivado O-acetilado tras siete días de reacción. En el caso de la segunda, luego de cinco días de reacción se formó el quimioisómero habitual, pero en un 8,4%.

#### **4. Alcohólisis de acetato de 2-tioacetoxietilo en presencia de n-butanol y n-octanol catalizada por lipasas**

Como complemento de la acetilación biocatalizada de 2-mercaptoetanol anteriormente descrita, se estudió el comportamiento de acetato de 2-tioacetoxietilo, AcS-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OAc

( 3 ), en reacciones de alcoholisis biocatalizadas, para lo cual primeramente se procedió a la preparación de dicho diéster.

En 1946 se publicó la obtención de 3 mediante reacción de 2-mercaptoetanol con cloruro de acetilo en benceno durante una hora a reflujo<sup>7</sup>. Sin referir el número de equivalentes de cloruro de ácido empleados, el autor informó la preparación del producto deseado con un rendimiento casi igual al teórico.

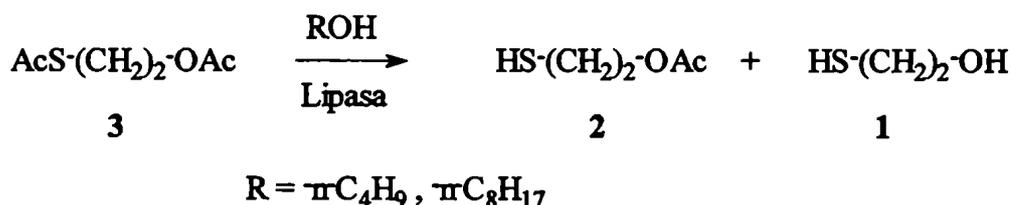
Cuando en nuestro laboratorio se reprodujo la técnica anterior, utilizando 2,5 equivalentes de cloruro de acetilo, el análisis por cromatografía gaseosa de la mezcla de reacción luego de una hora de reflujo indicó la presencia de 3,3% de hidroxialcanotiol sin reaccionar, 65,5% del diéster buscado y 31,2% de acetato de 2-mercaptoetilo.

Se repitió la reacción aumentando el tiempo de reflujo a cinco horas. En este caso, el cromatograma gaseoso presentó 98,0% de diéster y 2,0% del O-acetato.

En ambos casos ensayados, las mezclas finales de reacción presentaban una coloración rosada intensa. La purificación por cromatografía en columna de silicagel condujo a la obtención de acetato de 2-tioacetoxietilo ( 3 ) con un 82% de rendimiento como un líquido incoloro que fue caracterizado espectroscópicamente.

Se probó además la acetilación empleando 2,5 equivalentes de anhídrido acético en piridina durante diecinueve horas a temperatura ambiente. Luego de eliminar el exceso de agente acilante, se obtuvo el producto buscado con un 92% de rendimiento, puro por cromatografía gaseosa.

Al investigar las reacciones de transesterificación de acetato de 2-tioacetoxietilo con n-butanol y con n-octanol catalizadas por lipasas:



### ESQUEMA 2.5

se obtuvieron resultados que mostraron una fuerte dependencia con el tipo de lipasa empleada. En ausencia de lipasa no ocurrió reacción.

Al probar la alcoholisis en presencia de LIP y de CCL se recuperó, en ambos casos y con ambos alcoholes, la mezcla de partida aun después de tres días de reacción.

Para el caso de PPL, la alcoholisis se probó con n-octanol. Cuando la reacción alcanzó el máximo de conversión (a las cuarenta y ocho horas), se encontró diéster sin reaccionar y acetato de 2-mercaptoetilo ( **2** ), en un 50,4% de la mezcla en el caso de utilizar un equivalente del alcohol y en un 66,2% empleando dos equivalentes.

Los sistemas de reacción catalizados por CAL fueron muy reactivos y dieron lugar a comportamientos de interés, como puede observarse en la Tabla 2.12 y en las Figuras 2.4 y 2.5.

De los resultados obtenidos pueden extraerse varias conclusiones. Con un equivalente de alcohol ( Tabla 2.12 ) se observó la conversión del diéster al O-acetato para ambos alcoholes, sin producción de 2-mercaptoetanol. Si bien con el n-octanol la reacción transcurrió cuantitativamente y con mayor rapidez, cualitativamente el comportamiento fue el mismo en ambos casos.

Empleando dos equivalentes de nucleófilo, cada alcohol se comportó de manera diferente.

Para el caso del n-octanol ( Figura 2.4 ) se aprecia que en primer lugar se produce el O-acetato ( **2** ) a expensas del diéster, que desaparece muy rápidamente. Una vez consumido el diéster, comienza a reaccionar el O-acetato ( **2** ) hasta dar lugar a una mezcla que contiene

**TABLA 2.12** - Alcohólisis de acetato de 2-tioacetoxietilo (3) con un equivalente de alcohol en presencia de CAL<sup>a</sup> ( Esquema 2.5 )

Alcohol	t (h)	% 1 <sup>b</sup>
n-butanol	0,4	77,9
	1,1	97,7
	48,0	97,8
n-octanol	0,4	85,4
	1,0	100,0
	41,0	100,0

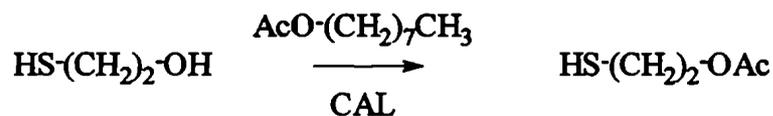
a- Las reacciones se llevaron a cabo en n-hexano, a 30°, a 200 rpm y empleando una relación diéster/alcohol = 1,6.

b- Determinados por cromatografía gaseosa

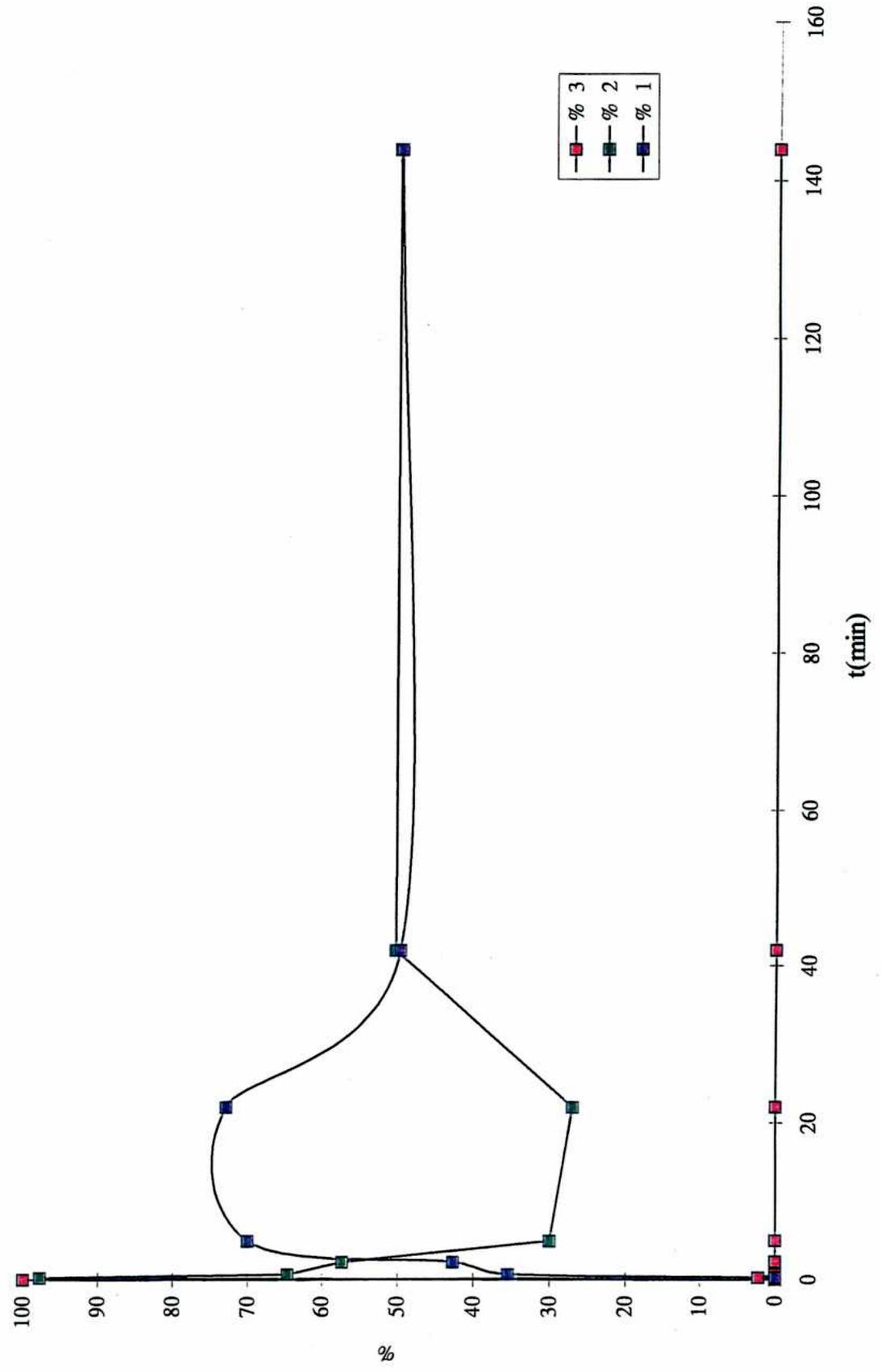
cantidades aproximadamente iguales del mismo y de 2-mercaptoetanol.

Con n-butanol ( Figura 2.5 ) se observa, ya desde tiempos de reacción muy cortos y hasta en presencia de cantidades apreciables del diéster, al 2-mercaptoetanol además de su derivado O-acetilado ( 2 ). No obstante, a tiempos de reacción elevados se obtiene una mezcla de O-acetato y 2-mercaptoetanol de composición bastante similar a la de la mezcla final de reacción con n-octanol.

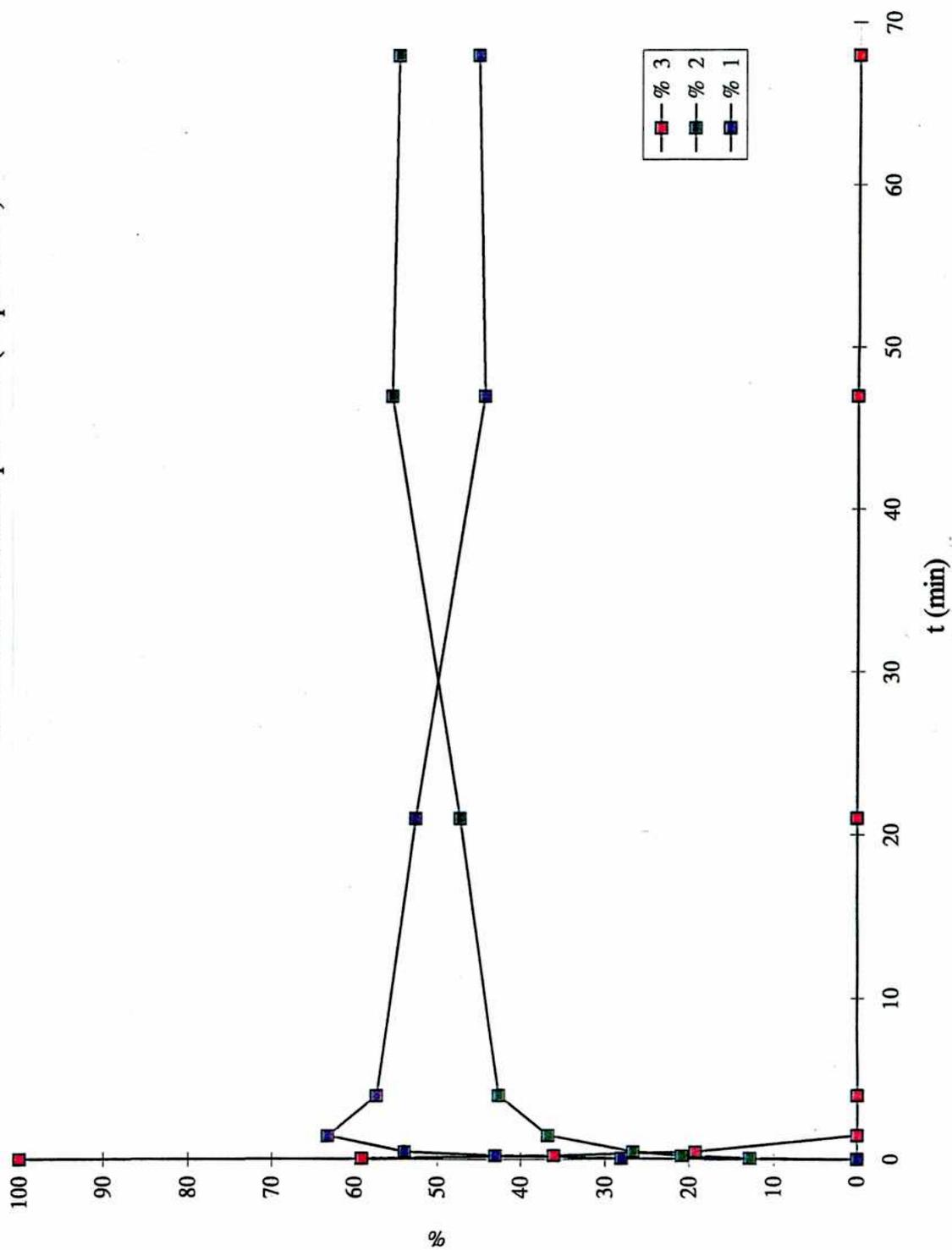
Las reacciones con dos equivalentes de ambos alcoholes presentan otra coincidencia notable: la curva de 2-mercaptoetanol en función del tiempo pasa por un máximo y luego decrece hasta hacerse aproximadamente constante. Estos datos sugieren que a partir de un cierto tiempo comienza a producirse la reacción inversa de la desacetilación del O-acetato:



**FIGURA 2.4** - Alcohólisis de acetato de 2-tioacetoxietilo con 2 equivalentes de n-octanol catalizada por CAL (Esquema 2.5)



**FIGURA 2.5** - Alcohólisis de acetato de 2-tioacetoxietilo con 2 equivalentes de n-butanol catalizada por CAL (Esquema 2.5)



por lo que en las reacciones estudiadas con exceso de ambos alcoholes, en principio ocurre desacetilación y luego, acetilación, hasta llegar a un equilibrio.

Durante todas las reacciones de alcoholisis de 2-mercaptoetanol y de acetato de 2-tioacetoxietilo descritas, nunca fue detectada la presencia de acetato de 2-hidroxietilo,  $\text{H}_3\text{COS}-(\text{CH}_2)_2\text{-OH}$ . Aunque en 1941 se describió su preparación a partir de óxido de etileno y ácido tiolacético<sup>8</sup>, este compuesto es inestable y se reordena a su quimioisómero, el acetato de 2-mercaptoetilo ( 2 ), tanto en medio básico<sup>9,10</sup> y ácido<sup>9</sup>, como en medio neutro mediante calentamiento<sup>8</sup>.

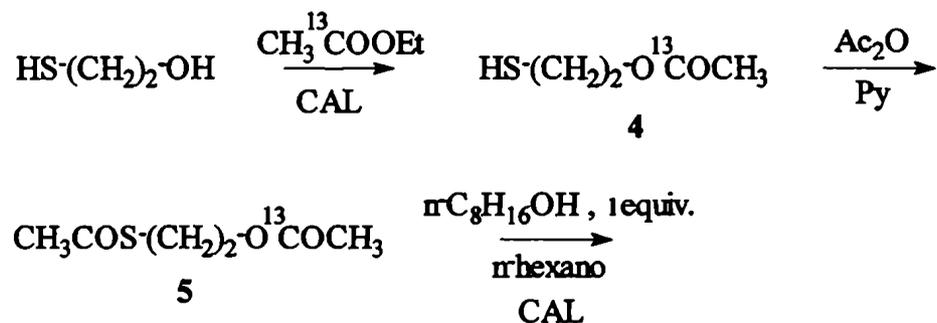
Al realizar espectros de resonancia magnética nuclear protónica de filtrados de la mezcla de reacción de 2-mercaptoetanol con acetato de etilo catalizada por PPL ( página 49 ), obtenidos a distintos tiempos, y tiempos muy cortos, nunca se encontraron señales correspondientes a acetato de 2-hidroxietilo. Estos resultados implican que aun utilizando un método suave y directo de análisis de la mezcla (que evita procedimientos separativos, cuyas condiciones podrían llegar a favorecer la isomerización, tales como cromatografía en columna, cromatografía gaseosa) no se detectó la existencia del derivado S-acetilado. Si durante el transcurso de las transformaciones biocatalizadas estudiadas dicho compuesto se formara, su isomerización debería ser tan rápida como para que no fuera posible detectar su existencia con las condiciones de análisis empleadas.

Más recientemente, se informó la preparación de productos de S-acilación de 2-mercaptoetanol a través de la reacción de dicho hidroxialcanotiol con ácidos grasos (palmítico, esteárico) y dicitclohexilcarbodiimida<sup>11</sup>. Cuando en nuestro caso se intentó reproducir la técnica descrita, pero empleando ácido acético, se obtuvo un líquido cuyo espectro de resonancia magnética protónica no presentó ninguna señal correspondiente al S-acetato. En efecto, el cromatograma gaseoso de dicho líquido mostró una mezcla de O-acetato y de diéster.

Para las reacciones de alcoholisis de acetato de 2-tioacetoxietilo con n-octanol catalizadas por CAL, cabe preguntarse qué desacetilación cataliza la lipasa en primer lugar: si la del

tioacetilo, la del O-acetilo, o una combinación de ambas posibilidades.

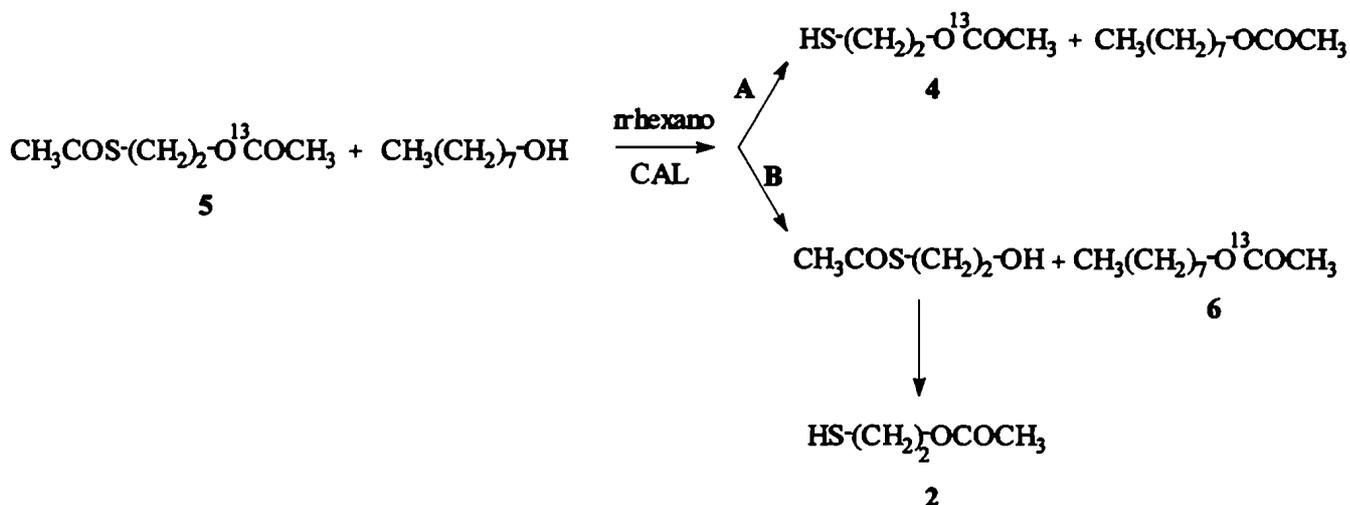
Para intentar obtener alguna información sobre cuál de las tres posibilidades expuestas es la que tiene lugar, se decidió llevar a cabo la siguiente secuencia:



### ESQUEMA 2.6

Según el Esquema 2.6, primero se hizo reaccionar 2-mercaptoetanol con acetato de etilo-1- $^{13}\text{C}$  mediante catálisis de CAL, bajo las condiciones expuestas en la Tabla 2.11 (en ausencia de cosolvente). El O-acetato **4** producido se acetiló con anhídrido acético en piridina para obtener el diéster **5**.

Si en la transesterificación de **5** con un equivalente de n-octanol catalizada por CAL la desacetilación que ocurre es la del S-acetato, finalizada la reacción, el compuesto enriquecido con  $^{13}\text{C}$  será **4**. Por su parte, si la lipasa cataliza la desacetilación del O-acetato, el S-acetato así formado se isomerizaría al O-acetato siempre observado, siendo ahora **6** el compuesto enriquecido en  $^{13}\text{C}$ :



ESQUEMA 2.7

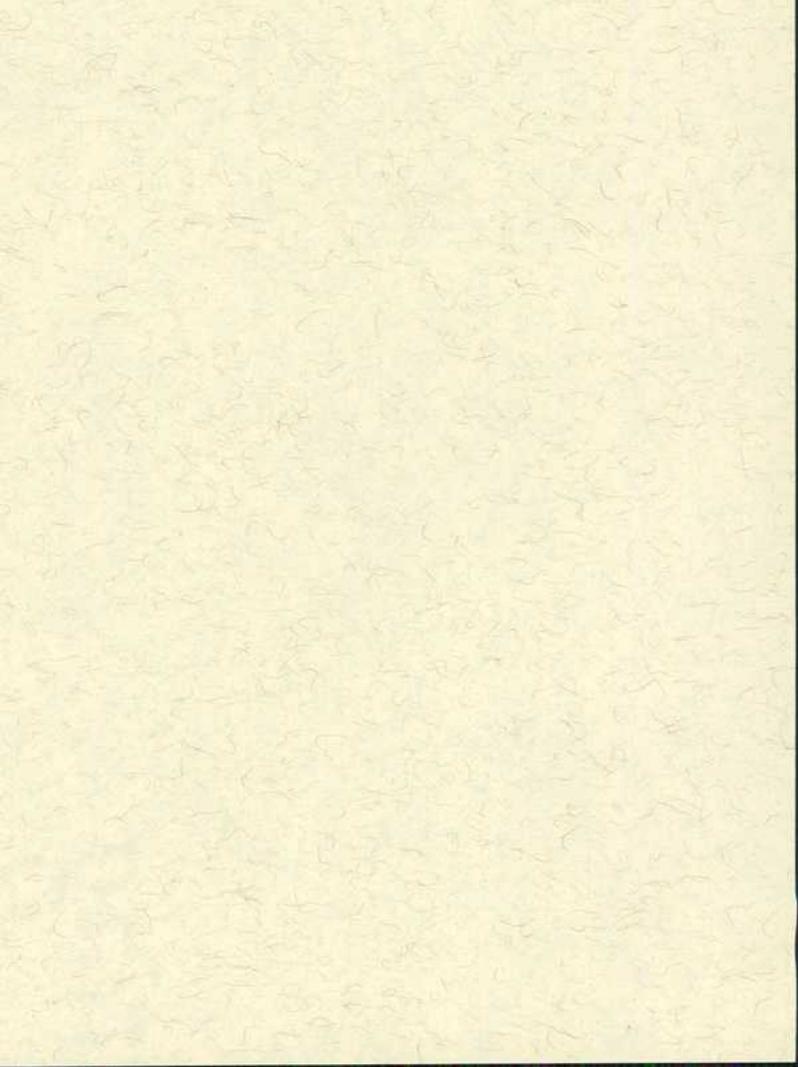
Experimentalmente, al efectuar la transesterificación biocatalizada del compuesto **5**, a los diez minutos de reacción se obtuvo un cromatograma gaseoso que presentó 24,3% de diéster sin reaccionar y una mezcla de O-acetato y de acetato de n-octilo. Estudiando esta mezcla por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa, pudo observarse que en el espectro de masa del O-acetato el pico base correspondía al ion con  $m/z = 44$ , y que la relación de intensidad de dicho ion con respecto a la del ion con  $m/z = 43$  era igual a 4,2. Considerando que el espectro de masa de **2** presenta el pico base a  $m/z = 43$ , y que la relación de intensidad anteriormente nombrada es igual a 0,09, podría postularse que el proceso de desacetilación investigado procede principalmente a través del camino dado por A en el Esquema 2.7, siendo **4** el mono-O-acetato detectado.

De este modo, el curso de la desacetilación biocatalizada coincide con el que se esperaría desde el punto de vista químico, teniendo en cuenta que un grupo tioéster es más inestable que un grupo éster y por lo tanto, más lábil<sup>12,13</sup>.

**Referencias bibliográficas**

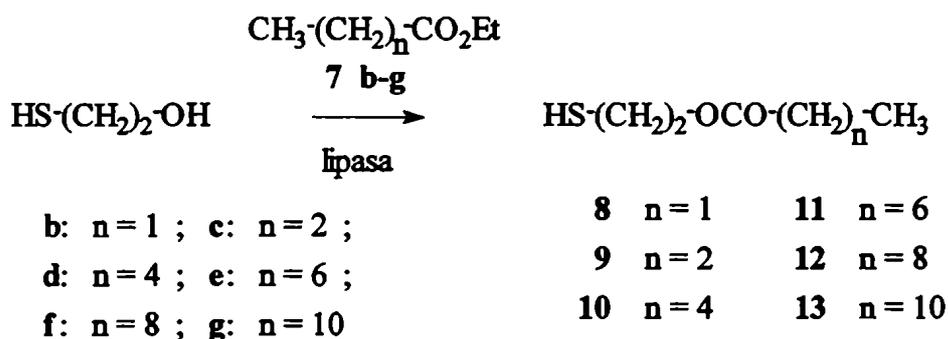
1. H.S.Bevinakatti y A.A.Banerji, *Biotechnol. Lett.* 10, 397 (1988)
2. T.M.Stokes y A.C.Oehlschlager, *Tetrahedron Lett.* 28, 2091 (1987)
3. K.Faber y S.Riva, *Synthesis* 895 (1992)
4. L.W.C.Miles y L.N.Owen, *J.Chem.Soc.* 817 (1952)
5. H.Fraenkel-Conrat, *Methods Enzymol.* 4, 247 (1957)
6. T.N.B.Kaimal y M.Saroja, *Biochim.Biophys.Acta* 999, 331 (1989)
7. R.C.G.Moggridge, *J.Chem.Soc.* 1105 (1946)
8. P.Nylen y A.Olsen, *Svensk.Kem.Tid.* 53, 274 (1941); *Chem.Abst.* 36, 753 (1942)
9. J.S.Harding y L.N.Owen, *J.Chem.Soc.* 1528 (1954)
10. R.B.Martin y R.I.Hedrick, *J.Am.Chem.Soc.* 84, 106 (1962)
11. P.E.Sonnet y G.G.Moore, *Lipids*, 24, 743 (1989)
12. K.Ogino y H.Fujihara, *Organic sulfur chemistry : biochemical aspects*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992, página 72.
13. T.W.Greene, *Protective groups in organic chemistry*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1981, página 195.

***CAPITULO III***



## 1. Acilación de 2-mercaptoetanol mediante transesterificaciones catalizadas por lipasas

En el capítulo anterior se describió la acetilación biocatalizada de 2-mercaptoetanol, observándose que la misma transcurría sistemáticamente con un comportamiento quimioespecífico. Resulta importante entonces poder extender la reacción de acilación por medio de estas transesterificaciones, más aún considerando que las referencias existentes en literatura sobre la preparación de productos acilados de 2-mercaptoetanol son muy escasas. Con esta finalidad, se estudió la transesterificación de dicho hidroxialcanotiol con una serie homóloga de ésteres etílicos:



### ESQUEMA 3.1

Todas las reacciones descritas en el Esquema 3.1 ocurrieron en forma quimioespecífica, ya que en cada caso el único producto encontrado fue el compuesto de O-acilación. Este comportamiento se observó en presencia de las tres enzimas ensayadas: PPL, LIP y CCL, bajo todas las condiciones experimentales probadas y hasta a tiempos cortos de reacción. Los resultados obtenidos se detallan en las Tablas 3.1 a 3.3, donde los tiempos de reacción informados corresponden al mayor grado de conversión observado.

**TABLA 3.1 - Acilación de 2-mercaptoetanol catalizada por PPL (Esquema 3.1)**

Agente acilante	t (d)	Producto	% Producto <sup>a</sup>	Observaciones <sup>b</sup>
7b	7	8	86,5	
7c	7	9	88,1	
7d	7	10	89,9	
	7		87,3	A/S = 5
7e	18	11	40,1	A/S = 1,5 , diisopropiléter
	7		84,4	A/S = 3
	7		86,0	
7f	15	12	72,1	
7g	22	13	57,4	
	7		88,7	Se agregaron al sistema de reacción tamices moleculares 4Å

a- Determinados por cromatografía gaseosa.

b- Las reacciones se efectuaron a 25°, tanto mediante agitación magnética como mecánica (200 rpm), con lipasa previamente secada sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en vacío a 4°. Se emplearon relaciones E/S = 1,3 y A/S = 15 salvo cuando se indica lo contrario.

**TABLA 3.2 - Acilación de 2-mercaptoetanol catalizada por LIP<sup>a</sup> (Esquema 3.1.)**

Agente acilante	t (h)	T (°)	Producto	% Producto <sup>b</sup>
7b	120	32	8	74,2
7c	48	31	9	84,4
	5	31		95,9 <sup>c</sup>
7d	2	32	10	91,9
7e	24	32	11	95,5 <sup>c</sup>
	196	31		72,4
7f	24	32	12	89,6

a- Las reacciones se llevaron a cabo a 150 rpm, empleando relaciones E/S = 1,3 y A/S = 5 salvo indicado lo contrario.

b- Determinados por cromatografía gaseosa. c- A/S = 15

TABLA 3.3 - Acilación de 2-mercaptoetanol catalizada por CCL<sup>a</sup> ( Esquema 3.1 )

Agente acilante	t (d)	T (°)	Producto	% Producto <sup>b</sup>
<b>7b</b>	1	32	<b>8</b>	86,3
<b>7c</b>	2	32	<b>9</b>	95,7 <sup>c</sup>
	2	31		82,0
<b>7d</b>	2	32	<b>10</b>	80,9
<b>7e</b>	8	31	<b>11</b>	64,2
<b>7f</b>	1	32	<b>12</b>	87,8

a- Las reacciones se efectuaron a 150 rpm empleando relaciones E/S = 3,9 y A/S = 5 salvo indicado lo contrario.

b- Determinados por cromatografía gaseosa. c- A/S = 15

Con dodecanoato de etilo ( **7g** , Esquema 3.1 ) sólo se verificó reacción con PPL, mientras que con tetradecanoato de etilo ( **7h** , n = 12 ) no hubo reacción con ninguna de las lipasas, si bien con ambos ésteres las reacciones también se probaron a 60° durante diez días y empleando una relación A/S igual a 15. Estos hechos estarían indicando que para el grupo acilo existe una longitud máxima de cadena a partir de la cual las lipasas dejan de catalizar la reacción.

De los datos presentados en las tablas precedentes surge que no existe una diferencia muy pronunciada entre las tres lipasas ensayadas en cuanto al rendimiento en producto que permiten alcanzar. No obstante, puede advertirse que para la mayoría de los ésteres etílicos probados, LIP fue el catalizador más eficiente ( Figura 3.1 ).

Un aspecto en el que se observa un comportamiento diferente según la lipasa utilizada es en la velocidad de transesterificación. En este sentido, LIP y CCL se comportaron más

FIGURA 3.1 - Producción de ésteres de 2-mercaptoetilo (Esquema 3.1)

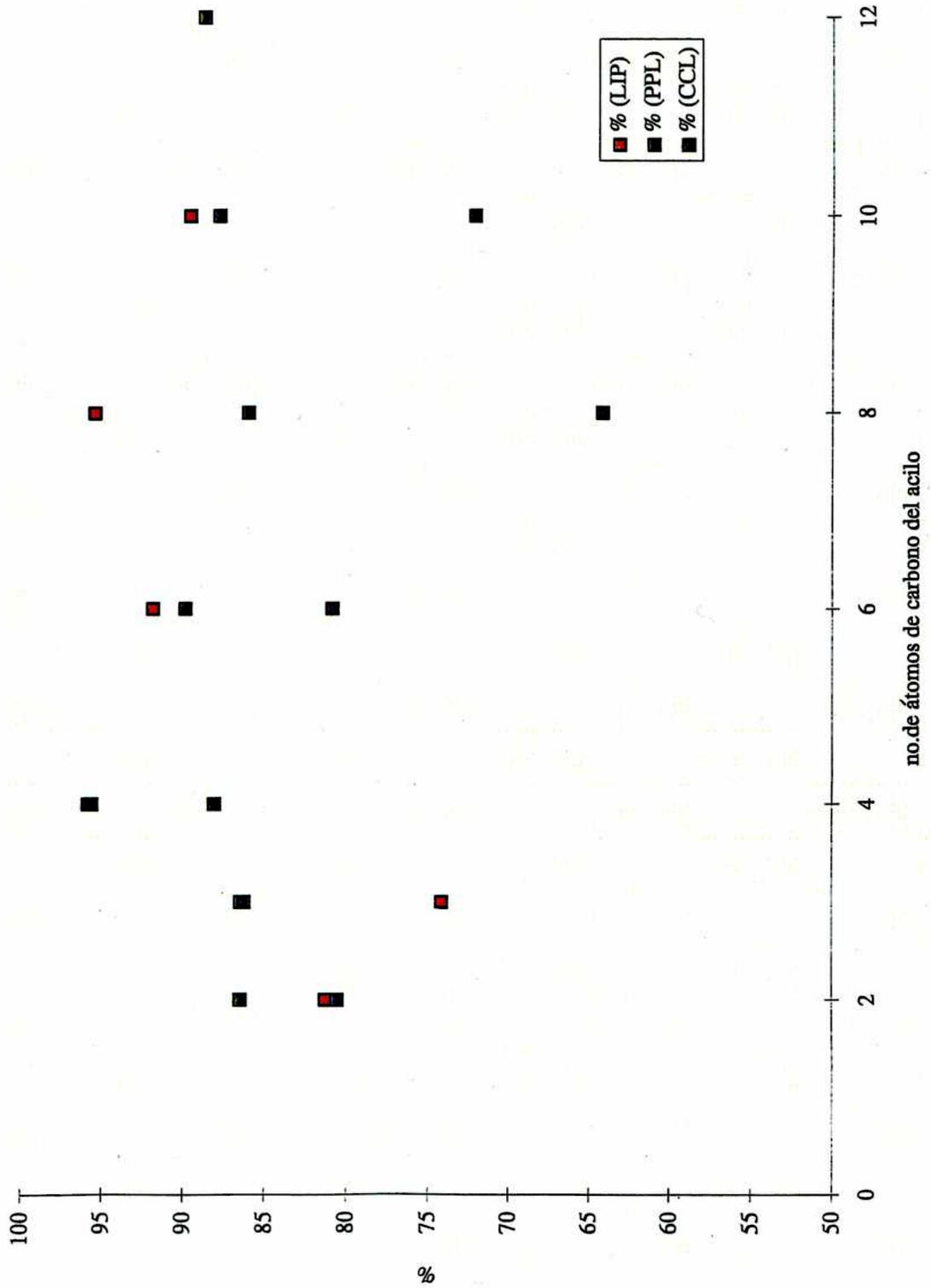
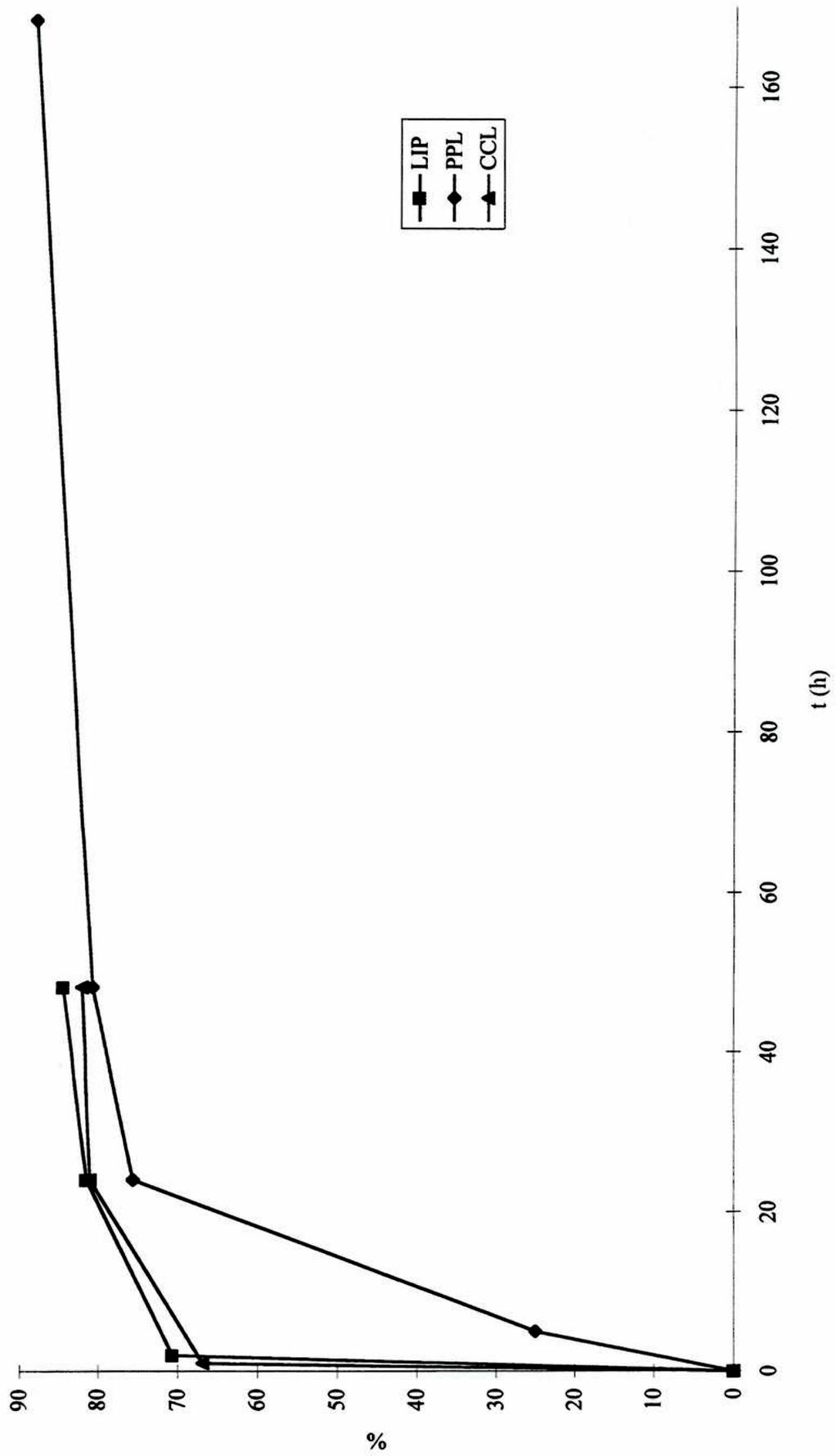


FIGURA 3.2 - Producción de butirato de 2-mercaptoetilo ( 9 ) en función del tiempo (Esquema 3.1)



eficientemente que PPL; en la Figura 3.2 la reacción con butirato de etilo ilustra cómo los tiempos de reacción son mucho menores en presencia de LIP y CCL que de PPL.

También es notable cómo al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada del agente acilante CCL aumenta su poder catalítico y opera en menor tiempo de reacción (Figura 3.3), aun utilizando una relación E/S menor que la óptima para la transesterificación con acetato de etilo (Tabla 2.1, Capítulo II).

Como en la obtención de acetato de 2-mercaptoetilo mediante catálisis con LIP se encontró que la reacción se encontraba favorecida a 55°, se decidió estudiar el efecto de la temperatura sobre las reacciones catalizadas por dicha lipasa, descritas en el Esquema 3.1.

**TABLA 3.4 - Efecto de la temperatura sobre la acilación de 2-mercaptoetanol catalizada por LIP<sup>a</sup> (Esquema 3.1)**

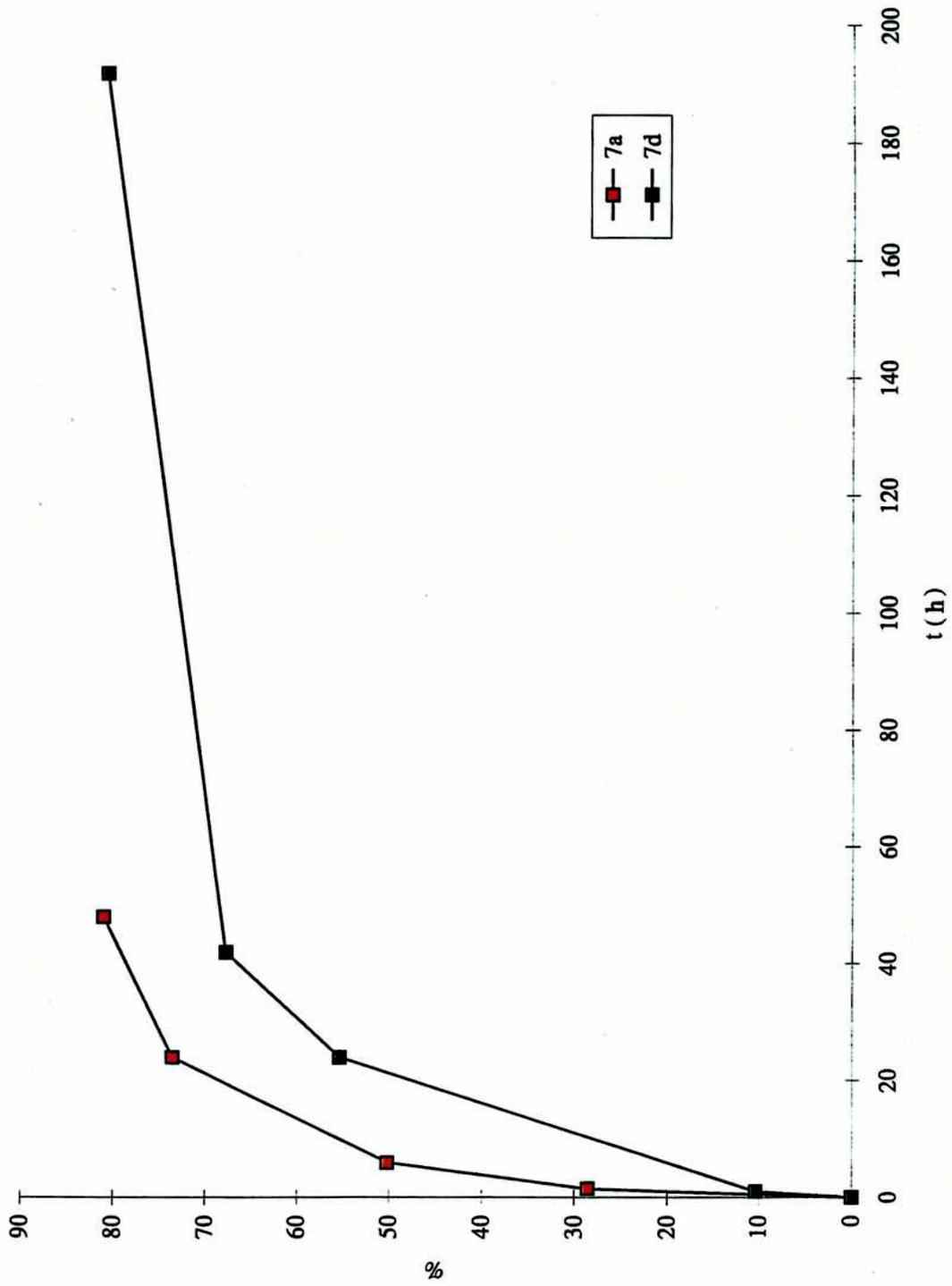
Agente acilante	Producto	% Producto <sup>b</sup>	
		32°	50°
7b	8	71,9	80,1
7c	9	81,5	81,7
7d	10	91,0	81,6
7e	11	95,5	70,5
7f	12	89,6	71,4

a- Las reacciones se llevaron a cabo a 150 rpm durante 24 horas, empleando relaciones E/S = 1,3 y A/S = 5.

b- Determinados por cromatografía gaseosa.

Puede concluirse que un aumento de temperatura no es favorable para estos sistemas de reacción, y en el caso de los ésteres de mayor longitud de cadena se verifica una disminución del rendimiento de la transesterificación.

FIGURA 3.3 - Efecto de la longitud del acilo sobre el comportamiento de CCL (Esquema 3.1)



Con las tres lipasas, la relación A/S mostró tener efecto sobre los rendimientos, pero no alteró la quimioespecificidad de las reacciones. De todos modos, una relación A/S igual a 5 permitió llevar a cabo las reacciones con rendimientos muy satisfactorios, en contraste con los resultados obtenidos con acetato de etilo en presencia de PPL y de CAL, donde disminuir dicha relación de 15 a 5 afectaba negativamente los rendimientos (Capítulo II).

Para estudiar el efecto de la naturaleza del solvente sobre la actividad enzimática, se eligió la transesterificación con hexanoato de etilo en presencia de PPL y se probaron solventes de diferentes propiedades fisicoquímicas.

**TABLA 3.5** - Efecto del solvente sobre la reacción de 2-mercaptoetanol con hexanoato de etilo ( 7d ) catalizada por PPL<sup>a</sup> ( Esquema 3.1 )

Solvente	log P	$\epsilon$	% 10 <sup>b</sup>	
			2 días	7 días
-----	----	----	74,0	87,2
n-hexano	3,50	1,89	30,1	88,3
diisopropiléter	1,90	3,88	44,7	67,6
acetona	-0,23	20,70	61,2	65,3

a- Las reacciones se efectuaron a 27° mediante agitación magnética, con lipasa previamente secada y empleando relaciones E/S = 1,3 y A/S = 5.

b- Determinados por cromatografía gaseosa.

Se aprecia que luego de siete días de reacción, la actividad de la lipasa en ausencia de solvente es mayor o similar que en los sistemas que contienen los solventes estudiados. Este comportamiento se acentúa a los dos días de reacción, tiempo al que las diferencias entre los sistemas con solvente y sin solvente son muy marcadas, siendo claramente desfavorable la presencia de solvente en el medio de reacción. Según estos resultados, para el sistema

compuesto por 2-mercaptoetanol, hexanoato de etilo y PPL el agregado de un solvente influye más sobre la velocidad de la reacción que sobre el rendimiento final.

Es importante destacar que la correlación entre la actividad enzimática y las propiedades de los solventes que puede establecerse a partir de los resultados a dos días de reacción es exactamente opuesta a la encontrada en numerosas referencias bibliográficas donde se describe a los solventes hidrofóbicos como particularmente adecuados para estas reacciones ( página 20 ).

De los tres solventes probados, los mejores resultados fueron obtenidos con acetona, el de mayor polaridad y constante dieléctrica, mientras que el hexano, el más hidrofóbico, originó una actividad enzimática pobre. Tampoco el hexano había resultado adecuado en la transesterificación de 2-mercaptoetanol con acetato de etilo ( Tabla 2.2 ). Parecería entonces que el efecto del solvente sobre la actividad enzimática depende fuertemente del sistema en el que participa (sustrato, agente acilante, lipasa) y tratar de predecir su influencia en función exclusiva de sus propiedades fisicoquímicas no siempre está de acuerdo con los hechos experimentales<sup>1</sup>.

Con todos los ésteres ensayados, las tres enzimas generaron los correspondientes ácidos carboxílicos. Aun en los casos en los que no hubo transesterificación (7g, 7h, Esquema 3.1), se formaron cantidades importantes de ácido dodecanoico y ácido tetradodecanoico, respectivamente. La mayor actividad hidrolítica fue observada para LIP y la menor, para CCL. Con PPL se observó una mayor actividad hidrolítica a mayor longitud de cadena del éster etílico.

Se intentó también emplear PPL para la transesterificación de 2-mercaptoetanol con algunos ésteres que formalmente pueden considerarse como derivados del acetato de etilo, como ser, bromoacetato de etilo, acetoacetato de etilo y fenilacetato de etilo. Utilizando una relación A/S igual a 10 y tras diez días de reacción, se recuperó en los tres casos la mezcla inicial del

sustrato y el éster. PPL y LIP tampoco catalizaron la reacción de 2-mercaptoetanol con benzoato de etilo, tanto con una relación A/S igual a 5 como igual a 15.

Salvo para el acetoacetato de etilo, con los restantes ésteres se advirtió que la lipasa adquiría progresivamente una coloración amarillenta. Esta observación y el hecho de que con este grupo de ésteres las lipasas tampoco dieron lugar a actividad hidrolítica sugieren que estos hipotéticos agentes acilantes promueven la inactivación de las enzimas.

Como acaba de relatarse, las transesterificaciones biocatalizadas estudiadas en nuestro laboratorio y descritas por el Esquema 3.1 permiten obtener quimioespecíficamente los correspondientes productos de O-acilación de 2-mercaptoetanol, moléculas que estructuralmente son ésteres de 2-mercaptoetilo,  $\text{HS}-(\text{CH}_2)_2\text{-OCOR}$  ( 8-13 ).

La preparación de los ésteres de 2-mercaptoetilo figura en la literatura en muy pocas ocasiones. En el primer trabajo sobre este objetivo<sup>2</sup> se informa la obtención de los compuestos 8-13 mediante la esterificación de los correspondientes ácidos carboxílicos con 2-mercaptoetanol y ácido *p*-toluensulfónico como catalizador, en condiciones de destilación azeotrópica del agua formada. Utilizando este método se preparó dodecanoato de 2-mercaptoetilo ( 13 ) con un rendimiento del 72 %. Posteriormente se publicó un estudio de estas esterificaciones en el que se investigó con mayor detalle el uso de distintos catalizadores<sup>3</sup>. En este caso, los autores encontraron que el empleo de ácido *p*-toluensulfónico conduce a una pérdida del hidroxialcanotiol de hasta un 40%, debido a la formación del polímero  $-(\text{CH}_2\text{-S})_n-$  que aparece junto con los productos deseados. La utilización de numerosas sales de metales de transición favorece la polimerización o no cataliza la esterificación; solamente el tricloruro de fósforo recién destilado y añadido paulatinamente a la mezcla de reacción permite obtener, con valor preparativo, pentanoato de 2-mercaptoetilo y dodecanoato de 2-mercaptoetilo, ambos libres de subproductos.

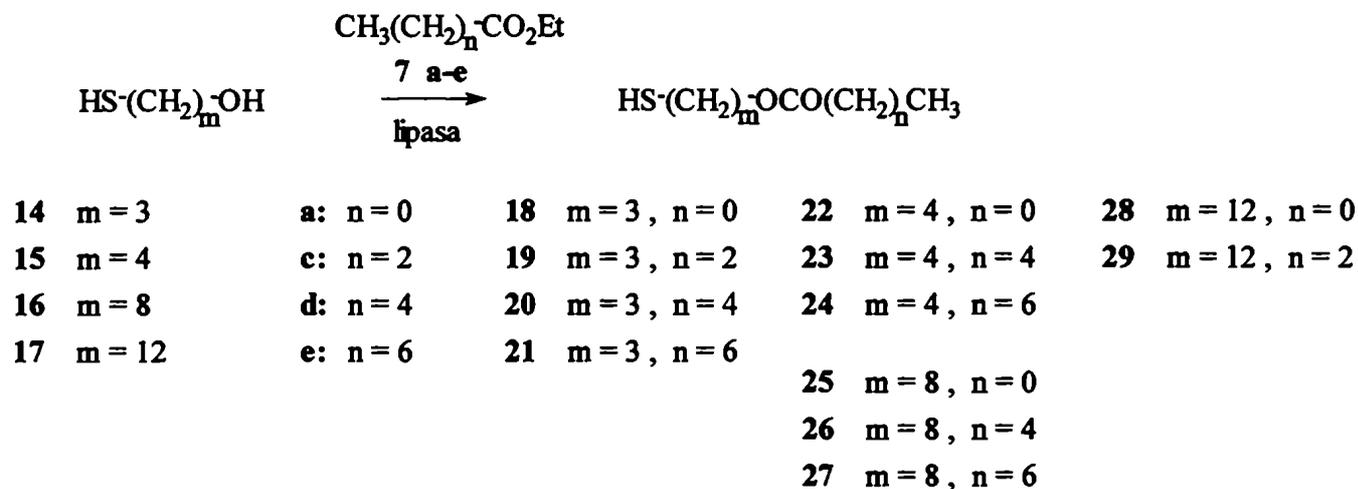
La preparación de propionato de 2-mercaptoetilo ( 8 ) se informó algunos años después, por medio de la esterificación de ácido propiónico con 2-mercaptoetanol<sup>4</sup>, pero estos autores utilizan ácido *p*-toluensulfónico como catalizador y omiten el rendimiento obtenido.

Frente a estos métodos, la transesterificación de 2-mercaptoetanol con ésteres etílicos catalizada por lipasas constituye un procedimiento simple para la obtención quimioespecífica de ésteres de 2-mercaptoetilo con rendimientos muy satisfactorios. La reacción transcurre a temperatura ambiente, sin necesidad de recurrir a agentes acilantes activados ni solvente adicional. Las propiedades espectroscópicas de estos compuestos, que en su mayoría no habían sido descritas hasta el presente, se detallan en el Capítulo VIII.

Los ésteres de 2-mercaptoetilo han encontrado dos aplicaciones principales. Se han empleado como agentes de transferencia de cadena en la polimerización radicalaria de monómeros vinílicos, donde regulan eficazmente el peso molecular del polímero en cantidades inferiores al 1% <sup>3,5,6</sup>. Por otra parte, los productos de condensación de compuestos organoestánicos con ésteres de 2-mercaptoetilo presentan excelentes propiedades para conferir estabilidad térmica a polímeros vinílicos, en particular, al cloruro de polivinilo<sup>2,7,8</sup>.

## **2. Acilación de otros $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles catalizada por lipasas**

Las transesterificaciones biocatalizadas anteriormente descritas tenían como centro a 2-mercaptoetanol. El estudio de estas reacciones continuó luego con otros sustratos pertenecientes a la misma familia de moléculas:



### ESQUEMA 3.2

Todas las acilaciones que figuran en el Esquema 3.2 ocurrieron con la misma quimioespecificidad hasta ahora encontrada, dando origen a los respectivos ésteres de  $\omega$ -mercaptoalquilo ( 18-29 ) con muy buenos rendimientos. Los resultados obtenidos se detallan en las Tablas 3.6 a 3.9, en las que se informan los tiempos a los que observaron los mejores rendimientos.

El 12-mercapto-1-dodecanol resultó ser insoluble en butirato de etilo. Se intentó entonces llevar a cabo la reacción agregando la lipasa sobre la suspensión formada. La pasta resultante se trató según las condiciones experimentales de la Tabla 3.9 y demostró ser un sistema de reacción adecuado.

Tal como se evidenció con 2-mercaptoetanol, se advierte que PPL cataliza estas transesterificaciones a menor velocidad que las otras enzimas.

Una diferencia en la reactividad de estos  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles comparados con 2-mercaptoetanol es que a mayor longitud de cadena hidrocarbonada del sustrato disminuye la longitud del acilo a partir del cual cesa la transesterificación. En efecto, 3-mercapto-1-propanol y 4-mercapto-1-butanol no reaccionaron con decanoato de etilo ni con dodecanoato de etilo luego de ocho días a 37° con PPL, LIP y CCL, mientras que con 12-mercapto-1-dodecanol no hubo reacción a partir de hexanoato de etilo. En todos estos casos

**TABLA 3.6 - Acilación de 3-mercapto-1-propanol (14) catalizada por lipasas<sup>a</sup> (Esquema 3.2)**

Agente acilante	t (h)	T (°)	Enzima	Producto	% Producto <sup>b</sup>
<b>7a</b>	24	28	PPL	<b>18</b>	95,4
	48	28	LIP	<b>18</b>	73,8
	192	28	CCL	<b>18</b>	81,5
	48	26	CAL	<b>18</b>	82,9
<b>7c</b>	24	28	PPL	<b>19</b>	87,8
	24	28	LIP	<b>19</b>	92,4
	24	28	CCL	<b>19</b>	93,5
<b>7d</b>	720	27	PPL	<b>20</b>	87,9
	16	27	LIP	<b>20</b>	94,5
	30	27	CCL	<b>20</b>	87,4
	24	26	CAL	<b>20</b>	94,2
<b>7e</b>	168	31	PPL	<b>21</b>	95,5
	46	31	LIP	<b>21</b>	95,0
	46	31	CCL	<b>21</b>	92,8

a- Las reacciones se llevaron a cabo a 200 rpm empleando una relación E/S = 1,1 para PPL, LIP y CAL y 3,3 para CCL.

Se utilizó una relación A/S = 15 para acetato de etilo (7a) y 5 para los restantes acilantes.

b- Determinados por cromatografía gaseosa.

**TABLA 3.7** - Acilación de 4-mercapto-1-butanol ( 15 ) catalizada por lipasas<sup>a</sup> ( Esquema 3.2 )

Agente acilante	t (h)	Enzima	Producto	% Producto <sup>b</sup>
7a	168	PPL	22	91,9
	48	LIP	22	88,1
	48	CCL	22	52,7
7d	168	PPL	23	66,1
	168	LIP	23	56,3
	168	CCL	23	66,2
7e	48	PPL	24	83,7
	48	LIP	24	76,4
	48	CCL	24	88,4

a- Las reacciones se llevaron a cabo a 30° y 190 rpm, empleando una relación E/S = 0,94 para PPL y LIP y 2,8 para CCL. Se utilizó una relación A/S = 15 para acetato de etilo ( 7a ) y 5 para los restantes ésteres.

b- Determinados por cromatografía gaseosa.

**TABLA 3.8** - Acilación de 8-mercapto-1-octanol ( 16 ) catalizada por lipasas<sup>a</sup> ( Esquema 3.2 )

Agente acilante	t (h)	Enzima	Producto	% Producto <sup>b</sup>
7a	168	PPL	25	94,2
	168	LIP	25	93,6
	168	CCL	25	90,6
7d	192	PPL	26	94,9
	192	LIP	26	99,2
	192	CCL	26	95,8
7e	46	PPL	27	93,9
	46	LIP	27	96,5
	46	CCL	27	94,5

a- Las reacciones se efectuaron a 33°C y a 210 rpm, empleando relaciones E/S = 0,62 para PPL y LIP y 1,9 para CCL. Se emplearon relaciones A/S = 15 para acetato de etilo (1a) y 5 para los restantes ésteres.

b- Determinados por cromatografía gaseosa.

**TABLA 3.9** - Acilación de 12-mercapto-1-dodecanol ( **16** ) catalizada por lipasas<sup>a</sup> ( Esquema 3.2 )

Agente acilante	t (h)	T (°)	Enzima	Producto	% Producto <sup>b</sup>
<b>7a<sup>c</sup></b>	168	30	PPL	<b>28</b>	53,8
	168	30	LIP	<b>28</b>	78,9
	168	30	CCL	<b>28</b>	91,8
<b>7c<sup>d</sup></b>	168	33	PPL	<b>29</b>	83,2
	45	33	LIP	<b>29</b>	93,2
	45	33	CCL	<b>29</b>	93,5

a- Las reacciones se efectuaron a 190 rpm, empleando relaciones E/S = 0,46 para PPL y LIP y 1,4 para CCL.

b- Determinados por cromatografía gaseosa. c- A/S = 15 d- A/S = 5

las enzimas presentaron actividad hidrolítica sobre los correspondientes ésteres. Parecería que una vez entrado el éster en el sitio activo de la lipasa, si el hidroxialcanotiol es de cadena larga, no puede penetrar para desplazar al grupo acilo del complejo acil-enzima.

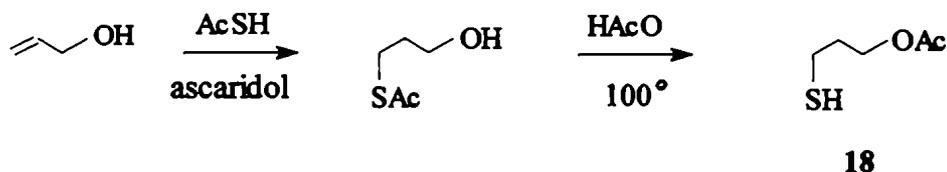
Estos hechos experimentales indicarían que la capacidad de las lipasas ensayadas para actuar sobre un sustrato perteneciente a la familia de los  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles estudiados se limita a partir de una cierta longitud de cadena hidrocarbonada.

Por lo demás, las Tablas 3.6 a 3.9 ponen de manifiesto que para cada lipasa no hay una tendencia definida que explique su actividad frente a un sustrato fijo cuando se varía el agente acilante, o cuando se fija el acilante y se varía el hidroxialcanotiol.

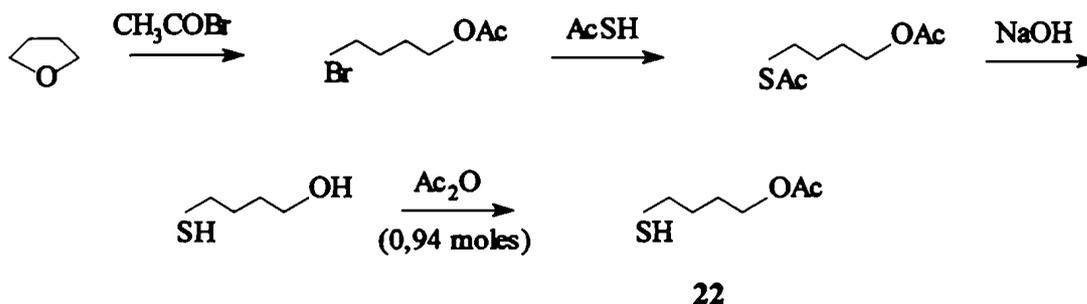
De los productos de las transesterificaciones que figuran en el Esquema 3.2 la bibliografía registra solamente la existencia y preparación de acetato de 3-mercaptoetilo ( **18** ) y de acetato de 4-mercaptobutilo ( **22** ). Por lo tanto, las acilaciones biocatalizadas informadas en el presente trabajo constituyen un método adecuado de obtención de diez compuestos cuya

existencia no ha sido descrita en literatura. Estas moléculas, que son homólogas de los ésteres de 2-mercaptoetilo, también podrían resultar adecuadas como aditivos de polímeros, tanto para su preparación como para su conservación. Por otra parte, se ha informado que tioles naturales y sintéticos de diversas estructuras ejercen protección sobre los efectos causados por la radiación  $\gamma$  sobre el DNA<sup>9,10</sup> y sobre los daños provocados por la radiación solar sobre la piel humana, hecho que ha llevado a emplear compuestos con un grupo sulfhidrilo libre en preparaciones cosméticas<sup>11</sup>. También se ha descrito el uso de tioles en la radioterapia del cáncer<sup>12</sup> y para prevenir procesos de carcinogénesis<sup>13</sup>.

La producción de **18** y de **22** mediante catálisis enzimática también mejora las preparaciones previas que se encuentran en bibliografía. El acetato de 3-mercaptopropilo ( **18** ) fue preparado por Harding y Owen<sup>14</sup> mediante la siguiente secuencia que llevaron a cabo con un rendimiento total del 44%:



Estos mismos autores obtuvieron acetato de 4-mercaptobutilo ( **22** ) con un rendimiento de sólo 24%, a través de esta serie de reacciones:



En otras dos ocasiones<sup>15,16</sup> este compuesto se preparó a través de una reacción de sustitución nucleofílica:



pero el sulfuro del producto deseado, que aparece como subproducto, hace que la reacción sea limitada desde el punto de vista sintético (página 138).

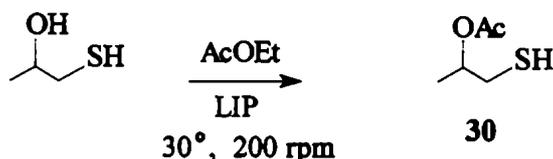
Esto muestra que, como ya se indicó, las preparaciones de **18** y **22** por el procedimiento aquí presentado resultaron altamente eficientes y simples comparadas con las descritas en bibliografía.

### **3. Discusión del comportamiento quimioespecífico de las acilaciones biocatalizadas de**

#### **$\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles**

Algunos ensayos permitieron comprobar que la naturaleza del grupo hidroxilo (primario o secundario) y del grupo tiol en la molécula del sustrato afecta drásticamente la actividad enzimática.

Cuando *dl*-1-mercapto-2-propanol, un isómero de posición de 3-mercapto-1-propanol, se hizo reaccionar con acetato de etilo en presencia de las cuatro lipasas, sólo se observó reacción con LIP:

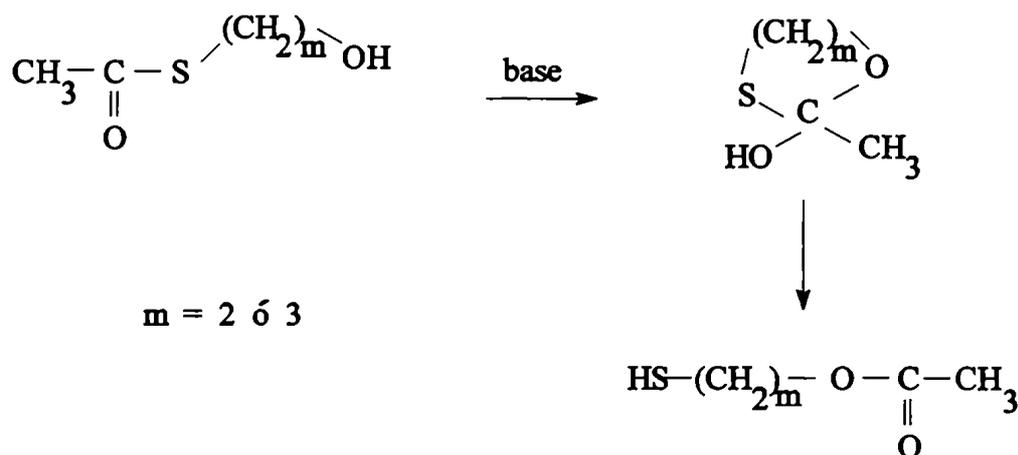


Nuevamente, la transesterificación ocurrió de modo quimioespecífico, ya que se formó exclusivamente el acetato de 1-mercapto-2-propilo ( **30** ), pero con un rendimiento que sólo alcanzó al 13% luego de siete días de reacción. El hecho de que **30** purificado no haya presentado actividad óptica excluye la posibilidad de un comportamiento enantioselectivo de LIP. Al probar la transesterificación con hexanoato de etilo durante un período de tiempo similar, no se verificó reacción. Por otra parte, *dl*-3-mercapto-2-butanol, isómero de posición de 4-mercapto-1-butanol en el que ambos grupos funcionales son secundarios, no reaccionó con ninguna de las cuatro enzimas aún luego de quince días de reacción. Estos resultados pueden explicarse considerando que en general, los alcoholes secundarios suelen ser sustratos más pobres que los primarios frente a transformaciones biocatalizadas (página 30 ).

Es notable que todas las acilaciones biocatalizadas de los hidroxialcanotioles hasta aquí estudiados hayan transcurrido con la quimioespecificidad encontrada. Independientemente del carácter primario o secundario del grupo hidroxilo, cuando la reacción se produce lo hace quimioespecíficamente. Cabe aquí preguntarse si las migraciones de grupos acilo desde el átomo de azufre hacia el de oxígeno, que originan ésteres, más estables termodinámicamente que los tioésteres isómeros, contribuyen a la formación de los productos de reacción observados en todos los casos.

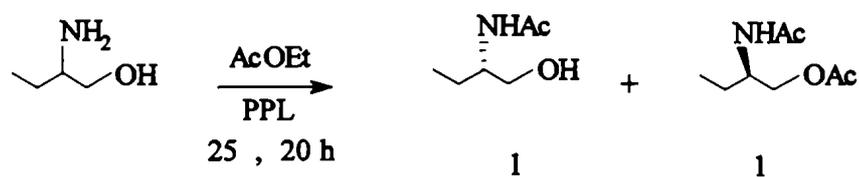
Para los  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles con  $m = 4, 8$  y  $12$  sería posible conjeturar que el comportamiento observado se debe a la esterificación directa del hidroxilo y no a un proceso de isomerización de tioésteres eventualmente formados en una primera etapa. Se sabe que para los tioésteres  $\text{CH}_3\text{COS}(\text{CH}_2)_m\text{OH}$  la transferencia del acetilo desde el átomo de azufre

hacia el de oxígeno ocurre solamente cuando  $m = 2$  ó  $3$ , ya que valores mayores de  $m$  implican la formación de un anillo de más de seis miembros durante la migración, por lo que la isomerización no se encuentra favorecida<sup>17</sup>:



Podría pensarse entonces que si las lipasas catalizan la esterificación directa del hidroxilo para  $m = 4, 8$  y  $12$ , lo mismo ocurriría en el caso de  $m = 2$  y  $3$ , sin que los productos encontrados provinieran de una isomerización. Esta hipótesis se encuentra apoyada por el hecho de que al tratar 1,2-etanoditiol y 1,3-propanoditiol con acetato de etilo en presencia de PPL durante veinte días a  $25^\circ$  y durante una semana a  $45^\circ$ , en ambos casos se recuperaron los ditiolos de partida. Esto sugeriría que el grupo tiol en esta clase de compuestos no reacciona en las transformaciones estudiadas. Además, si la acetilación se produjera inicialmente en el átomo de azufre y posteriormente existiese una migración, es difícil explicar la reactividad casi nula de *dl*-1-mercapto-2-propanol.

En la acilación de aminoalcoholes catalizada por lipasas se han encontrado algunos resultados útiles para analizar. Gotor y colaboradores describieron la reacción de *dl*-2-amino-1-butanol con acetato de etilo en presencia de PPL<sup>18</sup>, con el resultado que se indica:



Aun cuando en esta reacción la longitud del aminoalcohol y la posición adyacente de ambos grupos funcionales permiten un fenómeno de migración no enzimática del acetilo situado sobre el átomo de oxígeno al de nitrógeno<sup>19,20</sup>, la formación del producto diacetilado muestra que ambos grupos funcionales se hallan disponibles en el medio de reacción. En las transesterificaciones biocatalizadas de hidroxialcanotioles no se detectaron productos de diacilación, aunque siempre se trabajó con un gran exceso de agente acilante. Esto está en concordancia con la reacción de desacetilación de acetato de 2-tioacetoxietilo ensayada en el Capítulo II, donde se probó que el tioacetilo se elimina totalmente. A lo largo de las acilaciones biocatalizadas investigadas en este trabajo, tampoco se detectaron disulfuros, productos de oxidación que aparecen a menudo durante la operación con tioles (pág. 140). Klibanov y colaboradores probaron la butirilación de 6-amino-1-hexanol, un sustrato cuya longitud de cadena no hace posible eventuales migraciones, mediante transesterificaciones catalizadas por PPL y por lipasas de *Aspergillus niger* y *Pseudomonas sp*<sup>19</sup>. Si bien estos autores informaron la obtención quimioselectiva del éster, observaron la presencia de la amida aun a tiempos cortos de reacción. El resultado es exactamente opuesto al que se verifica cuando la acilación se lleva a cabo con cloruro de butirilo, y también fue hallado con *trans*-4-amino-1-ciclohexanol y otros aminoalcoholes de menor peso molecular<sup>19</sup>. Estos hechos experimentales revisten importancia porque ponen de manifiesto que la quimioselectividad conferida a una reacción por la catálisis enzimática no necesariamente concuerda con la que puede predecirse por métodos químicos convencionales. Por lo tanto,

la ausencia total de tioésteres durante las acilaciones biocatalizadas de hidroxialcanotioles no debe justificarse necesariamente en base a fenómenos de isomerización.

En síntesis, la quimioespecificidad sistemática encontrada en toda la serie de los  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles probados, la falta de reactividad de los ditiolles ensayados, la escasa reactividad de 1-mercapto-2-propanol y la ausencia de productos de diacilación y de disulfuros en todas las reacciones efectuadas pueden apoyar la hipótesis de que el grupo tiol de los hidroxialcanotioles investigados no se encontraría libre para reaccionar en el medio de reacción enzimático. Consecuentemente, este hecho explicaría el curso quimioespecífico observado durante las transesterificaciones de estos sustratos catalizadas por lipasas.

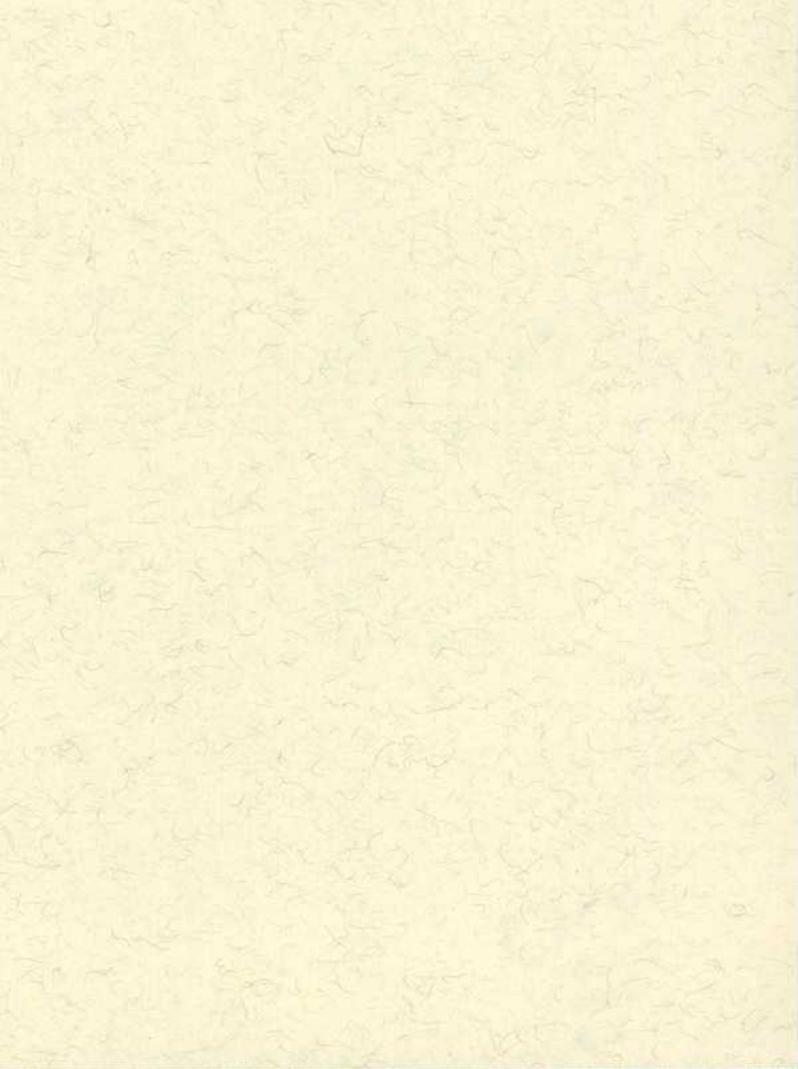
**Referencias bibliográficas**

1. A.M.P.Koskinen y A.M.Klibanov, *Enzymatic reactions in organic media*, Chapman & Hall, Glasgow, 1996, páginas 58 y 88.
2. H.E.Ramsden (to Metal & Thermit Corp.), Brit. 759.382, 17 Oct.1956 ; *Chem. Abstr.* 51 : P13918e (1957)
3. V.E.Mazaev, M.A.Korshinov y N.M.Rodionova, *Osnovn. Org. Sint. Neftekhim.* 4 , 79 (1975)
4. H.Seliger y H.H.Görtz, *Synt. Commun.* 10 , 175 (1980)
5. A.V.Ryabov, L.A.Smirnova, E.V.Gugina y V.M.Soldatov, *Tr. Khim. Khim. Teknol.* 3 , 23 (1975)
6. Y.Kato, M.Yuyama, M.Moritani y S.Iijima, Eur.Pat.Appl EP 178.115 (CLC08F20/14), 16 Abr.1986 ; *Chem. Abstr.* 105 : P25169m (1986)
7. L.Jirackova-Audouin, D.Ranceze y J.Verdu, *Analisis* 13 , 59 (1985)
8. D.L.Clark, B.J.Hollo, P.K.Tornstrom, R.E.Turnbull y T.R.Woodley, *J. Vinyl Technol.* 8 , 27 (1986)
9. M.V.M.Lafleur y J.Retèl, *Mutation Research*, 295 , 1 (1993)
10. D.Becker, S.Summerfield, S.Gillich y M.D.Sevilla, *Int. J. Radiat. Biol.* 65 , 537 (1994)
11. J.F.Weiss, M.G.Simic, *Pharmacol. Ther.* 39 , 1 (1988)
12. J.M.Yuhas, *Cancer Res.* 40 , 1519 (1980)
13. B.S.Reddy, C.V.Rao, A.Rivenson y G.Keloff, *ibid.*, 53 , 3493 (1993)
14. J.S.Harding y L.N.Owen, *J. Chem. Soc.* 1536 (1954)
15. M.E.Szarvasi, *Bull. Soc. Chim.* 463 (1950)

16. R.M.Lagidze y R.N.Akhvlediani, *Soobshch. Akad. Nauk. Gruz. SSR.* 31, 577 (1963); *Chem.Abstr.* 61: 9394g (1964)
17. S.Patai, *The chemistry of the thiol group*, John Wiley & Sons, Londres, 1974, Parte 2, página 692.
18. V.Gotor, R.Brieva y F.Rebolledo, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 957 (1988)
19. N.Chinsky, A.L.Margolin y A.M.Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* 111, 386 (1989)
20. P.de Mayo, *Molecular rearrangements*, Interscience Publishers, Nueva York, 1964, Volumen 2, página 766.



***CAPITULO IV***



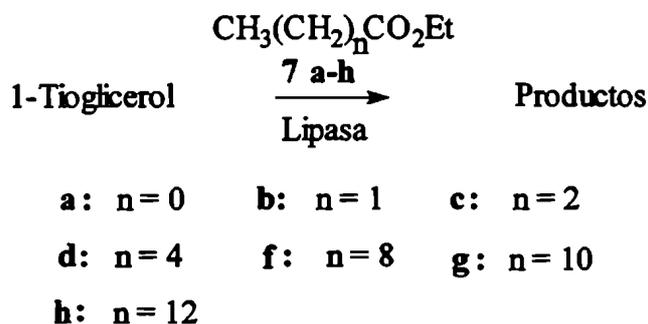
### **1. Acilación de 3-mercapto-1,2-propanodiol catalizada por lipasas**

Los resultados hasta aquí presentados muestran principalmente el comportamiento de varios hidroxialcanotioles bifuncionales en transesterificaciones catalizadas por lipasas<sup>1-3</sup>. Con el objetivo de continuar el estudio de estas reacciones de acilación se ensayaron otros mercaptoalcoholes de mayor complejidad funcional.

Existen pocas referencias bibliográficas que describan la preparación o existencia de productos de monoacilación de 3-mercapto-1,2-propanodiol ( **31** ), conocido comúnmente como 1-tioglicerol. En tres ocasiones<sup>4-6</sup> se informó la esterificación selectiva del grupo tiol de esta molécula, pero la literatura no registra la preparación de productos de 1-O-acilación de dicho compuesto.

En 1942 se detectó la presencia de 1-O-acetil-3-mercapto-1,2-propanodiol ( **32** ) en la mezcla de productos obtenida al calentar glicidol (2,3-epoxi-1-propanol) con ácido tiolacético<sup>4</sup>. Con excepción de este trabajo, y a nuestro mejor saber, no se encuentran en literatura otras referencias de la existencia de derivados 1-O-acilados de 3-mercapto-1,2-propanodiol. Por lo tanto, la posibilidad que reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas sobre dicha molécula transcurriesen siguiendo el curso selectivo encontrado con los hidroxialcanotioles bifuncionales previamente estudiados ( Capítulos II y III ) podría ofrecer un método de preparación en un solo paso de una familia de compuestos no descritos hasta el presente.

De este modo, se eligió a 1-tioglicerol como sustrato de las transesterificaciones que se indican a continuación:



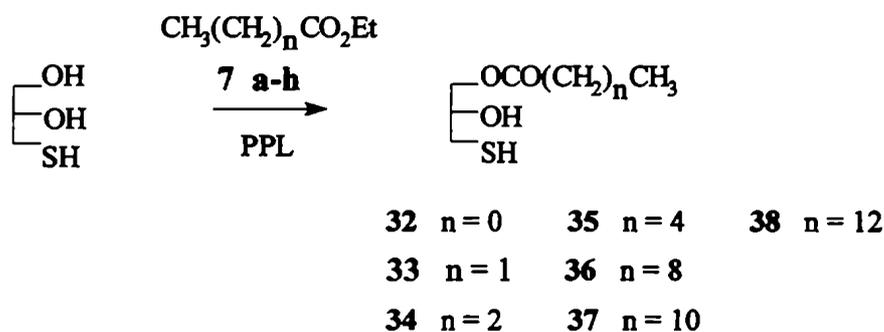
### ESQUEMA 4.1

El sustrato fue miscible en los agentes acilantes solamente para los casos 7a, 7b y 7c, pero con los restantes ésteres se observó que la fase sobrenadante de los correspondientes sistemas de reacción, originariamente bifásica, se volvía monofásica con el transcurso del tiempo.

En la Tabla 4.1 se detallan los resultados obtenidos al estudiar la reacción descrita en el Esquema 4.1 utilizando PPL como catalizador.

Si se excluye la reacción con acetato de etilo ( 7a ), estos valores muestran que el poder catalítico de PPL es bastante pobre frente a 1-tioglicerol bajo las condiciones experimentales ensayadas. Es posible correlacionar estos resultados con la apariencia presentada por los sistemas de reacción: mientras que con acetato de etilo se observó una suspensión de aspecto habitual, con los demás ésteres la situación fue diferente. Alrededor de dos horas después de comenzada la reacción, la lipasa comenzaba a aglutinarse y progresivamente, los sistemas de reacción pasaban de una suspensión a un sistema bifásico formado por una fase líquida relativamente límpida y por la lipasa, fuertemente aglutinada y de consistencia muy dura, que dificultaba su disgregación. Considerando que con todos los otros sustratos ensayados, entre ellos 3-mercapto-1-propanol ( 14 ), análogo de 1-tioglicerol, PPL nunca presentó este aspecto, cabe pensar que 1-tioglicerol pudo haber afectado la actividad de la enzima.

**TABLA 4.1** - Reacción de 1-tioglicerol con diversos ésteres etílicos catalizada por PPL<sup>a</sup> ( Esquema 4.1 )



Agente acilante	T (°)	t (h)	Producto	% Producto <sup>b</sup>
7a	25	360	32	80,2
7b	28	360	33	7,3 <sup>c</sup>
7c	30	360	34	6,2
7d	28	960	35	6,0
7f	28	360	36	0,0
7g	30	960	37	26,6
7h	30	960	38	0,0

a- Las reacciones se llevaron a cabo a 150 rpm, empleando E/S = 0,93 y A/S = 15 para 7a y 5 para los restantes acilantes.

b- Determinados por cromatografía gaseosa.

c- Se detectó además el isómero 2-O-acilado, asignado por cromatografía gaseosa / espectrometría de masa.

Cuando se agitó a 180 rpm 1-tioglicerol con benzoato de etilo en presencia de PPL a 30° , se recuperó la mezcla inicial luego de siete días de reacción. La ausencia de ácido benzoico, hecho que muestra que tampoco hubo actividad hidrolítica, y la coloración amarillenta de la lipasa sugieren la inactivación de la enzima, tal como se había encontrado con 2-mercaptoetanol. Parecería que PPL no presenta afinidad por moléculas aromáticas, como lo

confirma también el hecho de que fenol y tiofenol no reaccionaron con acetato de etilo en presencia de esta lipasa.

La Tabla 4.2. presenta los resultados obtenidos al ensayar el empleo de LIP.

**TABLA 4.2** - Reacción de 1-tioglicerol con diversos ésteres etílicos catalizada por LIP<sup>a</sup>

$$\begin{array}{c} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{Et} \\ \xrightarrow[\text{LIP}]{7 \text{ a-h}} \end{array} \begin{array}{c} \text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3 \\ \text{OH} \\ \text{SH} \end{array} + \begin{array}{c} \text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3 \\ \text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3 \\ \text{SH} \end{array}$$

<b>a:</b> n = 0	<b>f:</b> n = 8	<b>32</b> n = 0	<b>36</b> n = 8	<b>40</b> n = 1
<b>b:</b> n = 1	<b>g:</b> n = 10	<b>33</b> n = 1	<b>37</b> n = 10	<b>42</b> n = 4
<b>c:</b> n = 2	<b>h:</b> n = 12	<b>34</b> n = 2	<b>38</b> n = 12	
<b>d:</b> n = 4		<b>35</b> n = 4		

Agente acilante	T (°)	t (h)	% Producto 1-O-acilado <sup>b</sup>	Relación producto 1-O-acilado/subproducto <sup>c</sup>
<b>7a</b>	25	216	74,0	---
<b>7b</b>	28	24	65,5	24:1
<b>7c</b>	30	1	66,7	---
		48	68,2	---
<b>7d</b>	28	1	56,7	---
		48	70,5	99:1
<b>7f</b>	28	1	95,1	---
		48	95,6	---
<b>7g</b>	30	24	67,5	---
		48	87,0	---
	60 <sup>d</sup>	24	50,6	---
		88	57,1	---
<b>7h</b>	30	24	63,6	---
		360	69,0	---

a- Salvo indicado lo contrario, las reacciones se llevaron a cabo a 150 rpm, empleando E/S = 0,93 y A/S = 15 para **7a** y **5** para los restantes ésteres. b- Determinados por cromatografía gaseosa. c- La naturaleza de estos subproductos se determinó por cromatografía gaseosa / espectrometría de masa. d- Se empleó agitación magnética.

Puede apreciarse que a tiempos cortos, la reacción transcurre químicamente y regioespecíficamente, formándose los productos 1-O-acilados. Con el tiempo se observa, empleando ciertos agentes acilantes, la aparición de pequeñas cantidades de compuestos 1,2-di-O-acilados ( 40 y 42 ) que no sobrepasan el 4% de la mezcla de productos. En estos casos, a tiempos largos se mantiene la quimioespecificidad pero se pasa de un comportamiento regioespecífico a uno regioselectivo.

Para el caso ensayado a 60°, la temperatura no perjudicó la especificidad pero tampoco mejoró el rendimiento.

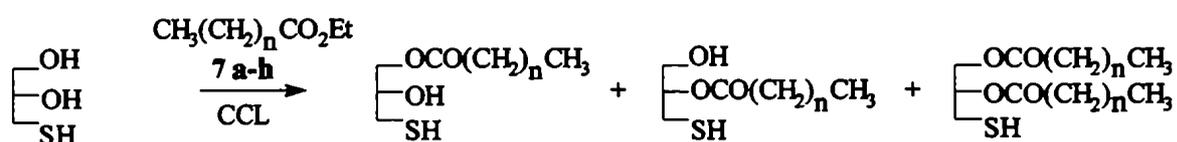
En la Tabla 4.3 se detallan los resultados obtenidos con el empleo de CCL como catalizador. Comparada con LIP, esta lipasa resultó menos efectiva, y en algunos casos demostró poca selectividad.

La Tabla 4.4 muestra los resultados obtenidos con CAL. Aunque las reacciones ocurrieron más velozmente que con las otras enzimas, CAL fue la menos selectiva de las cuatro lipasas ensayadas. Comparada con LIP, en general CAL no presentó un comportamiento más selectivo a tiempos cortos de reacción.

Es interesante destacar que en la reacción con acetato de etilo catalizada por esta última enzima, los mejores resultados se obtuvieron utilizando a temperatura ambiente una relación enzima/sustrato menor que la habitual. A 70° la reacción perdió su selectividad.

Analizando de modo general los resultados hallados con las cuatro lipasas, puede apreciarse que LIP y CAL, las dos enzimas inmovilizadas, originaron los mayores grados de conversión del sustrato, siendo LIP la que dio lugar a la mayor selectividad. Si bien la actividad de una lipasa en medio orgánico puede ser muy diferente a la que exhibe en medio acuoso, LIP ha sido descrita como específica para la hidrólisis en las posiciones 1- y 3- de derivados acilados de glicerol<sup>8,9</sup>, mientras que CCL y CAL no presentan una especificidad

**TABLA 4.3 - Reacciones de 1-tioglicerol con diversos ésteres etílicos catalizadas por CCL<sup>a</sup>**



<b>a:</b> n = 0	<b>f:</b> n = 8	<b>32</b> n = 0	<b>36</b> n = 8	<b>44</b> n = 1	<b>40</b> n = 1
<b>b:</b> n = 1	<b>g:</b> n = 10	<b>33</b> n = 1	<b>37</b> n = 10	<b>45</b> n = 2	<b>41</b> n = 2
<b>c:</b> n = 2	<b>h:</b> n = 12	<b>34</b> n = 2	<b>38</b> n = 12		
<b>d:</b> n = 4		<b>35</b> n = 4			

Agente acilante	T (°)	t (h)	% Producto 1-O-acilado <sup>b</sup>	Relación producto 1-O-acilado/subproducto(s)
<b>7a</b>	25	720	53,1	----
<b>7b</b>	30	2	13,1	2,6 : 1 <sup>c</sup>
		24	18,9	9 : 2,5 : 1 <sup>d</sup>
<b>7c</b>	30	1	38,2	19 : 5 : 1 <sup>e</sup>
<b>7d</b>	28	360	34,4	----
<b>7f</b>	28	1	86,8	----
		24	88,3	----
<b>7g</b>	30	24	86,8	----
<b>7h</b>	30	48	65,9	----

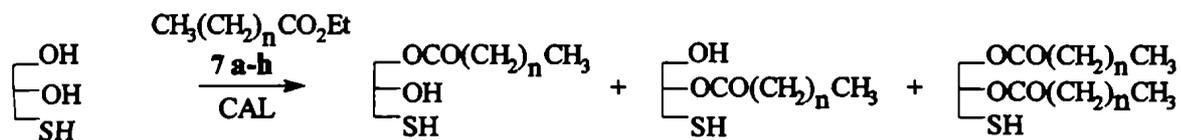
a- Las reacciones se llevaron a cabo a 150 rpm, empleando relaciones E/S = 2,8 y A/S = 15 para **7a** y **5** para los ésteres restantes. En las reacciones con **7b**, **7c** y **7f** se agregó hexano para formar un sistema agitable.

b- Determinados por cromatografía gaseosa.

c- Expresa la relación entre **33** y **44**. La identidad de **44** se determinó por CG/EM.

d- Expresa la relación **33** : **44** : **40**. La identidad de **40** se determinó por CG/EM.

e- Expresa la relación **34** : **45** : **41**. La identidad de **45** y **41** se determinó por CG/EM.

**TABLA 4.4 - Reacciones de 1-tioglicerol con diversos ésteres etílicos catalizada por CAL<sup>a</sup>**


<b>a:</b> n = 0	<b>f:</b> n = 8	<b>32</b> n = 0	<b>36</b> n = 8	<b>43</b> n = 0	<b>39</b> n = 0
<b>b:</b> n = 1	<b>g:</b> n = 10	<b>33</b> n = 1	<b>37</b> n = 10	<b>44</b> n = 1	<b>40</b> n = 1
<b>c:</b> n = 2	<b>h:</b> n = 12	<b>34</b> n = 2	<b>38</b> n = 12	<b>45</b> n = 2	<b>41</b> n = 2
<b>d:</b> n = 4		<b>35</b> n = 4		<b>46</b> n = 4	<b>42</b> n = 4

Agente acilante	T (°)	E/S	t (h)	% Producto 1-O-acilado <sup>b</sup>	Relación producto 1-O-acilado/subproducto(s)
<b>7a</b>	27	0,93	1	82,0	-----
			192	82,0	9 : 1 <sup>c</sup>
	70 <sup>d</sup>	0,93	0,5	78,3	3,6 : 1 <sup>c</sup>
			4	52,6	2,4 : 1 : 1,2 <sup>e</sup>
27	2,8	4	58,9	99 : 1 <sup>c</sup>	
		24	70,3	8 : 1 <sup>c</sup>	
<b>7b</b>	30	2,8	2	56,2	6,6 : 1,5 : 1 <sup>f</sup>
			24	47,8	3,5 : 1 : 1 <sup>f</sup>
<b>7c</b>	30	2,8	3	46,3	3,3 : 1 : 1 <sup>g</sup>
<b>7d</b>	28	2,8	4	61,1	5,7 : 1 : 1 <sup>h</sup>
<b>7f</b>	28	2,8	4	76,4	-----
<b>7g</b>	30	2,8	4	82,6	-----
			48	87,4	-----
<b>7h</b>	30	2,8	23	72,4	-----

a- Las reacciones se llevaron a cabo a 150 rpm, empleando una relación A/S = 15 para **7a** y 5 para los restantes ésteres. En las reacciones con **7b**, **7c**, **7d** y **7f** se agregó hexano para formar un sistema agitable. b- Determinados por cromatografía gaseosa. c- Expresa la relación entre **32** y **43**. La identidad de **43** se determinó por CG/EM. d- Se empleó agitación magnética. e- Expresa la relación **32** : **43** : **39**. La identidad de **39** se determinó por CG / EM. f- Idem e para **33** : **44** : **40**. g- Idem e para **34** : **45** : **41**. h- Idem e para **35** : **46** : **42**.

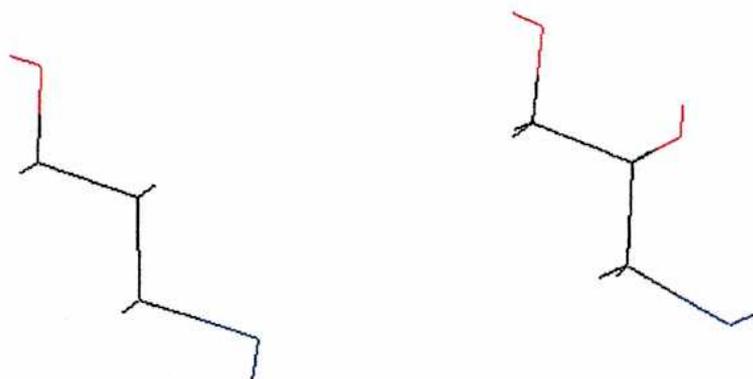
posicional marcada<sup>10,11</sup>.

En numerosas ocasiones, los datos de las Tablas 4.1 a 4.4 muestran que el aumento del tiempo de reacción afecta la regioespecificidad, pero no involucra la quimioespecificidad, tal como se halló con los  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles estudiados ( Capítulos II y III ). A diferencia de los resultados hallados con dichos compuestos bifuncionales, parece que para el 1-tioglicerol el tamaño del grupo acilo influye sobre la selectividad, ya que con acilos de tamaño intermedio se observaron los resultados menos selectivos. Otra diferencia importante con los  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles la constituye el hecho de que con 1-tioglicerol no se encontró un tamaño límite del grupo acilo a partir del cual deja de haber reacción.

Si se compara la reactividad en las transesterificaciones catalizadas por lipasas de los tres sustratos de tres átomos de carbono investigados en este trabajo<sup>3</sup>, 1-tioglicerol, 3-mercapto-1-propanol y 1-mercapto-2-propanol, los tres presentan en común la quimioespecificidad observada en todos los casos. 1-Mercapto-2-propanol, el único que no posee hidroxilo primario, fue escasamente reactivo. En general, 3-mercapto-1-propanol dio lugar a mejores rendimientos de reacción que 1-tioglicerol. Podría conjeturarse que este último, cuya estructura, comparada con la de 3-mercapto-1-propanol, contiene además un hidroxilo sobre un carbono quiral, resulta menos favorable que el  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotiol a los fines de interactuar con el sitio activo de la lipasa. En la Figura 5.1 se presentan las conformaciones estables de ambas moléculas.

Sin embargo, 3-mercapto-1-propanol no fue esterificado por grupos acilo de tamaño de cadena mayor que el octanoílo, mientras que 1-tioglicerol admitió agentes acilantes de mayor tamaño de cadena carbonada. Sería factible suponer que la mayor tolerancia del 1-tioglicerol se debe a que los sustratos naturales de las lipasas son el glicerol, molécula estructuralmente similar al 1-tioglicerol y los ácidos grasos, que poseen cadenas hidrocarbonadas largas.

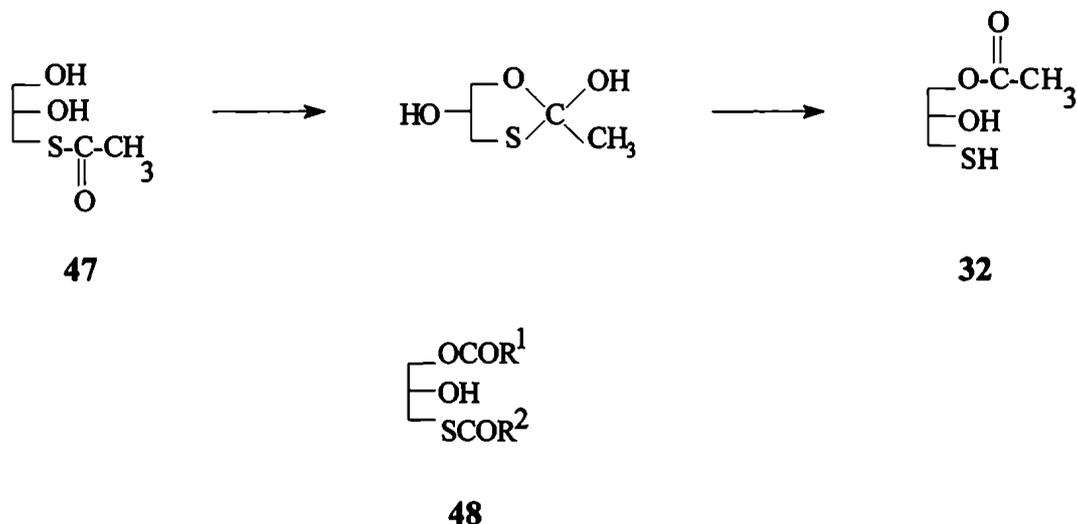
Frente al estudio de las reacciones que se presentan en el Esquema 4.1 es importante recordar que los productos de acilación parcial del glicerol, los mono y diglicéridos, sufren



**FIGURA 4.1** - Conformaciones de 3-mercapto-1-propanol (izquierda) y 1-tioglicerol (derecha) obtenidas mediante cálculos semiempíricos para la minimización de la energía molecular

con facilidad procesos de isomerización que ocurren a través de migraciones de grupos acilo<sup>12,13</sup>. Estos procesos se ven favorecidos en presencia de ácido, álcali, solventes polares, temperatura y sílicagel<sup>9,12,13</sup>.

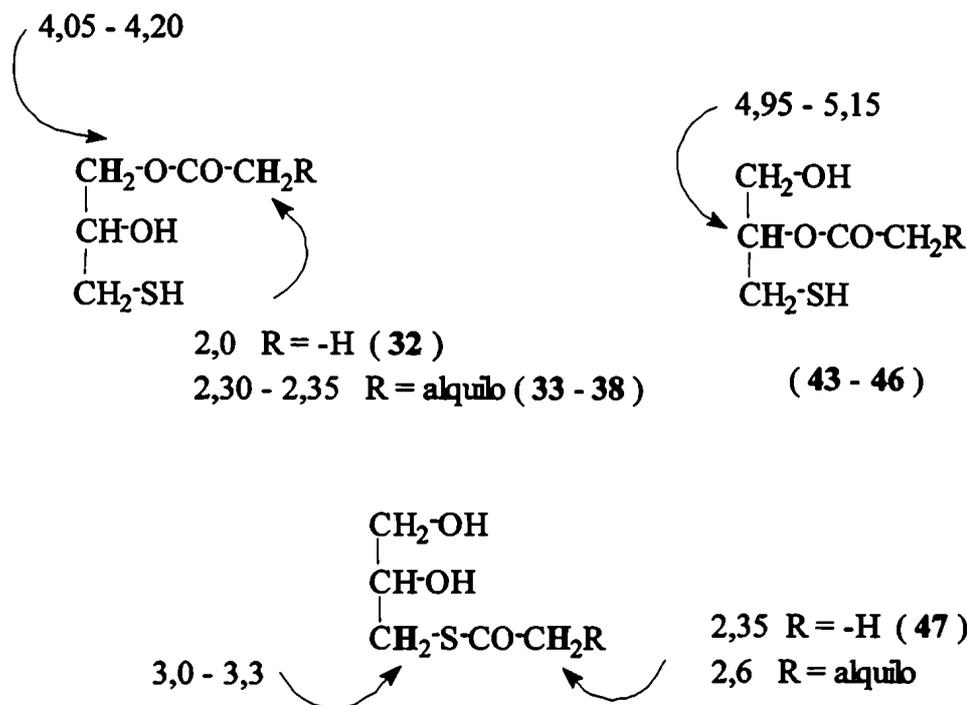
En dichas isomerizaciones los grupos acilo tienden a migrar desde un hidroxilo secundario hacia uno primario, posición de menor impedimento estérico y mayor estabilidad termodinámica<sup>13</sup>. Los acilos insaturados y de cadena corta migran con mayor facilidad<sup>13</sup>. Con respecto a los derivados acilados de 1-tioglicerol, se sabe que el 3-S-acetil-3-mercapto-1,2-propanodiol ( 47 ) isomeriza fácilmente al producto 1-O-acetilado ( 32 ), mientras que los tiodiglicéridos de estructura general 48 son estables aún luego de seis meses a 42°, hecho que indicaría que en las isomerizaciones el acilo situado sobre el átomo de azufre migra únicamente si en la molécula existe un hidroxilo primario<sup>14</sup>:



A diferencia de la estabilidad que presentan en medio acuoso o bifásico, se ha encontrado que los mono y diglicéridos son bastante estables en un medio de solvente orgánico con un contenido de agua menor que el 2%<sup>15</sup>. No obstante, al estudiar las reacciones descritas por el Esquema 4.1 es importante disponer de una técnica de análisis cuyas condiciones no favorezcan los procesos de isomerización.

La técnica de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  es particularmente útil para este propósito, ya que los espectros se obtienen mediante el análisis directo de la muestra a temperatura ambiente, condiciones que no promueven las migraciones. Además, es posible observar señales que indican la presencia de distintos isómeros de monoacilación<sup>14,16</sup>, aun cuando los mismos estén en una mezcla, tal como se puede apreciar en el Esquema 4.2.

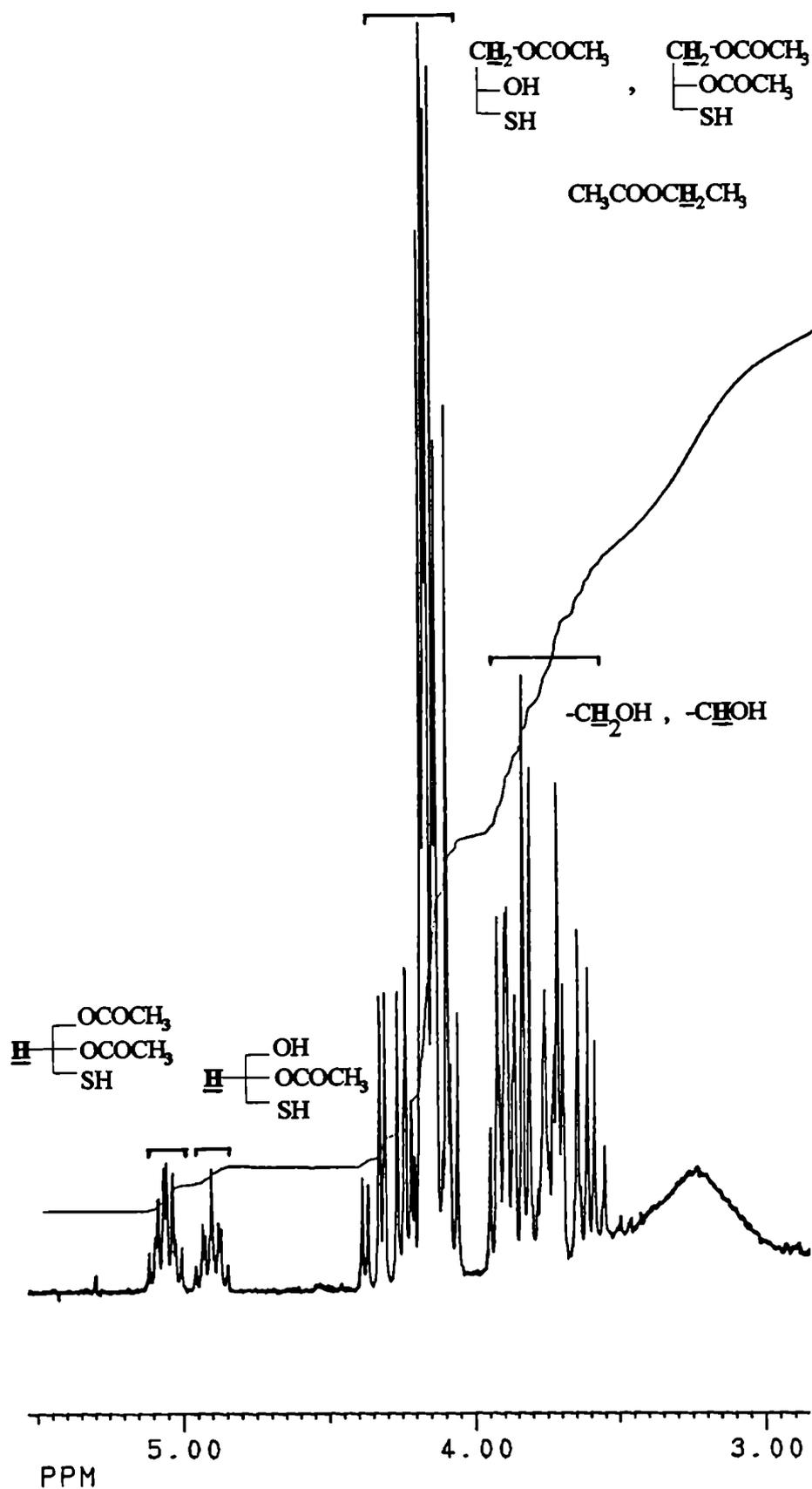
De este modo, el curso de las reacciones de transesterificación biocatalizadas de 1-tioglicerol con acetato de etilo a 25° y 27° (  $n = 0$  , Esquema 4.1 ), hexanoato de etilo a 28° (  $n = 4$  ) y tetradodecanoato de etilo (  $n = 12$  ) a 30° se determinó registrando los espectros de RMN- $^1\text{H}$  de alícuotas de reacción, eliminando la lipasa previamente por filtración.



**ESQUEMA 4.2** - Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) aproximados (en ppm) de hidrógenos de los tres productos de monoacilación de 1-tioglicerol en los espectros de RMN- $^1\text{H}$  14,16

Los espectros resultantes mostraron, en todos los casos, señales entre 4,1 y 4,3 ppm aproximadamente, asignables a hidrógenos de los respectivos productos de 1-O-acilación ( Esquema 4.2 ), sin que se observaran señales correspondientes a los otros dos isómeros. En cambio, cuando se analizó la reacción con acetato de etilo a 70° en presencia de CAL, las señales del espectro indicaron una mezcla de productos formada por 1-O-acetil-3-mercapto-1,2-propanodiol ( 32 ), 2-O-acetil-3-mercapto-1,2-propanodiol ( 43 ) y 1,2-di-O-acetil-3-mercapto-1,2-propanodiol ( 39 ) ( Figura 4.2 ).

Anteriormente se ha mencionado que los compuestos de fórmula general 48 presentan buena estabilidad a temperatura ambiente. Por lo tanto, la formación de los compuestos 1,2-di-O-acilados ( 39 - 42 ) podría explicarse suponiendo que la lipasa cataliza la acilación directa del



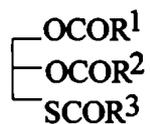
**FIGURA 4.2** - Aspecto del espectro de RMN- $^1\text{H}$  a 200 MHz entre 3,00 y 5,50 ppm de una alícuota a 4 horas de la reacción de 1-tioglicerol con acetato de etilo a  $70^\circ$  catalizada por CAL (solvente :  $\text{CDCl}_3$ )

hidroxilo secundario de los productos 1-O-acilados y no la acilación del grupo tiol. En este último caso se formarían los compuestos de fórmula general 48, que no fueron encontrados. Debido a que la eventual posterior migración del acilo desde el átomo de azufre hacia el hidroxilo secundario no es un proceso favorable, la ausencia de los compuestos expresados por 48 puede considerarse como otro hecho experimental que indicaría que en el medio de reacción enzimático, el grupo tiol no se encuentra disponible para su acilación, tal como se discutió con la serie de los  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles estudiados (Capítulo III).

Debido a que los compuestos 2-O-acilados (43 - 46) no fueron encontrados luego de purificar las mezclas de reacción mediante cromatografía en columna, cabría suponer dos posibilidades: si se formaron durante el transcurso de las transesterificaciones, se isomerizaron al compuesto 1-O-acilado durante la cromatografía en columna; en caso de no haberse formado a lo largo de las reacciones, se habrían originado en el cromatógrafo gaseoso. En algunos casos, con el empleo de dimetilpolisiloxano como fase fija de las cromatografías gaseosas (DB-5) se observó la formación de los 2-O-acilésteres e inclusive, de los 1-S-acil derivados, que nunca se aislaron al purificar las mezclas de reacción.

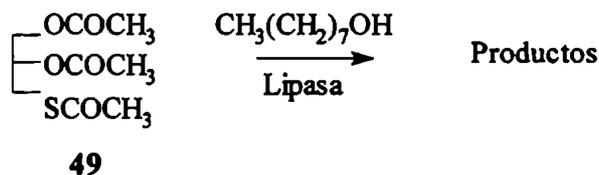
En síntesis, las transesterificaciones biocatalizadas de 3-mercapto-1,2-propanodiol que se acaban de describir permiten obtener selectivamente los mono-1-O-acil ésteres de dicha molécula, cuya existencia no había sido descrita hasta el presente. LIP resulta ser la enzima más conveniente desde el punto de vista preparativo.

Se ha descrito que el derivado de 1-tioglicerol sustituido con tres grupos oleílicos es un análogo de grasas de bajas calorías<sup>17</sup>. Los mono-1-O-acilésteres preparados en el presente trabajo pueden servir para la preparación de análogos de azufre de triglicéridos con tres sustituyentes distintos, compuestos que también podrían ser ensayados como análogos de grasas:



Por otra parte, los derivados 1-O-acilados de 3-mercapto-1,2-propanodiol constituyen análogos de azufre de monoglicéridos, sustancias ampliamente utilizadas para formar y estabilizar emulsiones<sup>18</sup>.

Finalmente, se estudió la transesterificación del producto de peracetilación de 1-tioglicerol ( 49 ) con exceso de n-octanol:



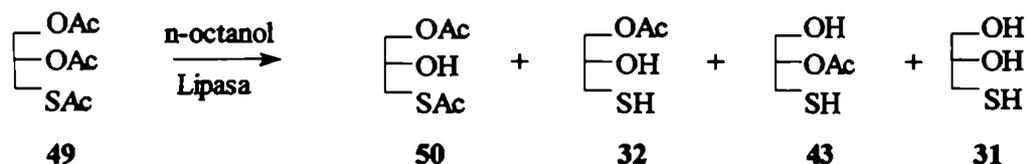
### ESQUEMA 4.3

cuyos resultados se describen en la Tabla 4.5.

Sin entrar a considerar la contribución de procesos de isomerización que pudiesen ocurrir bajo las condiciones del análisis, estos datos muestran que cada lipasa se comportó de un modo muy diferente, como en el caso de la alcoholólisis del acetato de 2-tioacetoxietilo ( 3 , Capítulo II ). PPL y LIP, que se habían mostrado inactivas frente a este último sustrato, catalizaron la alcoholólisis en esta ocasión.

Esto concuerda con resultados descritos en bibliografía: se ha visto que la naturaleza de los productos de desacetilación biocatalizada dependen fuertemente de la lipasa empleada. Algunos ejemplos son las alcoholólisis del octaacetato de la sacarosa<sup>19</sup> o de acetatos esteroideos<sup>20</sup>.

**TABLA 4.5 - Alcohólisis de 49 con n-octanol catalizada por lipasas<sup>a</sup>**  
( Esquema 4.3 )



Lipasa	% del producto indicado <sup>b</sup>				
	19	50	32	43	31
PPL	17,8	76,7	5,5	---	---
LIP	93,2	---	6,8	---	---
CCL	---	---	35,6	---	64,4
CAL	36,2	12,5	6,1	27,0	18,2

a- Se empleó una relación alcohol/éster = 7,5 y una E/S = 0,43.

b- Se indica la composición de las mezclas de reacción luego de 2 horas de iniciada la alcohólisis. Los porcentajes se determinaron por cromatografía gaseosa y la naturaleza de los productos por cromatografía gaseosa/espectrometría de masa.

## **2. Discusión del comportamiento de dioles en reacciones de acilación catalizadas por lipasas**

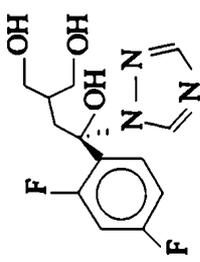
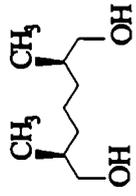
Las acilaciones catalizadas por PPL y LIP en medio orgánico de numerosos 1,n-dioles<sup>21-24</sup>, moléculas que poseen un hidroxilo primario y otro secundario, entre los que se encuentran el antibiótico cloranfenicol ( 51 , Tabla 4.6 ), conducen regioselectivamente a los ésteres en el hidroxilo primario. En la mayoría de las ocasiones se formaron pequeñas cantidades de diésteres, pero no se obtuvieron los productos de monoacilación en el hidroxilo secundario.



TABLA 4.6 - Ejemplos de acilación de 1,n-dioles catalizada por lipasas

Sustrato	Agente acilante	Lipasa	Producto	Referencia
	Ac <sub>2</sub> O	PPL		21
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> n = 0, 1, 2, 4, 6	PPL; <i>Chromobacterium viscosum</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; <i>Humicola langinosa</i>		22
	AcOCH=CH <sub>2</sub>	LIP		23
	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	PPL		24

TABLA 4.7 - Ejemplos de acilación catalizada por lipasas de dioles que poseen dos hidroxilos primarios

Sustrato	Agente acilante	Lipasa	Producto	Referencia
	AcOEt	PPL	1-mono-acetilado	25
	AcOCH=CH <sub>2</sub>	<i>Pseudomonas cepacia</i>	mono/diacetilado = 1,7	26
	AcOCH=CH <sub>2</sub>	<i>Pseudomonas sp.</i>	mono/diacetilado = 1,3	27

Como se ha visto anteriormente, las transesterificaciones catalizadas por lipasas de 1,2-dioles son altamente regioselectivas, pero se ha referido que las mismas transcurren con baja enantioselectividad<sup>23,24</sup>. Esto justificaría que los poderes rotatorios específicos de los 1-mono-O-acil derivados de 1-tioglicerol aislados hayan sido en todos los casos inferiores a 0,1 en valor absoluto. El 1-tioglicerol sin reaccionar aislado de cada mezcla de reacción tampoco originó valores de poder rotatorio específico apreciables. Por lo tanto, las transesterificaciones de 1-tioglicerol estudiadas no transcurrieron estereoselectivamente.

Estudiando la acilación biocatalizada de 1,2-dioles racémicos, Theil *et al* <sup>23</sup> también encontraron que la acilación regioselectiva en el hidroxilo primario ocurría sin enantioselectividad, pero hallaron que la acilación subsiguiente del producto de monoacilación, para dar los subproductos de diacilación, transcurría con alta enantioselectividad. En nuestro caso, cuando se aisló 1,2-di-O-propionil-3-mercapto-1,2-propanodiol ( 40 ) se midió un  $[\alpha]_D = +0,8$ . Este valor podría llegar a interpretarse como un indicio de enantioselectividad no nula considerando que los poderes rotatorios específicos de diglicéridos quirales no suelen tener valores altos<sup>9</sup>.

**Referencias bibliográficas**

1. A.Baldessari, L.E.Iglesias y E.G.Gros, *J. Chem. Res.* 204 (1992)
2. A.Baldessari, L.E.Iglesias y E.G.Gros, *Biotechnol. Letters* 16, 479 (1994)
3. L.E.Iglesias, A.Baldessari y E.G.Gros, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 6, 853 (1996)
4. J.W.Cox y L.A.Horrocks, *J. Lipid Research* 22, 496 (1981)
5. G.Renard, J.Grimaud, A.Elzant, M.Pina y J.Graille, *Lipids* 22, 539 (1987)
6. P.Sonnet y G.G.Moore, *Lipids* 24, 743 (1989)
7. B. Sjöberg, *Ber.* 75B, 13 (1942); *Chem. Abstr.* 36, 6138 (1942)
8. H.Svanholm, "Enzymatic interesterification and esterification", presentado en la AOCS, mayo 1989
9. A.W.Mazur, G.D.Giller, S.S.C.Lee, M.P.Armstrong y J.D.Wendel, *Chem. Phys. Lipids* 60, 189 (1991)
10. R.G.Jensen, F.A.Dejong y R.M.Clark, *Lipids* 18, 239 (1983)
11. J.Uppenbergh, M.Trier Hansen, S.Partkar y T.A.Jones, *Structure* 2, 293 (1994)
12. F.H.Mattson y R.A.Volpenhein, *J. Lipid Research* 3, 281 (1962)
13. B. Serdarevich, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 44, 381 (1967)
14. J.P.Ward, *Chem. Phys. Lipids* 47, 217 (1988)
15. M.Berger y M.P.Schneider, *Biotechnol. Lett.* 13, 333 (1991)
16. A.Heisler, C.Rabiller y L.Hublin, *Biotechnol. Lett.* 13, 327 (1991)
17. L.P. Klemann, J.W.Finley y A.Scimone, U.S. US 4.992.293 (Cl. 426-611; A23L1/307), *Chem. Abstr.* 115, 113287k (1991)
18. C.C.Akoh, *Biotechnol. Lett.* 15, 949 (1993)
19. D.C.Palmer y F.Terradas, *Tetrahedron Lett.* 35, 1673 (1994)
20. A.Baldessari, M.S.Maier y E.G.Gros, *ibid.* 36, 4349 (1995)
21. S. Ramaswamy, B.Morgan y A.C.Oehlschlager, *ibid.* 31, 3405 (1990)

22. G.Ottolina, G.Carrea y S.Riva, *J. Org. Chem.* 55, 2366 (1990)
23. F.Theil, J.Weidner, S.Ballschuh, A.Kunath y H.Schick, *ibid.* 59, 388 (1994)
24. A.J.M.Janssen, A.J.H. Klunder y B.Zwanenburg, *Tetrahedron* 47, 7409 (1991)
25. R.G.Lovey, A.K.Saksena y V.M.Girjavallabhan, *Tetrahedron Lett.* 35, 6047 (1994)
26. R.Chênevert y M.Desjardins, *J. Org. Chem.* 61, 1219 (1996)
27. Y.F.Wang y C.H.Wong, *ibid.* 53, 3127 (1988)
28. A.L.Margolin, J.Y.Crenne y A.M.Klibanov, *Tetrahedron Lett.* 28, 1607 (1987)
29. F.Binns, S.M.Roberts, A.Taylor y C.F.Willams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 899 (1993)
30. C.C.Akoh, C.Cooper y C.V.Nwosu, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 257 (1992)
31. V.Partali, L.Kvittingen, H.R.Sliwka y T.Anthonsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35, 329 (1996)



***CAPITULO V***



### 1. Acilación biocatalizada de ditioneitol y de ditioeritritol

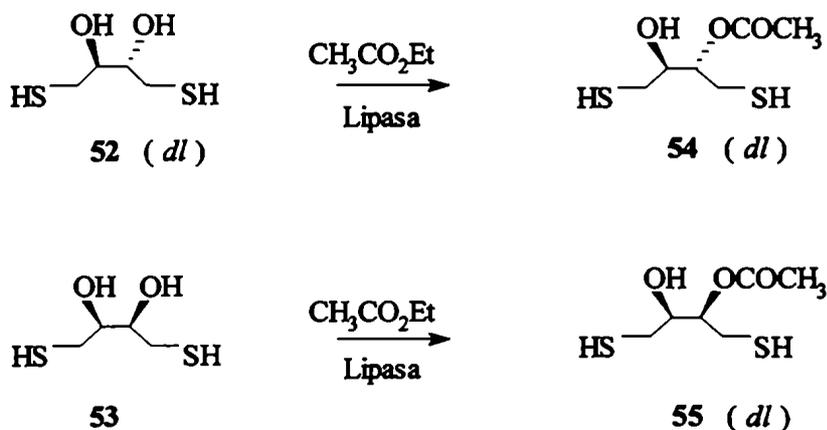
El ditioneitol ( DTT ; *treo*-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol ; **52** ) y el ditioeritritol ( DTE ; *eritro*-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol ; **53** ):



son moléculas diastereoisómeras que por su bajo potencial de óxido-reducción permiten reducir cuantitativamente disulfuros a tioles<sup>1</sup>. Además, poseen poca tendencia a oxidarse directamente por acción del aire. Por estas propiedades, ambos ditioneitroles son empleados comúnmente en bioquímica para evitar la oxidación de grupos tioles presentes en enzimas<sup>1</sup> o para reducir enlaces disulfuro de cistinas en proteínas<sup>2,3</sup>.

Hasta el presente, la bibliografía no registra la existencia de productos de monoacilación de estos hidroxialcanotioles polifuncionales, hecho que impulsó a estudiar sus reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas.

En primer lugar, se estudiaron las reacciones de DTT y de DTE con acetato de etilo en presencia de varias lipasas:



ESQUEMA 5.1

cuyos resultados se detallan en la Tabla 5.1.

**TABLA 5.1** - Reacción de DTT ( 52 ) y de DTE ( 53 ) con acetato de etilo en presencia de lipasas<sup>a</sup> ( Esquema 5.1 )

Lipasa	T (°)	E/S	Productos			
			t(h) <sup>b</sup>	% 54 <sup>c</sup>	t (h) <sup>b</sup>	% 55 <sup>c</sup>
PPL	30	0,65	91	18,6	672	7,1
LIP	30	0,65	168	31,7	336	2,0
CCL	30	1,95	336	40,9	336	26,0
CAL	30	1,95	336	53,4	336	37,7
	55	1,95	51	64,4	51	49,9

a- Las reacciones se llevaron a cabo a 180 rpm y empleando una relación A/S = 15.

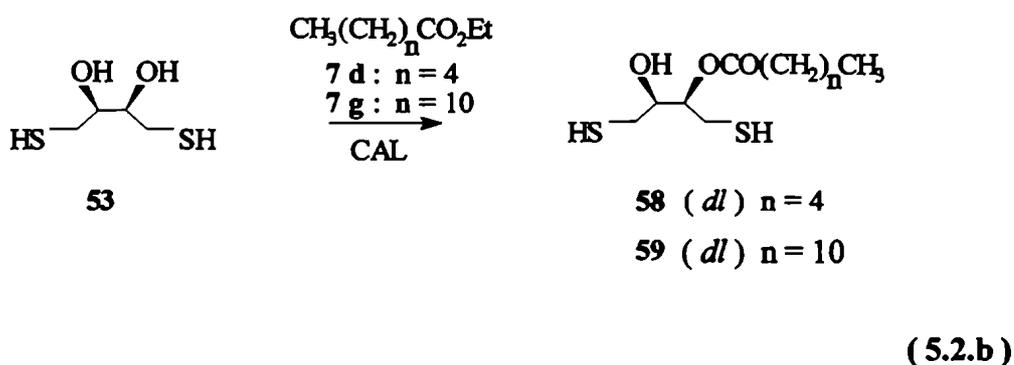
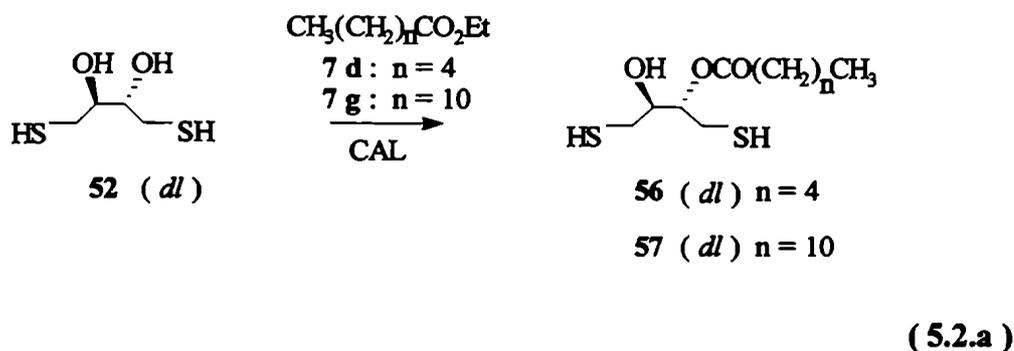
b- Se indican los tiempos a los que se observó la máxima conversión de los sustratos.

c- Determinados por cromatografía gaseosa.

Estos resultados muestran que las acetilaciones biocatalizadas descritas producen quimioespecíficamente los mono-O-acetatos de DTT y de DTE. De este modo, una vez más se repite el comportamiento selectivo encontrado con todos los hidroxialcanotioles previamente ensayados. Los largos tiempos de reacción requeridos tampoco afectaron el curso regioespecífico de la acetilación: como puede apreciarse, no hubo formación de productos di-O-acetilados, que habían sido detectados en algunas ocasiones durante las acilaciones biocatalizadas de 1-tioglicerol ( Capítulo IV ).

Para cada lipasa, DTT generó mayores grados de conversión que DTE. A su vez, el poder catalítico de las lipasas de *Candida* frente a ambos ditiotetritoles fue mayor que el de PPL y LIP.

Se decidió emplear CAL para continuar con el estudio de las transesterificaciones de estos sustratos con otros agentes acilantes:



### ESQUEMA 5.2

Debido a que DTT y DTE son dos sólidos que resultan insolubles en ésteres de mayor tamaño de cadena que el acetato de etilo, las acilaciones de los ditiotetritoles se probaron con distintos solventes. También se llevaron a cabo las transesterificaciones en ausencia de solvente, de manera tal que los sistemas de reacción consistían en suspensiones pastosas del sustrato y la lipasa en el agente acilante, sometidas a agitación mecánica.

Las Tablas 5.2 y 5.3 detallan los resultados obtenidos al ensayar las reacciones descritas en los Esquemas 5.2.a y 5.2.b, respectivamente.

Tal como se encontró en las reacciones de DTT y de DTE con acetato de etilo, las Tablas 5.2 y 5.3 permiten apreciar que estas transesterificaciones también transcurrieron quimio y regioespecíficamente. En efecto, en todos los casos se observó la formación exclusiva de los productos mono-O-acilados.

**TABLA 5.2 - Transesterificaciones de DTT ( 52 ) catalizadas por CAL<sup>a</sup>  
( Esquema 5.2.a )**

Agente acilante	Solvente	T (°)	t (h)	Producto	% Producto <sup>b</sup>
<b>7d</b>	-----	30	48	<b>56</b>	53,9
		55	23	<b>56</b>	60,3
	dioxano	30	96	<b>56</b>	33,1
	acetonitrilo	30	168	<b>56</b>	50,2
<b>7g</b>	-----	33	144	<b>57</b>	53,4
		55	48	<b>57</b>	62,5
	dioxano	30	168	<b>57</b>	18,1
	acetonitrilo	30	168	<b>57</b>	34,9

a- Las reacciones se llevaron a cabo a 200 rpm y empleando una relación E/S = 1,95. Se utilizaron relaciones A/S = 7,5 para los sistemas sin solvente y 5 para los sistemas con solvente.

b- Determinados por cromatografía gaseosa.

**TABLA 5.3 - Transesterificaciones de DTE ( 53 ) catalizadas por CAL<sup>a</sup>  
( Esquema 5.2.b )**

Agente acilante	Solvente	T (°)	t (h)	Producto	% Producto <sup>b</sup>
<b>7d</b>	-----	55	23	<b>58</b>	36,8 <sup>c</sup>
	dioxano	30	336	<b>58</b>	8,1
	acetonitrilo	30	168	<b>58</b>	11,3
<b>7g</b>	-----	55	23	<b>59</b>	63,4
	dioxano	30	48	<b>59</b>	6,5
	acetonitrilo	30	48	<b>59</b>	7,0

a- Las reacciones se llevaron a cabo a 200 rpm y empleando una relación E/S = 1,95. Salvo indicado lo contrario, se utilizaron relaciones A/S = 5.

b- Determinados por cromatografía gaseosa. c- Se empleó una A/S = 7,5.

Es interesante constatar las diferencias entre los resultados originados por los sistemas de reacción con solvente comparados con aquellos que no lo contenían. Los bajos resultados hallados con dioxano y acetonitrilo concuerdan con los descritos a menudo en bibliografía al utilizar solventes polares en transformaciones biocatalizadas ( página 20 ), si bien ya se discutió anteriormente que cada sistema formado por sustratos, lipasa y solvente presenta características particulares y no siempre los resultados pueden predecirse según la polaridad del solvente.

Las mezclas de reacción formadas por una suspensión pastosa del ditiotetritol y la lipasa en el agente acilante resultaron más satisfactorias, a pesar de su mayor heterogeneidad. También en el capítulo III se vio que las transesterificaciones biocatalizadas de 12-mercapto-1-dodecanol con butirato de etilo fueron satisfactorias aun cuando las mezclas de reacción no poseían solvente. Parece entonces que este tipo de sistema de reacción puede resultar adecuado; por otra parte, se ha comprobado que numerosas reacciones orgánicas clásicas transcurren eficientemente en estado sólido y en ausencia de solvente<sup>4</sup>.

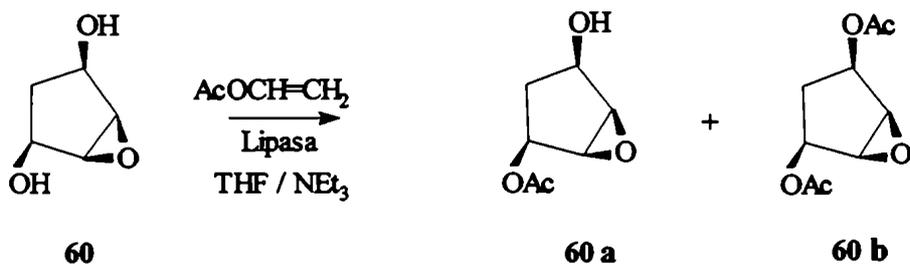
Analizando globalmente las reacciones de DTT y de DTE con los tres ésteres probados ( 7 a , Esquema 5.1 ; 7 d y 7 g , Esquema 5.2 ), surgen además otras conclusiones.

En todos los casos, DTT fue más reactivo que DTE, comportamiento que indicaría que la configuración de 52 es más favorable que la de 53 a los fines de interactuar con el sitio activo de la lipasa.

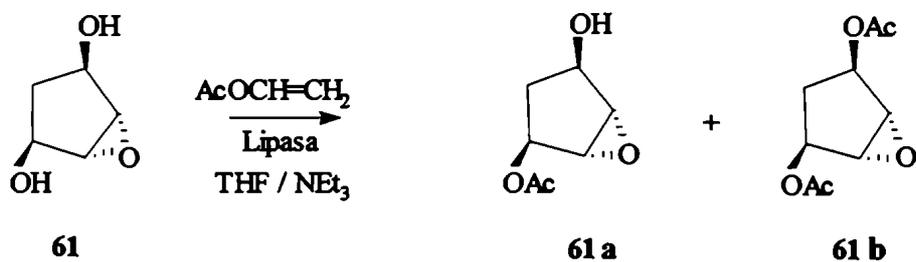
Las reacciones catalizadas por lipasas de los ciclopentanodiolos 60 y 61 <sup>5</sup> ( Tabla 5.4 ), de 6-acilmonosacáridos<sup>6</sup> y de desoxiazúcares<sup>7</sup> constituyen ejemplos de diastereoisómeros que presentan distinta reactividad en acilaciones biocatalizadas.

Dejando aparte las diferencias estereoquímicas entre DTT y DTE, ambos hidroxialcanotioles tienen en común el hecho de que no fueron muy reactivos en las biotransformaciones ensayadas. Una explicación de esta reactividad limitada reside en que los alcoholes secundarios son menos reactivos que los primarios en reacciones de acilación catalizadas por

**TABLA 5.4 - Acetilaciones biocatalizadas de los ciclopentanodiolos diastereoisómeros 60 y 61 ( Referencia 5 )**



Lipasa	t (h)	% 60a	% 60b
Amano PS	2	75	25
Lipozima	72	55	13
CAL (SP 382)	24	82	9



Lipasa	t (h)	% 61a	% 61b
Amano PS	8	< 5	---
Lipozima	8	< 5	---
CAL (SP 382)	168	56	9

lipasas<sup>8-10</sup>, una característica que ya fue comentada anteriormente. La menor reactividad de los alcoholes secundarios puede explicar por qué ni los tiempos largos de reacción ni la temperatura afectaron la regioespecificidad, a diferencia del comportamiento presentado por 1-tioglicerol, sustrato con un hidroxilo primario y otro secundario. Mientras que para el caso del 1-tioglicerol el aumento de la temperatura disminuyó la selectividad de las transesterificaciones en varias oportunidades, en los casos de DTT y DTE el incremento de la temperatura dio lugar a los mejores resultados.

Si se comparan DTT y DTE con 4-mercapto-1-butanol, otro sustrato de cuatro átomos de carbono ( Capítulo III ), se aprecia que el  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotiol, con su hidroxilo primario, fue más reactivo que los ditiotetritoles. Pero se recordará que 3-mercapto-2-butanol, molécula que también posee cuatro átomos de carbono, y en la que el grupo hidroxilo y el grupo tiol presentan respectivamente el mismo carácter secundario y primario que en DTT y DTE, tuvo una reactividad nula ( página 92 ).

Las diferentes reactividades de DTT, DTE y 3-mercapto-2-butanol, a los que puede sumarse 1-mercapto-2-propanol ( página 91 ) sirven para ilustrar que el comportamiento de un alcohol secundario en transesterificaciones catalizadas por lipasas depende mucho tanto la estructura del sustrato como de la lipasa empleada. Asimismo, la reactividad de los dioles y polioles cuyos hidroxilos son secundarios no se ajusta a un comportamiento sistemático<sup>5-7</sup> y la regioselectividad de sus reacciones contrasta con la de los 1,n-dioles ( Capítulo IV ).

## **2. Aproximación al estudio del curso enantioselectivo de las acilaciones biocatalizadas de ditiotreitól y de ditioeritritól**

En la Introducción ( Capítulo I ) se discutió a través de numerosos ejemplos el potencial de las enzimas para llevar a cabo transformaciones estereoselectivas que permiten la resolución de moléculas quirales y la obtención de productos con alta pureza quiral y diasteromérica.

En las páginas anteriores se describió que las transesterificaciones biocatalizadas de DTT y DTE ( Esquemas 5.1 y 5.2 ) ocurren quimio y regioespecíficamente. Independientemente de dichas propiedades, estas reacciones pueden haber transcurrido enantioselectivamente. Para DTE, esta eventual enantioselectividad representaría un caso de síntesis quiral, ya que constituiría la obtención de una molécula de alta pureza quiral a partir de un compuesto *meso*. En el caso de DTT, si las acilaciones fuesen enantioselectivas, se estaría además frente a un método de resolución de este ditiotetritol.

Por lo tanto, se decidió efectuar algunos estudios tendientes a evaluar el curso enantioselectivo de las transesterificaciones estudiadas.

El **exceso enantiomérico (ee)** es una magnitud que indica la pureza quiral de un compuesto. Se expresa como la diferencia entre la composición porcentual de cada enantiómero<sup>11</sup>; por ejemplo, un compuesto formado por 90 % de un enantiómero y 10 % del otro, presenta un ee del 80 %. De manera análoga se define el exceso diastereomérico (ed).

Cuando se conoce el poder rotatorio específico,  $[\alpha]_D$ , de un compuesto enantioméricamente puro (100%), el exceso enantiomérico de una muestra de dicho compuesto puede calcularse midiendo su rotación óptica y a través de la siguiente expresión:

$$ee = \left| \frac{[\alpha]_D \text{ muestra}}{[\alpha]_D} \right| \quad \text{Fórmula 5.1}$$

donde  $[\alpha]_D \text{ muestra}$  indica el poder rotatorio específico de la muestra del compuesto cuyo ee se desea conocer.

La reversibilidad de las acilaciones biocatalizadas tiene consecuencias muy importantes sobre la estereoselectividad de estas reacciones<sup>12</sup>. Se han desarrollado expresiones que vinculan el grado de conversión con la pureza óptica de sustrato y producto ( los respectivos

ee ) para acilaciones biocatalizadas en solvente orgánico llevadas a cabo bajo condiciones irreversibles<sup>13</sup> y reversibles<sup>14</sup>. A partir de estas expresiones puede verse que cuando se deja que las acilaciones lleguen al equilibrio, alcanzándose una situación de reversibilidad, disminuye el exceso enantiomérico del sustrato y del producto. En cambio, si estas reacciones están sujetas a control cinético, es decir, si transcurren irreversiblemente, tal como sucede con el empleo de agentes acilantes activados ( página 32 ), la estereoselectividad no se perjudica<sup>15</sup>.

Sin embargo, la reversibilidad de la reacción afecta la estereoselectividad sólo cuando la conversión del sustrato es mayor al 40 % <sup>15,16</sup>. Consecuentemente, al llevar a cabo transesterificaciones biocatalizadas de sustratos quirales con agentes acilantes reversibles, si se desea obtener un comportamiento estereoselectivo los grados de conversión no deben sobrepasar el 40 %.

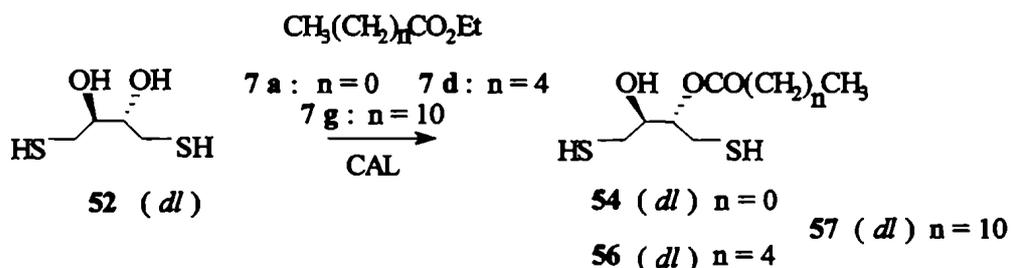
La correlación entre la enantioselectividad y las propiedades fisicoquímicas del solvente depende del sustrato. Tampoco puede establecerse una correlación segura entre la enantioselectividad y la longitud de la cadena carbonada del agente acilante<sup>17</sup>.

Las transesterificaciones catalizadas por CAL descritas en los Esquemas 5.1 y 5.2 fueron elegidas para estudiar su curso enantioselectivo. Motivó esta elección la numerosa cantidad de trabajos existentes en literatura donde se hace mención de las propiedades altamente enantioselectivas de la lipasa B de *Candida antarctica*<sup>18</sup> (Novozym 435™). Entre estos trabajos cabe mencionar a los de Hult y colaboradores<sup>19-21</sup> y a los de Gotor y colaboradores<sup>22-24</sup>.

Dado que el DTT es un compuesto para el que se conoce el poder rotatorio específico (  $[\alpha]_D$  ) de sus enantiómeros, la enantioselectividad de las transesterificaciones ensayadas se evaluó midiendo la rotación óptica del ditiotetritol que quedaba sin reaccionar cuando se interrumpieron las reacciones. Este momento fue elegido a grados de conversión adecuados

y previamente a la medición óptica, la mezcla del producto de acilación y el DTT se separaron mediante cromatografía en columna. La Tabla 5.5 presenta los resultados obtenidos.

**TABLA 5.5** - Rotación óptica del sustrato y los productos provenientes de transesterificaciones de DTT ( **52** ) catalizadas por CAL



Agente acilante	t (h) <sup>a</sup>	[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> DTT <sup>b</sup> (°)	ee (%) <sup>c</sup>	Producto (%) <sup>d</sup>	[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> producto <sup>b</sup> (°)
----	---	-16±1	100	---	---
<b>7a</b>	3	-2,9	18±1	<b>54</b> (31,8)	5,6
<b>7d</b>	1,5	4,1	26±2	<b>56</b> (34,1)	0,5
<b>7g</b>	2	0	0	<b>57</b> (27,1)	<0,1

a- Las reacciones se llevaron a cabo a 180 rpm y 30°, en ausencia de solvente, empleando una E/S = 1,95 en todos los casos y A/S = 15 para **7a** y 5 para los restantes acilantes.

b- Los poderes rotatorios se midieron con soluciones de concentración igual a 2 g del compuesto en 100 mL de cloroformo.

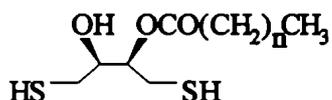
c- Calculado según Fórmula 5.1.

d- Los rendimientos se determinaron sobre producto aislado.

Los bajos valores de exceso enantiomérico logrados para el hidroxialcanotiol reflejan que estas transesterificaciones no resultaron útiles para la resolución de esta molécula. Es de esperar entonces que la formación de los productos de acilación haya transcurrido con baja enantioselectividad.

De todos modos, se advierte que bajo las condiciones ensayadas los tres agentes acilantes tuvieron distintos comportamientos. Frente a dodecanoato de etilo, la enantioselectividad desplegada por CAL fue nula, pero si bien con los otros dos acilantes el curso enantioselectivo fue muy pobre, el signo del  $[\alpha]_D$  del DTT recuperado en cada caso permite afirmar que mientras que con acetato de etilo la lipasa fue más discriminativa hacia un enantiómero, con hexanoato de etilo seleccionó más el otro enantiómero.

Para estudiar la enantioselectividad de las transesterificaciones de DTE, se recurrió a otro procedimiento, porque se partía de un compuesto ópticamente inactivo y tampoco se disponía de valores de  $[\alpha]_D$  de los compuestos **55**, **58** y **59** (Esquema 5.1 y 5.2.b):



**55** (dl)  $n = 0$

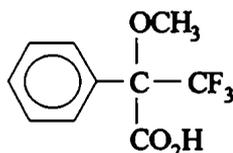
**58** (dl)  $n = 4$

**59** (dl)  $n = 10$

ya que éstos no han sido descritos hasta el presente trabajo.

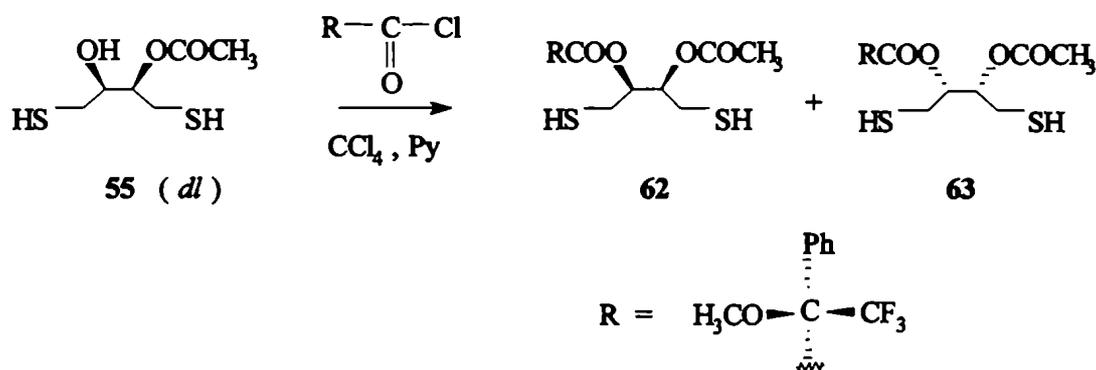
Procediendo de modo análogo con el descripto para DTT, las acilaciones de DTE catalizadas por CAL se llevaron a cabo sin solvente a 30° y bajo las condiciones experimentales detalladas en las Tablas 5.1 y 5.3. Transcurridos tiempos de reacción que no superaron las tres horas, las respectivas mezclas de reacción se purificaron por cromatografía en columna y se midieron los poderes rotatorios de **55**, **58** y **59**. El mayor valor de  $[\alpha]_D$  en valor absoluto correspondió al compuesto **55**, que aislado con un 14,2% de rendimiento luego de tres horas de reacción, dio un  $[\alpha]_D = -1,2$ , por lo que se decidió determinar el grado de pureza quiral de este compuesto.

Para esto, se pensó en preparar un éster de Mosher del compuesto **55**. Los ésteres de Mosher<sup>25</sup> se obtienen a partir de un alcohol y de uno de los enantiómeros del ácido [ $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -(trifluorometil)]fenilacético:



conocido comúnmente como ácido de Mosher. Cuando el alcohol de partida no es enantioméricamente puro, la reacción origina dos ésteres diastereoisómeros que pueden ser diferenciados por resonancia magnética nuclear<sup>25</sup>.

En la literatura, la preparación de ésteres de Mosher aparece con frecuencia como un método adecuado para la determinación del exceso enantiomérico de alcoholes provenientes de transformaciones biocatalizadas<sup>26-29</sup>, hecho que motivó ensayar la siguiente reacción:



### ESQUEMA 5.3

Luego de veintiún horas a 27°, el análisis por cromatografía gaseosa de una alícuota de reacción reveló la desaparición de **55** y mostró la presencia de dos compuestos que representaban el 88 % y cuyos tiempos de retención eran muy cercanos. Estos compuestos,

analizados por cromatografía gaseosa/espectrometría de masa, originaron dos espectros de masa casi idénticos, hecho que hizo pensar en su naturaleza diastereoisómera.

Se ha descrito que a 400 MHz se puede lograr una resolución de 0,02 ppm entre las señales de los hidrógenos de los metilos de acetatos diastereoisómeros<sup>27</sup>; a 500 MHz es posible alcanzar una resolución de hasta 0,001 ppm. El espectro de resonancia magnética nuclear de  $H^1$  a 500 MHz del líquido aislado tras finalizar la reacción presentaba, en la zona correspondiente a los hidrógenos de los grupos acetilo, dos señales muy intensas (singuletes) a 2,1958 y 2,2047 ppm. Por lo anterior, tanto los resultados hallados por cromatografía gaseosa como por resonancia magnética nuclear de  $H^1$  a 500 MHz indican que **55** no es ópticamente puro. La existencia de un multiplete a 1,38-1,54 ppm y de otro a 2,60-2,86 ppm indicó que en los ésteres de Mosher diastereoisómeros los grupos sulfhidrido se encuentran sin esterificar, mientras que se observó un multiplete adicional entre 5,10 y 5,23, zona de los protones metínicos,  $-CH_2-$ . Estos datos permitieron postular las estructuras **62** y **63** para los productos principales de la reacción descrita en el Esquema 5.3. En base a la integración de **62** y **63** en el cromatograma gaseoso, puede calcularse para **55** un ee del 67%.

Comparado con **54**, preparado bajo condiciones análogas a **55**, este último compuesto posee mayor pureza quiral (67 % frente a 18 %). Podría pensarse entonces que para la acetilación de DTT y de DTE con acetato de etilo en presencia de CAL, la lipasa es algo más enantioselectiva frente a la configuración *eritro*. No obstante, cabe mencionar que un valor de ee igual al 67 % sólo puede interpretarse como un grado de enantioselectividad pobre.

Hasta el presente, no es factible predecir si una acilación catalizada por lipasa transcurrirá estereoselectivamente, porque como ya se dijo, la naturaleza del sustrato, del agente acilante y las condiciones de reacción afectan complejamente a esta propiedad. Por ejemplo, así como para CAL se ha encontrado excelente estereoselectividad, también se han descrito resultados muy pobres<sup>30</sup>.

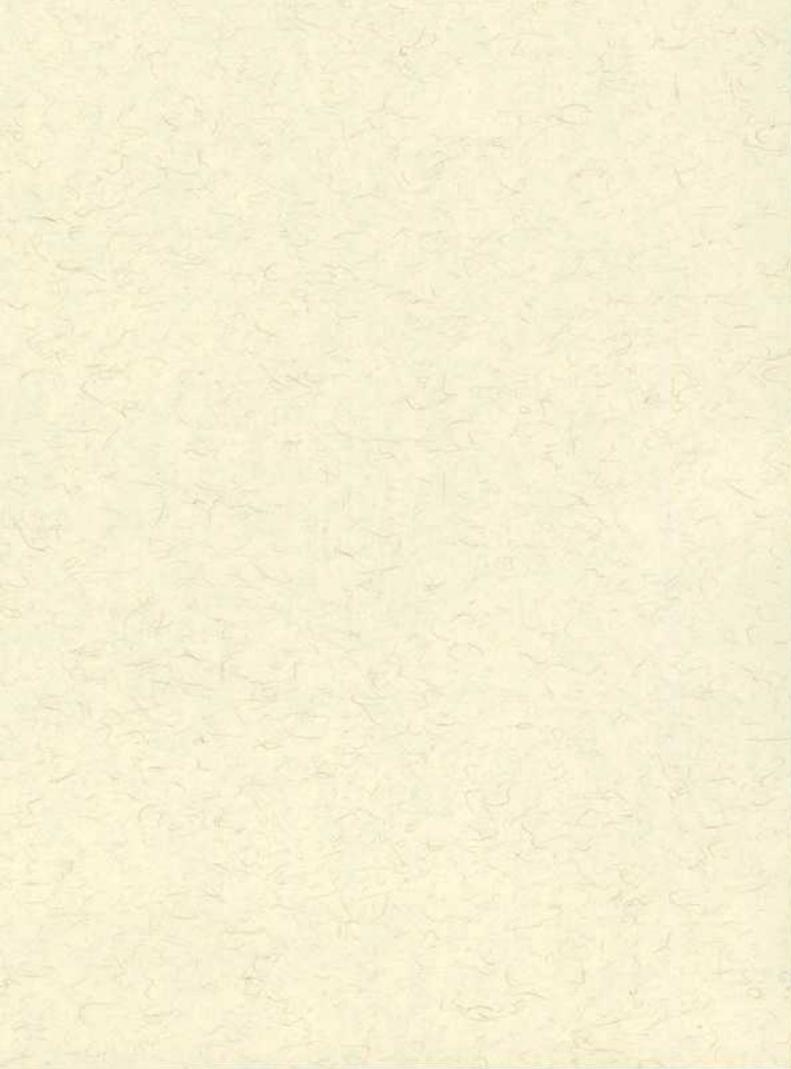
**Referencias bibliográficas**

1. W.W.Cleland, *Biochemistry* **3**, 480 (1964)
2. W.L.Zahler y W.W.Cleland, *J. Biol. Chem.* **243**, 716 (1968)
3. U.T.Rüegg y J.Rudinger, *Meths. Enzymol.* **47**, 111 (1977)
4. F. Toda, *Acc. Chem. Res.* **28**, 480 (1995)
5. F. Theil, H.Schick, G.Winter y G.Reck, *Tetrahedron* **47**, 7569 (1991)
6. M.Therisod y A.M.Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3977 (1987)
7. P.Ciuffreda, D.Colombo, F.Ronchetti y L.Toma, *J. Org. Chem.* **55**, 4187 (1990)
8. G. Kirchner, M.P.Scollar y A.M.Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7072 (1985)
9. H.S.Bevinakatti, A.A.Banerji y R.V.Newadkar, *J. Org. Chem.* **54**, 2453 (1989)
10. A.J.M.Janssen, A.J.H.Klunder y B.Zwanenburg, *Tetrahedron* **47**, 7645 (1991)
11. S.G.Davies, J.M.Brown, A.J.Pratt y G.M.Fleet, *Chem. Br.* 259 (1989)
12. K.Faber y S.Riva, *Synthesis* 895 (1992)
13. C.S.Chen, Y.Fujimoto, G.Girdaukas y J.C.Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7294 (1982)
14. C.S.Chen, H.S.Wu, G.Girdaukas y J.C.Sih, *ibid.*, **109**, 2812 (1987)
15. C.S.Chen y J.C.Sih, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **28**, 695 (1989)
16. T. Ema, S.Maeno, Y.Takaya, T.Sakai y M.Utaka, *Tetrahedron: Assym.* **7**, 625 (1996)
17. F.Secundo, S.Riva y G.Carrea, *ibid.*, **3**, 267 (1992)
18. J. Uppenberg, M.T.Hansen, S.Patkar y T.A.Jones, *Structure* **2**, 293 (1994)
19. H.Frykman, N.Öhrner, T.Norin y K.Hult, *Tetrahedron Lett.* **34**, 1367 (1993)
20. A.Mattson, N.Öhrner, K.Hult y T.Norin, *Tetrahedron: Assym.* **4**, 925 (1993)
21. N.Öhrner, «Lipase B from *Candida antarctica* as a stereoselective biocatalyst in acyl transfer reactions» - Tesis Doctoral, Royal Institute of Technology, Department of Biochemistry and Biotechnology, Stockholm, 1994.
22. V.Gotor, E.Menendez, Z.Mouloungui y A.Gaset, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **20**, 2453 (1993)

23. S.Puertas, R.Brieva, F.Rebolledo y V.Gotor, *Tetrahedron* 49, 4007 (1993)
24. M.Quirós, V.M.Sánchez, R.Brieva, F.Rebolledo y V.Gotor, *Tetrahedron: Assym.* 4, 1105 (1993)
25. J.A.Dale y H.S.Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 512 (1973)
26. P.Grisenti, P.Ferraboschi, A.Manzocchi y E.Santaniello, *Tetrahedron* 48, 3827 (1992)
27. H.J.Gais, H.Hemmerle y S.Kossek, *Synthesis* 169 (1992)
28. K.Mizuno, S.Sakuda, T.Nihira y Y.Yamada, *Tetrahedron* 50, 10849 (1994)
29. T.Hudlicky, M.A.A.Endoma y G.Butora, *Tetrahedron: Assym.* 7, 61 (1996)
30. N.Öhrner, M.Martinelle, A.Mattson, T.Norin y K.Hult, *Biotechnol. Lett.* 14, 263 (1992)



***CAPITULO VI***



### Preparación de $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles bifuncionales

Durante el desarrollo del presente trabajo se ha investigado el comportamiento de diversos  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles bifuncionales:



<b>1</b>	$m = 2$	<b>16</b>	$m = 8$
<b>14</b>	$m = 3$	<b>17</b>	$m = 12$
<b>15</b>	$m = 4$		

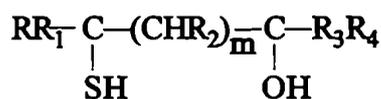
frente a reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas.

Salvo en el caso de 2-mercaptoetanol ( **1** ), los restantes  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles estudiados no son compuestos asequibles comercialmente, por lo que debió llevarse a cabo su preparación.

En literatura se ha descrito la existencia de distintos hidroxialcanotioles, entre los cuales los más frecuentes son los 2-hidroxialcanotioles y ciertos análogos azufrados de monosacáridos en los que un átomo de oxígeno, ya sea acetálico o no, está reemplazado por un azufre<sup>1</sup>.

La búsqueda bibliográfica de los métodos descritos hasta el presente para obtener hidroxialcanotioles reveló una serie de preparaciones bastante poco satisfactorias desde el punto de vista preparativo.

La síntesis de los hidroxialcanotioles bifuncionales de fórmula **64** :

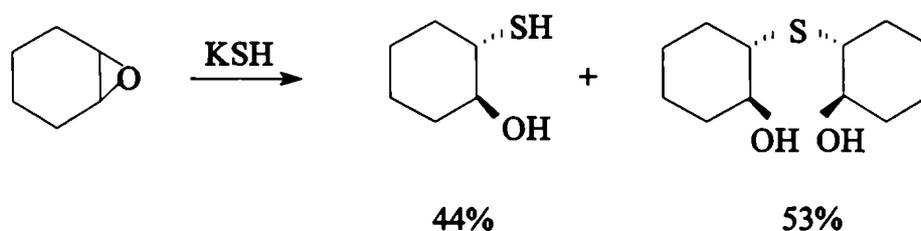


**64**

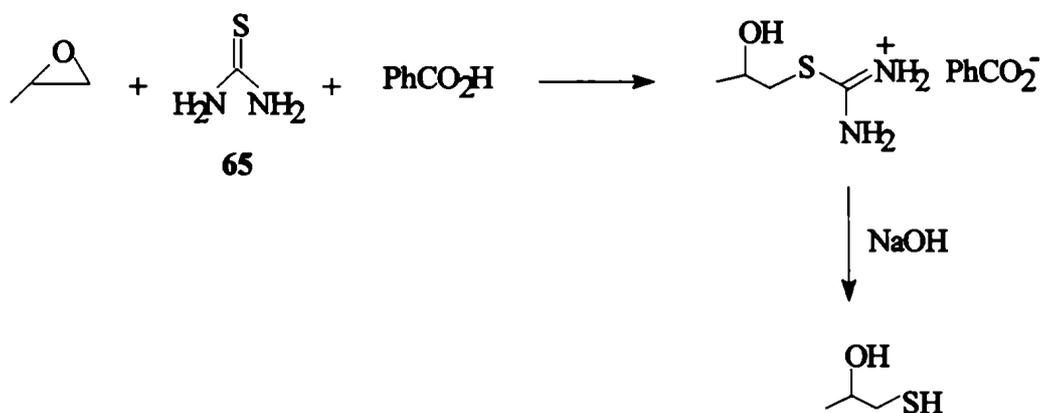
donde R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son hidrógeno, restos alquílicos, alicíclicos o arílicos involucra métodos preparativos diferentes dependiendo de si m es igual o distinto de 0.

1)  $m = 0$ 

Se trata de 2-mercaptoalcoholes, moléculas en las que los grupos tiol e hidroxilo se encuentran en carbonos adyacentes. Para estos compuestos, el método de obtención más adecuado parte del epóxido correspondiente<sup>2</sup>. La apertura del anillo oxiránico se ha llevado a cabo con sulfuro de hidrógeno en medio alcalino<sup>3</sup>, reacción que va acompañada por la formación de cantidades significativas del sulfuro correspondiente<sup>4</sup>:



También se ha descrito la apertura del epóxido por reacción con tiourea ( **65** ) y catálisis ácida; se forma así una sal de  $\beta$ -hidroxiisotiuronio intermediaria que por hidrólisis en medio alcalino conduce al 2-hidroxi-1-mercaptoalcohol<sup>5</sup>:



2)  $m \neq 0$ 

En este caso, los grupos funcionales no están en carbonos adyacentes y estos compuestos pueden ser obtenidos por métodos adecuados para la síntesis de tioles y de alcoholes en general.

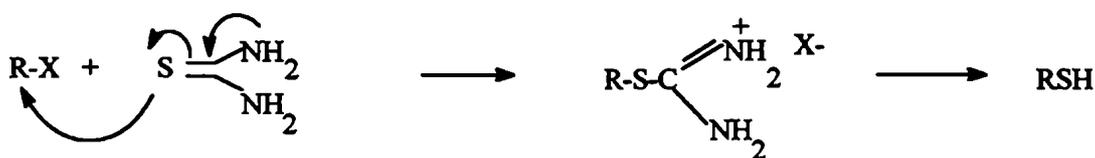
La existencia en bibliografía de preparaciones que parten de un precursor que ya contiene el tiol y otro grupo funcional que se transforma en alcohol, es muy escasa. Las informadas en literatura son reducciones de ácidos mercaptocarboxílicos con hidruro de aluminio y litio.

King y Rathore<sup>6</sup> mencionan la preparación de 3-mercapto-1-propanol ( 14 ) y de alcohol *o*-mercaptobencílico por reducción de los correspondientes ácidos carboxílicos con hidruro de aluminio y litio, así como también de alcohol *o*-(mercaptometil)bencílico por reducción de anhídrido tioftálico con el mismo hidruro. No obstante, en ninguno de estos casos informan el rendimiento con el que transcurren estas preparaciones, las cuales no habían sido descritas hasta ese momento.

Robinson *et al*<sup>7</sup> describen la reducción de ácido tioláctico (ácido 2-mercaptopropiónico) con hidruro de aluminio y litio para obtener 2-mercapto-1-propanol con un 39% de rendimiento.

La preparación de tioles que en la molécula poseen otro grupo funcional ha sido descrita con mayor frecuencia mediante métodos generales de obtención de tioles. En este caso, los compuestos de partida contienen, además del otro grupo funcional, uno que es precursor del tiol.

Los halogenuros de alquilo son reactivos especialmente versátiles para la síntesis de tioles<sup>8</sup>, ya que reaccionan con una amplia variedad de compuestos que contienen azufre, para dar especies intermediarias que posteriormente liberan el tiol. En particular, la reacción de los halogenuros de alquilo con tiourea<sup>9</sup> ( Esquema 6.1 ) produce, a través de una sustitución nucleofílica, una sal de S-(hidroxialquil)isotiouronio, que no necesita ser aislada y que en una reacción subsiguiente se hidroliza liberando el tiol:

**ESQUEMA 6.1**

Este método, ampliamente utilizado para preparación de mercaptanos, es experimentalmente simple, no da lugar a la formación de sulfuros y transcurre con rendimientos variados.

La obtención de tioles a través de la reacción con tiourea ha sido efectuada partiendo de numerosos halogenuros de alquilo de diversa naturaleza: saturados<sup>10</sup>, insaturados<sup>11</sup>, ácidos haloalquilcarboxílicos<sup>12</sup>, halohidrinás, etc. En este último caso los productos obtenidos son mercaptoalcoholes, y los así preparados descritos en bibliografía se obtuvieron con rendimientos que oscilan entre el 10 y el 60 %<sup>13-15</sup>.

Si se tiene en cuenta que la formación de la sal de S-alquilisotiuronio involucra una sustitución nucleofílica, el tiempo de reacción entre el halogenuro y la tiourea varía considerablemente con el tipo de halógeno presente en el haluro<sup>10</sup>. Los bromuros suelen requerir alrededor de tres o cuatro horas<sup>10,12,16</sup>, mientras que los cloruros reaccionan entre dieciséis y veinticuatro horas aproximadamente<sup>7,14</sup>.

El procedimiento más común para liberar el tiol es la hidrólisis alcalina de la sal con hidróxido de sodio<sup>7,10,12,14,16</sup>. Sin embargo, en este medio se ve favorecida la oxidación de los tioles a disulfuros por acción del aire debido a que, en presencia de oxígeno, se producen radicales tioles a partir de los tiolatos formados en el medio básico<sup>17</sup>. De hecho, algunos autores han detectado la formación de disulfuro durante preparaciones de tioles llevadas a cabo en medio alcalino, ya sea empleando la reacción con tiourea<sup>18</sup> u otros métodos<sup>19</sup>.

Si en la fórmula 64 ( página 137 ) todos los grupos R son hidrógenos, las moléculas en cuestión son  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles de cadena lineal no sustituidos,  $\text{HS}-(\text{CH}_2)_m\text{-OH}$ ,

algunos de los cuales se obtuvieron a lo largo de este trabajo y cuyas preparaciones se discuten a continuación.

### Preparación de 3-mercapto-1-propanol

Una búsqueda en literatura de los métodos existentes hasta el momento para obtener 3-mercapto-1-propanol ( 14 ) revela una serie de preparaciones que en general transcurren con rendimientos poco satisfactorios.

La reacción de 3-cloro-1-propanol<sup>20</sup> con sulfuro ácido de sodio da lugar a la formación de 3-mercapto-1-propanol con un 17% de rendimiento.

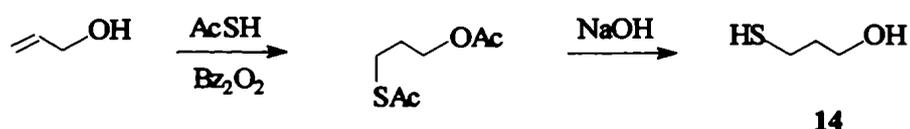
Por reacción de la misma halohidrina con tiourea en etanol a reflujo, seguida de hidrólisis con hidróxido de sodio se obtuvo 3-mercapto-1-propanol con 43% de rendimiento, acompañado de cantidades sustanciales del disulfuro<sup>18</sup>.

Empleando la misma reacción, pero tratando el 3-bromo-1-propanol con tiourea a reflujo y luego hidrólisis básica, el rendimiento fue del 28%<sup>16</sup>.

Se ha descrito la reacción de alcohol alílico con sulfuro de hidrógeno como método de preparación, irradiando con una lámpara de mercurio a 25°<sup>21</sup> o con catalizador de cobalto a presión<sup>22</sup>. En sendas preparaciones se forman el tioéter y el disulfuro, respectivamente.

También se ha informado la obtención mediante reacción de 3-bromo-1-propanol con *t*-C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>SNa seguida de reacción con ácido fosfórico 50% a 175°<sup>23</sup>.

Partiendo de alcohol alílico se desarrolló la siguiente preparación, en la que los autores no indican rendimiento<sup>24</sup> :



Utilizando ascaridol en vez de peróxido de benzoilo, Harding y Owen<sup>25</sup> refirieron la secuencia anterior con un rendimiento global del 29 % .

Robinson *et al*<sup>7</sup> han informado la preparación de 3-mercapto-1-propanol por reacción de 3-cloro-1-propanol con etilxantato de sodio (NaSCO<sub>2</sub>Et) seguida de reducción con hidruro de aluminio y litio del xantato intermediario formado. Se obtuvo el producto con un 35 % de rendimiento.

Como ya se mencionó, King y Rathore<sup>6</sup> redujeron ácido 3-mercaptopropiónico con hidruro de aluminio y litio, aunque no informaron ni condiciones de reacción ni rendimiento.

Si bien es posible reducir ácidos carboxílicos con hidruro de aluminio y litio<sup>26,27</sup>, esta reacción es menos satisfactoria que la reducción del correspondiente éster o cloruro de ácido y da lugar, en muchos casos, a bajos rendimientos de reacción. En particular, la reducción con hidruro de aluminio y litio del ácido tioláctico (ácido 2-mercaptopropiónico), un isómero de posición del ácido 3-mercaptopropiónico ( **66** ), cuya reducción se efectuó en nuestro laboratorio ( página 143 ), condujo a obtener 2-mercapto-1-propanol con un rendimiento del 39%<sup>7</sup>.

Más recientemente<sup>28</sup> se ha informado la obtención de 3-mercapto-1-propanol a través de sulfoboración del oxetano con sulfuro de *bis* (1,5-ciclooctano-diborilo) (sulfuro de 9-BBN) y posterior reacción con acetilacetona, con un rendimiento global del 83 %. Sin embargo, el reactivo de partida, sulfuro de 9-BBN, no es un compuesto accesible comercialmente, por lo que su obtención, a partir de 9-BBN y azufre elemental<sup>29</sup>, lleva el rendimiento global de la preparación al 69%.

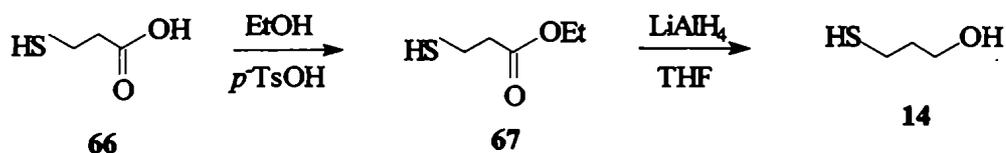
El tratamiento de ácidos carboxílicos con hidruro de *bis* (2-metoxietoxi) aluminio y sodio (SMEAH) ha sido descrito como un procedimiento conveniente para la reducción de estos compuestos<sup>30,31</sup> y permite obtener los alcoholes primarios correspondientes con buenos rendimientos<sup>31</sup>.

Debido a esto, inicialmente, en nuestro laboratorio se intentó preparar 3-mercapto-1-propanol por reducción del ácido 3-mercaptopropiónico ( **66** ) en un solo paso.

Con este fin, se trató una solución de ácido 3-mercaptopropiónico en tolueno a reflujo con SMEAH. El análisis por cromatografía gaseosa y posterior cromatografía gaseosa/espectrometría de masa del líquido proveniente de la reducción mostró una mezcla de ácido sin reaccionar,  $\beta$ -tiopropiolactona y 3-mercapto-1-propanol.

También se ensayó la reducción del ácido 3-mercaptopropiónico con borohidruro de sodio-ácido sulfúrico en tetrahidrofurano<sup>32</sup> a temperatura ambiente. En este caso la reacción ensayada tampoco fue útil desde el punto de vista sintético, ya que el cromatograma gaseoso del líquido aislado de la reacción mostró ácido sin reducir y 3-mercapto-1-propanol en proporción minoritaria.

La preparación de 3-mercapto-1-propanol se efectuó entonces según el siguiente esquema:



La obtención del 3-mercaptopropionato de etilo ( 67 ) se llevó a cabo por calentamiento del ácido 3-mercapto-propiónico con exceso de etanol en presencia de ácido *p*-toluensulfónico, reproduciendo así las condiciones experimentales de una técnica reciente<sup>33</sup>. En esta referencia los autores describen la preparación del éster etílico del ácido 2-mercaptopropiónico, bajo las condiciones mencionadas, con un dudoso rendimiento del 98%, ya que no desplazan del sistema de reacción el agua formada. En efecto, el 3-mercaptopropionato de etilo así preparado en nuestro laboratorio fue obtenido con 45 % de rendimiento, por lo que se llevó a cabo nuevamente la preparación en condiciones análogas, acompañadas de destilación azeotrópica durante el reflujo. De este modo pudo elevarse el rendimiento al 77 %, similar al informado en una preparación de 3-mercaptopropionato de etilo con condiciones experimentales semejantes a las empleadas en nuestro caso<sup>34</sup>.

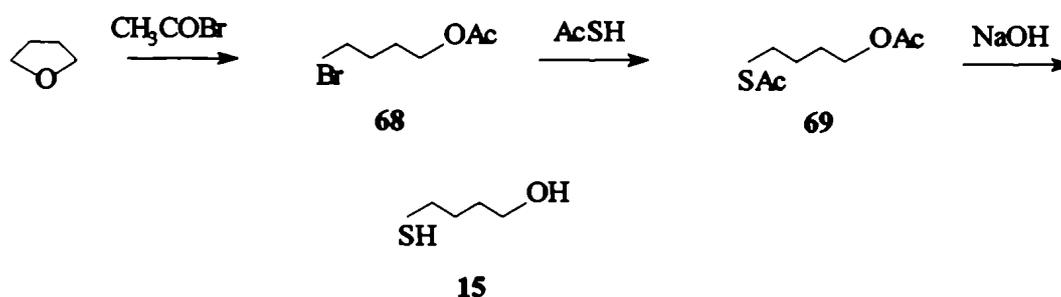
Por reducción de 3-mercaptopropionato de etilo con hidruro de aluminio y litio en tetrahidrofurano a temperatura ambiente se aisló 3-mercaptop-1-propanol con 84% de rendimiento.

De este modo se obtuvo el hidroxialcanotiol deseado con un rendimiento global del 65%.

### Preparación de 4-mercaptop-1-butanol

La obtención de 4-mercaptop-1-butanol ( 15 ) estaba descrita en bibliografía, mediante procedimientos que conducían al producto deseado con muy bajos rendimientos.

Harding y Owen<sup>25</sup> prepararon 4-mercaptop-1-butanol mediante la siguiente secuencia, mencionada en la página 90 al discutir la preparación de acetato de 4-mercaptopbutilo ( 22 ):



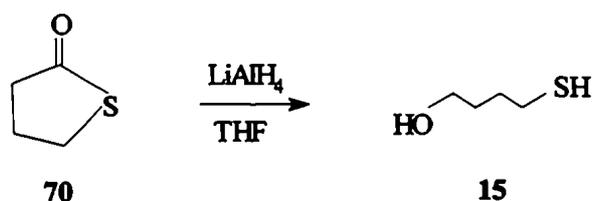
La reacción descrita por Cloke y Pilgrim<sup>35</sup> entre tetrahidrofurano y bromuro de acetilo daba lugar a una mezcla de productos cuya composición no fue estimada y que Harding y Owen no separaron, utilizando acetato de 4-bromobutilo ( 68 ) impuro para continuar con la secuencia. Por lo tanto, si bien no es posible precisar el rendimiento global con que obtuvieron 4-mercaptop-1-butanol, basándose en los rendimientos que los autores informan para el pasaje de 68 a 69 y de 69 a 4-mercaptop-1-butanol, puede afirmarse que debió ser bastante menor al 52 %.

A partir de acetato de 4-clorobutilo, Szarvasi<sup>36</sup> obtuvo el hidroxialcanotiol con un rendimiento global del 20%, según la siguiente secuencia:



Por otra parte, la sulfoboración de tetrahydrofurano seguida de tratamiento con acetilacetona<sup>28</sup> condujo a la obtención de 4-mercapto-1-butanol con un 63 % de rendimiento.

Considerando estos antecedentes, en nuestro laboratorio, la preparación de 4-mercapto-1-butanol se orientó hacia la reducción de la  $\gamma$ -tiobutirrolactona ( $\gamma$ -TBL, 70) con hidruro de aluminio y litio en tetrahydrofurano:



Se probaron distintas condiciones experimentales que se detallan en la Tabla 6.1.

**TABLA 6.1** - Reducción de  $\gamma$ -tiobutirrolactona con hidruro de aluminio y litio en tetrahydrofurano

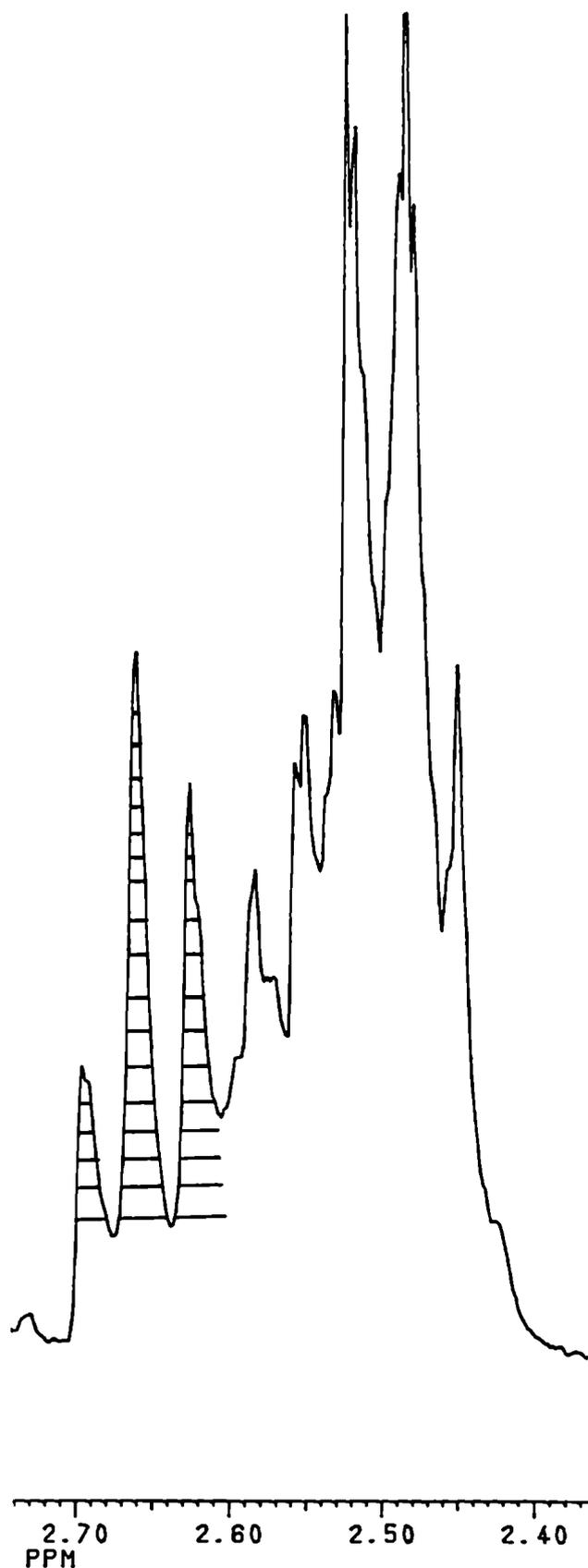
Temperatura (°)	Tiempo de reacción (h)	Relación LiAlH <sub>4</sub> / $\gamma$ -TBL	Productos obtenidos
25	72	5,0	ácido 4-mercaptobutírico
65	1,5	7,9	4-mercapto-1-butanol
65	5,5	5,0	4-mercapto-1-butanol
65	1,5	2,0	4-mercapto-1-butanol y 4-hidroxi-1-butildisulfuro
65	5,0	2,5	4-mercapto-1-butanol y 4-hidroxi-1-butildisulfuro

Por reacción a 25° durante tres días se obtuvo un líquido que al analizarse por cromatografía gaseosa presentó la tiolactona de partida y otro componente minoritario de elevado tiempo de retención. Este compuesto pudo ser aislado por cromatografía flash y en base a sus propiedades espectroscópicas se identificó como ácido 4-mercaptobutírico.

Cuando la reducción se llevó a cabo a reflujo empleando relaciones hidruro de aluminio y litio /  $\gamma$ -tiobutirilactona iguales a 7,9 y 5,0 durante los tiempos indicados en la Tabla 6.1, se obtuvo un producto cuyas propiedades espectroscópicas coincidieron con las descritas para el 4-mercapto-1-butanol<sup>7,14</sup>. El hidroxialcanotiol buscado fue obtenido con un 76% de rendimiento, lo que significó una mejora con respecto a los métodos existentes en literatura anteriormente discutidos. Además, hasta el presente, y a nuestro mejor saber, no ha sido informada ninguna reducción de una tiolactona.

La variación de la relación hidruro de aluminio y litio /  $\gamma$ -tiobutirilactona empleada mostró tener influencia sobre la reacción estudiada, hecho que puede observarse en la Tabla 6.1. En efecto, si la relación hidruro de aluminio y litio /  $\gamma$ -tiolactona disminuía a 2,0-2,5, por reacción a reflujo tanto una hora y media como durante cinco horas, se aislaba una mezcla que analizada por cromatografía gaseosa no indicaba la existencia de  $\gamma$ -tiobutirilactona. El espectro de resonancia magnética nuclear protónica de esta mezcla mostró un triplete centrado en  $\delta = 2,66$  ppm, con una  $J = 7$  Hz, señal debida a los dos hidrógenos adyacentes al enlace disulfuro,  $-\text{CH}_2\text{-S-S-}$  y que resulta de utilidad diagnóstica para detectar la presencia de disulfuro en estas mezclas de reacción. ( Figura 6.1 ). El análisis por cromatografía gaseosa/ espectrometría de masa de dicha mezcla presentó una señal correspondiente al 4-mercapto-1-butanol y otra en cuyo espectro de masa el ion molecular apareció a  $m/z = 210$ , que fue asignado al 4-hidroxi-1-butildisulfuro ( 71 ) :



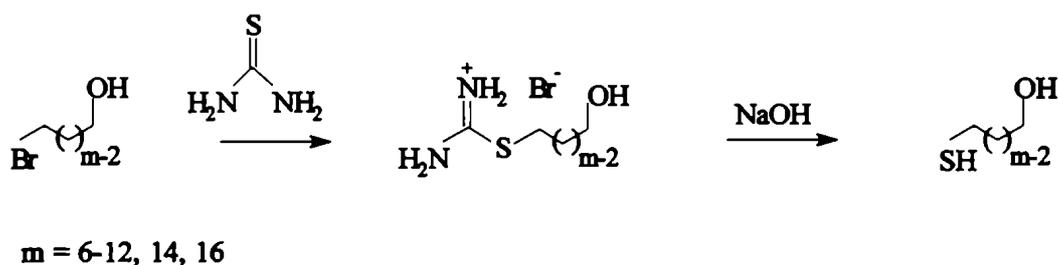


**FIGURA 6.1** - Fragmento del espectro de resonancia magnética nuclear protónica de la mezcla proveniente de la reducción de  $\gamma$ -tiobutirrolactona con hidruro de aluminio y litio en tetrahydrofurano a reflujo, empleando una relación  $\text{LiAlH}_4/\gamma\text{-TBL} = 2,0\text{-}2,5$

### Preparación de 8-mercapto-1-octanol y de 12-mercapto-1-dodecanol

Cuando se emprendió la obtención de los productos indicados, la literatura registraba solamente un trabajo sobre la obtención de 8-mercapto-1-octanol ( 16 ) y 12-mercapto-1-dodecanol ( 17 )<sup>15</sup>. En dicho trabajo se informaba la preparación de varios  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles  $\text{HO}-(\text{CH}_2)_n\text{-SH}$  (  $n = 6-12, 14, 16$  ) obtenidos a partir de las correspondientes halohidrinias a través de las respectivas sales de S-alquilisotiuronio.

Estas sales eran hidrolizadas con hidróxido de sodio, a reflujo:



Los autores mencionan que los rendimientos de estas preparaciones fueron bajos, oscilando entre el 10 y 30%. Además, sólo se refieren de modo global a todos los compuestos formados, no dando ningún tipo de dato particular acerca de los compuestos de nuestro interés (  $m = 8, 12$  ).

En nuestro caso, ambos compuestos fueron obtenidos por reacción del correspondiente  $\omega$ -bromo-1-alcohol con tiourea para dar una sal de S-( $\omega$ -hidroxi-1-alquil) isotiuronio, la cual, por posterior ruptura en un medio adecuado, generó el tiol.

Por tratamiento de 8-bromo-1-octanol primero con tiourea en etanol a reflujo y luego por calentamiento con hidróxido de sodio acuoso, se obtuvo con 67 % de rendimiento un líquido puro por cromatografía gaseosa, que desarrolló coloración intensa con el reactivo de Ellman y que fue identificado espectroscópicamente como 8-mercapto-1-octanol.

Cuando se hizo reaccionar 12-bromo-1-dodecanol con tiourea en etanol a reflujo y posteriormente se hidrolizó calentando con hidróxido de sodio acuoso, se aisló un producto cuyo cromatograma gaseoso presentó dos señales en relación 1:1 aproximadamente. En el espectro de resonancia magnética nuclear protónica de esta mezcla se observaron, entre otras, una señal entre 2,47 y 2,58 ppm, asignable a los hidrógenos del carbono adyacente al grupo tiol,  $-\text{CH}_2\text{SH}$ , y un triplete centrado en 2,68 ppm ( $J = 8 \text{ Hz}$ ) debido a los hidrógenos del carbono unido al enlace disulfuro,  $-\text{CH}_2\text{-S-S-}$ . En efecto, el análisis por cromatografía gaseosa/espectrometría de masa permitió asignar los dos componentes de la mezcla al 12-mercapto-1-dodecanol y al 12-hidroxi-1-dodecildisulfuro,  $\text{HO}-(\text{CH}_2)_{12}\text{-S-S-}(\text{CH}_2)_{12}\text{-OH}$  (72).

Ya se comentó que si bien el procedimiento más habitual para la ruptura de las sales de S-alquil-isotiuronio es la hidrólisis alcalina, es sabido que este medio favorece la oxidación de los tioles a disulfuros, especialmente para los mercaptanos de mayor peso molecular<sup>4</sup>. En bibliografía existen algunos ejemplos en los que se ha ensayado con mejores resultados otros procedimientos para la hidrólisis de la sal. Se ha descrito que no hubo formación de disulfuro cuando se reflujo la sal en una solución del álcali desgasificada y en atmósfera de nitrógeno<sup>39</sup>; por otra parte, la hidrólisis en bicarbonato de sodio con calentamiento<sup>40</sup> o en etanol a reflujo<sup>41</sup> condujo a la obtención de los tioles sin producción de disulfuro. Cabe señalar que todos estos ejemplos se limitan a muy pocos compuestos que además son bastante específicos estructuralmente.

En este trabajo, y con el objeto de ensayar distintas condiciones de ruptura del bromuro de S-(12-hidroxi-1-dodecil)isotiuronio tendientes a evitar la formación lateral de disulfuro, la sal fue aislada y purificada. En la Tabla 6.2 se presenta un esquema de los reactivos probados y los resultados obtenidos.

Aun probando la hidrólisis con hidróxido de sodio acuoso desgasificado a reflujo en atmósfera de nitrógeno, el producto resultante presentó disulfuro en proporción similar al tiol.

TABLA 6.2 - Ruptura del bromuro de S-(12-hidroxi-1-dodecil)-isotiuronio

Reactivo	Solvente	Temperatura (°)	Tiempo (h)	Productos obtenidos
NaOH	etanol-agua	78	3	tiol + disulfuro
NaOH	agua <sup>a</sup>	78	3	tiol + disulfuro
NaHCO <sub>3</sub>	agua	25	16	no se observó reacción
NaBH <sub>4</sub>	metanol	25	18	tiol + disulfuro
Zn	ácido acético	25	20	tiol

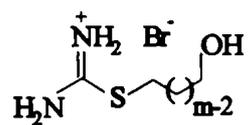
a- Desgasificada y en atmósfera de nitrógeno.

En el caso de usar bicarbonato de sodio para la ruptura, se recuperó la sal de S-alquilisotiuronio de partida.

Ya que el pasaje de una sal de S-alquilisotiuronio al correspondiente tiol puede ser considerado como una reducción, se decidió probar si alguno de los reactivos que reducen el enlace disulfuro a tiol <sup>42</sup>, y que evitarían la oxidación de este último, son capaces de escindir la sal en cuestión. No existe en literatura ninguna ruptura de estos compuestos llevada a cabo en presencia de un reactivo reductor.

Por reacción del bromuro de S-(12-hidroxi-1-dodecil)isotiuronio con borohidruro de sodio en metanol a temperatura ambiente, si bien hubo ruptura de la sal, no pudo evitarse la formación de disulfuro. Finalmente, al emplear como reductor cinc en ácido acético, se logró obtener 12-mercapto-1-dodecanol libre de disulfuro.

Debido a que ambos bromuros de S-( $\omega$ -hidroxi-1-alkil)isotiuronio:



73 m = 8

74 m = 12

no han sido descritos hasta el momento, los mismos fueron aislados, purificados y caracterizados espectroscópicamente ( ver Capítulo VIII ).

**Referencias bibliográficas**

1. D.H.Barton and W.D.Ollis, *Hydroxyalkanethiols*, en *Comprehensive Organic Chemistry*, Pergamon Press, Oxford, 1979, Volumen 3, pág 25.
2. S.Patai, *The chemistry of the thiol group*, John Wiley & Sons, London, 1974, Parte 1 , pág. 169 ; pág. 248 .
3. C.C.J.Culvenor, W.Davies y N.S.Heath, *J. Chem. Soc.*, 278 (1949)
4. Referencia 2, pág.181.
5. F.G.Bordwell y H.M.Andersen, *J. Amer. Chem. Soc.*, 75 , 4959 (1953)
6. J.F.King y R.Rathore, *Tetrahedron Letters*, 30 , 2763 (1989)
7. P.L.Robinson, J.W.Kelly y S.A.Evans, *Phosphorus and Sulfur*, 31 , 59 (1987)
8. Referencia 2, pág. 166.
9. Referencia 2, pág. 186.
10. G.G.Urquhart, J.W.Gates y R.Connor, *Org. Synth. Coll.* , III , 363 (1965)
11. H.J.Backer y J.Kramer, *Rec. Trav. Chem.* 53 , 1101 (1934)
12. N.H.Koenig, G.S.Sasin y D.Swern, *J. Org. Chem.*, 23 , 1525 (1958)
13. E.J.Goethals y M.Verzele, *Bull. Soc. Chim. Belges*, 74 , 21 (1965)
14. J.F.King, M.R.Webster, N.Chiba, J.K.Allen, K.J.M.Parker, R.Rathore y S. Skonieczny, *Phosphorus and Sulfur*, 31 , 161 (1987)
15. C.Miller, P.Cuendet y M.Grätzel, *J. Phys. Chem.*, 95 , 877 (1991).
16. R.Harry Cragg y M.Nazery, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 13 , 1438 (1974)
17. Referencia 2, Parte 2, pág. 809.
18. R.O.Clinton, C.M.Suter, S.C.Laskowski, M.Jackman y W.Huber, *J. Amer. Chem. Soc.*, 67 , 594 (1945)
19. C.D.Bain, E.B.Troughton, Y.Tao, J.Evall, G.M.Whitesides y R.G.Nuzzo, *J. Amer. Chem. Soc.*, 111 , 321 (1989)
20. C.A. Rojahn y G. Lemme, *Arch. Pharm.* 263 , 612 (1925)

21. W.E.Vaughan y F.F.Rust, Patente U.S. 2.398.480 , Apr.16, 1946 ;  
*Chem. Abstr.* 40 , 3766 (1946)
22. A.M.Alvarado, Patente Brit. 578 , 124 , June 17, 1946 ;  
*Chem. Abstr.* 41 , 2429 (1947)
23. B.Loew y J.F.Olin, Patente U.S. 3.069.472 , Dec.18, 1962 ;  
*Chem. Abstr.* 59, 7495 (1963)
24. R.Brown, W.E.Jones y A.R.Pinder, *J. Chem. Soc.* 2123 (1951)
25. J.S.Harding y L.N.Owen, *J. Chem. Soc.* 1536 (1954)
26. W.G.Brown, *Organic Reactions* 6 , 469 (1951)
27. J.Málek, *Organic Reactions* 36 , 265 (1988)
28. R.Köster y R.Kuczniarz, *Liebigs Ann. Chem.*, 835 (1992)
29. R.Köster y G.Seidel, *Inorganic Synthesis* 29 , 60 (1992)
30. J.Málek y M.Cerny, *Synthesis* 217 (1972)
31. M.Cerny, J.Málek, M.Capka y V.Chvalovsky, *Collect. Czech. Chem. Commun.*,  
34 , 1025 (1969)
32. A.Abiko y S.Masamune, *Tetrahedron Letters* 5517 (1992)
33. D.Bianchi y P.Cesti, *J. Org. Chem.* 55 , 5659 (1990)
34. P.Karrer y H.Schmid, *Helv. Chim. Acta* 27 , 124 (1944)
35. J.B.Cloke y F.J.Pilgrim, *J. Amer. Chem. Soc.* 61 , 2667 (1939)
36. M.E.Szarvasi, *Bull. Soc. Chim. France* 463 (1950)
37. J.T. Doi, G.W.Luehr y W.K.Musker, *J. Org. Chem.* 50 , 5716 (1985)
38. A.J.Speziale, *Organic Synthesis*, IV, 401 (1963)
39. E.F.Vanin y T.H. Ji, *Biochemistry*, 20 , 6754 (1981)
40. V.Horák, *Chem. Listy*, 48 , 414 (1954)
41. R.N.Prasad, C.W.Noell y R.K.Robins, *J. Amer. Chem. Soc.*, 81 , 193 (1959)
42. Referencia 26, páginas 314 y 322.

***CAPITULO VII***



## **Espectrometría de masa de sustratos y productos de acilaciones biocatalizadas descritas en este trabajo**

Durante el desarrollo de esta investigación, los sustratos empleados en las transesterificaciones catalizadas por lipasas y los productos provenientes de las mismas se caracterizaron mediante sus espectros de masa y de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  ( ver Parte Experimental, Capítulo VIII ).

Dado que un gran número de estas moléculas no ha sido descrito hasta el presente y considerando que los espectros de masa de aquellas que figuran en literatura tampoco han sido muy estudiados, resulta de interés efectuar un estudio sistemático de sus espectros de masa, obtenidos mediante ionización por impacto electrónico a 70 eV.

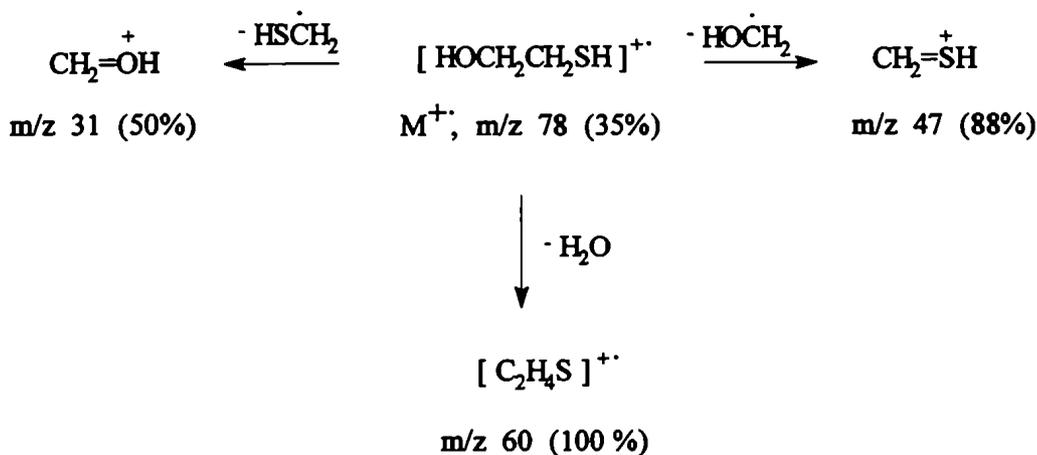
Con esta finalidad, las moléculas a analizar pueden agruparse en las siguientes familias:

- 1) hidroxialcanotioles bifuncionales;
- 2) ésteres de  $\omega$ -mercaptoalquilo;
- 3) derivados acilados de 1-tioglicerol;
- 4) derivados mono-O-acilados de ditiotreitól y de ditioeritritol.

Su comportamiento en espectrometría de masa se discutirá a continuación.

### **Hidroxialcanotioles bifuncionales**

La bibliografía registra espectros de masa de compuestos de esta familia<sup>1,2</sup>, pero sólo se ha propuesto un esquema de fragmentación para el 2-mercaptoetanol<sup>3</sup>:



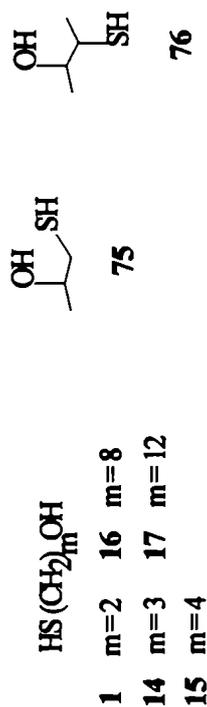
**ESQUEMA 7.1** - Esquema de fragmentación propuesto para el 2-mercaptoetanol  
(Referencia 3)

Este espectro ha servido para ilustrar la influencia que poseen distintos grupos funcionales sobre el esquema de fragmentación<sup>1,3</sup>. Es sabido que los heteroátomos dirigen los procesos de ruptura<sup>4</sup> y para el caso de 2-mercaptoetanol, la localización de carga puede efectuarse preferencialmente sobre el átomo de azufre, ya que sus electrones sin aparear poseen un potencial de ionización considerablemente más bajo que los del átomo de oxígeno<sup>5</sup>. Esto significa que el azufre, menos electronegativo que el oxígeno, estabiliza mejor una carga positiva<sup>6</sup>, y así se explica que los iones más importantes del espectro de masa de 2-mercaptoetanol surjan de estructuras donde la carga positiva reside sobre el átomo de azufre. Con respecto al pico base del espectro,  $m/z = 60$ , aunque ha sido mencionado en literatura<sup>3,6,7</sup>, siempre se lo representó como  $[\text{C}_2\text{H}_4\text{S}]^{+\cdot}$ , sin detallar su estructura.

Los espectros de masa de los hidroxialcanotioles se detallan en la Tabla 7.1.

En primer lugar, el Esquema 7.2 propone un camino general de fragmentación para los  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles. En estos compuestos se observa que a medida que aumenta el peso molecular, disminuye la importancia del átomo de azufre para dirigir los procesos de

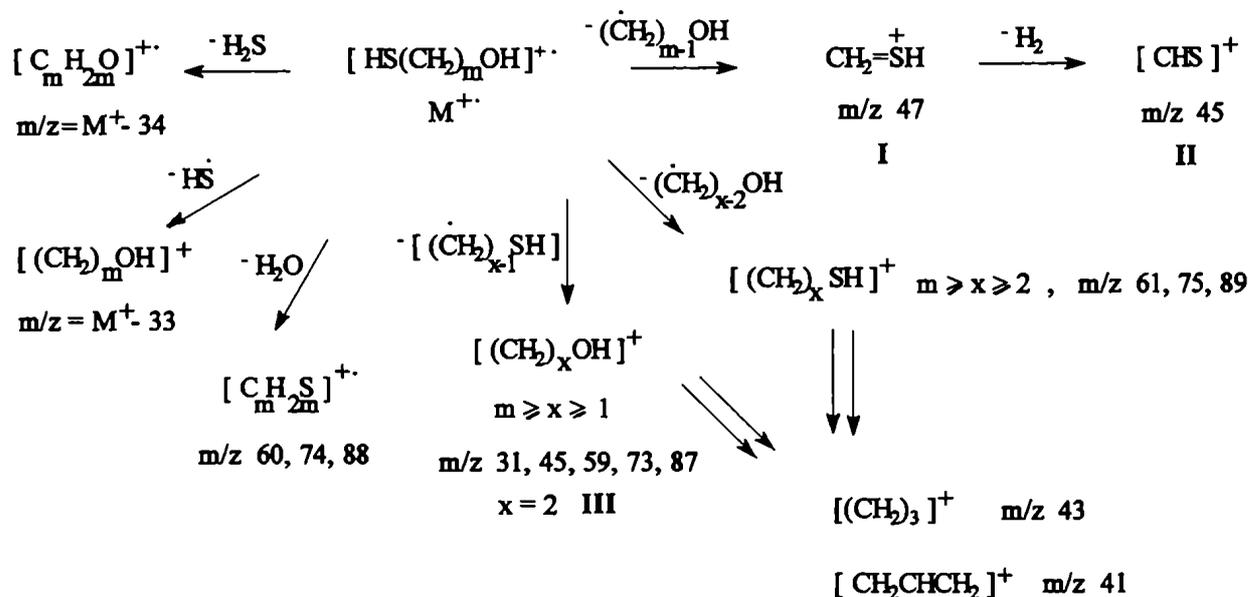
**TABLA 7.1 - Abundancias relativas de fragmentos específicos en los espectros de masa de hidroalcanotioles\***



Compuesto	m/z (%)								
	$M^+$	$[(\text{CH}_2)_x\text{SH}]^+$ b	$45^c$	$M^+ - 33$	$M^+ - 34$	$[(\text{CH}_2)_x\text{OH}]^+$ d	$M^+ - 18$	$43$	$41$
		<b>47</b>	<b>61</b>	<b>89</b>	<b>45<sup>c</sup></b>	<b>87</b>			
<b>1</b>	<b>78</b> (40)	(53) (6) (0)	(27)	<b>45</b> (27)	<b>44</b> (11)	(27) (0)	<b>60</b> (100)	(31)	(5)
<b>14</b>	<b>92</b> (60)	(46) (39) (0)	(26)	<b>59</b> (17)	<b>58</b> (87)	(26) (0)	<b>74</b> (56)	(50)	(100)
<b>15</b>	<b>106</b> (3)	(52) (10) (7)	(25)	<b>73</b> (10)	<b>72</b> (1)	(25) (8)	<b>88</b> (100)	(25)	(41)
<b>16</b>	<b>162</b> (0)	(38) (15) (6)	(13)	<b>129</b> (1)	(0)	(13) (58)	<b>144</b> (2)	(20)	(100)
<b>17</b>	<b>218</b> (1)	(12) (8) (14)	(8)	<b>185</b> (1)	(0)	(8) (100)	<b>200</b> (5)	(30)	(53)
<b>75</b>	<b>92</b> (12)	(19) (2) (0)	(100)	<b>59</b> (21)	<b>58</b> (3)	(100) (0)	<b>74</b> (16)	(17)	(16)
<b>76</b>	<b>106</b> (32)	(21) (39) (0)	(100)	<b>73</b> (16)	<b>72</b> (1)	(100) (0)	<b>88</b> (1)	(36)	(7)

\* En bastardilla se indican valores de m/z de los fragmentos, mientras que las abundancias respectivas se señalan entre paréntesis.

a- Concuerda cualitativamente con el descrito en Referencia 3. b- No se consideró el ion a  $m/z = 75$  por presentar una abundancia muy baja en todos los espectros. c- Sobre este ion, ver observaciones en el texto. d- Los iones a  $m/z = 59$  y  $73$  no se consideraron por presentar abundancias bajas.



**ESQUEMA 7.2** - Esquema de fragmentación propuesto para  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles

fragmentación. Hay varios indicios de este comportamiento. Uno de ellos lo constituye el ion producido por ruptura  $\alpha$  al sulfhidrido,  $[\text{CH}_2\text{SH}]^+$  (I,  $m/z = 47$ ), de interés diagnóstico en tioles primarios, cuya intensidad decrece del compuesto 1 al compuesto 17. Las señales originadas por pérdida de agua a partir del ion molecular, que forman una serie homóloga a  $m/z = 60, 74, 88 \dots$ , que se discutirá más adelante, pasan de ser picos base en los compuestos 1 y 15 a una abundancia muy pobre en los compuestos 16 y 17. Estas tendencias se manifiestan claramente en el espectro de masa del compuesto 17, en el que las señales de mayor importancia correspondieron a un ion de la serie de los alcoholes ( $m/z=87$ ) y al catión alilo ( $m/z = 41$ ). Por lo tanto, en estas moléculas, cuando se fija la naturaleza de los grupos funcionales y se varía la longitud de la cadena hidrocarbonada, la abundancia de los iones no puede predecirse en función de la habilidad del heteroátomo para localizar una carga positiva. Esta disminución de la importancia del átomo de azufre para dirigir las rupturas concuerda con lo descrito en bibliografía para tioles monofuncionales de peso



Según las rupturas del Esquema 7.3, en 75 y 76 el átomo de oxígeno posee una influencia mucho mayor que el de azufre sobre los procesos de fragmentación. Al comparar los pares de isómeros de posición 14, 75 y 15, 76, el oxígeno parece tener predominio sobre el azufre para dirigir las rupturas si forma parte de un hidroxilo secundario, aun cuando la molécula posea un grupo tiol.

### Esteres de ω-mercaptoalquilo

Estas moléculas bifuncionales poseen un grupo éster y un sulfhidrilo. La longitud del α,ω-hidroxicanotiol precursor dio lugar a cinco series de compuestos:

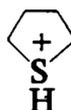


de las que se obtuvieron los espectros de masa ( Tablas 7.2 a 7.6 ).

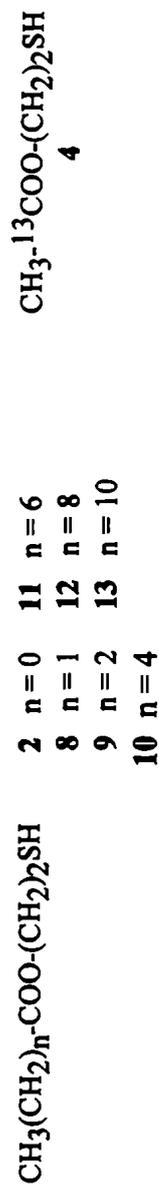
En todas estas series se observaron los iones de la serie  $[(\text{CH}_2)_x\text{SH}]^+$  ( $m/z = 47, 61, 75, 89$ ) con intensidades muy variables. La señal a  $m/z = 61$  se destacó en los ésteres de 2-mercaptoetilo, serie dentro de la cual constituyó una de las señales más importantes de los espectros. En caso de que este ion proviniera de tioles primarios lineales, se han propuesto dos estructuras posibles<sup>11</sup>:



En los espectros de masa de tioles, el ion a  $m/z = 89$ :



**TABLA 7.2 - Abundancias relativas de fragmentos específicos en los espectros de masa de ésteres de 2-mercaptoetilo\***



Compuesto	m/z (%)															
	$\text{M}^+$	$[(\text{CH}_2)_x\text{SH}]^+$	45	$\text{M}^+-33$	60	$\text{RCO}^+$	$\text{RCOOH}^+$	$\text{RCOOH}_2^+$	$[\text{C}_x\text{H}_{2x+1}]^+ \text{ a}$	$[\text{C}_x\text{H}_{2x-1}]^+ \text{ a}$						
		<b>47</b>	<b>61</b>						<b>43</b>	<b>57</b>	<b>71</b>		<b>41</b>	<b>55</b>	<b>69</b>	
<b>2</b>	<b>120</b> (1)	(13)	(32)	(38)	(4)	(100)	<b>43</b> (100)	<b>60</b> (100)	<b>61</b> (32)							
<b>4</b>	<b>121</b> (3)	(21)	(87)	(49)	(10)	(37)	<b>44</b> (100)	<b>61</b> (87)	<b>62</b> (7)							
<b>8</b>	<b>134</b> (14)	(100)	(99)	(100)	(11)	(99)	<b>57</b> (100)	<b>74</b> (66)	<b>75</b> (99)							
<b>9</b>	<b>148</b> (3)	(5)	(75)	(43)	(22)	(77)	<b>71</b> (86)	<b>88</b> (15)	<b>89</b> (100)				<b>42</b> (56)			
<b>10</b>	<b>176</b> (1)	(6)	(97)	(63)	(5)	(97)	<b>99</b> (92)	<b>116</b> (6)	<b>117</b> (91)	(100)	(92)	(74)	<b>56</b> (84)	(100)	(88)	(24)
<b>11</b>	<b>204</b> (1)	(5)	(67)	(21)	(36)	(66)	<b>127</b> (94)	<b>144</b> (43)	<b>145</b> (100)	(59)	(66)		<b>84</b> (61)	(58)	(63)	(30)
<b>12</b>	<b>232</b> (0)	(1)	(86)	(16)	(3)	(100)	(0)	<b>172</b> (20)	<b>173</b> (61)	(79)	(73)		<b>42</b> (31)	(40)	(30)	
<b>13</b>	<b>260</b> (0)	(3)	(79)	(19)	(0)	(94)	(0)	<b>200</b> (94)	<b>201</b> (6)	(100)	(96)	(89)	<b>56</b> (31)	(86)	(81)	(59)

\* En tipo bastardilla se indican valores de m/z de los fragmentos, mientras que las abundancias respectivas se señalan entre paréntesis.  
a- Se detalla la intensidad de estos iones sólo cuando la misma superó el 20% de abundancia relativa.

**TABLA 7.3 - Abundancias relativas de fragmentos específicos en los espectros de masa de ésteres de 3-mercaptopropilo\***

CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SH

18 n = 0  
 19 n = 2  
 20 n = 4  
 21 n = 6

Compuesto	m/z (%)									
	M <sup>+</sup> .	[(CH <sub>2</sub> ) <sub>x</sub> SH] <sup>+</sup>	45	M <sup>+</sup> .	33	74	RCO <sup>+</sup>	RCOOH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	[C <sub>x</sub> H <sub>2x+1</sub> ] <sup>+</sup> a	[C <sub>x</sub> H <sub>2x</sub> ] <sup>+</sup> a
18	134 (10)	(58) (24)	(34)	(9)	(9)	(100)	43 (88)	61 (50)	43 57 71	41 55 69
19	162 (1)	(19) (3)	(9)	(0)	(0)	(100)	71 (65)	89 (10)	(59)	(65)
20	190 (10)	(77) (15)	(88) (25)	(13)	(13)	(97)	99 (100)	117 (83)	(94)	(98)
21	218 (1)	(7) (1)	(21) (3)	(0)	(0)	(100)	127 (33)	145 (11)	(30)	(29)

\* En bastardilla se indican valores de m/z de los fragmentos, mientras que las abundancias respectivas se señalan entre paréntesis.

a- Se detalla la intensidad de estos iones sólo cuando la misma superó el 20% de abundancia relativa.



TABLA 7.5 - Abundancias relativas de fragmentos específicos en los espectros de masa de ésteres de 8-mercaptooctilo\*



Compuesto	m/z (%)												
	M <sup>+</sup> .	[(CH <sub>2</sub> ) <sub>x</sub> SH] <sup>+</sup>	45	M <sup>+</sup> -33	74	88	RCO <sup>+</sup>	RCOOH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	[C <sub>x</sub> H <sub>2x+1</sub> ] <sup>+</sup> a	[C <sub>x</sub> H <sub>2x</sub> ] <sup>+</sup> a	[C <sub>x</sub> H <sub>2x-1</sub> ] <sup>+</sup> a		
25	204 (0)	(15) (19) (5)	(5)	(0)	(3) (5)	43 (100)	61 (1)	43	57	71	41	55	69
26	260 (1)	(28) (16) (14)	(11)	(0)	(5) (11)	99 (71)	117 (51)	(100)	(32)	42 (30)	(100)	(96)	(71)
27	288 (0)	(20) (14) (14)	(8)	(1)	(4) (10)	127 (59)	145 (45)	(55)	(72)	42 (22)	(89)	(100)	(65)

\* En bastardilla se indican valores de m/z de los fragmentos, mientras que las abundancias respectivas se señalan entre paréntesis. a- Se detalla la intensidad de los iones sólo cuando la misma superó el 20% de abundancia relativa.

TABLA 7.6 - Abundancias relativas de fragmentos específicos en los espectros de masa de ésteres de 12-mercaptododecilo



Compuesto	m/z (%)											
	M <sup>+</sup> .	[(CH <sub>2</sub> ) <sub>x</sub> SH] <sup>+</sup>	45	M <sup>+</sup> -33	74	88	RCO <sup>+</sup>	RCOOH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	[C <sub>x</sub> H <sub>2x+1</sub> ] <sup>+</sup> a	[C <sub>x</sub> H <sub>2x</sub> ] <sup>+</sup> a	[C <sub>x</sub> H <sub>2x-1</sub> ] <sup>+</sup> a	
28	260 (1)	(15) (36) (14)	(5)	(2)	(6) (17)	43 (100)	61 (36)	(22)	56 (20)	(54)	(82)	(49)
29	288 (2)	(18) (11) (72)	(6)	(1)	(4) (16)	71 (100)	89 (72)	(94)	42 (20)	(82)	(88)	(40)

\* En bastardilla se indican valores de m/z de los fragmentos, mientras que las abundancias respectivas se señalan entre paréntesis. a- Se detalla la intensidad de los iones sólo cuando la misma superó el 20% del pico base.

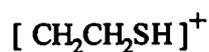
suele presentarse con un valor de abundancia variable<sup>9,12</sup>, siempre menor que la del fragmento I ( Esquema 7.2 ), pero de cualquier forma atribuible a la estabilidad especial de un sulfuro cíclico de cinco miembros<sup>9</sup>. A juzgar por los resultados obtenidos con tioles primarios, la formación de un ion sulfuro de seis miembros ( $m/z$  103) está menos favorecida que la correspondiente al fragmento de cinco miembros; así, en nuestro caso, en los espectros de los ésteres de 8-mercaptooctilo y 12-mercaptododecilo, el ion a  $m/z$  103 fue prácticamente despreciable.

En el espectro del compuesto 2, el miembro más sencillo de esta familia, hay dos estructuras posibles para el ion a  $m/z = 60$ , pico base del espectro:

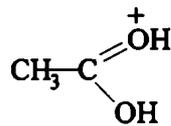


Ambas pueden generarse mediante un reordenamiento de Mc Lafferty dirigido por el átomo de oxígeno, que transcurre dando lugar a un ácido carboxílico y un alqueno. En los espectros de masa de ésteres, el alqueno suele ser el que retiene la carga<sup>13</sup>; en nuestro caso, además, el alqueno formado contiene un átomo de azufre, hechos que apoyan la suposición de que el ion a  $m/z = 60$  esté compuesto principalmente por 77 y no por 78. Más aún, el ácido acético ( 78 ) es un ion que en general aparece en los espectros de masa de ésteres con una abundancia muy distante de la observada para el ion a  $m/z = 60$  en todos los ésteres de 2-mercaptoetilo<sup>13</sup>. Con la excepción de los ésteres de 2-mercaptoetilo, en las demás series las señales debidas a los ácidos carboxílicos tuvieron intensidades muy bajas.

En el espectro del compuesto 2, también se advierte que hay dos posibles estructuras que justifican la señal a  $m/z = 61$ :

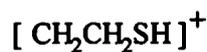


IV

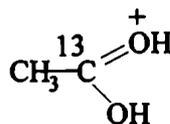


V

Para el compuesto 4 las estructuras anteriores deben aparecer, respectivamente, a  $m/z = 61$  y 62:



IV

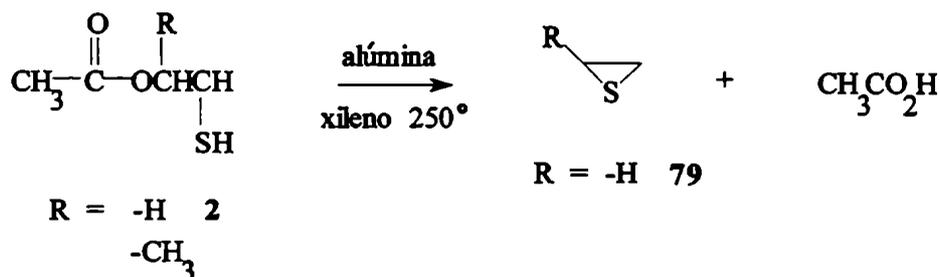
 $m/z$  61

VI

 $m/z$  62

y como el ion a  $m/z = 62$  sólo tiene una abundancia del 7 %, podría suponerse que la estructura V no contribuye muy significativamente al ion a  $m/z = 61$  en el espectro del compuesto 2.

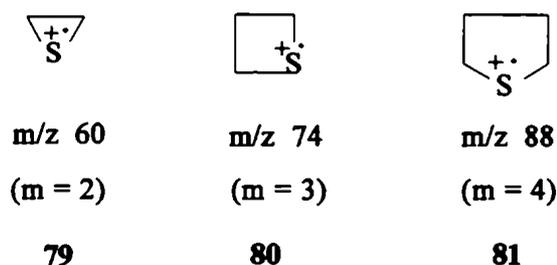
La especie 77 también constituye una estructura posible para el ion  $[\text{C}_2\text{H}_4\text{S}]^+$ , pico base del espectro de 1 (Tabla 7.1). En bibliografía<sup>14</sup> se encontró la descomposición térmica de dos ésteres de 2-mercaptoetilo según la siguiente transformación, en la que el sulfhidrilo realiza un ataque nucleofílico intramolecular favorecido por el grupo funcional vecino, que actúa como grupo saliente:



El tamaño del anillo que se forma es muy importante para este tipo de fenómeno; los más favorables son los anillos de tres, cinco o seis miembros, en el orden citado<sup>15,16</sup>. La reacción anterior coincide formalmente con el reordenamiento de Mc Lafferty y conduce a la formación de un episulfuro o tiirano; la estructura **79** es una de las propuestas para el ion a  $m/z = 61$  ( página 160 ). Por otra parte, Harding y Owen<sup>17</sup> encontraron el tiirano **79** durante la hidrólisis alcalina de **2**. Cabría suponer entonces que **79** es otra estructura posible, junto con **77** ( página 165 ), para el ion a  $m/z = 60$  observado en los espectros del compuesto **2** y de los ésteres de 2-mercaptoetilo.

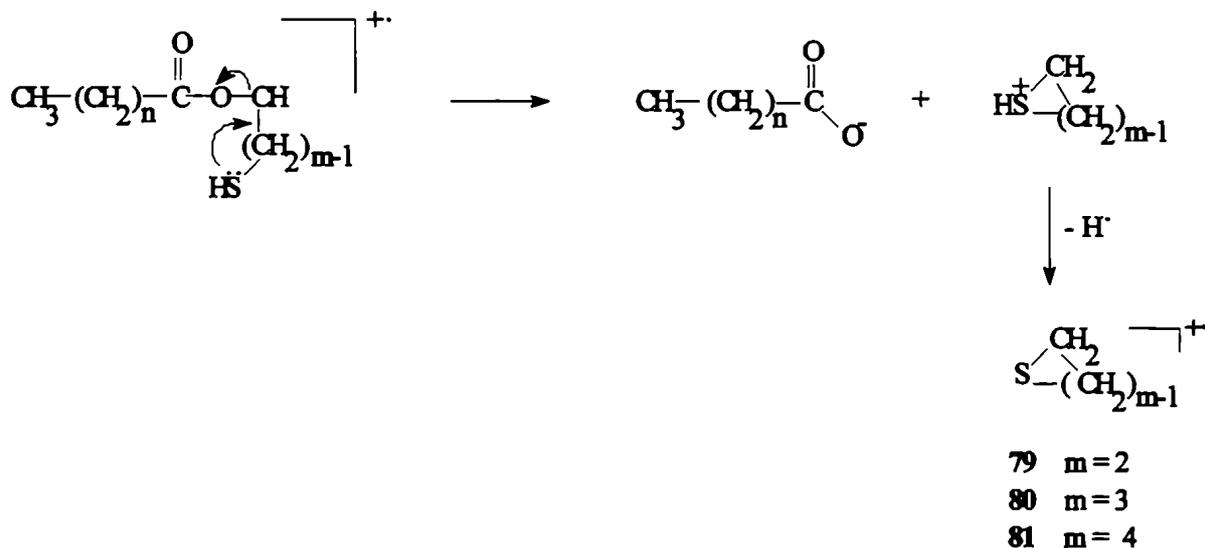
En la Tabla 7.2 se puede apreciar que el ion a  $m/z = 60$  mantuvo una intensidad relativamente constante independientemente del aumento del número de carbonos del grupo acilo y análogamente, esto ocurrió con la señal a  $m/z = 74$  en los espectros de los ésteres de 3-mercaptopropilo ( pico base en la mayoría de los casos, Tabla 7.3 ) y con el ion a  $m/z = 88$  en los ésteres de 4-mercaptobutilo ( Tabla 7.4 ). Sin embargo, las señales análogas en las series con  $m = 8$  ( Tabla 7.5 ) y  $m = 12$  ( Tabla 7.6 ),  $m/z = 144$  y  $200$ , respectivamente, decayeron a una intensidad que no sobrepasó el 10%.

En definitiva, se está en presencia de tres iones que contienen azufre y cuya abundancia destacada es relativamente independiente del tamaño de la molécula que los origina. Estos hechos se pueden justificar postulando estructuras cíclicas para cada uno de los tres iones en discusión:



Independientemente de la estabilidad especial de la estructura de tetrahidrotiofeno ( **81** ), los sulfuros se caracterizan por ser aún más estables que sus análogos oxigenados, los éteres<sup>18</sup>. Por eliminación de los correspondientes  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles con dietoxitrietilfosforano, Robinson *et al*<sup>19</sup> describieron la obtención y caracterización de los sulfuros **79**, **80** y **81** como moléculas estables. Podría conjeturarse entonces que la estructura **79** es más probable que **77** ( páginas 167 y 165 ) para describir el ion a  $m/z = 60$  en los espectros del compuesto **1** y de los ésteres de 2-mercaptoetilo.

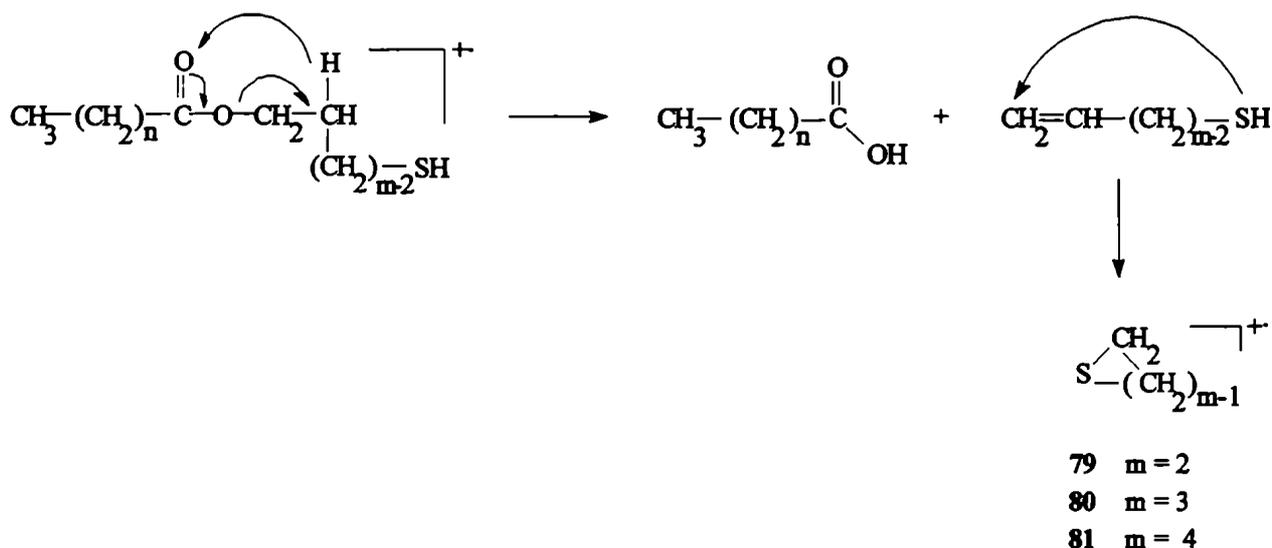
Basándose en una sustitución nucleofílica intramolecular, anteriormente discutida, el Esquema 7.4 propone una ruta posible para la formación de los iones a  $m/z = 60, 74$  y  $88$  en las series de ésteres de  $\omega$ -mercaptoalquilo, con  $m = 2, 3$  y  $4$ , respectivamente:



**ESQUEMA 7.4** - Formación de los iones **79**, **80** y **81** mediante una sustitución nucleofílica intramolecular

Considerando que tal como se dijo con anterioridad, las reacciones de sustitución nucleofílica intramolecular se hallan más favorecidas cuando se generan ciclos de tamaño pequeño, puede pensarse que la ruta propuesta contribuye decrecientemente de  $m = 2$  a  $4$ .

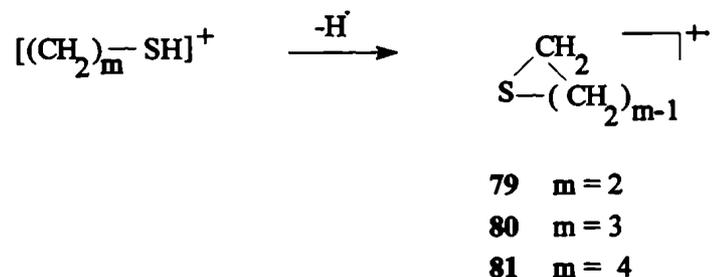
No puede descartarse como ruta alternativa a la propuesta un reordenamiento de Mc Lafferty con posterior ciclación del  $\omega$ -mercapto-1-alqueno formado, proceso en que la carga inicial reside sobre un átomo de oxígeno:



**ESQUEMA 7.5** - Formación de los iones **79**, **80** y **81** mediante un reordenamiento de Mc Lafferty seguido de ciclación intramolecular

La literatura registra la ciclación de 5-mercapto-1-penteno, que ocurre mediante una adición intramolecular del tiol al alqueno; esta transformación, según las condiciones, puede seguir un mecanismo iónico o radicalario<sup>20</sup>.

Es significativo el hecho de que en los espectros de tioles primarios monofuncionales las señales a  $m/z = 60$ ,  $74$  y  $88$  no aparezcan, o en caso positivo, que lo hagan con una intensidad muy baja<sup>9,12</sup>. Esto sugiere que la ciclación y pérdida de un hidrógeno a partir de los iones originados por ruptura  $\beta,\gamma$  y  $\delta$  al sulfhidrilo:

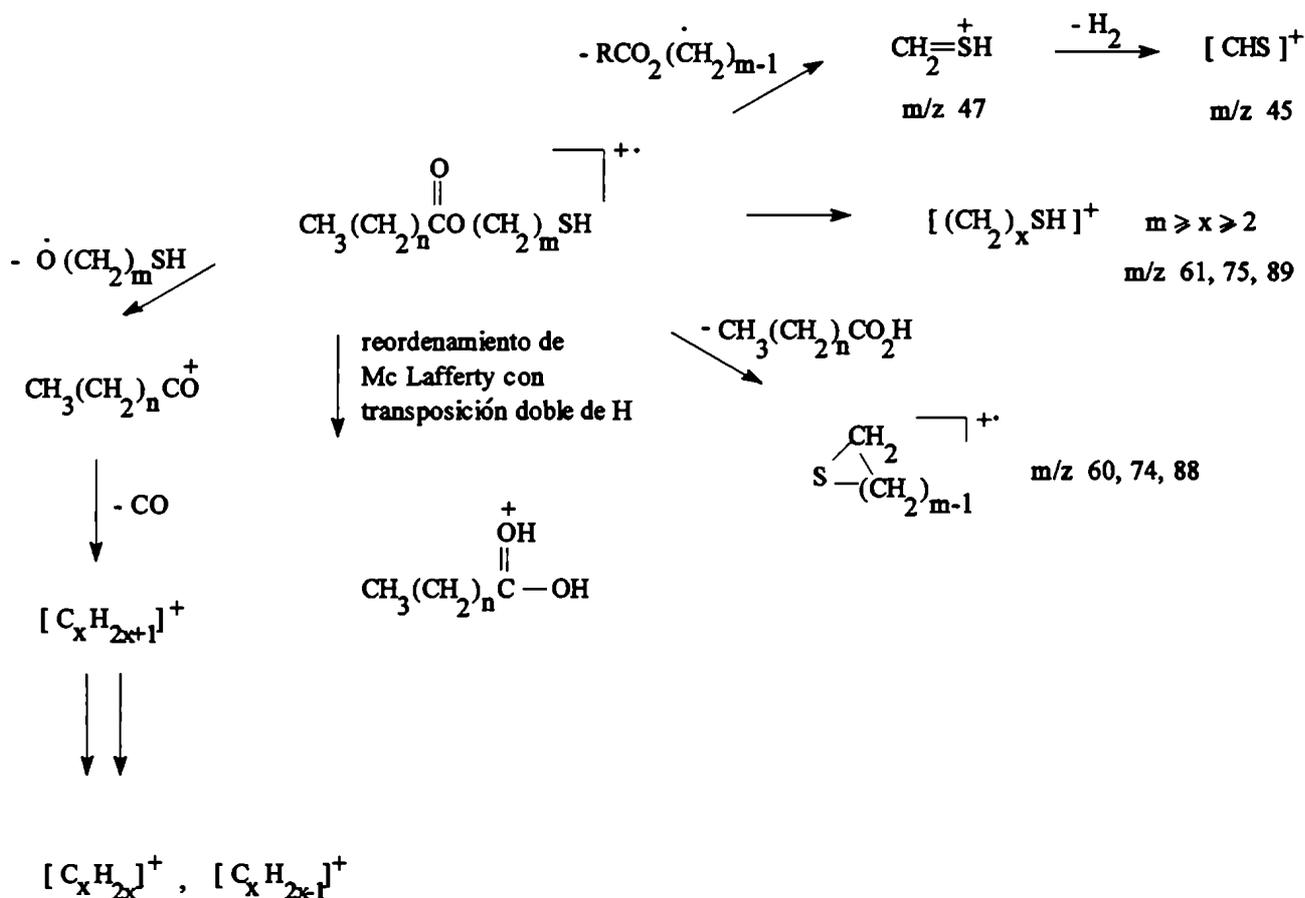


no es un camino importante para la producción de los iones **79**, **80** y **81**. En coherencia con esta conjetura, los ésteres de 8-mercaptooctilo y de 12-mercaptododecilo, para los cuales la formación de especies cíclicas mediante las rutas descritas en los Esquemas 7.4 y 7.5 es muy poco factible, originaron estos iones con abundancias inferiores al 20%.

Como comportamiento común a los ésteres de  $\omega$ -mercaptoalquilo estudiados, los fragmentos de la serie  $[\text{C}_x\text{H}_{2x+1}]^+$ ,  $[\text{C}_x\text{H}_{2x}]^+$  y  $[\text{C}_x\text{H}_{2x-1}]^+$ , así como también los iones acilo  $[\text{RCO}]^+$  forman parte de las señales más destacadas de los espectros cuando los ésteres tienen cadenas carbonadas largas (a partir de seis átomos de carbono), tanto en el resto ácido como en el alcohólico. El reordenamiento de Mc. Lafferty con transposición doble de hidrógeno, que conduce a ácidos carboxílicos protonados, es otra ruptura destacada en estos espectros y que se encuentra dirigida por el átomo de oxígeno.

Otra característica observada al variar  $m$  es la disminución de la pérdida del grupo sulfhidrido. En las series con  $m = 2$  y  $m = 3$  esta ruptura presentó intensidades en general pequeñas, pero prácticamente desapareció cuando aumentó la longitud de la cadena del hidroxialcanotiol.

El Esquema 7.9 presenta un camino general de fragmentación de los ésteres de  $\omega$ -mercaptoetilo.



ESQUEMA 7.6 - Esquema general de fragmentación de ésteres de  $\omega$ -mercaptoalquilo

### Derivados acilados de 1-tioglicerol

En el Capítulo IV se describió que la transesterificación biocatalizada de este hidroxialcanotiol condujo mayoritariamente a los productos de acilación en el hidroxilo primario. Los espectros de masa de esta familia se encuentran recopilados en la Tabla 7.7.

Una primera observación que puede hacerse sobre los compuestos de esta serie es que para ninguno de ellos se detectó el ion molecular. Esta diferencia con los ésteres de  $\omega$ -alquilo y con los  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles puede atribuirse a la presencia de un hidroxilo secundario en

**TABLA 7.7 - Abundancias relativas de fragmentos específicos en los espectros de masa de derivados 1-O-acilados de 1-tioglicerol\***



<b>32</b>	n = 0	<b>36</b>	n = 8
<b>33</b>	n = 1	<b>37</b>	n = 10
<b>34</b>	n = 2	<b>38</b>	n = 12
<b>35</b>	n = 4		

Compuesto	PM	m/z (%)										
		<b>M<sup>+</sup> - 18</b>	<b>47</b>	<b>45</b>	<b>90</b>	<b>72</b>	<b>RCO<sup>+</sup></b>	<b>RCOOH<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	<b>[C<sub>x</sub>H<sub>2x+1</sub>]<sup>+</sup> a</b>	<b>[C<sub>x</sub>H<sub>2x-1</sub>]<sup>+</sup> a</b>		
<b>32</b>	150	<b>132</b> (4)	<b>47</b> (62)	<b>45</b> (24)	<b>90</b> (69)	<b>72</b> (53)	<b>43</b> (100)	<b>61</b> (62)				
<b>33</b>	164	<b>146</b> (4)	<b>47</b> (30)	<b>45</b> (26)	<b>90</b> (34)	<b>72</b> (38)	<b>57</b> (100)	<b>75</b> (9)				<b>(28)</b>
<b>34</b>	178	<b>160</b> (3)	<b>47</b> (24)	<b>45</b> (18)	<b>90</b> (27)	<b>72</b> (45)	<b>71</b> (96)	<b>89</b> (16)		<b>(100)</b>		<b>(38)</b>
<b>35</b>	206	<b>188</b> (1)	<b>47</b> (19)	<b>45</b> (16)	<b>90</b> (20)	<b>72</b> (58)	<b>99</b> (100)	<b>117</b> (10)		<b>(84)</b> (25)	<b>(48)</b>	<b>(33)</b>
<b>36</b>	262	<b>244</b> (4)	<b>47</b> (21)	<b>45</b> (18)	<b>90</b> (61)	<b>72</b> (100)	<b>155</b> (93)	<b>173</b> (9)		<b>(90)</b> (53)	<b>(53)</b>	<b>(62)</b> (22)
<b>37</b>	290	<b>272</b> (4)	<b>47</b> (16)	<b>45</b> (18)	<b>90</b> (52)	<b>72</b> (93)	<b>183</b> (78)	<b>201</b> (13)		<b>(100)</b> (86)	<b>(35)</b>	<b>(66)</b> (49)
<b>38</b>	318	<b>300</b> (5)	<b>47</b> (8)	<b>45</b> (62)	<b>90</b> (3)	<b>72</b> (69)	<b>211</b> (5)	<b>229</b> (0)		<b>(87)</b> (66)	<b>(30)</b>	<b>(100)</b> (67)

\* En bastardilla se indican valores de m/z de los fragmentos, mientras que las abundancias respectivas se señalan entre paréntesis.

a - La intensidad de estos iones se detalla sólo cuando la misma superó el 20% de abundancia relativa.

todos los derivados 1-O-acilados de tioglicerol, que favorece un proceso de deshidratación. Efectivamente, los iones de mayor relación  $m/z$  de todos los espectros de estas moléculas correspondieron a la pérdida de dieciocho unidades de masa a partir del ion molecular. Estas señales nunca sobrepasaron una abundancia del 5% y su intensidad fue casi constante a lo largo de toda la familia.

Por ruptura  $\alpha$  al sulfhidrilo apareció el ion  $[\text{CH}_2\text{SH}]^+$  a  $m/z = 47$ , con abundancias moderadas y con la tendencia a decrecer en importancia al aumentar el tamaño del acilo observada con los  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles y con los ésteres de 2-mercaptoetilo. La señal a  $m/z = 45$  también es indicio del grupo tiol.

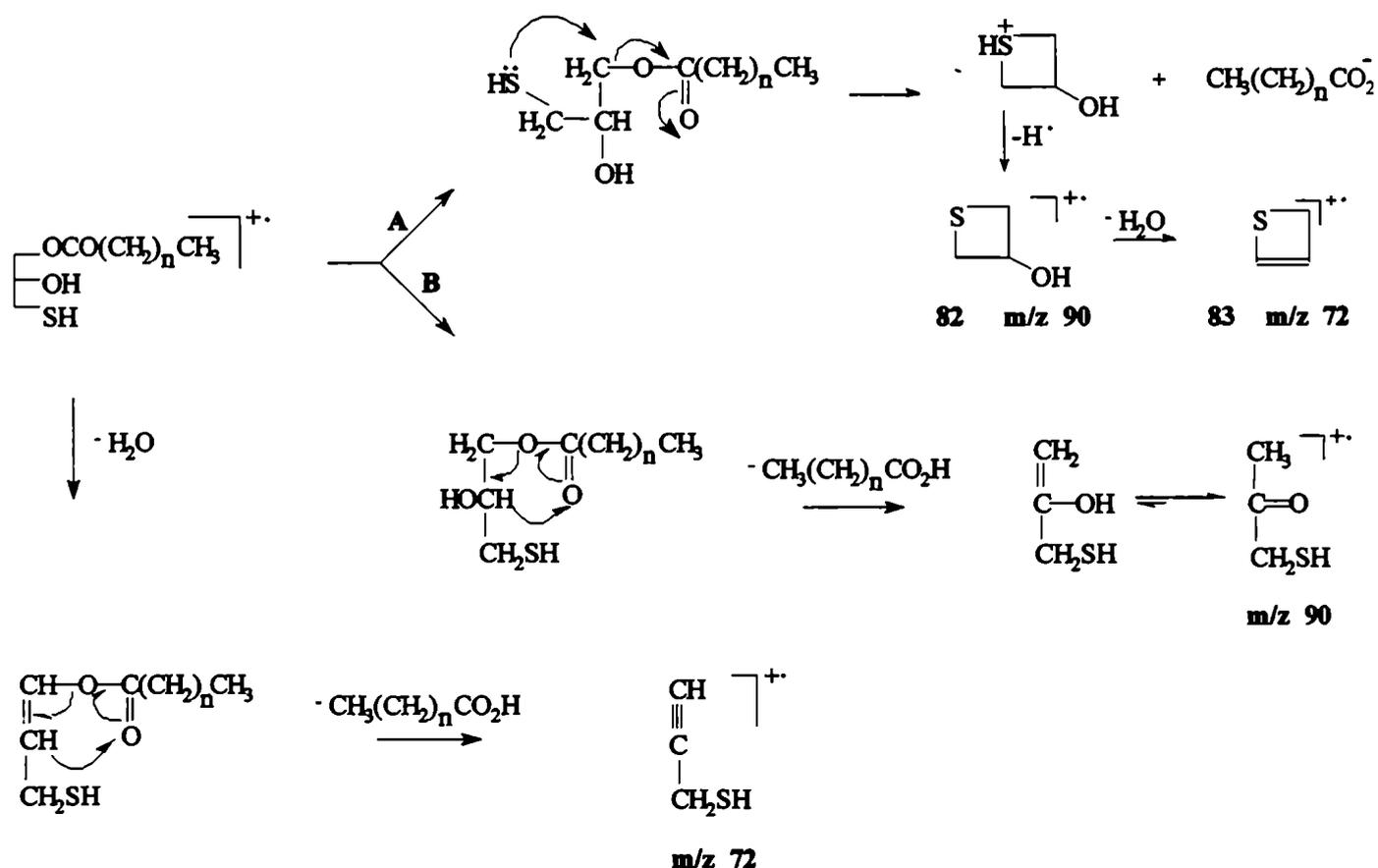
En esta familia, la ruptura  $\beta$  al sulfhidrilo genera un ion a  $m/z = 77$ , pero con la excepción del compuesto 32 (57%), en los demás casos fue inferior al 5%. Esto marca una diferencia con los espectros de masa de 1-O-monoglicéridos, en los que suele darse con mayor importancia la pérdida de  $-\text{CH}_2\text{OCOR}^{21}$ .

La ruptura en  $\gamma$  sólo se apreció en los compuestos 36 y 37 (15% y 13% respectivamente). En ningún caso se observó la pérdida del sulfhidrilo o de sulfuro de hidrógeno a partir del ion molecular.

Para las series  $[\text{C}_x\text{H}_{2x+1}]^+$ ,  $[\text{C}_x\text{H}_{2x}]^+$ ,  $[\text{C}_x\text{H}_{2x-1}]^+$  y para los iones acilo se encontraron tendencias similares a las de los ésteres de  $\omega$ -mercaptoalquilo; los iones acilo fueron en la mayoría de las ocasiones las señales más destacadas de los espectros.

Los iones a  $m/z = 90$  y  $72$  requieren una especial atención. Para la formación de estas señales pueden plantearse dos caminos posibles ( Esquema 7.7 ), análogos a los propuestos para explicar la formación de los iones a  $m/z = 60, 74$  y  $88$  en los espectros de ésteres de  $\omega$ -mercaptoalquilo ( $\omega = 2,3, \text{ y } 4$ ) y que involucran una sustitución nucleofílica intramolecular ( A , Esquema 7.7 ) o un reordenamiento de Mc Lafferty ( B ).

El camino descrito por A postula estructuras de sulfuros cíclicos de cuatro miembros para los iones a  $m/z = 90$  y  $72$  ( 82 y 83 ); como se recordará, el tietano ( 80 ) originaba el pico base de los espectros de los ésteres de 3-mercaptopropilo en casi todos los casos.



**ESQUEMA 7.7** - Esquemas de formación posibles para los iones a  $m/z$  90 y  $m/z$  72 en los espectros de masa de derivados 1-O-acilados de 1-tioglicerol

También pueden plantearse estas dos rutas de fragmentación a los derivados 2-O-acilados de 1-tioglicerol (Tabla 7.8, Esquema 7.8), compuestos que se detectaron durante el análisis por cromatografía gaseosa/espectrometría de masa. Sin embargo, si se observa la Tabla 7.8, se advierte la ausencia de los iones a  $m/z = 90$  (aparecieron sólo en algunos casos y con una abundancia menor al 4%). Este hecho lleva a replantearse la validez de la ruta B en el Esquema 7.8, ya que si ésta tuviese lugar, debería formarse la señal a  $m/z = 90$  en el caso de los derivados 2-O-acilados. Por lo tanto, habría que descartar dicho camino como fuente de producción de iones, pudiéndose suponer además que la ruta B no tiene demasiado peso en

TABLA 7.8 - Abundancias relativas de fragmentos específicos en los espectros de masa de derivados 2-O-aciados de 1-tioglicerol\*

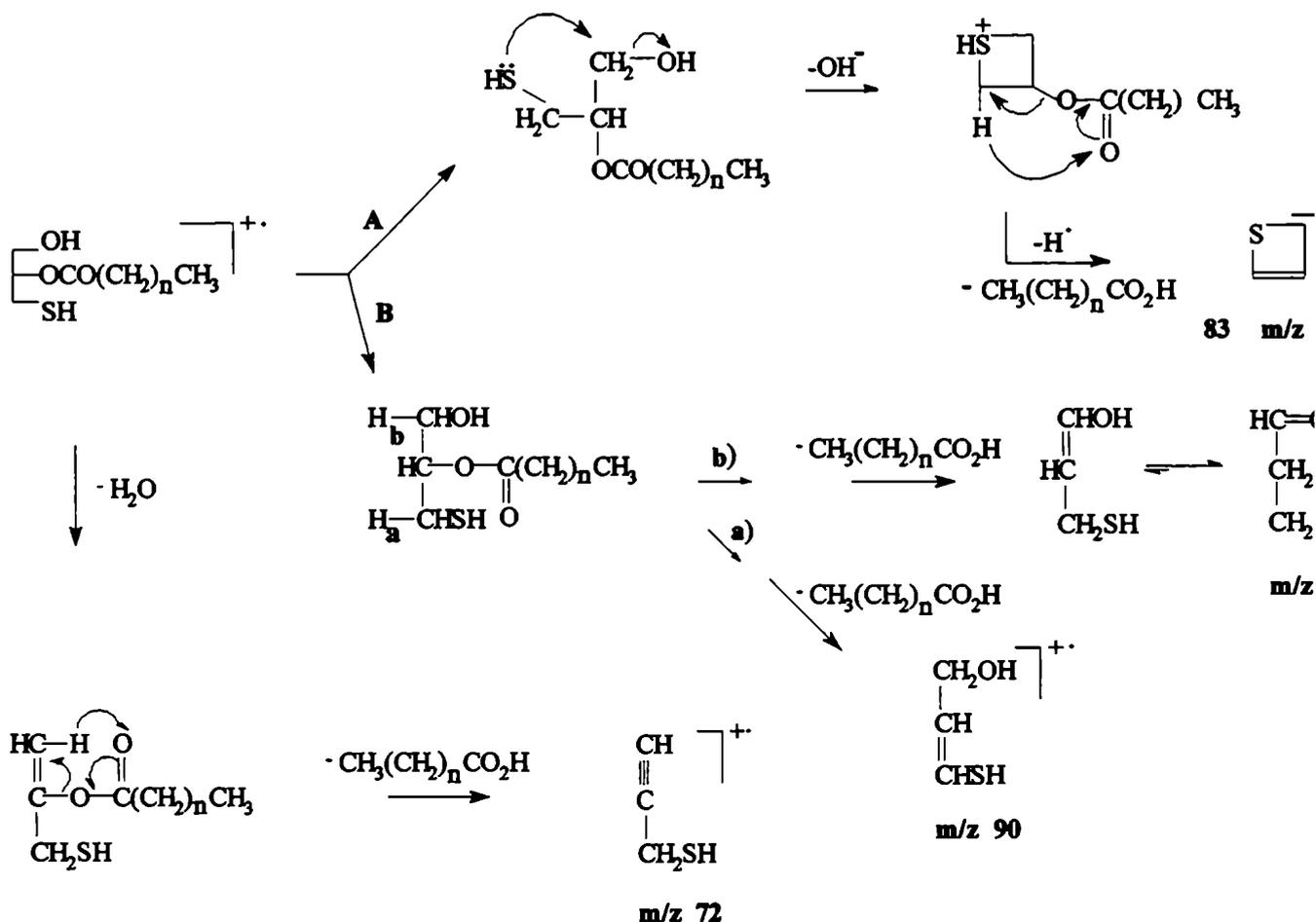


43 n = 0    45 n = 2  
44 n = 1    46 n = 4

Compuesto	m/z (%)							
	M <sup>+</sup> - 18	47	45	72	RCO <sup>+</sup>	RCOOH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	[C <sub>x</sub> H <sub>2x+1</sub> ] <sup>+</sup> a	[C <sub>x</sub> H <sub>2x-1</sub> ] <sup>+</sup> a
43	132 (2)	(16)	(4)	(18)	43 (100)	61 (4)	43	41 55
44	146 (20)	(4)	(6)	(91)	57 (100)	75 (4)		
45	160 (11)	(2)	(3)	(36)	71 (100)	89 (3)	(59)	(100) (11)
46	188 (4)	(3)	(6)	(15)	99 (100)	117 (0)	(93)	(32) (24) (16)

\* En bastardilla se indican valores de m/z de los fragmentos, mientras que las abundancias respectivas se señalan entre paréntesis.

a- La intensidad de estos iones se detalló sólo cuando la misma superó el 20% de abundancia relativa.



**ESQUEMA 7.8** - Esquemas de formación del ion a  $m/z$  72 y del hipotético ion a  $m/z$  90 en los espectros de masa de los derivados 2-O-acilados de 1-tioglicerol

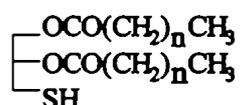
la formación del ion a  $m/z = 90$  de los derivados 1-O-acilados.

La factibilidad de las sustituciones intramoleculares planteadas en los Esquemas 7.7 y 7.8 está avalada por algunos trabajos descritos en literatura<sup>22,23</sup>, donde mediante reacciones de desplazamiento intramolecular en moléculas polifuncionales, un grupo aciloxi o hidroxilo es sustituido por un grupo tiol vecinal. Más allá de estas racionalizaciones, la existencia del

ion a  $m/z = 90$  en los espectros de masa de estas dos familias isómeras es importante a nivel diagnóstico, porque justamente la presencia o ausencia de esta señal es la diferencia más sobresaliente que se encuentra entre los espectros de ambas familias.

La predominancia de la sustitución intramolecular sobre el reordenamiento de Mc Lafferty, reflejo de la importancia del átomo de azufre en dirigir las rupturas, también permite explicar por qué el ion a  $m/z = 90$  tampoco aparece en los espectros de los 1,2-di-O-acilderivados de 1-tioglicerol (Tabla 7.9), moléculas cuyos espectros de masa poseen un perfil bastante parecido a los de los 2-O-acilderivados.

**TABLA 7.9 - Abundancias relativas de fragmentos específicos en los espectros de masa de derivados 1,2-di-O-acilados de 1-tioglicerol\***



**39**  $n = 0$       **41**  $n = 2$   
**40**  $n = 1$       **42**  $n = 4$

Compuesto	PM	m/z (%)						
		<b>47</b>	<b>45</b>	<b>72</b>	<b>RCO<sup>+</sup></b>	<b>RCOOH<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	<b>[C<sub>x</sub>H<sub>2x+1</sub>]<sup>+</sup> a</b>	<b>[C<sub>x</sub>H<sub>2x-1</sub>]<sup>+</sup> a</b>
						<b>43</b>	<b>71</b>	<b>41</b>
<b>39</b>	192	(1)	(3)	(51)	<b>43</b> (100)	<b>61</b> (62)		
<b>40</b>	220	(6)	(11)	(18)	<b>57</b> (100)	<b>75</b> (9)		(22)
<b>41</b>	248	(0)	(1)	(13)	<b>71</b> (100)	<b>89</b> (16)	(22)	
<b>42</b>	304	(7)	(15)	(21)	<b>99</b> (100)	<b>117</b> (10)	(60) (37)	(44)

\* En tipo bastardilla se indican valores de  $m/z$  de los fragmentos, mientras que las abundancias respectivas se señalan entre paréntesis.

a- La intensidad de estos iones se detalló solo cuando la misma superó el 20% de abundancia relativa.



**TABLA 7.10 - Abundancias relativas de fragmentos específicos en los espectros de masa de derivados S-acilados de 1-tioglicerol\***



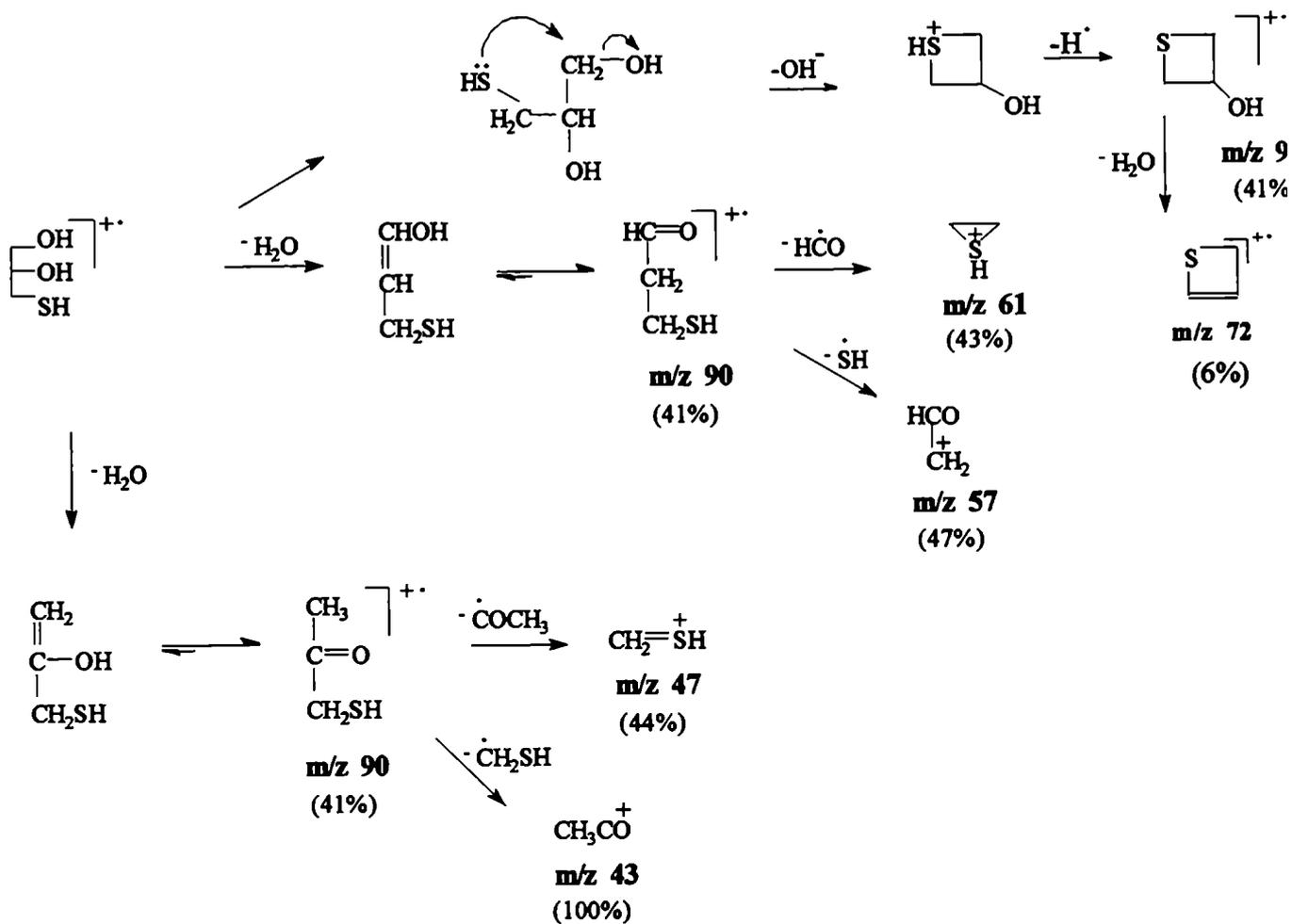
47 n = 0      87 n = 8  
 84 n = 1      88 n = 10  
 85 n = 2      89 n = 12  
 86 n = 4

Compuesto	m/z (%)							
	M <sup>+</sup> - 18	RCO <sup>+</sup>	72	74	[C <sub>x</sub> H <sub>2x+1</sub> ] <sup>+</sup> a			41
					43	57	71	
47	132 (2)	43 (100)	(17)	(2)				
84	146 (9)	57 (100)	(26)	(4)				(40)
85	160 (14)	71 (100)	(87)	(6)	(43)			
86	188 (8)	99 (80)	(100)	(9)	(60)		(54)	(20)
87	244 (8)	155 (9)	(52)	(8)	(100)			(36)
88	272 (2)	183 (4)	(38)	(8)	(25)	(20)		(100)
89	300 (6)	211 (5)	(19)	(5)	(81)	(42)	(28)	(100)

\* En tipo bastardilla se indican valores de m/z de los fragmentos, mientras que las abundancias se señalan entre paréntesis.

a- La intensidad de estos iones se detalló sólo cuando la misma superó el 20% de abundancia relativa.

Después de haber analizado todos estos compuestos, puede plantearse también un esquema de fragmentación para el 1-tioglicerol:



**ESQUEMA 7.10** - Esquema de fragmentación propuesto para 1-tioglicerol

### **Mono-O-acilésteres de ditiotreititol (DTT) y de ditioeritritol (DTE)**

Los espectros de masa de estas dos familias se detallan en las Tablas 7.11 y 7.12. Examinadas globalmente, ambas familias presentan una notable similitud y tal como ocurre con otros diastereoisómeros, su diferenciación no es posible mediante la espectrometría de masa<sup>24</sup>.

Existen numerosas analogías entre los espectros de estas dos series y los de los derivados acilados de 1-tioglicerol. En las familias derivadas de DTT y DTE no se detectaron los iones moleculares ( la excepción la constituye el espectro del compuesto 56, en el que su ion molecular apareció con una abundancia de sólo el 2% ), así como tampoco se observaron las pérdidas del sulfhidrilo y de sulfuro de hidrógeno; la pérdida de agua a partir del ion molecular fue directamente nula. Asimismo, en cada familia, el ion a  $m/z$  47 presenta una abundancia decreciente a medida que aumenta el peso molecular del acilo. Por ruptura  $\beta$  a cada sulfhidrilo se pueden originar dos iones: uno a  $m/z$  77 y otro a  $m/z = M^+ - 77$ , ambos de intensidad muy escasa, con la excepción del compuesto 54, ( 19% para la señal a  $m/z$  77 ).

Además, los iones acilo y los de la serie  $[C_xH_{2x+1}]^+$ , que fueron las señales más importantes de los espectros de estos diastereoisómeros, también fueron destacadas en el caso de los derivados de 1-tioglicerol.

Postulando nuevamente sustituciones intramoleculares donde el tiol actúa como nucleófilo, es posible explicar la existencia de los iones a  $m/z = 136$  y  $118$ , señales que aparecen en los espectros con abundancias bajas y variables ( Esquema 7.11 ).

La postulación de la estructuras 90 y 91 para los iones a  $m/z = 136$  y  $118$  supone que la formación de un sulfuro cíclico de cinco miembros, cuya estabilidad especial ya se comentó con anterioridad, es favorable. Los compuestos 90 y 91 fueron obtenidos durante la reacción de DTT y de DTE con ácido clorhídrico caliente<sup>23</sup>, si bien las condiciones de dicha reacción son muy distintas a las que operan en el espectrómetro de masa.

TABLA 7.11 - Abundancias relativas de fragmentos específicos en los espectros de masa de derivados O-acilados de ditiotreitol\*

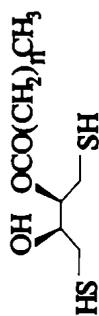
54  $n = 0$ 56  $n = 4$ 57  $n = 10$ 

Compuesto	PM	m/z (%)									
		47	45	136	134	118	RCO <sup>+</sup>	RCOOH <sup>+</sup>	RCOOH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	[C <sub>x</sub> H <sub>2x+1</sub> ] <sup>+</sup> a	[C <sub>x</sub> H <sub>2x-1</sub> ] <sup>+</sup> a
54	196	(63)	(50)	(2)	(14)	(1)	43 (100)	60 (25)	61 (5)		
56	252	(24)	(16)	(32)	(22)	(48)	99 (100)	116 (0)	117 (26)	(87)	(59) (33) (24)
57	336	(2)	(8)	(14)	(2)	(9)	183 (2)	200 (13)	201 (2)	(100) (26) (31)	(21) (22)

\* En bastardilla se indican valores de m/z de los fragmentos, mientras que las abundancias respectivas se señalan entre paréntesis.

a- Se detalla la intensidad de los iones sólo cuando la misma superó el 20% de abundancia relativa.

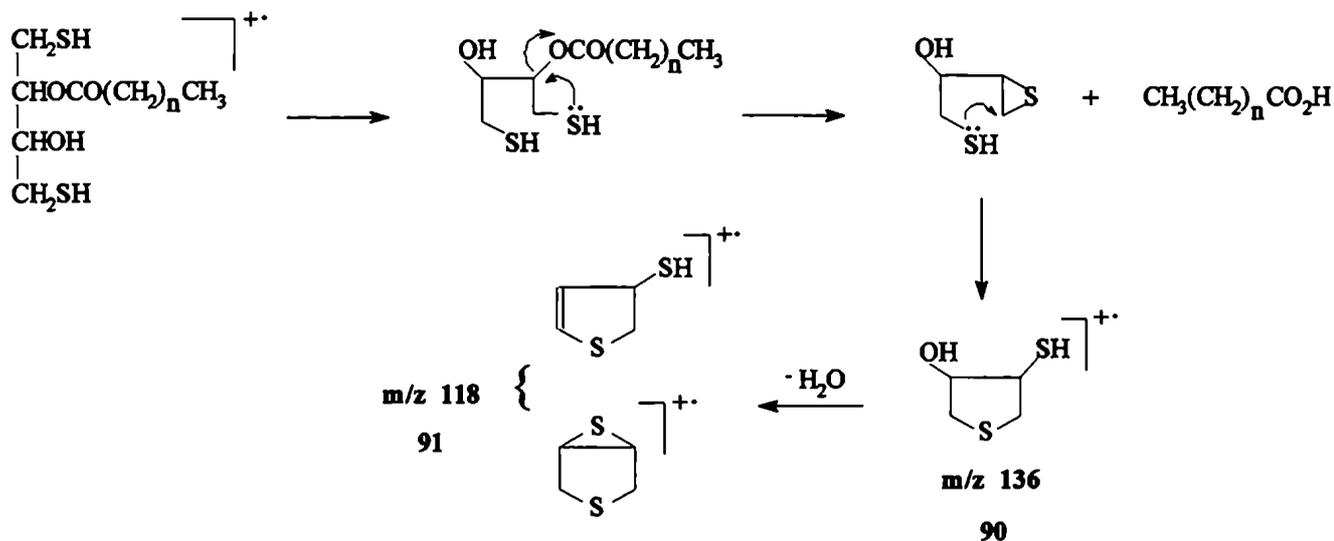
**TABLA 7.12 - Abundancias relativas de fragmentos específicos en los espectros de masa de derivados O-acilados de ditioeritritol\***



55 n = 0  
 58 n = 4  
 59 n = 10

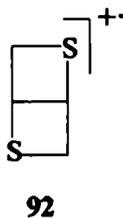
Compuesto	PM	m/z (%)											
		47	45	136	134	118	RCO <sup>+</sup>	RCOOH <sup>+</sup>	RCOOH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	[C <sub>x</sub> H <sub>2x+1</sub> ] <sup>+</sup> a	[C <sub>x</sub> H <sub>2x-1</sub> ] <sup>+</sup> a		
55	196	(14)	(16)	(5)	(10)	(0)	43 (100)	60 (18)	61 (5)	43	71	41	55
58	252	(2)	(5)	(6)	(13)	(15)	99 (70)	116 (100)	117 (12)	(29)	(28)		
59	336	(4)	(7)	(9)	(8)	(10)	183 (3)	200 (9)	201 (3)	(40)	(22)	(100)	(33)

\* En tipo bastardilla se indican valores de m/z de los fragmentos, mientras que las abundancias respectivas se señalan entre paréntesis.  
 a- Se detalla la intensidad de estos iones sólo cuando la misma superó el 20% del pico base.



**ESQUEMA 7.11** - Esquema de formación de los iones a  $m/z$  136 y 118 en los espectros de masa de derivados mono-O-acilados de ditiotreitól y de ditioeritritól

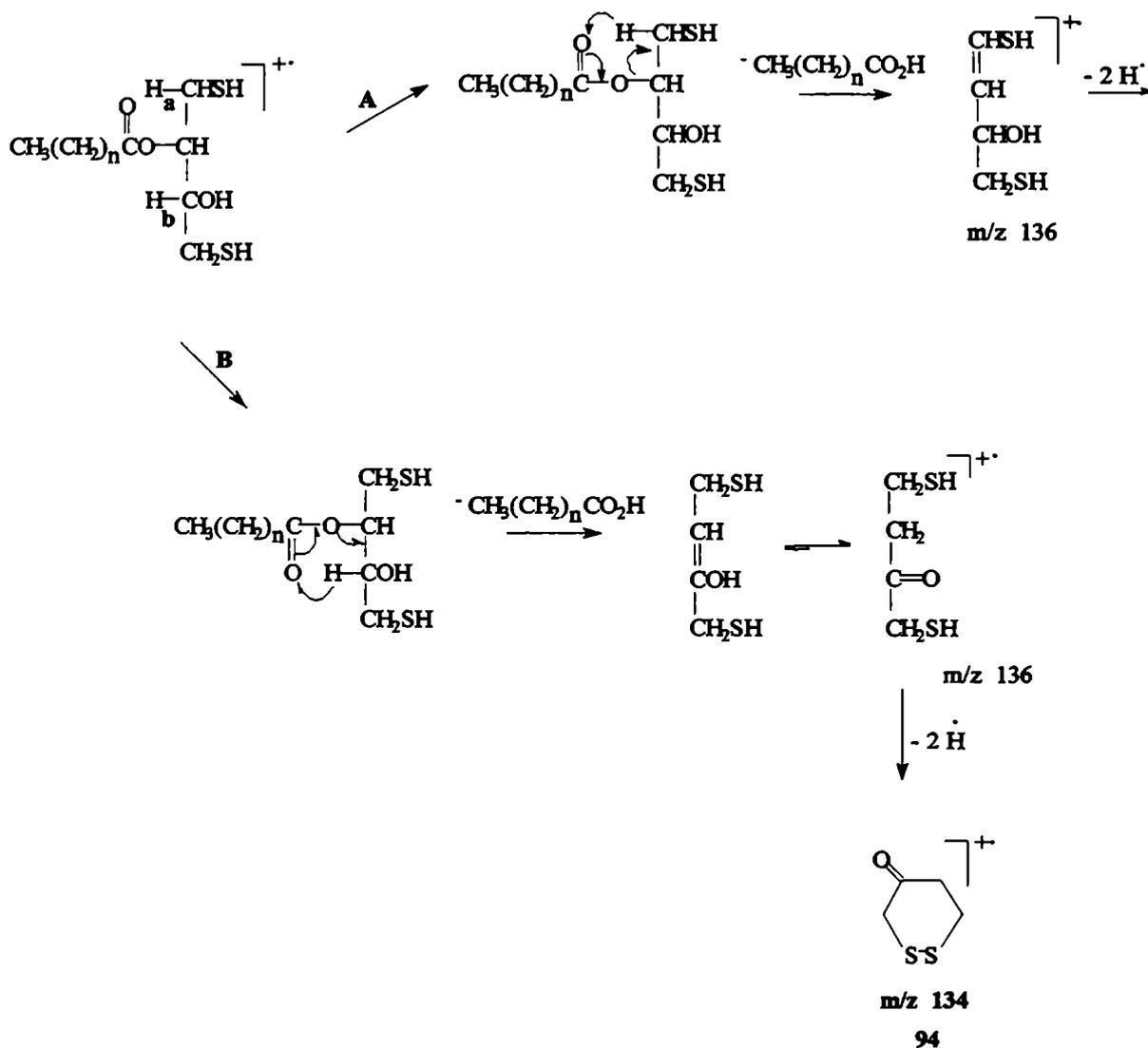
No obstante, para el ion a  $m/z = 118$  no puede descartarse la estructura isómera **92**:



que se formaría mediante un ataque nucleofílico que implica un tamaño de ciclo menor, favorable para una sustitución intramolecular.

En los espectros de las series de derivados de DTT y de DTE hay algunas diferencias con los de las familias estudiadas hasta ahora. La intensidad de las señales a  $m/z$  136 y  $m/z$  118 en los espectros de las Tablas 7.11 y 7.12 es menor que la de los sulfuros cíclicos de los derivados acilados de 1-tioglicerol y los ésteres de  $\omega$ -mercaptoalquilo. A juzgar por la

mayor abundancia que presentan las señales  $[RCOOH]^+$  en los diastereoisómeros analizados, no debería despreciarse que ocurriera el reordenamiento de Mc Lafferty, a partir del cual, además, podría conjeturarse una estructura para el ion a  $m/z$  134:



**ESQUEMA 7.12** - Mecanismos hipotéticos para la formación del ion a  $m/z$  134 en los espectros de masa de derivados mono-O-acylados de ditiotreitrol y de ditioeritritol



Una conclusión común a la mayoría de los compuestos analizados es que estos tioles bi o polifuncionales pueden fragmentarse dando lugar a sulfuros cíclicos. Los sulfuros son moléculas de naturaleza química similar a los éteres pero de mayor estabilidad<sup>18</sup>; la formación de estas estructuras explica que en muchos casos, y hasta a peso molecular elevado, en los espectros se observen señales importantes que contienen azufre, asignables a dichos heterociclos. La presencia de estos sulfuros cíclicos contrasta con su ausencia o su intensidad muy baja en los espectros de tioles monofuncionales<sup>25</sup>.

Finalmente, puede hacerse una observación sobre las pérdidas de sulfhidrilo y de sulfuro de hidrógeno. Exceptuando a los  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles y a los ésteres de 2- y 3-mercaptoalquilo, en los que observó la pérdida del sulfhidrilo en varios casos y con intensidades muy moderadas, en los demás compuestos dicha pérdida fue nula. Esto concordaría con el hecho de que es necesaria la presencia del tiol para generar los sulfuros cíclicos. Por otra parte, en los casos en que se observó la pérdida del sulfhidrilo, ésta fue considerablemente superior a la pérdida de sulfuro de hidrógeno (salvo el caso aislado del compuesto 14). Cuando no se observó el ion a  $m/z = M^+ - 33$ , tampoco apareció el ion a  $m/z = M^+ - 34$ . Este comportamiento estaría de acuerdo con Djerassi<sup>26</sup>, para quien la ruptura del sulfhidrilo en tioles es más importante que la pérdida de sulfuro de hidrógeno, si bien Mc Lafferty opina lo contrario<sup>12</sup>.

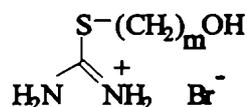
### **Otros compuestos que contienen azufre**

En el capítulo VI se describió que durante la preparación de 4-mercapto-1-butanol y de 12-mercapto-1-dodecanol se formaron, bajo ciertas condiciones, los respectivos disulfuros. Sus espectros se hallan en la Tabla 7.13 y el esquema de fragmentación, en el Esquema 7.14. No existen datos en bibliografía sobre la espectrometría de masa de este tipo de compuestos; por otra parte, el compuesto 72 no ha sido descrito hasta el presente.



También se prepararon y aislaron dos sales de S-alquilisotiuronio ( Tabla 7.14 ; Esquema 7.15 ). En los espectros de estos dos compuestos el ion molecular se observó a una relación m/z correspondiente al peso molecular de catión de la sal. Además de las rupturas que conducen a los iones de la serie  $[(CH_2)_xOH]^+$ , de la serie alquímica y de alquenos, se destacan las fragmentaciones que originan tiourea y tiourea protonada, la última mediante un reordenamiento de Mc Lafferty. Estas dos rupturas fueron las únicas que aparecieron al realizar el espectro proveniente de ionización por bombardeo con átomos acelerados (FAB) del compuesto 74 ( Figura 7.1 ).

**TABLA 7.14** - Abundancias relativas de fragmentos específicos en los espectros de masa de sales de S-alquilisotiuronio

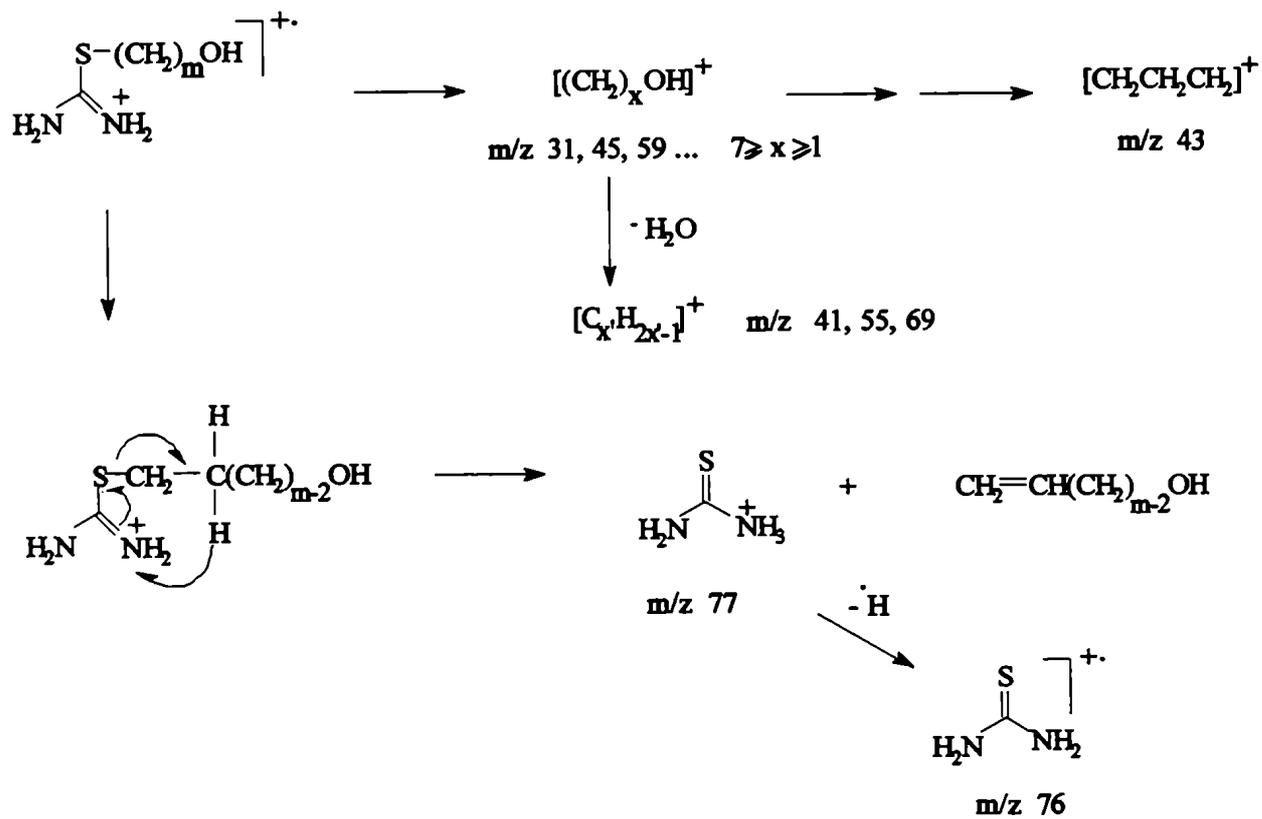


73 m = 4  
74 m = 12

Compuesto	PM	m/z (%)											
		M <sup>+</sup>	76	77	[(CH <sub>2</sub> ) <sub>x</sub> OH] <sup>+</sup> a				[C <sub>x</sub> H <sub>2x-1</sub> ] <sup>+</sup> a				43
					45	87	101	115	41	55	69	83	
73	285	205 (21)	(49)	(45)	(20)				(73)	(62)	(70)		(100)
74	341	261 (2)	(52)	(34)		(81)	(71)	(27)	(88)	(100)	(96)	(63)	(68)

\* En tipo bastardilla se indican valores de m/z de los fragmentos, mientras que las abundancias respectivas se señalan entre paréntesis.

a- Se detalla la intensidad de estos iones sólo cuando la misma superó el 20% de abundancia relativa.



**ESQUEMA 7.15** - Esquema de fragmentación de sales de S-alkilsulfonio

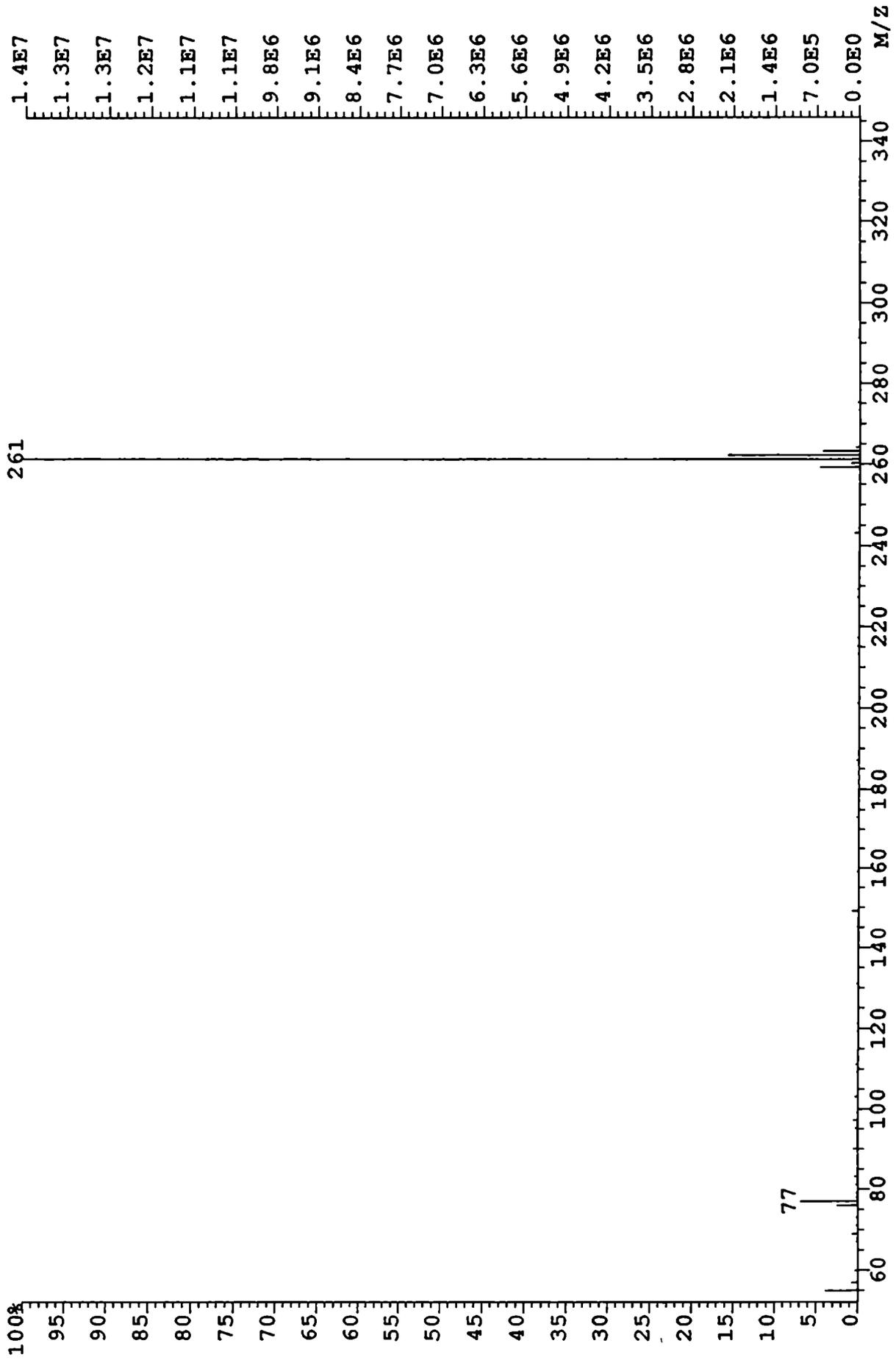


FIGURA 7.1 - Espectro de masa mediante ionización por bombardeo con átomos acelerados (FAB) del compuesto 74

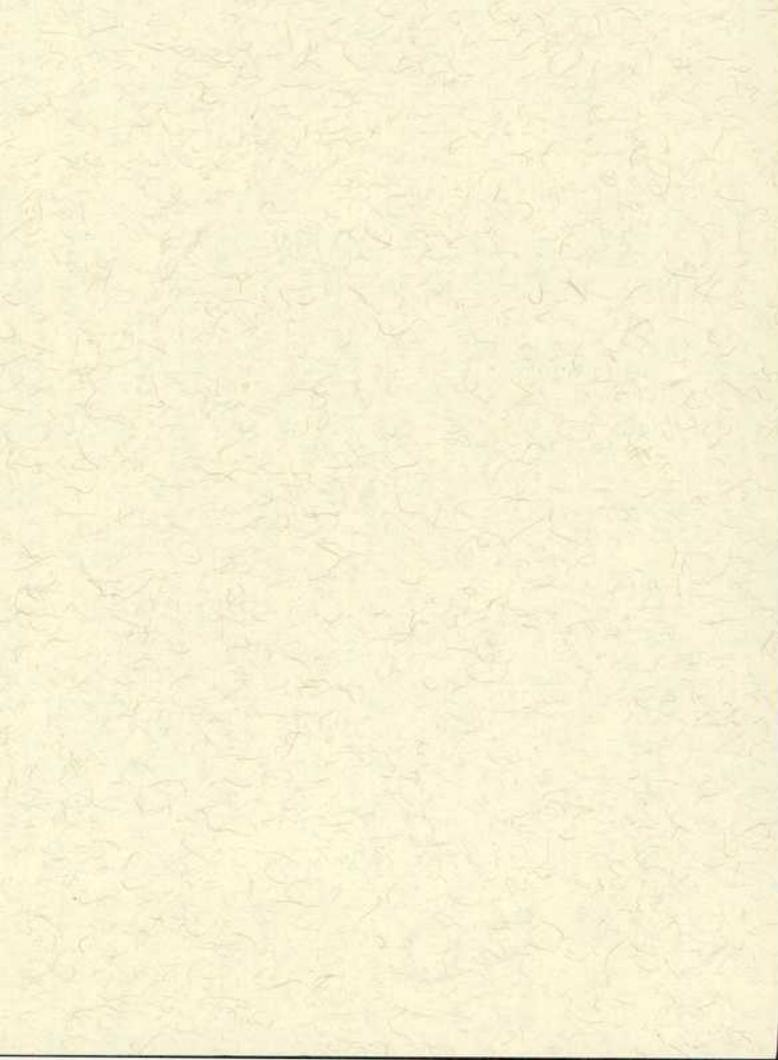
**Referencias bibliográficas**

1. K.Biemann, *Mass Spectrometry*, McGraw-Hill Book Co, New York, 1962, pág. 87.
2. R.Köster y R.Kuczniarz, *Liebigs Ann. Chem.* 835 (1992)
3. S.Patai, *The chemistry of the thiol group*, John Wiley & Sons, London, 1974, Parte 1, página 328.
4. J.Seibl, *Espectrometría de masas*, Editorial Alhambra, Madrid, 1973, página 69.
5. Referencia 3, página 335.
6. A.G.Harrison, C.D.Finney y J.A.Sherk, *Org. Mass Spectrom.* **5**, 1313 (1971)
7. M.P.de Vries, D.Oudman y W.D.Weringa, *ibid.*, **27**, 1131 (1992)
8. Referencia 3, página 326.
9. Referencia 4, página 128.
10. Referencia 4, página 125.
11. Referencia 3, página 337.
12. F.Mc Lafferty, *Interpretation of Mass Spectra*, University Science Books, Mill Valley, California, 1980, página 215.
13. Referencia 4, pág. 330.
14. Y.Labat, Ger.Offen. 2.222.239 (Cl. C 07d), 16 Nov 1972, Fr. ; *Chem. Abstr.* **78**, 43244 (1973).
15. N.L.Allinger, M.P.Cava, D.C.De Jongh, C.R.Johnson, N.A.Lebel y C.L.Stevens, *Química Orgánica*, Parte 1, página 557.
16. Referencia 3, página 437.
17. J.S.Harding y L.N.Owen, *J. Chem. Soc.* 1528, 1536 (1954)
18. D.H.Barton y W.D.Ollis, *Comprehensive Organic Chemistry*, Pergamon Press, Oxford, 1979, Volumen 3, pág. 33.
19. P.L.Robinson, J.W.Kelly y S.A.Evans, *Phosphorus and Sulfur* **31**, 59 (1987)
20. Referencia 3, Parte 2, Capítulo 15, pág. 707.

21. R.Ryhage y E.Stenhagen, *J. Lipid Research* **3**, 382 (1960)
22. L.N.Owen, *Dithiols*, en *Organic Sulfur Compounds*, Pergamon Press, New York, 1961, Volumen 1, pág. 199.
23. R.A.Sanchez, *Synthesis* 148 (1982)
24. R.Erra Balsells, *Reacciones fotoquímicas de alcoholes*, Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (1979)
25. E.J.Levy, W.A.Stahl, *Anal. Chem.* **33**, 707 (1961)
26. A.M.Duffield, W.Carpenter y C.Djerassi, *Chem. Commun.* 109 (1967)



***CAPITULO VIII***



*Parte experimental*



## 1. Generalidades

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fisher-Johns o mediante el método del capilar en un baño de ácido sulfúrico y no fueron corregidos.

Las muestras para microanálisis (análisis elemental) se secaron previamente a presión reducida en presencia de pentóxido de fósforo como desecante.

Los poderes rotatorios se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 141 empleando una lámpara de sodio ( $\lambda = 589 \text{ nm}$ ), en microceldas de 1 dm de longitud y a temperatura ambiente, utilizando el solvente y la concentración de muestra que se indican en cada caso.

### Lipasas y reacciones catalizadas por lipasas

Las lipasas utilizadas fueron en todos los casos de origen comercial y las especificaciones de cada *batch* empleado se detallan a continuación:

Lipasa pancreática porcina (PPL) (Tipo II, Sigma) Contiene amilasa y proteasa.

Actividad determinada incubando aceite de oliva a pH 7,7 durante 30 minutos (una unidad hidroliza un microequivalente de ácido graso a partir de un triglicérido en una hora y a 37°):

unidades/mg de sólido: 46 ; 53 ; 43

unidades/mg de proteína: 220 ; 190 ; 135

Lipasa de *Candida cylindracea* (CCL) (Tipo VII, Sigma) Contiene lactosa.

Actividad determinada incubando aceite de oliva durante 30 minutos (una unidad hidroliza un microequivalente de ácido graso a partir de un triglicérido en una hora a pH 7,2 y a 37°):

unidades/mg de sólido: 1010 ; 1010 ; 905 ; 860

unidades/mg de proteína: 7770 ; 7770 ; 4570 ; 2425

Lipozyme<sup>R</sup> IM 20 (LIP) (Lipasa de *Mucor miehei*, Novo Nordisk)

La actividad se expresa en BIU (Batch Interesterification Units). 1 BIU corresponde a un mol de ácido palmítico incorporado en trioleína por minuto y bajo condiciones estandar<sup>1</sup>.

BIU/g sólido: 25 ; 25

SP 435 L (CAL) (Lipasa de *Candida antarctica*, Novo Nordisk)

La actividad se expresa en PLU (unidades de propil laurato); la determinación de actividad se basa en un ensayo de esterificación entre 1-propanol y ácido láurico realizado a 60° durante 15 minutos<sup>2</sup>.

PLU/g sólido: 9500

Lipasa de *Pseudomonas species* (Tipo XIII, Sigma) Polvo liofilizado; contiene seroalbúmina bovina y sales.

Actividad (una unidad produce 1 micromol de glicerol por minuto a pH 7,0 y a 37°, en presencia de seroalbúmina bovina):

unidades/mg de sólido: 28

unidades/mg de proteína: 53

Lipasa de *Chromobacterium viscosum* (Sigma) Polvo liofilizado.

Actividad (aceite de oliva, pH 7.2 , 37°C, 30 minutos):

unidades/mg de sólido: 2100

unidades/mg de proteína: 3750

El tratamiento de PPL con ultrasonido (sonicación) se efectuó por medio de un sonicador Cole-Parmer 8852.

Las muestras de PPL seca se obtuvieron secando la enzima en pistola de pentóxido de fósforo a 4° hasta peso constante. También se utilizó PPL lavada con acetona y éter etílico a -20° previo a su secado<sup>3</sup>.

Las muestras de PPL liofilizada se prepararon disolviendo la lipasa en agua destilada y llevando la solución resultante a un aparato Virtis Freezemobile 3, que operó a presiones menores que 100 miliTorr y con temperaturas del condensador menores a -50°. Concluída la liofilización, las muestras se secaron en pistola de pentóxido de fósforo a 4°.

La determinación de humedad en muestras de PPL se realizó por el método de Karl-Fisher automatizado.

Las reacciones catalizadas por lipasas se llevaron a cabo en un agitador tipo rotatorio de 130 rpm y en un incubador digital tipo orbital INNOVA™ 4000 (New Brunswick) equipado con control de temperatura y de velocidad.

Las centrifugaciones se efectuaron por medio de una centrífuga analítica Adams.

### **Métodos espectroscópicos**

Los espectros de absorción de radiación infrarroja (IR) se determinaron con espectrofotómetros Perkin-Elmer 710-B y Nicolet Magna-IR 550 (FT/IR) en película o pastilla de bromuro de potasio.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- $^1\text{H}$ ) se realizaron a 100,1 MHz en un espectrómetro Varian XL-100-15 FT, a 200,1 MHz en un espectrómetro Bruker AC-200 y a 500,1 MHz en un espectrómetro Bruker AM-500. Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN- $^{13}\text{C}$ ) se obtuvieron a 25,2 MHz en un Varian XL-100-15 y a 50,2 MHz en un Bruker AC-200. A menos que se indique otro solvente o mezclas de solventes, en todos los casos se utilizó cloroformo deuterado, en tubos de 5 mm de diámetro.

Los desplazamientos químicos para RMN- $^1\text{H}$  se expresan en todos los casos en la escala  $\delta$ , en partes por millón (ppm) respecto de la resonancia de tetrametilsilano, empleado como referencia interna (0.00 ppm). Las señales se indican en cada caso como singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (c), doble doblete (dd), multiplete (m) o singulete ancho ( $s_2$ ). Los desplazamientos químicos para RMN- $^{13}\text{C}$  se expresan en ppm utilizando como referencia el pico central de la señal correspondiente al cloroformo deuterado (77,0 ppm). Las señales acompañadas por los signos \*, # , @ y ^ pueden intercambiarse. Los valores de

desplazamiento químico se informan con dos cifras decimales solamente cuando el dato numérico así expresado sirve para interpretar la existencia de varias señales.

Los espectros de masa (EM) por introducción directa se determinaron en los espectrómetros de masa Varian-MAT CH7-A, TRIO-2 VG Masslab y SHIMADZU QP-5000 y salvo indicado lo contrario, fueron obtenidos mediante ionización por impacto electrónico a 70 eV. Para los espectros de masa mediante ionización por bombardeo con iones de Cs (FAB) se empleó un espectrómetro VG-ZAB BEQ.

### **Métodos cromatográficos**

Las cromatografías analíticas en capa delgada se realizaron sobre sílicagel como fase fija (Sílicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck).

Los agentes de revelado utilizados fueron: vapores de yodo; ácido sulfúrico-agua (1:1) y posterior calentamiento en estufa; pulverizado con una solución acetónica de reactivo de Ellman.

Solución reveladora de reactivo de Ellman<sup>4</sup>: Se mezclaron:

solución 10<sup>-3</sup>M de reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)) en acetona, buffer fosfato 0,1 M (pH = 8.0) y acetona en una relación de volúmenes 1:1:4 .

Para la detección cualitativa de tioles se mezclaron las tres soluciones anteriormente mencionadas en volúmenes iguales. Con la mayoría de los tioles ensayados se observó una coloración amarilla muy intensa antes de los dos minutos.

Las cromatografías en columna se llevaron a cabo empleando como adsorbente sílicagel (Silicagel 60, malla 230-400, Merck); las cromatografías flash se efectuaron según la referencia<sup>5</sup> utilizando también sílicagel como fase fija (Silicagel H, malla 70-230, Merck).

Las cromatografías gas-líquido (CGL) fueron realizadas en los cromatógrafos Hewlett Packard 5830 A y 5840 A, ambos equipados con detectores de ionización de llama (FID) y

registradores Hewlett Packard. En todos los casos se empleó nitrógeno como gas portador. En la Tabla 8.1 se detallan las características de las columnas usadas.

**TABLA 8.1 - Características de las columnas para cromatografía gas-líquido empleadas en el presente trabajo**

Denominación de la columna	Tipo	Longitud y diámetro interno	Fase soporte	Malla	Concentración fase líquida	Temperatura máx. operación
CARBOWAX 20 M	capilar	50 m ; 0.2 mm	—	—	espesor del film : 0.2 $\mu$ m	220°C
DGS 12%	empacada	1,8 m ; 2 mm	Chromosorb W-AW DMCS	80-100 mesh	12%	200°C
OV 225	empacada	1,8 m ; 2 mm	Chromosorb W-AW DMCS	60-80 mesh	3%	250°C

Las cromatografías gas-líquido combinadas con espectrometría de masa (CG-EM) se efectuaron en un sistema compuesto por un cromatógrafo gaseoso Varian 1400 acoplado a un espectrómetro de masa Varian Mat CH7-A y en un equipo VG-TRIO-2/2000 acoplado a un cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard 5890.

### Métodos computacionales

Las conformaciones moleculares determinadas por medio cálculos para la minimización de la energía molecular fueron obtenidas aplicando el programa HYPERCHEM Release 3, mediante el método semiempírico PM 3 y el algoritmo de Polak-Ribiere para la optimización de la geometría.

### **Solventes**

Los solventes para cromatografía (en columna y en capa delgada) y para recristalización fueron purificados por destilación fraccionada. En los casos restantes, se utilizaron solventes de pureza grado analítico.

Las mezclas de solventes están expresadas en relaciones de volúmenes (v/v).

Los extractos de solventes orgánicos fueron secados sobre sulfato de sodio anhidro y evaporados a presión reducida, a temperaturas menores de 45°.

Preparación de tetrahidrofurano anhidro: El solvente se pasó a través de una columna de alúmina neutra y luego se reflujo sobre sodio en presencia de benzofenona, hasta observar coloración azul-violácea. Se destiló en el momento de utilizar.

### **Purificación de reactivos**

Los reactivos que se listan a continuación fueron purificados por destilación fraccionada a presión atmosférica : n-butanol ; n-octanol ; acetato de terbutilo ; acetoacetato de etilo ; bromoacetato de etilo. El acetato de isopropenilo y el acetato de vinilo se destilaron en presencia de hidroquinona.

## **2. Preparación de compuestos obtenidos sin catálisis enzimática**

### ***Benzoato de etilo***

Este compuesto se obtuvo adaptando dos técnicas para preparación de ésteres descriptas por Vogel<sup>6</sup>.

Sobre una solución de piridina (23 ml, 0,26 moles) en etanol absoluto (34 ml, 0,58 moles) se hizo gotear cloruro de benzoilo (30 mL, 0.26 moles) desde una ampolla compensadora . Concluida la adición, se reflujo durante 2 horas y luego el sistema se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió agua destilada, la fase orgánica se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio, con agua, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Tras filtrar, el líquido se destiló a presión atmosférica, obteniéndose 17,16 g (45% de rendimiento) de benzoato de etilo (P.Eb.: 208-212° C)

### *Acetato de 2-tioacetoxietilo ( 3 )*

#### *Método A*

Desde una ampolla compensadora, se dejó gotear lentamente cloruro de acetilo (9,0 ml, 128 mmoles) sobre una solución de 2-mercaptoetanol (3,6 mL, 51 mmoles) en 10 mL de benceno en baño de hielo-agua. Finalizada la adición, se retiró el baño y se reflujo durante 5 horas. Tras ese tiempo, la mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente y el benceno se eliminó en evaporador rotatorio. Se obtuvo un líquido rosado que por cromatografía gaseosa presentaba como subproducto 2% de acetato de 2-mercaptoetilo. La purificación de dicho líquido mediante cromatografía en columna de sílicagel utilizando cloruro de metileno como eluyente condujo al compuesto 3 (6,82 g, 82%), un líquido incoloro puro por cromatografía gaseosa.

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 1740 y 1710 (C=O)

EM (m/z, %) : 162 ( $\text{M}^+$ , 17) , 86 (70) , 43 (100)

RMN- $^1\text{H}$  (100 MHz)  $\delta$  = 1,96 (s, 3 H, -OCOCH $_3$ ), 2,26 (s, 3 H, -SCOCH $_3$ ), 3,04

(t, 2 H, J = 7 Hz, -CH $_2$ -SCOCH $_3$ ), 4,08 (t, 2 H, J = 7 Hz, -CH $_2$ -OCOCH $_3$ )

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 20,6 (-OCOCH $_3$ ), 27,7 (-CH $_2$ SH), 30,4 (-SCOCH $_3$ ),

62,6 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-O-}$ ), 170,5 ( $-\underline{\text{C}}\text{O- O}$ ), 194,6 ( $-\underline{\text{C}}\text{O-S-}$ )

### *Método B*

A una solución de 2,8 ml de 2-mercaptoetanol (40 mmoles) en piridina (7,1 ml, 88 mmoles) mantenida a 0° en un baño de hielo-agua se agregaron 9,5 ml de anhídrido acético (101 mmoles). Luego de 20 minutos se retiró el baño y la agitación prosiguió a temperatura ambiente durante 19 horas. Finalizada la reacción, se agregó agua destilada helada, con lo que se separaron dos fases. La orgánica se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio, luego con ácido clorhídrico 2N, con agua destilada y finalmente se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Se obtuvieron 5,85 g (92%) de **3**, puro por cromatografía gaseosa.

Esta misma técnica se empleó para preparar *acetato -1-<sup>13</sup>C de 2-tioacetoxietilo (5)*.

Se tomaron 83 mg de acetato-1-<sup>13</sup>C de 2-mercaptoetilo (**4**, 0,69 mmoles), se añadieron 0,03 ml de piridina y la solución se hizo reaccionar con 0,1 ml de anhídrido acético (1,1 mmoles). Luego de 16 horas a 30° se comprobó por cromatografía gaseosa la desaparición del compuesto de partida. Se obtuvieron 90 mg de **5** (81%), puro por cromatografía gaseosa.

EM (m/z, %): 163 (M<sup>+</sup>, 2), 87 (11), 61 (30), 60 (16), 44 (93), 43 (100)

### *Acetato de (3-tioacetoxi-2-acetoxi)-1-propilo (49)*

1-Tioglicerol (3,348 g, 2,7 ml, 31 mmoles) y 13 ml de piridina (12,74 g, 161 mmoles) se diluyeron en 100 ml de cloruro de metileno. Sobre la solución anterior, enfriada en un baño a 0° y agitada enérgicamente, se añadieron lentamente 15 ml de cloruro de acetilo (16,5 g, 212 mmoles). Concluída la adición se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se dejó

agitando a temperatura ambiente durante 46 horas. Transcurrido este tiempo, se filtró el cloruro de piridonio formado y la fase líquida orgánica se lavó con agua, solución de hidróxido de sodio al 5% y ácido clorhídrico 5%. La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el solvente se eliminó en evaporador rotatorio. Se obtuvo un líquido amarillento que se purificó por cromatografía en columna de silicagel. La elución con acetato de etilo condujo a 6,99 g (96% de rendimiento) de **49**, puro por cromatografía gaseosa.

Utilizando anhídrido acético en vez de cloruro de acetilo, el rendimiento fue considerablemente más bajo.

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1740 y 1710 (C=O)

EM (m/z, %): 132 ( $\text{M}^{+}$ -.60, 10), 73 (41), 43 (100)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 2,07 (s, 3H,  $-\text{CH}_2\text{-OCOCH}_3$ ), 2,08 (s, 3H,  $-\text{CH-OCOCH}_3$ ), 2,35 (s, 3H,  $-\text{CH}_2\text{-SCOCH}_3$ ), 3,07 (dd, 1H,  $J = 7$  Hz,  $-\text{CH}^*\text{H}'\text{-SCO-}$ ), 3,27 (dd, 1H,  $J = 6$  Hz,  $-\text{CHH}^*\text{-SCO-}$ ), 4,12 (dd, 1H,  $J = 6$  Hz,  $-\text{CH}^*\text{H}'\text{-OCO-}$ ), 4,27 (dd, 1H,  $J = 5$  Hz,  $-\text{CHH}^*\text{-OCO-}$ ), 5,11-5,16 (m, 1H,  $-\text{CH-}$ )

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 20,7 ( $-\text{CH}_2\text{-OCOCH}_3$ ), 20,8 ( $-\text{CH-OCOCH}_3$ ), 29,2 ( $-\text{CH}_2\text{S-}$ ), 30,3 ( $-\text{CH}_2\text{-SCOCH}_3$ ), 63,4 ( $-\text{CH}_2\text{-O-}$ ), 69,8 ( $-\text{CH-O-}$ ), 169,8 ( $-\text{CH}_2\text{-OCO-}$ ), 170,3 ( $-\text{CH-OCO-}$ ), 194,1 ( $-\text{CH}_2\text{-SCO-}$ )

La asignación de las señales a 29,2, 30,3, 63,4 y 69,8 fue confirmada por medio de un espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  DEPT.

### ***3-Mercaptopropionato de etilo (67)***

Ácido 3-mercaptopropiónico comercial (40,0 g, 377 mmoles) disuelto en 350 ml de etanol absoluto que contenían 400 mg de ácido *p*-toluensulfónico se reflujo durante quince horas. Transcurrido este tiempo se agregaron 70 mL de etanol absoluto, se adaptó al sistema un

equipo de destilación fraccionada y se destiló hasta no observar más pasaje de destilado. Luego se eliminó el exceso de etanol en evaporador rotatorio y el líquido remanente se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio acuoso. Se extrajo con cloruro de metileno y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro; tras eliminación del solvente en evaporador rotatorio se obtuvieron 39,23 g de 3-mercaptopropionato de etilo, puro por cromatografía gaseosa (rendimiento: 77%).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 2575 (SH), 1719 (C=O)

EM (m/z, %) : 134 ( $\text{M}^+$ , 67), 101 (5), 89 (43), 88 (100), 87 (19), 61 (29), 60 (22)

RMN- $^1\text{H}$  (100 MHz)  $\delta$  = 1,26 (t, 3 H,  $J = 7\text{Hz}$ ,  $-\text{CH}_3$ ), 1,56-1,74 (m, 1 H,  $-\text{SH}$ ), 2,50-2,92 (m, 4 H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{SH}$ ), 4,20 (c, 2 H,  $J = 7\text{ Hz}$ ,  $-\text{OCH}_2-$ )

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 14,3 ( $-\text{CH}_3$ ), 19,8 ( $-\text{CH}_2\text{SH}$ ), 38,5 ( $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 60,6 ( $-\text{OCH}_2-$ ), 171,4 ( $-\text{CO}-$ )

### ***3-Mercapto-1-propanol (14)***

3-Mercaptopropionato de etilo (1,13 g, 8,4 mmoles) disuelto en 10 mL de tetrahydrofurano anhidro se añadió lentamente, mediante una ampolla compensadora, sobre una suspensión de 1,44 g de hidruro de aluminio y litio (37,9 mmoles) en 25 ml de tetrahydrofurano anhidro. Todas las operaciones se efectuaron en atmósfera de nitrógeno seco. Concluida la adición del éster se continuó la agitación durante 18 horas a temperatura ambiente, siempre en atmósfera de nitrógeno. Transcurrido ese tiempo el sistema de reacción se enfrió a  $0^\circ$  y se añadió agua helada acidificada con ácido sulfúrico 10 % hasta no observar más floculación. Se filtró, el filtrado se extrajo con acetato de etilo y el sólido se lavó con etanol. El análisis por cromatografía gaseosa de ambos filtrados mostró una señal minoritaria correspondiente a 3-mercaptopropionato de etilo sin reaccionar, por lo que se juntaron ambos filtrados, se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron en evaporador rotatorio. El líquido residual

obtenido se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente cloruro de metileno-acetato de etilo 70:30. Se obtuvieron 0,610 g de 3-mercapto-1-propanol, puro por cromatografía gaseosa (rendimiento: 84 %).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3400 (OH), 2550 (SH)

EM (m/z, %): 92 ( $\text{M}^+$ , 60), 74 (56), 61 (39), 58 (87), 47 (46), 45 (26), 43 (50), 41 (100)

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD} + \text{D}_2\text{O}$ , 200 MHz)  $\delta = 1,79\text{-}1,97$  (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ),

2,60 (t, 2H,  $J = 8$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{SH}$ ), 3,68 (t, 2H,  $J = 6$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ )

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)<sup>7</sup>  $\delta = 21,2$  (C-2), 36,2 (C-3), 60,8 (C-1)

#### Reducción de ácido 3-mercaptopropiónico con SMEAH

Una solución de ácido 3-mercaptopropiónico (0,282 g, 2,7 mmoles) en 3 mL de tolueno se gotearon sobre 20 ml de una solución 2,5 M de hidruro de *bis* (2-metoxietoxi) aluminio y sodio (SMEAH) mantenida en baño de hielo-agua. Todas las operaciones se realizaron bajo pasaje de nitrógeno seco.

Finalizada la adición del mercaptoácido, el sistema se calentó a reflujo durante 4 horas. Concluido el reflujo, la mezcla de reacción se enfrió a 0° y se agregó agua helada acidificada con ácido sulfúrico 10 %, observándose la formación de un precipitado abundante. Se filtró, se lavó con acetato de etilo y los filtrados unidos se secaron sobre sulfato de sodio. Tras evaporar en evaporador rotatorio, se obtuvo un residuo líquido cuyo cromatograma gaseoso mostró una mezcla que presentaba ácido 3-mercaptopropiónico, 3-mercapto-1-propanol y otra señal. Este componente pudo identificarse por cromatografía gaseosa/espectrometría de masa como  $\beta$ -tiopropiolactona. ( EM (m/z, %): 88 ( $\text{M}^+$ , 28), 73 (60), 59 (45), 58 (100), 45 (98), 43 (98) )

*Reducción de ácido 3-mercaptopropiónico con borohidruro de sodio*

Sobre una suspensión de 9,35 g de borohidruro de sodio (245 mmoles) en 100 mL de tetrahidrofurano mantenida a 0°, se agregaron 10,60 g de ácido 3-mercaptopropiónico (100 mmoles). Desde una ampolla compensadora se agregó una solución de 7 ml de ácido sulfúrico concentrado disuelto en 15 ml de éter etílico. Una vez finalizada la adición del reactivo, se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Se enfrió el sistema y se agregó ácido clorhídrico 2N hasta no observar más burbujeo. Se obtuvo un líquido homogéneo que se extrajo con cloruro de metileno; la fase orgánica se secó y se evaporó en evaporador rotatorio, originando un líquido que por cromatografía gaseosa presentó el reactivo de partida y 3-mercaptopropanol sólo en proporción minoritaria.

***4-Mercapto-1-butanol ( 15 )****Procedimiento general para la reducción de  $\gamma$ -tiobutiolactona*

Sobre una suspensión de hidruro de aluminio y litio (la relación LAH /  $\gamma$ -TBL se indica en la Tabla 6.1) en tetrahidrofurano anhidro, colocada en baño de hielo-agua, se añadió lentamente y bajo atmósfera de nitrógeno seco, una solución de 996 mg de  $\gamma$ -tiobutiolactona (9,8 mmoles) en 10 ml de tetrahidrofurano anhidro. Finalizada la adición de la tiolactona la mezcla reaccionó a la temperatura y el tiempo indicados ( Tabla 6.1 ). Transcurrido ese tiempo, se detuvo el calentamiento y el sistema se enfrió a 0°. Se agregó agua helada acidificada con ácido sulfúrico 2N hasta no observar más floculación. Se filtró, se lavó con etanol y el filtrado y los lavados se extrajeron con cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó en evaporador rotatorio, obteniéndose en cada caso ( página 146 ) un líquido que fue analizado por cromatografía gaseosa.

El mejor rendimiento se logró utilizando 2,92 g del hidruro (relación LAH/ $\gamma$ -TBL = 7,9) en 70 ml de tetrahidrofurano. La reacción tuvo lugar a reflujo durante noventa minutos. Se aislaron 727 mg (rendimiento: 76%) de 4-mercapto-1-butanol, un líquido puro por cromatografía gaseosa y que desarrolló coloración con el reactivo de Ellman.

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3400 (OH), 2570 (SH)

EM (m/z, %): 106 ( $\text{M}^+$ , 3), 88 (100), 73 (10), 60 (72), 47 (52), 45 (25), 43 (25)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 1,29 (t, 1 H,  $J$  = 8Hz, -SH), 1,59-1,83 (m, 4H, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2,13 (s, 1H, -OH), 2,47-2,58 (m, 2 H, HSCH<sub>2</sub>-), 3,61 (t, 2 H,  $J$  = 7Hz, -CH<sub>2</sub>OH)

RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz)<sup>7</sup>  $\delta$  = 24,4 (C-3), 30,2 (C-4\*), 31,3 (C-2\*), 62,1 (C-1)

Cuando se utilizaron 1,85 g del hidruro (relación LiAlH<sub>4</sub>/ $\gamma$ -TBL = 5.0) y la mezcla se mantuvo durante 72 horas a 25°, en el cromatograma gaseoso del líquido obtenido se observó la tiolactona de partida y otro componente muy minoritario, que se separó de la mezcla mediante cromatografía flash. Luego de elución con cloruro de metileno se aisló el componente minoritario, un líquido identificado como ácido 4-mercaptobutírico:

EM (m/z,%): 120( $\text{M}^+$ , 36), 102 (98), 61 (92), 60 (99), 47 (91), 45 (60), 43 (82), 42 (100)

RMN- $^1\text{H}$  (100 MHz)  $\delta$  = 1,36 (t, 1H,  $J$  = 8Hz, -SH), 1,72-1,87 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 2,37 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2,52 (t, 2H,  $J$  = 8Hz, -CH<sub>2</sub>SH)

### ***Bromuro de S-(8-hidroxi-1-octil)-isotiouronio ( 73 )***

A una solución de 8-bromo-1-octanol (456 mg, 2,4 mmoles) en 5 mL de etanol se agregaron 198 mg de tiourea (2,6 mmoles). El sistema de reacción se reflujo durante 3 horas. Tras evaporar el etanol en evaporador rotatorio se obtuvo un residuo sólido que se recristalizó de

éter etílico-etanol, obteniéndose un sólido blanco de P.F. 64-66°, poco soluble en agua y soluble en metanol y en etanol. (461 mg, 74%)

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3354 (OH), 3160 ( $\text{NH}_2$ ), 2851 ( $\text{H}_3\text{N}^+$ ), 1655 (C=N)

EM (m/z, %): 205 ( $\text{M}^+$ , 21), 77 (45), 76 (49), 69 (70), 55 (62), 43 (100), 41 (73)

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 200 MHz)  $\delta$  = 1,37-1,77 (m, 16H), 2,20 (s, 1H, -OH),

3,15 (t, 2H,  $J = 8\text{Hz}$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ), 3,55 (t, 2H,  $J = 8\text{Hz}$ ,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ )

RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 50 MHz)  $\delta$  = 26,7 (C-3), 29,3 (C-5\*), 29,6 (C-6\*), 30,0 (C-4),

30,2 (C-7), 32,0 (C-8), 33,5 (C-2), 62,9 (C-1), 173,1 (C-9,  $\text{H}_2\text{NCSN}^+\text{H}_3$ )

#### Análisis elemental

Calculado para  $\text{C}_9\text{H}_{21}\text{BrN}_2\text{OS}$ : C, 37,89; H, 7,37; N, 9,82; S, 11,23; Br, 28,07

Encontrado: C, 38,12; H, 7,61; N, 10,14; S, 11,61; Br, 28,67

#### *8-Mercapto-1-octanol* (16)

A una solución de 8-bromo-1-octanol comercial (1,94 g, 9,3 mmoles) en 20 ml de etanol se agregaron 765 mg de tiourea (10 mmoles) y la mezcla resultante se reflujo durante 2 horas. Luego se agregaron 400 mg de hidróxido de sodio (10 mmoles) en 4 ml de agua y se reflujo 2 horas más. Concluido el reflujo, se llevó a temperatura ambiente, se enfrió a 0° y se acidificó con ácido clorhídrico 2N hasta pH 2. Se observó la formación de una turbidez que desapareció por agitación. Se extrajo con cloruro de metileno, la fase orgánica se lavó con agua y se secó sobre sulfato de sodio. Luego de eliminar el solvente en evaporador rotatorio se obtuvieron 915 mg (rendimiento: 67%) de un líquido puro por cromatografía gaseosa y que desarrolló coloración con el reactivo de Ellman.

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3358 (OH), 2855 (S- $\text{CH}_2$ ), 2556 (SH)

EM (m/z, %): 144 (2), 101 (44), 87 (58), 61 (15), 47 (38), 41 (100)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 1,28-1,36 (m, 12H), 1,53-1,61 (m, 1H, -SH), 2,16 (s, 1H,-

OH), 2,52 (c, 2H, J = 8Hz, -CH<sub>2</sub>SH), 3,63 (t, J= 7Hz, -CH<sub>2</sub>OH)  
 RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz) δ = 24,4 (C-8), 25,5 (C-3), 28,3 (C-6), 29,1 (C-4\*), 29,5 (C-5\*),  
 32,5 (C-2), 33,8 (C-7), 62,6 (C-1)

***Bromuro de S-(12-hidroxi-1-dodecil)-isotiouronio ( 74 )***

A 1,02 g de 12-bromo-1-dodecanol (3,9 mmol) en 12 mL de etanol se agregaron 340 mg de tiourea (4,5 mmoles) y se reflujo durante 3 horas. Tras evaporar el etanol en evaporador rotatorio se obtuvo un residuo sólido que se recristalizó de éter etílico-etanol, obteniéndose un sólido blanco de p.f. 94,5-96,5°, poco soluble en agua y soluble en metanol y en etanol (1,06 g, 80%).

IR (KBr,cm<sup>-1</sup>) : 3330 (OH), 3160 y 3100 (NH<sub>2</sub>), 2810 (H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>), 1630 (C=N)

EM (m/z, %) : 261 (M<sup>+</sup>-cación, 2), 101 (71), 87 (81), 76 (52), 55 (100), 43 (68), 41 (88)

FAB-EM (m/z, %) : 261 (100), 77 (7)

RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 200 MHz) δ = 1,32-1,79 (m, 20 H), 2,16 (s, 1H, -OH), 3,16

(t, 2H, J = 8Hz, -CH<sub>2</sub>S-), 3,54 (t, 2H, J = 8 Hz, -CH<sub>2</sub>OH)

RMN-<sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 50 MHz) δ = 26,9 (C-3), 29,4 (C-9\*), 29,6 (C-10\*), 30,46 (C-6 y

7@), 30,55 (C-5 y 8@), 30,61 (C-4 y 11#), 30,67 (C-4 y 11#), 32,0 (C-12),

33,6 (C-2), 63,0 (C-1), 173,2 (C-13, NH<sub>2</sub>C<sub>3</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)

**Análisis elemental**

Calculado para C<sub>13</sub>H<sub>29</sub>BrN<sub>2</sub>OS : C, 45,75 ; H, 8,50 ; N, 8,21 ; S, 9,38 ; Br, 23,46

Encontrado : C, 45,47 ; H, 8,84 ; N, 8,09 ; S, 9,00 ; Br, 23,85

***12-mercapto-1-dodecanol ( 17 )***

Bromuro de S-(12-hidroxi-1-dodecil)-isotiuronio (748 mg, 2,2 mmoles) se disolvió en ácido acético por calentamiento en baño de agua a 40-50°. La solución se dejó llegar a temperatura ambiente y entonces se añadieron 1,11 g de cinc (17,1 mmoles) previamente tratado con ácido clorhídrico concentrado y lavado con agua y acetona. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas, luego de las cuales se filtró y se lavó con metanol y acetona. El filtrado y los lavados unidos se neutralizaron con bicarbonato de sodio (sólido y solución saturada). A pH 5-6 se observó la formación de un precipitado abundante, por lo que al alcanzar pH 7 se filtró y el filtrado se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio y luego de evaporar en evaporador rotatorio se obtuvo un sólido que fue recristalizado de hexano. Se obtuvieron 235 mg (rendimiento: 50%) de un producto blanco de p.f. 39-40°, puro por cromatografía gaseosa y que desarrolló coloración positiva con el reactivo de Ellman.

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3370 (OH), 2850 (S-CH<sub>2</sub>), 2520 (SH)

EM (m/z, %) : 218 (M<sup>+</sup>, 1), 101 (76), 87 (100), 61 (25), 41 (88), 43 (94), 41 (50)

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD, 200 MHz)  $\delta$  = 1,29-1,34 (m, 20 H), 1,51-1,58

(m, 1H, -SH), 2,20 (s, 1H, -OH), 2,51 (t, 2H, J = 8Hz, -CH<sub>2</sub>SH), 3,57 (t, 2H, J = 8Hz, -CH<sub>2</sub>OH)

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>CN, 200 MHz)  $\delta$  = 24,2 (C-12), 25,4 (C-3), 28,5 (C-10),

28,8 (C-4\*), 29,1 (C-5 y 8\*), 29,2 (C-6 y 7\*), 29,4 (C-9), 31,8 (C-2), 32,4 (C-11), 62,3 (C-1)

Reducción del bromuro de S-(12-hidroxi-1-dodecil)-isotiuronio con borohidruro de sodio

A 67 mg de la sal de S-alkylisotiuronio (0,20 mmoles) disueltos en 1 mL de metanol se agregaron 40 mg de borohidruro de sodio (1,0 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se enfrió sobre hielo y se acidificó con ácido clorhídrico 5%. Se extrajo con cloruro de metileno y acetato de etilo; las fases orgánicas se juntaron y se secaron sobre sulfato de sodio. Por evaporación de los solventes se obtuvo un sólido formado por 12-mercapto-1-dodecanol y 12-hidroxi-1-dodecildisulfuro ( 72 ; EM (m/z,%): 434 (M<sup>+</sup>, 35), 199 (67), 101 (23), 87 (41), 55 (100), 43 (61), 41 (72) )

Reacción de eritro-acetato de (1,4-dimercapto-3-hidroxi)-2-butilo (55) con cloruro de (S)-[ $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -(trifluorometil)]fenilacetilo

A una solución de 34 mg de eritro-acetato de (1,4-dimercapto-3-hidroxi)-2-butilo ( 55, 0,17 mmoles) y 0,3 mL de piridina (3,4 mmoles) en 0,5 ml de tetracloruro de carbono se añadieron 140 mg de cloruro de (S)-MTPA. La mezcla reaccionó con agitación a 27° durante 21 horas. A este tiempo se tomó una alícuota, el sólido presente en la misma se separó por centrifugación y el sobrenadante se analizó por cromatografía gaseosa, verificándose la ausencia de 55. La mezcla de reacción se transfirió a un baño de hielo y se volcó sobre agua alcalinizada con bicarbonato de sodio. Se formó un sistema aceitoso que por agregado de cloruro de metileno formó dos fases. La fase orgánica se lavó con ácido clorhídrico 2N, agua destilada y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Tras evaporar el solvente a presión reducida se obtuvo un líquido que al ser analizado por cromatografía gaseosa y espectroscopía de RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz) reveló ser una mezcla (página 133).

### **3. Preparación de compuestos mediante catálisis enzimática**

#### **Procedimiento general para las reacciones de acilación enzimáticas**

El sustrato y el agente acilante se mezclaron en la relación indicada para cada caso. Los hidroxialcanotioles líquidos formaron soluciones con el agente acilante sin recurrir a un solvente o cosolvente. Solamente se obtuvieron sistemas bifásicos en los casos de 1-tioglicerol con ésteres etílicos de resto ácido mayor que el butanoato. Los hidroxialcanotioles sólidos se disolvieron con el éster en un solvente miscible o se agregaron directamente a este último, formándose una mezcla pastosa. Cuando el sustrato (líquido o sólido) y el agente acilante no formaron una solución, los sistemas heterogéneos resultantes fueron reactivos frente a las lipasas empleadas, aun sin el agregado de un solvente.

A los sistemas anteriormente descritos se añadió la enzima. En las preparaciones que se describirán a continuación, el biocatalizador se empleó sin ningún tratamiento previo. La cantidad de lipasa, el tipo de agitación y la temperatura se indican en cada caso. El transcurso de la reacción se siguió por cromatografía gaseosa, para lo cual se tomaron alícuotas de las que se eliminó la lipasa por centrifugación. Alcanzado el grado de conversión, la enzima se filtró y se lavó con hexano o cloruro de metileno. En los casos en que las mezclas de reacción contenían 1-tioglicerol, ditiotreitól, ditioeritritól y 12-mercapto-1-dodecanol, se efectuó un lavado final de la enzima con pequeñas cantidades de metanol.

El filtrado se evaporó a presión reducida y la mezcla resultante se purificó por medio de los procedimientos cromatográficos que se detallan en cada técnica. Cuando los agentes acilantes fueron acetato de etilo y propionato de etilo, el exceso de los mismos se eliminó a presión reducida, mientras que los restantes ésteres etílicos se separaron cromatográficamente, eluyendo con un solvente de menor polaridad que el empleado para aislar los productos. La pureza de los productos aislados se confirmó por cromatografía gaseosa.

**Acetato de 2-mercaptoetilo ( 2 )**

2-Mercaptoetanol (0,7 ml, 770 mg, 10 mmoles) reaccionó con 15 ml de acetato de etilo (153 mmoles) en presencia de 1,00 g de PPL (E/S = 1,3) durante 7 días a 25°, mediante agitación magnética.

El producto crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash. Por elución con cloruro de metileno se obtuvo el líquido 2 (910 mg , 76%).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 2570 (SH), 1735 (C=O)

EM (m/z , %) : 120 ( $\text{M}^+$ , 1), 61 (32), 60 (99), 59 (44), 47 (13), 45 (38), 43 (100)

RMN- $^1\text{H}$  (100 MHz)  $\delta$  = 1,36 (t, 1 H, J = 8 Hz , -SH), 1,92 (s, 3 H, -COCH<sub>3</sub>),

2,49-2,71 (m, 2 H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), 4,04 (t, 2 H, J = 7 Hz, -OCH<sub>2</sub>-)

RMN- $^{13}\text{C}$  (25 MHz)  $\delta$  = 20,8 (CH<sub>3</sub>-), 23,2 (-CH<sub>2</sub>SH), 65,7 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH),

170,4 (-CO-)

**Acetato-1- $^{13}\text{C}$  de 2-mercaptoetilo ( 4 )**

2-Mercaptoetanol (0,05 ml, 0,71 mmoles) reaccionó con 1,1 ml de acetato de etilo-1- $^{13}\text{C}$  (11 mmoles) en presencia de 71 mg de CAL a 200 rpm durante 3 horas. Mediante un procedimiento cromatográfico similar al descrito para el compuesto 2 se obtuvieron 83 mg del líquido 4 (97% de rendimiento)

EM (m/z , %) : 121 ( $\text{M}^+$ , 3), 61 (87), 60 (37), 44 (100)

Reacción de acetato-1-<sup>13</sup>C- de 2-tiolacetoxietilo ( 5 ) con octanol catalizada por CAL

Una solución formada por 90 mg de 5 (0,55 mmoles) y 0,09 ml de octanol (0,55 mmoles) en 0,1 ml de hexano se hizo reaccionar con 56 mg de CAL a 30° y 200 rpm. Los resultados obtenidos se describieron en la página 73.

***Propionato de 2-mercaptoetilo ( 8 )***

A 0,35 ml de 2-mercaptoetanol (385 mg, 5,0 mmoles) en 8,6 ml de propionato de etilo (75 mmoles) se agregaron 500 mg de PPL. La suspensión resultante se agitó a 130 rpm y 28° durante 7 días.

La purificación por cromatografía flash (elución con cloruro de metileno) rindió 470 mg del líquido 8 (71%).

IR (film, cm<sup>-1</sup>) : 2856 (S-CH<sub>2</sub>), 2570 (SH), 1740 (C=O)

EM (m/z , %) : 134 (M<sup>+</sup>, 14), 74 (66), 60 (99), 47 (100), 45 (100)

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz) δ = 1,15 (t, 3H, J = 7 Hz, -CH<sub>3</sub>), 1,40-1,67 (c, 1H, J = 8 Hz, -SH), 2,36 (c, J = 7Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-CO-), 2,64-2,86 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 4,20 (t, J = 6Hz, -OCH<sub>2</sub>-)

RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz) δ = 8,9 (-CH<sub>3</sub>), 23,1 (-CH<sub>2</sub>SH), 27,2 (-CH<sub>2</sub>CO-), 65,4 (-OCH<sub>2</sub>-), 173,7 (-CO-)

***Butirato de 2-mercaptoetilo ( 9 )***

2-Mercaptoetanol (0,17 ml, 187 mg, 2,4 mmoles) en 1,6 ml de butirato (12,1 mmoles) de etilo se hizo reaccionar en presencia de 300 mg de LIP a 30° durante dos días.

El líquido resultante se purificó mediante cromatografía flash. Por elución con hexano-acetato de etilo 95:5) se obtuvieron 275 mg del líquido **9** ( 77 %).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 2580 (SH), 1740 (C=O)

EM (m/z, %) : 148 ( $\text{M}^+$ , 1), 60 (100), 71 (74), 43 (99)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 0,96 (t, 3H, J = 8Hz, -CH<sub>3</sub>), 1,49 (t, 1H, J = 9 Hz, -SH),

1,61-1,72 (m, 2H, -CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2,31 (t, 2H, J = 8 Hz, -CH<sub>2</sub>CO-),

2,69-2,80 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 4,20 (t, 2H, J = 7 Hz, -OCH<sub>2</sub>-)

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 13,5 (-CH<sub>3</sub>) , 18,3 (-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) , 23,2 (-CH<sub>2</sub>SH) ,

35,9 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-) , 65,4 (-OCH<sub>2</sub>) , 173,2 (-CO-)

#### **Hexanoato de 2-mercaptoetilo ( 10 )**

2-Mercaptoetanol (0,17 ml, 2,4 mmoles) en 2,0 ml de hexanoato de etilo (12,1 mmoles) reaccionó en presencia de 245 mg de PPL a 25° durante 7 días.

El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna. La elución con hexano-cloruro de metileno 80:20 dio 354 mg del líquido **10** ( 84%).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 2570 (SH) , 1740 (C=O)

EM (m/z, %) : 176 ( $\text{M}^+$ , 1), 99 (92), 61 (97), 43 (100), 41 (100)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 0,88 (t, 3H, J = 7Hz, -CH<sub>3</sub>), 1,25-1,32 (m, 6H), 1,44 (t, 1H,

J = 9 Hz, -SH), 2,34 (t, 2H, J = 7 Hz, -CH<sub>2</sub>CO-), 2,67-2,80 (m, 2H,

-CH<sub>2</sub>SH), 4,18 (t, 2H, J = 7 Hz, -OCH<sub>2</sub>-)

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 13,8 (-CH<sub>3</sub>), 22,3 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23,2 (-CH<sub>2</sub>SH), 24,6

(-CO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 31,3 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 34,1 (-CO-CH<sub>2</sub>-),

65,5 (-CH<sub>2</sub>O-), 173,6 (-CO-)

***Octanoato de 2-mercaptoetilo ( 11 )***

2-Mercaptoetanol (0,17 mL, 2,4 mmoles) en 2,4 ml de octanoato de etilo (12,2 mmoles) se trató con 238 mg de LIP a 31° durante 8 días.

El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano-cloruro de metileno 80:20), obteniéndose 332 mg del líquido 11 (68 %).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 2572 (SH), 1743 (C=O)

EM (m/z, %) : 204 ( $\text{M}^+$ , 1), 145 (100), 127 (94), 61 (67), 57 (66)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 0,86 (t, 3H,  $J = 7$  Hz, -CH<sub>3</sub>), 1,22-1,29 (m, 10 H, -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-), 1,43 (t, 1H,  $J = 9$  Hz, -SH), 2,33 (t, 2H,  $J = 7$  Hz, -CH<sub>2</sub>CO-), 2,67-2,79 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 4,19 (t, 2H,  $J = 7$  Hz, -OCH<sub>2</sub>-)

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 14,2 (-CH<sub>3</sub>), 22,4 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23,2 (-CH<sub>2</sub>SH), 25,0 (-CO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 29,3 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-), 31,8 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 34,2 (-CO-CH<sub>2</sub>-), 65,4 (-CH<sub>2</sub>O-), 173,3 (-CO-)

***Decanoato de 2-mercaptoetilo ( 12 )***

2-Mercaptoetanol (0,17 ml, 2,4 mmoles) y 2,8 mL de decanoato de etilo (12,1 mmoles) se hicieron reaccionar en presencia de 722 mg de CCL durante 24 horas a 32° y 150 rpm.

El producto crudo resultante se purificó por cromatografía en columna (eluyente: hexano-cloruro de metileno 80:20), obteniéndose 308 mg del líquido 12 (63%).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 2570 (SH), 1744 (C=O)

EM (m/z, %) : 173 (61), 61 (86), 60 (100), 57 (79)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 0,85 (t, 3H,  $J = 7$  Hz, -CH<sub>3</sub>), 1,21-1,30 (m, 14H,

-CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-), 1,45 (t, 1H, J = 9 Hz, -SH), 2,33 (t, 2H, J = 7 Hz, -CH<sub>2</sub>CO-), 2,68-2,81 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 4,20 (t, 2H, J = 7 Hz, -OCH<sub>2</sub>-),  
 RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz) δ = 13,9 (-CH<sub>3</sub>), 22,4 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23,2 (-CH<sub>2</sub>SH), 24,8 (-CO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 29,0 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C\*H<sub>2</sub>-), 29,1 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(C\*H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-), 29,3 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CO-), 31,8 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 34,1 (-CO-CH<sub>2</sub>-), 65,4 (-CH<sub>2</sub>O-), 173,6 (-CO-)

### ***Dodecanoato de 2-mercaptoetilo ( 13 )***

2-Mercaptoetanol (0,17 ml, 2,4 mmoles) y 9,5 ml de dodecanoato de etilo (36 mmoles) reaccionaron en presencia de 240 mg de PPL durante 24 horas.

La cromatografía en columna del líquido resultante (elución con hexano-cloruro de metileno 80:20) rindió 319 mg del líquido 13 (51 %).

IR (film, cm<sup>-1</sup>): 2575 (SH), 1740 (C=O)

EM (m/z, %): 200 (94), 71 (89), 61 (79), 60 (94), 57 (96), 43 (100)

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz) δ = 0,86 (t, 3H, J = 7 Hz, -CH<sub>3</sub>), 1,20-1,28 (m, 18H, -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-), 1,46 (t, 1H, J = 8 Hz, -SH), 2,32 (t, 2H, J = 7 Hz, -CH<sub>2</sub>CO-), 2,69-2,81 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 4,19 (t, 2H, J = 7 Hz, -OCH<sub>2</sub>-)  
 RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz) δ = 14,1 (-CH<sub>3</sub>), 22,5 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23,2 (-CH<sub>2</sub>SH), 24,8 (-CO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 29,10 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C\*H<sub>2</sub>-), 29,17 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-C\*H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-), 29,24 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-C\*H<sub>2</sub>-), 29,4 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-C\*H<sub>2</sub>-), 29,5 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-C\*H<sub>2</sub>-), 31,7 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 34,1 (-CO-CH<sub>2</sub>-), 65,4 (-CH<sub>2</sub>O-), 173,6 (-CO-)

**Acetato de 3-mercaptopropilo ( 18 )**

A 186 mg de 3-mercapto-1-propanol (2,0 mmoles) en 3 mL de acetato de etilo (30,7 mmoles) se agregaron 200 mg de PPL. La suspensión se agitó magnéticamente durante 24 horas a 28°.

Por cromatografía flash, utilizando hexano como eluyente, se obtuvieron 240 mg del líquido **18** (89%)

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 2572 (SH) , 1745 (C=O)

EM (m/z , %) : 134 ( $\text{M}^+$ , 10), 74 (100), 47 (58), 43 (88)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 1,40 (t, 1H, J = 8 Hz, -SH), 1,87-2,01 (m, 2H, -CH $_2$ CH $_2$ SH) ,  
2,06 (s, 3H, -CH $_3$ ), 2,55-2,67 (m, 2H, -CH $_2$ CH $_2$ SH), 4,18 (t, 2H, J = 8 Hz,  
-OCH $_2$ -)

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 21,1 (-CH $_3$ ), 29,7 (-CH $_2$ SH), 32,8 (-OCH $_2$ CH $_2$ -),  
62,5 (-OCH $_2$ -), 171,1 (-CO-)

**Butanoato de 3-mercaptopropilo ( 19 )**

3-Mercapto-1-propanol (92 g, 1,0 mmoles) y 0,6 mL de butirato de etilo (4,5 mmoles) se hicieron reaccionar en presencia de 213 mg de CCL durante 24 horas a 28° y 200 rpm.

Por cromatografía en columna (eluyente: hexano-acetato de etilo 90:10) se obtuvieron 139 mg del líquido **19** (86%).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 2568 (SH), 1741 (C=O)

EM (m/z , %) : 162 ( $\text{M}^+$ , 1), 74 (100), 71 (65), 43 (59)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 0,95 (t, 3H, J = 8 Hz, -CH $_3$ ), 1,45 (t, 1H, J = 9 Hz, -SH),  
1,59-1,70 (m, 2H, CH $_3$ CH $_2$ CH $_2$ -), 1,90-2,05 (m, 2H, -CH $_2$ CH $_2$ SH),

2,30 (t, 2H, J = 8 Hz, -CH<sub>2</sub>CO-), 2,58-2,69 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 4,10  
(t, 2H, J = 7 Hz, -OCH<sub>2</sub>-)

RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz) δ = 13,5 (-CH<sub>3</sub>), 18,4 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 29,4 (-CH<sub>2</sub>SH), 32,5  
(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), 34,0 (-CO-CH<sub>2</sub>-), 62,3 (-OCH<sub>2</sub>-), 173,2 (-CO-)

### ***Hexanoato de 3-mercaptopropilo ( 20 )***

A 65 mg de 3-mercapto-1-propanol (0,71 mmoles) en 0,61 mL de hexanoato de etilo (3,6 mmoles) se agregaron 78 mg de LIP. La suspensión resultante se agitó a 27° y 200 rpm durante 24 horas.

La cromatografía en columna del crudo de reacción condujo, mediante elución con hexano-cloruro de metileno 80:20, a 113 mg del líquido 20 (84%).

IR (film, cm<sup>-1</sup>) : 2570 (SH), 1740 (C=O)

EM (m/z, %) : 190 (M<sup>+</sup>, 10), 117 (83), 99 (100), 75 (88), 47 (77), 41 (94)

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz) δ = 0,87 (t, 3H, J = 7Hz, -CH<sub>3</sub>), 1,24-1,31 (m, 6H, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-),  
1,42 (t, 1H, J = 8Hz, -SH), 1,88-2,00 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), 2,34  
(t, 2H, J = 7Hz, -CH<sub>2</sub>CO-), 2,54-2,65 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 4,11  
(t, 2H, J = 7Hz, -OCH<sub>2</sub>-)

RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz) δ = 13,7 (-CH<sub>3</sub>), 22,2 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24,5 (-CO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 29,4  
(-CH<sub>2</sub>SH), 31,1 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 32,4 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 34,2 (-CO-CH<sub>2</sub>-),  
62,2 (-CH<sub>2</sub>O-), 173,6 (-CO-)

### ***Octanoato de 3-mercaptopropilo ( 21 )***

3-Mercapto-1-propanol (92 mg, 1,0 mmoles) y 0,95 ml de octanoato de etilo (4,9 mmoles) se agitaron en presencia de 110 mg de LIP durante 45 horas a 31° y 200 rpm.

La cromatografía en columna del crudo de reacción (elución con hexano-cloruro de metileno 80:20) dio 192 mg del líquido **21** (88%).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2570 (SH), 1740 (C=O)

EM (m/z, %): 218 ( $\text{M}^+$ , 1), 127 (33), 74 (100), 57 (30)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 0,85 (t, 3H,  $J$  = 7 Hz, -CH<sub>3</sub>), 1,21-1,30 (m, 10 H, -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-), 1,45 (t, 1H,  $J$  = 9 Hz, -SH), 1,88-2,02 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), 2,33 (t, 2H,  $J$  = 8 Hz, -CH<sub>2</sub>CO-), 2,56-2,67 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), 4,10 (t, 2H,  $J$  = 8 Hz, -OCH<sub>2</sub>-)

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 14,0 (-CH<sub>3</sub>), 22,3 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24,9 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-), 29,3 (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-), 29,4 (-C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>SH), 31,6 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 32,5 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), 34,0 (-CH<sub>2</sub>CO-), 62,6 (-CH<sub>2</sub>O-), 173,7 (-CO-)

#### *Acetato de 4-mercaptobutilo ( 22 )*

4-Mercapto-1-butanol (269 mg, 2,5 mmoles) en 3,8 ml de acetato de etilo (38,9 mmoles) se hicieron reaccionar en presencia de 255 mg.de PPL a 200 rpm y 30° durante 42 horas.

Por cromatografía flash utilizando hexano-acetato de etilo 80:20 como eluyente se aislaron 308 mg de **22** (82 %).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2574 (SH), 1735 (C=O)

EM (m/z, %): 88 (62), 60 (65), 47 (22), 43 (100)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 1,36 (t, 1H,  $J$  = 8 Hz, -SH), 1,64-1,79 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), 2,05 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,51-2,62 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 4,08 (t, 2H,  $J$  = 7 Hz, -OCH<sub>2</sub>-)

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 20,8 (-CH<sub>3</sub>), 24,1 (-CH<sub>2</sub>SH), 27,2 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 30,3 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), 63,7 (-OCH<sub>2</sub>-), 170,9 (-CO-)

**Hexanoato de 4-mercaptobutilo ( 23 )**

4-Mercapto-1-butanol (81 mg, 0,76 mmoles) en 0,62 mL de hexanoato de etilo (3,7 mmoles) reaccionó con 200 mg de CCL a 30° y 190 rpm durante 7 días.

La cromatografía en columna del crudo de reacción (eluyente: hexano-cloruro de metileno 80:20) rindió 94 mg del líquido 23 (61%).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2575 (SH), 1740 (C=O)

EM (m/z, %): 117 (70), 99 (84), 88 (54), 47 (31), 43 (100), 41 (87)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 0,86 (t, 3H,  $J$  = 7Hz, -CH<sub>3</sub>), 1,26-1,32 (m, 6H, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-),  
1,38 (t, 1H,  $J$  = 8 Hz, -SH), 1,67-1,80 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), 2,36  
(t, 2H,  $J$  = 8Hz, -CH<sub>2</sub>CO), 2,52-2,61 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 4,07  
(t, 2H,  $J$  = 7Hz, -OCH<sub>2</sub>-)

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 13,8 (-CH<sub>3</sub>), 22,3 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24,2 (-C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>SH), 24,6  
(-COCH<sub>2</sub>C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>-), 26,9 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 30,4 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), 31,4  
(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 33,9 (-COCH<sub>2</sub>-), 64,1 (-OCH<sub>2</sub>-), 173,5 (-CO-)

**Octanoato de 4-mercaptobutilo ( 24 )**

A 57 mg de 4-mercapto-1-butanol (0,54 mmoles) y 0,52 mL de octanoato de etilo (2,7 mmoles) se agregaron 168 mg de CCL. La suspensión resultante se agitó durante 48 horas a 30° y 190 rpm.

Se aislaron 101 mg del líquido 24 (80%) luego de cromatografiar en columna el crudo de reacción (elución con hexano-cloruro de metileno 80:20).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2570 (SH), 1745 (C=O)

EM (m/z, %): 88 (44), 47 (57), 43 (74), 41 (100)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 0,84 (t, 3H,  $J$  = 7 Hz,  $-\text{CH}_3$ ), 1,21-1,30 (m, 10 H,  $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5-$ ), 1,41 (t,  $J$  = 8 Hz, 1H,  $-\text{SH}$ ), 1,65-1,79 (m, 4H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ ), 2,32 (t, 2H,  $J$  = 7Hz,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 2,49- 2,60 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{SH}$ ), 4,08 (t, 2H,  $J$  = 7 Hz,  $-\text{OCH}_2-$ )

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 13,9 ( $-\text{CH}_3$ ), 22,4 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 24,2 ( $-\text{C}^*\text{H}_2\text{SH}$ ), 24,8 ( $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$ ), 26,9 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 29,3 ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2-$ ), 30,5 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ ), 31,7 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 34,1 ( $-\text{COCH}_2-$ ), 64,0 ( $-\text{OCH}_2-$ ), 173,5 ( $-\text{CO}-$ )

#### *Acetato de 8-mercaptooctilo ( 25 )*

8-Mercapto-1-octanol (52 mg, 0,32 mmoles) en 0,5 ml de acetato de etilo (5,1 mmoles) se agitaron a 210 rpm y 33° durante siete días en presencia de 54 mg de LIP.

El compuesto **25** se aisló mediante cromatografía flash, eluyendo con hexano-acetato de etilo 95:5 (56 mg, 85%).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 2868 (S- $\text{CH}_2$ ), 2572 (SH), 1749 (CO)

EM (m/z, %) : 55 (39), 47 (15), 43 (100), 41 (36)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 1,23-1,40 (m, 8H), 1,52-1,70 (m, 5H), 2,02 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 2,44-2,55 (c, 2H,  $J$  = 8 Hz,  $-\text{CH}_2\text{SH}$ ), 4,03 (t, 2H,  $J$  = 8 Hz,  $-\text{OCH}_2-$ )

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 20,9 ( $-\text{CH}_3$ ), 24,5 ( $-\text{CH}_2\text{SH}$ ), 25,8 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 28,2 ( $-\text{OCH}_2\text{C}^*\text{H}_2-$ ), 28,5 ( $-\text{C}^*\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ ), 29,0 ( $-\text{C}^*\text{H}_2\text{C}^*\text{H}_2(\text{CH}_2)_3\text{SH}$ ), 29,3 ( $-\text{C}^*\text{H}_2\text{C}^*\text{H}_2(\text{CH}_2)_3\text{SH}$ ), 33,9 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ ), 64,5 ( $-\text{OCH}_2-$ ), 171,1 ( $-\text{CO}-$ )

**Hexanoato de 8-mercaptooctilo ( 26 )**

8-Mercapto-1-octanol (0,35 mmoles) y 0,37 mL de hexanoato de etilo (2,2 mmoles) se hicieron reaccionar 8 días a 33° y 210 rpm en presencia de 32 mg de LIP.

Tras purificar por cromatografía en columna el producto crudo de reacción (hexano-acetato de etilo 90:10) se aislaron 82 mg del líquido 26 (91%).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2570 (SH), 1740 (C=O)

EM (m/z, %): 260 ( $\text{M}^+$ , 1), 117 (51), 99 (71), 47 (28), 43 (100)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 0,89 (t, 3H,  $J$  = 7Hz,  $-\text{CH}_3$ ), 1,21-1,40 (m, 14H), 1,55-1,70 (m, 5H), 2,28 (t, 2H,  $J$  = 8Hz,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 2,46-2,56 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{SH}$ ), 4,10 (t, 2H,  $J$  = 7Hz,  $-\text{OCH}_2-$ )

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 13,8 ( $-\text{CH}_3$ ), 22,2 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 24,5 ( $-\text{C}^*\text{H}_2\text{SH}$ ), 24,6 ( $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{C}^*\text{H}_2-$ ), 25,8 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 28,3 ( $-\text{OCH}_2\text{C}^\#\text{H}_2-$ ), 28,6 ( $-\text{C}^\#\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ ), 29,0 ( $-\text{C}^\text{@}\text{H}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{SH}$ ), 29,5 ( $-\text{CH}_2\text{C}^\text{@}\text{H}_2(\text{CH}_2)_3\text{SH}$ ), 31,3 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 33,9 ( $-\text{CO}-\text{C}^\wedge\text{H}_2-$ ), 34,3 ( $-\text{C}^\wedge\text{H}_2\text{CH}_2\text{SH}$ ), 64,2 ( $-\text{OCH}_2-$ ), 173,8 ( $-\text{CO}-$ )

**Octanoato de 8-mercaptooctilo ( 27 )**

8-Mercapto-1-octanol (40 mg, 0,25 mmoles) y 0,27 mL de octanoato de etilo (1,4 mmoles) se hicieron reaccionar durante 45 horas a 33° y 210 rpm en presencia de 23 mg de LIP.

La cromatografía en columna del crudo de reacción (eluyente: hexano-acetato de etilo 90:10) permitió obtener 63 mg del líquido 27 (89%).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2868 (S- $\text{CH}_2$ ), 2577 (SH), 1742 (CO)

EM (m/z, %): 145 (45), 127 (59), 57 (72), 55 (100), 47 (20), 43 (55), 41 (89)

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz)  $\delta$  = 0,87 (t, 3H, J = 7 Hz, -CH<sub>3</sub>), 1,20-1,35 (m, 18H), 1,53-1,66 (m, 5H), 2,27 (t, 2H, J = 7 Hz, -CH<sub>2</sub>CO-), 2,44-2,56 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 4,08 (t, 2H, J = 7 Hz, -OCH<sub>2</sub>-)

RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz)  $\delta$  = 13,9 (-CH<sub>3</sub>), 22,5 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24,5 (-CH<sub>2</sub>SH), 24,9 (-CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 25,8 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 28,3 (-OCH<sub>2</sub>C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>-), 28,6 (-C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), 28,8 (-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-), 29,0 (-C<sup>#</sup>H<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SH), 29,6 (-CH<sub>2</sub>C<sup>#</sup>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SH), 31,6 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 33,9 (-COC@H<sub>2</sub>-), 34,3 (-C@H<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), 64,2 (-CH<sub>2</sub>O-), 173,8 (-CO-)

### *Acetato de 12-mercaptododecilo ( 28 )*

12-Mercapto-1-dodecanol (97 mg, 0,45 mmoles) se disolvió en 0,7 ml de acetato de etilo (7,1 mmoles) por calentamiento a 40°. Se dejó llegar a temperatura ambiente y a la solución formada se le agregaron 44 mg de LIP. La reacción se llevó a cabo a 30° y 170 rpm durante 7 días.

El líquido **28** se aisló por mediante cromatografía flash, empleando como eluyente hexano-acetato de etilo 98:2. (84 mg, 73 %).

IR (film, cm<sup>-1</sup>) : 2855 (S-CH<sub>2</sub>-), 2573 (SH), 1736 (CO)

EM (m/z, %) : 260 (M<sup>+</sup>, 1), 61 (36), 55 (82), 47 (15), 43 (100), 41 (54)

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 1,24-1,43 (m, 16H), 1,54-1,65 (m, 5H), 2,04 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,47-2,58 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 4,05 (t, J = 7 Hz, 2H, -OCH<sub>2</sub>-)

RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 21,0 (-CH<sub>3</sub>), 24,6 (-CH<sub>2</sub>SH), 25,9 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 28,3 (-OCH<sub>2</sub>C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>-), 28,6 (-C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), 29,0 (-O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C<sup>#</sup>H<sub>2</sub>-), -O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C<sup>#</sup>H<sub>2</sub>-), 29,2 (-O(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(C<sup>#</sup>H<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-), 29,5 (-CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SH), 34,0 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), 64,6 (-CH<sub>2</sub>O-), 171,2 (-CO-)

**Butirato de 12-mercaptododecilo ( 29 )**

A una suspensión de 49 mg de 12-mercapto-1-dodecanol (0,22 mmoles) en 0,15 ml (1,13 mmoles) de butirato de etilo se agregaron 25 mg de LIP. El sistema se agitó a 210 rpm y 33° durante 45 horas.

El producto crudo de la mezcla de reacción se sembró mediante pastilla en una columna de silicagel; por elución con hexano-acetato de etilo 95:5 se obtuvieron 53 mg del líquido 29 (82 %)

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 2862 (S-CH<sub>2</sub>) , 2574 (SH) , 1738 (C=O)

EM (m/z, %) : 288 (M<sup>+</sup>,2), 89 (72), 71 (100), 47 (18), 43 (94), 41 (82)

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz)  $\delta$  = 0,95 (t, 3H, J = 8 Hz, -CH<sub>3</sub>), 1,24-1,36 (m, 16H), 1,60-1,71 (m, 7H), 2,28 (t, 2H, J = 8 Hz, -CH<sub>2</sub>CO-), 2,52 (c, 2H, J = 7 Hz, -CH<sub>2</sub>SH), 4,06 (t, 2H, J = 7Hz, -OCH<sub>2</sub>-)

RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz)  $\delta$  = 13,5 (-CH<sub>3</sub>), 18,4 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24,6 (-CH<sub>2</sub>SH), 25,8 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 28,2 (-OCH<sub>2</sub>C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>-), 28,6 (-C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH), 28,9 (-O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C<sup>#</sup>H<sub>2</sub>- , -O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C<sup>#</sup>H<sub>2</sub>-), 29,2 (-O(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(C<sup>#</sup>H<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-), 29,5 (-CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SH), 34,0 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH), 36,0 (-COCH<sub>2</sub>-), 64,7 (-OCH<sub>2</sub>-), 173,3 (-CO-)

**Acetato de 1-mercapto-2-propilo ( 30 )**

1-Mercapto-2-propanol (0,3 ml, 314 mg, 3,4 mmoles) se disolvió en 5 ml (51 mmoles) de acetato de etilo. Se agregaron 344 mg de LIP y el sistema formado se agitó a 200 rpm y 30° durante quince días.

El compuesto 30, líquido, se aisló luego de una cromatografía flash, utilizando cloruro de metileno como eluyente (50 mg , 11 %)

EM (m/z, %) : 134 (M<sup>+</sup>, 1), 74 (95), 47 (10), 43 (100)

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 1,27 (d, J = 7 Hz, 3H, -CHCH<sub>3</sub>), 1,40 (t, J = 8 Hz, 1H, -SH), 2,03 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2,65 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 4,96-5,02 (m, 1H, -CH-)

***Acetato de (3-mercapto-2-hidroxi)-1-propilo ( 32 )***

A una solución de 0,86 mL de 1-tioglicerol (1,07 g , 9,9 mmoles) en 15 mL de acetato de etilo (153 mmoles) se agregaron 1 g de PPL. La reacción transcurrió a 150 rpm y 25° durante 15 días.

La cromatografía flash de la mezcla final de reacción (elución con hexano-acetato de etilo 1:1) condujo a 1,10 g de 32, un líquido aceitoso. (74%)

IR (film, cm<sup>-1</sup>) : 3440 (OH), 2572 (SH), 1730 (CO)

EM (m/z, %): 132 (M<sup>+</sup>-18, 4), 90 (69), 77 (57), 47 (62), 43 (100)

RMN-<sup>1</sup>H (100 MHz) δ = 1,51 (t, 1H, J = 9 Hz, -SH), 2,08 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2,60-2,73 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 3,14 (s<sub>a</sub>, 1H, -OH), 3,79-3,93 (m, 1H, -CH-), 4,06-4,20 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>OCO-)

RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz) δ = 20,6 (-CH<sub>3</sub>), 27,7 (-CH<sub>2</sub>SH), 66,1 (-CH<sub>2</sub>OCO-), 70,1 (-CHOH), 171,0 (-COCH<sub>3</sub>)

La asignación de las señales a 66,1 y 70,1 ppm se confirmó por medio de un espectro de RMN-<sup>13</sup>C-DEPT.

**Propionato de (3-mercapto-2-hidroxi)-1-propilo ( 33 )**

1-Tioglicerol (0,58 ml, 6,7 mmoles) en 3,8 ml de propionato de etilo (32 mmoles) se agitó a 32° y 200 rpm durante 2 horas en presencia de 1,96 g de CAL.

Concluida la reacción, el producto crudo resultante se purificó por cromatografía en columna. La elución con hexano-acetato de etilo 85:15 dio lugar a 102 mg de un líquido que fue identificado como propionato de (3-mercapto-2-propanoxi)-1-propilo ( 40 )

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2881 (SCH<sub>2</sub>), 2572 (SH), 1749 (CO)

EM (m/z, %): 57 (100), 41 (22)

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz)  $\delta$  = 1,13 (t, 3H, J = 8 Hz, -CH<sub>2</sub>OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,15 (t, 3H, J = 8 Hz, -CHOCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,46 (t, 1H, J = 9 Hz, -SH), 2,33 (c, 2H, J = 8 Hz, -CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,35 (c, 2H, J = 8 Hz, -CHOCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,69-2,77 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 4,22 (dd, 1H, J = 6 Hz, -CH<sup>\*</sup>H'OCO-), 4,35 (dd, 1H, J = 4 Hz, -CHH<sup>\*</sup>OCO-), 5,02-5,13 (m, 1H, -CHOCO-)

RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz)  $\delta$  = 9,0 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>- y CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COOCH-), 27,4 (CH<sub>3</sub>C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>- y CH<sub>3</sub>C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOCH-), 27,5 (-C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>SH), 63,0 (-CH<sub>2</sub>OCO-), 72,1 (-CHOCO-), 173,6 (-CHOCO-), 173,9 (-CH<sub>2</sub>OCO-)

Por elución con hexano-acetato de etilo 1:1 se obtuvieron 543 mg (49%) de propionato de (3-mercapto-2-hidroxi)-1-propilo ( 33, líquido aceitoso)

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3600 (OH), 2888 (S-CH<sub>2</sub>), 1749 (CO)

EM (m/z, %): 146 (M<sup>+</sup>-18, 4), 90 (34), 57 (100), 47 (30)

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz)  $\delta$  = 1,14 (t, 3H, J = 7 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CO-), 1,49 (t, 1H, J = 9 Hz, -SH), 2,34 (c, 2H, J = 7 Hz, -CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CO-), 2,53 (s, 1H, -OH), 2,60-2,77

(m, 2H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{SH}$ ), 3,82-3,93 (m, 1H,  $-\underline{\text{C}}\text{HOH}$ ), 4,13 (dd, 1H,  $J_1 = 5 \text{ Hz}$ ;  
 $J_2 = 3 \text{ Hz}$ ,  $-\underline{\text{C}}\text{H}^*\text{H}'\text{OCO}-$ ), 4,20 (dd, 1H,  $J_1 = 3 \text{ Hz}$ ;  $J_2 = 5 \text{ Hz}$ ,  $-\text{C}\underline{\text{H}}\text{H}'^*\text{OCO}-$ )  
 RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta = 8,9$  ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 27,3 ( $\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}-$ ), 28,1 ( $-\text{CH}_2\text{SH}$ ),  
 66,2 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OCO}-$ ), 70,4 ( $-\underline{\text{C}}\text{HOH}$ ), 174,5 ( $-\underline{\text{C}}\text{OOCH}_2-$ )

***Butirato de (3-mercapto-2-hidroxi)-1-propilo (34)***

1-Tioglicerol (0,14 ml, 1,6 mmoles) y 1,1 ml de butirato de etilo (8,3 mmoles) se dejaron reaccionar en presencia de 160 mg de LIP durante 20 horas a 150 rpm.

Por cromatografía en columna del crudo de reacción (eluyente: hexano-acetato de etilo 80:20), se aisló un líquido aceitoso identificado como 34 (175 mg, 61 %)

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3500 (OH), 2570 (SH), 1745 (C=O)

EM (m/z, %): 160 ( $\text{M}^+ - 18$ , 3), 90 (27), 71 (96), 72 (45), 47 (24), 43 (100)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta = 0,96$  (t, 3H,  $J = 8 \text{ Hz}$ ,  $-\text{CH}_3$ ), 1,50 (t, 1H,  $J = 9 \text{ Hz}$ ,  $-\text{SH}$ ),  
 1,60-1,71 (m, 2H,  $\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2-$ ), 2,29 (t, 2H,  $J = 8 \text{ Hz}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 2,46  
 (s, 1H,  $-\text{OH}$ ), 2,62-2,73 (m, 2H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{SH}$ ), 3,79-3,91 (m, 1H,  $-\underline{\text{C}}\text{HOH}$ ), 4,12  
 (dd, 1H,  $J_1 = 5 \text{ Hz}$ ;  $J_2 = 2 \text{ Hz}$ ,  $-\underline{\text{C}}\text{H}^*\text{H}'\text{OCO}-$ ), 4,19 (dd, 1H,  $J_1 = 2 \text{ Hz}$ ;  
 $J_2 = 5 \text{ Hz}$ ,  $-\text{C}\underline{\text{H}}\text{H}'^*\text{OCO}-$ )

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta = 13,4$  ( $-\text{CH}_3$ ), 18,5 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$ ), 28,0 ( $-\text{CH}_2\text{SH}$ ), 36,1  
 ( $-\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ), 66,1 ( $-\text{CH}_2\text{O}-$ ), 70,4 ( $-\text{CHOH}$ ), 173,0 ( $-\text{CO}-$ )

***Hexanoato de (3-mercapto-2-hidroxi)-1-propilo (35)***

1-Tioglicerol (0,14 ml, 1,6 mmoles) y 1,35 mL de hexanoato de etilo (8,2 mmoles) se hicieron reaccionar en presencia de 168 mg de LIP durante 24 horas a 28° y 150 rpm.

La cromatografía en columna del crudo de reacción condujo, tras elución con hexano-acetato de etilo 1:1 a 219 mg de **35**, un líquido aceitoso. (66 %)

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3550 (OH), 2573 (SH), 1746 (C=O)

EM (m/z, %): 188 ( $\text{M}^+$ -18, 1), 99 (100), 90 (20), 72 (58), 43 (84)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 0,87 (t, 3H,  $J$  = 7 Hz, -CH<sub>3</sub>), 1,24-1,31 (m, 6H,

CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-), 1,50 (t, 1H,  $J$  = 9 Hz, -SH), 2,14 (s, 1H, -OH), 2,33

(t, 2H,  $J$  = 7 Hz, -CH<sub>2</sub>CO-), 2,58-2,70 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 3,78-3,87

(m, 1H, -CHOH), 4,11 (dd, 1H,  $J_1$  = 5 Hz;  $J_2$  = 2 Hz, -CH<sup>\*</sup>H'OCO-),

4,18 (dd, 1H,  $J_1$  = 2 Hz;  $J_2$  = 5 Hz, -CHH<sup>\*</sup>OCO-)

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 13,7 (-CH<sub>3</sub>), 22,1 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24,4 (-CO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 27,9

(-CH<sub>2</sub>SH), 31,0 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 34,0 (-CO-CH<sub>2</sub>-), 66,0 (-CH<sub>2</sub>OCO-),

70,3 (-CHOH), 173,8 (-CO-)

#### ***Decanoato de (3-mercapto-2-hidroxi)-1-propilo (36)***

1-Tioglicerol (0,17 ml, 2,0 mmoles) y 2,3 mL de decanoato de etilo (9,9 mmoles) reaccionaron con 200 mg de LIP durante 2 horas a 200 rpm y 30°.

La cromatografía en columna del crudo de reacción (eluyente: hexano-acetato de etilo 1:1) rindió 451 mg de **36** (87 %)

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3560 (OH), 2576 (SH), 1743 (C=O)

EM (m/z, %): 244 ( $\text{M}^+$ -18, 4), 155 (93), 90 (61), 72 (100), 47 (21), 43 (90)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 0,87 (t, 3H,  $J$  = 7 Hz, -CH<sub>3</sub>), 1,20-1,28 (m, 14H,

CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-), 1,49 (t, 1H,  $J$  = 9 Hz, -SH), 2,15 (t, 2H,  $J$  = 7 Hz,

-CH<sub>2</sub>CO-), 2,46 (s, 1H, -OH), 2,61-2,73 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 3,80-3,93

(m, 1H, -CHOH), 4,12 (dd, 1H,  $J_1$  = 5 Hz;  $J_2$  = 3 Hz, -CH<sup>\*</sup>H'OCO-),

4,19 (dd, 1H,  $J_1 = 3$  Hz;  $J_2 = 5$  Hz,  $-\underline{\text{CH}}\underline{\text{H}}^*\text{OCO}-$ )

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta = 13,9$  ( $-\text{CH}_3$ ), 22,5 ( $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_3$ ), 24,8 ( $-\text{CO}-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2-$ ), 28,0 ( $-\text{CH}_2\text{SH}$ ), 29,0 ( $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2\underline{\text{C}}^*\text{H}_2-$ ), 29,1 ( $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_3-(\underline{\text{C}}^*\text{H}_2)_2-$ ), 29,3 ( $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\underline{\text{C}}^*\text{H}_2-$ ), 31,7 ( $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 34,2 ( $-\text{CO}-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2-$ ), 66,1 ( $-\text{CH}_2\text{O}-$ ), 70,4 ( $-\text{CHOH}$ ), 173,9 ( $-\text{CO}-$ )

***Dodecanoato de (3-mercapto-2-hidroxi)-1-propilo (37)***

A 0,17 mL de 1-tioglicerol (2,0 mmoles) en 2,5 mL de dodecanoato de etilo (9,5 mmoles) se agregaron 598 mg de CCL. La suspensión resultante se agitó a 30° durante 24 horas.

Con el producto evaporado resultante se preparó una pastilla que se sembró en una columna de sílicagel. Por elución con hexano-acetato de etilo 1:1 se obtuvieron 446 mg de **37** (79%).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3480 (OH), 2855 (S- $\text{CH}_2$ ), 2578 (SH), 1742 (CO)

EM (m/z, %): 272 ( $\text{M}^+ - 18$ , 4), 183 (78), 90 (52), 72 (93), 57 (86), 43 (100)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta = 0,88$  (t, 3H,  $J = 6$  Hz,  $-\text{CH}_3$ ), 1,20-1,27 (m, 18H,  $\text{CH}_3-(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2)_9-$ ), 1,54 (t, 1H,  $J = 9$  Hz), 2,11 ( $s_a$ , 1H,  $-\text{OH}$ ), 2,35 (t, 2H,  $J = 7$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 2,61-2,72 (m, 2H,  $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{SH}$ ), 3,75-3,86 (m, 1H,  $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{OH}$ ), 4,11 (dd, 1H,  $J_1 = 5$  Hz,  $J_2 = 2$  Hz,  $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}^*\text{H}'\text{OCO}-$ ), 4,18 (dd, 1H,  $J_1 = 2$  Hz;  $J_2 = 5$  Hz,  $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{H}}^*\text{OCO}-$ )

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta = 14,0$  ( $-\text{CH}_3$ ), 22,6 ( $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_3$ ), 24,8 ( $-\text{CO}-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2-$ ), 28,1 ( $-\text{CH}_2\text{SH}$ ), 29,0 ( $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\underline{\text{C}}^*\text{H}_2-$ ), 29,16 ( $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_3-(\underline{\text{C}}^*\text{H}_2)_2-$ ), 29,22 ( $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\underline{\text{C}}^*\text{H}_2-$ ), 29,3 ( $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_6-\underline{\text{C}}^*\text{H}_2-$ ), 29,5 ( $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_7-\underline{\text{C}}^*\text{H}_2-$ ), 31,8 ( $-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 34,1 ( $-\text{CO}-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2-$ ), 66,1 ( $-\text{CH}_2\text{O}-$ ), 70,4 ( $-\text{CHOH}$ ), 173,9 ( $-\text{CO}-$ )

***Tetradecanoato de (3-mercapto-2-hidroxi)-1-propilo ( 38 )***

1-Tioglicerol (0,17 ml, 2,0 mmoles) y 2,95 mL de tetradecanoato de etilo (10 mmoles) se agitaron durante cuarenta y ocho horas a 30° y 200 rpm en presencia de 600 mg de CAL. Con el residuo de la evaporación se preparó una pastilla que se sembró en una columna de silicagel. Por elución con hexano-acetato de etilo 1:1 se obtuvieron 410 mg (65%) de un líquido aceitoso identificado como 38.

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3500 (OH), 2571 (SH), 1742 (C=O)

EM (m/z, %): 300 ( $\text{M}^+$ -18, 5), 72 (69), 55 (67), 45 (62), 43 (87), 41 (100)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 0,88 (t, 3H,  $J$  = 6 Hz, -CH<sub>3</sub>), 1,26-1,32 (m, 22 H, CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-), 1,50 (t, 1H,  $J$  = 9 Hz, -SH), 2,35 (t, 2H,  $J$  = 7 Hz, -CH<sub>2</sub>CO-), 2,54 (s<sub>a</sub>, 1H, -OH), 2,61-2,82 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>SH), 3,84-3,90 (m, 1H, -CHOH), 4,14 (dd, 1H,  $J_1$  = 5 Hz;  $J_2$  = 3 Hz, -CH<sup>\*</sup>H'OCO-), 4,21 (dd, 1H,  $J_1$  = 3 Hz;  $J_2$  = 5 Hz, -CHH<sup>'</sup>\*OCO-)

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 13,9 (-CH<sub>3</sub>), 22,5 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24,7 (-CO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 28,0 (-CH<sub>2</sub>SH), 29,0 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>-), 29,15 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-), 29,22 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-(C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-), 29,3 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-(C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-), 29,5 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>-), 31,7 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 34,0 (-CO-CH<sub>2</sub>-), 66,0 (-CH<sub>2</sub>O-), 70,4 (-CHOH), 173,8 (-CO-)

***treo-Acetato de (1,4-dimercapto-3-hidroxi)-2-butilo ( 54 )***

A una solución de 194 mg de ditiotreitól (1,3 mmoles) en 1,9 ml de acetato de etilo (19,4 mmoles) se agregaron 383 mg de CAL. La mezcla formada se agitó a 30° y 180 rpm durante 40 horas.

Con el producto crudo de reacción se preparó una pastilla que se sembró en una columna cromatográfica. La elución con hexano-acetato de etilo 65:35 dio 108 mg de un aceite identificado como **54** (44%).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3460 (OH), 2559 (SH), 1748 (CO)

EM (m/z, %): 60 (25), 47 (63), 45 (50), 43 (100)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 1,44-1,52 (m, 1H,  $-\text{CH}_2\text{SH}^*$  en C-4), 1,55-1,62 (m, 1H,  $-\text{CH}_2\text{SH}^*$  en C-1) 2,13 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 2,58- 2,69 (m, 2H,  $-\text{CH}_2^*\text{SH}$  en C-4), 2,76-2,85 (m, 2H,  $-\text{CH}_2^*\text{SH}$  en C-1), 3,92- 4,02 (m + s<sub>a</sub>, 2H,  $-\text{CHOH}$ ), 4,95-5,03 (m, 1H,  $-\text{CHOCOCH}_3$ )

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 20,3 ( $-\text{CH}_3$ ), 24,5 ( $-\text{CH}_2\text{-CHOCO-}$ ), 28,2 ( $-\text{CH}_2\text{-CHOH}$ ), 71,6 ( $-\text{CHOH}$ ), 75,5 ( $-\text{CHOCO-}$ ), 170,5 ( $-\text{CO-}$ )

Por posterior elución con acetato de etilo-metanol 95:5 se recuperaron 112 mg de ditiotreitól sin reaccionar.

**treo-Hexanoato de (1,4-dimercapto-3-hidroxi)-2-butilo ( 56 )**

Ditiotreitól (154 mg, 1,0 mmoles) y 1,3 ml de hexanoato de etilo (7,9 mmoles) reaccionaron en presencia de 296 mg de CAL durante 23 horas a 210 rpm y 25°.

El producto crudo final de reacción se sembró en una columna cromatográfica mediante una pastilla. Por elución con hexano-acetato de etilo 70:30 se obtuvieron 108 mg de **56** como un aceite (43 %).

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3470 (OH), 2861 ( $\text{SCH}_2$ ), 2572 (SH), 1742 (CO)

EM (m/z, %): 136 (32), 117 (26), 99 (100), 47 (24), 43 (87), 41 (33)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 0,88 (t, 3H,  $J = 7$  Hz,  $-\text{CH}_3$ ), 1,25-1,32 (m, 6H,

CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-), 1,45-1,52 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>SH\* en C-4), 1,56-1,66 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>SH\* en C-1), 2,35 (t, 2H, J = 8 Hz, -CH<sub>2</sub>CO-), 2,54-2,64 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>\*SH en C-4), 2,73-2,85 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>\*SH en C-1), 3,90-3,98 (m + s<sub>a</sub>, 2H, -CHOH), 4,93-5,01 (m, 1H, -CHOCO-)

RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz) δ = 13,8 (-CH<sub>3</sub>), 22,2 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24,5 (-CO-CH<sub>2</sub>C\*H<sub>2</sub>-), 24,6 (-C\*H<sub>2</sub>-CHOCO-), 28,2 (-CH<sub>2</sub>-CHOH), 31,2 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 34,2 (-CO-CH<sub>2</sub>-), 71,7 (-CHOH), 75,2 (-CHO-CO-), 173,3 (-CO-)

El ditiotreitól sin reaccionar se eluyó con acetato de etilo-metanol 95:5 (85 mg)

**treo-Dodecanoato de (1,4-dimercapto-3-hidroxi)-2-butilo ( 57 )**

Una mezcla de 246 mg de ditiotreitól (1,6 mmoles) y 2,3 ml de dodecanoato de etilo (8,7 mmoles) se agitaron durante 23 horas a 25° y 210 rpm.

Con el producto crudo de reacción se armó una pastilla que se sembró en una columna cromatográfica. La elución con hexano-acetato de etilo 75:25 dio 128 mg de un aceite identificado como 57 (41%).

IR (film, cm<sup>-1</sup>): 3470 (OH), 2861 (S-CH<sub>2</sub>), 2565 (SH), 1742 (CO)

EM (m/z, %): 136 (14), 71 (31), 43 (100)

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz) δ = 0,87 (t, 3H, J = 7 Hz, -CH<sub>3</sub>), 1,21-1,26 (m, 18H, CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-), 1,46-1,53 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>SH\* en C-4), 1,57-1,63 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>SH\* en C-1), 2,32 (t, 2H, J = 7 Hz, -CH<sub>2</sub>CO-), 2,59-2,66 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>\*SH en C-4), 2,75-2,83 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>\*SH en C-1), 3,96-4,07 (m + s<sub>a</sub>, 2H, -CHOH), 4,95-5,03 (m, 1H, -CHOCO-)

RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz) δ = 14,0 (-CH<sub>3</sub>), 22,6 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24,6 (-C\*H<sub>2</sub>CHO-CO-), 24,9 (-CO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 24,9 (-CO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 28,1 (-CH<sub>2</sub>-CHOH), 29,07

(-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>-), 29,16 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-), 29,23 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>-), 29,4 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>-), 29,5 (-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-C<sup>\*</sup>H<sub>2</sub>-), 31,8 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 34,2 (-CO-CH<sub>2</sub>-), 71,8 (-CHOH), 75,3 (-CHOCO-), 173,2 (-CO-)

La elución con acetato de etilo-metanol 95:5 permitió recuperar 169 mg de ditiotreitól sin reaccionar.

**eritro-Acetato de (1,4-dimercapto-3-hidroxi)-2-butilo ( 55 )**

Ditioeritritol (154 mg, 1,0 mmoles) se disolvió mediante calentamiento en 1,5 ml de acetato de etilo (15,3 mmoles). La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 303 mg de CAL. La mezcla se agitó a 30° y 180 rpm durante 40 horas.

El crudo final de reacción se cromatografió por columna, eluyendo con hexano-acetato de etilo 65 : 35. Se obtuvieron 59 mg de un aceite identificado como 55 (30%)

IR (film, cm<sup>-1</sup>) : 3470 (OH) , 2566 (SH) , 1743 (C=O)

EM (m/z, %) : 60 (18), 47 (14), 43 (100)

RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz) δ = 1,38-1,46 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>SH\* en C-4), 1,49-1,57 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>SH\* en C-1), 2,11 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,67-2,75 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>\*SH en C-4), 2,82-2,91 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>\*SH en C-1), 3,81-3,92 (m + s<sub>a</sub>, 2H, -CHOH), 4,86-4,94 (m, 1H, -CHOCO-)

RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz) δ = 20,9 (-CH<sub>3</sub>), 25,3 (-CH<sub>2</sub>-CHOCO-), 28,5 (-CH<sub>2</sub>CHOH), 71,1 (-CHOH), 75,0 (-CHOCO-), 170,3 (-CO-)

**eritro-Hexanoato de (1,4-dimercapto-3-hidroxi)-2-butilo ( 58 )**

Ditioeritritol (154 mg, 1,0 mmoles) se suspendieron en 1,3 ml de hexanoato de etilo (7,9 mmoles). Se agregaron 300 mg de CAL y la suspensión resultante se agitó a 55° y 210 rpm durante 23 horas.

Con el producto crudo de reacción se preparó una pastilla que se sembró en una columna cromatográfica. La elución con hexano-acetato de etilo 75:25 permitió aislar 83 mg de 58 (aceite, 33 %)

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3500 (OH), 2570 (SH), 1744 (C=O)

EM (m/z, %): 116 (100), 99 (70), 43 (29)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta = 0,88$  (t, 3H,  $J = 7$  Hz,  $-\text{CH}_3$ ), 1,24-1,31 (m, 6H,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3-$ ), 1,39-1,47 (m, 1H,  $-\text{CH}_2\text{SH}^*$  en C-4), 1,50-1,58 (m, 1H,  $-\text{CH}_2\text{SH}^*$  en C-1), 2,34 (t, 2H,  $J = 8$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 2,69-2,76 (m, 2H,  $-\text{CH}_2^*\text{SH}$  en C-4), 2,83-2,96 (m, 2H,  $-\text{CH}_2^*\text{SH}$  en C-1), 3,83-3,91 (m + s<sub>a</sub>, 2H,  $-\text{CHOH}$ ), 4,88-4,96 (m, 1H,  $-\text{CHOCO}-$ )

RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta = 13,9$  ( $-\text{CH}_3$ ), 22,3 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 24,5 ( $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 25,4 ( $-\text{CH}_2-\text{CHOCO}-$ ), 28,5 ( $-\text{CH}_2-\text{CHOH}$ ), 31,4 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 34,2 ( $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ), 71,2 ( $-\text{CHOH}$ ), 75,2 ( $-\text{CHO}-\text{CO}-$ ), 173,1 ( $-\text{CO}-$ )

**eritro-Dodecanoato de (1,4-dimercapto-3-hidroxi)-2-butilo ( 59 )**

A 154 mg de ditioeritritol (1,0 mmoles) en 1,4 ml de dodecanoato de etilo (5,3 mmoles) se agregaron 298 mg de CAL. La suspensión así formada se agitó a 55° y 200 rpm durante 24 horas.

El producto crudo de reacción se sembró en una columna cromatográfica mediante una pastilla. Por elución con hexano-acetato de etilo 75:25 se obtuvieron 194 mg de **59** (aceite, 58 %)

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3480 (OH), 2568 (SH), 1745 (-CO)

EM (m/z, %): 118 (10), 43 (40), 41 (100)

RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  = 0,87 (t, 3H,  $J = 7$  Hz), 1,21-1,26 (m, 18H,  $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9-$ ),  
 1,40-1,48 (m, 1H,  $-\text{CH}_2\text{SH}^*$  en C-4), 1,50-1,59 (m, 1H,  $-\text{CH}_2\text{SH}^*$  en C-1),  
 2,32 (t, 2H,  $J = 7$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 2,68-2,74 (m, 2H,  $-\text{CH}_2^*\text{SH}$  en C-4),  
 2,82-2,95 (m, 2H,  $-\text{CH}_2^*\text{SH}$  en C-1), 3,84-3,95 (m + s<sub>a</sub>, 2H,  $-\text{CHOH}$ ),  
 4,87-4,96 (m, 1H,  $-\text{CHOCO}-$ )

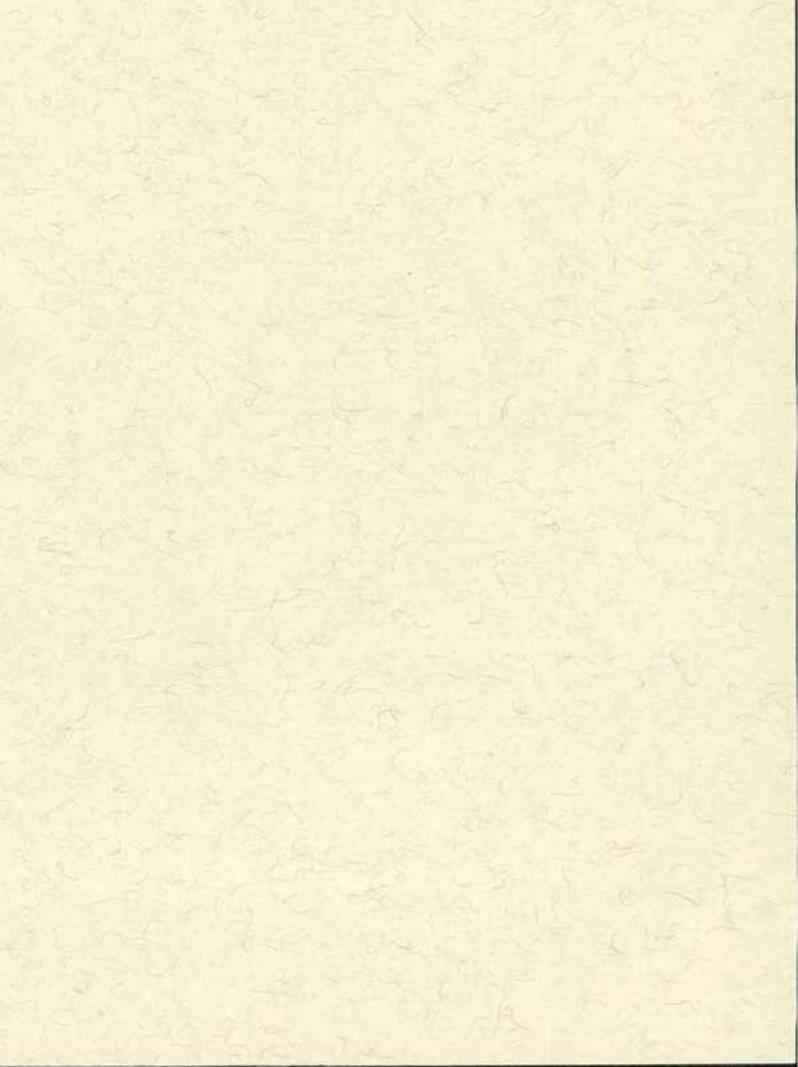
RMN- $^{13}\text{C}$  (50 MHz)  $\delta$  = 14,0 ( $-\text{CH}_3$ ), 22,7 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 24,8 ( $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 25,3  
 ( $-\text{CH}_2\text{CHOCO}-$ ), 28,4 ( $-\text{CH}_2\text{CHOH}$ ), 29,0 ( $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}^*\text{H}_2-$ ), 29,18  
 ( $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_3-\text{C}^*\text{H}_2-$ ), 29,22 ( $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\text{C}^*\text{H}_2-$ ), 29,4  
 ( $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_6-\text{C}^*\text{H}_2-$ ), 29,5 ( $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_7-\text{C}^*\text{H}_2-$ ), 31,7 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3-$ ),  
 34,2 ( $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ), 71,1 ( $-\text{CHOH}$ ), 75,1 ( $-\text{CHOCO}-$ ), 173,1 ( $-\text{CO}-$ )

### **Referencias bibliográficas**

1. H.Svanholm, *Enzymatic interesterification and esterification*, presentado en la AOCS, mayo 1989.
2. Especificaciones de Novo Nordisk sobre Lipasa SP 435.
3. T.M.Stokes y A.C.Oehlschlager, *Tetrahedron Lett.* 28 , 2091 (1987)
4. G.L.Ellman, *Arch. Biochem. and Biophys.* 74 , 443 (1958)
5. W.C.Still, M.Kahn y A.Mitra, *J. Org. Chem.* 43 , 2923 (1978)
6. A.Vogel, *Textbook of practical Organic Chemistry*, Longman, Nueva York, 1978, páginas 511 y 844.
7. R.Köster y R.Kuczniarz, *Liebigs Ann.Chem.* 835 (1992)



# ***RESUMEN***



El objetivo principal de este trabajo consistió en el estudio sistemático de reacciones de acilación biocatalizadas, empleando como sustratos diversos hidroxialcanotioles bi- y polifuncionales. Con esta finalidad se probaron transesterificaciones en presencia de lipasas de distinto origen. Estas enzimas actúan como catalizadores con comportamiento altamente selectivo y eficiente aun en medio orgánico ( Capítulo I ).

El primer sustrato ensayado fue 2-mercaptoetanol, que se hizo reaccionar con acetato de etilo y lipasa pancreática porcina ( PPL ) ( Capítulo II ). Esta primera reacción transcurrió quimioespecíficamente, obteniéndose solamente el producto de O-acetilación. Dicha quimioespecificidad se mantuvo cuando la reacción se repitió variando diversas condiciones experimentales. En efecto, factores tales como el tiempo, la temperatura, la relación enzima/sustrato y la relación agente acilante/sustrato no afectaron la quimioespecificidad, pero permitieron optimizar la obtención del acetato de 2-mercaptoetilo. La utilización de otros posibles reactivos acetilantes no significó una mejora con respecto a dichas condiciones optimizadas.

Con las otras enzimas ensayadas, lipasa de *Mucor miehei* ( Lipozyme<sup>R</sup>, LIP ), lipasa de *Candida cylindracea* ( CCL ) y lipasa de *Candida antarctica* ( CAL ), la reacción de 2-mercaptoetanol con acetato de etilo presentó el mismo curso quimioespecífico. En cambio, la alcoholólisis biocatalizada del acetato de 2-tioacetoxietilo dependió de la lipasa utilizada y de la relación alcohol/diéster.

La transesterificación de 2-mercaptoetanol catalizada por lipasas se extendió luego al empleo de otros ésteres etílicos ( Capítulo III ), que en todos los casos condujeron con buenos rendimientos a los productos O-acilados, los ésteres de 2-mercaptoetilo, sin que el tipo de lipasa alterara la quimioespecificidad.

Frente a estos resultados, y para intentar determinar si en las transesterificaciones estudiadas los hidroxialcanotioles responden a un comportamiento quimioselectivo en común, se varió la estructura del sustrato ensayado. Esta variación fue importante no sólo desde el punto de

vista de un mayor conocimiento de las acilaciones investigadas, sino también como eventual método de obtención de un grupo de ésteres no descritos hasta el presente en literatura.

La serie de  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles,  $\text{HS}-(\text{CH}_2)_m\text{-OH}$  ( $m = 3, 4, 8, 12$ ), reaccionó con el mismo comportamiento quimioespecífico que 2-mercaptoetanol. Efectivamente, en presencia de todas las lipasas empleadas, se obtuvieron exclusivamente los productos de acilación del hidroxilo. Sin embargo, el aumento del número de átomos de carbono del hidroxialcanotiol limitó la reacción a grupos acilo de menor tamaño. Así, mientras 2-mercaptoetanol reaccionó con decanoato de etilo, 12-mercapto-1-dodecanol no dio ésteres de cadena más larga que el butirato.

También se encontró la misma quimioespecificidad en la transesterificación biocatalizada de algunos hidroxialcanotioles polifuncionales: 1-tioglicerol ( Capítulo IV ) y los ditiotetritoles ditiotreitil y ditioeritritol ( Capítulo V ). Ante la presencia de un par de grupos hidroxilo en las tres moléculas y de un par de grupos sulfhidrilo en los ditiotetritoles, las lipasas actuaron regioselectivamente. Para ditiotreitil y ditioeritritol, las acilaciones ensayadas originaron los productos O-acilados en forma regioespecífica bajo todas las condiciones de reacción probadas, mientras que 1- tioglicerol reaccionó regioespecíficamente o con distintos grados de regioselectividad según el tipo de lipasa utilizada. Por otra parte, estos tres sustratos admitieron en sus transesterificaciones grupos acilo de mayor tamaño de cadena que los correspondientes  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles de tres y cuatro átomos de carbono.

Cuando 1-mercapto-2-propanol, molécula con un grupo hidroxilo secundario y un sulfhidrilo primario, se hizo reaccionar con acetato de etilo sólo en presencia de LIP hubo producto (el O-acetato). 3-Mercapto-2-butanol, que posee sus dos grupos funcionales secundarios, no reaccionó con ninguna lipasa. En concordancia con acilaciones biocatalizadas de alcoholes secundarios descritas en bibliografía, estos hechos muestran que la naturaleza del hidroxilo (primario o secundario), que involucra factores estéricos, influye decididamente sobre las reacciones estudiadas. Esto explicaría la menor reactividad

de los ditiotetritoles, que poseen sus dos hidroxilos secundarios, comparados con 1-tioglicerol.

A través de algunas determinaciones realizadas para estudiar las acilaciones de ditiotreitól y ditioeritritól desde el punto de vista estereoselectivo, se comprobó que las mismas transcurrieron con baja enantioselectividad.

A nivel experimental, las transesterificaciones descritas se llevaron a cabo satisfactoriamente utilizando al éster etílico tanto como reactivo y solvente. Es interesante destacar que cuando el sustrato y el agente acilante formaban un sistema heterogéneo, estas mezclas fueron reactivas bajo las condiciones ensayadas.

El análisis global de todos los hidroxialcanotioles estudiados en este trabajo revela un comportamiento quimioespecífico sistemático. Cabe entonces conjeturar que esta propiedad pueda ser extensible a otros miembros de esta familia de compuestos. De este modo, las transesterificaciones catalizadas por lipasas podrían constituir un método de validez más amplio para la esterificación selectiva de un hidroxilo en presencia de un tiol, transformación a menudo poco satisfactoria si se emplean reactivos de acilación tradicionales. Además, los ésteres así formados podrían ofrecer utilidad como grupos protectores.

Dado que dentro de la serie de  $\alpha,\omega$ -hidroxialcanotioles investigada sólo el 2-mercaptoetanol es comercialmente accesible, los restantes compuestos estudiados fueron obtenidos en el laboratorio. El Capítulo VI describe la preparación de estos compuestos, que significó una mejora con respecto a los métodos preparativos existentes en literatura, discutidos en esas páginas. También se describe la obtención de las sales de S-alkilisotiuronio 73 y 74, cuya existencia no había sido descrita hasta el presente.

Desde el punto de vista preparativo, las transesterificaciones biocatalizadas proveyeron un método alternativo adecuado para obtener con mejor rendimiento nueve compuestos citados en bibliografía y otros veintitrés compuestos no registrados en literatura (ver Apéndice).

Entre los métodos espectroscópicos que se emplearon para la caracterización de sustratos y productos, la espectroscopía de masa fue de particular interés, hecho que llevó a presentar y

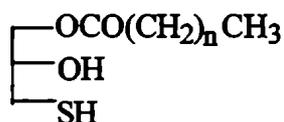
analizar los espectros de masa de cada familia de compuestos ( Capítulo VII ). Las técnicas experimentales que condujeron a la obtención de estas sustancias y sus propiedades espectroscópicas se detallan en el Capítulo VIII.

Apéndice

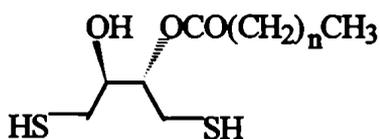
A continuación se detallan las estructuras de las moléculas preparadas mediante transesterificaciones biocatalizadas. Los números de los compuestos no descritos en literatura hasta el presente se indican subrayados y en bastardilla.



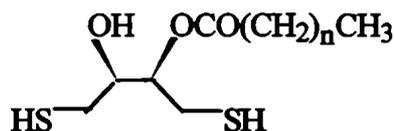
m = 2	<u>2</u> n = 0	<u>11</u> n = 6	m = 3	<u>18</u> n = 0
	<u>8</u> n = 1	<u>12</u> n = 8		<u>19</u> n = 2
	<u>9</u> n = 2	<u>13</u> n = 10		<u>20</u> n = 4
	<u>10</u> n = 4	<u>4</u> $\text{CH}_3^{13}\text{COO}(\text{CH}_2)_2\text{SH}$		<u>21</u> n = 6
m = 4	<u>22</u> n = 0	m = 8	<u>25</u> n = 0	m = 12
	<u>23</u> n = 4		<u>26</u> n = 4	<u>28</u> n = 0
	<u>24</u> n = 6		<u>27</u> n = 6	<u>29</u> n = 2



<u>32</u> n = 0	<u>36</u> n = 8
<u>33</u> n = 1	<u>37</u> n = 10
<u>34</u> n = 2	<u>38</u> n = 12
<u>35</u> n = 4	



<u>54</u> n = 0
<u>56</u> n = 4
<u>57</u> n = 10



<u>55</u> n = 0
<u>58</u> n = 4
<u>59</u> n = 10

Parte del presente trabajo de tesis originó las siguientes publicaciones:

1. Regiospecific acylation of 2-mercaptoethanol by lipase-catalyzed transesterification in organic media  
A.Baldessari, L.E.Iglesias and E.G.Gros  
*Journal of Chemical Research* 204 (1992)
2. An improved procedure for chemospecific O-acylation of 2-mercaptoethanol by lipase-catalyzed transesterification  
A.Baldessari, L.E.Iglesias and E.G.Gros  
*Biotechnology Letters* 16, 479 (1994)
3. Regioselective acylation of 3-mercapto-1,2-propanediol by lipase-catalyzed transesterification  
A.Baldessari, L.E.Iglesias and E.G.Gros  
*Journal of Chemical Research* 382 (1993)
4. Lipase-catalyzed chemospecific acylation of 3-mercapto-1-propanol and 4-mercapto-1-butanol  
L.E.Iglesias, A.Baldessari and E.G.Gros  
*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 7, 853 (1996)
5. Simple procedures for the preparation of  $\alpha,\omega$ -hydroxyalkanethiols  
L.E.Iglesias, A.Baldessari and E.G.Gros  
*Organic Preparations and Procedures International* 28, 329 (1996)

**INDICE DE TABLAS**

	pág.
TABLA 1.1 .....	3
TABLA 1.2 .....	14
TABLA 1.3 .....	15
TABLA 1.4 .....	28
TABLA 1.5 .....	31
TABLA 1.6 .....	33
TABLA 1.7 .....	44
TABLA 2.1 .....	52
TABLA 2.2 .....	53
TABLA 2.3 .....	54
TABLA 2.4 .....	55
TABLA 2.5 .....	56
TABLA 2.6 .....	57
TABLA 2.7 .....	60
TABLA 2.8 .....	61
TABLA 2.9 .....	63
TABLA 2.10 .....	64
TABLA 2.11 .....	65
TABLA 2.12 .....	68
TABLA 3.1 .....	76
TABLA 3.2 .....	76
TABLA 3.3 .....	77
TABLA 3.4 .....	80
TABLA 3.5 .....	82
TABLA 3.6 .....	87
TABLA 3.7 .....	88
TABLA 3.8 .....	88
TABLA 3.9 .....	89
TABLA 4.1 .....	101
TABLA 4.2 .....	102
TABLA 4.3 .....	104
TABLA 4.4 .....	105

TABLA 4.5 .....	113
TABLA 4.6 .....	115
TABLA 4.7 .....	116
TABLA 5.1 .....	122
TABLA 5.2 .....	124
TABLA 5.3 .....	124
TABLA 5.4 .....	126
TABLA 5.5 .....	130
TABLA 6.1 .....	146
TABLA 6.2 .....	151
TABLA 7.1 .....	157
TABLA 7.2 .....	161
TABLA 7.3 .....	162
TABLA 7.4 .....	163
TABLA 7.5 .....	164
TABLA 7.6 .....	164
TABLA 7.7 .....	172
TABLA 7.8 .....	175
TABLA 7.9 .....	177
TABLA 7.10 .....	179
TABLA 7.11 .....	182
TABLA 7.12 .....	183
TABLA 7.13 .....	188
TABLA 7.14 .....	189
TABLA 8.1 .....	199