



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Orgánica

**Biocatálisis aplicada a reacciones y síntesis de
esteroides, amidas y lactonas de interés farmacológico,
monómeros y polímeros acrílicos**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad
de Buenos Aires en el Área de Química Orgánica

Eduardo Miguel Rustoy

Directora de Tesis

Dra. Alicia Baldessari

Buenos Aires, 22 de Noviembre de 2007

A la memoria de mi padre.

A mi esposa, mi madre, mi hermana y mis tres sobrinos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires, por brindarme la posibilidad de realizar este trabajo en un laboratorio de su dependencia.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por las Becas de Investigación otorgadas.

A la Dra. Alicia Baldessari, directora de esta Tesis, por guiarme con su compromiso personal durante el desarrollo de la misma.

A la Dra. Constanza Pía Mangone, por guiarme durante los primeros meses del desarrollo de la Tesis.

A la Dra. Andrea Bruttomesso, por la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear y el afecto brindado.

Al Dr. Gerardo Burton por el apoyo brindado tanto en lo profesional como personal.

A la Dra. Rosa Erra-Balsells por el apoyo brindado tanto en lo profesional como personal.

A UMYMFOR, por permitirme utilizar su instrumental y por la realización de los espectros de masa y resonancia magnética nuclear.

A la Lic. María de las Mercedes Rivero, por el afecto brindado y su ayuda en el análisis por cromatografía gaseosa.

Al Sr. Jorge Aznárez, Lic. Gabriel Cases y el Dr. Javier Ramírez, por el afecto brindado y la realización de los espectros de masa y las cromatografías gaseosas acopladas a espectrometría de masa.

Al Sr. José Gallardo, por el afecto brindado y la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear.

Al Lic. Gernot Hunke por la realización de los espectros de resonancia magnética.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, Leandro N. Monsalve, Ignacio Pedre, Paula Quintana, Ignacio Ruíz Arias, Juan A. Bisceglia, Romina Gómez y Stella Maris Romero. Por los momentos compartidos.

A todos mis compañeros del Departamento, en especial a los Dres. Alberto Ghini y Fernando Durán, por el afecto brindado.

Al personal administrativo de UMYMFOR por el apoyo brindado.

A la totalidad del personal no docente del Departamento, por el afecto y el apoyo brindado.

A mis amigos de siempre, José Hegelle, Heber Holzmann, Mariano Hürst, Mariano Pertino, María Eulalia Lorenzo, Romina Vigna y Jorgelina Lambrech por su apoyo que me enseñó que para la Amistad no existe distancia.

Al Dr. Oscar Quinzani, por sus consejos y afecto.

Al Dr. Andrés Ciolino, por sus consejos y afecto.

A la Dra. Olga Pieroni, por su afecto.

A mi madre, por su apoyo.

A mi hermana y mis tres sobrinos, por su apoyo.

A mi familia política por su apoyo y cariño brindado en todo momento.

A Soledad, mi esposa, por el apoyo y la tolerancia constante.

Biocatalysis in reactions and synthesis of steroids, amides and lactones with pharmaceutical applications, monomers and acrylic polymers

Eduardo M. Rustoy, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Noviembre de 2007

Keywords: Lipases; lapyrium chloride; aminolysis; acylation; alcoholysis; amidoester; 3,17- β -estradiol; N-(2-hydroxyalkyl)-acrylamides; poly (N-(2-hydroxyethyl)-acrylamide); poly (ethyl acrylate), polyacrylic acid, *Mucor rouxii*; *Saccharomyces cerevisiae*; lactones; ketoesters.

Abstract: An efficient route for large-scale preparation of lapyrium chloride, a broad-spectrum antimicrobial surfactant, was developed from chloroacetic acid in four steps, three of them enzymatic. Due to the chemoselective behavior of the biocatalysts, lapyrium chloride was obtained in a high degree of purity and yield, from mild reaction conditions and following a low environmental impact methodology.

Continuing the work with lipases, a series of acyl esters of 3,17- β -estradiol has been prepared by an enzymatic methodology. Eleven 17-monoacyl products (five novel compounds) were obtained in a highly regioselective way by acylation of 3,17- β -estradiol or by alcoholysis of the corresponding diacyl derivatives. The influence of various reaction parameters such as molar ratio, enzyme:substrate ratio and temperature was evaluated. Among the tested lipases, *Candida rugosa* lipase appeared to be the most appropriate in monoacylation and lipase from *Candida antarctica* in alcoholysis. The advantages showed by this methodology such as mild reaction conditions, economy and low environmental impact, make the biocatalysis a convenient way to prepare monoacyl derivatives of 3,17- β -estradiol containing the aromatic 3-hydroxyl group free. Some of these compounds are recongnized as useful products in the pharmaceutical industry.

Moreover, a lipase-catalyzed procedure is described for the preparation of hydroxyalkylacrylamides, useful among a number of electrophoretical applications such as capillary and gel electrophoresis. The N-hydroxyalkylacrylamides were prepared through an aminolysis reaction of alkanolamines on ethyl acrylate. The reaction was catalyzed by *Candida antarctica* lipase. The addition of radical inhibitors improved chemoselectivity and amides were obtained in high yield and purity at room temperature.

Several acrylic co- and terpolymers containing, at random, sequences of poly(ethyl acrylate) and poly(N-(2-hydroxyethyl)acrylamide) and polyacrylic acid were obtained from ethyl acrylate as the only monomer starting material in a chain polymerization process, catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. In the presence of ethanolamine, the enzyme

not only catalyzes the chain polymerization of ethyl acrylate but also aminolysis and hydrolysis of the pendant ester groups.

The products, characterized by FTIR, ^1H and ^{13}C NMR and UV-MALDI-TOF-MS, show low molecular weight and high monodispersity. The activity showed by *C. antarctica* lipase B in the polymerization reaction is a new example of enzyme promiscuity.

Finally, an innovative combination strategy that uses pure enzymes and whole microbial cells in the same process was used to prepare enantiomerically pure 3-carboxyalkyl- γ -butyrolactones and several alkyl esters of 2-hydroxyglutarates from 2-oxoglutaric acid. The method involves two consecutive biocatalytic steps. The first step, which converts the 2-oxoglutaric acid into the corresponding dialkyl esters, was catalyzed by a lipase. Then in the second step, by microbial reduction of a series of dialkyl-2-oxoglutarates it is possible to obtain 3-carboxyalkyl- γ -butyrolactones or 2-hydroxyesters depending on the length of the chain in the alkyl moiety of the esters and on the fresh or lyophilized status of the cells.

In this part of the work was also studied the behavior of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in the decarboxylation, hidrolisis and reduction reactions of the substrates ketoesters.

Biocatálisis aplicada a reacciones y síntesis de esteroides, amidas y lactonas de interés farmacológico, monómeros y polímeros acrílicos

Eduardo M. Rustoy, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Noviembre de 2007

Palabras claves: Lipasas; cloruro de lapirio; acilación; alcoholólisis; amidoéster; 3,17- β -estradiol; N-(hidroxialquil)-acrilamidas; poli(N-(2-hidroxiethyl)-acrilamida); poli(acrilato de etilo), ácido poliacrílico; *Mucor rouxii*; *Saccharomyces cerevisiae*; lactonas; cetoésteres.

Resumen: Se desarrolló una ruta eficiente para la preparación a gran escala de cloruro del lapirio, un surfactante antimicrobiano de amplio-espectro. Tres de los pasos que conforman esta síntesis fueron enzimáticos. Debido al comportamiento quimioselectivo de los biocatalizadores, el cloruro del lapirio fue obtenido con un alto grado de pureza y un alto rendimiento, bajo condiciones suaves de reacción. La metodología enzimática diseñada disminuyó las consecuencias sobre el medio ambiente en comparación con la metodología clásica de obtención de cloruro de lapirio.

Continuando con el uso de lipasas, se preparó una serie de ésteres derivados del 3,17 β -estradiol a partir de una metodología enzimática. Se obtuvieron once productos 17-monoacilados (cinco compuestos de ellos novedosos) de una manera altamente regioselectiva por acilación de 3,17 β -estradiol o por alcoholólisis de los derivados diacilados correspondientes. Fue evaluada la influencia de varios parámetros experimentales tales como: relación agente acilante/3,17 β -estradiol, relación enzima/sustrato y temperatura. Entre las lipasas probadas, la lipasa de *Candida rugosa* (CRL) resultó ser la más apropiada en la reacción de monoacilación, mientras que el uso de la lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CAL B) permitió obtener los mejores resultados en la reacción de alcoholólisis. Las ventajas presentadas por esta metodología, tales como: condiciones suaves de la reacción, economía y bajas consecuencias para el medio ambiente, hacen de la biocatálisis una manera conveniente de preparar derivados monoacilados de 3,17 β -estradiol conteniendo el grupo 3-hidroxilo aromático libre. Algunos de estos compuestos son reconocidos como productos útiles en la industria farmacéutica.

Por otra parte, se describe un procedimiento catalizado por lipasas para la preparación de N-(hidroxialquil)acrilamidas, útiles en electroforesis capilar. Las N-(hidroxialquil)acrilamidas fueron preparadas a partir de la reacción de aminólisis de acrilato de etilo y alcanolaminas. La reacción fue catalizada por lipasa de *Candida*

antarctica tipo B (CAL B). La adición de inhibidores de radicales mejoró la quimioselectividad permitiendo obtener las amidas con altos rendimientos y elevada pureza trabajando a temperatura ambiente.

Fueron obtenidos varios co- y terpolímeros que contenían, secuencias al azar, de poli(acrilato de etilo), poli(N-(2-hidroxietil)-acrilamida) y ácido poliacrílico. Estos productos fueron obtenidos utilizando acrilato de etilo como único monómero vinílico de partida. El proceso fue catalizado por CAL B. En presencia de etanolamina, la enzima catalizó no solamente la polimerización en cadena de acrilato de etilo, sino también la aminólisis y la hidrólisis de los grupos éster pendientes de la cadena poliacrílica. Los productos fueron caracterizados por espectroscopía FTIR y de RMN de ^1H y ^{13}C , y espectrometría de masa UV-MALDI-TOF. La actividad demostrada por CAL B en la reacción de polimerización es un nuevo ejemplo de promiscuidad enzimática.

Finalmente, se aplicó una estrategia innovadora consistente en la combinación de enzimas puras y células enteras para preparar 3-carboxialquil- γ -butirolactonas enantioméricamente puras y varios alquilésteres del ácido 2-hidroxi-glutámico a partir de ácido 2-oxoglutámico. El método implica dos pasos biocatalíticos consecutivos. En el primer paso, se convierte el ácido 2-oxoglutámico en los dialquilésteres correspondientes, dicha transformación fue catalizada por lipasas. En el segundo paso, por reducción microbiana de una serie de 2-oxoglutaratos de alquilo fue posible obtener 3-carboxialquil- γ -butirolactonas o 2-hidroxiésteres dependiendo de la longitud de la cadena de los sustituyentes alcoxilo de los ésteres y del estado fresco o liofilizado de las células del hongo *Mucor rouxii*. En esta parte del trabajo también fue estudiado el comportamiento de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* en las reacciones de descarboxilación, hidrólisis y reducción de los 2-oxoglutaratos de dialquilo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I

1. Biocatálisis	1
1.1. Definición	1
1.2. Evolución de la biocatálisis	1
1.3. Aplicación de la biocatálisis en síntesis orgánica	1
1.4. Biocatálisis en medios no convencionales	2
1.4.1. Enzimas aisladas en medio orgánico. Características	2
1.4.2. Dependencia del solvente y la especificidad de las enzimas	3
1.4.2.1. Enantioselectividad	4
1.4.2.2. Regio- y quimioselectividad	4
1.5. Aplicación de enzimas aisladas como catalizadores	6
1.5.1. Lipasas	7
1.5.1.1. Fuentes	7
1.5.1.2. Mecanismo	8
1.5.1.3. Estructura	9
1.5.1.3.1. Bolsillo S	11
1.5.1.3.2. Bolsillo A	13
1.6. Promiscuidad enzimática	13
1.6.1. Comportamiento promiscuo clase 2 en lipasas	13
1.6.1.1. Reacciones de adición aldólica catalizadas por Lipasas	13
1.6.1.2. Reacciones de adición de Michael catalizadas por Lipasas	15
1.7. Aplicación de células enteras como catalizadores	18
1.7.1. Oxidorreductasas	18
1.8. ¿Qué es la biocatálisis aplicada?	19
1.8.1. Historia de la biocatálisis aplicada	19
1.8.1.1. Antigüedad	19
1.8.1.2. Período 1697 a 1885	20
1.8.1.2.1. Aproximaciones teóricas	20
1.8.1.3. Período 1890 a 1940	22
1.8.1.3.1. Desarrollo teórico	23
1.8.1.3.2. Desarrollo tecnológico	23

1.8.1.4. Desarrollo desde 1940	25
1.8.2. Algunos ejemplos de biocatálisis aplicada en la química básica	25
1.8.2.1. Uso de Nitrilohidratatas	26
1.8.2.1.1. Obtención de acrilamida a partir de acrilonitrilo	26
1.8.2.1.2. Obtención de nicotinamida a partir de 3-cianopiridina	26
1.8.2.2. Uso de nitrilasas	27
1.8.2.2.1. Obtención de 1,5-Dimetil-2-piperidona (Xolvone™)	27
1.8.2.3. Aplicación de lipasas en la industria cosmética	28
1.8.2.4. Biocatálisis aplicada en la química fina	28
1.8.2.4.1. Quiralidad vs. propiedades y usos de las moléculas	28
1.8.2.4.2. Aminoácidos enantioméricamente puros	29
1.8.2.4.2.1. Proceso catalizado por Aminoacilasa de <i>Aspergillus oryzae</i>	29
1.8.2.4.2.2. Uso combinado de Racemasa/Hidantoinasa/carbamoilasa en la obtención de D-fenilglicina y D-hidroxfenilglicina	30
1.8.2.4.3. Dos aplicaciones de células enteras en la industria farmacéutica	32
1.8.2.4.3.1. Trimegestona	32
1.8.2.4.3.2. LY300164	32
1.8.2.4.4. Tres aplicaciones de lipasas en la industria farmacéutica	33
1.8.2.4.4.1. Tetrahidrolipstatina	33
1.8.2.4.4.2. MK-0571, antagonista del receptor LTD4	34
1.8.2.4.4.2. Alfuzosin	34
1.8.2.4.5. Uso de lipasas para la obtención de aminas enantioméricamente puras	35
Bibliografía	37

Con formato: Sangría:
Izquierda: 1,59 cm, Sangría
francesa: 2,86 cm

Eliminado: ¶

Eliminado: ¶

CAPÍTULO II

2. Objetivos	39
2.1. Síntesis quimioenzimática de cloruro de lapirio	40
2.2. Síntesis enzimática regioselectiva de ésteres de ácidos grasos de 3,17 β -estradiol	40
2.3. Síntesis quimioselectiva de N-hidroxiacrilamidas catalizada por lipasas	42
2.4. Síntesis enzimática de poliacrilamidas modificadas Hidrofóbicamente	43
2.5. Lipasas y microorganismos como catalizadores en esterificación. reducción y descarboxilación de α -cetoácidos	43

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO III

3. Síntesis quimioenzimática de cloruro de lapirio	45
3.1. Introducción	45
3.2. Primer paso enzimático: Obtención de cloroacetato de etilo (72)	50
3.2.1. Optimización de condiciones experimentales	50
3.3. Segundo paso enzimático: Obtención de 2-cloro-N-(2-hidroxietyl) Acetamida (60)	52
3.3.1. Selección de biocatalizador y temperatura de reacción	54
3.3.2. Optimización de las condiciones experimentales	55
3.4 Tercer paso enzimático: Obtención de dodecanoato de 2(2-cloroacetamido)etilo (61)	58
3.4.1. Obtención del amidoéster 61 por transesterificación de laurato de etilo con la cloroamida 60	59
3.4.1.1. Optimización de las condiciones experimentales	60
3.4.2. Obtención del amidoéster 61 a partir de la esterificación de ácido láurico con la cloroacetamida 60	65
3.4.2.1. Optimización de condiciones experimentales.	65
3.5. Procedimiento en una sola etapa para obtener el amidoéster 61	68
3.6. Escala preparativa	69
3.7. Formación del cloruro de lapirio (58)	70
3.8. Conclusión	70
Bibliografía	72

CAPÍTULO IV

4. Síntesis enzimática regioselectiva de ésteres de ácidos grasos de 3,17 β -estradiol	73
4.1. Introducción	73
4.2. Acilación enzimática regioselectiva de 3,17 β -estradiol	74
4.2.1. Optimización de parámetros experimentales para la reacción de acilación de 3,17 β -estradiol en presencia de ácido oleico	75
4.2.1.1. Estudio del efecto de lipasa y solvente de reacción	77
4.2.1.2. Efecto de la temperatura	77
4.2.1.3. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S)	78
4.2.1.4. Naturaleza del agente acilante	79
4.2.1.5. Relación agente acilante/sustrato	79
4.2.1.6. Condiciones óptimas	80
4.2.1.7. Aplicación de la acilación enzimática de 3,17 β -estradiol (40) en presencia de otros agentes acilantes	80
4.3. Alcohólisis del dioleato de 3,17 β -estradiol	81
4.3.1. Preparación del dioleato de 3,17- β -estradiol (43h)	82
4.3.1.1. Preparación química de 43h	82
4.3.1.2. Preparación enzimática de 43h	83
4.3.1.3. Reacción de alcohólisis del dioleato de 3,17- β -estradiol (43h)	84
4.3.1.4. Hidrólisis químiaselectiva del dioleato de 3,17- β -estradiol (43h)	85
4.4. Conclusión	86
Bibliografía	89

Eliminado: 2

CAPÍTULO V

5. Síntesis quimioselectiva de N-(hidroxialquil)-acrilamidas catalizada por lipasas	91
5.1. Introducción	91
5.2. Optimización de condiciones experimentales	95
5.2.1 Efecto del tipo de lipasa, solvente y temperatura	96
5.2.2. Efecto de la concentración de los reactivos en el medio de reacción	98
5.2.3. Efecto del agregado de inhibidores de radicales y	

temperatura	100
5.2.4. Efecto del tiempo de reacción	102
5.2.5. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S)	102
5.2.6. Condiciones optimizadas	103
5.3. Estudio del reciclado del catalizador	104
5.4. Aplicación del procedimiento enzimático optimizado en la obtención de N-(hidroxialquil)-acrilamidas derivadas de diferentes alcanolaminas	104
5.5. Conclusión	105
Bibliografía	107

CAPÍTULO VI

6. Síntesis enzimática de poliacrilamidas modificadas hidrofóbicamente	109
6.1. Introducción	109
6.2. Síntesis de co- y terpolímeros	113
6.2.1. Optimización de condiciones experimentales	113
6.2.1.1. Selección del biocatalizador	113
6.2.1.2. Efecto del solvente	115
6.2.1.3. Efecto de la temperatura	117
6.2.1.4. Influencia de la relación enzima/sustrato (E/S)	117
6.2.1.5. Condiciones optimizadas	118
6.2.2. Efecto de la relación etanolamina/acrilato de etilo	119
6.3. Elucidación estructural de los terpolímeros 47-49 y copolímeros 50-53	120
6.3.1. Análisis estructural de los productos 47-53 por espectrometría de masa UV-MALDI-TOF	123
6.3.1.1. Procedimiento para realizar la asignación de las señales de las señales de los espectros de espectrometría de masa UV-MALDI-TOF	126
6.3.2. Análisis estructural de los compuestos 47-53 por espectroscopía de RMN uni- y bidimensional	147
6.3.2.1. Compuestos 47-49	147
6.3.2.2. Compuestos 50-53	154
6.4. Comportamiento de los productos 47-53 en medio acuoso	159
6.5. Conclusión	160
Bibliografía	163

Eliminado: 1.

CAPÍTULO VII

7. Lipasas y microorganismos como catalizadores en esterificación, reducción y descarboxilación de α -cetoácidos	165
7.1. Introducción	165
7.2. Esterificación del ácido-2-oxo-glutámico catalizada por lipasas	168
7.2.1. Optimización de condiciones experimentales	169
7.2.1.1. Efecto del tiempo de reacción	169
7.2.1.2. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S)	170
7.2.1.3. Efecto del alcohol	171
7.3. Hidrólisis, descarboxilación y reducción de ésteres del ácido 2-oxo-glutámico catalizada por células enteras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	172
7.4. Reducción de ésteres alquílicos de α -cetoácidos catalizada por el Hongo <i>Mucor rouxii</i>	174
7.4.1. Reducción quimio- y estereoselectiva de ésteres alquílicos de α -cetoácidos catalizada por cultivos frescos de <i>Mucor rouxii</i>	175
7.4.1.1. Optimización de condiciones experimentales	177
7.4.2. Reducción quimio- y estereoselectiva de 2-oxo-glutaratos de alquilo catalizada por células liofilizadas de <i>Mucor rouxii</i>	180
7.5. Conclusión	183
Bibliografía	186

Parte experimental

Capítulo VIII

8.1. Generalidades	187
8.2. Biotransformaciones catalizadas por enzimas aisladas	193
8.2.1. Síntesis quimioenzimática de Cloruro de Lapirio	193
8.2.2. Síntesis enzimática regioselectiva de ésteres de ácidos grasos de 3,17 β - estradiol	196
8.2.3. Preparación enzimática quimioselectiva de N-(hidroxialquil)-acrilamidas	205
8.2.4. Síntesis de poli(acrilamidas) modificadas hidrofobicamente	207
8.3. Biotransformaciones catalizadas por células enteras	212
8.3.1. Condiciones generales para las reducciones catalizadas por <i>Mucor rouxii</i>	212

8.3.2. Preparación de sustratos	212
8.3.3. Preparación de compuestos mediante reducciones	214
8.3.3.1. Uso de cultivos frescos de <i>Mucor rouxii</i>	214
8.3.3.2. Uso de cultivos frescos de <i>Mucor rouxii</i>	218
8.3.4. Hidrólisis enzimática de los productos 55d y 55f	221
8.3.5. Condiciones generales para las reducciones catalizadas por levadura de panadería	221
Bibliografía	224
Resumen	225

Eliminado: 45

Capítulo I

Introducción

1. BIOCATÁLISIS

1.1 DEFINICIÓN

La biocatálisis puede ser definida como el uso de catalizadores naturales, llamados biocatalizadores, con el propósito de realizar transformaciones en la estructura química de compuestos orgánicos.¹ Los biocatalizadores más utilizados hasta el momento son las enzimas, las cuales pueden emplearse en forma purificada, es decir, aisladas o formando parte de un complejo enzimático; o bien como una preparación de células enteras. La fuente del biocatalizador puede ser de origen animal, vegetal o bien microbiano.

1.2. EVOLUCIÓN DE LA BIOCATÁLISIS

Hace veinte años la biocatálisis era considerada una metodología con grandes limitaciones, que se manifestaban en:

- (i) Las enzimas sólo aceptaban un grupo reducido de sustratos
- (ii) La disponibilidad y la cantidad de enzimas
- (iii) Estabilidad de las proteínas componentes de los biocatalizadores
- (iv) Necesidad de co-sustratos como cofactores.¹

Estas desventajas fueron subsanadas por el:

- Uso de solventes orgánicos y co-solventes; sistemas mono-y bifásicos
- Técnicas para disminuir la inhibición de sustratos y productos.
- Regeneración de cofactores.
- Modificación de la actividad enzimática.
- Producción de enzimas semisintéticas.
- Inmovilización y estabilización de enzimas.
- Uso de DNA recombinante para la producción de enzimas a gran escala.
- Mutagénesis y evolución directa para cambiar las propiedades de las enzimas.
- Búsqueda y análisis de actividad de nuevas enzimas para su potencial uso en síntesis.

1.3. APLICACIÓN DE LA BIOCATÁLISIS EN SÍNTESIS ORGÁNICA

La síntesis orgánica es una ciencia altamente desarrollada. En particular, la síntesis de compuestos farmacéuticos, alimentarios y agroquímicos, entre otros, demandan procedimientos sintéticos muy sofisticados. La palabra clave en síntesis es **selectividad**,

característica necesaria para obtener un producto específico con un alto rendimiento.

El uso de biocatalizadores en síntesis permite efectuar transformaciones que resultan con un alto grado de quimio-, regio- y enantioselectividad,² utilizando como sustratos, materiales naturales y sintéticos. Estos procesos suceden en condiciones de reacción relativamente suaves, ausencia de productos secundarios y un bajo impacto sobre el medio ambiente, derivado de condiciones de reacción menos peligrosas y de menor consumo de energía que los procesos de química convencional especialmente cuando se emplean metales pesados como catalizadores. Esto permite incluir a la biocatálisis dentro del concepto de “química verde”.

El concepto de química verde fue introducido por la Agencia de protección del Medioambiente de los Estados Unidos de América al principio de la década pasada, con el fin de “promover metodologías químicas que reduzcan o eliminen el uso o generación de sustancias peligrosas en el diseño, fabricación y uso de productos químicos”.³

La química verde generalmente está asociada con los doce principios formulados por Paul Anastas y John Warner.⁴ Estos principios consideran el ciclo de vida de los productos químicos para disminuir el impacto medioambiental de los mismos.

Los doce principios de la química verde se encuentran acompañados de los doce principios de la ingeniería verde.⁵ Todos ellos hacen que la química verde sea:

- Lógica desde el punto de vista científico.
- Más segura que los procesos convencionales.
- De menor costo.
- Compatible con un desarrollo sostenible.

Finalmente podemos considerar que por todas estas razones la biocatálisis se ha convertido en un objetivo para la investigación tanto en el ámbito académico como en el industrial.

1.4. BIOCATÁLISIS EN MEDIOS NO CONVENCIONALES

1.4.1. Enzimas aisladas en medio orgánico. Características

Tradicionalmente, se pensaba en las enzimas como catalizadores que eran eficientes sólo en sistemas acuosos. Sin embargo Sym en 1936⁶ y Klibanov y col.⁷ entre 1984 y 1986⁵ demostraron que algunas de ellas podían variar su selectividad y aumentar su estabilidad térmica en solventes no acuosos.

A primera vista, la sustitución del medio acuoso resulta incompatible de acuerdo a la idea convencional de que las enzimas pueden desnaturalizarse en solventes orgánicos.

Sin embargo, esta idea surge de examinar a las enzimas en mezclas de solvente orgánico y agua, no en solventes orgánicos puros. La ausencia de agua, que actúa como lubricante natural⁷ vuelve a las enzimas más rígidas. En solventes orgánicos puros, si bien la molécula de proteína es propensa a desnaturalizarse, la insuficiente flexibilidad conformacional impide que esto suceda.⁸ De acuerdo con esto, se ha encontrado que muchas enzimas en forma cristalina retienen esencialmente su estructura nativa aún en solventes orgánicos.⁹

La habilidad de los solventes orgánicos para afectar y más aun, aumentar las propiedades catalíticas de las enzimas, amplió la aplicación de la biocatálisis a la síntesis orgánica. Como ventajas de esta metodología se puede mencionar que en solventes orgánicos:

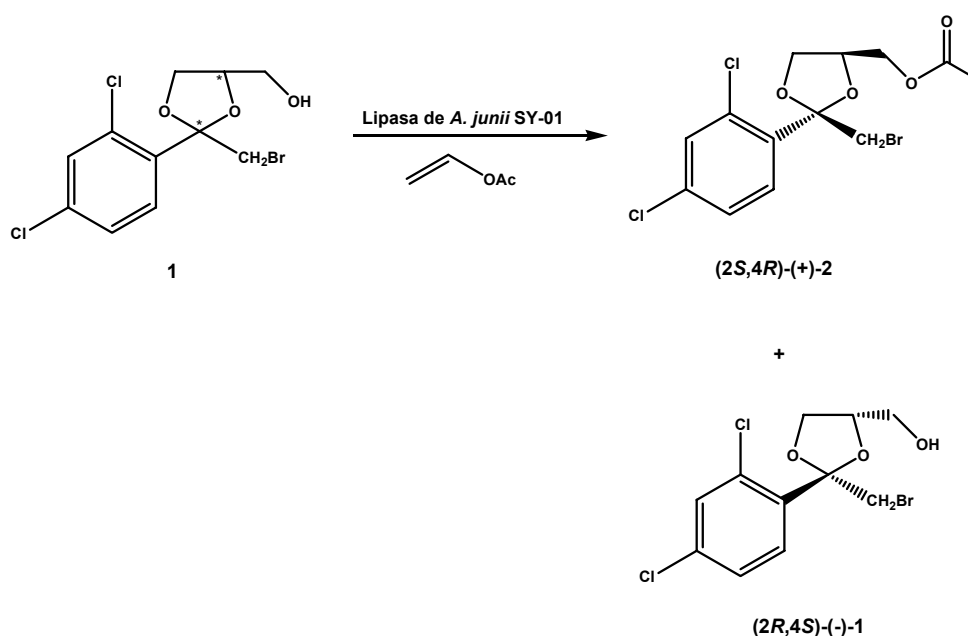
- 1) Aumenta de la solubilidad de sustratos y productos hidrofóbicos o poco solubles en agua.
- 2) Se suprimen reacciones secundarias inducidas por el agua, como la hidrólisis de anhídridos y ésteres.
- 4) Se facilita la recuperación de algunos productos.
- 5) El biocatalizador es insoluble en el medio de reacción, en consecuencia puede ser fácilmente recuperado,
- 6) Las enzimas presentan mayor estabilidad térmica en solventes orgánicos anhidros que en medio acuoso. Por ejemplo, la lisozima pierde el 50% de su actividad en 30 segundos, en una solución buffer a pH 8 o en 100 minutos a pH 4, mientras que en ciclohexano esta reducción de actividad es observada luego de 140 horas.

1.4.2. Dependencia del solvente en la especificidad de las enzimas

Como mencionamos anteriormente la selectividad es la característica más importante de la catálisis enzimática. Se considera como una propiedad intrínseca de cada enzima. Una de las estrategias para variar la selectividad es modificar la molécula de enzima, por ejemplo mediante técnicas de mutagénesis dirigida. Esto es útil si la enzima es activa solamente en agua, es decir con un medio de reacción fijo, pero no es necesario si el proceso enzimático se lleva a cabo en solventes orgánicos. Existen varios casos en la literatura en donde la selectividad ha cambiado notablemente al variar el solvente.¹⁰ Mencionaremos algunos ejemplos de enantio-, regio- y químioselectividad.

1.4.2.1. Enantioselectividad

La enantioselectividad es el tipo de selectividad enzimática más importante debido a que permite obtener productos con un alto grado de enantiopureza. Sin embargo, algunas enzimas presentan una baja estereoselectividad en las transformaciones no naturales, siendo necesario recurrir a laboriosas técnicas de screening que implican un costo elevado. El descubrimiento de que la enantioselectividad puede ser influenciada y a veces revertida por el solvente, convierte a esta metodología en una excelente alternativa al screening enzimático. Por ejemplo, Park observó que la enantioselectividad de la lipasa de *Acinetobacter junii* SY-01 en la acetilación de (\pm) itraconazol, un potente fungicida **1**, aumentó quince veces aproximadamente cuando se cambió el diisopropil éter como solvente por acetonitrilo. El producto preponderante en la acetilación del sustrato proquiral **1** fue el acetato de (2*S*, 4*R*)-(+)-itraconazol (**2**), esta selectividad permitió obtener el isómero que presenta la actividad fungicida (2*R*, 4*S*)-(-) itraconazol (**1**) con una alta enantiopureza (Esquema 1.1).¹¹

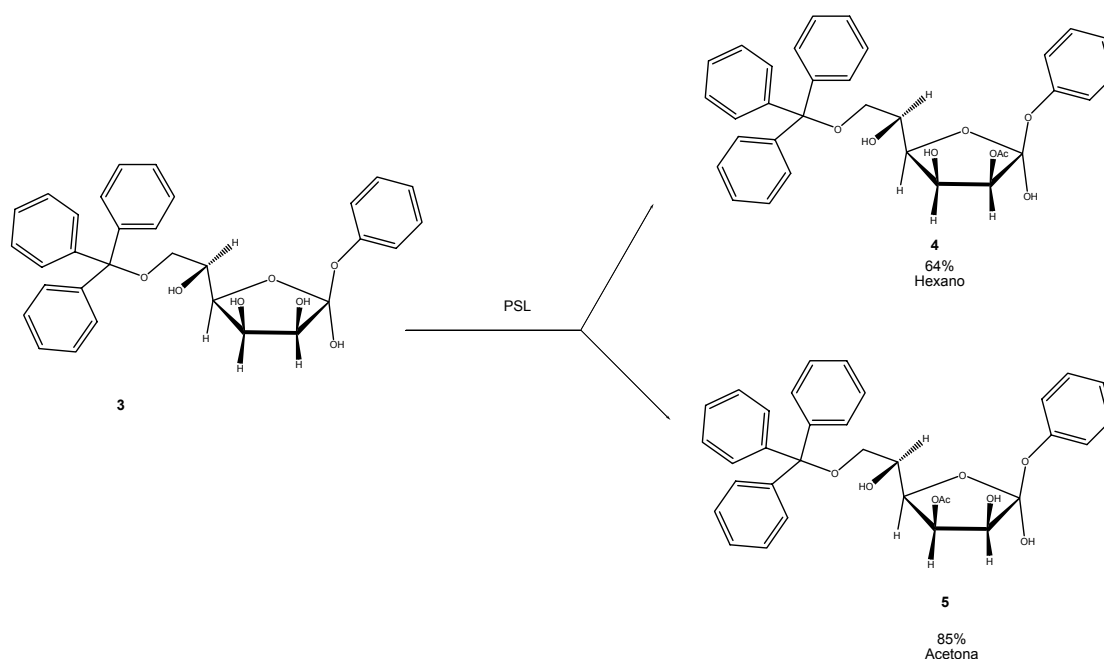


Esquema 1.1. Resolución enzimática del (\pm) itraconazol

1.4.2.2. Regio- y quimioselectividad

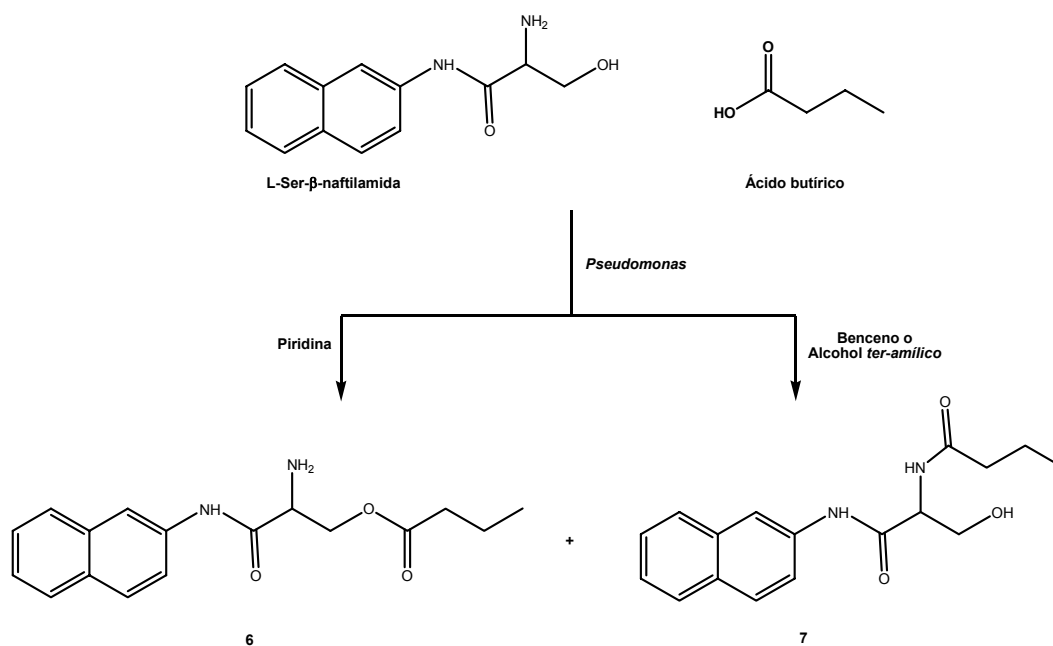
Otros dos tipos de selectividad enzimática, la regio- y la quimioselectividad, también pueden ser controladas por el solvente. La regioselectividad se refiere a la preferencia

de la enzima por uno de varios grupos funcionales idénticos presentes en la molécula de sustrato. Ha sido demostrado en la reacción de acetilación del fenil 6-O-tritil- β -D-manopiranosido **3** catalizada por lipasas de *Pseudomonas cepacia* (PSL).¹² Cuando el medio de reacción utilizado fue acetona se obtuvo una mezcla de los productos 2-O-acetilado **4** y 3-O-acetilado **5** en una relación 15:85, mientras que cuando el solvente fue hexano esta relación era 64:36 (Esquema 1.2).



Esquema 1.2. Efecto del medio de reacción sobre la acetilación regioselectiva del 6-O-tritil- β -D-manopiranosido

La quimioselectividad está determinada por la preferencia de una enzima a favor de uno entre varios grupos funcionales distintos en la molécula de sustrato. Se ha encontrado para muchas lipasas y proteasas que el grado de preferencia para la acilación de grupos hidroxilo frente a grupos amino en un sustrato dado depende marcadamente del solvente. Por ejemplo, se ha reportado¹³ que a partir de la reacción de acilación de L-Ser- β -naftilamida con ácido butanoico catalizada por lipasas de *Pseudomonas* se obtiene el producto de O-acilación cuando se utiliza piridina **6** como solvente, mientras que el uso de benceno o alcohol *ter*-amílico permite obtener el producto de N-acilación **7** (Esquema 1.3).



Esquema 1.3. Influencia del solvente en la selectividad de la reacción de L-Ser-β-naftilamida y ácido butírico catalizada por lipasas de *Pseudomonas*

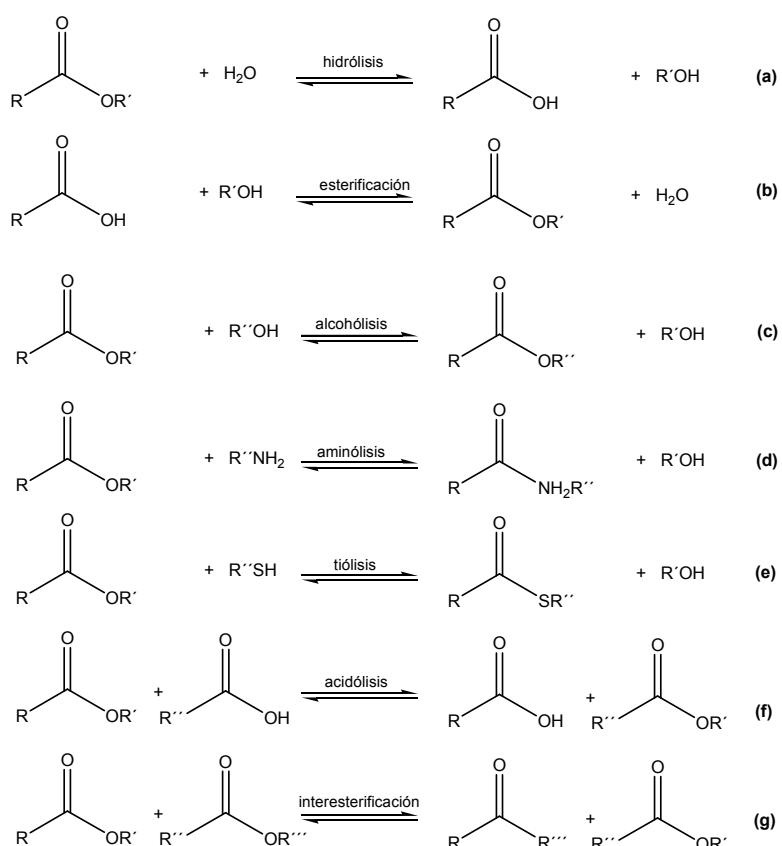
A pesar de que el efecto del solvente en varios tipos de selectividad enzimática se encuentra hoy firmemente probado y en condiciones de ser utilizado a escala preparativa, los mecanismos involucrados están apenas comenzando a ser dilucidados.

1.5. APLICACIÓN DE ENZIMAS AISLADAS COMO CATALIZADORES

Los biocatalizadores más usados en síntesis orgánica son las enzimas hidrolíticas. Dentro de esta clasificación se encuentran las enzimas capaces de catalizar la hidrólisis y la formación de las uniones éster y amida, como las amidasas, las proteasas, las esterases y las lipasas. De estos cuatro grupos de enzimas, las lipasas merecen especial atención debido a su extendido uso en biotransformaciones aplicadas a síntesis orgánica.

1.5.1. Lipasas

Las lipasas son serina hidrolasas, cuya reacción natural es la hidrólisis de triglicéridos. Debido al amplio espectro de sustratos que aceptan, además de la hidrólisis de ésteres (a), catalizan reacciones de esterificación (b), alcoholólisis (c), aminólisis (d), tiólisis (e), acidólisis (f) y transesterificación (g), etc. Esta amplia actividad (b-g) la manifiestan cuando el agua no está presente en el medio de reacción (Esquema 1.4).¹⁴



Esquema 1.4. Reacciones catalizadas por lipasas

1.5.1.1. Fuentes

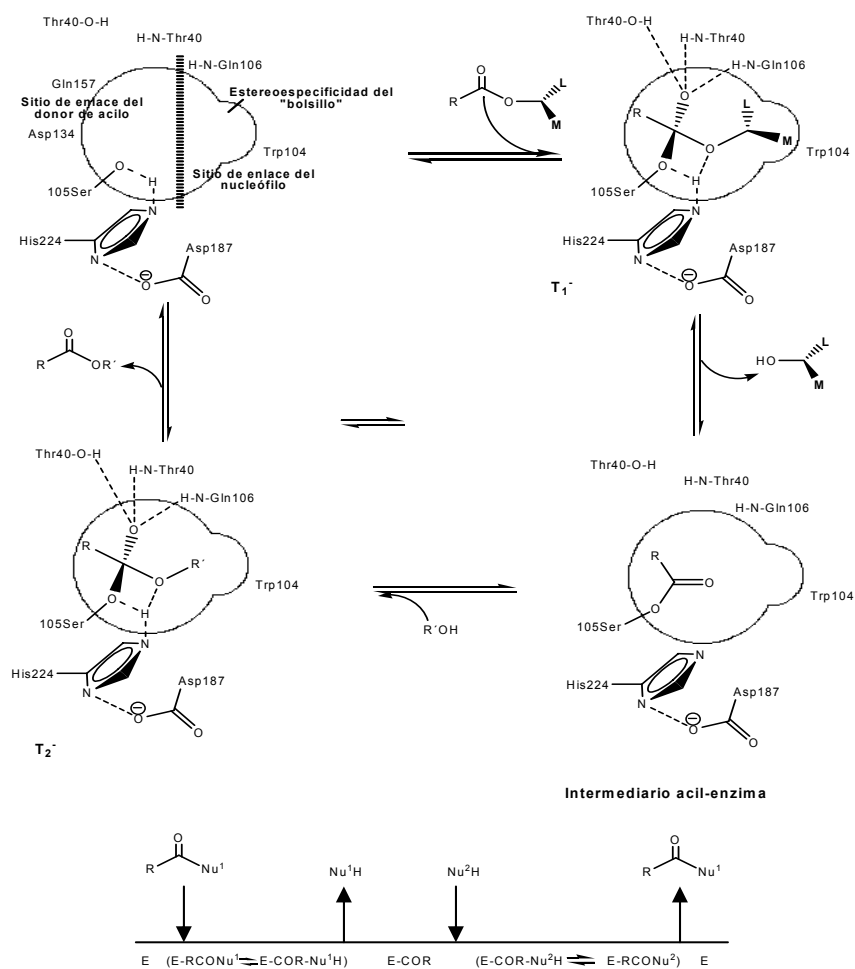
Las lipasas son enzimas que pueden provenir de distinto origen: microbiano¹⁵, vegetal¹⁶ o animales superiores.^{16,17} Las lipasas comerciales generalmente son de origen microbiano¹⁶ y, a partir de técnicas de ingeniería genética, en la actualidad se producen un gran número de lipasas a partir de recombinantes de bacterias y levaduras. En la Tabla 1.1 se resumen las principales lipasas disponibles comercialmente, empleadas en síntesis orgánica.

Tabla 1. Ejemplos de lipasas comerciales utilizadas en síntesis orgánica

Origen	Lipasa	Nombre comercial
Mamíferos	Lipasa pancreática porcina (PPL)	
Hongos	Lipasa de <i>Candida rugosa</i> (CRL)	Lipase OF Amano lipase AY
	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> tipo B (CAL B)	SP-435
	Lipasa de <i>Humicola lanuginosa</i>	Amano lipase R-10
	Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> (LIP)	Amano MAP-10 Lipozyme RML
Bacterias	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> (PSL)	Amano, P.PS PS30, LP80 SAM-I
	Lipasa de <i>Chromobacterium viscosum</i>	Amano lipase LP
	Lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. (PS-C)	Amano AK, K-10 SAM-II

1.5.1.2. Mecanismo

Las lipasas hidrolizan las uniones éster mediante un mecanismo tipo ping-pong bi-bi, el cual es conocido como el mecanismo de las serina hidrolasas.¹⁴ En el Esquema 1.5 se representa dicho mecanismo a través de la reacción de un éster quiral (RCO_2CHLM , como donador de acilo RCONu^1) con $\text{R}'\text{OH}$ (nucleófilo Nu^2H), catalizada por una lipasa. En primera instancia el éster ingresa al sitio activo donde la serina (Ser105) es activada por la formación de un puente de hidrógeno con la histidina (His224). El ataque nucleofílico del hidroxilo de la serina sobre el carbono carbonílico del sustrato da origen al intermediario tetraédrico (T_1^-), el cual es estabilizado por tres puentes de hidrógeno generados en el hueco del oxianión, uno con el residuo Gln106 y dos con Thr40. El intermediario colapsa liberando el alcohol LMOH (Nu^1H) y dando origen al intermediario acil-enzima. El ataque de $\text{R}'\text{OH}$ (un nucleófilo agregado Nu^2H) genera un segundo intermediario aniónico tetraédrico el cual finalmente libera el segundo producto ($\text{RCO}_2\text{R}'$ o RCONu^2) y la enzima comienza un nuevo ciclo.



Esquema 1.5. Mecanismo tipo ping-pong bi-bi para CAL B

1.5.1.3. Estructura

Entre 1990 y 1994 se obtuvieron una gran cantidad de información estructural y de datos bioquímicos de lipasas extremadamente puras. Estas determinaciones demostraron que no todas las lipasas presentan el fenómeno de activación interfacial definido por Sarda y Desnuelle en 1958¹⁸. Este modelo es consistente con el hecho de que la actividad de las lipasas es baja al emplear sustratos monoméricos, en cambio con sustratos que tienen la posibilidad de formar agregados, como emulsiones o soluciones micelares, la actividad se ve fuertemente incrementada. En primera instancia, este comportamiento fue atribuido a la presencia de un segmento peptídico anfifílico que actúa como una tapa protegiendo el sitio activo de la enzima en solución. Brzozowski y colaboradores¹⁹ concluyeron que al producirse el contacto con la interfase lípido-agua, la tapa experimenta un reordenamiento conformacional que permite el acceso del sustrato al sitio activo. Sin embargo, como indicamos, algunas lipasas como las de *Pseudomonas glumae*²⁰ y

Candida antarctica tipo B (CAL B) que poseen la tapa amfifílica que cubre el sitio activo no muestran activación interfacial.²¹ Verger concluye que, ni el fenómeno de activación interfacial, ni la presencia de un dominio tipo tapa constituyen criterios apropiados para clasificar una esterasa dentro de una subfamilia de lipasas.²² Para clasificar una esterasa como una lipasa, el criterio más conveniente sigue siendo la evidencia experimental, es decir su capacidad de hidrolizar o no acilglicérols de cadena larga.

Pleiss y colaboradores²³ con el fin de justificar los comportamientos diferenciales de lipasas y esterases, realizaron un estudio más detallado en base a la información de rayos X existente de las estructuras de dichas enzimas con inhibidores y herramientas informáticas. Compararon el sitio activo de 11 familias de serina-esterasas y lipasas (Tabla 1.2) publicadas en ese momento, y observaron que todas ellas son miembros de la familia de proteínas α/β que poseen una arquitectura similar compuesta por una secuencia específica de hélices α y láminas β , y en las cuales el sitio activo está ubicado en la lámina β central.

Tabla 1.2. Lipasas y esterases estudiadas por Pleiss

Enzima	Familia	Individuo
Lipasa	<i>Candida</i>	<i>C. antarctica</i> tipo B (CAL B)
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. cepacia</i> (PSL)
		<i>P. Glumae</i>
	páncreas de mamíferos	humana
		porcina (PPL)
		equina
		de cerdo de Guinea
	hongos filamentosos	<i>Rhizomucor miehei</i> (RML)
		<i>Rhizopus delemar</i>
		<i>Rhizopus niveus</i>
		<i>Humicola lanuginosa</i>
		<i>Penicillium camembertii</i>
	levaduras	<i>Candida rugosa</i> (CRL)
<i>Geotrichum candidum</i>		
	<i>Fusarium solani</i> cutinasa	
Esterasa	acetilcolinesterasas	<i>Torpedo californica</i>
		<i>Electrophorus electricus</i>
		ratones
		<i>Streptomyces aureofaciens</i> bromoperoxidase A2

El sitio activo, en una forma simplificada, puede separarse en dos "bolsillos", el primero poco selectivo y destinado a contener el donador de acilo (bolsillo S) y el segundo muy selectivo que contiene el nucleófilo (bolsillo A).

1.5.1.3.1. Bolsillo S

Pleiss y sus colaboradores²³ indican que las lipasas pueden ser subdivididas, en base a las características del bolsillo S, en tres grupos: 1) lipasas con un bolsillo hidrofóbico con forma de hendidura localizado en la superficie de la proteína (lipasas de *Rhizomucor* y *Rhizopus*), 2) lipasas con un bolsillo en forma de embudo (lipasas de *Candida antarctica*, de *Pseudomonas*, de páncreas de mamíferos y cutinasa) y 3) lipasas con el bolsillo en forma de túnel (lipasa de *Candida rugosa*). Las esterasas y lipasas investigadas poseen su maquinaria enzimática en el fondo del sitio activo donde el sustrato se une con su eje ácido-alcohol en forma paralela al eje del bolsillo S, cuyo ancho oscila entre 4 a 4,5 Å en todas las enzimas analizadas. La longitud del bolsillo S varía desde 3.5 Å en la acetilcolinesterasa y la bromoperoxidasa, a 22 Å en las lipasas de *Candida rugosa* (CRL) y *Rhizomucor miehei* (RML). Con esta información se puede concluir que las esterasas con bolsillos S pequeños pueden hidrolizar ácidos grasos de cadena corta (propanoilo o butanoilo) mientras que las lipasas con un bolsillo grande aceptan ácidos grasos de cadenas medias y largas.

Pleiss indica que existen otros factores adicionales que influyen sobre la especificidad de la longitud de la cadena del ácido graso. Por ejemplo, las mutaciones en el sitio activo y la tapa anfifílica de la enzima pueden cambiar la mencionada especificidad, en este sentido. Reemplazando el residuo tirosina T138 por serina en el hueco donde se ubica el oxianión (ver sección Mecanismo) en la lipasa de *R. delemar* se generó una disminución en la actividad enzimática sobre la tributirina de cuatro veces respecto a la trioleína. Estas observaciones están en concordancia con la información experimental, que indica que la actividad y especificidad de las lipasas puede ser influenciada por muchos factores como la actividad de agua, el soporte donde se pueden inmovilizar y las características de la interfase del sustrato. Las mutaciones pueden interferir con uno o varios de estos factores.

En reacciones de alcoholisis y esterificación de monoésteres catalizadas por lipasa de CAL B y RML en solvente orgánico se observó que las características del sitio activo son determinantes sobre la especificidad de longitud de cadena, mientras que las condiciones de reacción tuvieron una incidencia menor. La lipasa de CAL B demostró tener una actividad alta para ácidos de cadenas cortas y medias mientras que RML presentó una

preferencia inversa. Estos resultados están en concordancia con la forma y propiedades del bolsillo S de las enzimas (Figura 1.1). El bolsillo de CAL B es relativamente corto (los cálculos realizados indican que no puede contener una cadena mayor a 13 carbonos (C13), y tiene una pequeña área hidrofóbica localizada en la pared del embudo. En la RML el bolsillo está ubicado en una hendidura hidrofóbica, bien definida, que le permite acomodar una cadena de 18 carbonos (C18).

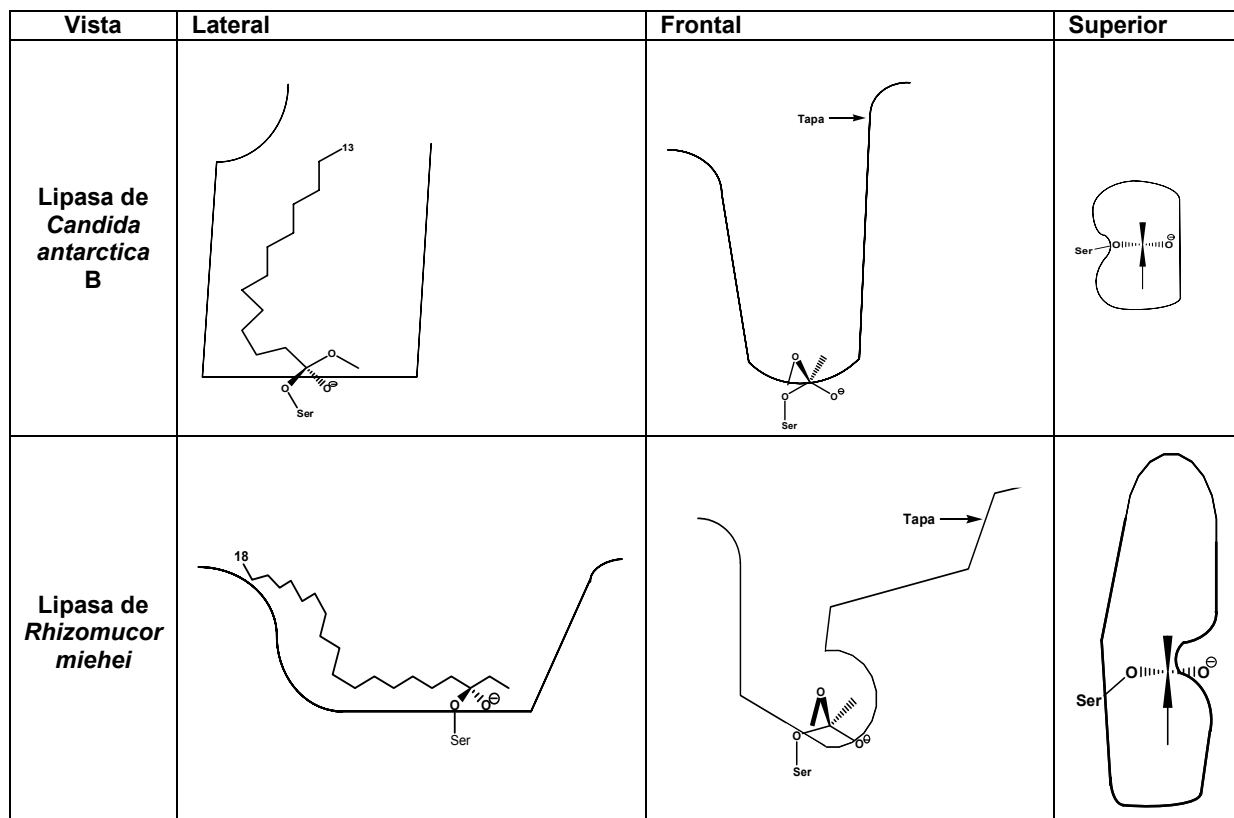


Figura 1.1. Vista lateral: plano definido por tres átomos del inhibidor (fósforo, carbono y oxígeno del éster). Vista frontal: plano perpendicular definido para "vista lateral", incluye los átomos de carbono, el oxígeno de la serina y el oxianión. Vista superior: perpendicular a la cadena del ácido graso y al plano definido para "vista frontal", es una vista desde el punto de entrada del sitio activo.

Sin embargo, cuando la variable del ensayo involucra la interacción sustrato-agua en la interfase, la dependencia de la longitud de cadena cambia drásticamente, esta observación fue realizada por Berger y Schneider²⁴ en la hidrólisis de triglicéridos cuando se utiliza RML. Finalmente, Pleiss concluye que, en adición al bolsillo S, existen otros elementos estructurales que condicionan la especificidad sobre la longitud de cadena, estos son el bolsillo A y la tapa anfifílica del sitio activo.

1.5.1.3.2. Bolsillo A

Debido a que las reacciones catalizadas por lipasas dependen fuertemente de la estereoquímica de los centros quirales en el sustrato, varios grupos de investigación han concentrado sus esfuerzos en intentar explicar estos resultados experimentales.²⁵ Todos ellos concluyen que el tamaño limitado del bolsillo A es la clave de la enantioselectividad observada cuando se trabaja con sustratos conteniendo aminas o alcoholes que presentan en su estructura un centro quiral.

1.6. PROMISCUIDAD ENZIMÁTICA

En 2005 Kazlauskas definió promiscuidad enzimática como la capacidad del sitio activo de una enzima de catalizar más de un tipo de reacción. En esta ampliación de la actividad de una enzima puede variar el tipo de enlace roto o formado durante la reacción y/o puede diferir el mecanismo involucrado.²⁶ Muchos ejemplos de promiscuidad enzimática involucran ambos cambios.

La promiscuidad enzimática puede ser clasificada en:

CLASE 1:

Catálisis de una reacción alternativa a través del mecanismo típico. Por ejemplo:

- Proteasas que catalizan hidrólisis de ésteres.
- Fosfatasas que hidrolizan ésteres de sulfatos.
- Metaloproteasas que rompen enlaces P-O- o P-F-.

CLASE 2:

Comprende aquellas reacciones que involucran cambios mecanísticos. Por ejemplo:

- Uso de iones metálicos alternativos, en metaloenzimas.
- Cambios generados por mutaciones naturales o inducidas artificialmente en la estructura de la enzima.
- Generación de un camino catalítico diferente al natural en enzimas no modificadas.

1.6.1. Comportamiento promiscuo clase 2 en lipasas

1.6.1.1. Reacciones de adición aldólica catalizadas por lipasas

Las reacciones que dan origen a enlaces C-C son muy importantes en síntesis orgánica. Las aldolasas catalizan estas reacciones en el metabolismo de carbohidratos a través de un ión Zn^{2+} o un residuo lisina que participa en la formación del ión enolato. Estas

enzimas son muy específicas respecto al sustrato donador, que es el enolato nucleofílico, pero presentan cierta flexibilidad sobre el electrófilo. En los últimos años se desarrollaron anticuerpos con una funcionalidad amino que presentan actividad aldolasa. Esto demostró la posibilidad de introducir nuevas funcionalidades en estructuras proteicas ya existentes.²⁷

Como indicamos anteriormente las lipasas pertenecen a la familia de α/β hidrolasas.

Como vimos en 1.5.1.2. las enzimas de esta familia tienen en común un mecanismo de acción que involucra la activación de la función carbonílica a través del hueco del oxianión. El nitrógeno con carácter básico del par Asp-His de la tríada catalítica facilita la transferencia del protón durante el proceso catalítico, mientras la serina asistida por Asp-His funciona como nucleófilo. Si esta funcionalidad nucleofílica es eliminada la transferencia del protón y la capacidad de estabilizar la carga del oxianión pueden ser utilizadas para la catálisis de reacciones que no son viables en la enzima nativa.

Con este objetivo Berglund y colaboradores investigaron la capacidad de una enzima en la que la serina (Ser105) es mutada por un residuo no polar, como alanina, para catalizar las adiciones aldólicas de cetonas y aldehidos.²⁷

Sus experimentos demostraron claramente un importante incremento de la velocidad de reacción cuando la adición aldólica fue catalizada por la enzima mutante comparada con la lipasa nativa (Figura 1.2). La enzima Ser105Ala exhibe actividad específica cuatro veces mayor que la lipasa nativa y trescientas veces mayor que la albúmina o el soporte libre de la enzima.

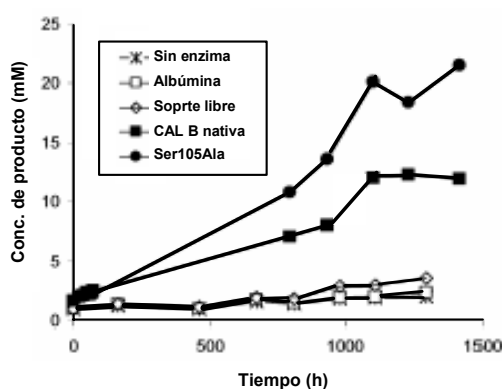
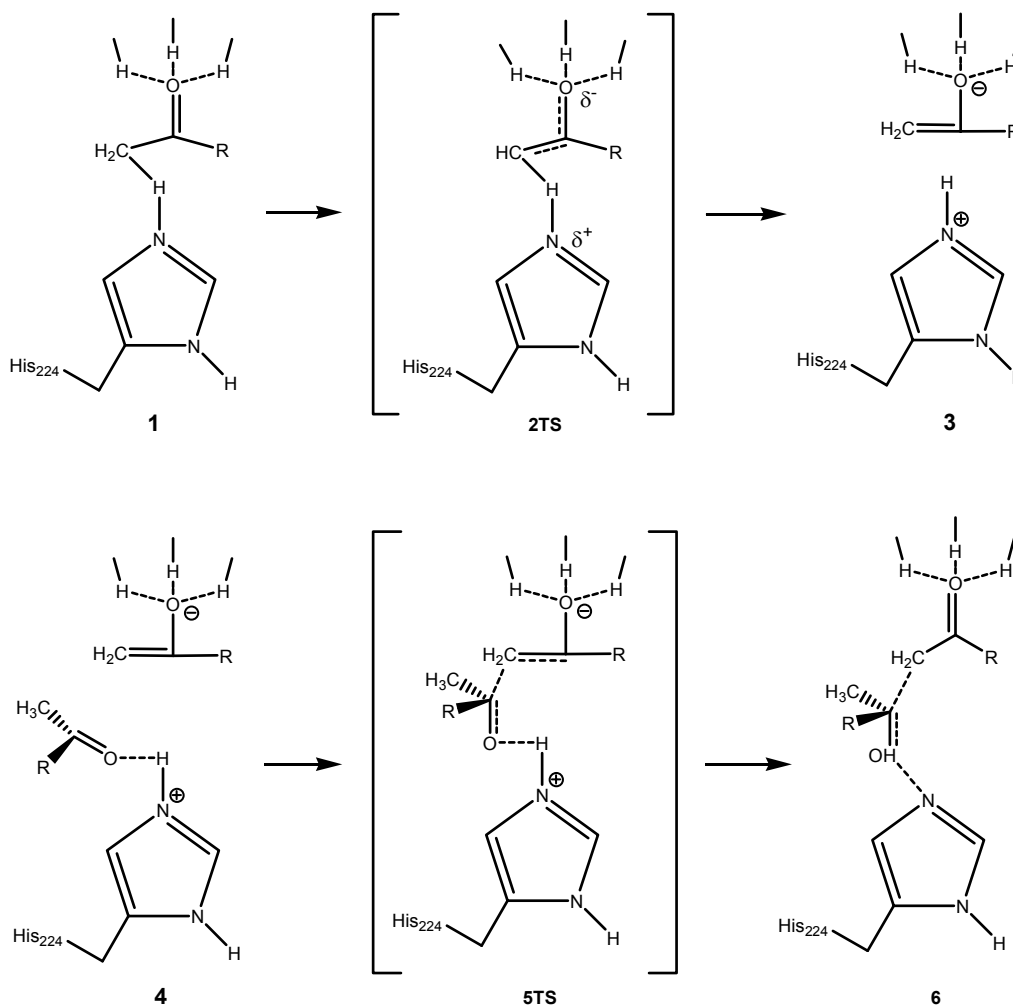


Figura 1.2. Curva representativa del progreso de la adición aldólica del hexanal catalizada por CAL B nativa y la serina mutante Ser105Ala

Los autores proponen un mecanismo para este comportamiento promiscuo basados en sus estudios computacionales.

El intermediario enolato es estabilizado en el hueco del oxianión, de acuerdo al mecanismo de dos pasos del Esquema 1.6. En el primer paso, la diada Asp-His y el hueco del oxianión estabilizan la formación del ión enolato. Luego el ion es atacado por

una segunda molécula de sustrato. En este segundo paso se forma el enlace C-C y el protón es transferido al oxígeno en un proceso concertado.



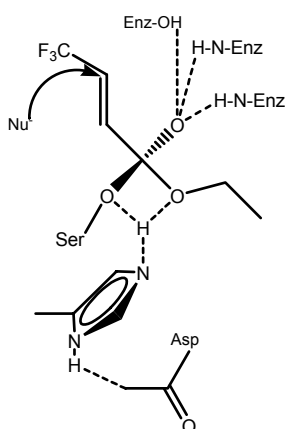
Esquema 1.6. Mecanismo de dos pasos propuesto en base a los cálculos teóricos de la adición aldólica de acetaldehído (R=H), o acetona (R=CH₃), catalizada por la serina mutante

1.6.1.2. Reacciones de adición de Michael catalizadas por lipasas

La adición de Michael puede ser catalizada enzimáticamente. Las lipasas catalizan la adición de pequeñas moléculas a dobles enlaces del tipo C=C, C=N o C=O, o bien la reacción inversa. Estas enzimas poseen un gran potencial sintético pero no tienen una disponibilidad comercial sencilla.

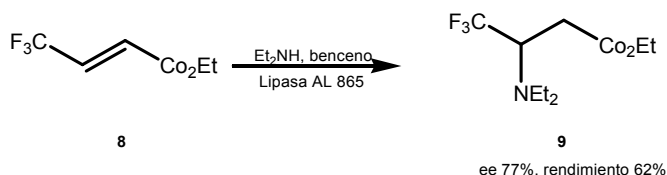
Otra estrategia para realizar adiciones de Michael es el uso de lipasas. El método tiene un limitante importante que es la baja pureza enantiomérica de los productos obtenidos. Kanerva propone que esta reacción no natural en las lipasas puede ocurrir a través de

un mecanismo en el cual el intermediario tetraédrico aniónico T_1^- (Esquema 1.7) sirve como estructura para la adición de un nucleófilo.



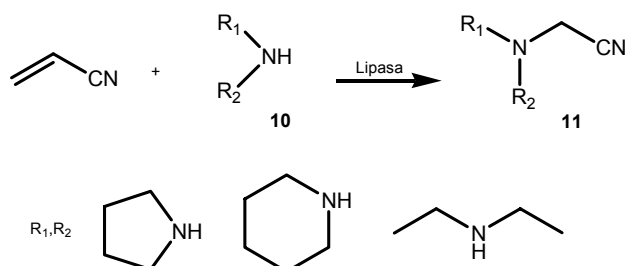
Esquema 1.7. Mecanismo propuesto para la adición de Michael catalizada por lipasas

Con el objeto de analizar esta estrategia se estudió la formación de **9** por la adición de dietilamina al (*E*)-4,4,4-trifluoro-2-butenolato de etilo (**8**) (Esquema 1.8) catalizada por una serie de lipasas. La lipasa AL 865 de *Achromabacter* resultó ser una de las mejores enzimas, con un 77 % de e.e. y un rendimiento del 62%.¹⁴



Esquema 1.8. Adición de Michael de dietilamina al (*E*)-4,4,4-trifluoro-2-butenolato de etilo

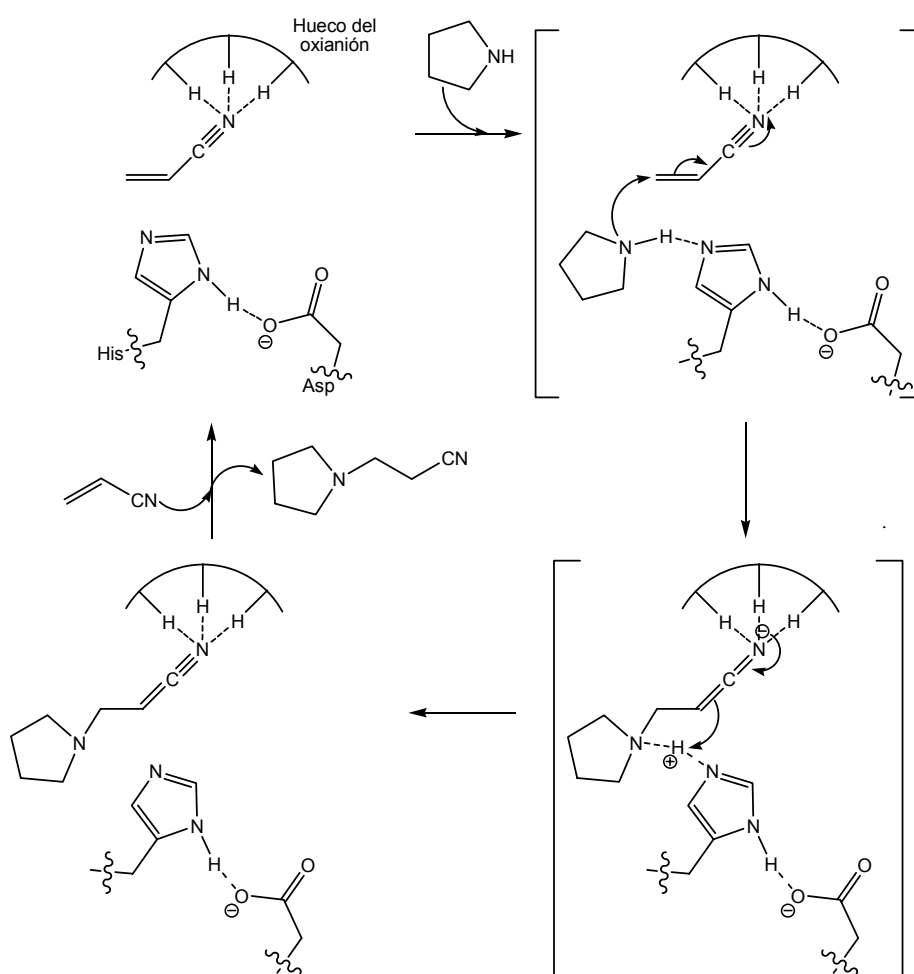
Gotor investigó la reacción de acrilonitrilo con diferentes aminas secundarias (**10**) en presencia de CAL B (Esquema 1.9).²⁸



Esquema 1.9. Adición de Michael de aminas secundarias a acrilonitrilo

Corroboró que la formación del correspondiente aducto de Michael (**11**) se produce con mayor velocidad en presencia de la enzima que en su ausencia. Con el objetivo de demostrar el efecto catalítico de la enzima, la desnaturalizó con urea a 100°C, y repitió el experimento. Observó que los datos eran similares a los obtenidos para la reacción sin enzima. Esta información sugirió que la estructura terciaria del biocatalizador era necesaria para promover el proceso y que el soporte polimérico tenía un efecto insignificante en la actividad detectada.

Con estos resultados Gotor y col.²⁸ proponen un mecanismo para este nuevo proceso (Esquema 1.10). Los catalizadores normalmente utilizados en reacciones de adición de Michael usualmente son ácidos de Lewis (similar al hueco del oxianión) o un grupo ácido-base que permite la transferencia del protón desde el donador de Michael a la posición C- α del aceptor de Michael. En el sitio activo de la lipasa estos dos grupos pueden estar muy cerca en el espacio.



Esquema 1.10. Mecanismo propuesto por Gotor para la adición de Michael catalizada por lipasas

El mecanismo propuesto podría comenzar con la instalación del aceptor de Michael (acrilonitrilo) en el sitio activo. La interacción del grupo nitrilo con el hueco del oxianión puede incrementar su capacidad electrofílica.

1.7. APLICACIÓN DE CÉLULAS ENTERAS COMO CATALIZADORES

A pesar de que la mayoría de los trabajos sobre biotransformaciones en medio orgánico se han hecho con enzimas aisladas, el uso de células enteras como biocatalizadores en sistemas bifásicos está adquiriendo gran importancia y se está convirtiendo en un prometedor campo de estudio especialmente para ciertas bioconversiones como oxidaciones y reducciones, que requieren el agregado y/o regeneración de cofactores, o bien fermentaciones, en donde se requieren caminos metabólicos multienzimáticos. Las ventajas de emplear un medio de reacción bifásico residen no sólo en la factibilidad de emplear sustratos de escasa solubilidad en agua, sino en que mantiene una baja concentración en la fase acuosa de compuestos tóxicos o inhibidores, permite la recuperación del producto *in situ* (lo que reduce la inhibición por producto final y favorece el rendimiento por desplazamiento del equilibrio termodinámico) y facilita las condiciones para la recuperación tanto del catalizador como del producto.

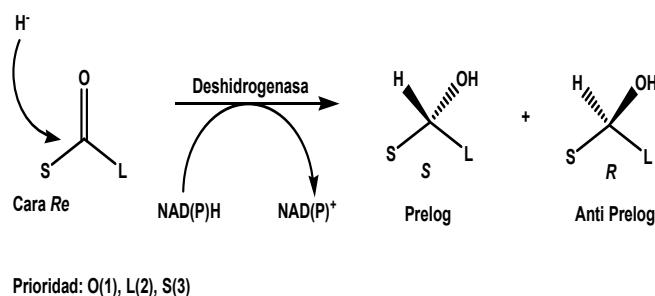
El descubrimiento de cepas de bacterias tolerantes al medio orgánico, y la utilización de células enteras de microorganismos inmovilizadas en matrices poliméricas, han ampliado las expectativas puestas en este campo, generando la posibilidad de comprender los mecanismos de tolerancia y toxicidad de los microorganismos en solventes orgánicos. Existe en la literatura una cantidad apreciable de trabajos que tratan este tema.²⁹

1.7.1. Oxidorreductasas

Las oxidorreductasas son las enzimas responsables de los procesos de oxidorreducción en la naturaleza. Estos catalizadores, a diferencia de las hidrolasas, necesitan de cofactores para mantener su actividad enzimática. La mayoría de las oxidorreductasas conocidas emplean nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) o su correspondiente 2'-fosfato (NADP) como cofactores para donar o recibir hidrógeno, cuando un mol de sustrato es reducido un mol de cofactor es oxidado y vice versa. Debido a que los cofactores poseen costos elevados deben ser regenerados para aumentar la factibilidad económica del proceso.

Las oxidorreductasas pueden dividirse en: deshidrogenasas, oxigenasas y oxidasas.

Las deshidrogenasas catalizan la reducción enantioselectiva de cetonas asimétricas para obtener alcoholes secundarios (Esquema 1.11). Esta reacción es de gran importancia debido a que es una síntesis asimétrica capaz de dar el producto con un 100% de rendimiento. Existen numerosos ejemplos de esta reacción usando como catalizador alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (ADHHC) o alcohol deshidrogenasa de levaduras (ADHL). Estas reacciones siguen la regla de Prelog para la estereoselectividad, la cual establece que el hidruro ataca al grupo ceto por la cara *Re*, obteniéndose el (S)-alcohol como producto mayoritario (Esquema 1.11). El uso de células enteras elimina la necesidad de regenerar el cofactor NAD(P)H. Las células enteras más utilizadas son las de levaduras de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*). Las reducciones catalizadas por estas levaduras, en general, siguen la regla de Prelog y pueden reducir selectivamente dobles enlaces activados.²⁹



Esquema 1.11. Reducción enantioselectiva de cetonas asimétricas catalizada por deshidrogenasas.

1.8. ¿QUÉ ES LA BIOCATÁLISIS APLICADA?

La biocatálisis aplicada puede ser definida como la aplicación de un biocatalizador para realizar una transformación química en un biorreactor, bajo condiciones controladas. El biocatalizador puede ser una enzima aislada, un complejo de enzimas, organelas celulares o células enteras.³⁰

1.8.1. Historia de la biocatálisis aplicada

1.8.1.1. Antigüedad

La biocatálisis comenzó a ser utilizada en la antigüedad en China y Japón para la manufactura de alimentos y bebidas alcohólicas. En Europa la biocatálisis aplicada también cuenta con una historia muy larga. Alrededor del año 400 a.C. Homero menciona

en su obra La Ilíada el uso de estómagos de niños en la fabricación de queso. En esa época se descubrió que cuando la leche era almacenada en estómagos de niños u ovejas se transformaba en una sustancia semisólida. Si este material semisólido era sometido a los efectos de una prensa, se obtenía un material seco el cual se denominó “queso”. Este nuevo material presentaba propiedades superiores a las de la leche, podía ser transportado fácilmente y manifestaba la aparición de aroma luego de cierto tiempo de almacenamiento.

1.8.1.2. Período 1697 a 1885

En 1697, Stahl, presenta en su libro *Zymotechnika Fundamental* los resultados de sus investigaciones sobre el origen y características de la fermentación como proceso industrial. En esta publicación Stahl postula que la *Zymotechnika* podía ser la base científica de la fermentación.

La fermentación alcohólica fue el tema dominante en este período. Sobre su origen pueden encontrarse dos corrientes bien diferenciadas. La primera fue propuesta por Berthelot. Según su interpretación el principio activo de la fermentación era una sustancia, formada por levaduras, que era capaz de transformar el azúcar en alcohol. La transformación de azúcar en alcohol se producía en ausencia de microorganismos. Por lo tanto, según Berthelot, la fermentación era un proceso químico puro. Los resultados experimentales a partir de los cuales Berthelot elaboró sus conclusiones no pudieron ser considerados confiables ya que sus experimentos no fueron llevados a cabo bajo condiciones estériles.

Por otro lado, Pasteur a través de sus resultados experimentales demostró que la fermentación alcohólica procedía exclusivamente en presencia de microorganismos. Estos experimentos fueron realizados bajo condiciones controladas. Los microorganismos considerados eran de diferentes características y podían encontrarse también en el aire. Estos resultados representaron una fuerte evidencia contra la presunción de una “generación espontánea” postulada por Gay Lussac (ver Aproximaciones teóricas, Gay Lussac).

1.8.1.2.1. Aproximaciones teóricas

Debido a la gran importancia del proceso de fermentación, diferentes investigadores que vivieron a lo largo del período 1697-1885, intentaron racionalizar este proceso. A continuación se presentan las aproximaciones teóricas más importantes de esa época.

Beral (1815) y “le principe vital”

Consideró la existencia de un principio importante en los procesos asociados con la síntesis de materiales de origen biológico. Según este principio: “En la naturaleza todos los cuerpos simples están sujetos a dos tipos de fuerzas, una de atracción, que tiende a unir las moléculas de los cuerpos, y otra de origen calórico que tiende a separarlas... Un cierto número de estos cuerpos simples está sometido a una tercera fuerza, causada por el factor vital, la cual cambia y supera a las otras dos, y cuyos límites no son conocidos”.

Gay Lussac y “la generación espontánea” vs. Pasteur

Según su hipótesis Gay Lussac indica que los microorganismos se generan a través de una cadena de sucesos cuyo origen está rodeado de misterio. Pero Pasteur mostró que esta hipótesis carecía de sustento empírico, y que la fermentación sólo era posible por la inoculación de microorganismos. Pasteur incluyó a la fermentación en una nueva disciplina, la Microbiología.

Berzelius (1839)

Postuló que un cuerpo simplemente por su mera presencia podría, por afinidad a la sustancia fermentable, causar su descomposición.

Poppe (1842)

“La fermentación parece originarse por el movimiento espontáneo en un líquido de ciertos compuestos. Este movimiento surgiría como consecuencia de que algunos de estos compuestos actúan en armonía entre ellos, mientras otros lo hacen sin armonía, es decir, los primeros se atraen mientras que los segundos se repelen”.

Wagner (1857) y Payen (1874)

Describen dos tipos de fermentos:

Tipo 1: sustancia que contiene nitrógeno orgánico (no organizada), tal como material proteico.

Tipo 2: microorganismos de origen animal o vegetal.

Kühne (1878)

Denomina a los fermentos Tipo 1: **Enzimas**.

1.8.1.3. Período 1890 a 1940

Emil Fischer en 1894 comparó el comportamiento de dos enzimas Invertina y Emulsina, en la hidrólisis de glicósidos y oligosacáridos. A partir de sus trabajos Fischer pudo observar que:

- La Invertina hidrolizó el α -, pero no el β -metil-D-glicósido.
- La Emulsina presentó una selectividad opuesta a la Invertina.
- El L-azúcar derivado y el metil-L-glicósido no sufrieron transformación alguna.

Estas y otras observaciones permitieron a Fischer enunciar su famosa teoría sobre especificidad.

Después, Eduard Buchner publicó una serie de trabajos que marcaron un quiebre entre la fermentación y la enzimología.

Primero indicó que “una separación de la fermentación (alcohólica) de una fuente biológica era imposible por el momento”. Luego describió los detalles experimentales para la obtención de un “jugo libre de células vivas” a partir de levaduras que puede ser considerado un complejo de enzimas, y la formación de dióxido de carbono producida por la fermentación de sacarosa, glucosa, fructosa y maltosa. La fermentación no fue observada en los casos de la lactosa y el manitol. Estos experimentos fueron realizados en condiciones tales que el crecimiento era inhibido por el agregado de cloroformo. A pesar de esto la fermentación existió. Esta es la primera prueba concluyente de la “reacción enzimática”. Cuando Buchner comenzó a elevar la temperatura, llegó un punto en el cual comenzó a precipitar la proteína y la actividad se redujo. De estos resultados Buchner pudo dar un poco más de claridad al misterio del origen de la fermentación alcohólica. Estos resultados obtuvieron importantes objeciones fundamentalmente sobre la estabilidad de su “jugo libre de células vivas”. Neumeister probó que este jugo tenía una estabilidad muy baja comparada a otras enzimas conocidas, por lo tanto él desconfiaba que fuera un complejo de enzimas y que estuviera libre de células vivas. Buchner continuó sus trabajos y junto a Rapp pudieron cuantificar la cantidad de producto generado por el “jugo libre de células vivas” bajo diferentes condiciones, incluyendo un agente antiséptico.

Croft y Hill realizaron las primeras síntesis enzimáticas en 1898 utilizando como sustrato una solución de glucosa y como biocatalizador un extracto de levaduras que contenía una α -glicosidasa.

En 1900 Kastle y Lovenhart descubrieron que la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos catalizada por lipasas era una reacción reversible y podía ocurrir en una mezcla de ácido

y alcohol. Este principio fue utilizado por Fischer y Bourquelot en la síntesis de numerosos glicósidos.

1.8.1.3.1. Desarrollo teórico

Emil Fischer (1909)

Durante su trabajo experimental, Fischer, elaboró dos aspectos esenciales de la catálisis enzimática. El primero de ellos fue la especificidad. El indicaba que los agentes de las células vivas, las enzimas, eran ópticamente activos y en consecuencia sólo aceptarían aquellos azúcares cuya geometría no fuera muy diferente a la geometría de la glucosa.

El segundo aspecto se refiere a la naturaleza proteica de las enzimas. A pesar de que en el siglo XIX la estructura de las proteínas era desconocida y algunas de ellas, como la albúmina y la caseína, eran consideradas coloides, Fischer postulaba que “los coloides (las proteínas) poseían energía y que probablemente eran una fuente de fuerza y vitalidad”.

Buchner (1897-1898)

Buchner, en estricto contraste a Pasteur, afirmaba que la catálisis enzimática era un proceso químico que no necesariamente era desencadenado por la presencia de células vivas. El agente activo era una sustancia, de origen proteico, la cual denominó “zimasa”.

1.8.1.3.2. Desarrollo tecnológico

El desarrollo industrial de las enzimas fue lento, inicialmente. Las patentes de invención relacionadas con aplicación de enzimas del período 1890-1940 fueron recolectadas por Neidleman y se presentan en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Patentes sobre uso y preparación de enzimas del período 1890-1940.

Inventor	Año	Enzima	Título de la patente
J. Takamine	1894	Amilasas	Preparación de una enzima diastática
J. Takamine	1906	Amilasas	Procedimiento para la producción de sustancias diastáticas
O. Röhm	1908	Tripsina, esteapsina	Depilado de cuero
J. Takamine	1911	Amilasas	Enzima
J. Takamine	1911	Amilasas	Enzima amilolítica
L. Wallerstein	1911	Proteasa de malta	Procedimiento para la preparación de cerveza

Tabla 1.3. Continuación

L. Wallerstein	1911	Papaína	Método para el tratamiento de cerveza
L. Wallerstein	1911	Bromelaína	Método para el tratamiento de cerveza
L. Wallerstein	1911	Levaduras	Método para el tratamiento de cerveza
O. Röhm	1915	Pancreatinas	Procedimiento de lavado de limpieza
S. Frankel	1915	Amilasa	Manufactura de diastasa
I. Pollak	1915	Amilasas	Procedimiento para preparación de diastasa
I. Pollak	1915	Amilasas	Procedimiento para obtener extractos de malta
A. Bidin/J. Effront	1917	Amilasas	Procedimiento para tratar sustancias amiláceas
A. Boidin/J. Effront	1917	Amilasas	Procedimiento para obtener toxinas por oxidación de fermentos
V.G. Bloede	1918	Amilasa	Producción de goma de origen vegetal
H.S. Paine/J. Hamilton	1922	Invertasa	Preparación de chocolate para repostería
J. Takamine	1923	Amilasas, protease, lipase	Procedimiento para la preparación de enzimas
A. Boidin/J. Effront	1924	Amilasa, proteasa, lipasa	Tratamiento de de fibras y tejidos
Wallerstein Co.	1931	Amilasas, protease, lipase	Mejora en el proceso de depilado de cueros
M. Wallerstein	1932	Amilasas o papaínas	Método de fabricación de chocolate
R. Douglas	1932	Amilasas	Procedimiento para la preparación de pectina
L. Wallerstein	1933	Invertasa	Procedimiento de producción de invertasas
L. Wallerstein	1937	Proteasas	Proceso de estabilización de cerveza
L. Wallerstein	1937	Proteasas	Gomas
L. Wallerstein	1938	Proteasas	Desproteínización de goma

1.8.1.4. Desarrollo desde 1940

En la década del '40 varios laboratorios desarrollan la fermentación de la penicilina. En 1955 la producción de enzimas experimenta un crecimiento importante debido al aumento de ventas de una proteasa y una amilasa de origen bacteriano producidas por la empresa Novo Industri, hoy conocida como Novo Nordisk. Un parámetro para medir el crecimiento del uso de las enzimas es el volumen de producción de Novo Nordisk que en 1965 era de 1 millón de dólares, en 1969: 50 millones y en 1998 ascendió a 1600 millones de dólares. Existieron dos procesos industriales que le dieron un gran empuje a la producción de enzimas, el primero fue la producción de detergentes que contenían proteasas y el segundo la obtención de dextrosa a partir de un proceso catalizado por una glucoamilasa.

El factor que limitó la aplicación de las enzimas a nivel industrial fue la reutilización de estos biocatalizadores. Los primeros intentos de reutilizar las enzimas fueron descritos por Nelson a comienzos del siglo XX, eran enzimas adsorbidas en carbón vegetal que resultaron ser muy inestables.

Las aminoácidoacilasas y penicilin-G-acilasa fueron las primeras enzimas inmovilizadas que pudieron ser utilizadas en la escala de una planta piloto, las primeras fueron inmovilizadas por Tanabe Seiyako Co. de Japón, y la penicilin-G-acilasa por M.D. Lilly/University College de Londres, Beecham Pharmaceuticals de Inglaterra y G. Schmidt-Kastner de Baviera.

Aún hoy en día la enzima que presenta un volumen mayor de inmovilización es la glucosa isomerasa. Otras enzimas que presentan un volumen de inmovilización mayor a 1 ton/año son: aminoacilasa (Amano), hidantoinasa (Smith-Kline-Beecham), lactasa (Valio), lipasa (Novo Nordisk), penicilina-G-acilasa (Gist-Brocades, Smith-Kline-Beecham-Röhm) y penicilin-V-acilasa (Novo Nordisk/Gist-Brocades).

1.8.2. Algunos ejemplos de biocatálisis aplicada en la química básica

A continuación se presentarán algunos ejemplos de la aplicación de biocatalizadores en diferentes tipos de industrias y escalas de producción. En todos los casos la aplicación de los biocatalizadores en una o varias etapas del proceso aporta una mejora operativa y/o un aumento de la calidad del producto final que deriva indefectiblemente en una disminución en el costo global del proceso.

1.8.2.1. Uso de Nitrilohidratasas

1.8.2.1.1. Obtención de acrilamida a partir de acrilonitrilo

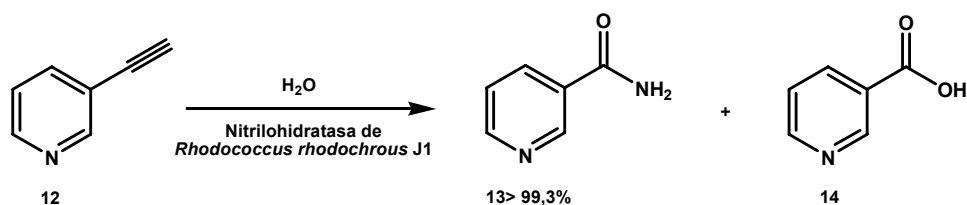
Para obtener una poliacrilamida de alto grado de polimerización es necesario un monómero muy puro, especialmente libre de metales y aniones. En el proceso químico convencional para obtener acrilamida a partir de acrilonitrilo se utiliza cobre como catalizador. Hideaki Yamada de la Universidad de Kyoto desarrolló un proceso de producción de acrilamida catalizado por células enteras de *Rhodococcus rhodochrous* J1.³¹ Las nitrilohidratasas presentes en las células enteras hidrolizan el acrilonitrilo para obtener acrilamida. Estas enzimas pertenecen a la familia de las hidrolasas que contienen Fe^{3+} o Co^{3+} y permiten obtener la amida, a diferencia de las nitrilasas que catalizan la adición de dos moléculas de agua al grupo nitrilo para formar el ácido carboxílico. Sin embargo en el caso de utilizar nitrilos aromáticos el producto obtenido es la amida correspondiente en presencia de la nitrilohidratasa.

En el caso de utilizar nitrilos líquidos como sustrato, la concentración de partida de nitrilo puede ser muy alta, frecuentemente mayor a 1000g/l.

El proceso biocatalítico para obtener acrilamida es utilizado por Nitta Chemical Corporation. La escala de producción es de 3000 ton/año, el reactor utilizado es del tipo semicontinuo y el rendimiento de la reacción es > 99.9%.

1.8.2.1.2. Obtención de nicotinamida a partir de 3-cianopiridina

En forma análoga a la hidrólisis catalizada por nitrilohidratasa de acrilonitrilo la 3-cianopiridina (**12**) puede sufrir una hidrólisis para dar nicotinamida (**13**) (Esquema 1.12).³²



Esquema 1.12. Procedimiento biocatalítico para obtener nicotinamida

La nicotinamida es conocida como la vitamina B₃ y utilizada como ingrediente en alimentos balanceados y como agente contra la pelagra en seres humanos. La firma Lonza (Visp, Suecia) obtuvo la licencia de la Universidad de Kyoto para utilizar la

nitrilohidratasa proveniente de la *Rhodococcus rhodochrous* J1. En el año 2000 Lonza comenzó a producir en China la nicotinamida a través del proceso biocatalítico con una capacidad de producción de 3400 ton/año. Para obtener la 3-cianopiridina se parte del 2-metil-1,5-diaminopentano (Dytek®), producto secundario en la obtención del adiponitrilo.

El proceso para producir nicotinamida presenta una configuración de tres reactores del tipo tanque con agitación. El sustrato es alimentado en forma continua con una concentración entre el 10 y 20% p/p, mientras que el biocatalizador ingresa al sistema en contracorriente.

El proceso enzimático permite obtener la nicotinamida con una selectividad >99,3% respecto al ácido nicotínico (**14**), mientras que en el proceso de hidrólisis química este ácido es obtenido con un rendimiento del 3 al 5%. El ácido nicotínico en estas concentraciones produce diarrea en los animales que consumen alimentos balanceados.

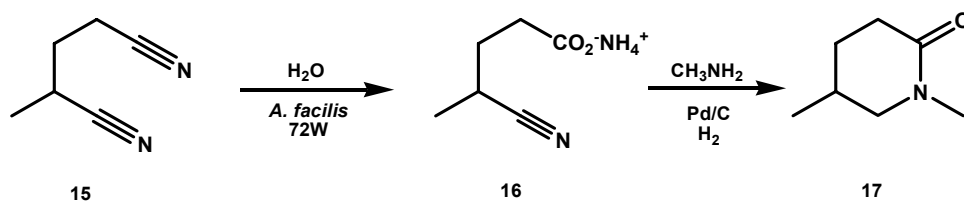
1.8.2.2. Uso de nitrilasas

1.8.2.2.1. Obtención de 1,5-Dimetil-2-piperidona (Xolvone™)

Dupont desarrolló un camino sintético para obtener la 1,5-dimetil-2-piperidona (1,5-DMPD), a través de un proceso catalizado por la enzima nitrilasa. El Xolvone™ es utilizado en la industria de la electrónica.³³

El proceso quimioenzimático ideado por Dupont (Esquema 1.13) presenta dos pasos: en el primer paso, el 2-metilglutaronitrilo (MGN) (**15**) es hidrolizado en presencia de células enteras de *Acidovorax facilis* 72W, obteniéndose la sal de amonio del ácido 4-cianopentanoico (A 4-CP) (**16**) con una selectividad > 98% y una conversión del 100%. En el segundo paso, luego de remover el biocatalizador, el 4-cianopentanoato de amonio es hidrogenado catalíticamente con Pd/C en presencia de metilamina para dar la 1,5-DMPD (**17**). Este proceso presenta dos ventajas respecto a metodología totalmente química:

- Aumenta el rendimiento del 1,5-DMPD respecto a 1,3-DMPD.
- Disminuye la cantidad de residuos producidos durante el proceso.



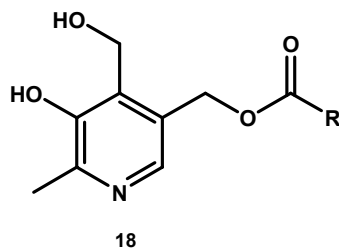
Esquema 1.13. Procedimiento quimioenzimático para la obtención de la 1,5-DMPD

1.8.2.3. Aplicación de lipasas en la industria cosmética

La firma Unichem Internacional de España produce a gran escala miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo y palmitato de 2-etilhexilo a través de un proceso catalizado por lipasas de *Rhizomucor meihei*. Estos ésteres de ácidos grasos son utilizados como emolientes en productos para el cuidado de la piel. La compañía Unichem Internacional considera que el uso del proceso biocatalítico es más costoso que el procedimiento de fabricación convencional, pero en contrapartida los ésteres obtenidos por el método enzimático demandan una menor purificación.

Otro ejemplo de la aplicación de lipasas en la industria cosmética es la producción de ésteres de ácidos y alcoholes de cadenas largas, desarrollado por Croda Universal Ltd.. Esta compañía utiliza como biocatalizador lipasa de *Candida rugosa*, e indica que el procedimiento biocatalítico es más costoso, pero los productos son de mayor calidad, haciendo que el aumento de costo sea despreciable.³⁴

En nuestro laboratorio desarrollamos un método catalizado por lipasas,³⁵ para obtener ésteres derivados de vitamina B₆ (**18**) que fue presentado como patente.³⁶ Estos compuestos son utilizados como agentes antioxidantes en preparaciones cosméticas, etc.

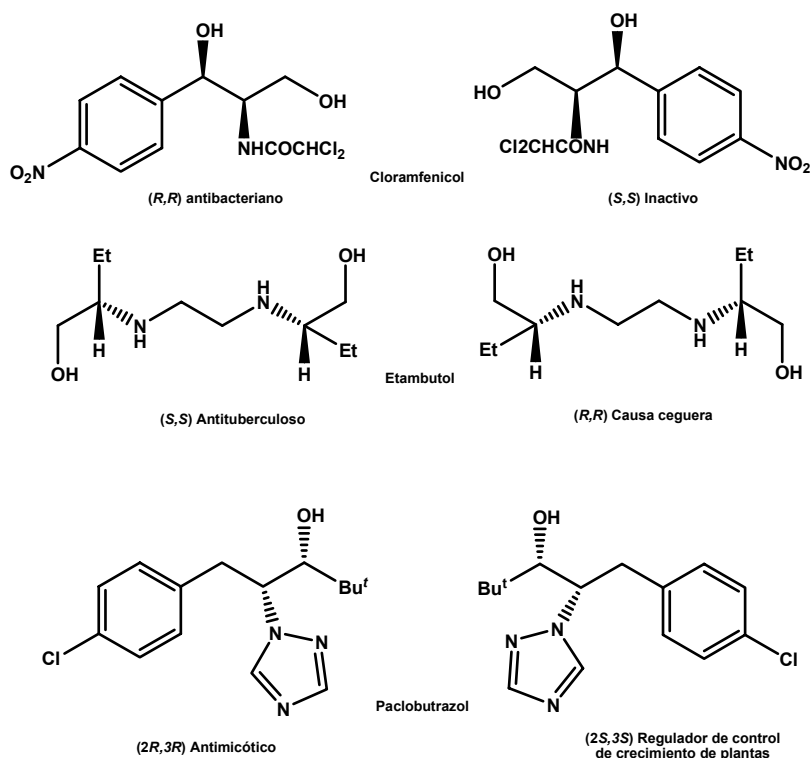


1.8.2.4. Biocatálisis aplicada en Química Fina

1.8.2.4.1. Quiralidad vs. propiedades y usos de las moléculas

La variación en la estereoquímica de una molécula dada puede producir importantes cambios en sus propiedades y esto afectar su aplicabilidad. Por lo tanto los productos quirales deben ser obtenidos con una alta pureza enantiomérica, no sólo porque la presencia del enantiómero no deseado puede reducir la actividad esperada sino que pueden producirse efectos secundarios adversos en el caso de un fármaco.

La Esquema 1.14 muestra ejemplos de cambios de propiedades de diferentes enantiómeros.



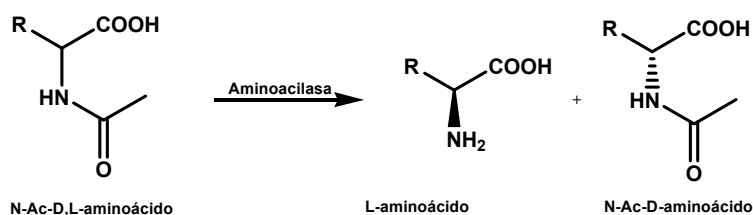
Esquema 1.14. Propiedades de diferentes enantiómeros

1.8.2.4.2. Aminoácidos enantioméricamente puros

Los aminoácidos enantioméricamente puros tienen una gran importancia debido a su uso en la producción de péptidos, aminoalcoholes y aminoaldehídos. Los L-aminoácidos son utilizados en la producción de suplementos dietarios. Por estas razones existen varios procesos biocatalíticos a gran escala para sintetizar estos productos. En las siguientes secciones presentaremos algunos ejemplos de los mismos.

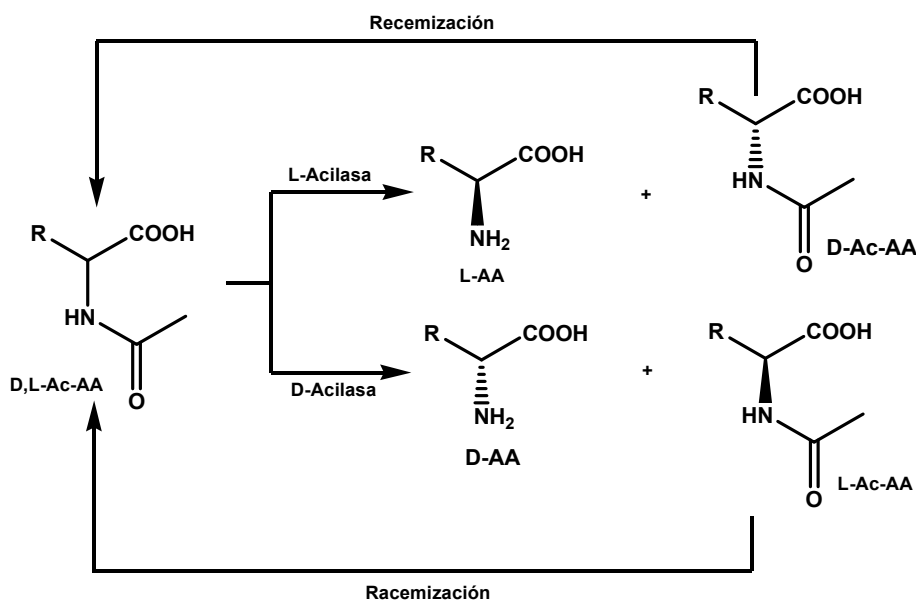
1.8.2.4.2.1. Proceso catalizado por Aminoacilasa de *Aspergillus oryzae*

El proceso enzimático para la producción de L-aminoácidos consiste en la resolución de los racematos de N-acetil-DL-aminoácidos.³⁷ Como productos se obtienen el N-acetil-D-aminoácido y el L-aminoácido (Esquema 1.15).



Esquema 1.15. Reacción catalizada por la aminoacilasa

La separación del L-aminoácido se logra a través del uso de una resina de intercambio iónico o por cristalización, mientras que el N-acetil-D-aminoácido se racemiza bajo condiciones drásticas o bien por el uso de una racemasa, obteniéndose finalmente un rendimiento del 45% del L-aminoácido (Esquema 1.16). Los D-aminoácidos pueden ser obtenidos por la hidrólisis química de los N-acetil-D-aminoácidos o a través del uso de acilasas D-selectivas.



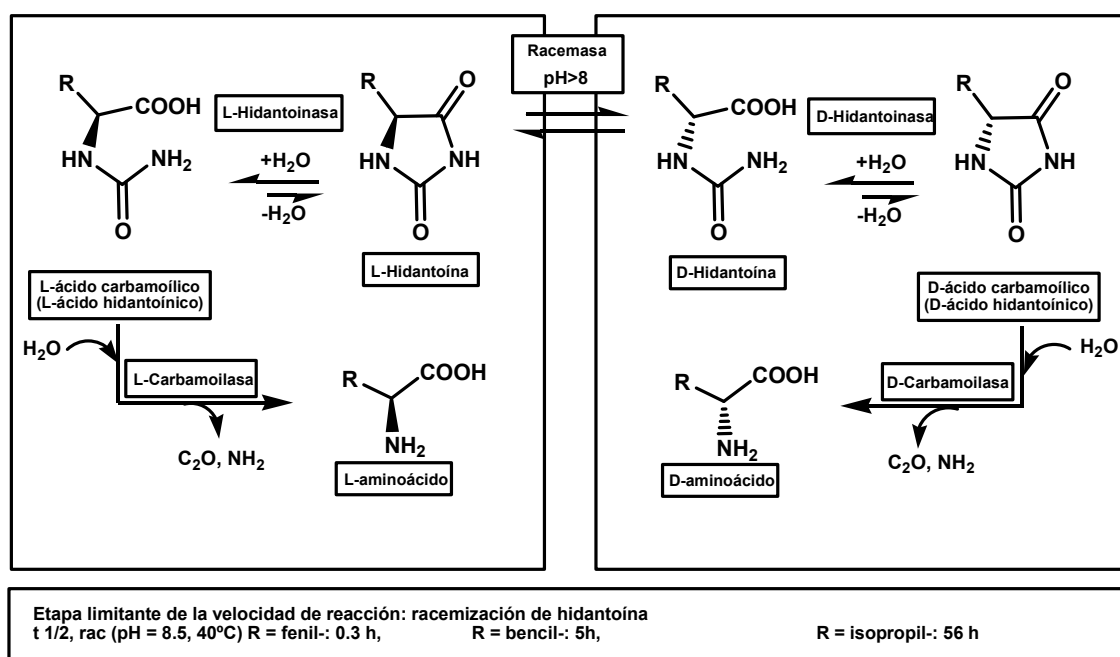
Esquema 1.16. Proceso catalizado por L-D-acilasa para obtener aminoácidos enantioméricamente puros. La racemización química se produce a pH = 3 y entre 80 a 100°C, mientras que la racemización enzimática se produce a pH = 7 y entre 25 a 40°C.

En 1969, Tanabe Seiyaku de Japón, comercializó el primer biorreactor utilizando una acilasa proveniente del hongo *Aspergillus oryzae*. En este reactor de lecho fijo se pudieron obtener L-metionina, L-valina y L-fenilalanina. En 1982, Degussa presentó el primer biorreactor de membrana, usando la L-aminoacilasa de *Aspergillus oryzae* en solución. Estos reactores de membrana actualmente permiten obtener L-metionina a gran escala y bajo costo.

1.8.2.4.2.2. *Uso combinado de Racemasa/Hidantoinasa/Carbamoilasa en la obtención de D-fenilglicina y D-hidroxifenilglicina*

La D-fenilglicina y D-hidroxifenilglicina son D-aminoácidos utilizados como bloques de construcción en la producción de antibióticos como ampicilina, cefalexina y amoxicilina. En los últimos treinta años se ha utilizado un proceso biocatalítico para la obtención de estos aminoácidos.³⁸ En la primera etapa de este proceso se produce la racemización

de la hidantoína sustituida catalizada por una racemasa, en la segunda etapa la hidantoína sustituida es hidrolizada en presencia de la hidantoinasa para dar como producto el ácido hidantoínico correspondiente, en la última etapa el ácido hidantoínico es hidrolizado enzimáticamente con una carbamoilasa para dar como producto final el aminoácido con la estereoquímica deseada y con rendimientos cercanos al 100% (Esquema 1.17).



Esquema 1.17. Proceso catalizado por el sistema de enzimas racemasa/hidantoinasa/ carbamoilasa para la obtención de L- o D-aminoácidos

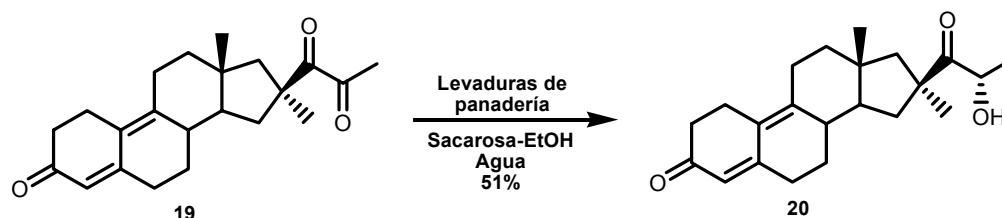
La razón por la cual se eligen derivados 5-monosustituidos de la hidantoína como material de partida en este proceso es que ellos racemizan con mayor facilidad que los acil- o amido-derivados de aminoácidos.

En contraste a lo que sucede con el procedimiento industrial para obtener D-fenilglicina y D-hidroxifenilglicina, el procedimiento industrial para obtener los L-aminoácidos no ha superado la escala de planta piloto debido a la dependencia de la selectividad de la L-hidantoinasa respecto a la identidad del sustituyente en la posición cinco de la hidantoína monosustituida usada como sustrato, y la manifiesta inestabilidad de las L-carbamoilasas utilizadas.

1.8.2.4.3. Dos aplicaciones de células enteras en la industria farmacéutica

1.8.2.4.3.1. Trimegestona

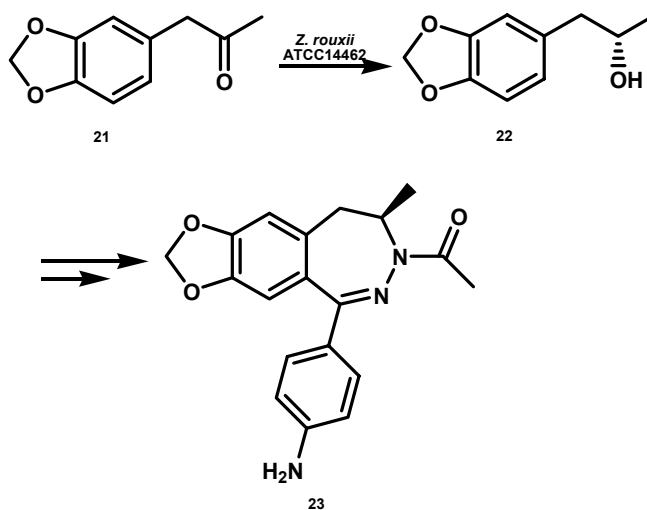
La trimegestona es un compuesto progestomimético desarrollado para el tratamiento de enfermedades postmenopáusicas. El paso crítico en el camino sintético utilizado para obtener trimegestona consiste en la reducción quimio-, regio- y estereoespecífica de la 3,20,21-tricetona **19** para obtener la trimegestona **20** que contiene el hidroxilo en la posición 21 con la configuración (S) (Esquema 1.18). En 1997 Crocq³⁹ reportó un procedimiento en el cual la etapa de reducción de **19** para obtener el hidroxiderivado **20** con un e.d. =99%, era catalizada por levaduras de panadería utilizando un medio de reacción acuoso. El uso de células enteras en la reducción de cetonas fue la primera aplicación rentable a nivel industrial del uso de este sistema como biocatalizador. .



Esquema 1.18. Reducción enantio- y regioselectiva para obtener trimegestona

1.8.2.4.3.2. LY300164

El fármaco LY300164 es una benzodiazepina desarrollada por Eli Lilly para el tratamiento contra la esclerosis lateral amiotrófica (Esquema 1.19).



Esquema 1.19. Ruta sintética abreviada para obtener el agente LY300164 ideada por Eli Lilly

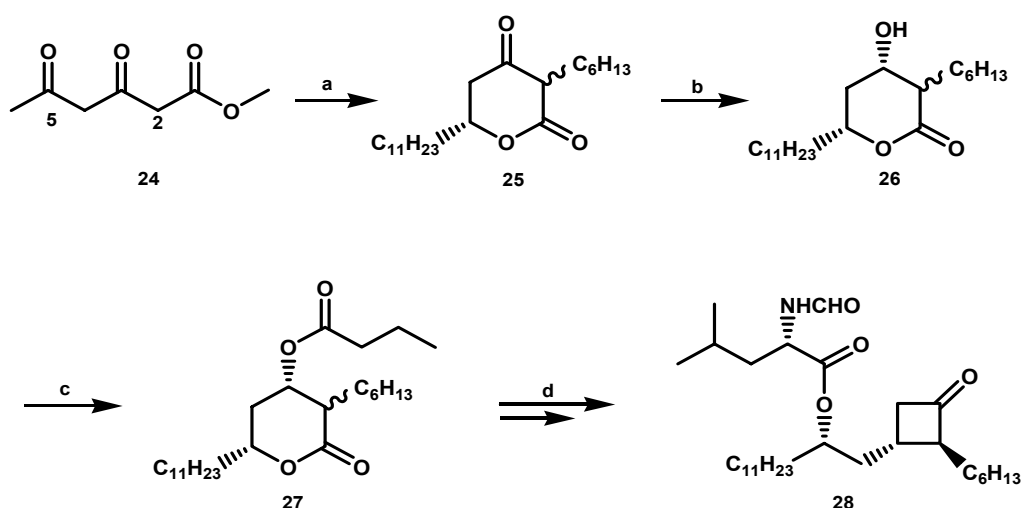
El paso clave en el camino sintético del LY300164 consiste en la reducción de la 3,4-metilendioxfenilacetona **21** catalizada por levaduras provenientes del hongo *Zygosaccharomyces rouxii* (ATCC14462).⁴⁰ El (S)-alcohol **22** producto de la reducción es obtenido con un rendimiento del 96% y un e.e.>99%. Este derivado con la estereoquímica deseada luego de varios pasos químicos se transforma en LY300164 **23**.

1.8.2.4.4. Tres aplicaciones de lipasas en la industria farmacéutica

1.8.2.4.4.1. Tetrahidrolipstatina

La tetrahidrolipstatina es un inhibidor de lipasas desarrollado y comercializado por Roche en tratamientos contra la obesidad.

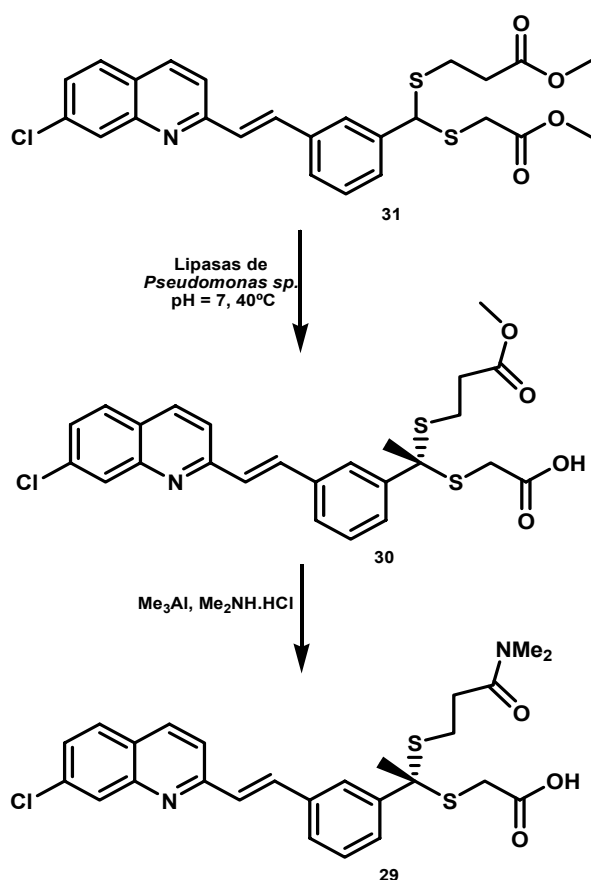
Para obtener este fármaco (Esquema 1.20) se utiliza como material de partida el 3,5-dicetohexadecanoato de metilo **24**. A través de la sustitución sobre la posición dos, la reducción del grupo carbonilo en la posición cinco y posterior lactonización (**a**) se obtiene el derivado **25**, el cual por una reacción de hidrogenación (**b**) se transforma en la mezcla de diastereoisómeros **26**, esta mezcla se resuelve a través de una reacción de esterificación enzimática (**c**) utilizando como donador de acilo el butirato de vinilo y como catalizador lipasas de PS-C, obteniéndose la (2S, 3S, 5R)-lactona derivada **27** con un rendimiento del 43 % y un e.e. > 99%. Este derivado con la estereoquímica deseada luego de varios pasos químicos (**d**) se transforma en la tetrahidrolipstatina **28**.⁴¹



Esquema 1.20. Ruta sintética abreviada para obtener el inhibidor de lipasas tetrahidrolipstatina

1.8.2.4.4.2. MK-0571, antagonista del receptor LTD₄

El receptor LTD₄ participa en la respuesta inflamatoria observada en pacientes con asma. Merck desarrolló un antagonista del receptor LTD₄, el MK-0571 **29**. Este compuesto presenta en su estructura dos grupos tioetilos prácticamente equivalentes. Uno de los pasos claves en la síntesis de esta molécula es introducir en una de las cadenas de tioetilo un grupo carboxílico y en la otra cadena el grupo dimetilamida. Zaks⁴² (Esquema 1.21) logró obtener el hemiéster metílico **30** con la estereoquímica deseada a partir de la hidrólisis enantioselectiva catalizada por lipasas de *Pseudomonas sp.* del bis-β-tiopropionato de dimetilo **31**. Luego el hemiéster a través de una etapa química es transformado en MK-0571.



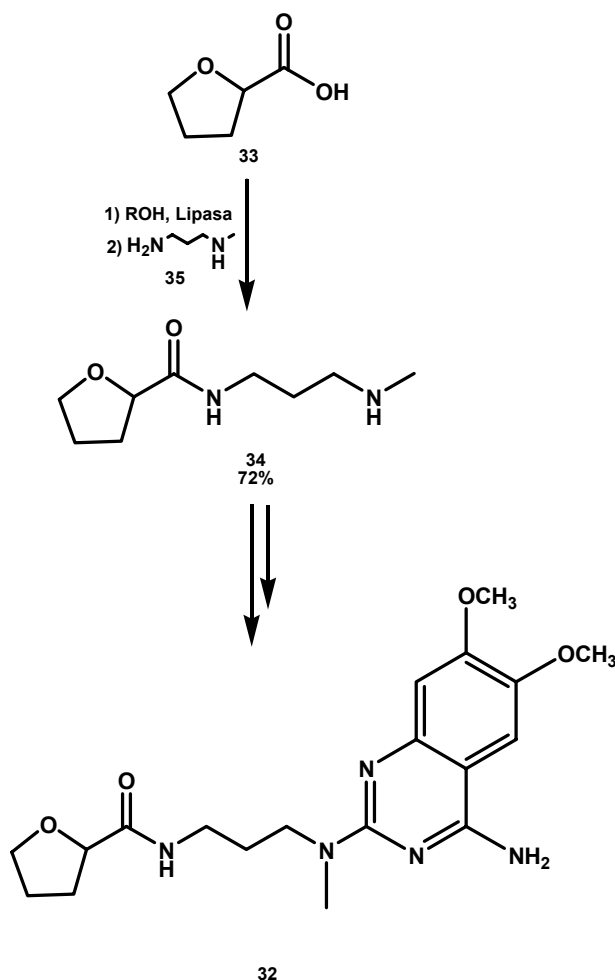
Esquema 1.21. Procedimiento quimienzimático para obtener el agente MK-0571

1.8.2.4.4.3. Alfuzosin

El alfuzosin **32** es un derivado de la quinazolina que actúa como antagonista del receptor-α₁ responsable de los síntomas asociados con la hipertrofia prostática benigna. En la mayoría de de las rutas sintéticas utilizadas para obtener el alfuzosin, podemos encontrar a la tetrahidro-N-[3-(metilamino)-propil]-2-furancarboxamida **34** como intermediario para obtener **32**. La preparación del compuesto a partir del ácido

2-tetrahidrofuroico **33** es muy difícil, involucra el uso de reactivos muy tóxicos y sensibles al aire y condiciones drásticas de reacción.⁴³

En vista de los inconvenientes existentes, desarrollamos en nuestro laboratorio un procedimiento catalizado por lipasas que hizo posible obtener el intermediario **34** con buen rendimiento y en condiciones suaves de reacción (Esquema 1.22).^{44a}



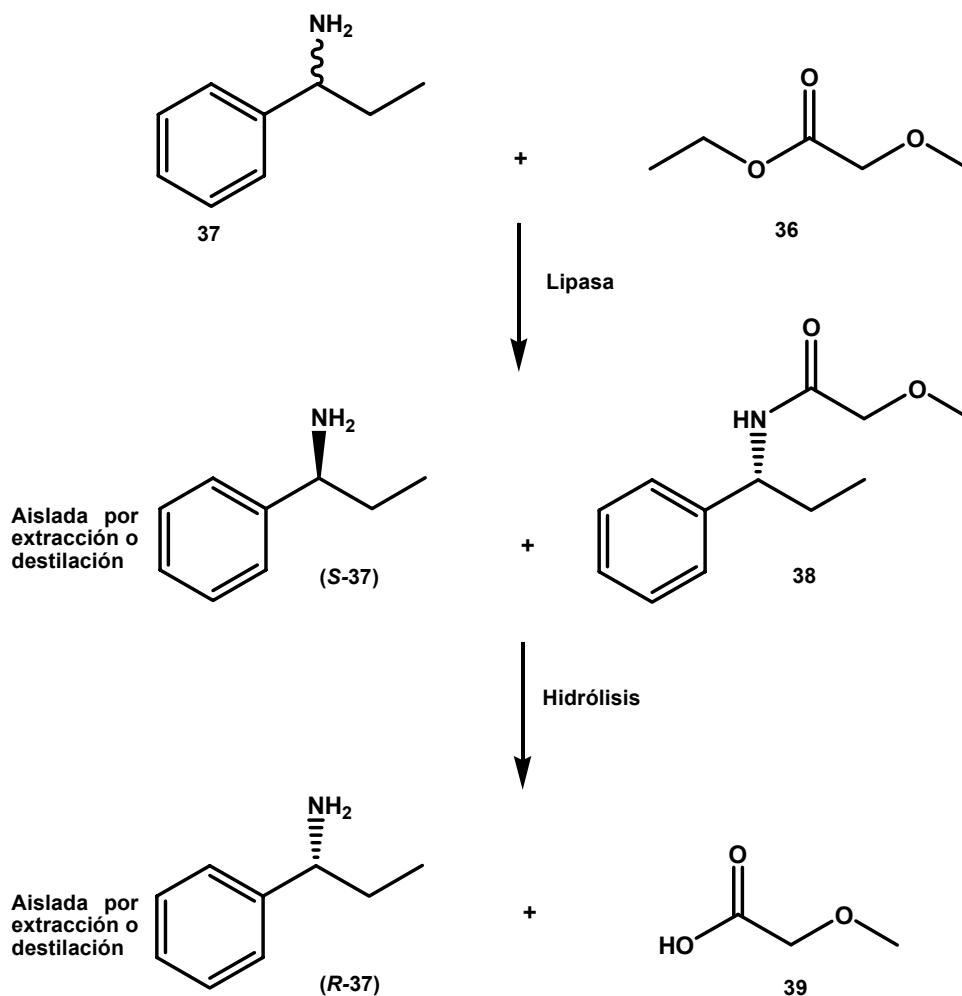
Esquema 1.22. Procedimiento enzimático de una etapa para obtener el intermediario **34**

El procedimiento enzimático de una etapa, que fue patentado,^{44b} involucró la esterificación del ácido **33** en presencia de etanol o isopropanol. Una vez alcanzada la conversión completa del ácido en éster se agregó *in situ* la N-metil-1,3-propanodiamina **35**. Luego de 72 horas de reacción se obtuvo la amida **34** con un 72% de rendimiento trabajando con lipasa de *Candida antarctica* como catalizador.

1.8.2.4.5. *Uso de lipasas para la obtención de aminas enantioméricamente puras*

Las aminas racémicas pueden ser resueltas eficientemente a través del tratamiento con un agente acilante como el metoxiacetato de etilo (**36**) y lipasa de *Burkholderia plantarii*

como biocatalizador (Esquema 1.23).⁴⁵ Cuando la amina racémica es la fenetilamina (**37**) se obtienen como productos de reacción la (*R*)-feniletil metoxiacetamida (**38**) y la (*S*)-feniletilamina (**S-37**) con un 43 y 45 % de rendimiento respectivamente, y un e.e. > 93% para ambos productos. Luego a través de una reacción de hidrólisis de **38** se recupera la amina (**R-37**) y el ácido metoxiacético (**39**). Esta tecnología es utilizada por BASF actualmente con una escala de producción de 1000 toneladas por año.



Esquema 1.23. Proceso diseñado por BASF para la resolución de aminas racémicas catalizada por lipasas

Bibliografía

1. A.S. Bommarius, B.R. Riebel, *Biocatalysis Fundamentals and Applications*, Wiley-VCH Verlag Gmbh & Co.: Weinheim, 2004.
2. A.J.J. Straathof, P. Adlercreutz, *Applied Biocatalysis*, Sec. Ed., Harwood Academic Publisher: Amsterdam, 2000.
3. (<http://www.epa.gov/>)
4. P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, 2000.
5. P.T Anastas, J.B. Zimmerman, *Environ. Sci. Technol*, 37 (2003) 95.
6. A. Sym, *Biochem. J.*, 30 (1936) 609.
7. a) A. Zaks y A.M. Klibanov, *Science*, 224 (1984) 1249. b) G. Kirchner, M.P. Scollar y A.M. Klibanov, *J.Am.Chem.Soc*, 107 (1985) 7072. c) A. Zaks, A.M. Klibanov, *Prod.Natl.Acad.Sci.USA*, 82 (1985) 3192. d) A.M. Klibanov, *Chemtech*, 16 (1986) 354.
8. a) I.D. Kuntz, y W. Kauzmann, *Adv.Protein.Chem.*, 28 (1974) 239. b) J.A. Rupley y G. Careri, *Adv.Protein.Chem.*, 41 (1991) 37.
9. K. Griebenow y A.M. Klibanov, *J.Am.Chem.Soc.*, 47 (1996) 11695.
10. G. Correa, G. Ottolina, S. Riva, *Trends Biotechnol.*, 13 (1995) 63.
11. Y.-M. Young, S.H. Lee, Ch.-S. Cheong. J.-K. Park, *Enzyme and Microb. Technol.*, 35 (2004) 574.
12. D.A. Mac Mamus y E.N. Vulfson, *Enzyme and Microb. Technol.*, 20 (1997) 225.
13. C. Elbert, L. Gardossi, P. Linda, R. Vesnaver, *Tetrahedron*, 52 (1996) 4867.
14. A. Liljeblad, L. T. Kanerva, *Tetrahedron*, 62 (2006) 5831.
15. a) K.E. Jaeger, S. Ransac, B.W. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel, O. Misset, O., *FEMS Microbiol. Rev.*, 15 (1994) 15 29; b) S. Wohlfahrt, K.E. Jaeger, *Bioengineering*, 9 (1993) 39.
16. E.J Gilbert, *Enzyme Microb. Technol.*, 15 (1993) 634;
17. F. Carriere, S. Bezzine, R. Verger, *J. Mol. Catal. B*, 3 (1997) (special issue devoted to "Microbial Lipases in the Biocatalysis").
18. L. Sarda, P. Desnuelle, *Biochim.Biophys.Acta*, 30 (1958) 513.
19. L. Brady, A.M Brzozowski, Z.S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J.P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Huge-Jensen, L. Norskov, *Nature*, 22 (1990) 767.
20. N.E.M. Noble, A. Cleasby, L.N. Johnson, L.G.J. Frenken, M.R. Egmond, *FEBS Lett.*, 331 (1993) 123.
21. J.Uppenberg, M.T.Patkar, S.Hansen, A.Jones, *Structure*, 2 (1994) 293.
22. A. Hjorth, Carriere, F.C. Cudrey, H. Woldike, E. Boel, D.M. Lawson, F. Ferrato, C. Cambillau, G.G. Dodson, L. Thim, R. Verger, *Biochemistry*, 32 (1993) 4702.
23. J. Pleiss. M. Fischer, R.D. Schmid, *Chem. and Phys. of Lipids*, 93 (1998) 67.
24. M. Berger, M.P. Schneider, *Biotechnol. Lett.*, 13 (1991) 641.
25. a) A.D. Cuiper, M.L.C.E. Kouwijzer, P.D.J. Grootenhius, R.M. Kellogg, B.L. Feringa, *J. Org. Chem.*, 64 (1999) 9529; b) R.T. Otto, H. Scheib, U.T. Bornscheuer, J. Pleiss, C. Sydlatk, R.D.

- Schmid, J. *Mol. Catal. B*, 8 (2000) 201; c) T.K. Venkatachalam, P. Samuel, G. Li, S. Qazi, C. Mao, S. Pendergrass, F.M. Uckun, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 3371; d) L.F. Solares, I Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Tetrahedron*, 62 (2006) 3284.
26. R.J. Kazlauskas, *Current Opinion in Chemical Biology*, 9 (2005) 195.
27. C. Branneby, P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 874.
28. O. Torre, I. Alfonso y V. Gotor, *Chem Commun.*, (2004) 1725.
29. a) A. Inoue, K. Horikoshi, *Nature* 338 (1989) 264. b) J.Y. Lee, Y.B. Choi, H.S. Kim, *Biotechnol. Prog.*, 9 (1993) 46. c) M.G. Wubbolts, P. Reuvekamp, B. Witholt, *Enzyme Microb. Technol.*, 16 (1994) 608.
30. Ref. 2, págs.153-207.
31. Ref. 1, págs. 160-161.
32. Ref. 1, pág.162.
33. Ref. 1, pág.163.
34. F. Hasan, A.A. Shah, A. Hamed, *Enzyme and Microb. Technol.*, 39 (2000) 235.
35. A. Baldessari, C.P. Mangone, E.G. Gros, *Helvetica Chimica Acta*, 81 (1998) 2407.
36. A. Baldessari, C. P. Mangone. Esteres derivados de vitamina B₆, procedimiento enzimático para su preparación y sus formulaciones. *Boletín de Marcas y Patentes, INPI*, fasc. 318, AR025550A1, 4 diciembre 2002.
37. Ref. 1, págs. 170-174.
38. Ref. 1, págs. 174-177.
39. V. Croq, C. Masson, J. Winter, C. Richard, G. Lemaitre, J. Lenay, M. Vivat, *Org. Proc. Res. Dev.*, 1 (1997) 2.
40. Ref. 1, págs. 404-405.
41. Ref. 1, págs. 407-408.
42. A. Zaks, D.R. Dodds, *Drug Discovery Today*, 21 (1997) 513.
43. a) P.M. Manoury, J.L. Binet, A.P. Dumas, F. Lefèbvre-Borg, I.Cavero, *J. Med. Chem.* 29 (1986) 19; b) P. M. Manoury, (Synthelabo S.A.)US 4,315,007, 09 Feb 1982.
44. a) A. Baldessari, C.P. Mangone, *J. of Molecular Catal. B: Enzymatic.* , 11 (2001)335; b) A. Baldessari, E. G. Gros. Procedimiento para la preparación enzimática de amidas sustituidas a partir de ácidos carboxílicos en un solo paso. AR002219B1, 1 abril 2004.
45. F. Balkenhohl, K. Ditrach, B. Hauer, W. Ladner, *J. Prakt. Chem*, 339 (1997) 381.

Capítulo II

Objetivos

2. OBJETIVOS

Como se discutió previamente, la característica más importante que presentan las enzimas es su elevada selectividad química. Este comportamiento permite simplificar complejos esquemas de síntesis lo que convierte a las reacciones catalizadas por enzimas en una reconocida alternativa a la síntesis orgánica tradicional.

La selectividad que confiere a las reacciones la catálisis enzimática puede dividirse en tres categorías:

1. Quimioselectividad: se refiere a la habilidad para actuar sobre un grupo funcional selectivamente en presencia de otro grupo funcional diferente pero de similar reactividad química.
2. Regioselectividad: se relaciona con la capacidad para reaccionar con un grupo funcional selectivamente en presencia de otros grupos funcionales iguales presentes en la molécula.
3. Estereoselectividad: se corresponde con la habilidad para actuar selectivamente sobre sólo un enantiómero o diastereoisómero presente en una mezcla.

Otra característica importante de esta metodología es que requiere condiciones de reacción muy suaves. Este factor es muy importante cuando se desean realizar transformaciones en moléculas químicamente lábiles, en donde normalmente los métodos químicos tradicionales involucran condiciones de reacción más drásticas.

Considerando estas ventajas, el objetivo central del presente trabajo consistió en estudiar distintos tipos de reacciones catalizadas por entidades biológicas (enzimas o células enteras) con la finalidad de encontrar en esta metodología una alternativa más favorable para llevar a cabo transformaciones químicas sobre distintos tipos de compuestos orgánicos.

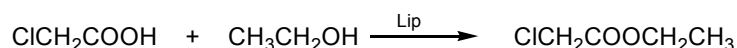
Dentro de este objetivo general, el trabajo se dividirá en cinco partes:

- 1) Síntesis quimioenzimática de cloruro de lapirio.
- 2) Síntesis enzimática regioselectiva de ésteres de ácidos grasos de 17 β - estradiol
- 3) Síntesis enzimática quimioselectiva de N-(hidroxalquil)-acrilamidas.
- 4) Síntesis de poliacrilamidas modificadas hidrofóbicamente.
- 5) Lipasas y microorganismos como catalizadores en esterificación, reducción y descarboxilación de α -cetoácidos.

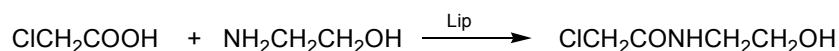
2.1. SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE CLORURO DE LAPIRIO

En la primera parte de esta investigación se proyecta estudiar la síntesis quimioenzimática de cloruro de lapirio a través de un camino sintético formado por cuatro etapas.

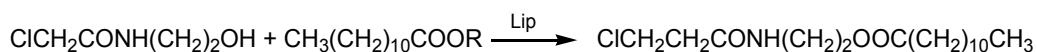
1) El primer paso involucrará la biotransformación del ácido carboxílico en el correspondiente éster etílico según se esquematiza a continuación:



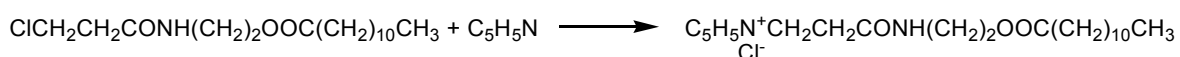
2) En un segundo paso por agregado de la amina la lipasa catalizará la aminólisis del éster:



3) La tercera etapa consistirá en la reacción de esterificación del ácido láurico (R: H) o la transesterificación del laurato de etilo (R: etilo) en presencia de la hidroxiamida obtenida en la etapa anterior y la enzima:



4) La cuarta etapa es el único paso químico, en el cual se produciría la sustitución nucleofílica en presencia de piridina según el siguiente esquema:



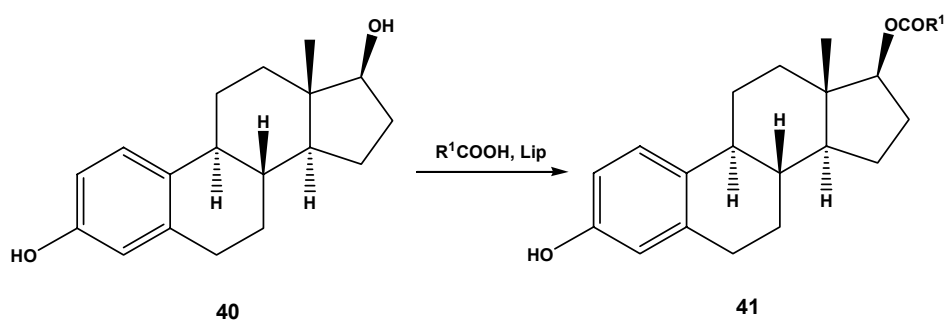
Este estudio se proseguirá con el análisis de las etapas enzimáticas en mayor profundidad, estudiando aspectos tales como las relaciones enzima/sustrato y agente acilante/nucleófilo, efecto de la adición de tamices moleculares como agente deshidratante del medio de reacción en la tercera etapa, quimioselectividad, temperatura, etc.

2.2. SÍNTESIS ENZIMÁTICA REGIOSELECTIVA DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS DE 3,17β-ESTRADIOL

Los monoésteres de 3,17β -estradiol (**40**) en la posición 17 son esteroides de importancia farmacológica. En general, son utilizados en combinación con otros esteroides como

agentes terapéuticos para la disminución de los síntomas relacionados con la menopausia y la prevención de lesiones óseas provocadas por la osteoporosis, ataques cardíacos y cáncer de próstata.

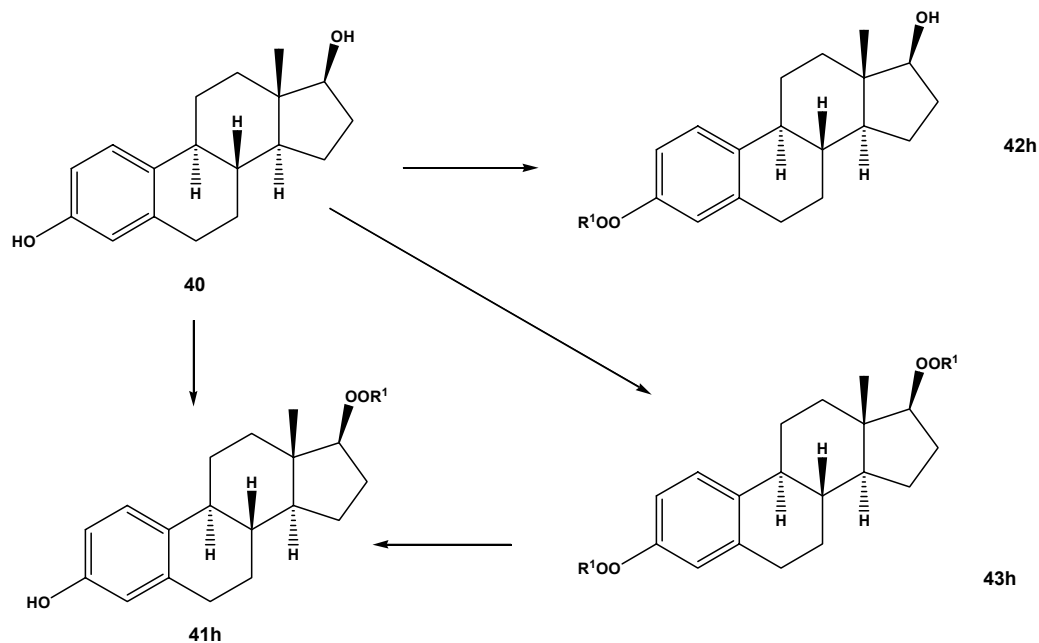
En esta parte del trabajo de tesis se propondrá aplicar lipasas sobre compuestos esteroideos, a través de dos estrategias enzimáticas para la obtención de monoésteres de 3,17 β -estradiol en la posición 17 (**41**) (Esquema 2.1). Se efectuarán reacciones de acilación de **40** (Esquema 2.1) con ácidos grasos de diferente longitud de cadena y grado de saturación, y alcoholísis de productos de diacilación (Esquema 2.2) .



Producto	R ¹	Agente acilante
41a	-C ₄ H ₇	Acido valérico
41b	-C ₅ H ₁₁	Acido caproico
41c	-C ₉ H ₁₇	Acido capricho
41d	-C ₁₁ H ₂₁	Acido láurico
41e	-C ₁₃ H ₂₅	Acido mirístico
41f	-C ₁₅ H ₂₉	Acido palmítico
41g	-C ₁₇ H ₃₃	Acido esteárico
41h	-C ₁₇ H ₃₁ - <i>cis</i>	Acido oleico
41i	-C ₁₇ H ₃₁ - <i>trans</i>	Acido eláidico
41j	-C ₁₇ H ₂₉ - <i>cis,cis</i>	Acido linoleico
41k	-C ₁₇ H ₂₇ - <i>cis,cis,cis</i>	Acido linolénico

Esquema 2.1

Para aplicar esta segunda estrategia en la preparación del derivado monooleilado (Esquema 2.2), previamente se obtendrá químicamente una mezcla del derivado oleilado en la posición 3 (**42h**) y el dioleato de estradiol (**43h**). Este último, una vez purificado, será utilizado como material de partida en las reacciones de alcoholísis



Esquema 2.2

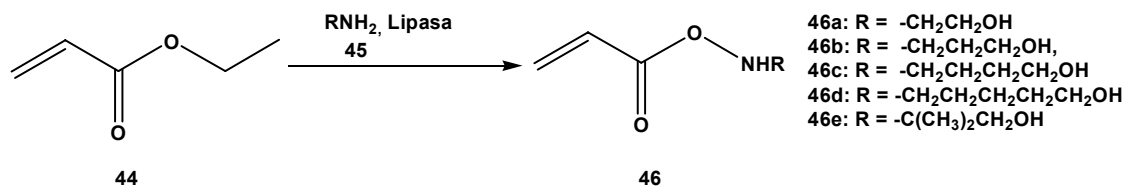
Se analizará la influencia de distintos parámetros involucrados en las dos estrategias planteadas, por ejemplo:

- Tipo de enzima utilizada para la biocatálisis: lipasa, en estado nativo o inmovilizada.
- Solvente: en el caso de las reacciones catalizadas por enzimas fue notable la influencia de del solvente sobre la velocidad y el rendimiento de las reacciones.
- Reactivo: relación entre la enzima y el agente acilante, tipo de agente acilante.
- Temperatura, relación enzima-sustrato, etc.

2.3. SÍNTESIS QUIMIOSELECTIVA DE N-(HIDROXIALQUIL)-ACRILAMIDAS CATALIZADA POR LIPASAS

En tercer lugar, se investigará la aminólisis del acrilato de etilo (**44**) en presencia de diferentes alcanolaminas (**45**) catalizada por lipasas con el objeto de obtener N-(hidroxialquil)-acrilamidas (**46**) que puedan ser utilizadas como monómeros en la producción de nuevas poli(N-(hidroxialquil)-acrilamidas) que dan origen a matrices hidrofílicas empleadas en electroforesis capilar (CE) para la secuenciación de ADN. Dentro de estas N-(hidroxialquil)-acrilamidas se puede encontrar la N-(hidroxietyl)-acrilamida (HEAA) (**46a**) conocida comercialmente como Duramide®.

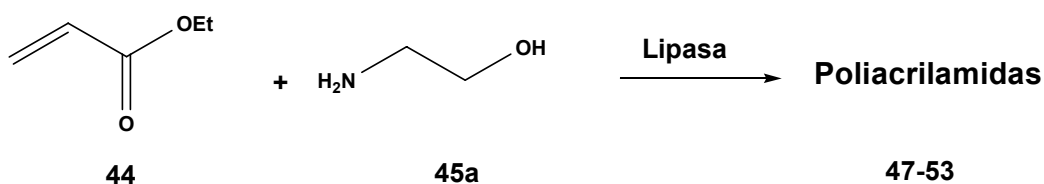
En nuestra estrategia enzimática (Esquema 2.3) se estudiarán algunos parámetros importantes para obtener la mayor quimioselectividad y el mejor rendimiento final. Entre estos parámetros se pueden considerar: relación enzima/sustrato, solvente, tipo de enzima, temperatura, tiempo de reacción, el efecto de inhibidores de radicales, etc.



Esquema 2.3

2.4. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE POLIACRILAMIDAS MODIFICADAS HIDROFÓBICAMENTE

El objetivo de la cuarta parte de esta tesis será estudiar las reacciones de polimerización, aminólisis e hidrólisis de acrilato de etilo (**44**) catalizadas por lipasas en presencia de etanolamina (**45a**) (Esquema 2.4). También se analizarán las características de los productos obtenidos en función de la variación de los diferentes parámetros como: temperatura, solvente y relaciones enzima/sustrato y acrilato de etilo/etanolamina.

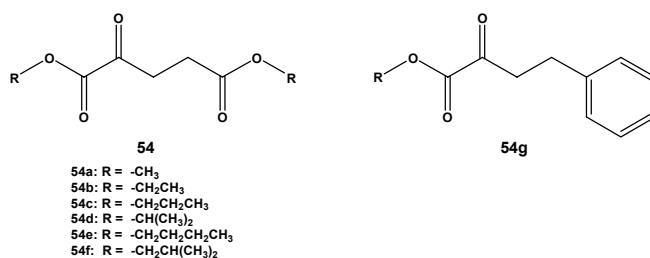


Esquema 2.4

2.5 LIPASAS Y MICROORGANISMOS COMO CATALIZADORES EN ESTERIFICACIÓN, REDUCCIÓN Y DESCARBOXILACIÓN DE α -CETOÁCIDOS

Para concluir con el desarrollo experimental de este trabajo de tesis se propone extender el empleo de biocatalizadores a otro tipo de reacciones que permitan generar asimetría en la molécula. En este nuevo enfoque se proyecta llevar a cabo reducciones quimio- y estereoselectivas de grupos carbonilo de α -cetoglutaratos de alquilo (**54 a-f**) utilizando como fuente biotecnológica directamente las células enteras provenientes de organismos bacterianos, levaduras, hongos, etc.

En primer lugar se proyecta estudiar el comportamiento del hongo *Mucor rouxii* en la reducción de compuestos carbonílicos polifuncionales como los siguientes α -cetoésteres (Esquema 2.5).



Esquema 2.5

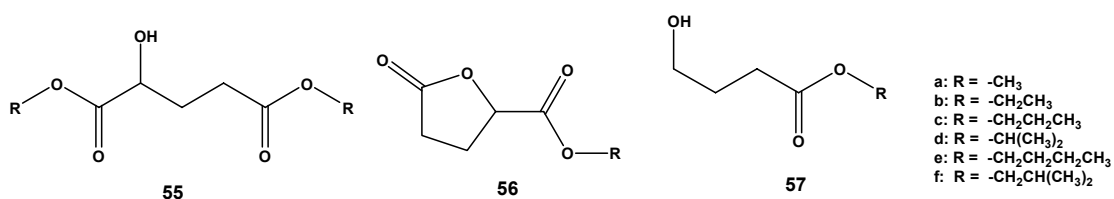
Se comenzará el estudio con el α -cetoglutarato de dietilo (**54b**) con el objeto de determinar las condiciones óptimas de reacción. Se propone analizar la influencia de los distintos parámetros involucrados en la reacción, como por ejemplo:

-Morfología del microorganismo: *Mucor rouxii* es un hongo saprófito y dimórfico cuyas esporas pueden desarrollarse como micelio cenocítico o como levadura.

-Solvente: Se ensayarán las reacciones en diferentes solventes orgánicos formando sistemas mono- o bifásicos en agua estéril y también utilizando agua destilada como único solvente.

-Temperatura, modo de agitación, relación sustrato/biomasa, etc.

En los casos que se utilicen como reactivos los sustratos **54a-f** se espera obtener los hidroxiésteres **55**, los productos de lactonización **56** o bien los productos de descarboxilación y reducción **57**, variando las condiciones de reacción y las características estructurales de los sustratos.



En segundo lugar se repetirá la misma rutina de trabajo pero esta vez utilizando como biocatalizador levadura de panadería y como sustratos los α -cetoésteres **54a-f**.

Del mismo modo que en el caso anterior se analizarán los parámetros involucrados en la reacción.

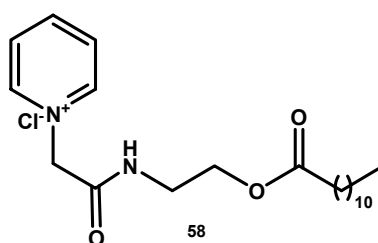
Capítulo III

Resultados y discusión

3. SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE CLORURO DE LAPIRIO

3.1. INTRODUCCIÓN

El cloruro de 1-[(2-dodecanoiloxietilcarbamoil)metil]piridinio **58** es una aciloxialcanolamida conocida en la industria química como cloruro de lapirio.

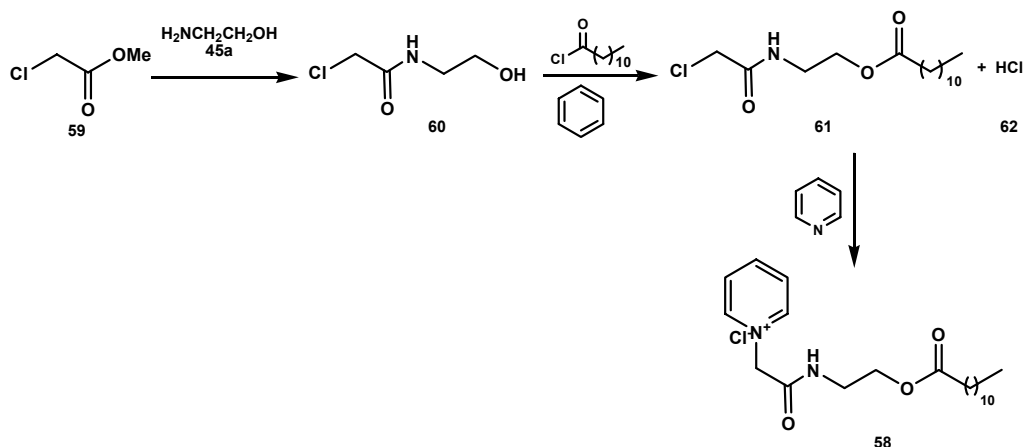


Este compuesto se utiliza como desinfectante y antiséptico en solución acuosa al 5-10%. Presenta numerosas aplicaciones, como por ejemplo:

- Asepsia de indumentaria y recipientes utilizados por lactantes.
- Antimicrobiano epidérmico o sobre heridas abiertas.
- Antiséptico sobre dermatitis y asepsia de quemaduras y zonas expuestas a intervención quirúrgica.¹
- Debido a su actividad surfactante es ingrediente en productos de cuidado personal como acondicionadores capilares y dérmicos,² pastas dentales y enjuagues bucales.^{3,4}
- Ingrediente en formulaciones de inhibidores de corrosión⁵ y productos para el tratamiento de aguas de residuos domésticos.⁶

Los antecedentes relacionados con la preparación de las aciloxialcanolamidas son escasos. En general se refieren sólo a sus aplicaciones y están publicados bajo la forma de patentes.

La patente de A. K. Epstein y B. R. Harris,⁷ describe un procedimiento para la fabricación de este tipo de compuestos (Esquema 3.1).



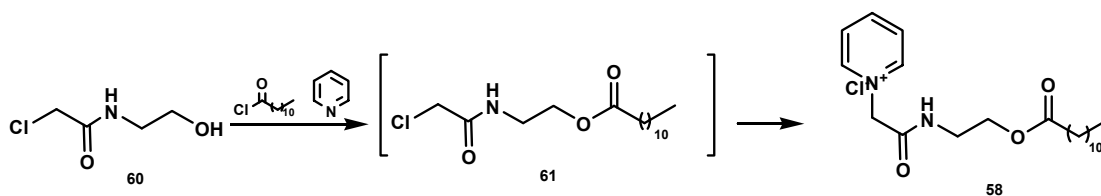
Esquema 3.1. Ruta sintética descrita por A.K. Epstein y B.R. Harris para la preparación de cloruro de lapirio

Por tratamiento del cloroacetato de metilo **59** con etanolamina **45a** se obtuvo la N-(hidroxietyl)-cloroacetamida **60** que por reacción con cloruro de lauroilo dio lugar a la formación de **61**. Finalmente por tratamiento de **61** con piridina se obtiene el cloruro de lapirio **58**.

La patente describe un camino frecuentemente desarrollado en numerosos libros, patentes y publicaciones periódicas para la síntesis de amidas en las que se activa la función ácido a través de la formación de un cloruro de ácido o anhídrido mixto⁸.

Esta metodología presenta la desventaja de que la formación del éster intermediario **61** está acompañada por la liberación gases corrosivos e irritantes de cloruro de hidrógeno **62**. Además se generan subproductos derivados de la piridina, lo que dificulta su purificación.

Otra patente que describe la síntesis de este tipo de compuestos es la correspondiente a J.E. Gordon y R. A. Ralston⁹ (Esquema 3.2) con un esquema similar al descrito por A.K. Epstein y B.R. Harris.

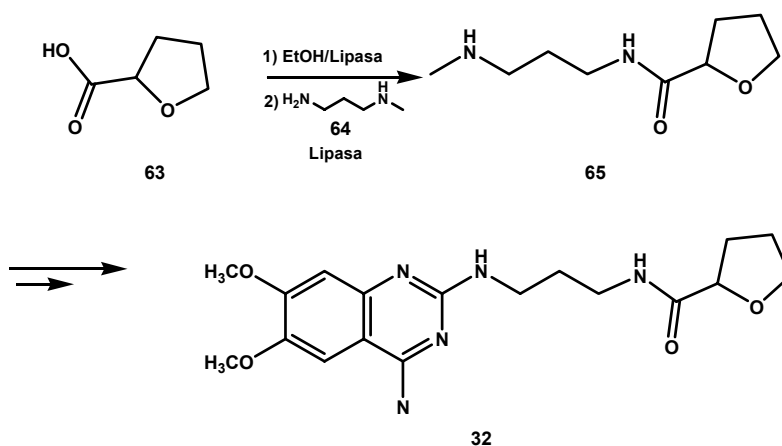


Esquema 3.2. Síntesis del cloruro de lapirio descrita por J.E. Gordon y R.A. Ralston

En este procedimiento se elimina el uso de benceno y la generación de gases de HCl, pero utiliza reactivos tóxicos y condiciones drásticas de reacción.

En literatura se describen procedimientos químicos¹⁰ y enzimáticos para obtener amidas sustituidas integrantes de principios activos farmacéuticos. Un ejemplo es el caso del

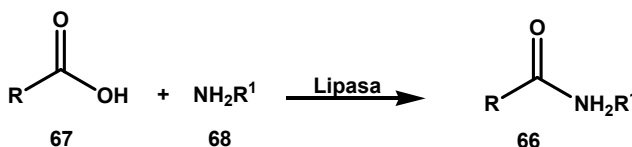
Alfuzosin (**32**). Es un derivado de quinazolina que actúa en forma competitiva y selectiva como un potente antagonista de los receptores α_1 -adrenérgicos que intervienen en la contracción de la próstata, la cápsula prostática, la uretra proximal y el músculo base de la vejiga reduciendo los síntomas asociados a la hipertrofia prostática benigna. En nuestro laboratorio se ha desarrollado un procedimiento de un paso catalizado por lipasas en el cual se obtiene en primer lugar el éster etílico del ácido tetrahidro-2-furancarboxílico (**63**) y por agregado *in situ* de la *N*-3-(metilamino)-1-propilamina (**64**) se obtiene la tetrahidro-*N*-[3-(metilamino)-propil]-2-furancarboxamida (**65**) utilizada como intermediario en la síntesis de Alfuzosin (Esquema 3.3).¹¹



Esquema 3.3

También se han descrito métodos químicos y enzimáticos para la preparación de amidas derivadas de ácidos grasos con propiedades emulsificantes con aplicaciones cosméticas y farmacéuticas.¹²

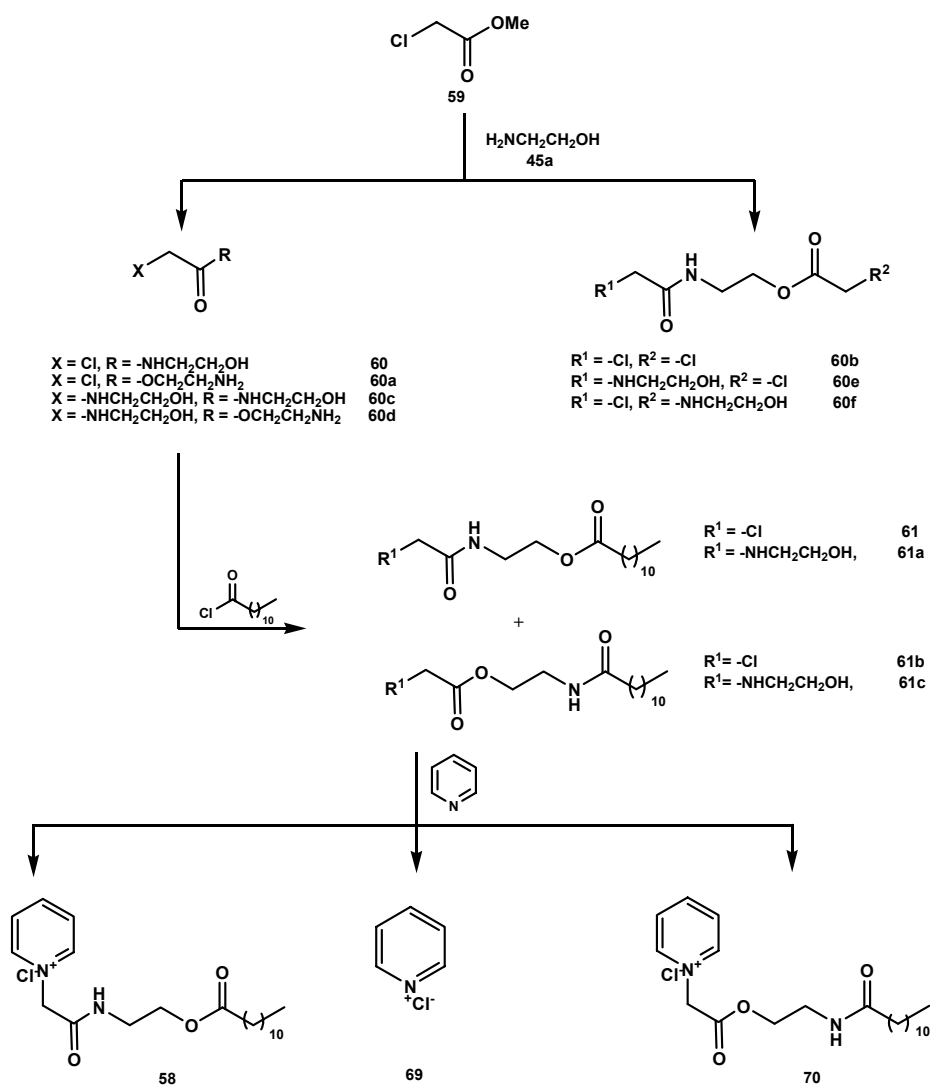
Con respecto al caso particular de alcanolaminas, Hempel y col.¹³ describen en una patente la síntesis de alcanolamidas derivadas del ácido lisérgico con actividad geotrópica. Otro antecedente en el campo de la síntesis enzimática de alcanolamidas lo constituye el trabajo de Otero¹⁴ en el cual se obtienen amidas derivadas de ácidos grasos con propiedades surfactantes (**66**) a partir de la reacción de los ácidos grasos libres (**67**) y aminas primarias (**68**) catalizada por lipasas (Esquema 3.4).



Esquema 3.4

La información correspondiente al cloruro de lapirio, en particular, encontrada en bases de datos internacionales, se relaciona básicamente con sus aplicaciones.

Como se mencionó anteriormente en la patente de A. K. Epstein y B. R. Harris⁷ la cloroamida **60** fue obtenida por el agregado de etanolamina a cloroacetato de metilo **59**. Esta operación se llevó a cabo a baja temperatura utilizándose hielo seco y agregando la etanolamina muy lentamente. Se obtuvo una mezcla de productos que no fueron aislados ni identificados. A esa mezcla se le agregó cloruro de lauroilo y luego de una destilación al vacío, al sólido fundido se le agregó piridina. La masa obtenida, que era de color marrón fue disgregada con benceno y sometida a un largo proceso de purificación. Resulta obvio observar que, como consecuencia de las reacciones utilizadas, en cada paso se obtienen mezclas de productos provenientes de reacciones secundarias debido a la falta de selectividad (Esquema 3.5).



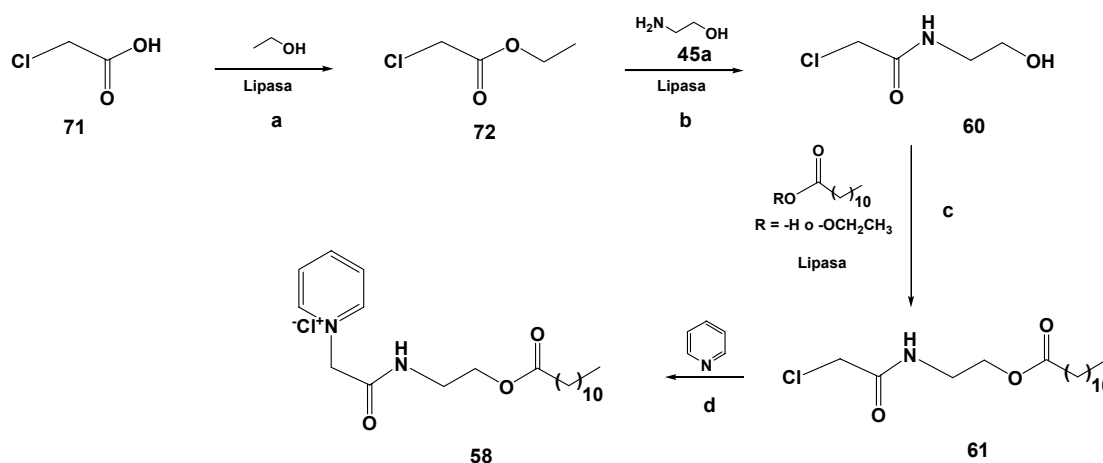
Esquema 3.5. Esquema sintético descrito para la preparación de cloruro de lapirio en el cual se incluyen los posibles productos secundarios en cada una de las etapas de síntesis

El agregado de etanolamina **45a** para obtener la cloroamida **60**, puede generar también los productos secundarios **60a-f**. Los productos secundarios en la formación del amidoéster **61** serían los amidoésteres **61a**, **61c** y **61d**. Finalmente al agregar piridina a la mezcla de productos **61**, **61a**, **61c** y **61d**, se podrían generar, además de **58**, los compuestos **69** y **70** como subproductos.

En este camino sintético tradicional, donde se emplean solventes cancerígenos y agentes irritantes y sensibles a la humedad, no se suministran datos acerca de la pureza y rendimiento ni del producto ni de los intermediarios.

Con el objeto de lograr una ruta sintética más selectiva que permitiera obtener un producto de mayor pureza y con un rendimiento mejor se aplicó la metodología enzimática en la síntesis del cloruro de lapirio

El procedimiento quimioenzimático desarrollado se presenta en el Esquema 3.6.



Esquema 3.6. Procedimiento quimioenzimático de obtención de cloruro de lapirio **58**

Como puede observarse en la Esquema 3.6 de los cuatro pasos que conforman este procedimiento, tres de ellos son catalizados por lipasas:

- Esterificación del ácido cloroacético **71** con etanol, para obtener el cloroacetato de etilo **72**.
- Aminólisis quimioselectiva de **72** por etanolamina **45a**, para formar la amida **60**.
- Esterificación o transesterificación del alcohol intermediario **60**, producto del paso b) con ácido láurico o laurato de etilo, para formar el amidoéster **61**.

El cuarto paso es químico:

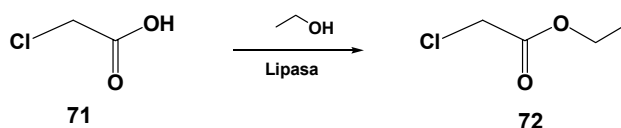
- La obtención de la sal de amonio cuaternario **58** mediante la reacción del producto del paso c) (amidoéster **61**) con piridina.

En los pasos **a)**, **b)** y **c)** se probaron varias enzimas como catalizadores. En todos los casos se estudiaron los diversos parámetros que condicionan el rendimiento de las reacciones como: efecto de la temperatura, relación sustrato/agente acilante, relación enzima/sustrato y solvente. Las enzimas utilizadas para llevar a cabo la presente reacción fueron lipasas de diversas fuentes: mamíferos, bacterias, hongos y levaduras. A continuación se describirá el trabajo realizado con el fin de optimizar las condiciones experimentales de trabajo y los resultados obtenidos utilizando las condiciones óptimas para cada uno de los dos pasos de reacción.

3.2. Primer paso enzimático: Obtención de cloroacetato de etilo

3.2.1. Optimización de condiciones experimentales

Con el fin de optimizar las condiciones experimentales para obtener enzimáticamente el éster **72** (Esquema 3.7) se emplearon las condiciones estándar en esterificaciones catalizadas por lipasas aplicadas a otros sistemas.¹⁵



Esquema 3.7. Esterificación del ácido cloroacético con etanol catalizada por lipasas

Los primeros ensayos se llevaron a cabo a 25°C, empleando una relación enzima/sustrato de 2.0, etanol como nucleófilo y solvente de reacción y cinco lipasas diferentes: lipasa de *Candida rugosa* (CRL), lipasa de *Candida antarctica* tipos A y B (CAL A y CAL B), lipasa de *Rhizomucor miehei* (LIP) y lipasa de *Pseudomonas sp.* (PS-C). A las 12 horas de reacción se tomaron alícuotas de los diferentes ensayos y se analizaron por cromatografía gaseosa (CG). Se observó en los cromatogramas de todas las reacciones la aparición de una nueva señal con un tiempo de retención menor al observado para el ácido cloroacético **71**. Se procedió a realizar la identificación del producto para lo cual se decidió continuar las reacciones hasta alcanzar la máxima conversión y aislar **72** del ensayo en el cual se utilizó CAL B, que mostró la mayor conversión. El producto fue aislado por evaporación del exceso de etanol y varios lavados con una solución de bicarbonato de sodio en primer lugar y luego agua destilada. De esta manera se obtuvo un líquido incoloro identificado a partir de espectroscopia de RMN

de ^1H como el producto **72**. Bajo estas condiciones experimentales el producto fue obtenido con un rendimiento del 98%.

Con el fin de continuar el estudio de la optimización de las condiciones de reacción, se varió la relación enzima/sustrato (E/S). En la Tabla 3.1 se presentan los resultados obtenidos trabajando a 25°C. Para estos ensayos se usó CAL B como biocatalizador. La conversión indicada en cada caso fue obtenida por cromatografía gaseosa luego de 36 horas de reacción. Este tiempo fue definido experimentalmente como aquel a partir del cual no se observó ningún cambio en la conversión de **71** a **72**, en cualquiera de las relaciones E/S analizadas.

Tabla 3.1. Influencia de la relación enzima/sustrato (E/S) en la esterificación del ácido cloroacético **71** catalizada por CAL B

E/S	Conversión de 71 a 72 (%)
0.1	45
0.25	88
0.5	97
1.0	98
2.0	98
5.0	98

Los resultados de la Tabla 3.1 muestran que a partir de una relación E/S de 0.5 la reacción de esterificación es cuantitativa. Valores mayores a 0.5 no ofrecen un cambio sustancial en la conversión. Por esto se eligió la relación E/S de 0.5 como óptima para la esterificación del ácido **72**.

En la Tabla 3.2 se presentan las condiciones definidas como óptimas para la reacción del ácido cloroacético y etanol.

Tabla 3.2. Condiciones óptimas de los parámetros experimentales para la reacción de ácido cloroacético y etanol catalizada por lipasas.

Parámetro	Condición óptima
Enzima	CAL B
Tiempo de reacción	36 hs.
Relación enzima/sustrato (E/S)	0.5
Temperatura	25°C

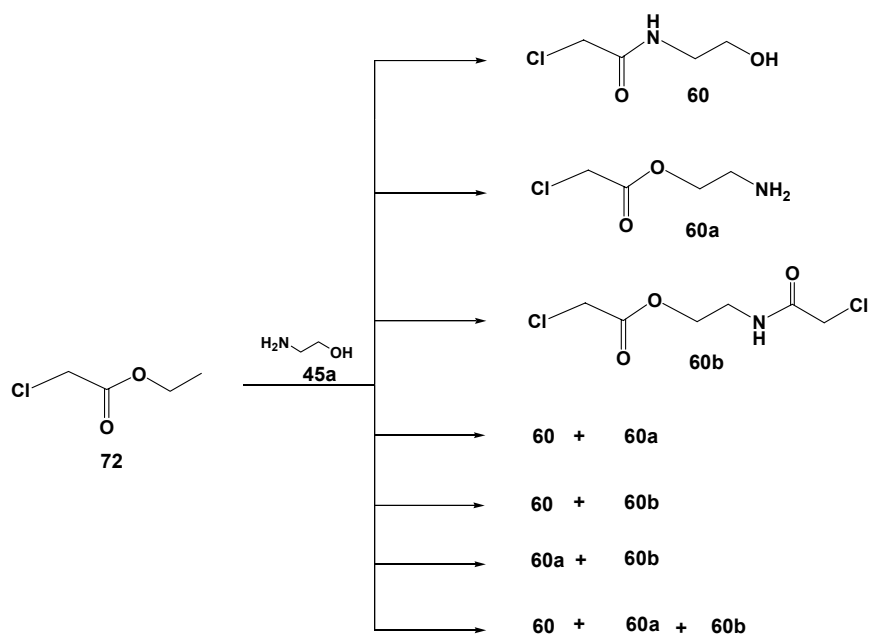
Trabajando en las condiciones experimentales presentadas en la Tabla 3.2 el cloroacetato fue obtenido con un rendimiento del 97%. Debe notarse que a pesar de no haber utilizado etanol absoluto el rendimiento obtenido fue casi cuantitativo.

En la preparación química del cloroacetato de etilo **72**, previamente reportada,¹⁶ el producto es obtenido por reflujo del ácido **71** con un exceso de etanol absoluto, utilizando ácido sulfúrico como catalizador. En estas condiciones el cloroacetato de etilo fue obtenido con un rendimiento del 75%. En cambio el proceso enzimático anteriormente optimizado permitió obtener el mismo producto con un rendimiento mayor, en condiciones de reacción más suaves que en la síntesis química y utilizando solamente etanol como solvente y nucleófilo.

3.3. Segundo paso enzimático: Obtención de 2-cloro-N-(2-hidroxiethyl)-acetamida (**60**)

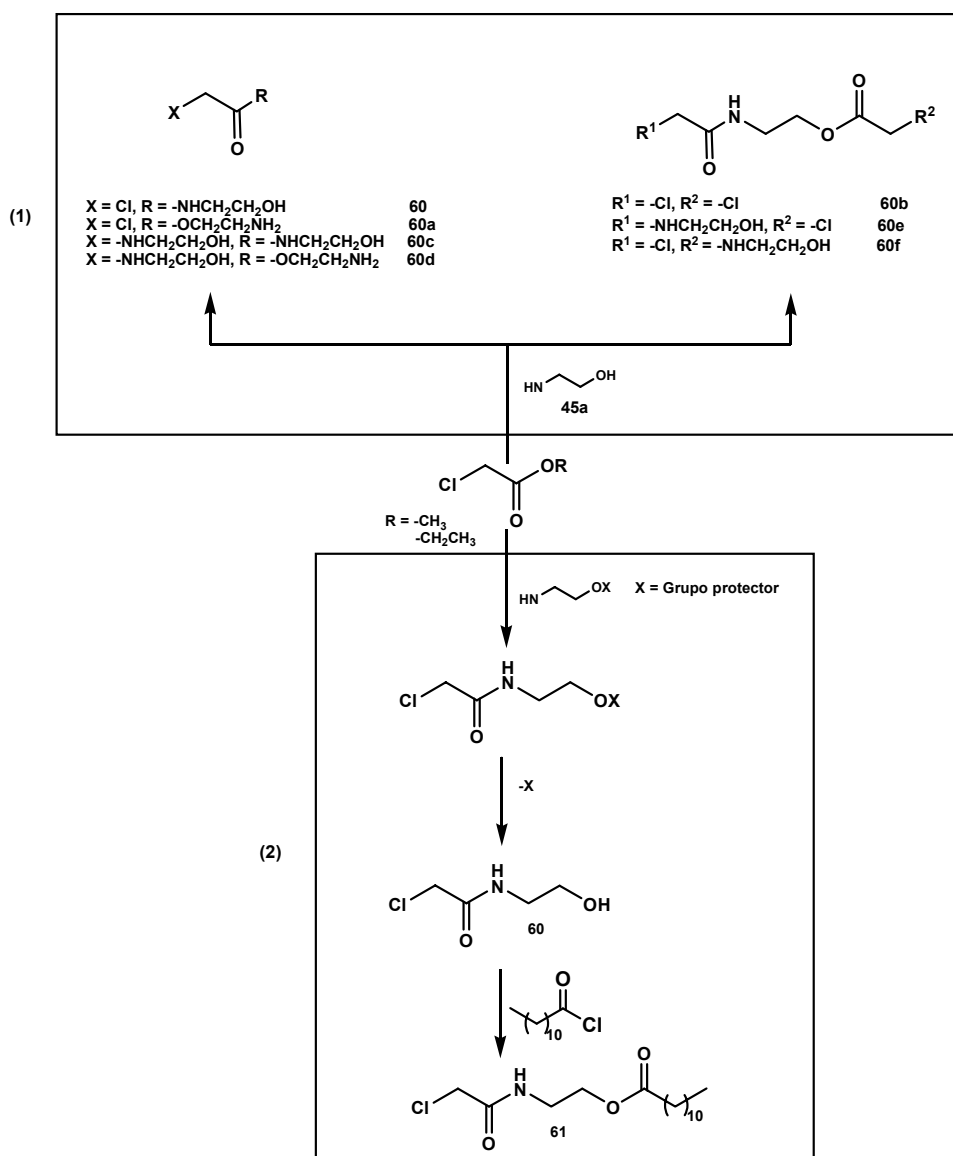
Los resultados hasta aquí presentados mostraron el comportamiento de las lipasas en la reacción de esterificación del ácido cloroacético. Como se discutió en la introducción las lipasas pueden actuar como catalizadores en otro tipo de reacciones. Una vez formado el complejo acilenzima, distintos nucleófilos pueden reaccionar con el mismo dando lugar a reacciones de hidrólisis, aminólisis, transesterificación, etc.

El estudio de la quimioselectividad es una cuestión muy importante. Es necesario averiguar qué sucede cuando una molécula con dos grupos nucleofílicos diferentes reacciona con el complejo acilenzima.



Esquema 3.8. Probables productos en la reacción biocatalítica de cloroacetato de etilo y etanolamina

Esta es la situación que se presentó cuando se consideró la posibilidad de obtener la cloroamida **60** a partir de la aminólisis enzimática, empleando como materiales de partida cloroacetato de etilo y etanolamina (Esquema 3.8). Existía la posibilidad de obtener varios productos: el de aminólisis **60**, el aminoéster **60a**, producto de la reacción de transesterificación, y los amidoésteres **60b** y **60c** formados a partir de la combinación de las anteriores reacciones o bien mezclas de estos productos. Por lo tanto, los resultados estarían subordinados a la quimioselectividad que presentarían las lipasas en las condiciones de trabajo.



Esquema 3.9. Caminos químicos posibles para obtener la cloroamida **60**

Para obtener químicamente el producto **60** existen dos estrategias (Esquema 3.9): la primera de ellas (1) se basa en la reacción de cloroacetato de etilo o metilo con

etanolamina, la cual resultó ser poco selectiva dando una mezcla compleja de productos. La segunda alternativa (2) consiste en proteger el grupo hidroxilo de la etanolamina en un paso previo a la reacción de aminólisis. Esta alternativa significa un mayor costo en el proceso debido a la mayor cantidad de reacciones involucradas en el camino sintético ya que no sólo hay que considerar la etapa de protección sino también una etapa posterior de desprotección para que el grupo hidroxilo esté disponible para el paso siguiente de acilación que conduce a la obtención del amidoéster 61.

3.3.1. Selección del biocatalizador y temperatura de reacción

Por todo lo anteriormente expuesto, en esta parte del capítulo se discutirá la capacidad de las lipasas para actuar como catalizadores en la formación de un enlace amida cuando se utiliza un aminoalcohol como nucleófilo, sin necesidad de proteger el grupo hidroxilo de la alcanolamina e intentando obtener la químioselectividad requerida. Para ello se comenzó estudiando la reacción de aminólisis de cloroacetato de etilo con etanolamina en presencia de lipasas de distinto origen.

Los primeros ensayos se realizaron bajo condiciones similares a las optimizadas por Gotor y col.¹⁷ para aminólisis catalizadas por lipasas en otros sistemas. Se llevaron a cabo a 25°C y 55°C, empleando una relación enzima/sustrato (E/S) de 7.0, una relación etanolamina/cloroacetato de etilo de 1.3, acetonitrilo como solvente y lipasas de seis fuentes diferentes: lipasa de *Candida rugosa* (CRL), lipasa de *Candida antarctica* tipos A y B (CAL A y CAL B), lipasa de *Rhizomucor miehei* (LIP), lipasa de *Pseudomonas sp.* (PS-C) y lipasa pancreática porcina (PPL). Se tomaron alícuotas de cada uno de los ensayos a diferentes tiempos y se analizaron por cromatografía en capa delgada (CCD) observándose el mismo resultado para las cuatro enzimas, es decir la aparición de una nueva mancha de diferente R_f que los materiales de partida. Con el fin de determinar el tiempo óptimo de reacción se realizó el análisis de las alícuotas tomadas a diferentes tiempos por cromatografía gaseosa (CG) utilizando como patrones los materiales de partida y el ácido cloroacético, el uso de este último tenía como objeto poder determinar si, bajo las condiciones de reacción aplicadas, el cloroacetato de etilo sufría una reacción de hidrólisis ya que el acetonitrilo utilizado como solvente fue empleado sin secado previo. Los resultados indicaron que: no se había producido hidrólisis. Las mejores conversiones se lograron cuando se trabajó a 55°C durante 72 horas, empleando CAL B o LIP como biocatalizador (Tabla 3.3).

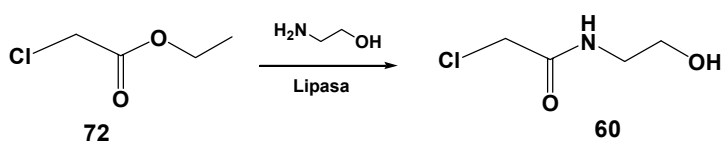
Se realizó la purificación del crudo de reacción por cromatografía en columna obteniéndose un líquido de aspecto oleoso color amarillo. A través de técnicas

espectroscópicas usuales tales como espectrometría de masa y espectroscopia de RMN ^1H y de ^{13}C se pudo establecer que el producto obtenido era la cloroamida **60**.

Tabla 3.3. Reacción de etanolamina (**45a**) con cloroacetato de etilo (**72**) catalizada por lipasas a 25°C y 55°C

Temperatura	Enzima	Tiempo (hs)	Rendimiento
25	CAL B	72	60
25	CAL A	80	32
25	PPL	78	25
25	PS-C	82	31
25	CRL	88	30
25	LIP	72	57
55	CAL B	48	98
55	CAL A	70	44
55	PPL	70	41
55	PS-C	75	41
55	CRL	74	44
55	LIP	48	98

Con esta información se pudo concluir que bajo las condiciones experimentales mencionadas era posible obtener este producto con rendimiento del 98% cuando se utilizaron CAL B y LIP respectivamente. Pero los rendimientos obtenidos no eran el dato más relevante sino que en todos los casos sólo se había obtenido el producto de aminólisis con una selectividad del 100% (Esquema 3.10).



Esquema 3.10. Aminólisis de cloroacetato de etilo empleando etanolamina catalizada por lipasas

Este resultado altamente quimioselectivo indica que la aminólisis catalizada por lipasas es más conveniente que la alternativa química ya que en esta última se obtenía una mezcla compleja de productos.

3.3.2. Optimización de las condiciones experimentales

En vista de la quimioselectividad observada en la obtención de la cloroamida **60** catalizada por lipasas, se continuaron los estudios con la finalidad de optimizar el

rendimiento de la reacción. Para ello se analizó la influencia de los siguientes parámetros experimentales sobre la mencionada transformación: efecto del solvente de reacción, relación etanolamina/cloroacetato de etilo, relación enzima/sustrato

Para analizar la influencia del solvente de reacción se repitieron las reacciones catalizadas por CAL B y LIP a 55°C con una variedad de solventes. Los resultados de este estudio se resumen en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Influencia del solvente de reacción en la obtención de la cloroamida **60**

Solvente	Rendimiento (%)	
	CAL B	LIP
Sin solvente	89	90
Etanol	90	91
Tolueno	---	---
Hexano	---	---
Acetonitrilo	99	99
Acetona	98	97
THF	88	88
Dioxano	87	91

Como puede apreciarse en la Tabla 3.4 con solventes de baja polaridad como el hexano y el tolueno, el rendimiento fue nulo, probablemente debido a la baja concentración de etanolamina en el medio de reacción. Resulta muy interesante resaltar los resultados obtenidos cuando se empleó etanol, ya que, a pesar de que su concentración fue mucho mayor que la concentración de etanolamina la reacción de aminólisis prevaleció sobre la reacción de transesterificación, reflejando la alta químiaselectividad de CAL B y LIP. Finalmente podemos concluir que los mejores resultados fueron alcanzados cuando se utilizó acetonitrilo como solvente obteniéndose un rendimiento del 99% tanto con CAL B como con LIP. Sin embargo, los resultados obtenidos con acetona son prácticamente iguales a los observados con acetonitrilo. Cuando se realizó un análisis comparativo en el cual se consideraba el costo de la enzima y el solvente, la toxicidad del solvente y el rendimiento obtenido para cada combinación enzima/solvente se concluyó que la más apropiada era LIP/acetona. El acetonitrilo no sólo es más costoso que la acetona sino que además es más tóxico. En cuanto al biocatalizador LIP es más económica que CAL B.

El próximo parámetro analizado fue la influencia de la relación etanolamina/cloroacetato de etilo (Tabla 3.5). Para este estudio se repitió la reacción catalizada por LIP empleando

una relación enzima/sustrato de 7, una temperatura de 55°C, acetona como solvente y un tiempo de reacción de 48 horas.

Tabla 3.5. Influencia de la relación etanolamina/cloroacetato de etilo en la reacción de aminólisis

Relación etanolamina/cloroacetato de etilo	Rendimiento (%)
0.1	15
0.5	55
1.0	97
3.0	98
5.0	98

Como puede apreciarse en la Tabla 3.5., los rendimientos obtenidos con relaciones etanolamina/cloroacetato de etilo mayores o iguales a 1.0 resultaron ser prácticamente idénticos. Debido a esto se decidió elegir la relación 1.0 como la óptima a partir de ese momento. Esta elección permitió economizar material de partida, ya que hasta entonces se trabajaba con una relación etanolamina/cloroacetato de etilo de 1.3. Además el uso de una relación estequiométrica facilitó la parte operativa de la síntesis ya que no fue necesario purificar el producto por cromatografía en columna. Las pequeñas cantidades de cloroacetato de etilo sin reaccionar fueron eliminadas por evaporación, mientras que la etanolamina que no reaccionó fue eliminada luego de lavar el crudo de reacción con pequeñas cantidades de agua.

Luego se analizó la influencia de la relación enzima/sustrato (E/S) (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Influencia de la relación enzima sustrato (E/S) en la aminólisis de cloroacetato de etilo catalizada por LIP.

E/S	Rendimiento (%)
0.1	32
0.25	60
0.5	85
1.0	96
3.0	98
5.0	98
7.0	98
10	98

Los ensayos realizados para la determinación de la relación E/S óptima se hicieron variando la cantidad de LIP en el sistema de reacción con una concentración de cloroacetato de etilo de 1.0 M empleando una relación molar etanolamina/cloroacetato de etilo de 1.0. El rendimiento en las reacciones de aminólisis alcanzó el 96% al emplear una relación E/S de 1.0, llegando a su valor máximo cuando esta relación fue de 5.0. Al analizar estos resultados se concluyó que el beneficio logrado en el rendimiento de la reacción de aminólisis al trabajar con la relación E/S de 5.0 con respecto a una E/S de 1.0 era despreciable respecto al incremento en el costo del proceso en el uso de tanta cantidad de enzima. Por tal motivo se eligió la relación E/S: 1.0. En la Tabla 3.7 se presentan las condiciones definidas como óptimas para la aminólisis de cloroacetato de etilo con etanolamina.

Tabla 3.7. Condiciones óptimas de diferentes parámetros experimentales para la aminólisis de cloroacetato de etilo con etanolamina

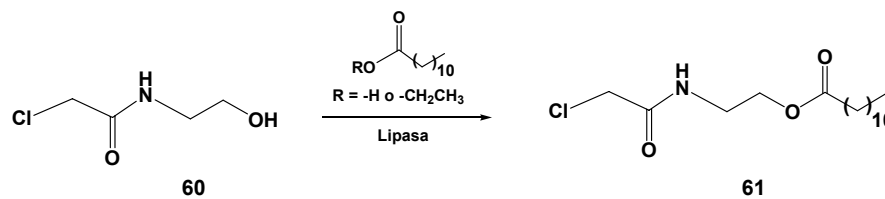
Parámetro	Condición óptima
Enzima	LIP
Tiempo de reacción	48 hs.
Enzima/sustrato (E/S)	1.0
Etanolamina/cloroacetato de etilo	1.0
Temperatura	55°C
Solvente	Acetona

Trabajando en las condiciones experimentales presentadas en la Tabla 3.7 la cloroamida **60** fue obtenida con un rendimiento del 96% y una selectividad del 100%.

Por último se llevaron a cabo experimentos para analizar la capacidad de reciclaje de la enzima, se observó una disminución del 12% en la actividad catalítica de la enzima luego de 9 ciclos con cloroacetato de etilo, etanolamina y acetona frescos.

3.4. Tercer paso enzimático: Obtención de dodecanoato de 2-(2-cloroacetilamino)etilo (61)

El paso siguiente consistió en averiguar si las lipasas eran capaces de acilar el grupo hidroxilo de la cloroamida **60** para obtener el amidoéster **61**. Con este fin se probaron dos estrategias diferentes sobre **60** (Esquema 3.11): una transesterificación de laurato de etilo y una esterificación con ácido láurico.



Esquema 3.11. Acilación de la cloroamida **60** catalizada por lipasas

3.4.1. Obtención del amidoéster **61** por transesterificación de laurato de etilo con la cloroamida **60**

En virtud de los excelentes resultados obtenidos en nuestro grupo en las transesterificaciones de la piridoxina con diferentes ésteres de ácidos grasos catalizadas por lipasas,¹⁸ decidimos estudiar el comportamiento de estas enzimas sobre la transesterificación del laurato de etilo con la cloroamida **60** para obtener el amidoéster **61**.

Los primeros ensayos se realizaron en las condiciones experimentales similares a las optimizadas en nuestro laboratorio para las transesterificaciones anteriormente mencionadas (Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Condiciones ensayadas inicialmente en la transesterificación de laurato de etilo con la cloroamida **60** catalizada por lipasas

Parámetro	Condiciones ensayadas
Enzimas ensayadas	CAL B, CAL A, LIP, CRL, PPL, PS-C
Tiempo de reacción	48 hs.
Enzima/sustrato (E/S)	3.0
Laurato de etilo/cloroamida 60	3.0
Temperatura	25°C
Solvente	Acetona

Se tomaron alícuotas de los diferentes ensayos a diferentes tiempos de reacción, y se analizaron por cromatografía gaseosa (CG). Para tal fin se utilizaron patrones de los reactivos y del ácido láurico. La utilización de este último compuesto tuvo como objeto comprobar la reacción de hidrólisis del laurato de etilo o del producto de transesterificación **61**, que se generaría debido a que los ensayos no se llevaron a cabo en condiciones anhidras. Se observaron resultados similares para todas las enzimas ensayadas, es decir la aparición de una señal a un tiempo de corrida mayor que los correspondientes a las señales de los reactivos. Además todas las alícuotas presentaban

una señal con un tiempo de retención igual que el observado para el ácido láurico, este resultado confirmaba la hipótesis de la existencia de la hidrólisis del laurato de etilo o del producto que se formaría por la reacción de transesterificación. También se observó que la intensidad de la señal asignada al ácido láurico crecía a medida que disminuía la señal asignada al producto de reacción, hasta ese momento incógnita.

Las reacciones en las cuales se observó mayor conversión fueron aquellas catalizadas por CAL B y LIP.

Se separaron los componentes de la mezcla de reacción mediante cromatografía en columna obteniéndose un sólido blanco con un 55% y un 50% de rendimiento en los ensayos en los que se utilizó CAL B y LIP respectivamente. Este producto fue identificado a través de espectrometría de masa y RMN ^1H y de ^{13}C . Estas técnicas permitieron concluir que el producto obtenido era el amidoéster **61**. La separación de los componentes de la mezcla de reacción mediante cromatografía en columna también permitió recuperar una cantidad importante de ácido láurico, este dato confirma la información extraída de análisis por CG. Es decir, además de la reacción de transesterificación también se producía la hidrólisis del amidoéster **61**, del laurato de etilo o de ambos ésteres. A pesar de este último dato los resultados eran alentadores ya que se había logrado obtener el amidoéster **61** con un rendimiento modesto que tal vez se podía aumentar optimizando las condiciones experimentales de reacción.

3.4.1.1. Optimización de las condiciones experimentales

Se comenzó estudiando los caminos posibles para eliminar la reacción de hidrólisis que generaba una disminución en el rendimiento del amidoéster **61**. Se consideraron dos posibilidades: la primera de ella consistía en trabajar en condiciones anhidras con el consecuente aumento en el costo del proceso y complicaciones operativas. La segunda alternativa consideraba la posibilidad del agregado de un agente que atrapara el agua que pudiera estar presente en la reacción. Se utilizaron tamices moleculares (TM) para tal fin.

Para estudiar el efecto de los tamices moleculares se realizaron dos ensayos empleando CAL B o LIP como catalizador, una relación enzima sustrato (E/S) de 3.0, acetona como solvente, una relación laurato de etilo/cloroamida **60** de 3.0 y TM de 4Å como atrapantes de agua. En la Tabla 3.9 se presentan los resultados obtenidos a diferentes tiempos de reacción y dos temperaturas distintas: 25°C y 55°C. Los valores de conversión informados fueron determinados por cromatografía gaseosa.

Los resultados de la Tabla 3.9 muestran que el agregado de TM al medio de reacción permitió obtener mayores conversiones que en los primeros ensayos. Por cromatografía gaseosa pudo comprobarse que en los ensayos que se utilizaron TM no se generó ácido láurico. Este dato junto con las conversiones crecientes observadas a tiempos mayores corroboró la hipótesis sobre la existencia de la reacción de hidrólisis del producto **61** cuando no se trabajaba en condiciones anhidras.

Tabla 3.9. Efecto del uso de tamices moleculares como agente deshidratante en la conversión de la reacción de transesterificación de laurato de etilo y la cloroamida **60** catalizada por lipasas

Tiempo de (hs)	Rendimiento (%)			
	CAL B	LIP		
		25°C	55°C	
6	10	12	12	15
12	18	21	22	26
18	26	29	35	39
24	36	38	46	49
30	48	52	55	57
36	59	62	65	68
48	70	70	75	75
60	71	71	77	76

De los datos presentados en la Tabla 3.9 también se pudo concluir que un aumento en la temperatura de trabajo no produjo cambios significativos en la conversión de la reacción, por lo tanto a partir de ese momento se decidió elegir una temperatura de 25°C como valor óptimo para la reacción de transesterificación del laurato de etilo con la cloroamida **60**. Por último se pudo establecer que tiempos de reacción mayores a 48 horas no ofrecían un aumento importante en la conversión de la reacción de transesterificación.

Otro parámetro analizado fue el efecto del tipo de enzima. Aunque los resultados de los primeros ensayos indicaban que LIP o CAL B ofrecían las mayores conversiones, se decidió estudiar el comportamiento de las otras lipasas (CAL A, PPL, CRL y PSL) en presencia de TM. Estos ensayos se efectuaron a 25°C, empleando una relación (E/S) de 3.0, acetona como solvente y una relación laurato de etilo/cloroamida **60** de 3.0 durante 48 horas, tiempo suficiente para alcanzar la máxima conversión posible. Los resultados se presentan en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Efecto del tipo de enzima en la reacción de laurato de etilo y la cloroamida **60**

Enzima	Rendimiento (%)
CAL B	71
LIP	77
CAL A	46
CRL	43
PPL	37
PSL	29

Analizando en forma general los resultados obtenidos con las diferentes lipasas puede apreciarse que se obtiene la misma tendencia que pudo apreciarse sin agregado de TM al medio de reacción. Es decir las mayores conversiones fueron obtenidas con CAL B y LIP. Se debe remarcar que en los ensayos realizados con CAL A, CRL, PPL y PSL tampoco se observó la presencia de ácido láurico al igual que en los casos de CAL B y LIP. Pudiendo concluir que las conversiones menores en los ensayos de las primeras cuatro enzimas respecto a LIP y CAL B no se debe a la generación de la reacción de hidrólisis, sino simplemente a una menor actividad de estas enzimas hacia la reacción de transesterificación.

En vista de estos resultados se eligió a partir de ese momento a LIP como catalizador para la reacción de transesterificación del laurato de etilo y la cloroamida **60**.

Una vez elegido el catalizador, continuamos nuestro trabajo estudiando el efecto de la relación enzima/sustrato (E/S). Las reacciones se llevaron a cabo empleando siete relaciones E/S diferentes a 25°C, una relación laurato de etilo/cloroamida **60** de 3.0, tamices moleculares y LIP como catalizador durante 48 horas. Los resultados obtenidos son presentados en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S) sobre la transesterificación de la cloroamida **60** con laurato de etilo catalizada por LIP

Relación E/S	Rendimiento (%)
0.1	23
0.25	34
0.5	42
1.0	60
3.0	75
5.0	76
7.0	76

A partir de los datos presentados en la Tabla 3.11 se puede indicar que el máximo rendimiento se obtiene cuando se utiliza una relación E/S de 3.0, por lo que se decidió continuar trabajando con esta última relación E/S.

En todos los ensayos realizados se había utilizado una relación agente acilante (laurato de etilo)/sustrato (cloroamida **60**) de 3.0. Para comprobar que este valor era el óptimo se efectuaron una serie de ensayos en los cuales se determinó el rendimiento de las reacciones para siete relaciones sustrato agente acilante/sustrato diferentes empleando una relación E/S de 3.0, LIP como catalizador, tamices moleculares y acetona como solvente. Todas las reacciones se desarrollaron a 25°C durante 48 horas. En la Tabla 3.12 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 3.12. Efecto de la relación agente acilante/sustrato en la reacción de obtención de **61**

Relación agente acilante/sustrato	Rendimiento (%)
1	30
2	68
2.3	75
2.5	75
2.8	75
3.0	75
4.0	75

Al examinar los datos de la Tabla 3.12 se puede notar que con relaciones agente acilante/sustrato mayores de 2.3 se obtuvo el rendimiento mayor. Por lo tanto se decidió elegir esta la relación agente acilante/sustrato como condición óptima.

Tabla 3.13. Efecto de la variación del medio de reacción en la reacción de transesterificación de la cloroamida **60** con laurato de etilo catalizada por LIP.

Solvente	Rendimiento del producto 5^a (%)
sin solvente	NR
Etanol	NR
Acetonitrilo	74
Acetona	75
THF	50
Dioxano	72

a: rel E/S:3.0, rel. agente acilante/sustrato: 2.3, temperatura: 25°C, tiempo de reacción: 48 hs, uso de tamices moleculares como agente deshidratante

El último parámetro analizado fue el efecto de la variación del medio de reacción. Para estos ensayos se utilizaron las condiciones experimentales optimizadas anteriormente. De los datos presentados en la Tabla 3.13 podemos concluir que los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó acetona como medio de reacción. Los ensayos realizados con dioxano y acetonitrilo permitieron obtener conversiones similares pero inferiores. Por lo tanto se eligió acetona como solvente óptimo para la reacción de laurato de etilo y la cloroamida **60** catalizada por LIP.

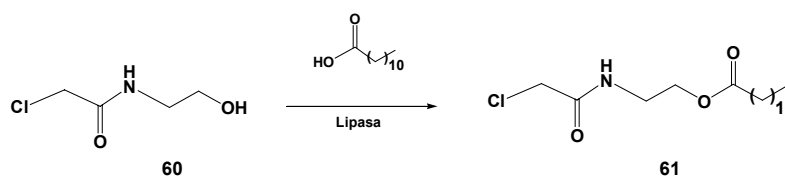
Trabajando en las condiciones optimizadas (Tabla 3.14) en la forma descrita el amidoéster **61** fue obtenido con un rendimiento del 75%.

Tabla 3.14. Condiciones optimizadas para la reacción de laurato de etilo y cloroamida **60** catalizada por lipasas

Parámetro	Condición óptima
Enzima	LIP
Agente secuestrante de agua	Tamices moleculares
E/S	3.0
Laurato de etilo/cloroamida 60	2.3
Temperatura	25°C
Tiempo	48 hs.

A pesar de que **61** se obtenía con buen rendimiento a través de la transesterificación enzimática era necesario aumentar el mismo debido a que quedaba cloroamida **60** sin reaccionar y era necesario efectuar varios lavados con hexano del crudo de reacción para eliminarla. Estos sucesivos lavados también permitieron quitar el exceso de laurato de etilo.

Con el fin de eliminar estos inconvenientes se pensó en cambiar el agente acilante usando ácido láurico en lugar de laurato de etilo (Esquema 3.12).



Esquema 3.12. Reacción del ácido láurico y la cloroamida **60** catalizada por lipasas

3.4.2. Obtención del amidoéster 61 a partir de la esterificación de ácido láurico con la cloroacetamida 60

3.4.2.1. Optimización de condiciones experimentales

Con el fin de optimizar la conversión en la reacción del ácido láurico con la cloroamida **60** para obtener el producto **61**, se realizaron ensayos en condiciones experimentales similares a las optimizadas para la transesterificación de laurato de etilo con cloroamida **60** catalizada por LIP pero sin agregado de TM al medio de reacción. Los resultados del análisis por cromatografía gaseosa de los crudos de reacción reflejaron la presencia creciente de ácido láurico, lo cual indicaba la existencia de la reacción de hidrólisis del amidoéster **61**. También se observaron conversiones mayores a tiempos menores de reacción. Estos resultados eran similares a los obtenidos en los casos en que se utilizó laurato de etilo como agente acilante en ausencia de agente deshidratante. Además el comportamiento de las diferentes enzimas presentaba la misma tendencia que en la reacción de transesterificación, es decir los mejores resultados eran obtenidos con LIP y CAL B. Se obtuvieron rendimientos del 60% y 61%, para LIP y CAL B respectivamente cuando se utilizó acetona como solvente de reacción. Por otra parte el análisis del efecto del medio de reacción sobre la conversión nos permitió concluir que los ensayos realizados con acetona ofrecían las mayores conversiones.

A continuación se analizaron los efectos de otros parámetros experimentales tales como: relación enzima/sustrato, relación agente acilante/sustrato, tiempo de reacción, temperatura y efecto del agregado de TM.

Se comenzó estudiando el efecto de los TM. En iguales condiciones que las optimizadas para la reacción de transesterificación se pudo obtener el producto **61** con 95% de rendimiento cuando se emplearon LIP o CAL B como catalizadores, a una temperatura de 25°C, con un tiempo de reacción de 48 horas y usando TM. Además se pudo comprobar por cromatografía gaseosa que no se generaba ácido láurico durante la reacción. Estos resultados nos permitieron concluir que la alternativa de la esterificación era más favorable que la transesterificación ya que en las mismas condiciones de trabajo a partir de este último camino se pudo obtener el producto con un rendimiento del 75% solamente.

El próximo paso fue optimizar el tiempo de reacción. Para estos ensayos se agregaron TM a la mezcla de reacción. Los resultados obtenidos indicaron que a partir de las 24 horas de reacción se alcanzaba la conversión máxima posible (95%) cuando se utilizó LIP como catalizador.

La temperatura no fue un factor determinante ya que cuando se varió este parámetro desde 25°C a 55°C no se produjo variación alguna en los resultados. Es decir la conversión se mantuvo en el 95%.

Los experimentos realizados para la determinación de la relación enzima/sustrato óptima se hicieron variando esta relación desde 0.1 hasta 5.0 (Figura 3.1) utilizando LIP como catalizador.

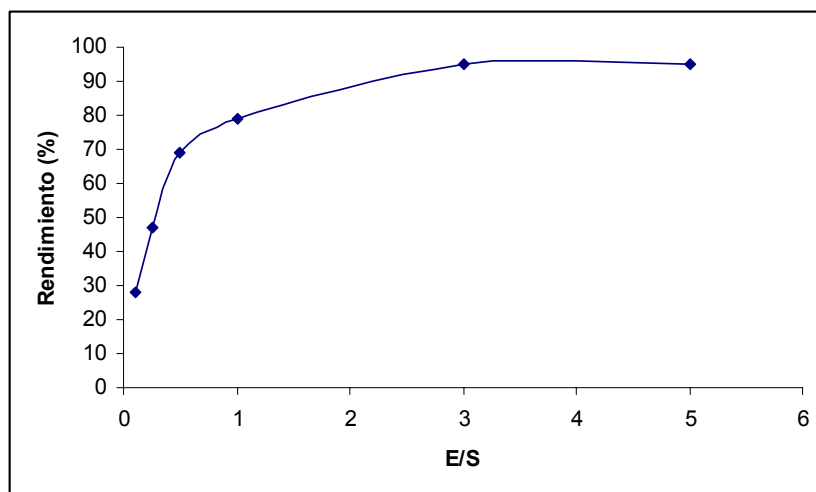


Figura 3.1. Influencia de la relación enzima/sustrato (E/S) en la esterificación de la cloroamida **60** con ácido láurico

El rendimiento máximo posible (95%) fue alcanzado cuando se utilizaron relaciones E/S mayores a 3.0.

El valor óptimo de la relación agente acilante/sustrato fue obtenido a partir de una serie de ensayos en los cuales se utilizó una cantidad fija de cloroamida **60** y se varió la cantidad de ácido láurico desde una relación molar ácido/cloroamida **60** de 1 hasta una relación de 5 (Tabla 3.15).

Tabla 3.15. Efecto de la relación agente acilante/cloroamida **61** en la reacción de esterificación de la cloroamida **60** catalizada por lipasas

Relación agente acilante/cloroamida 61	Rendimiento (%)
1.0	95
1.5	95
3.0	96
5.0	96

A partir de los datos obtenidos pudo concluirse que el rendimiento observado con la relación de 1.0 es prácticamente igual al que se obtiene trabajando con relaciones mayores. Por lo tanto se decidió trabajar con una relación equimolar ácido/cloroamida. Este dato representaba otra ventaja del uso de ácido láurico en lugar de laurato de etilo como agente acilante, donde era necesario emplear una relación agente acilante/cloroamida **60** de 2.3. Por lo tanto el uso de ácido láurico aporta un beneficio económico. No sólo porque se utiliza una cantidad equimolar respecto a la cloroamida **60**, sino que además su costo es menor que el de laurato de etilo y permite obtener el producto con un mayor rendimiento. En la Tabla 3.16 se comparan los parámetros experimentales optimizados para la reacción de acilación de la cloroamida **60** con ácido láurico y laurato de etilo como agentes acilantes.

Tabla 3.16. Comparación de la influencia de diferentes parámetros experimentales en la reacción de acilación de la cloroamida **60** con laurato de etilo y ácido láurico catalizada por lipasas

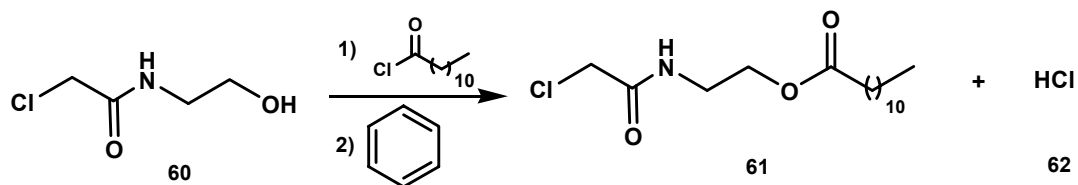
Parámetro	Condición óptima	
	Laurato de etilo	Ácido láurico
Enzima	LIP	LIP
Agente deshidratante	Tamices moleculares	Tamices moleculares
Rel. E/S	3.0	3.0
Rel. Agente acilante/sustrato	2.3	1.0
Temperatura	25°C	25°C
Tiempo	48 hs	24 hs
Rendimiento	75%	95%

Trabajando en las condiciones experimentales descritas en la Tabla 3.16 el amidoéster **61** fue obtenido con un 95% de rendimiento cuando se utilizó ácido láurico como agente acilante, mientras que en el caso del laurato de etilo el rendimiento fue sólo del 75%. Esta fue la primera ventaja que se encontró respecto al uso del ácido laurico. Las otras dos ventajas fueron:

- 1) el uso de una relación agente acilante/cloroamida **60** menor lo cual derivó en una disminución en el costo del proceso y una mejora notable en la etapa de purificación del producto,
- 2) un tiempo de reacción menor que significó un ahorro de energía.

Un análisis comparativo de las metodologías química y enzimática utilizadas para obtener el amidoéster **61** permite concluir que la opción enzimática exige condiciones operativas

de menor complejidad ya que no utiliza cloruro de lauroilo como agente acilante (Esquema 3.13).



Esquema 3.13. Formación del producto **61** a partir de la cloroamida **60** y cloruro de lauroilo

Como se mencionó previamente, cuando se utiliza cloruro de lauroilo como agente acilante se genera el amidoéster **61** y vapores de cloruro de hidrógeno **62**. Estos vapores podrían reaccionar con la piridina que se agrega en el paso posterior de obtención del cloruro de lapirio, para formar cloruro de piridinio. Por esta razón es necesario el uso de benceno para aislar el producto antes del paso de formación del cloruro de lapirio.

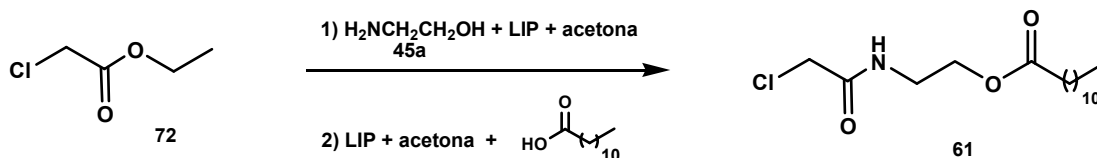
En cambio en la metodología enzimática es suficiente con filtrar la enzima, lavar el biocatalizador con acetona, evaporar el solvente y finalmente lavar el crudo de reacción con pequeñas cantidades de hexano. De esta manera, precipita el producto **61** y en solución quedan los sustratos que no reaccionaron.

La formación de cloruro de piridinio **69** en la síntesis química trae como consecuencia que una solución acuosa al 1% de cloruro de lapirio posea un pH de 2.5 a 3.8 que es muy ácido para el uso medicinal.

3.5. Procedimiento en una sola etapa para obtener el amidoéster **61**

Debemos notar que en las etapas de aminólisis para obtener la cloroamida **60** y acilación de este compuesto para obtener el amidoéster **61** se utilizó la misma enzima y el mismo solvente. Teniendo en cuenta esta circunstancia y el trabajo previo de nuestro grupo para obtener un intermediario en la síntesis del Alfuzosin,¹¹ se consideró la posibilidad de la aplicación de un procedimiento en una sola etapa para preparar el producto **61** a partir de **72**.

La cloroamida **60** fue obtenida a partir de cloroacetato de etilo en presencia de etanolamina, utilizando acetona como solvente y LIP como biocatalizador. Una vez alcanzado el valor máximo de conversión, determinado por cromatografía gaseosa, se agregaron a la mezcla ácido láurico, acetona, tamices moleculares y una cantidad adicional de LIP (Esquema 3.14).



Esquema 3.14. Procedimiento en una etapa para obtener el producto **61**

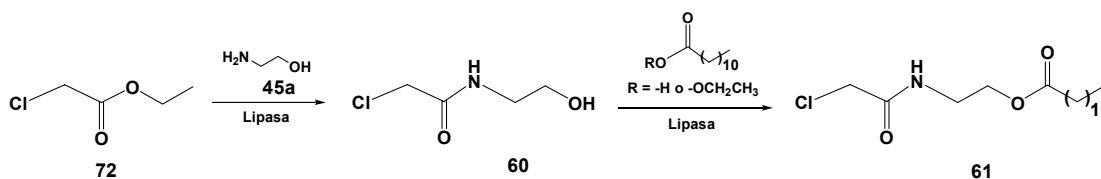
El rendimiento global de este procedimiento fue sólo del 62%. Se concluye que es más conveniente aislar la cloroamida **60** y luego preparar el producto **61** alcanzándose un rendimiento global del 91% que seguir el procedimiento en una etapa.

Es probable que la presencia de un exceso de etanolamina proveniente del primer paso inhiba la generación del producto **60** en el segundo paso.

Además, en la etapa de obtención de **60**, una cantidad considerable de este producto quedaba adsorbida en la superficie de la enzima al finalizar la reacción de aminólisis. Este material retenido fue desorbido por lavados de la enzima con acetona. Estos lavados no pueden ser realizados en el proceso en una etapa, y esto podría ser una de las razones de la disminución del rendimiento.

3.6. Escala preparativa

El próximo objetivo propuesto consistió en llevar a escala preparativa el procedimiento sintético de dos pasos consistente en la aminólisis de **72** para dar el producto **60**, que por reacción de esterificación bajo las condiciones anteriormente descritas nos permitió obtener el producto **61** (Esquema 3.15).



Esquema 3.15. Camino de dos pasos para obtener el intermediario **61**

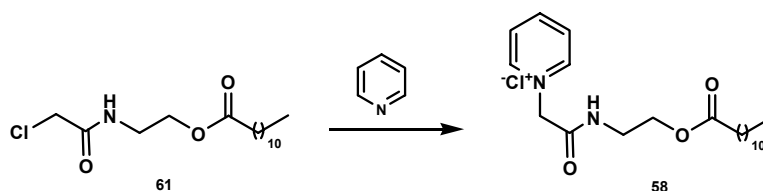
La reacción de aminólisis se llevó a cabo con 20.0 gramos y 9.9 gramos de los compuestos **72** y **45a** respectivamente y 20 gramos de LIP. Trabajando en estas condiciones se obtuvo el producto **60** con un 96% de rendimiento, es decir un 2% menor que en el caso de trabajar a pequeña escala.

Finalmente el producto **60** obtenido se hizo reaccionar con una cantidad equimolar de ácido láurico. De esta manera el amidoéster fue obtenido con un 90% de rendimiento. Por

lo tanto el rendimiento global fue del 86%, este rendimiento es un poco menor que el observado (91%) cuando se trabajó a una escala menor. Estos resultados demostraron la posibilidad de aplicar el procedimiento para obtener cloruro de lapirio a escala industrial.

3.7. Formación del cloruro de lapirio (58)

Finalmente el cloruro de lapirio fue obtenido por tratamiento del intermediario **61** con piridina durante toda una noche a temperatura ambiente (Esquema 3.16). El producto fue precipitado por la adición de hexano al medio de reacción. El producto de reacción **58** fue caracterizado por espectrometría de masa y espectroscopía de RMN de ^1H y de ^{13}C . Esta caracterización permitió identificar el producto obtenido como cloruro de lapirio. El rendimiento fue del 87%.



Esquema 3.16. Obtención del cloruro de lapirio (**58**) a partir de la reacción del amidoéster **61** y piridina

CONCLUSIÓN

En este capítulo se ha presentado un procedimiento quimioenzimático muy eficiente para la preparación de cloruro de lapirio a partir de ácido cloroacético.¹⁹ La metodología propuesta consiste en cuatro pasos, tres de ellos catalizados por lipasas y el último químico. También se desarrolló una metodología alternativa ligeramente menos eficiente, en la cual el segundo y tercer paso enzimático son realizados en una sola etapa.

La metodología enzimática desarrollada ofreció resultados superiores a los observados en los métodos de síntesis clásicos. Estos resultados, en parte, fueron producto de las siguientes características ofrecidas por las enzimas:

- *Químioselectividad:* la enzima manifestó un comportamiento altamente quimioselectivo en el segundo paso del camino sintético. El análisis del curso de la reacción y del producto obtenido por cromatografía gaseosa utilizando como patrones todos los posibles productos generados por la reacción de **72** y **45a** demostró la formación exclusiva de **60**. En esta etapa la enzima discriminó

perfectamente entre los grupos hidroxilo y amino de la etanolamina y catalizó la formación de la amida con excelente rendimiento y una pureza de 100%

- *Eficiencia:* en el tercer paso catalizado por lipasas se pudo obtener el amidoéster (**61**) directamente a partir de la reacción de (**60**) con ácido láurico o laurato de etilo. De esta manera se eliminó la necesidad del uso del cloruro de lauroílo necesario en la síntesis química que trae aparejado un aumento en el costo y dificultad en la manipulación, requiere condiciones anhidras de reacción y un mayor esfuerzo en el tratamiento de efluentes.
- *Condiciones suaves de reacción:* la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente y en condiciones suaves que evitan la formación de subproductos aumentando el rendimiento y facilitando el aislamiento del producto final.
- *Pureza del producto:* la pureza del producto obtenido químicamente es muy inferior a la del producto obtenido enzimáticamente (98-100%). Una solución acuosa al 1% de cloruro de lapirio obtenido enzimáticamente posee un pH neutro, mientras que la solución del producto obtenido a través del camino desarrollado por Epstein tiene un pH de 2.5 a 3.8 y la solución del producto obtenido por el método de Gordon tiene un pH de 4 a 5.2. En el caso del cloruro de lapirio, cuya principal aplicación se encuentra en formulaciones farmacéuticas o cosméticas, directamente relacionadas con la vida humana, esta característica es de vital importancia.
- *Rendimiento:* se obtuvieron excelentes rendimientos en los pasos enzimáticos. En la obtención del amidoéster **61** a partir de cloroacetato de etilo, el rendimiento global fue de 93% (con acetonitrilo como solvente en el segundo paso), 83% (sin solvente en el segundo paso) y 62% en el procedimiento en una etapa. Tanto por el procedimiento en una sola etapa como en los dos pasos por separado el producto obtenido (**61**) es de excelente pureza. Para lograr este elevado grado de pureza empleando las reacciones de síntesis orgánica tradicional se deben efectuar purificaciones de los intermediarios y del producto final que aumentan el costo global del proceso.

Las notables ventajas presentadas por la metodología enzimática en la síntesis de cloruro de lapirio permitieron presentar estos resultados en una patente de invención.²⁰

Bibliografía

1. R.S. Home: www.epa.gov/crs/index.htm.
2. H. Argembeaux, M. Demitz, J. Treu (Beiersdorf A.-G., Germany) Ger. Off. DE 10,103,093 (Cl. A61K7/06), 25 Jul 2002, Appl. 10,103,093, 24 Jan 2001; 12 pp.
3. T. Maruyama (Sunstar Inc., Japan) Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2001072562 A2, 21 Mar 2001, Appl. JP 1999,252459 7 Sep 1999; 5 pp.
4. T. Sipos (Johnson & Johnson) US 4,006,218 (Cl.424-54; A61K7/22), 01 Feb 1977, Appl. 285,682, 01 Sep 1972; 10 pp.
5. F.T. Haines, D. Forte (United States Environmental Resources, Corp.) US 4,615,807 (Cl. 210-704; C02F1/24), 07 Oct 1986, Appl. 757,971, 23 Jul 1985; 8 pp.
6. N.A. Warrender, J.R. Carlile (Stanchem Inc., Can.) PCT Int. Appl. WO 9833953 A1, 06 Aug 1998, Appl. WO 1998-CA76, 02 Feb 1998; 42 pp.
7. A.K. Epstein, B.R. Harris, US 2,290,173 (Cl. 167-22), 21 Jul 1942, Appl. 355,032, 31 Aug 1940; 10 pp.
8. S. Patai (ed.) The Chemistry of Acyl Halides, The chemistry of functional groups, a series of advanced treatises. Interscience, London, 1964).
9. J.E. Gordon, R.A. Ralston, US 4,017,501 (Cl. 260-295), 24 Oct 1975, Appl. 625,407, 12 Apr 1977; 4 pp.
10. W. Lubisch, A. Moller, H. Treiber, M. Knopp de Abbott GmbH & Co. KG, US2004/0082569A1, IPC: A61K31/ 29 April de 2004, 15 pp.
11. A. Baldessari, E.G. Gros. Patente AR002219B1, 01Abril2004, 16 pp.
12. J. Graille y col., De Societe d'Exploitation de Produits pour les Industries Chimiques S.E.P.P.I.C., ,IPC: C12P17/14,13/02, 23 Dec 1988.
13. R. Hempel y col., EP0205068, IPC: C07D457/04B; C07D457/06B, 17 Dec 1986.
14. M. Fernandez-Perez, C. Otero, Enzyme Microb Technol., 28 (2001) 527.
15. A. Baldessari, L.E. Iglesias, E.G. Gros, Biotecnol. Lett., 16 (1994) 479.
16. A.I. Vogel, J. Chem. Soc., 1948, 644
17. M. Lopez-García, I. Alfonso, V. Gotor, J. Org. Chem., 68 (2003) 648.
18. A. Baldessari, C.P. Mangone, E.G. Gros, Helvetica Chimica Acta, 81 (1998) 2407
19. E. Rustoy, A. Baldessari, Eur. J. Org. Chem., 21 (2005) 4268
20. A. Baldessari, E. Rustoy. Patente. Acta N° P050103459 INPI, 16 Ago 2005.
(http://www.conicet.gov.ar/VINCULACION/acciones/listado_convenios_de_patentes.php)

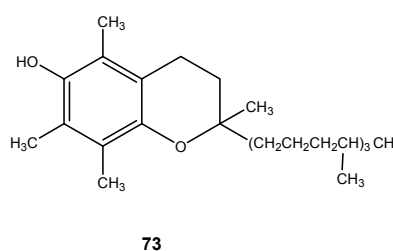
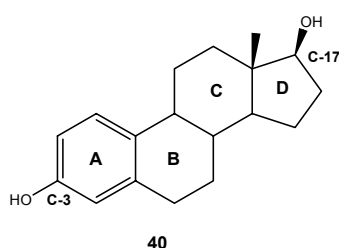
Capítulo IV

Resultados y discusión

4. SÍNTESIS ENZIMÁTICA REGIOSELECTIVA DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS DE 3,17 β -ESTRADIOL

4.1. INTRODUCCIÓN

Los estrógenos humanos, tales como el 3,17 β -estradiol **40**, son conocidos por ejercer efectos antioxidantes en sistemas lípido-acuosos *in vitro*.¹⁻³ La eficiencia de estos efectos parece depender de la presencia del grupo hidroxilo en el anillo aromático A de las moléculas de estrógeno,⁴⁻⁷ ya que esta característica estructural también aparece en otros oxidantes tales como el α -tocoferol **73**.⁸



La presencia de ésteres en la posición 17 del anillo D,^{9,10} sugiere que estos derivados podrían ser componentes estructurales de las lipoproteínas. Estas moléculas asociadas con las lipoproteínas podrían interferir en el proceso aterosclerótico.

La esterificación de ácidos grasos con hormonas esteroidales es una transformación metabólica que prolonga y potencia la actividad hormonal, aunque estos ésteres son prohormonas que requieren de una ruptura hidrolítica para su activación.¹¹ En teoría, los ésteres pueden constituir un reservorio hormonal que se ubica principalmente en los tejidos grasos.¹² Algunos investigadores especulan que existen esterases específicas que gatillan la activación y liberación de los estrógenos una vez que los órganos esteroideogénicos comienzan a perder su actividad.¹¹

A partir de todo lo expuesto podemos suponer que los monoésteres del 3,17 β -estradiol en la posición 17 del anillo D con ácidos grasos podrían ser útiles para determinar la utilidad protectora de los estrógenos contra la aterosclerosis y proveer un patrón para estudios metabólicos. De aquí, la importancia de contar con derivados monoacilados de 3,17 β -estradiol en C-17.

La transformación regioselectiva de compuestos polifuncionales como los esteroides, es un desafío para la síntesis orgánica, especialmente en el caso de estructuras sensibles a ácidos, bases, reacciones de oxidación o reducción. Estos factores limitan el espectro de reactivos que pueden usarse en una transformación en particular.

Específicamente en el campo de los esteroides, la catálisis enzimática puede jugar un importante papel debido a que demanda condiciones de reacción suaves y una

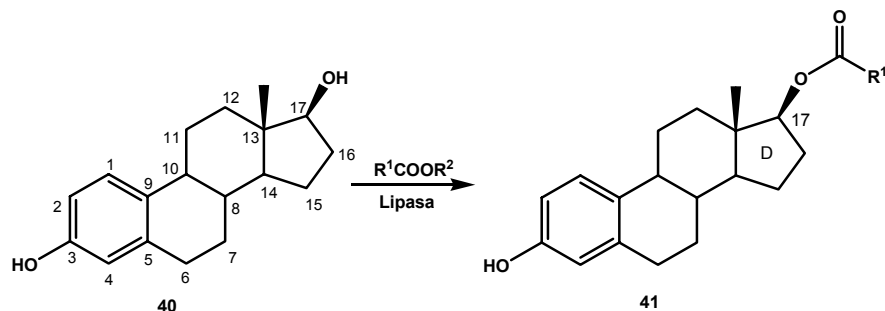
interconversión selectiva de los grupos funcionales a través de transformaciones regioselectivas¹³⁻¹⁷. En nuestro laboratorio hemos realizado la esterificación y transesterificación de esteroides polifuncionalizados observando que las lipasas pueden actuar sobre sustituyentes ubicados en el anillo A o en el anillo D del esqueleto esteroideal.^{18,19} Así, en trabajos previos observamos que, cuando trabajamos con androstanos y pregnanos, la lipasa de *Candida rugosa* muestra preferencia por los grupos hidroxilo o aciloxi ubicados en la posición 3 en el anillo A, mientras que la lipasa de *Candida antarctica* cataliza las reacciones en el anillo D.^{20,21}

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en esta parte de la tesis doctoral se describen los estudios realizados para obtener derivados monoacilados de 3,17 β -estradiol.

Se siguieron dos estrategias:

- Acilación enzimática regioselectiva de 3,17 β -estradiol
- Alcohólisis enzimática de derivados diacilados de 3,17 β -estradiol

4.2. ACILACIÓN ENZIMÁTICA REGIOSELECTIVA DE 3,17 β -ESTRADIOL



Producto	R ¹	R ²
41a	-CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	-CH ₂ CH ₃
41a	-CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	H
41b	-CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃	H
41c	-CH ₂ (CH ₂) ₇ CH ₃	H
41d	-CH ₂ (CH ₂) ₉ CH ₃	H
41e	-CH ₂ (CH ₂) ₁₁ CH ₃	H
41f	-CH ₂ (CH ₂) ₁₃ CH ₃	H
41g	-CH ₂ (CH ₂) ₁₅ CH ₃	H
41h	<i>cis</i> -CH ₂ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	-CH ₂ CH ₃
41h	<i>cis</i> -CH ₂ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	H
41i	<i>trans</i> -CH ₂ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	H
41j	<i>cis, cis</i> -CH ₂ (CH ₂) ₅ (CH=CHCH ₂) ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃	H
41k	<i>cis, cis</i> -CH ₂ (CH ₂) ₅ (CH=CHCH ₂) ₃ (CH ₂) ₃ CH ₃	H

Esquema 4.1. Acilación regioselectiva de 3,17 β -estradiol (**40**) catalizada por lipasas

Dado que la molécula de 3,17 β -estradiol (**40**) contiene dos grupos hidroxilos, los primeros estudios de esta parte del presente trabajo estuvieron centrados en el análisis de la capacidad de las lipasas para acilar selectivamente el grupo hidroxilo ubicado en la posición 17 del anillo D en **40**, empleando ácidos grasos libres o ésteres etílicos derivados de algunos de estos ácidos grasos como donores de acilo (Esquema 4.1).

4.2.1. Optimización de parámetros experimentales para la reacción de acilación de 3,17 β -estradiol en presencia de ácido oleico

Se comenzó evaluando la actividad desarrollada por lipasas de diferente origen en la reacción de acilación de **40**.

Las primeras reacciones se llevaron a cabo a 33°C, empleando ácido oleico como agente acilante, diisopropil éter (DIPE) como solvente, una relación enzima/sustrato de 10 y lipasas de seis orígenes diferentes: lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CAL B), lipasa de *Rhizomucor miehei* (LIP), lipasa de *Candida rugosa* (CRL), pancreatina, lipasa pancreática porcina (PPL) y lipasa de *Pseudomonas* sp. (PS-C).

El curso de las reacciones se estudió por cromatografía en capa delgada. En los experimentos con CRL y CAL B, se observó luego de 24 horas de reacción, la aparición de dos manchas de mayor R_f que los compuestos de partida. Con CAL B se observó que la conversión era menor. Se continuó la reacción hasta alcanzar el mayor grado de conversión posible y se aislaron los dos productos mediante cromatografía en columna obteniéndose un sólido amarillo claro de aspecto ceroso con un 35% de rendimiento y un líquido incoloro con un 20% de rendimiento.

Con la información obtenida a partir de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se pudo concluir que el producto correspondiente a la mancha de mayor R_f (20% de rendimiento) era oleato de diisopropilo.

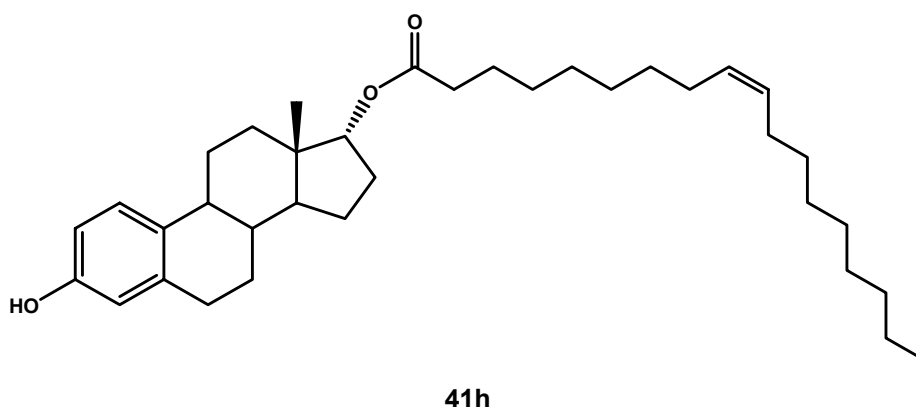
Para identificar el producto de menor R_f se hizo un análisis comparativo de los espectros de este producto, del estradiol libre, de algunos de sus derivados mono y diacilados ya reportados en bibliografía,¹⁰ y de los derivados diacilado y monoacilado en la posición 3 con ácido oleico sintetizados químicamente en nuestro laboratorio. Para este estudio también se consideraron los espectros del ácido oleico libre y de su éster etílico. Se focalizó la atención en los cambios sufridos respecto al estradiol libre de los desplazamientos de los núcleos de ¹H del esqueleto esteroide correspondientes a los grupos metilo 20 y metino 17 (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Corrimientos de los desplazamientos (ppm) de los protones 17 y 20 observados en los espectros de RMN de ^1H en el producto **41h** respecto a los desplazamientos de 3,17 β -estradiol

Protón	Corrimiento
H-20	0,75 \rightarrow 0,83
H-17	3,80 \rightarrow 4,70

Se observó que la señal asignada a los protones de la posición 20 experimentó un corrimiento desde 0,75 ppm en el estradiol libre a 0,83 ppm en el producto obtenido, mientras que el protón del metino 17 sufrió un corrimiento desde 3,80 ppm a 4,70 ppm. Estos datos son consistentes con la presencia de un grupo acilo en el producto. Una vez establecida la acilación en la posición 17 restaba comprobar que no se había producido acilación en la posición 3. Para esta comprobación se analizaron los cambios observados en el espectro de resonancia magnética de los protones correspondientes al anillo aromático A de **40**, es decir aquellos ubicados en la posiciones 1 a 5 y en la posición 10. Se observó que estos protones no sufrieron cambio alguno respecto a los desplazamientos asignados al estradiol libre. Por lo tanto se concluyó que no se había producido acilación en la posición 3.

Por último, analizando el espectro de ^{13}C , se compararon los desplazamientos asignados al carbono carboxílico del ácido oleico y del producto obtenido, observándose un corrimiento desde 180,5 ppm a 174,1 ppm que permitió diagnosticar la formación de la unión éster. Con toda esta información se identificó el producto obtenido como el *cis*-9-octadecenoato de (17 β)-estra-1,3,5-(10)-trien-3,17-diol (**41h**).



En vista de la selectividad lograda en la acilación de **40** con ácido oleico catalizada por la lipasa de *Candida rugosa*, se continuaron los estudios con la finalidad de optimizar el rendimiento de la reacción. Para ello se analizó la influencia de los siguientes parámetros

experimentales sobre la mencionada transformación: efecto del solvente, de la temperatura, de la relación enzima/sustrato (E/S), de la relación agente acilante/ sustrato **40** y de la naturaleza del agente acilante.

4.2.1.1. Estudio del efecto de lipasa y solvente de reacción

Se comenzó realizando un estudio del efecto del solvente sobre la actividad de CRL y CAL B que habían dado los mejores resultados en los estudios previos (Tabla 4.2). Para estas pruebas se utilizó una relación enzima/sustrato de 10, una relación ácido oleico/**40** de 3.0, una temperatura de 33°C y un tiempo de reacción de 5 días. Los porcentajes de conversión fueron establecidos por cromatografía gaseosa.

Tabla 4.2. Influencia de diferentes lipasas y solventes en la reacción de 3,17β-estradiol con ácido oleico catalizada por lipasas

Solvente	Enzima Rendimiento de 41h (%)	
	CAL B	CRL
THF	---	---
DIPE	15	35
Acetonitrilo	---	---
Acetona	---	---
Tolueno	28	60
Dioxano	---	---

Los datos presentados en la Tabla 4.2 muestran que los mejores resultados fueron obtenidos cuando se usaron CRL como biocatalizador y tolueno como solvente. La baja solubilidad del compuesto de partida **40** en tolueno facilitó la separación y recuperación de este compuesto al finalizar la reacción. Para ello, el producto **41h**, soluble en tolueno fue separado de la enzima por filtración. Posteriormente **40** fue recuperado realizando sucesivos lavados con metanol a la mezcla enzima/sustrato. El compuesto así recuperado fue reutilizado en reacciones sucesivas previo análisis por cromatografía gaseosa para comprobar su pureza.

4.2.1.2. Efecto de la temperatura

Para analizar la influencia de la temperatura se repitió la reacción de acilación de **40** en presencia de ácido oleico usando CRL como catalizador a una relación E/S de 10. En la Tabla 4.3 se comparan los rendimientos obtenidos en las reacciones a 33°C y 55°C. Los

tiempos de reacción informados corresponden a los de mayor rendimiento. En ausencia de lipasa no se observó reacción en ninguna de las condiciones ensayadas.

Tabla 4.3. Reacción de 3,17- β -estradiol con ácido oleico catalizada por CRL a 33°C y 55°C.

Temperatura	Tiempo (hs)	Rendimiento (%)
33	96	62
55	72	79

Los resultados presentados en la Tabla 4.3 muestran que el aumento de la temperatura produjo una disminución importante en los tiempos de reacción ya que por ejemplo en el ensayo realizado a 33°C empleando CRL y tolueno la conversión máxima fue alcanzada a las 96 horas mientras que a 55°C el máximo fue observado a las 72 horas. A esta temperatura el rendimiento en cualquiera de las reacciones ensayadas aumentó en forma significativa. También resulta interesante observar que el aumento de temperatura no afectó la selectividad de la reacción.

4.2.1.3. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S)

Se continuó con el estudio del efecto de la relación enzima/sustrato (E/S) para lo cual se usó como modelo la acilación de **40** con ácido oleico catalizada por CRL. Las reacciones se llevaron a cabo empleando cinco relaciones E/S, una temperatura de 55°C, tolueno como solvente y un tiempo de reacción de 72 horas. La formación del producto **41h** fue monitoreada por cromatografía gaseosa (Figura 4.1).

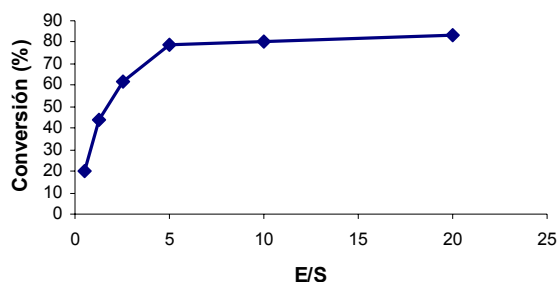


Figura 4.1. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S) sobre la acilación de 3,17- β -estradiol con ácido oleico catalizada por CRL.

De los resultados obtenidos se puede concluir que la relación E/S de 5 es la más conveniente ya que se observó que a relaciones mayores, por ejemplo de 10, se obtenía un rendimiento levemente mayor de 4% y este pequeño aumento en el rendimiento no justificaba aumentar cuatro veces la cantidad de enzima

4.2.1.4. Naturaleza del agente acilante

Otro parámetro que se analizó fue la naturaleza del agente acilante. Con este fin se hizo un estudio comparativo de:

- la reacción de acilación de **40** con ácido oleico y
- transesterificación del oleato de etilo en presencia de **40**

Para este fin se utilizó en ambos casos tolueno como solvente, CRL como biocatalizador, una temperatura de 55°C y 72 horas como tiempo de reacción. En estas condiciones la reacción con oleato de etilo mostró un rendimiento del 39% contra el 79% obtenido con ácido oleico. Resultados similares fueron obtenidos por nuestro grupo cuando se realizó la acilación de piridoxina²² y dehidropiandrosterona¹⁹ y por otros autores cuando estudiaron la preparación del oleato de colesterol²³ y oleatos de fitoesteres.²⁴ En consecuencia en todas las reacciones de acilación de **40** se utilizaron ácidos grasos libres como agentes acilantes. En efecto, el uso de ácidos grasos libres es más conveniente. No sólo son reactivos más económicos sino que facilitan la purificación del producto por cromatografía en columna. Debido a que los Rf de los ésteres etílicos de los ácidos grasos en nuestras condiciones de trabajo son similares a los Rf de los productos **41 a-k**, la purificación resulta compleja. En cambio los Rf de los ácidos grasos libres son menores y muy diferentes en las mismas condiciones de trabajo, lo que añade una ventaja adicional a favor del uso de los ácidos grasos libres como agentes acilantes ya que permite separar los productos en una forma más eficiente.

4.2.1.5. Relación agente acilante/sustrato

Luego del análisis anteriormente descrito se continuó con el estudio del efecto de la relación agente acilante/sustrato (A/S) en la acilación de **40** en presencia de ácido oleico, empleando tolueno y CRL. El curso de las reacciones fue monitoreado por cromatografía gaseosa a las 24 y 72 horas de reacción. Como era esperable, se observó que un exceso molar de ácido graso libre era ventajoso para la reacción (Tabla 4.4), los mejores resultados fueron obtenidos cuando se trabajó con una relación molar ácido oleico/**40** de 2.5, obteniéndose un rendimiento del 79% a las 72 horas de reacción.

Tabla 4.4. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S) sobre la acilación de 3,17 β -estradiol con ácido oleico catalizada por CRL

A/S	Rendimiento(%)	
	24hs.	72hs.
1:1	35	57
2.5:1	66	79
5:1	62	74
10:1	44	70
20:1	38	64

El uso de un gran exceso de ácido oleico produjo una disminución en el rendimiento obtenido. Esta situación podría ser consecuencia de una disminución de la actividad enzimática producida por la disminución del pH del medio de reacción que desencadena el exceso de ácido graso libre cuando se trabaja con relaciones agente acilante/sustrato mayores a 2.5.

4.2.1.6. Condiciones óptimas

Como consecuencia del estudio descrito anteriormente se eligieron como óptimas las siguientes condiciones experimentales:

Enzima	CRL
Solvente	Tolueno
Temperatura	55°C
Tiempo de reacción	72 hs.
Rel. enzima/sustrato (E/S)	5:1
Rel. Agente acilante/sustrato (A/S)	2.5:1

Bajo estas condiciones se pudo obtener el monoéster **41h** con un rendimiento del 79% y una selectividad del 100%.

4.2.1.7. Aplicación de la acilación enzimática de 3,17 β -estradiol (**40**) en presencia de otros agentes acilantes

En vista de los resultados obtenidos en la acilación catalizada por CRL de **40** en presencia de ácido oleico, se decidió estudiar si el comportamiento regioselectivo de la

enzima sobre el hidroxilo ubicado en la posición 17 se conservaba al emplear otros agentes acilantes, tales como ácidos carboxílicos de longitud de cadena variable desde 5 hasta 18 carbonos, tanto saturados como insaturados. Para ello se efectuaron las reacciones a 55°C empleando tolueno como solvente. El análisis por cromatografía gaseosa de las alícuotas provenientes de diferentes tiempos de reacción reveló que a las 72 horas se alcanzaba la conversión máxima (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Reacción de 3,17 β -estradiol con diferentes ácidos grasos catalizada por CRL.

Producto	Agente acilante	Rendimiento
41a	Ácido valérico	67
41b	Ácido caproico	66
41c	Ácido cáprico	69
41d	Ácido láurico	73
41e	Ácido mirístico	78
41f	Ácido palmítico	70
41g	Ácido esteárico	71
41i	Ácido eláidico	75
41j	Ácido linoleico	72
41k	Ácido linolénico	77

Para proceder a la identificación de los productos obtenidos se purificaron mediante cromatografía en columna obteniéndose sólidos blancos cuando se emplearon como agentes acilantes los ácidos valérico, caproico, cáprico y láurico, mientras que con los ácidos: mirístico, palmítico, esteárico, eláidico, linoleico y linolénico, los productos fueron sólidos de aspecto ceroso.

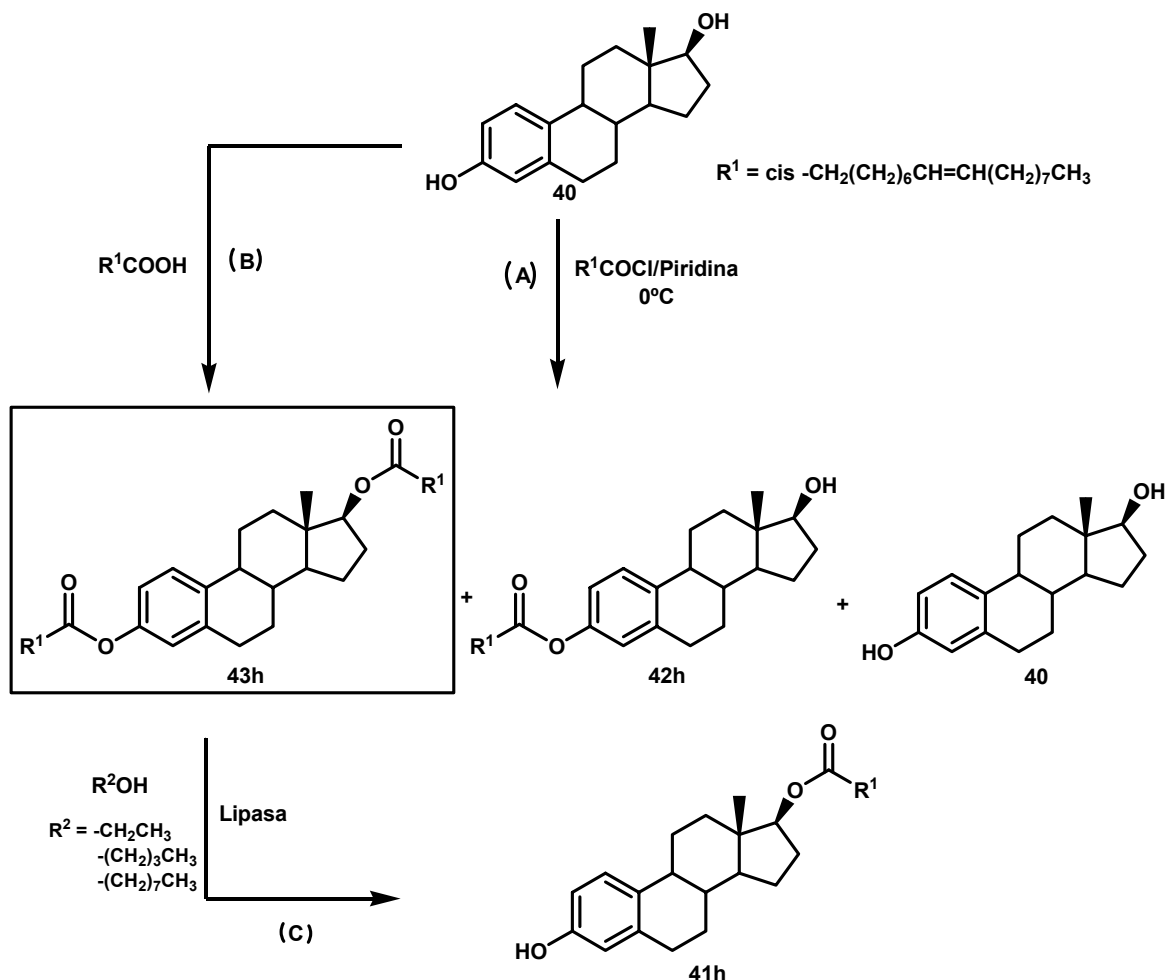
El análisis por RMN de ^1H reveló que todos los productos obtenidos eran los 17-monoésteres derivados de **40**.

Los resultados obtenidos mostraron que la reacción de acilación no fue influenciada por la longitud de cadena o la presencia de insaturaciones en las cadenas de ácidos grasos.

4.3. ALCOHÓLISIS DEL DIOLEATO DE 3,17- β -ESTRADIOL

El paso siguiente consistió en averiguar si las lipasas eran capaces de desacilar en la misma posición donde catalizaban la acilación. Para ello se estudió el comportamiento del dioleato de 3,17- β -estradiol (**43h**) en reacciones de alcoholisis. Dado que el diéster

43h no era comercial, se plantearon dos caminos de obtención de este compuesto (Esquema 4.2), uno químico¹⁰ y otro enzimático.

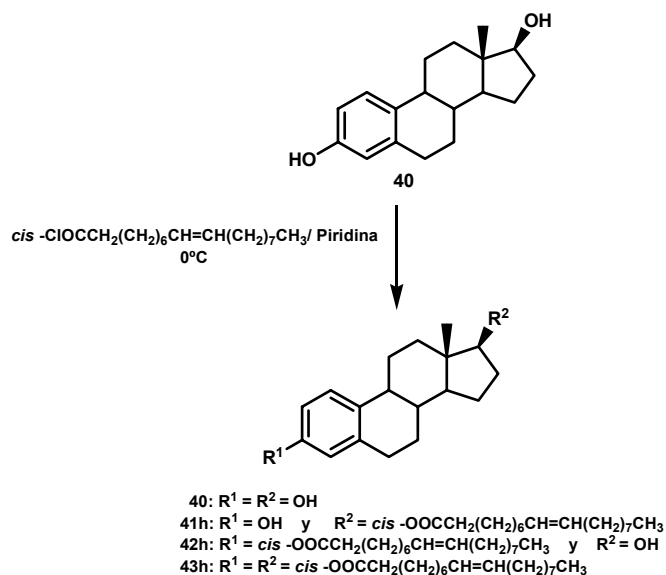


Esquema 4.2. Acilación química de 3,17β-estradiol con cloruro de oleílo (Camino A). Peracilación de 3,17-β-estradiol con ácido oleico catalizada por lipasas (Camino B). Alcohólisis selectiva del diéster **43h** catalizada por lipasas (Camino C).

4.3.1. Preparación de dioleato de 3,17-β-estradiol (**43h**)

4.3.1.1. Preparación química de **43h** (Camino A)

La preparación química consistió en el tratamiento del 3,17β-estradiol (**40**) con cloruro de oleílo en piridina a 0°C (Esquema 4.3) durante una noche con agitación magnética. De esta forma se obtuvo una mezcla de productos que fue separada por cromatografía en columna obteniéndose el dioleato **43h** con un rendimiento del 57%.

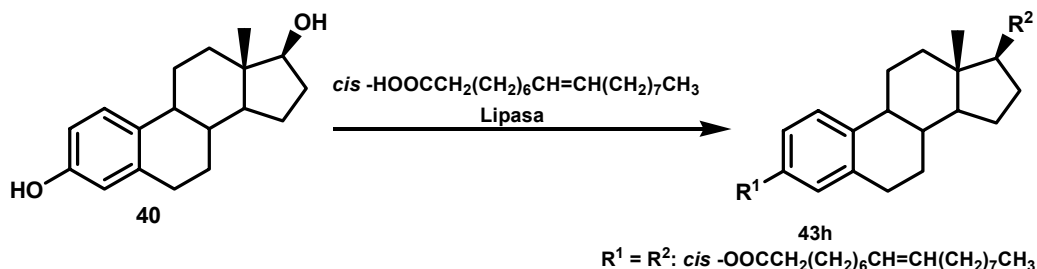


Esquema 4.3. Acilación química de 3,17β-estradiol **40** con cloruro de oleílo (Camino A).

Para determinar la identidad de los productos separados y purificados se hizo uso de la espectroscopía de RMN de 1H y de información espectroscópica reportada en bibliografía de los compuestos **42h** y **43h**. El compuesto que se encontraba en mayor proporción fue identificado como el diéster **43h**, mientras que los compuestos que se encontraban en menor proporción eran los monoésteres **41h** (6%) y **42h** (19%). También se pudo recuperar a través del proceso de purificación una cantidad importante de **40** (18%) sin reaccionar.

4.3.1.2. Preparación enzimática de 43h

La alternativa enzimática resultó en una peracilación de **40** (Esquema 4.4).



Esquema 4.4. Peracilación de 3,17β-estradiol **40** con ácido oleico catalizada por lipasas (Camino B).

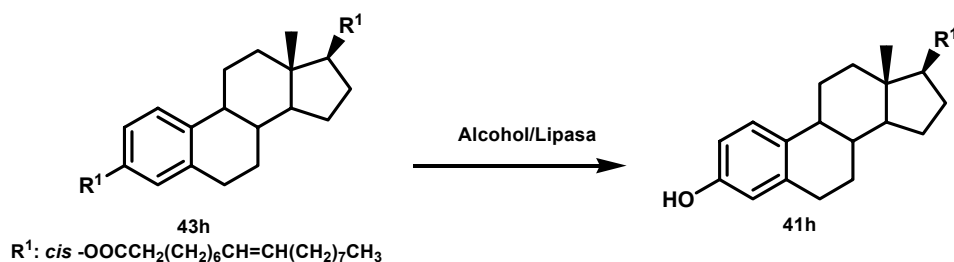
Con este fin se efectuó una reacción enzimática sin solvente, “en pasta”, mezclando el sustrato **40** con la enzima y luego, agregando el ácido oleico en una cantidad tal que se

formara una pasta (relación molar aproximada ácido oleico/40 de 10). Para este ensayo se utilizó CRL como catalizador, una temperatura de 55°C y un tiempo de reacción de 72 horas. Debe aclararse que en estas condiciones el efecto de la agitación fue casi nulo, ya que la mezcla de reacción presentaba una fuerte resistencia. Una vez terminada la reacción el producto obtenido fue purificado por cromatografía en columna e identificado como el diéster **43h** por espectroscopia de RMN de ^1H . De esta forma el producto **43h** fue obtenido con un rendimiento del 92%. Debemos remarcar que este fue el único producto que se obtuvo, este resultado se verificó tomando una muestra del crudo de reacción y analizando la misma por cromatografía gaseosa utilizando como estándares para dicho análisis muestras de los monoésteres **41h** y **42h**. La identidad de estas muestras había sido confirmada previamente por espectrometría de masa y espectroscopia de RMN de ^1H .

Este resultado es muy interesante ya que en las condiciones anteriormente descritas la enzima perdió por completo la selectividad observada en los ensayos en que se utilizó tolueno como solvente y se obtenía exclusivamente el derivado monoacilado **41h**.

Si comparamos las alternativas química y enzimática en la obtención del diéster **43h**, podemos concluir que esta última resultó ser más ventajosa ya que en su desarrollo no se utilizan solventes ni reactivos tóxicos y sensibles a la humedad como el cloruro de oleilo y la piridina. Además se reduce el número de pasos de síntesis debido a la alta selectividad que muestra la CRL hacia la diacilación, lo cual reduce los costos, el tiempo de trabajo y la complejidad de la síntesis. Por último se puede indicar que en la alternativa enzimática los efluentes generados son prácticamente nulos ya que no se utilizó solvente y los reactivos sin reaccionar fueron recuperados y utilizados en procesos posteriores. Estas últimas observaciones permiten encuadrar a la alternativa enzimática dentro de la denominada "Química Verde".

4.3.1.3. Reacción de alcoholísis del dioleato de 3,17 β -estradiol (**43h**)



Esquema 4.5. Alcoholísis selectiva del diéster **43h** catalizada por lipasas (Camino C).

Los estudios sobre las reacciones de alcoholisis de **43h** comenzaron empleando diferentes alcoholes como nucleófilos, en algunos casos también como solventes, y diferentes lipasas como catalizadores (Esquema 4.5).

La mezcla de reacción se agitó a 30°C y 55°C. Con el fin de obtener la temperatura y el tiempo óptimos de reacción se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se analizaron por cromatografía gaseosa.

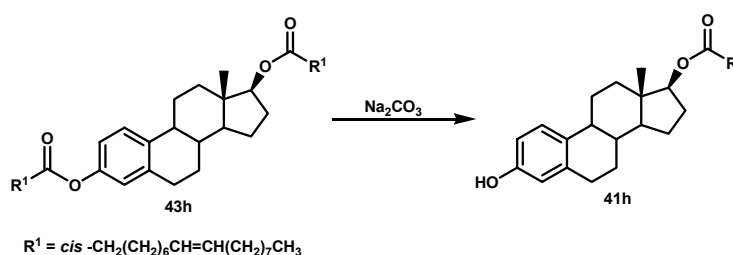
A partir de esta información se pudo concluir que la máxima conversión se obtuvo empleando una temperatura de 55°C, un tiempo de reacción de 48 horas y CAL B como catalizador. Este valor máximo dependió del alcohol utilizado como nucleófilo y solvente (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Alcoholisis regioselectiva del diéster **43h** catalizada por CAL B

Alcohol	Rendimiento (%)
Etanol	95
Butanol	94
Octanol	90

Los resultados de la Tabla 4.6 muestran que el aumento en la longitud de la cadena alquímica del alcohol utilizado produjo una leve disminución en el rendimiento observado. Por otra parte el uso de octanol como nucleófilo y solvente tiene una desventaja adicional: debido a su alto punto de ebullición es difícil de eliminar por evaporación a presión reducida una vez terminada la reacción.

4.3.1.4. Hidrólisis quimioselectiva del dioleato de 3,17-estradiol (**43h**)

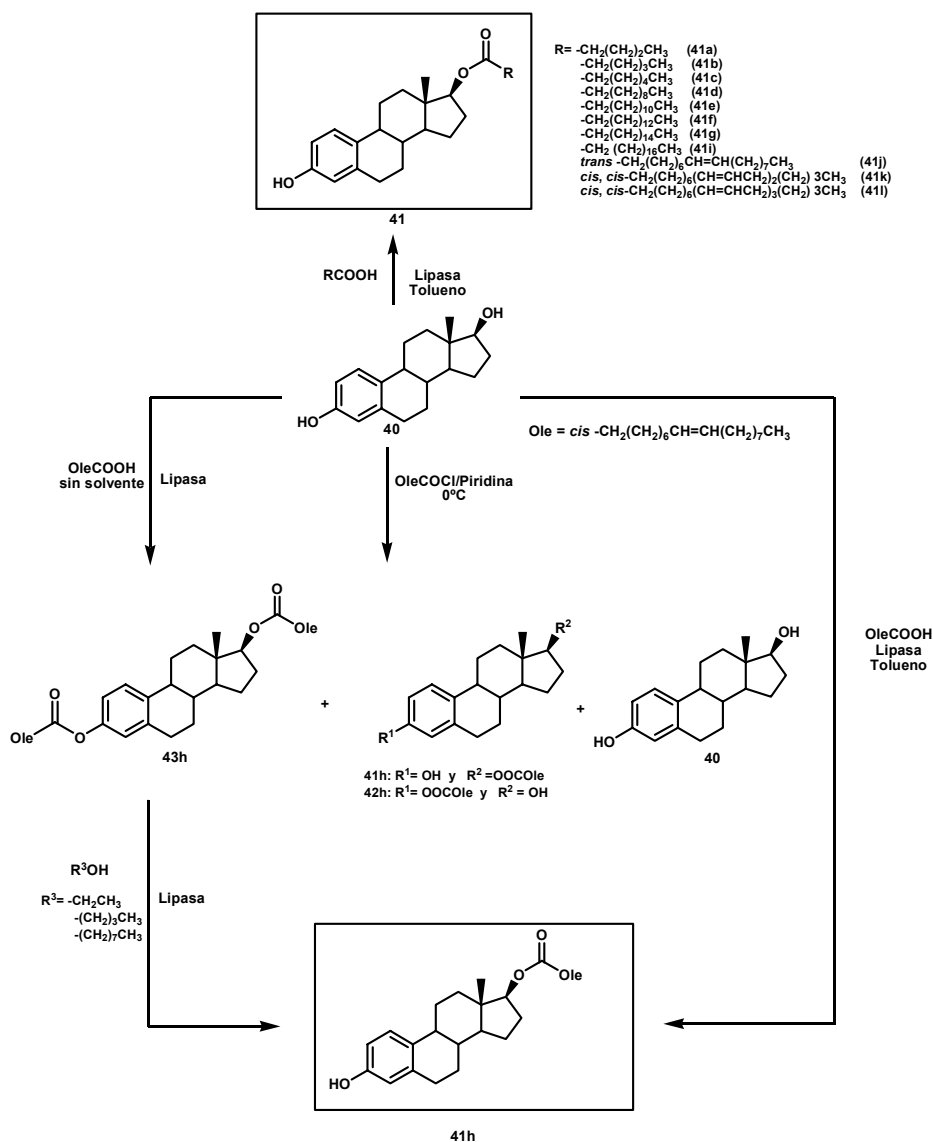


Esquema 4.6. Hidrólisis quimioselectiva del diéster **43h**

Con el objeto de comparar los resultados obtenidos en las estrategias quimioenzimática y enzimática con la convencional se decidió obtener el compuesto **41h** a partir de la hidrólisis quimioselectiva del diéster **43h** en presencia de carbonato de sodio. Bajo estas condiciones el compuesto **41h** fue obtenido con un rendimiento del 91% (Esquema 4.6).

Resumiendo, la alternativa consistente en la obtención del derivado **41h** a partir de la alcoholisis enzimática del compuesto **43h** (también sintetizado enzimáticamente a partir de estradiol **40**) utilizando etanol como nucleófilo y solvente mostró un rendimiento global del 87% (desde **40**). Estos resultados fueron muy alentadores a favor de esta estrategia. Sin embargo, la alternativa de la acilación de **40** catalizada por lipasas en presencia de ácido oleico mostró ser más ventajosa debido a que el proceso consta de un sólo paso y el rendimiento no es mucho menor (79%) que el rendimiento observado en la alternativa de la alcoholisis. Además se debe tener en cuenta que en esta última se requiere un gran exceso de agente acilante en la etapa de diacilación de **40**.

CONCLUSIÓN



Esquema 4.7. Caminos sintéticos para obtener derivados monoacilados en la posición 17 del 3,17-β-estradiol (**40**).

Trabajando en medio orgánico, se utilizaron lipasas de distintas fuentes como biocatalizadores en reacciones de acilación y alcoholólisis para obtener en forma regioselectiva, derivados monoacilados de 3,17 β -estradiol. Las lipasas también permitieron obtener el derivado diacilado **43h** utilizado luego como material de partida en la reacción de alcoholólisis enzimática.

En las reacciones de acilación regioselectiva las enzimas actuaron en forma exclusiva sobre el sustituyente presente en la posición 17 del anillo D del esqueleto esteroideal, mientras que, en las reacciones de alcoholólisis, la posición 3 del anillo A fue la única reactiva. El uso de ácido oleico como agente acilante y en ausencia del solvente tuvo como efecto la pérdida de la regioselectividad observada en las reacciones anteriores haciendo posible obtener el derivado diacilado **43h** (Esquema 4.7).

En la Tabla 4.8 se presentan algunas de las características más importantes de las estrategias:

- (A) Convencional: acilación química + hidrólisis química.
- (B) Quimioenzimática: acilación química + alcoholólisis enzimática.
- (C) Enzimática: acilación enzimática + alcoholólisis enzimática.
- (D) Enzimática: acilación enzimática.

Tabla 4.8. Comparación de las características de las estrategias quimioenzimáticas, enzimática química desarrolladas para obtener el producto **41h**

Estrategia	Características
A	<ul style="list-style-type: none"> • Se utilizan piridina y cloruro de oleilo en la etapa de acilación. • En la etapa de acilación además del producto 43h se genera una mezcla de productos secundarios. • Uso de benceno en la purificación del producto 41h. • Generación de una cantidad importante de efluentes. • El agente acilante sin reaccionar no se puede recuperar para ser reutilizado en procesos posteriores. • El rendimiento global de la reacción es menor a cualquiera del obtenido en cualquiera de las otras tres estrategias (46%)
B	<ul style="list-style-type: none"> • Aumenta el rendimiento global de la reacción (54%) respecto a la estrategia A. • Se eliminó el uso de benceno en la purificación del producto 41h. • Se disminuyó la cantidad de efluentes.
C	<ul style="list-style-type: none"> • En la etapa de acilación enzimática se elimina el uso de cloruro de oleilo y piridina. • Se recuperan los sustratos pudiéndose reutilizar los mismos en futuros procesos. • Se obtiene un rendimiento mayor respecto a cualquiera de las otras tres

Tabla 4.8. Continuación

	<p>estrategias analizadas (87%) cuando se utilizó etanol como nucleófilo y solvente en la etapa de alcoholólisis enzimática.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se utiliza un exceso importante de agente acilante respecto a la estrategia D. • La cantidad de efluentes generados es menor que en las estrategias A y B. • La etapa de acilación se desarrolla en ausencia de solvente.
D	<ul style="list-style-type: none"> • Obtención del producto 41h en una sola etapa. • El rendimiento de 41h fue del 79%. • La cantidad de agente acilante utilizada es menor que en la estrategia C. • Se utiliza tolueno como solvente de reacción. El uso de este solvente no aumenta los efluentes generados ya que puede ser destilado y reutilizado en procesos futuros. • Reciclado de enzima. • Reciclado de sustrato 40

De la información presentada en la Tabla 4.8 se puede concluir que cualquiera de las tres estrategias enzimáticas desarrolladas, una quimioenzimática (**B**) y dos enzimáticas (**C** y **D**), no sólo requieren de condiciones de reacción más suaves y menos contaminantes sino que brindan un rendimiento que supera ampliamente al obtenido mediante la ruta sintética convencional.

Bibliografía

1. S. Ayres, M. Tang, M.T. Subbiah, *J. Lab. Clin. Med.* 128 (1996) 367.
2. V.A. Rifici, A.K. Kahchadurian, *Metabolism* 41 (1992) 1110.
3. C. Maziere, M. Auclair, M.F. Ronvezux, *Atherosclerosis* 89 (1991) 175.
4. M. Nakano, K. Sugioka, I. Naito, S. Takekoshi, E. Niki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142 (1987) 919.
5. M.B. Ruiz-Larrea, A.M. Leal, M. Liza, M. Lacort, H. de Groot, *Steroids* 59 (1994) 383.
6. C.P. Miller, I. Jirkovsky, D.A. Hayhurst, S.J. Adelman, *Steroids* 61 (1996) 305.
7. K. Mukai, K. Daifuku, S. Yokohama, M. Nakano, *Biochim. Biophys. Acta* 1035 (1990) 348.
8. M.J. Tikkanen, H. Adlercreutz, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 1.
9. D.L. Jones, V.H.T. James, *J. Steroid Biochem.* 22 (1995) 243.
10. J.M. Lerner, S.L. Pahuja, C.H. Shackleton, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 13893.
11. R.B. Hochberg, *Endocr. Rev.* 19 (1998) 331.
12. J. Lerner, C. Shackleton, E. Roitman, P. Schwartz, R. Hochberg, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 75 (1992) 195.
13. M. Ferrero, V. Gotor, In *Stereoselective Biocatalysis*; Patel, R. M., Ed.; Marcel Dekker: New York, 2000; pp 579-631.
14. M.M. Cruz Silva, S. Riva, M.L. Sá e Melo, *Tetrahedron* 61 (2005) 3065.
15. F. Secundo, G. Carrea, M. De Amici, S. Joppolo di Ventimiglia, J.S. Dordick, *Biotechnol. Bioeng.* 81 (2003) 391.
16. A. Bertinotti, G. Carrea, G. Ottolina, S. Riva, *Tetrahedron* 50 (1994) 13165.
17. M.M. Cruz Silva, M.M. Sá e Melo, M. Parolin, D. Tessaro, S. Riva, B. Danieli, *Tetrahedron: Asymmetry* 15 (2004) 21.
18. A. Baldessari, M.S. Maier, E.G. Gros, *Tetrahedron Lett.*, 36 (1995) 4349.
19. A.C. Brutomesso, A. Tiscornia, A. Baldessari, *A. Biocatal. & Biotransf.* 22 (2004) 215.
20. A. Baldessari, A.C. Bruttomesso, E.G. Gros, *Helv. Chim. Acta* 79 (1996) 999.
21. A.C. Brutomesso, A. Baldessari, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 29 (2004) 149.
22. A. Baldessari, C.P. Mangone, *Biocatal. Biotransform.* 20 (2002) 275.
23. N. Weber, P. Weitkamp, K.D. Mukherjee, *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 67.
24. P. Villeneuve, F. Turon, Y. Caro, R. Escoffier, B. Baréa, B. Barouh, R. Lago, G. Piombo, M. Pina, *Enzyme Microb. Technol.*, 37 (2005)150.

Capítulo V

Resultados y discusión

5. SÍNTESIS QUIMIOSELECTIVA DE N-(HIDROXIALQUIL)-ACRILAMIDAS CATALIZADA POR LIPASAS

5.1. INTRODUCCIÓN

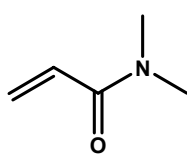
La electroforesis en geles es ampliamente utilizada en la separación de macromoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos. Los geles más utilizados son agrupados en la familia de las poliacrilamidas.

La manipulación de estos geles es una tarea tediosa ya que deben ser pretratados y comercializados en soluciones buffers a un pH entre 8 y 9. Bajo estas condiciones, los geles se descomponen a partir de los cuatro meses de almacenamiento a 4°C. Esta descomposición provoca una disminución en la movilidad electroforética de las macromoléculas que tiene como efecto una disminución en la resolución de la separación. La descomposición de los geles es atribuida a la degradación hidrolítica de las unidades de acrilamida. Este fenómeno hace que resulte muy difícil almacenar grandes cantidades de poliacrilamida durante largos períodos de tiempo, sin que se observe la descomposición del material.

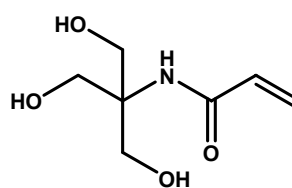
Para evitar la mencionada descomposición es necesario utilizar soluciones buffers no alcalinas en el almacenamiento de las poliacrilamidas, o bien encontrar materiales que, manteniendo la capacidad de resolución de los geles de poliacrilamida, sean más estables.

Algunos grupos de investigación desarrollaron sistemas de buffers neutros.¹ Los geles de poliacrilamida almacenados con estas nuevas soluciones aumentaron significativamente sus tiempos de vida útil. Sin embargo, los patrones de separación de proteínas obtenidos con estos nuevos buffers son diferentes de aquellos obtenidos en condiciones alcalinas basadas en el sistema Laemmli.²

Considerando estos resultados, diferentes grupos de investigación comenzaron a estudiar el comportamiento de varios monómeros vinílicos derivados de aminas sustituidas con el fin de reemplazar la acrilamida. Entre estos monómeros se pueden mencionar la N,N'-dimetilacrilamida (DMA)³ (**74**) y el N-acrilóil-tris-(hidroximetil)-aminometano (NAT) (**75**).⁴



74



75

Los geles preparados con DMA fueron más estables que aquellos preparados con acrilamida, pero la DMA es muy hidrofóbica, y sólo es útil en un número reducido de aplicaciones electroforéticas tales como el análisis de ciertos ácidos nucleicos. En cambio, el NAT mostró ser un monómero muy hidrofílico, sus geles presentaron un patrón de separación similar a los de acrilamida, pero su estabilidad fue menor.

Utilizando modelado molecular, Miertus y col.⁵ concluyeron que cuando hay dos átomos entre el enlace amida y el grupo hidroxilo, como es el caso del NAT, el grupo hidroxilo facilita la hidrólisis del enlace amida.

En 1995 Righetti y col.⁶ reportaron el uso de acrilamidas y metacrilamidas derivadas de aminas N-mono- y N-disustituidas en electroforesis en geles.

La N-(hidroxietoxietil)-acrilamida (HEEAA) resultó tener la mayor hidrofiliidad y mejor resistencia a la hidrólisis alcalina.

A diferencia de la electroforesis en geles, en la electroforesis capilar (EC) se utilizan polímeros no entrecruzados. Un problema intrínseco de la EC es el flujo electroosmótico (FEO) que debe ser suprimido con el fin de obtener una buena resolución. En general, los capilares utilizados en EC son de sílica fundida. Los grupos silanoles de la superficie interna se encuentran cargados negativamente bajo condiciones de trabajo alcalinas, esta situación provoca que, cuando se aplica una diferencia de potencial, la solución en el interior del capilar es arrastrada hacia el cátodo. Este fenómeno retrasa la migración de los componentes de la solución cargados negativamente y obstaculiza la separación por tamaño de los componentes de una muestra. En consecuencia es necesario neutralizar las cargas mencionadas con el fin de minimizar o, en el mejor de los casos, eliminar el FEO.

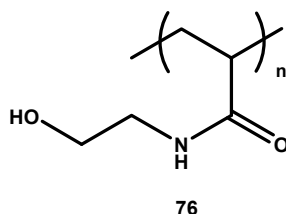
Para neutralizar las cargas y evitar el FEO algunos investigadores comenzaron a considerar la posibilidad de someter la pared interna del capilar a un tratamiento físico. Dicho tratamiento consistía en la adsorción de un material polimérico sobre la pared del capilar. Esta alternativa tenía dos ventajas muy importantes:

- La eliminación física del FEO era mucho más rápida y simple de realizar que la supresión química de este fenómeno.
- Una disminución en el costo de la EC ya que se planteaba la posibilidad de que no ocurriera la hidrólisis de los enlaces amida y por lo tanto la vida útil de los capilares sería mayor.

Madabhushi⁷ continuó estudiando la aplicación de poliacrilamidas N-sustituidas en EC, encontrando que cierto tipo de poli(N-(hidroxialquil)-acrilamidas) mostraba una alta versatilidad ya que podían ser aplicadas a muestras de diferente naturaleza. Sin

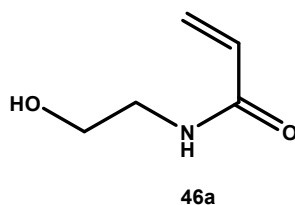
embargo, no era posible subsanar el problema de la disminución en la resolución de las separaciones realizadas.

Haciendo caso omiso a los resultados obtenidos por Madsabushi, Garner y Kusakawa⁸ aplicaron la PHEAA (**76**) a la secuenciación de ADN por EC y electroforesis en geles.



Estos investigadores encontraron que la resolución obtenida con la PHEAA era superior a la observada con poliacrilamida. Ellos estudiaron la aplicación de otras poli(N-(hidroxialquil)-acrilamidas), sin embargo ninguna de ellas permitió obtener los buenos resultados observados con la PHEAA.

La PHEAA se obtiene a partir de la polimerización de N-(hidroxietyl)-acrilamida **46a**.



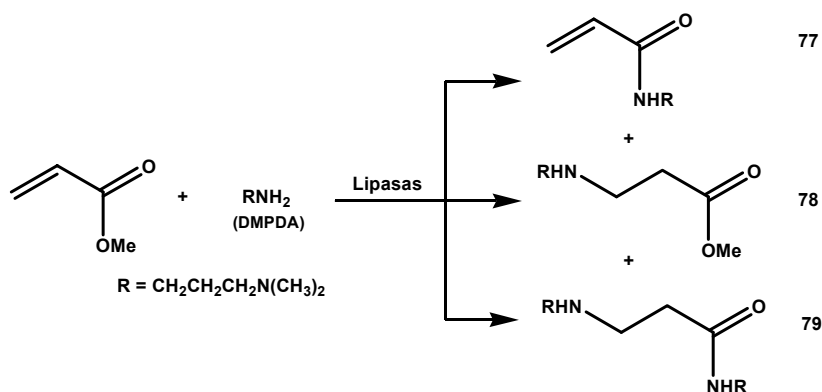
Existen varios métodos de obtención de este monómero descritos en bibliografía. El primero de ellos fue reportado por Chen en 1986.⁹ En este método, que involucra un sistema monofásico, se hizo reaccionar cloruro de acrilóilo con un exceso de etanolamina (relación molar 1:2) utilizando acetonitrilo como solvente. De esta manera se pudo obtener la HEAA con un alto rendimiento y no fue necesaria una purificación del producto. Sin embargo, cuando se eliminó el acetonitrilo por destilación, se observó la polimerización del monómero.

En 1996, Saito y col¹⁰ reportaron un método de “dos fases” para obtener la HEAA. En esta metodología de dos fases, la fase orgánica contiene cloruro de acrilóilo y acetato de etilo, mientras que la fase acuosa contiene hidróxido de sodio y etanolamina. El producto fue recuperado desde la fase orgánica y purificado por cromatografía en columna. La HEAA es muy soluble en agua por lo tanto su recuperación con acetato de etilo fue poco eficiente. Además, el uso de la cromatografía en columna para purificar el producto hace inviable la producción de la HEAA a gran escala.

También en 1996, Righetti y col.¹¹ informaron un nuevo procedimiento que involucraba un sistema monofásico para producir HEAA. Ellos indicaron que el etanol era el mejor solvente para esta metodología, pero como el etanol puede llegar a reaccionar con el cloruro de acilo, es necesario efectuar la reacción a temperaturas muy bajas. Por otro lado también era necesario purificar el producto a través de cromatografía en columna. Posteriormente Jones¹² describió una nueva metodología para producir la HEAA a partir de etanolamina y acrilatos de alquilo (C1-C22). En este camino el monómero no era aislado para su posterior polimerización.

En el año 1998 Garner y Kusakawa⁸ pudieron obtener la HEAA con un alto rendimiento y una alta pureza, por reacción del cloruro de acilo y etanolamina. Como solvente se utilizó acetonitrilo. La reacción fue realizada a baja temperatura y atmósfera inerte. La diferencia fundamental con las metodologías desarrolladas anteriormente residió en la etapa de aislamiento del producto. Garner y Kusakawa filtraron la solución del crudo de reacción para separar el clorhidrato de etanolamina, luego agregaron a la solución agua desionizada y evaporaron el solvente a presión reducida manteniendo la temperatura a 25°C. Finalmente la solución acuosa de HEAA se trató con resinas de intercambio iónico con el fin desionizar el medio. De esta manera Garner y Kusakawa pudieron obtener la HEAA con alta pureza. El inconveniente de esta metodología es que las soluciones acuosas de HEAA nunca superan una concentración del 50%. Además este procedimiento, a pesar de evitar la purificación por cromatografía en columna, presenta una etapa de aislamiento que debe ser realizada con mucho cuidado con el fin de evitar la polimerización de la HEAA.

En vista de los resultados presentados anteriormente, y la necesidad de encontrar una estrategia que permitiera obtener N-(hidroxialquil)acrilamidas en forma simple y eficiente, emprendimos la tarea de estudiar la reacción de acrilato de etilo con diferentes hidroxialquilaminas catalizada por lipasas.

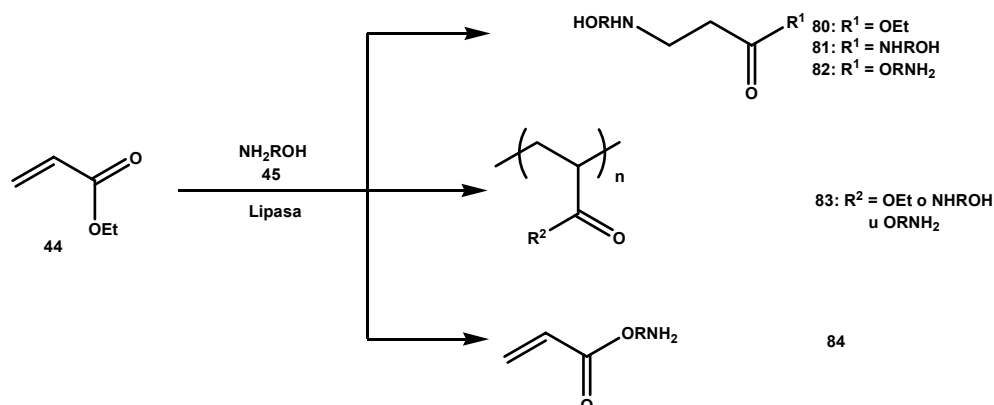


Esquema 5.1. Productos obtenidos por Gotor y col. durante el estudio de la reacción de acrilato de metilo y N,N-dimetil-1,3-propanodiamina (DMPDA) catalizada por lipasas

La síntesis enzimática de acrilamidas derivadas de diaminas fue reportada por Gotor y col.¹³ Obtuvieron la N-(4-metil-4-azapentil)-acrilamida **77** a partir de acrilato de metilo y N,N-dimetil-1,3-propanodiamina (DMPDA) utilizando diferentes lipasas como catalizadores. Además del producto deseado obtuvieron los productos de adición de Michael **78** y **79** (Esquema 5.1).

La síntesis de las N-(hidroxialquil)-acrilamidas a partir de acrilato de etilo **44** y las N-alquilaminas **45** catalizada por lipasas presentaba un desafío doble (Esquema 5.2):

- En primer lugar evitar la generación de los productos secundarios generados por adición de Michael y por la polimerización de acrilato de etilo y las N-(hidroxialquil)-acrilamidas **80-83**.
- En segundo lugar conseguir que la reacción de aminólisis prevaleciera sobre la reacción de transesterificación para obtener sólo las acrilamidas en lugar de los aminoésteres **84**.



Esquema 5.2. Posibles productos secundarios formados en la reacción de acrilato de etilo **44** con las N-alquilaminas **45** catalizada por lipasas

5.2. OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES EXPERIMENTALES

Se comenzó empleando acrilato de etilo como donador de acilo y etanolamina **45a** como nucleófilo, empleando condiciones experimentales similares a las optimizadas en nuestro laboratorio para aminólisis catalizadas por lipasas en otros sistemas.¹⁴ Las primeras pruebas se llevaron a cabo a 25°C, utilizando una relación enzima/sustrato (E/S) de 5.0, una relación etanolamina/acrilato de etilo de 1.3, acetonitrilo como solvente y lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CAL B) como catalizador. Se tomaron alícuotas de los diferentes ensayos a diferentes tiempos y se analizaron por espectroscopia de RMN de ¹H observándose que en ninguno de los casos se había obtenido el producto deseado. Ante estos resultados se decidió realizar nuevos ensayos utilizando las condiciones optimizadas por Gotor y col.¹³ para la obtención de la N-(4-metil-4-azapentil)-acrilamida

77. Trabajando en esas condiciones los resultados fueron desalentadores ya que no se pudo obtener el producto deseado.

Considerando estos resultados se realizaron nuevos ensayos variando los siguientes parámetros experimentales:

- Tipo de lipasa
- Solvente
- Concentración de sustratos
- Temperatura
- Agregado de inhibidores de radicales
- Tiempo de reacción
- Relación enzima/sustrato (E/S)

En todos estos ensayos se utilizaron acrilato de etilo como agente acilante (AA) y etanolamina como nucleófilo (N).

5.2.1 Efecto del tipo de lipasa, solvente y temperatura

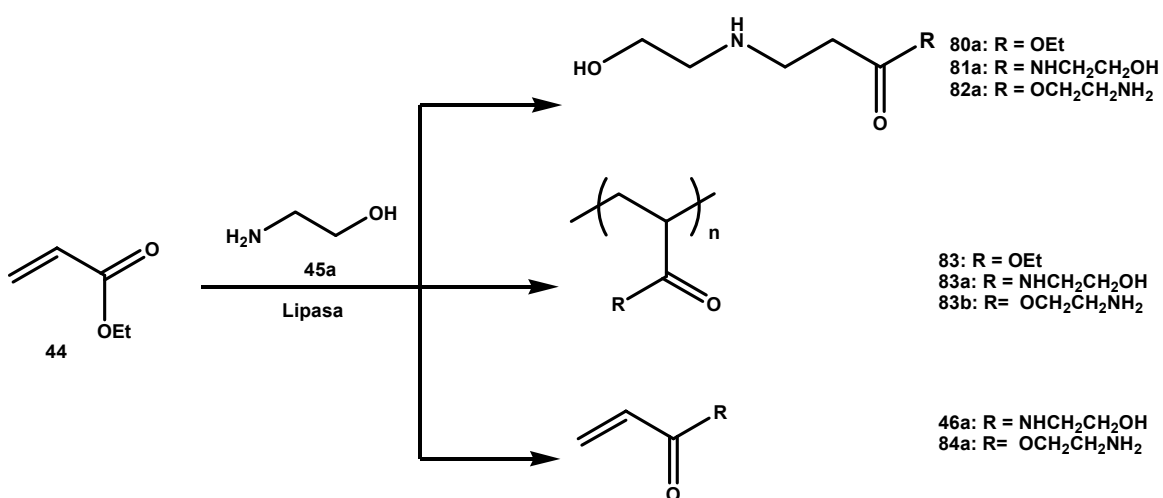
En primer lugar se realizaron varios ensayos con el fin de estudiar el efecto del origen de la lipasa y el solvente de reacción. Para este fin se utilizaron lipasas de cinco fuentes diferentes: lipasa de pancreática porcina (PPL), lipasa de *Rhizomucor miehei* (LIP), lipasas de *Candida antarctica* tipos A y B (CAL A y CAL B) y lipasa de *Candida rugosa* (CRL). Los solventes ensayados fueron: dioxano, acetonitrilo, acetona, tetrahidrofurano (THF), diisopropiléter (DIPE) y hexano. Los experimentos fueron desarrollados a tres temperaturas diferentes (18°C, 25°C y 30°C) durante 24 horas, empleando una relación AA/N de 1.0 y una relación E/S de 7.0, trabajando con una concentración de sustratos de 1.5 M. En la Tabla 5.1 se presentan en forma resumida los resultados obtenidos.

A partir de los resultados presentados en la Tabla 5.1 podemos indicar que se observaron los peores rendimientos del producto **46a** a 30°C, mientras que los mejores fueron alcanzados cuando se trabajó a 18°C.

En todos los casos la mezcla de reacción estaba formada principalmente por los aductos de Michael **80a-81a** y un material polimérico (**83a**) (Esquema 5.3). En ninguno de los ensayos se detectó la presencia de los productos de transesterificación **84a**.

Tabla 5.1. Resultados obtenidos en el estudio de los efectos de las variaciones de temperatura, tipo de lipasa y solvente de reacción

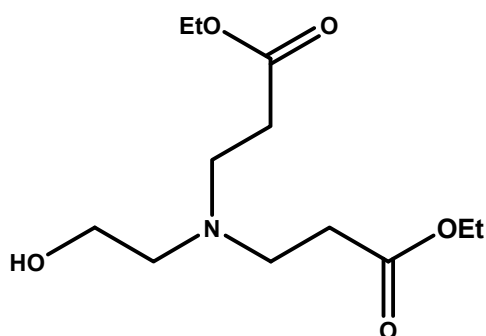
Solvente	Temperatura (°C)	Rendimiento del producto 46a (%)					
		Sin enzima	CAL B	CAL A	CRL	LIP	PPL
Dioxano	18	---	8	6	6	5	3
Acetona	18	---	5	5	3	5	2
Acetonitrilo	18	---	9	2	6	4	5
THF	18	---	9	5	6	9	4
DIPE	18	---	12	5	8	10	7
Hexano	18	---	---	---	---	---	---
Sin solvente	18	---	---	---	---	---	---
Dioxano	25	---	6	5	5	3	2
Acetona	25	---	4	6	2	4	2
Acetonitrilo	25	---	7	6	2	4	2
THF	25	---	8	4	1	7	3
DIPE	25	---	10	6	7	9	5
Hexano	25	---	---	---	---	---	---
Sin solvente	25	---	---	---	---	---	---
Dioxano	30	---	3	2	2	1	---
Acetona	30	---	3	1	3	3	---
Acetonitrilo	30	---	4	4	2	3	1
THF	30	---	5	3	1	4	2
DIPE	30	---	9	6	5	7	4
Hexano	30	---	---	---	---	---	---
Sin solvente	30	---	---	---	---	---	---



Esquema 5.3. Reacción de acrilato de etilo **44** y etanolamina **45a** catalizada por lipasas

A 18°C se pudo obtener el producto **46a** con un rendimiento del 12% cuando se emplearon CAL B como catalizador y DIPE como solvente. Otro dato importante es que a 30°C la proporción de producto polimérico aumentaba pero también aumentaba la fracción de residuos amida en el mismo. Este dato permitía concluir que el aumento en la temperatura de reacción favorecía la reacción de aminólisis.

En ausencia del catalizador sólo se obtuvo el producto **80a** con un rendimiento del 30% mientras que cuando se utilizó hexano como solvente y cualquiera de las lipasas como catalizador sólo se obtuvo el producto de doble adición de Michael **85** con un rendimiento máximo del 70% en el caso de CAL B.



85

Cuando los ensayos fueron realizados sin solvente sólo se obtuvo una mezcla de los productos **80a**, **81a** y **83a**. Resultados similares fueron obtenidos cuando se realizaron ensayos a temperaturas menores a 18°C.

A pesar de que los resultados hasta ese momento no eran muy alentadores, los ensayos realizados habían permitido identificar el sistema enzima/solvente más apropiado para obtener el producto **46a**. El próximo paso consistía en estudiar el efecto de la concentración de los sustratos en la mezcla de reacción.

5.2.2. Efecto de la concentración de los reactivos en el medio de reacción

Trabajando con una relación **44/45a** 1:1 se estudió el efecto de la concentración de los reactivos sobre el rendimiento del producto **46a**.

En la Tabla 5.2 se presentan los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la concentración de cada uno de los reactivos en el medio de reacción. Para este análisis se empleó CAL B como catalizador, DIPE como solvente y una relación E/S de 7.0, llevándose a cabo la reacción a 18°C durante 24 horas.

Tabla 5.2. Efecto de la concentración de acrilato de etilo [44] y etanolamina [45] en el medio de reacción sobre el rendimiento del producto **46a**

[44]	[45]	Rendimiento del producto 46a (%)
0.1	0.1	29
0.6	0.6	29
1.0	1.0	15
1.6	1.6	10
2.0	2.0	7
2.5	2.5	5
3.0	3.0	3

De los resultados de la Tabla 5.2 podemos concluir que una disminución en la concentración de los reactivos favorece la quimioselectividad de la síntesis prevaleciendo la reacción de aminólisis sobre las reacciones de adición de Michael y de polimerización, y pudiéndose obtener un rendimiento mayor del producto **46a**. Debido a que en el intervalo de concentración de los reactivos entre 0.6 y 1.0 se observó la mayor variación en el rendimiento de **46a**, se decidió realizar un nuevo análisis del efecto de este parámetro circunscrito a este intervalo (Figura 5.1).

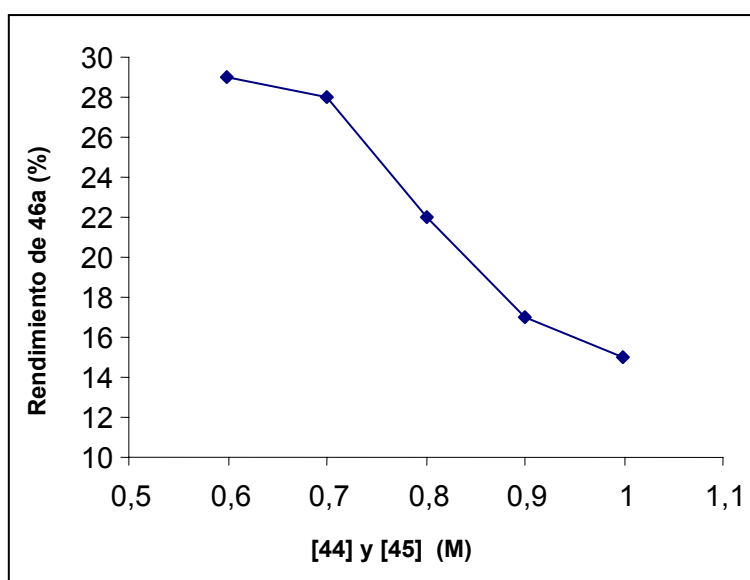


Figura 5.1. Influencia de la concentración de reactivos en el rango 0.6-1.0 M en la formación del producto **46a** catalizada por CAL B

La información presentada en la Figura 5.1 permite concluir que trabajando con valores de concentración de reactivos menores o iguales a 0.7 M el rendimiento del producto **46a** no varía sustancialmente (28%). Se eligió trabajar con una concentración de reactivos 0.7 M ya que la diferencia respecto a una concentración 0.6 M era despreciable y resultaba más conveniente trabajar con una concentración mayor.

A pesar de la sustancial mejora obtenida (28% contra 12%, ver Tabla 5.1), el rendimiento aun no era satisfactorio. Debido a esta situación se buscó una alternativa que permitiera eliminar la generación de la mezcla polimérica **83a** como subproducto. Trabajando con una concentración de cada uno de los reactivos 0.7 M y empleando CAL B como catalizador y DIPE como solvente se pudo comprobar la ausencia de los productos de adición de Michael **80a** y **81a**. Por otra parte se deseaba aumentar la temperatura de trabajo desde 18°C hasta 30°C ya que, como se había observado en los primeros ensayos, este aumento generaba un grado mayor de aminólisis.

En resumen, se buscaba poder trabajar a una temperatura de 30°C o mayor para favorecer la reacción de aminólisis, y por otra parte que este aumento de temperatura no favoreciera la formación de productos poliméricos.

5.2.3. Efecto del agregado de inhibidores de radicales y temperatura

Chen había reportado que el agregado de 4-metoxifenol como inhibidor de radicales a la mezcla de reacción antes del aislamiento del producto, podía prevenir la polimerización de N-(hidroxialquil)-acrilamidas.⁹ Por lo tanto, se decidió estudiar el efecto del agregado de diferentes inhibidores de radicales en la reacción de acrilato de etilo con etanolamina catalizada por lipasas a distintas temperaturas. Para los nuevos ensayos (Tabla 5.3) se utilizaron cuatro inhibidores de radicales a una concentración de 3% p/p: *p*-benzoquinona (PBQ), N-fenil-2-naftilamina (NFNA), ciclohexeno (CH) y 2,6-di-*ter*-butil-4-metilfenol (BHT), cinco lipasas comerciales diferentes: PPL, CRL, LIP, CAL A y CAL B, DIPE como solvente y tres temperaturas diferentes: 30°C, 40°C y 55°C durante 24 horas.

En la Tabla 5.3 podemos observar que en todos los casos el agregado de un inhibidor de radicales aumentó el rendimiento del producto **46a**, este efecto alcanzó su valor máximo (95%) cuando se utilizaron CAL B como biocatalizador y BHT o PBQ como inhibidores de radicales trabajando a 40°C. Sin embargo los análisis por espectroscopia de RMN protónica de los productos de los ensayos realizados a esta temperatura indicaron, que además de **46a**, se formaban también los productos de adición de Michael **80a** y **81a** y la mezcla polimérica **83a**.

Tabla 5.3. Influencia del agregado de inhibidores de radicales y la variación de la temperatura en la reacción de acrilato de etilo y etanolamina catalizada por lipasas

Lipasa	Temperatura (°C)	Sin inhibidor	Rendimiento del producto 46 ^a			
			PBQ	NFNA	CH	BHT
CAL B	30	65	93	92	83	93
CAL A	30	7	44	40	33	47
PPL	30	---	38	37	22	39
CRL	30	---	37	26	20	33
LIP	30	---	26	22	16	26
CAL B	40	65	95	94	88	95
CAL A	40	10	50	43	35	52
PPL	40	---	45	45	27	42
CRL	40	---	47	30	22	36
LIP	40	---	29	26	20	30
CAL B	50	58	80	76	65	79
CAL A	50	2	36	35	29	39
PPL	50	---	30	27	15	25
CRL	50	---	29	18	12	23
LIP	50	---	17	14	9	18

Trabajando a 50°C se generó una mayor cantidad de los productos secundarios mencionados anteriormente indicándonos que el aumento de temperatura de trabajo produjo una pérdida de selectividad en la reacción enzimática del acrilato de etilo con la etanolamina.

Cuando se utilizó PBQ o BHT como inhibidor de radicales y CAL B como catalizador trabajando a 30°C no se detectaron los productos secundarios y se pudo obtener el producto **46a** con un 93% de rendimiento. En estas condiciones la lipasa resultó menos activa (93% contra 95% a 40°C) pero más selectiva.

Entre PBQ y BHT elegimos este último ya que es más fácil separarlo del producto a través de un lavado del crudo de reacción con hexano. El exceso de etanolamina se separó por extracción con una solución de ácido clorhídrico, mientras que el exceso de acrilato de etilo se eliminó por destilación a presión reducida. Debe aclararse que no se observó la polimerización de la N-(hidroxietil)-acrilamida obtenida a partir del método enzimático.

5.2.4. Efecto del tiempo de reacción

Para estudiar el efecto del tiempo en la reacción de aminólisis se emplearon las condiciones optimizadas hasta el momento, es decir: una concentración de reactivos 0.7M, una [AA/N] de 1.0, una temperatura de 30°C, DIPE como solvente, una relación (E/S) de 7.0 y CAL B como catalizador. En la Figura 5.2 se presentan los resultados obtenidos del análisis del efecto del tiempo de reacción en la reacción de aminólisis.

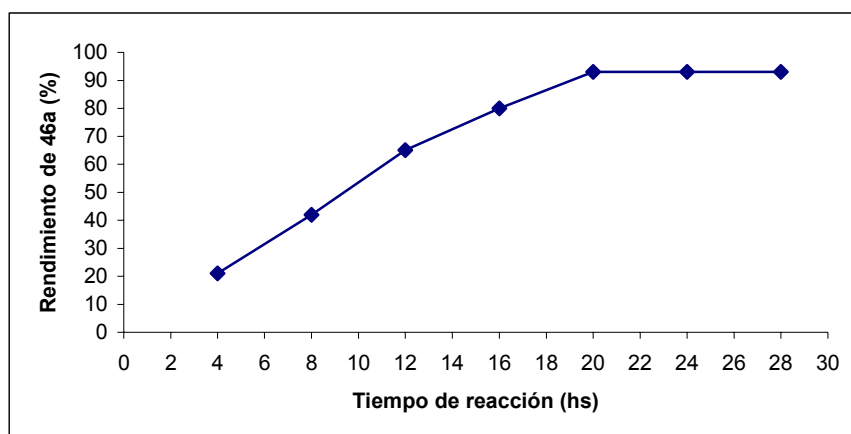


Figura 5.2. Influencia del tiempo de reacción sobre el rendimiento del producto **46a**

En la Figura 5.2 podemos ver que a partir de un tiempo de reacción de 20 horas se alcanza el rendimiento máximo del producto **46a**. Sin embargo por razones operativas se eligió como tiempo de reacción óptimo 24 horas.

5.2.5. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S)

Por último se decidió estudiar el efecto de la relación E/S en la reacción de aminólisis. Los ensayos para este análisis fueron desarrollados empleando una relación acrilato de etilo/etanolamina de 1.0, una concentración de reactivos de 0.7, DIPE como solvente, CAL B como catalizador y BHT como inhibidor de radicales. Todas las reacciones fueron desarrolladas a 30°C durante 24 horas.

En la Tabla 5.4 se presentan los resultados obtenidos en los ensayos realizados.

Tabla 5.4. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S) sobre el rendimiento del producto **46a**

E/S	Rendimiento del producto 46^a
0.5	30
1.0	59
2.0	93
4.0	93
7.0	93

La información presentada en la Tabla 5.4 refleja que a partir de una relación E/S mayor a 2.0 se obtiene el máximo rendimiento.

5.2.6. Condiciones optimizadas

Finalmente luego de los análisis presentados en las secciones anteriores elegimos las siguientes condiciones experimentales para obtener el producto **46a**:

Parámetro experimental	Condición óptima
Biocatalizador	CAL B
Temperatura	30°C
Solvente	DIPE
Tiempo de reacción	24 hs.
Rel. E/S	2.0
Concentración de reactivos	0.7 M
Inhibidor de radicales libres	BHT

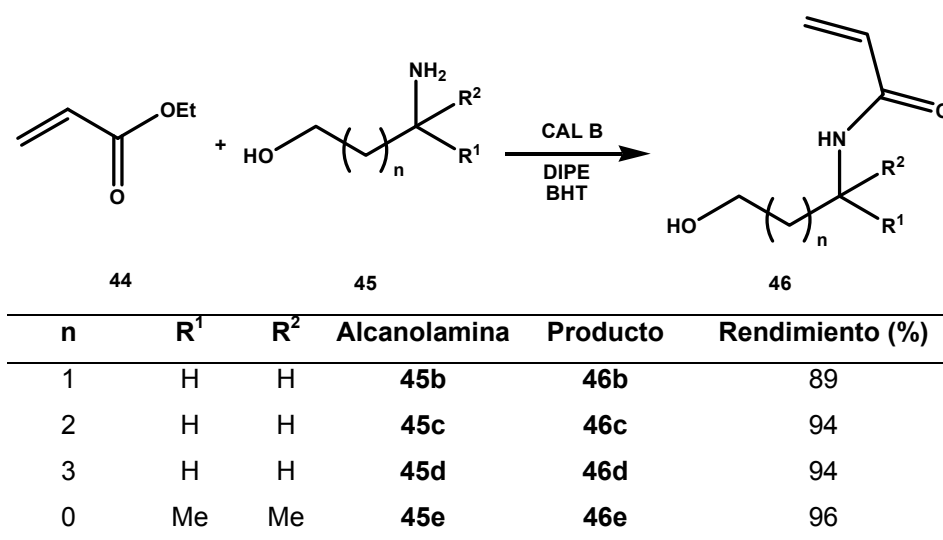
Trabajando bajo las condiciones descritas anteriormente fue posible obtener el producto **46a** con un rendimiento del 93 %. Además no se detectaron los productos de adición de Michael **80a** y **81a** ni la mezcla polimérica. Este último resultado es una prueba de la excelente selectividad que mostró CAL B en la reacción de aminólisis de acrilato de etilo con etanolamina.

5.3. ESTUDIO DEL RECICLADO DEL CATALIZADOR

El análisis de los resultados de este estudio nos permitió concluir que luego de ocho ciclos realizados con reactivos, inhibidor de radicales libres y solvente frescos la disminución del rendimiento de **46a** fue del 18%.

5.4. APLICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO ENZIMÁTICO OPTIMIZADO EN LA OBTENCIÓN DE N-(HIDROXIALQUIL)-ACRILAMIDAS DERIVADAS DE DIFERENTES ALCANOLAMINAS

Por último se aplicaron las condiciones optimizadas anteriormente a la síntesis de varias N-(hidroxialquil)-acrilamidas a partir acrilato de etilo y diferentes alcanolaminas (Esquema 5.4).



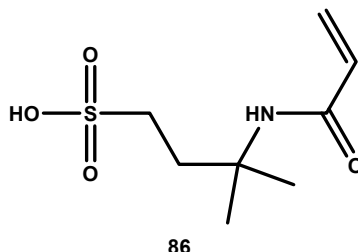
Esquema 5.4. Aminólisis de acrilato de etilo con diferentes alcanolaminas (**46b-e**) catalizada por CAL B

Cuando se utilizaron 3-amino-1-propanol y 4-amino-1-butanol se obtuvieron los productos **46b** y **46c** con rendimientos del 89% y 94% respectivamente. Por otra parte se debe indicar que no se detectaron productos de adición de Michael o de la polimerización de los monómeros. Esto último probó que el aumento de la longitud de la cadena alquílica de la alcanolamina no afectó la selectividad de CAL B hacia la reacción de aminólisis.

Cuando se realizó la reacción utilizando 2-amino-2-metil-1-propanol la eficiencia y la selectividad de las lipasas no sufrieron cambios. Los dos grupos metilos unidos al

carbono que contiene el grupo amino no impidieron la formación de la N-(2-amino-2-metil-1-propil)-acrilamida (**46e**), que fue obtenida con un rendimiento del 94%.

La amida **46e** es utilizada como precursor en la síntesis de ácido 3-(acrilamido)-3-metilbutano-1-sulfónico conocido como AMPS **86**.



El AMPS es utilizado como material de partida en la preparación de copolímeros que poseen propiedades de hidrogeles que son usados como aditivos en el proceso de cementado de los pozos petrolíferos.¹⁵

Estos copolímeros también son utilizados en la fabricación de fibras para evitar la formación de corrientes estáticas.

La síntesis tradicional de AMPS involucra la reacción de isobuteno, ácido sulfúrico y acrilonitrilo, a través de un procedimiento que requiere trabajar a una temperatura de 7°C bajo cero.¹⁶

El procedimiento enzimático desarrollado en nuestro grupo ofrece una alternativa a esta síntesis si se utilizara la amida **46e** como material de partida

5.5 CONCLUSIÓN

Se desarrolló un procedimiento enzimático alternativo para obtener N-(hidroxialquil)-acrilamidas. A diferencia de la metodología química, en el procedimiento enzimático no se utiliza cloruro de acilo sino acrilato de etilo como donador de acilo lo cual permite trabajar bajo condiciones experimentales más suaves. Además el costo de acrilato de etilo es menor así como las exigencias para su manipulación.

Todos los productos fueron obtenidos con rendimientos y pureza comparables a los informados en el método químico más eficiente.⁸ Una ventaja adicional de la metodología enzimática en este caso es el aislamiento rápido y sencillo de los productos.

Además, las N-(hidroxialquil)-acrilamidas obtenidas enzimáticamente mostraron una tendencia menor a la autopolimerización que los productos obtenidos químicamente.

Entre los productos obtenidos los más interesantes son la N-(hidroxietil)-acrilamida (HEAA) **46a** y la (2-amino-2-metil-1-propil)-acrilamida **46e**. Como indicamos

anteriormente el primero de estos productos es utilizado como monómero en la síntesis de matrices poliméricas empleadas en electroforesis capilar. Mientras que la acrilamida **46e** es utilizada como precursor del AMPS.

Bibliografía

1. H. Takeda Y. Koshiji, H. Kubota, K Lizuka, US 5464516 , 05 de feb. de 1994, (CI 235-934), 07 no. 1995, 7 pp. .
2. U. K. Laemmil, Nature, 227 (1970) 680.
3. R. Shorr, T. Jain, US 5055517, 31 march 1989, (CI 524-813), 08 oct. 1991, 27 pp .
4. B. Kozulic, US 52020075, 07 may 1991, (CI 204-461), 13 april 1993, 19 pp.
5. S. Miertus, P.G. Righetti, M. Chiari, Electrophoresis, 15 (1994) 1104
6. P.G. Righetti, M. Chiari, US 5470916, 03 jun. 1994, (CI 525-296), 28 nov. 1995, 17 pp.
7. R.M. Madabhushi, S.M. Mechen, W.J. Efcavitch, P.D. Grossman, US 5567792, 02 dec. 1994, (CI 204-454), 22 nov 1996, 37 pp.
8. M.T. Zhang, N. Kusukawa, M. Garner, Bio Wittaker Molecular Apliccations,Inc., US 6464850B1, 06 dec. 1994, (CI 204-451), 22 oct. 1996, 37 pp .
9. F. Chen, ACS Symposium Series, 322 (1986) 282.
10. N. Saito, T. Sugawara, T. Matsuda, Macromolecules 29 (1996) 313.
11. C. Gelfi, E. Simò-Alfonso, R. Sebastiano, A. Citterio, P.G. Righetti, Electrophoresis, 17 (1996) 738
12. Jones, US 2593888, (CI 564-143), 23 april 1952, 4 pp.
13. O. Torre, V. Gotor-Fernández, I. Alfonso, L.F. García-Alles, V. Gotor, Adv. Synthesis & Catal., 347 (2005)1007.
14. . E.M. Rustoy, A. Baldessari, Eur. J. Org. Chem. (2006) 4628.
15. JC. Zhang, A.J. Easteal, J. Appl. Polym. Sci., 88 (2003) 2563.
16. I.D. Khalistova, V.A. Podgornova, Russ. J. Appl. Chem., 67 (1994) 1185.

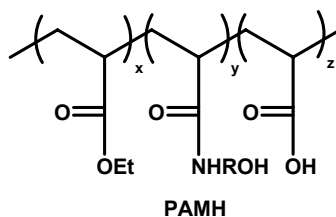
Capítulo VI

Resultados y discusión

6. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE POLIACRILAMIDAS MODIFICADAS HIDROFÓBICAMENTE

6.1. INTRODUCCIÓN

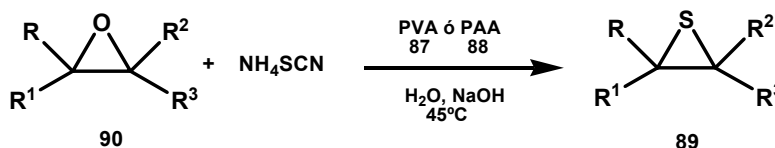
Los polímeros ternarios formados por N-(hidroxialquil)-acrilamidas, acrilato de etilo y ácido acrílico, conocidos como poliacrilamidas modificadas hidrofóbicamente (PAMH) han atraído gran atención en las últimas décadas debido a su capacidad de controlar la viscosidad (Esquema 6.1).



Esquema 6.1

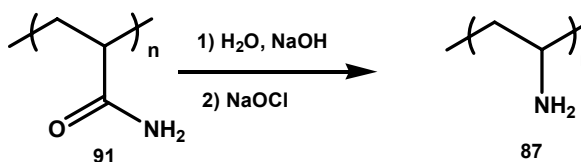
Debido a esta capacidad son utilizados en los procesos de separación sólido-líquido en la extracción de petróleo.¹

Las polivinilaminas (PVA) **87** y polialilaminas (PAA) **88** son utilizadas como catalizadores en la preparación de tiiranos **89** a partir de oxiranos **90** (Esquema 6.2).²



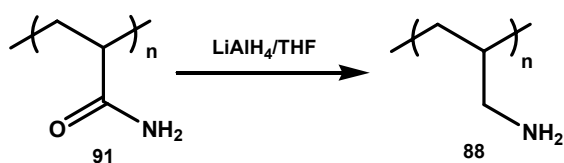
Esquema 6.2. Obtención de tiiranos catalizada por PVA y PAA

Las PVA son obtenidas por tratamiento de poliacrilamidas **91** con hidróxido de sodio acuoso e hipoclorito de sodio (Esquema 6.3).



Esquema 6.3.

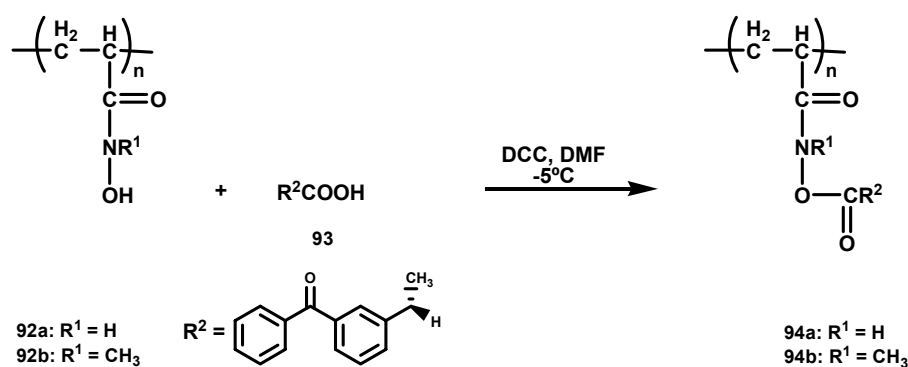
Las PAA se sintetizaron a partir de la reducción de poliacrilamidas **91** con hidruro de aluminio y litio (Esquema 6.4).



Esquema 6.4

Por otra parte, pueden encontrarse en bibliografía varias referencias en las cuales se informa sobre aplicaciones biomédicas de las PAMH.³

En este sentido, R.F. Ottenbrite y col.⁴ informaron la síntesis y el uso de poliacrilamidas derivadas de los ácidos hidroxámico (**92a**) y N-metilhidroxámico (**92b**) como agentes de protección en el transporte del Ketoprofeno (**93**) al colon. Para lograr este resultado estos investigadores sintetizaron los hidroxamatos **94a** y **94b** por tratamiento de polímeros del tipo **92a** y **92b** con ácidos del tipo **93** (Esquema 6.5).

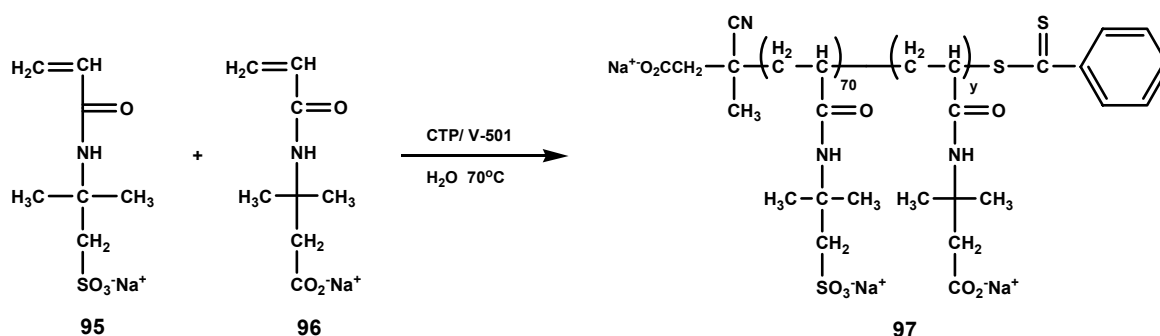
Esquema 6.5. Inmovilización de ketoprofeno sobre las hidroxipoliacrilamidas **94a** y **94b**

Con respecto a su síntesis, las PAMH se obtienen generalmente a través de una polimerización radicalaria, en particular polimerización radicalaria micelar. La polidispersión (Mw/Mn) de los productos sintetizados por este método, determinada por cromatografía de permeación por geles (CPG), se encuentra entre 3.1 y 5.8 dependiendo del tiempo de reacción.

Estos valores altos de polidispersión significan una limitante del método de obtención de las PAMH. En los últimos años se ha intentado mejorar la polimerización radicalaria para poder disminuir la distribución de pesos moleculares y en consecuencia minimizar la polidispersión.

En este sentido recientemente se ha utilizado el método denominado polimerización por adición-fragmentación de cadena reversible con el fin de disminuir la polidispersión de los polímeros obtenidos. Con este objetivo, Mc Cormick y col.⁵ reportaron la copolimerización de 2-acrilamido-2-propanosulfonato de sodio (NaAMPS) **95** y 2-acrilamido-2-

metilbutanoato de sodio (AMBA) **96** utilizando ácido 4-cianopentanoico ditiobenzoato (CTP) como iniciador y ácido 4,4'-azobis (4-cianopentanoico) (V-501) como agente de transferencia de cadena, obteniéndose el copolímero **97** como producto (Esquema 6.6).



Esquema 6.6. Copolimerización de NaAMPS y AMBA

Con el mismo objetivo, se han preparado PAMH a través de la modificación química de poliacrilamidas en dioxano a 100°C.⁶

Sin embargo, ninguno de los métodos anteriormente mencionados ha permitido acotar la distribución de pesos moleculares de los productos y como resultado minimizar la polidispersión.

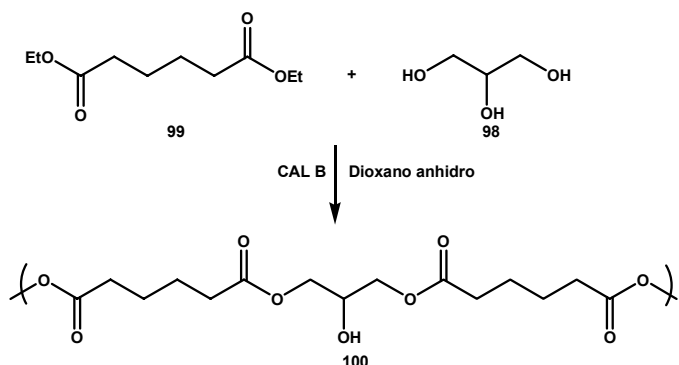
En vista de estos resultados y la experiencia de nuestro laboratorio en la aplicación de enzimas en la síntesis de compuestos orgánicos, se decidió explorar las posibilidades de utilizar enzimas como catalizadores en la síntesis de PAMH.

El uso de las enzimas en la síntesis de diferentes familias de polímeros ha sido reportado recientemente.⁷ A partir de este material bibliográfico se puede concluir que las polimerizaciones catalizadas por enzimas son ejemplos de una nueva metodología en la síntesis de polímeros, y en algunos casos, estos biocatalizadores permiten la síntesis de nuevos materiales que serían muy difíciles de preparar por otro método.⁸

En general se ha estudiado el uso de enzimas aisladas en la síntesis de polímeros. Estos catalizadores son utilizados en la obtención de poliésteres como una alternativa a la metodología clásica la cual incluye el uso de metales de transición como catalizadores. En estos casos el uso de las enzimas permite establecer procesos más limpios ya que, en general los catalizadores metálicos son altamente tóxicos. Además las condiciones de reacción drásticas necesarias en la metodología clásica de síntesis, tales como altas temperaturas y atmósferas inertes, no son necesarias en los métodos enzimáticos.⁹

Las polimerizaciones por condensación catalizadas por lipasas son realizadas en ausencia de metales y a bajas temperaturas. En bibliografía se pueden encontrar ejemplos de esta metodología en los cuales se han utilizado combinaciones de diferentes monómeros.¹⁰

En nuestro laboratorio se ha desarrollado la polimerización de glicerol **98** con adipato de dietilo **99** en dioxano anhidro, utilizando lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CAL B) como catalizador.¹¹ Trabajando a 30°C se pudo obtener el poli(adipato de 1,3-glicerilo) **100** de bajo peso molecular. Esta reacción mostró una alta regioselectividad y una baja polidispersión $M_w/M_n = 1.1$ (Esquema 6.7).



Esquema 6.7. Polimerización de glicerol y adipato de dietilo catalizada por CAL B

Otras enzimas, tales como la peroxidasa de rábano (HRP), han sido utilizadas para catalizar polimerizaciones por adición de monómeros vinílicos.¹²⁻¹⁴

Sin embargo, hasta este momento no existen trabajos sobre la polimerización de monómeros vinílicos catalizada por lipasas.

En un capítulo anterior (Cápítulo V) se describió la síntesis de N-(hidroxialquil)-acrilamidas por aminólisis de acrilato de etilo con alcanolaminas catalizada por lipasas, utilizando DIPE como solvente.

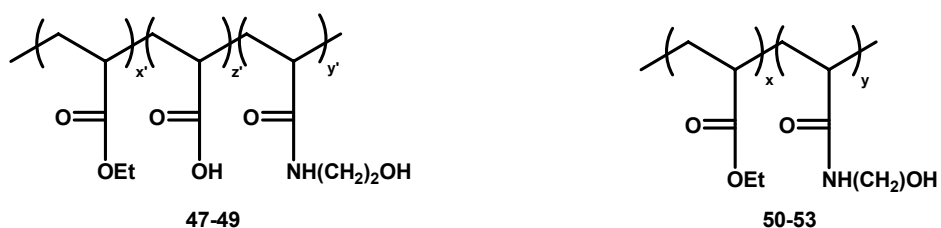
Sin embargo durante el desarrollo de la investigación mencionada se observó la formación de un material polimérico como producto secundario. Este resultado nos motivó a estudiar la reacción de polimerización de acrilato de etilo en presencia de etanolamina catalizada por lipasas, que se describe en el presente capítulo.

Se analizaron los efectos de diferentes parámetros experimentales, tales como: solvente de reacción, fuente de la lipasa utilizada como catalizador, relación enzima/sustrato (E/S), relación etanolamina/acrilato de etilo (B/A), temperatura y tiempo de reacción.

Los productos formados fueron analizados por espectroscopías de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y RMN unidimensional de ^1H y ^{13}C y bidimensional (COSY, HSQC, HMBC). Para determinar la composición, los pesos moleculares promedio (M_w y M_n) y la polidispersión (PD) de los productos se utilizó espectrometría de masa de ionización/desorción-láser ultravioleta asistida por la matriz con un analizador de tiempo de vuelo (espectrometría de masa UV-MALDI-TOF).

La variación de la relación B/A permitió obtener una serie de productos poliméricos perteneciente a la familia de los acrilatos y con una diversidad de grupos pendientes de la cadena poliacrílica principal. Considerando la relación B/A creciente, esta familia estaba constituida por dos grupos diferentes de productos: copolímeros donde los grupos pendientes de la cadena de poliacrilato fueron éster y amida (**50-53**) y un segundo grupo de terpolímeros (**47-49**) en los cuales los grupos pendientes de la cadena fueron ácido carboxílico, amida y éster.

En el Esquema 6.8 se muestran las estructuras de los copolímeros (**50-53**) y terpolímeros (**47-49**) obtenidos.



Esquema 6.8

Como mencionamos anteriormente los resultados informados en el Capítulo V nos motivaron a estudiar la posibilidad de lograr la polimerización de un monómero vinílico como el acrilato de etilo en presencia de etanolamina catalizada por lipasas. Esta motivación además fue alimentada por las evidencias de promiscuidad mostrada por las lipasas reportada por diferentes grupos de trabajo y ya comentada en el Capítulo I.

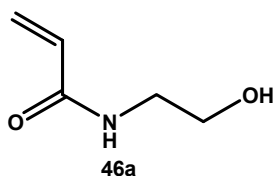
6.2 SÍNTESIS DE CO- Y TERPOLÍMEROS

6.2.1. OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES EXPERIMENTALES

6.2.1.1. Selección del biocatalizador

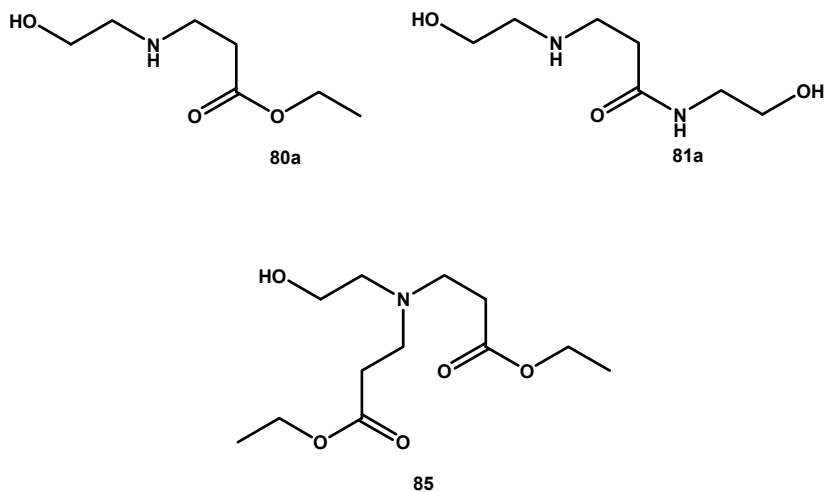
Con el fin de optimizar las condiciones de reacción se comenzaron a realizar ensayos utilizando lipasas de cuatro fuentes comerciales diferentes: lipasa de *Candida rugosa* (CRL), lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CAL B), lipasa de *Rhizomucor miehei* (LIP) y lipasa pancreática porcina empleando diisopropiléter (DIPE) como solvente, una E/S de 1.0, una relación etanolamina:acrilato de etilo (B/A) de 1.0, una concentración de los reactivos acrilato de etilo [A] y etanolamina [B] 5 M y una temperatura de trabajo de 30°C. En forma paralela y utilizando las mismas condiciones experimentales se realizó un ensayo en ausencia de biocatalizador, pudiéndose observar que en estas condiciones no se formó el producto polimérico.

Con el objetivo de estudiar el curso de la reacción se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se analizaron por espectroscopía de RMN de ^1H . Luego de 48 horas de reacción, los espectros correspondientes a los ensayos realizados con todas las enzimas mostraron la ausencia de las señales de los protones vinílicos del acrilato de etilo y de la acrilamida **46a** (Esquema 6.9).



Esquema 6.9

Los productos también fueron analizados por espectrometría de masa de impacto electrónico (EM-IE) con el fin de obtener información adicional del producto. A partir de esta herramienta se pudo determinar que el producto era una mezcla, y a pesar de que los espectros presentaban una gran complejidad se pudieron detectar, entre otras, señales con valores de m/z de 230 y 345. Estas señales no concordaban con las correspondientes a las relaciones m/z esperables para los aductos de Michael **80a** y **81a** o el producto de doble adición de Michael **85** (Esquema 6.10).



Esquema 6.10

Las señales a 230 y 345 Da se podrían correlacionar con componentes de la muestra que estuvieran formadas por residuos de 2 y 3 unidades de **46a** que actuaría como monómero. Por supuesto que este dato no era suficiente para obtener una información acabada de la estructura de los productos obtenidos debido a que la EM-IE no nos

permitiría obtener señales correspondientes a fragmentos de tamaños mayores. Sin embargo esta evidencia permitía suponer que se estaba ante una mezcla de productos. Para poder establecer la naturaleza polimérica del producto se debió utilizar una herramienta más compleja como es la espectrometría de masa UV-MALDI-TOF.

El análisis, por este último método, de los productos formados en las reacciones en las que no se utilizó catalizador o bien se usó CRL, PPL o LIP, mostró que estas mezclas tenían entre 147 mg y 220 mg del aducto de Michael **80a** y entre 441 y 588 mg del producto **81a**. A diferencia de estos resultados, en el caso de la reacción catalizada por CAL B, los datos espectroscópicos fueron consistentes con una mezcla que contenía cantidades de los aductos **80a** y **81a** menores que en los casos anteriores. A partir de las 48 horas de reacción no se observaron evidencias de cambios en las conversiones obtenidas.

Considerando estos resultados a partir de ese momento se eligió a CAL B como catalizador y 48 horas como tiempo de reacción para los ensayos que se continuarían realizando con el fin de estudiar el efecto de los parámetros experimentales mencionados anteriormente, es decir:

- Solvente
- Temperatura
- Relación enzima:sustrato (E/S)

6.2.1.2. Efecto del solvente

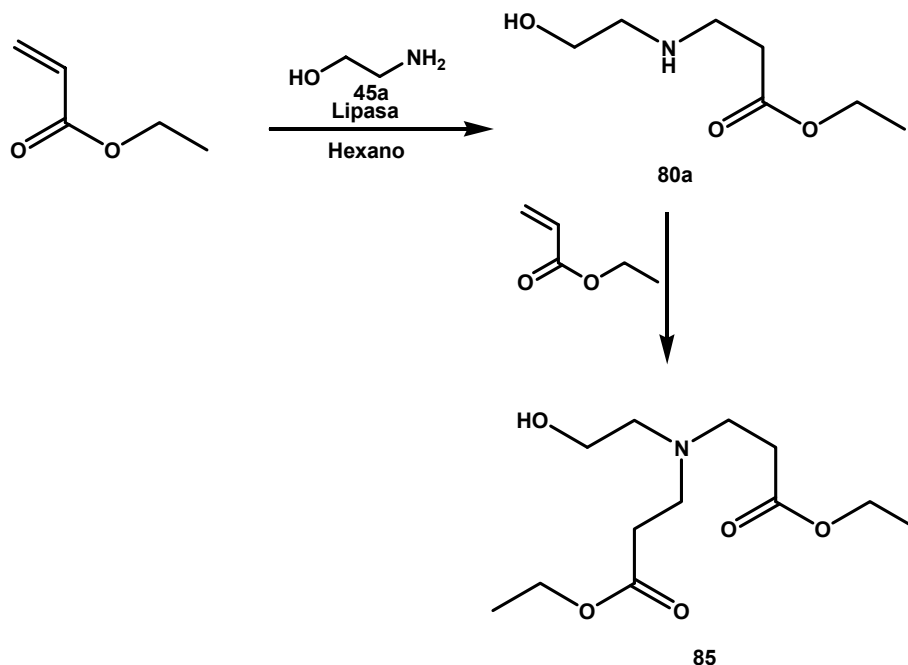
Se comenzó estudiando el efecto del solvente sobre la reacción de acrilato de etilo con etanolamina catalizada por CAL B, para lo cual se decidió utilizar las condiciones experimentales iniciales. Es decir, las reacciones se llevaron a cabo empleando una relación E/S de 1.0, una concentración de reactivos 5M y una relación molar B:A de 1.

En la Tabla 6.1 se comparan los rendimientos obtenidos a 30°C durante 48 horas de reacción.

Tabla 6.1. Estudio del efecto del solvente en la reacción de acrilato de etilo y etanolamina catalizada por CAL B

Solvente	Rendimiento de 51 (g)
Sin solvente	---
Hexano	---
THF	0.662
Dioxano	0.832
DIPE	0.441
Acetonitrilo	1.47

Los resultados de la Tabla 6.1 muestran que en ausencia de solvente se recuperaron los materiales de partida y la mezcla de aductos de Michael. Cuando se utilizó un solvente no polar como el hexano sólo se obtuvo el producto de doble adición de Michael **85**. Éste se generaría por una segunda adición de acrilato de etilo al aducto **80a** (Esquema 6.11).¹⁵



Esquema 6.11. Obtención del producto de doble adición de Michael (**85**) a partir de acrilato de etilo y etanolamina

Los ensayos realizados en éteres tales como tetrahidrofurano (THF), dioxano y DIPE permitieron obtener el material polimérico deseado pero en muy bajos rendimientos.

El mejor rendimiento fue alcanzado cuando la reacción fue realizada en acetonitrilo. Este solvente además permitió disolver totalmente los sustratos y el producto de reacción.

Debe aclararse que no sólo se analizó la conversión de los sustratos a material polimérico, sino que además se trató de analizar el grado de aminólisis alcanzado en dichos ensayos, ya que en el sistema de trabajo propuesto podían suceder varias reacciones, a saber: la polimerización deseada, la formación de los aductos de Michael ya mencionados y la reacción de aminólisis del acrilato de etilo en presencia de la etanolamina.

Como se indicó anteriormente, la información obtenida por espectroscopia de RMN de ¹H permitía confirmar la ausencia de la N-(hidroxietyl)-acrilamida ya que desaparecían las señales de los protones vinílicos en los espectros adquiridos.

A pesar de que los espectros de los productos obtenidos eran muy complejos se pudo estimar que el grado de aminólisis era similar usando éteres o acetonitrilo como solvente.

La espectroscopía de RMN ^1H y ^{13}C fue una herramienta muy efectiva para establecer que había existido reacción de aminólisis y, por lo tanto, el producto obtenido se trataba de un copolímero formado por cadenas de poliacrilato con funciones amida y éster como grupos pendientes.

6.2.1.3. Efecto de la temperatura

La temperatura es un parámetro clave en todos los procesos biocatalíticos, como se pudo apreciar en los capítulos anteriores, debido a que generalmente un aumento en la temperatura de reacción permite alcanzar mayores conversiones aunque también puede generar una disminución en la selectividad. Los ensayos realizados para el estudio del efecto de la temperatura fueron efectuados utilizando condiciones experimentales similares a las empleadas en el análisis del efecto del solvente con acetonitrilo como medio de reacción.

En la Tabla 6.2 se comparan los resultados obtenidos en las reacciones realizadas a cuatro temperaturas diferentes.

Tabla 6.2. Estudio del efecto de la temperatura sobre la reacción de polimerización de acrilato de etilo en presencia de etanolamina

Temperatura (°C)	Masa obtenida de 51 (g)
15	-- ^a
25	1.47
33	1.46
55	1.47

^a aducto de Michael **80a**

Como puede apreciarse en la Tabla 6.2 cuando se trabajó a la temperatura menor, es decir 15°C, solamente se obtuvo el producto de adición de Michael **80a**. A temperaturas mayores, la conversión de acrilato de etilo a material polimérico **51** fue total. La temperatura de 25°C fue elegida como óptima para los ensayos que se continuaron realizando a partir de ese momento.

6.2.1.4. Influencia de la relación enzima/sustrato (E/S)

Los ensayos realizados para la determinación E/S óptima se hicieron variando esta relación entre 0.2 y 2.0 (CAL B) con una concentración de reactivos 5 M, una relación etanolamina:acrilato de etilo (B/A) de 1.0, empleando acetonitrilo como solvente a 25°C durante 48 horas. En ausencia de enzima no se detectó la presencia del producto **51**.

A partir de la información obtenida se confeccionó el siguiente gráfico (Figura 6.1)

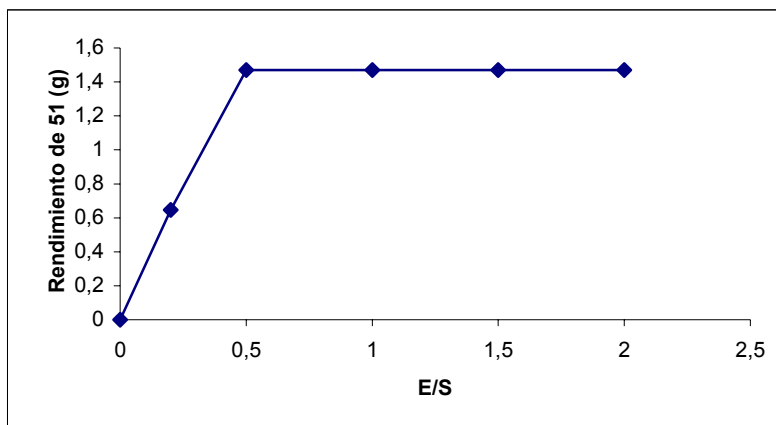


Figura 6.1. Efecto de la temperatura en la reacción de polimerización de acrilato de etilo en presencia de etanolamina catalizada por CAL B

Al examinar los datos de la Figura 6.1 se observa que los mejores rendimientos en términos de la polimerización fueron alcanzados a partir de una E/S = 0.5.

6.2.1.5. Condiciones optimizadas

Como consecuencia del estudio descrito anteriormente se eligieron como óptimas las siguientes condiciones experimentales:

Enzima	CAL B
Solvente	Acetonitrilo
Temperatura	25°C
Tiempo de reacción	48 hs.
Enzima/sustrato (E/S)	0.5

Bajo estas condiciones se pudieron obtener 1.47 g del producto **51**.

Debe aclararse que una vez optimizados los parámetros anteriormente mencionados se realizó un nuevo ensayo de control, bajo estas condiciones, pero en ausencia del catalizador para comprobar que no se formaba el material polimérico. Los resultados obtenidos fueron los mismos que los realizados en el primer ensayo de control anterior, es decir, no se formó el material deseado. Esta información confirmaba la hipótesis: la polimerización del acrilato de etilo era catalizada por las lipasas. Además la información obtenida por espectroscopia de RMN ^1H de alícuotas a diferentes tiempos de reacción indicaba que la velocidad de desaparición de las señales vinílicas era mayor que la

velocidad de desaparición de las señales del metilo y del metileno correspondientes al grupo etoxilo de los grupos pendientes éster. Esto permitía, en primera instancia suponer que la velocidad de polimerización era mayor que la velocidad de la reacción de aminólisis, aunque en este punto de desarrollo de la investigación no era posible encontrar una explicación lógica en los modelos clásicos del mecanismo catalítico de las lipasas, ya que la polimerización de monómeros vinílicos como el acrilato de etilo catalizada por lipasas significaba un nuevo comportamiento promiscuo de estas enzimas que hasta el momento no había sido informado.

6.2.2. Efecto de la relación etanolamina/acrilato de etilo

En virtud de los resultados obtenidos en la reacción catalizada por CAL B de acrilato de etilo (A) en presencia de etanolamina (B) en una relación molar B/A: 1, se decidió estudiar el comportamiento de la enzima al emplear otras relaciones molares de B/A.

Las reacciones se llevaron a cabo a 25°C, empleando siete relaciones B/A diferentes (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Relaciones de etanolamina (B)/acrilato de etilo (A) utilizadas en la síntesis de los productos **47-53**

Relación B/A	0.05	0.1	0.25	0.5	1	2.5	5
Producto	47	48	49	50	51	52	53
Masa obtenida (g)	0.026	0.058	0.245	0.740	1.470	1.470	1.470

Luego de 48 hs. de reacción se aislaron alícuotas de cada uno de los ensayos, se evaporó el solvente y se analizaron por espectroscopia de RMN ^1H . Los resultados permitieron dividir a los siete productos en dos grupos de acuerdo a la relación B/A en el sistema de reacción. Los productos obtenidos con relaciones molares B/A menores o iguales a 0.25 presentaban las señales correspondientes a los protones vinílicos del acrilato de etilo y de la N-(hidroxietil)-acrilamida **46a**. En cambio los espectros de los productos obtenidos en los ensayos con relaciones B/A mayores o iguales a 0.5 no mostraron estas señales lo cual indicaba que la reacción de polimerización había finalizado. Todos los ensayos se continuaron hasta el momento en que no se observaron cambios en los espectros de ^1H RMN, ya que no sólo se quería estudiar la reacción de polimerización sino también las reacciones de aminólisis o transesterificación que

podieran producirse bajo las condiciones de trabajo utilizadas. Debe indicarse respecto a esto último que no se obtuvieron evidencias espectroscópicas que indicaran la existencia de la reacción de transesterificación en ninguno de los ensayos realizados.

Finalmente, se pudo comprobar que el tiempo de reacción óptimo para los ensayos con relaciones molares mayores a 0.5 era el mismo que para el ensayo realizado anteriormente con una relación de 1.0, es decir 48 horas.

En cambio, el tiempo óptimo para los ensayos realizados con relaciones molares B/A menores fue de seis días.

Luego de los tiempos óptimos mencionados se aislaron los productos. En los casos que se utilizaron relaciones molares B/A menores o iguales a 1.0 sólo fue necesario filtrar la enzima, la cual fue lavada con una mezcla de metanol y dioxano. Finalmente, se juntaron todas las fracciones y se evaporó el solvente obteniéndose en todos los casos líquidos de alta viscosidad.

El aislamiento de los productos obtenidos a partir de los ensayos realizados con exceso de etanolamina (**52** y **53**) fue un poco más complejo. En estos casos se procedió de la siguiente manera: se filtró la enzima, el solvente del filtrado fue evaporado y el residuo fue disuelto en una solución de ácido oxálico 5 M. De esta manera se eliminó el exceso de etanolamina por filtración de la sal formada con el ácido oxálico. Por evaporación del solvente restante se obtuvo una mezcla del producto y ácido oxálico. Al agregar 2-propanol y el producto polimérico precipitó y fue separado del ácido oxálico por filtración.

6.3. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS TERPOLÍMEROS 47-49 Y LOS COPOLÍMEROS 50-53

El análisis por RMN ^1H de los compuestos **47-53** permitió detectar una diferencia que permitía agrupar a estos productos en dos familias diferentes (Figura 6.2). Los productos obtenidos con relaciones molares B/A menores a 0.25 presentaban dos conjuntos de señales que fueron asignadas a metilos de los grupos etoxilos. El primero de ellos, era un conjunto de tripletes con un desplazamiento a 1.22 ppm (**a**) que pudo ser asignado a los grupos pendientes ésteres etílicos en la cadena de poliacrilato y un segundo conjunto de tripletes con un desplazamiento menor (1.17 ppm) (**e'**) típico al observado en los espectros de compuestos como etanol o éter etílico. Los productos obtenidos con relaciones B/A mayores a 0.5 presentaban sólo un conjunto de tripletes con un desplazamiento de 1.22 ppm (**a**) aproximadamente.

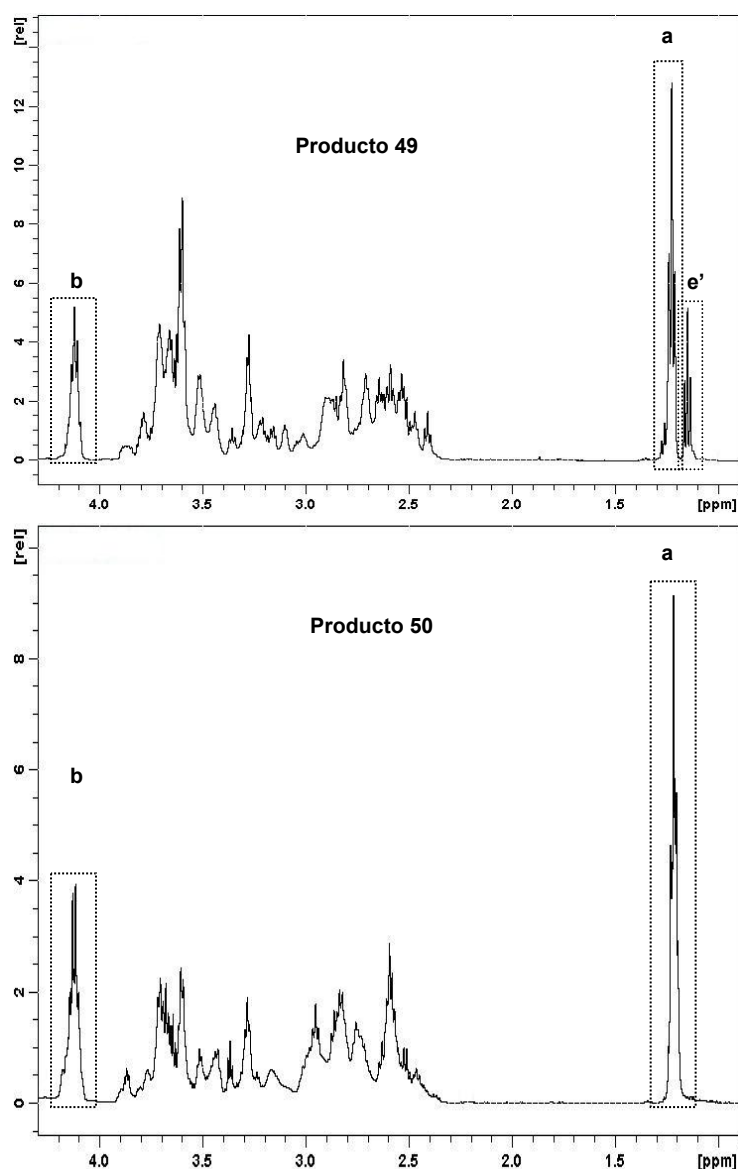
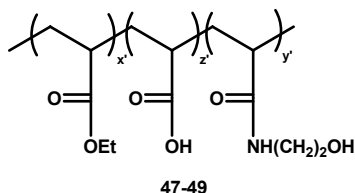


Figura 6.2. Espectros de RMN de ^1H de los productos **49** y **50**, zona 1-4.5 ppm

En primera instancia se pensó que el conjunto de señales con menor desplazamiento presente en los productos **47-49** evidenciaba que podría haber quedado etanol ocluido en el producto generado durante la reacción de aminólisis. Para discernir esta situación los productos fueron sometidos a sucesivos secados y volvieron a ser analizados. Los nuevos análisis por RMN ^1H mostraban que ninguna de las dos señales desaparecía y que mantenían sus relaciones de áreas constantes. Otro dato importante eran las señales correspondientes a los metilenos de los mencionados grupos pendientes ésteres. En los siete productos aparecía un conjunto de cuartetos asignados al metileno correspondientes a grupos etoxilos de los grupos pendientes ésteres de la cadena de poliacrilato en la zona de 4.20 ppm (**b**) aproximadamente (Figura 6.2). Sin embargo, debido a la complejidad de los espectros, en los casos de los productos **47-49** se pudo

observar un segundo grupo de señales inmerso en la zona de 3.7 ppm que podría corresponder a metilenos unidos a oxígeno típicos de éteres acoplados a los protones e' , pero que hasta el momento no se podían asignar.

Los espectros de RMN ^{13}C (Figura 6.3) de los productos **47-49** mostraban, además de la señal correspondiente a los metilos de los grupos etoxilos (**a**) (18.3 ppm) pendientes de la cadena de poliacrilato, una señal típica del metilo correspondiente al residuo etoxilo (e') (13.9 ppm) observado en compuestos del tipo de éteres etílicos (**Espectro 2**).



Para probar que estas señales correspondían a grupos metilos se realizó un espectro con acoplamientos protón- ^{13}C , este experimento permitió concluir que las señales correspondían a los grupos metilos debido a la multiplicidad de éstas, es decir cuartetos (**Espectro 1**). Con esta información se determinó que la señal observada a mayor desplazamiento correspondía al metilo de los grupos etoxilos pendientes de las cadenas de poliacrilato mientras que la otra señal correspondía a los metilos de los residuos etoxilos que según la presunción mencionada con anterioridad estarían ubicados en uno de los extremos de las cadenas poliméricas.

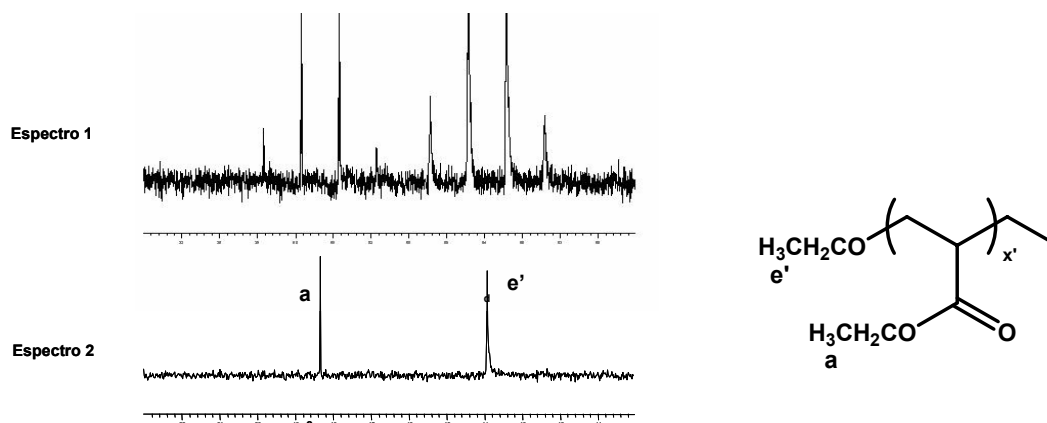


Figura 6.3

Toda esta información obtenida de los productos **47-49** era un tanto desconcertante ya que por un lado sabíamos que debido al secado exhaustivo que se había realizado las muestras no podían contener etanol y por otra parte bajo las condiciones de trabajo aplicadas hasta el momento no había información reportada que indicara que las lipasas podrían generar éteres. Además otro interrogante era, si se había formado una unión éter, en qué lugar de la molécula era posible esto?

Lo primero que se supuso fue que estuviera localizada en uno de los extremos de las cadenas poliméricas. Otro hecho innegable era que las herramientas de análisis que se habían utilizado hasta ese momento no eran lo suficientemente eficientes para elucidar la estructura de los nuevos productos. Por esto se decidió recurrir a técnicas de análisis más complejas como espectroscopia de RMN bidimensional y espectrometría de masa UV-MALDI-TOF.

La información obtenida a partir de espectrometría de masa UV-MALDI-TOF fue utilizada para determinar el peso molecular promedio pesado (M_w), el peso molecular promedio numérico (M_n), la polidispersión (PD), las fórmulas más probables de cada una de las componentes de las mezclas poliméricas, el grado de polimerización en cada caso y en el caso de los productos **50-53** las fracciones moleculares de los grupos pendientes amida y éster de las cadenas de poliacrilato. En los casos de los productos **47-49** no fue posible establecer las fracciones molares mencionadas debido a razones intrínsecas de los sistemas analizados que se explicarán más adelante.

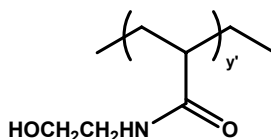
El análisis de los espectros de RMN bidimensional permitió confirmar la hipótesis que se propuso para determinar la información estructural obtenida a partir de UV-MALDI-TOF.

6.3.1. Análisis estructural de los productos 47-49 por espectrometría de masa UV-MALDI-TOF

Para utilizar la información obtenida por espectrometría UV-MALDI-TOF fue necesario establecer un método de cálculo que permitiera obtener las relaciones masa/carga teóricas de cada una de las componentes de cada uno de los productos. Con este objeto se relevó la información obtenida a partir de espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C y espectrometría de masa de impacto electrónico (EM-IE), a saber:

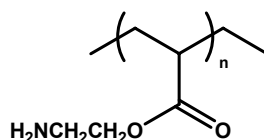
- Habían desaparecido las señales correspondientes a los protones vinílicos por lo tanto no había regiones insaturadas en los productos poliméricos.
- Las cadenas poliméricas podían contener grupos etóxilos diferentes a los correspondientes a las unidades de acrilato de etilo cuando se trabajaba con una relación etanolamina/acrilato de etilo (B/A) menor o igual a 0.25. Los desplazamientos químicos correspondientes a los grupos metilenos y metilos de estos grupos etóxilos se asemejaban a aquellos observados en éteres etílicos. Estas señales también podrían ser asignadas a etanol generado durante la reacción de aminólisis y que podría haber quedado ocluido en el material, pero como mencionamos anteriormente debido al secado exhaustivo de la muestra esta posibilidad era improbable.

- Se pudieron asignar señales de grupos metilenos de residuos amida y éster, lo cual indicaría que se había producido una reacción de aminólisis (Esquema 6.12).



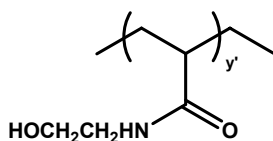
Esquema 6.12

También se observaron señales en la zona correspondiente a metilenos unidos a grupos amino secundario. Además, no se observaron evidencias de una reacción de transesterificación consistente con un grupo pendiente aminoéster (Esquema 6.13).



Esquema 6.13

- En los espectros de RMN de ^{13}C se observaron señales en las zonas de carbonos carbonílicos de amidas, ésteres y ácidos carboxílicos. Estas últimas se observaron solamente con una relación (B/A) menor o igual a 0,25 (**47-49**).
- Los espectros de EM-IE mostraban señales con relaciones m/z que podrían corresponder a fragmentos formados por dos (230 Da) y tres (345 Da) unidades derivadas de N-hidroxietilacrilamida (Esquema 6.14).



m/z: 230 Da $y' = 2$
m/z: 345 Da $y' = 3$

Esquema 6.14

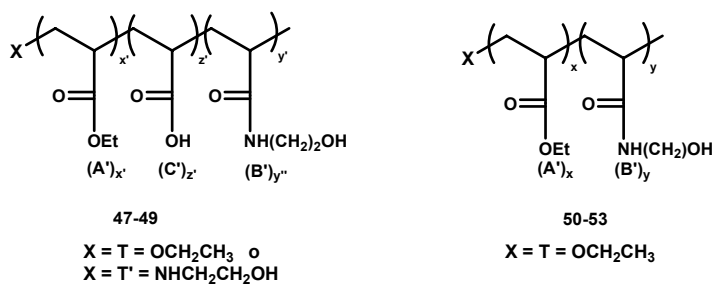
Por otra parte, se comprobó que las dispersiones preparadas en agua de los compuestos **47-49** mostraron tener un pH ácido. Lo cual indicaba que las cadenas de poliacrilato podían contener ácidos carboxílicos como grupos pendientes

Teniendo en cuenta toda esta información se propuso la siguiente hipótesis:

la reacción de acrilato de etilo con etanolamina catalizada por CAL B generaba un material polimérico formado por unidades derivadas de acrilato de etilo (A'), de N-

hidroxietilamida (B'), y en los casos que se utilizó una relación molar (B/A) menor o igual a 0.25 el producto también contenía unidades de ácido acrílico (C'). Además los productos **47-49** obtenidos en esas condiciones contendrían en uno de sus extremos un residuo de etanolamina (T) o de etoxilo (T'). Mientras que en el otro extremo la cadena terminaría con un protón (H).

Para relaciones molares (B/A) mayores o iguales a 0.5 (**50-53**) las cadenas estarían formadas solamente por A' y B' y las contendrían en uno de sus extremos un residuo de etanolamina (T) y en el otro un protón (Esquema 6.15).



Esquema 6.15

Debido a características intrínsecas de la técnica de UV-MALDI-TOF utilizada (modo positivo), el valor numérico de la señal que se observa será igual a la relación m/z (donde $z = 1$) de la cadena polimérica más la masa del H^+ o Na^+ . En los casos que se utiliza DMSO como solvente en la preparación de la muestra (**47** y **48**) analizada por espectrometría de masa UV-MALDI-TOF, existen algunas señales a las que a su valor es necesario sumar la masa de este solvente.

Como conclusión de esta hipótesis basada en las evidencias experimentales se podía indicar que se habían obtenido dos familias de productos diferentes: la primera de ellas copolímeros cuando se trabajó con relaciones molares B/A mayores o iguales a 0.5 (**50-53**), mientras que cuando esta relación fue menor o igual a 0.25 los productos eran terpolímeros (**47-49**).

Considerando la existencia de las dos familias de productos **50-53** y **47-49** era necesario diseñar un nuevo método que facilitara asignar la estructura más probable a cada relación m/z experimental, teniendo en cuenta la información con que se contaba.

La asignación en el caso de los copolímeros parecía resultar menos compleja que la asignación de los terpolímeros.

En la próxima sección se describirá el procedimiento para asignar las señales correspondientes a los espectros de espectrometría de masa UV-MALDI TOF de los productos obtenidos. A modo de ejemplo se tomarán sólo algunas de las señales correspondientes a los productos **49** y **50**.

6.3.1.1. Procedimiento para realizar la asignación de las señales de las señales de los espectros de espectrometría de masa UV-MALDI-TOF

Primer paso

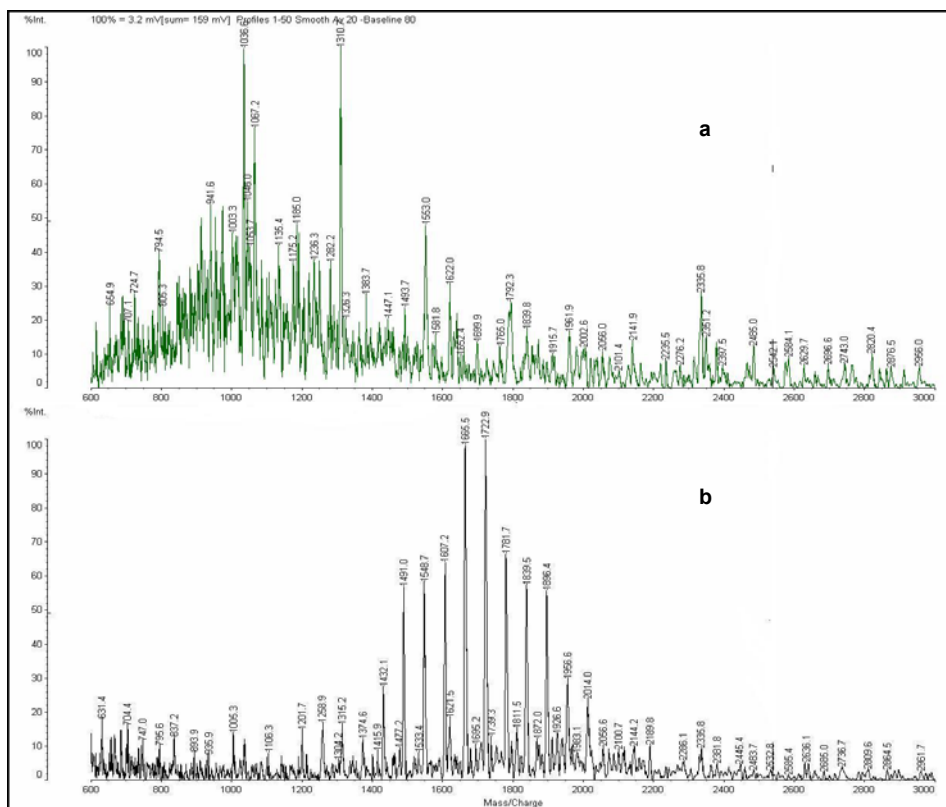


Figura 6.4. a) Espectro UV-MALDI-TOF del blanco (Matriz/H₂O/MeOH/DMSO); b) Espectro de EM-UV-MALDI-TOF del producto **49**

El primer paso consiste en comparar los espectros del compuesto en estudio, en este caso el producto **49** (b), y de la matriz utilizada, realizados en las mismas condiciones (blanco) (a) (Figura 6.4).

De esta manera se restan del espectro del compuesto **49** las señales que aparecen en el espectro del blanco.

Con los datos obtenidos se genera la columna de relación masa/carga experimental (m/z exp.) de la Tabla 6.4, la cual contiene las señales relacionadas a las componentes del compuesto polimérico **49**.

Tabla 6.4. Asignaciones de las señales de los espectros de masa UV-MALDI-TOF para el producto **49** (m/z exp. [Da], los valores corresponden a la ionización con H^+ y Na^+)

m/z (exp.)	Especies	n	m/z (teór.+ H^+)	m/z (teór.+ Na^+)
393.7	TA'B ₂ H	3	392.5	
	T'B ₃ H	3	392.5	
455.9	TA ₂ B'H(DMSO)	3	455.6	
	T'A'B ₂ H(DMSO)	3	455.6	
471.0	TA'B ₂ H(DMSO))	3	470.6	
	T'B ₃ H(DMSO))	3	470.6	
499.1	TA ₃ B'H	4		499.6
	T'A ₂ B ₂ H	4		499.6
570.6	TA ₂ B ₂ H(DMSO)	4	570.7	
	T'A'B ₃ H(DMSO)	4	570.7	
631.4	TB'C ₆ H	7		631.6
704.4	TB'C ₇ H	8		703.6
789.4	TB ₃ C ₅ H	8		789.8
837.6	TA ₂ B ₅ H	7	838.0	
	T'A'B ₆ H	7	838.0	
893.9	TA ₅ B'C ₃ H	9	894.0	
	T'A ₄ B ₂ C ₃ H	9	894.0	
1005.3	TB ₈ H	8		1005.1
1106.3	TA'B ₃ C ₈ H	12		1106.1
	T'B ₄ C ₈ H	12		1106.0
1201.7	TA ₆ B ₄ H(DMSO)	10	1201.5	
	T'A ₅ B ₅ H(DMSO)	10	1201.5	
1258.9	TA ₈ B ₂ C ₂ H	12		1259.4
	T'A ₇ B ₃ C ₂ H	12		1259.4
1315.2	TA ₁₀ B ₂ H	12		1315.5
	T'A ₉ B ₃ H	12		1315.5
1432.1	TA ₇ B ₅ CH	13		1432.6
	T'A ₆ B ₆ CH	13		1432.6
1491.0	TA ₆ B ₇ H	13		1490.7
	T'A ₅ B ₈ H	13		1490.7
1533.4	TA ₇ B ₄ C ₄ H	15		1533.7
	T'A ₆ B ₅ C ₄ H	15		1533.7
1548.7	TA ₆ B ₅ C ₄ H	15		1548.7
	T'A ₅ B ₆ C ₄ H	15		1548.7
1607.2	TA ₅ B ₇ C ₃ H	15		1606.8
	T'A ₄ B ₈ C ₃ H	15		1606.8
1621.5	TA ₄ B ₈ C ₃ H	15		1621.8
	T'A ₃ B ₉ C ₃ H	15		1621.8
1665.5	TA ₂ B ₁₂ H	14		1665.9
	T'AB ₁₃ H	14		1665.9
1722.9	TA ₁₃ B ₂ C ₆ H	21	1723.0	
	T'A ₁₂ B ₃ C ₆ H	21	1723.0	

Tabla 6.4. Continuación

1739.3	TA ₁₁ 'B ₅ 'H	16	1739.1	
	T'A ₁₀ 'B ₆ 'H	16	1739.1	
1781.7	TA ₃ 'B ₄ 'C ₁₃ 'H	20		1781.7
	TA ₂ 'B ₅ 'C ₁₃ 'H	20		1781.7
1811.5	TA ₁₁ 'B ₅ 'C'H	17	1811.1	
	T'A ₁₀ 'B ₆ 'C'H	17	1811.1	
1839.5	TA ₁₂ 'B ₅ 'H	17	1839.2	
	T'A ₁₁ 'B ₆ 'H	17	1839.2	
1872.0	TA ₇ 'B ₄ 'C ₉ 'H	20	1872.0	
	T'A ₆ 'B ₅ 'C ₉ 'H	20	1872.0	
1896.4	TA ₂ 'B ₁₄ 'H	16		1896.1
	T'A'B ₁₅ 'H	16		1896.1
1956.6	TA ₁₀ 'B ₄ 'C ₆ 'H	20	1956.2	
	T'A ₉ 'B ₅ 'C ₆ 'H	20	1956.2	
2014.0	TA ₈ 'B ₁₀ 'H	18	2014.4	
	T'A ₇ 'B ₁₁ 'H	18	2014.4	
2115.9	TA ₈ 'B ₉ 'C ₃ 'H	20	2115.4	
	TA ₇ 'B ₁₀ 'C ₃ 'H	20	2115.4	
2189.8	TA ₆ 'B ₂ 'C ₁₈ 'H	26	2190.2	
	T'A ₅ 'B ₃ 'C ₁₈ 'H	26	2190.2	
2286.1	TA ₁₂ 'B ₂ 'C ₁₁ 'H	25	2286.5	
	T'A ₁₁ 'B ₃ 'C ₁₁ 'H	25	2286.5	
2381.8	TA ₈ 'B ₁₃ 'H	21		2381.7
	T'A ₇ 'B ₁₄ 'H	21		2381.7
2445.4	TA ₉ 'B ₁₁ 'C ₃ 'H	23	2445.8	
	T'A ₈ 'B ₁₂ 'C ₃ 'H	23	2445.8	
2636.1	TA ₄ 'B ₁₇ 'C ₃ 'H	24	2636.0	
	T'A ₃ 'B ₁₈ 'C ₃ 'H	24	2636.0	

Debe recordarse que, debido a las características intrínsecas de la técnica de espectrometría de masa UV-MALDI-TOF las señales observadas en los espectros no corresponden a los iones moleculares de las diferentes componentes de la muestra sino a la sumatoria del ion molecular más un contraión que pueden ser los iones protón o sodio, también existen casos en los cuales a esta sumatoria hay que agregarle otra componente que es la masa del dimetilsulfóxido.

Segundo paso

La segunda etapa de este procedimiento consiste en estimar una relación masa/carga teórica. Con estos datos se generan las columnas m/z (teór. + H⁺) y m/z (teór. + Na⁺) de la Tabla 6.4. La columna especie contiene la estructuras asignadas a las relaciones m/z calculadas [m/z (teór + X), donde X es H⁺ o Na⁺].

Tercer paso

Esta etapa consiste en establecer una fórmula para cada rel. m/z teórica. La fórmula general de cada cadena de la mezcla será la siguiente: $TA'_x B'_y H$ en el caso de los copolímeros (50-53) y $T(o T')A'_x B'_y C'_z H$, en el caso de los terpolímeros (47-49). Donde x , y , x' , y' y z' representan la cantidad de los diferentes residuos en cada una de las cadenas de polímero (Esquema 6.16).

T y T' = grupo terminal

A = A' = $CH_2CHCOOEt$

B = B' = $CH_2CHCONHCH_2CH_2OH$

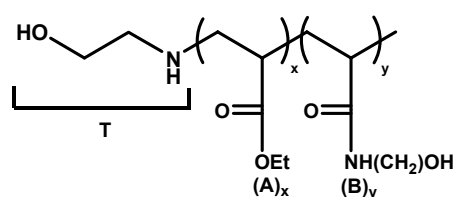
C' = $CH_2CHCOOH$

Esquema 6.16

Con estos datos se construye la columna denominada Especies de la Tabla 6.4. La sumatoria de x o x' , y o y' y z' representan los grados de polimerización de las cadenas que son representados en la Tabla 6.4 bajo la denominación "n".

Las relaciones m/z de las dos familias diferentes pueden expresarse de la siguiente manera:

Copolímeros (productos 50-53) (Esquema 6.17)



50-53

Esquema 6.17

$$m/z = [(M_B - 1) + M_H \text{ (o } M_{Na}) + (xM_{A'} + yM_{B'}) + M'_H] \text{ Da} \quad (\mathbf{a})$$

$(M_B - 1) = T = m/z$ de B-1, correspondiente al residuo de etanolamina ubicado en uno de los extremos de la cadena = 60.08 Da.

M_H (o M_{Na}) = m/z de un H^+ o del ion Na^+ = 1.01 Da (H^+) o 22.98 Da (Na^+).

$x_{A'}$ = número de residuos de A' en cada cadena de polímero o fracción molar de A' en cada cadena polimérica, x es un número entero mayor o igual a 1.

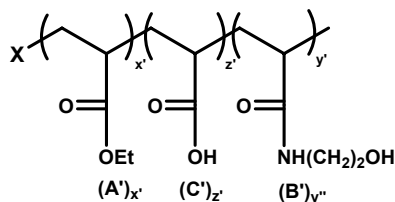
$M_{A'}$ = m/z del residuo de acrilato de etilo = 100.12 Da

$y_{B'}$ = número de residuos de B' en cada cadena de polímero o fracción molar de B' en cada cadena polimérica, y es un número entero mayor o igual a 1.

$M_{B'}$ = m/z del residuo de acrilato de etilo = 115.13 Da

M'_H = masa del protón que se encuentra en uno de los extremos de cada cadena polimérica

Terpolímeros (productos **47-49**) (Esquema 6.18)



47-49

X = T = OCH₂CH₃ ó
X = T' = NHCH₂CH₂OH

Esquema 6.18

$$m/z = [T (oT') + M_H (o M_{Na}) + (xM'_{A'} + yM'_{B'} + zM_{C'}) + M'_H + M_{DMSO}] \text{ Da} \quad (\mathbf{b})$$

$T = (M_B - 1.01 \text{ Da})$ = masa de (B - 1.01) Da, correspondiente a el residuo de etanolamina ubicado en uno de los extremos de la cadena = 60.08 Da.

$T' = (M_{EtOH} - 1.01 \text{ Da})$ = masa de (EtOH - 1.01) Da, correspondiente a el residuo etoxilo ubicado en uno de los extremos de la cadena = 45.06 Da.

$x'_{A'}$ = número de residuos de A en cada cadena de polímero, x es un número entero mayor o igual a 1.

$M'_{A'}$ = m/z del residuo de acrilato de etilo = 100.12 Da

$y'_{B'}$ = número de residuos de B' en cada cadena de polímero, y es un número entero mayor o igual a 1.

$M'_{B'}$ = m/z del residuo de acrilato de etilo = 115.13 Da.

$z'_{C'}$ = número de residuos de C' en cada cadena de polímero o fracción molar de C' en cada cadena polimérica, z' es un número entero mayor o igual a 1.

$M_{C'}$ = m/z del residuo de ácido acrílico = 72.06 Da

M_{DMSO} = masa del DMSO = 78.13 Da.

Obsérvese que las definiciones de los pares ($x_{A'}, x'_{A'}$) y ($x_{B'}, x'_{B'}$) difieren en que las primeras de cada par pueden ser consideradas en el cuarto paso para determinar la fracción molar de A' ($X_{A'}$) y B' ($X_{B'}$). En cambio, en los casos de $x'_{A'}$ y $x'_{B'}$ esto no es así ya

que debido a la suposición que un residuo etoxilo podría estar presente en uno de los extremos de las cadenas poliméricas cambia la situación y estas magnitudes no pueden ser relacionadas directamente para obtener las fracciones molares $X_{A'}$ y $X_{B'}$.

Esto sucede por una simple cuestión matemática, se sabe que:

$$M_{A'} = 100.12 \text{ Da}$$

$$M_{B'} = 115.13 \text{ Da}$$

$$M_T = 60.08 \text{ Da}$$

$$M_{T'} = 45.06 \text{ Da}$$

O sea que las diferencias

$$M_{B'} - M_{A'} = 15.01 \text{ Da (c)}$$

$$M_T - M_{T'} = 15.02 \text{ Da (d)}$$

Además supongamos que se pudo asignar a una rel. m/z una estructura: $TA'_x B'_y C'_z H$, por lo tanto debido a que las diferencias **c** y **d** son prácticamente indistinguibles podemos asignar una segunda estructura para la misma rel. m/z que será $T' A'_{x'+1} B'_{y'-1} C'_z H$. Debido a esta razón es que en el caso de los terpolímeros x' e y' no pueden ser utilizados en la próxima etapa del trabajo para calcular $X_{A'}$ y $X_{B'}$. Lo que si podremos calcular serán las fracciones de etoxilo X_{Eto} y los residuos de etanolamina que se encuentren en forma de amina secundaria como extremo de la cadena o como grupo pendiente en las unidades de B' X_{NH_2EtOH} .

Una vez realizadas todas las definiciones mencionadas, es necesario encontrar una forma práctica de aplicarlo. Para esto se definieron dos caminos: uno denominado "creciente" y otro "decreciente". El primero resulta más útil para los copolímeros mientras que el segundo es más apropiado para los terpolímeros, aunque cualquiera de los dos caminos pueden ser aplicados en ambos casos.

A continuación se presentarán algunos ejemplos de asignaciones de algunas de las señales de las componentes de los productos **49** y **50**.

Se comenzará explicando el camino "descendente" aplicado para determinar las estructuras de las componentes de las mezclas de los terpolímeros **47-49**. Para este fin se tomarán como ejemplo algunas componentes del producto **49** presentadas en la Tabla 6.4 (Tabla 6.4.a).

Tabla 6.4.a. Relaciones m/z exp. (Da) identificadas en el espectro de UV-MALDI-TOF del producto **49**

m/z (exp.)	Especies	n	m/z (teór.+ H ⁺)	m/z (teór.+ Na ⁺)
893.9				
.
.
.
1201.7				

En este caso se considerará la expresión empírica **b**

$$m/z = [T (oT') + M_H (o M_{Na}) + (x'M_{A'} + y'M_{B'} + z'M_{C'}) + M'_H + M_{DMSO}] \text{ Da } \mathbf{(b)}$$

Por conveniencia se utilizará $M_{C'}$ (72.06 Da) como “valor base”.

Para determinar cada estructura el término $[T (oT') + M_H (o M_{Na}) + (x'M_{A'} + y'M_{B'} + z'M_{C'}) + M'_H + M_{DMSO}]$, pasa al otro miembro obteniéndose la nueva expresión empírica **e**

$$[m/z \text{ exp.} - T (oT') - M_H (o M_{Na}) - (x'M_{A'} + y'M_{B'} + z'M_{C'}) - M'_H - M_{DMSO}] \text{ Da} \approx 0 \text{ Da } \mathbf{(e)}$$

La tolerancia aceptada entre las relaciones m/z experimental y las teóricas es ± 1 , aunque en algunos casos esta diferencia fue un poco mayor pero fue calificada como aceptable.

Los términos $T (oT') - M_H + M'_H$ en las expresión **b** son fijos, por lo tanto se pueden reunir y obtener una relación $m/z = 61.09$ (para T) o 45.06 (para T') constantes que se pueden denominar K (para T) y K' (para T').

Los cálculos se comenzarán con la primera rel. m/z de la Tabla 6.4.a:

$$m/z (\text{exp.}) = 893.9 \text{ Da}$$

Por lo tanto por lo expuesto anteriormente

$$[893.9 - T (oT') + M_H (o M_{Na}) + (x'M_{A'} + y'M_{B'} + z'M_{C'}) + M'_H + M_{DMSO}] \text{ Da} \approx 0 \text{ Da}$$

Debe aclararse que M_{DMSO} sólo fue considerada cuando el valor teórico obtenido no era satisfactorio.

El primer cálculo se realizó considerando a T como extremo de la cadena y no a T'

$$z' = 1$$

$$[893.9 - 60.08 - 1.01 - x'M_{A'} - y'M_{B'} - 72.06] \text{ Da} \approx 0 \text{ Da}$$

$$[759.74 - x'M_{A'} - y'M_{B'}] \text{ Da} \approx 0 \text{ Da}$$

Este resultado permite observar que no existen valores de x' e y' que satisfagan la relación. Ya que el valor obtenido debería ser

$$\text{Valor obtenido} - y'115.13 = x'A' \text{ (donde } x' \geq 0 \text{)}$$

Siempre que $y' \leq 7$ ($7 \times 115.13 = 805.91$) si fuera mayor se deberá sumar una unidad, con A' se puede realizar una relación similar.

$$\text{Valor obtenido} - y'100.12 = y'B' \text{ (donde } y' \geq 0 \text{) o,}$$

$$\text{Valor obtenido} - y'100.12 = y'M_{B'}$$

Finalmente se pueden combinar las relaciones de A' y B'. Ahora veremos qué sucede cuando

$$z' = 2$$

$$[687.68 - x'M_{A'} - y'M_{B'}] \text{ Da} \approx 0 \text{ Da}$$

Nuevamente el resultado no es satisfactorio, por lo tanto se agrega una nueva unidad de C'

$$z' = 3$$

$$[615.62 - x'M_{A'} - y'M_{B'}] \text{ Da} \approx 0 \text{ Da}$$

El nuevo valor es satisfactorio porque permite encontrar una relación de x' e y' :

$$y' = 1$$

$$x' = 5$$

$$[615.62 - 500.60 - 115.13] \text{ Da} = -0.13 \text{ Da}$$

$$[893.9 - K - 1.01 - x'M_A - y'M_B - 3(72.06) + M'_H] \text{ Da} \approx 0 \text{ Da}$$

$$[615.62 - x'M_A - y'M_B] \text{ Da} = -0.13 \text{ Da} < |1|$$

Por lo tanto este resultado cumple con la condición impuesta. Ahora resta terminar la estructura, que será: $TA'_5B'_3C'_3H$, además la cadena tiene como contraión ^+H , con una relación m/z (teór. + ^+H) = 893.94 Da

El grado de polimerización será

$$n = x' + y' + z = 5 + 1 + 3 = 9$$

Por convención el valor centesimal se aproxima al valor menor cuando es menor de 0.05 o al mayor cuando la diferencia es mayor a 0.05, si esta diferencia es igual a 0.05 la cifra decimal se aproximara a la cifra decimal par es decir por ejemplo si el valor calculado es 1000.45, el valor aproximado será 1000.4. En el caso en discusión la relación $m/z = 893.9$.

Con estos datos se completan las columnas de la Tabla 6.4.a. Pero ésta no es la única asignación posible ya que si en lugar de T consideramos T' obtenemos otra estructura probable que surgirá de restar una unidad de B' y sumar una de A' como se hizo referencia anteriormente. Entonces se asignaría: T' A'_6C'_3H.

Con estos datos se completan las columnas de la Tabla 6.4.a (Tabla 6.4.b).

Tabla 6.4.b. Especie, n y m/z (teór. + H^+) determinadas para m/z exp. = 893.9 Da

m/z (exp.)	Especies	n	m/z (teór. + H^+)	m/z (teór. + Na^+)
893.9	$TA'_5B'_3C'_3H$	9	893.9	
	$T' A'_6C'_3H$	9	893.9	

En esta explicación se obvian los cálculos realizados considerando al contraión Na^+ ya que no dan resultados satisfactorios. Lo mismo ocurre con los cálculos realizados considerando el DMSO.

A continuación se considerará la relación m/z exp = 1201.7 Da

Se podrían realizar los cuatro cálculos necesarios para conservar como valor base 72.06 Da, considerando como contraiones H^+ o Na^+ y la combinación con DMSO, sin embargo

no se llegará a un valor satisfactorio. Sólo se presentará un ejemplo considerando H^+ como contraión

$$[1201.7 - 11 (72.06) - 3 (115.13) - 61.09 - 1.01] \text{ Da} = 1200.15 \text{ Da}$$

$$[1201.7 - 1200.15] \text{ Da} = 1.55 \text{ Da}$$

La diferencia entre el valor teórico y el experimental no es aceptable por lo tanto como se aclaró anteriormente se realizaron los tres cálculos restantes sin llegar a un valor satisfactorio.

Por lo tanto se pensó en cambiar el valor base 72.06 Da por 100.12 Da con el fin de observar alguna diferencia que facilitara la asignación. Además se tomaron las diferencias entre $M_{A'} - M_{C'}$ y $M_{B'} - M_{C'}$ para ir observando en cada "paso a paso" alguna diferencia "lógica" que permitiera aumentar la velocidad del proceso de asignación:

$$M_{A'} - M_{C'} = 28.06 \text{ Da}$$

$$M_{B'} - M_{C'} = 43.07 \text{ Da}$$

En síntesis se puede llegar a la siguiente expresión siguiendo un procedimiento paso a paso:

$$[6(100.12) + 4 (115.13) + 61.09 + 1.01] \text{ Da} = 1123.34 \text{ Da}$$

Ahora bien, este valor está lejos de ser apropiado, sin embargo si efectuamos la siguiente sustracción:

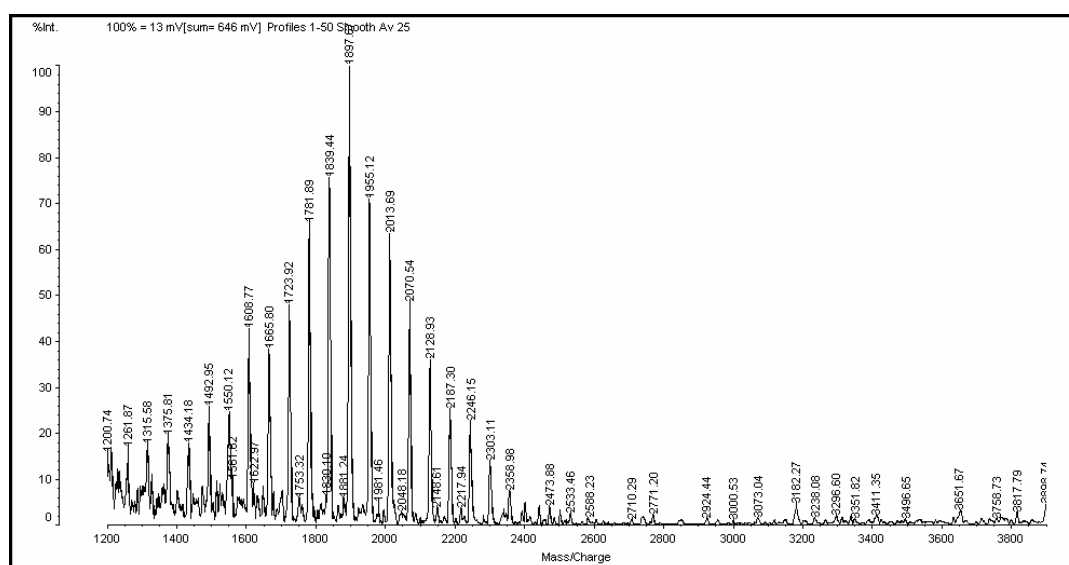
$$[1201.7 - 1123.34] \text{ Da} = 78.36 \text{ Da}$$

Este valor es prácticamente igual a M_{DMSO} (78.13 Da). Por lo tanto, se considera $x' = 6$ e $y' = 4$, H^+ como contraión y por último que esta componente de la mezcla polimérica en el proceso de desorción e ionización formó un cluster con una unidad de DMSO que presentaba la siguiente fórmula $[(T'A'_6B'_4H)^+H]$ DMSO con una rel. m/z (teór + ^+H) = 1201.47 Da. En este caso $n = 10$. Pero nuevamente aquí vuelve a existir la posibilidad de una segunda asignación que será $[(T'A'_5B'_5H)^+H]$ DMSO (Tabla 6.4.c).

Tabla 6.4.c. Especie, n y m/z (teór.+ H⁺) determinadas para m/z exp. = 1201.7 Da

m/z (exp.)	Especies	n	m/z (teór.+ H ⁺)	m/z (teór.+ Na ⁺)
1201.7	TA ₆ B ₄ H(DMSO)	10	1201.5	
	T'A ₅ B ₅ H(DMSO)	10	1201.5	

En el caso de los productos **50-53** se aplicó el “camino ascendente”. A continuación se explicará esta metodología haciendo uso de algunas componentes del producto **50** (Figura 6.5 y Tabla 6.6).

**Figura 6.5.** Espectro de masa UV-MALDI-TOF del producto **50****Tabla 6.5.** Asignaciones de las señales del espectro de masa UV-MALDI-TOF para el producto **50** (m/z, Da; los valores corresponden a la ionización con H⁺ y Na⁺)

m/z (exp.)	Especies	n	m/z (theor. + H ⁺)	m/z (theor. + Na ⁺)
1261.8	TA ₆ B ₅ H	11		1260.45
1315.5	TA ₁₀ B ₂ H	12		1315.53
1375.8	TA ₆ B ₆ H	12		1375.57
1434.1	TA ₂ B ₁₀ H	12		1435.61
1492.9	TA ₆ B ₇ H	13		1491.11
1550.1	TA ₂ B ₁₁ H	13		1550.74
1608.8	TA ₁₂ B ₃ H	15	1608.9	
1665.8	TA ₂ B ₁₂ H	14		1665.87
1723.9	TA ₁₂ B ₄ H	16	1724.1	
1781.9	TA ₂ B ₁₃ H	15		1781.0
1839.4	TA ₅ B ₁₂ H	17	1839.2	1839.18
1897.7	TA ₂ B ₁₄ H	16		1896.13

Tabla 6.5. Continuación

1954.3	TA ₁₂ B ₆ H	18	1955.1	
2013.7	TA ₈ B ₁₀ H	18	2014.4	
2070.5	TA ₁₂ B ₇ H	19	2069.4	
2128.9	TA ₈ B ₁₁ H	19	2129.5	
2187.3	TA ₂₁ H	21		2186.59
2303.2	TA ₄ B ₁₆ H	20	2304.7	
2359.0	TA ₈ B ₁₃ H	21	2359.8	
2446.2	TA ₁₉ B ₄ H	23		2446.87
2537.2	TA ₁₃ B ₁₀ H	23		2536.93
2747.3	TA ₂₂ B ₄ H	26		2747.23
3182.3	TA ₂₆ B ₃ H	29		3182.68
3651.7	TA ₁₄ B ₁₉ H	33	3651.25	
3898.7	TA ₂₂ B ₁₄ H	36		3898.53

De la Tabla 6.5 se tomarán dos señales para ejemplificar el razonamiento seguido (Tabla 6.5.a).

Tabla 6.5.a. Relaciones m/z (Da) identificadas en el espectro de masa UV-MALDI-TOF del producto **50**

m/z (exp.)	Especies	n	m/z (teór. + H ⁺)	m/z (teór. + Na ⁺)
1315.5				
·	·	·	·	·
·	·	·	·	·
·	·	·	·	·
1954.3				

Para este fin se utilizará la expresión empírica **a**

$$m/z = [(M_B - 1) + M_H \text{ (o } M_{Na}) + (xM_{A'} + yM_{B'}) + M'_H] \text{ Da} \quad (\mathbf{a})$$

Empezamos considerando que el contraión de la cadena desorbida es H⁺, por lo tanto m/z = 1.01 Da.

Los extremos de las cadenas son H⁺ y un residuo de M_B, por lo tanto m/z = M_B - 1 = 60.08.

En segundo lugar para el camino creciente utilizaremos como valor base la relación m/z de A', esta es, 100.12 Da.

Por lo tanto lo único que resta es comenzar el procedimiento

$$m/z \text{ (exp.)} = 1315.5 \text{ Da}$$

Se comienza la sumatoria para obtener la relación m/z teórica considerando a H⁺ como contraión (m/z teór + H⁺), por lo tanto se debe obtener una expresión de forma

$$1315.5 \text{ Da} \approx [K + 1.01 + (xM_{A'} + yM_{B'})]\text{Da}$$

La tolerancia para las diferencias entre las relaciones m/z teóricos y experimentales fue de ± 1 Da, existieron casos en los cuales pudo llegar a ser un poco mayor a este valor pero se asignó en forma tentativa dado que era la estructura más probable de todas las posibles calculadas.

Entonces:

$$m/z (\text{teór} + \text{H}^+) = 61.09 + 1.01 + 9 (100.12) = 963.18 \text{ Da}$$

En este punto se observa que no existirá un número de residuos de A' o B' que conduzca a un valor apropiado, sin embargo por sumatoria de tres unidades de B es posible llegar a la siguiente relación m/z:

$$(m/z \text{ teór} + \text{H}^+) = [61.09 + 1.01 + 9 (100.12) + 3 (115.13)] \text{ Da} = 1308.57 \text{ Da}$$

Este es el valor más cercano al valor experimental que se puede obtener a partir de las diferentes combinaciones de los números de A' y B' que se repiten en una cadena dada. Por otra parte existe otro detalle interesante:

$$(1315.5 - 1308.57) \text{ Da} = 6.93 \text{ Da}$$

Esta diferencia es prácticamente igual al resultado de aumentar en una unidad la cantidad de los residuos de A', disminuir en la misma cantidad el número de residuos de B' y cambiar el contraión H⁺ por Na⁺, o sea

$$(1308.57 - 115.13 + 100.12 - 1.01 + 22.98) \text{ Da} = 1315.53 \text{ Da}$$

Por lo tanto la especie asignada a la señal en cuestión será TA'₁₀B'₂H con Na⁺ como contraión. Una vez asignada la estructura más probable para cada señal observada, se debe establecer el grado de polimerización de cada componente, el cual es determinado a partir de la siguiente ecuación:

$$n = x + y$$

Para este caso

$$n = 10 + 2 = 12$$

Con estos datos ya se puede completar el resto de las columnas de la Tabla 6.5.b.

Tabla 6.5.b. . Especie, n y m/z (teór.+ Na⁺) determinadas para m/z exp. = 1315.5

m/z (exp.)	Especie	n	m/z (teór. + H ⁺)	m/z (teór. + Na ⁺)
1315.5	TA' ₁₀ B' ₂ H	12		1315.53

Existe otra manera de asignar esta señal. Consiste en sumar a K y a la rel m/z de Na⁺ un número de residuos de A de tal forma que supere a la relación experimental, es decir 1315.5 y observar que este valor calculado se excede aproximadamente en n(115.13 Da), o sea

$$[61.09 + 22.98 + 13 (100.12)] \text{ Da} = 1385.63 \text{ Da}$$

Si a este valor restamos tres unidades de A', entonces obtenemos 1085.27, la diferencia entre 1315.5 y 1085.27 es igual a 230.23. Esta diferencia es prácticamente igual a la diferencia entre dos unidades de 2B' - 2A' = 30.02:

$$(1385.63 - 3(100.12) + 2(115.13) \text{ Da} = 1315.53 \text{ Da}$$

La asignación de la otra señal seleccionada [m/z (exp.) = 1954.32 Da] es más sencilla (Tabla 6.5.c):

Tabla 6.5.c. Relaciones m/z exp. =1954.32 Da identificadas en el espectro de masa UV-MALDI-TOF del producto **50**

m/z (exp.)	Especie	n	m/z (teór. + H ⁺)	m/z (teór. + Na ⁺)
1954.3				

Para la m/z (exp.) = 1954.3 Da

$$m/z (\text{teór.} + \text{H}^+) = [61.09 + 1.01 + 12 (100.12)] \text{ Da} = 1263.54 \text{ Da}$$

$$\Delta [(m/z (\text{exp.}) - m/z (\text{teór.} + \text{H}^+)) \text{ Da} = (1954.32 - 1263.54) \text{ Da} = 690.78 \text{ Da}$$

Esta diferencia es $[6 (115.13)] \text{ Da} = 690.78 \text{ Da}$, entonces

$$m/z (\text{teór.} + \text{H}^+) = [61.09 + 1.01 + 12 (100.12) + 6 (115.13)] \text{ Da} = 1954.32 \text{ Da}$$

Entonces $n = 18$, y la especie más probable $\text{TA}_{12}\text{B}_6\text{H}$ habiendo sido desorbida con H^+ como contraión. Con estos datos podemos completar la Tabla 6.5.a (Tabla 6.5.d):

Tabla 6.5.d. Especie, n y m/z (teór.+ X^+ , $\text{X} = \text{H}$ o Na) determinadas para m/z exp. = 1315.5 y 1954.3 Da

m/z (exp.)	Especies	n	m/z (teór. + H^+)	m/z (teór. + Na^+)
1315.5	$\text{TA}'_{10}\text{B}'_2\text{H}$	12		1315.53
1954.32	$\text{TA}'_{12}\text{B}'_6\text{H}$	18	1954.3	

Debe aclararse que con el objeto de facilitar la explicación del cálculo se han obviado los pasos de sumatoria para establecer x e y . Ya que cada cálculo se hace paso a paso.

Cuarto paso

En esta parte del trabajo se calculan los pesos moleculares promedios en peso (M_w) y en número (M_n), según las siguientes expresiones:

$$M_n = \frac{\sum (a_i M_i)}{\sum a_i}$$

$$M_w = \frac{\sum (a_i M_i^2)}{\sum a_i M_i}$$

donde a_i = es el área de cada señal en cuestión, M_i es igual a la masa de cada componente menos la masa del contraión. Además, en los casos que fue necesario se eliminó la masa del DMSO.

El área de cada señal (a_i) es considerada y calculada como la de un triángulo, es decir:

$$a_i = (b_i \times h_i) / 2$$

En los casos en los cuales una rel m/z fuera producto de la desorción de una componente con los dos contraiones o bien la posibilidad de que uno de los extremos fuera T o T' o bien que la componente tuviera DMSO, pero en todos los casos todas tuvieran el mismo peso luego de eliminar los contraiones y el DMSO: el área de la masas en particular es considerada como la suma de todas las áreas que surjan de las diferentes combinaciones de contraiones y grupos terminales como T o T'.

Se presentarán algunos ejemplos de los cálculos de Mw y Mn de las estructuras asignadas de los productos **49** y **50** (Tabla 6.6. y Tabla 6.5.d).

Tabla 6.6. Especie, n y m/z (teór.+ H⁺) determinadas para m/z exp. = 893 y 1201.7 Da

m/z (exp.)	Especies	n	m/z (teór.+ H ⁺)	m/z (teór.+ Na ⁺)
.
.
893.9	TA' ₅ B'C' ₃ H	9	893.9	.
	T' A' ₆ C' ₃ H	9	893.9	.
.
.
1201.7	TA' ₆ B' ₄ H(DMSO)	10	1201.5	.
	T'A' ₅ B' ₅ H(DMSO)	10	1201.5	.
.
.
.

$$m/z (\text{teór.} + H^+) = 893.9 \text{ Da}$$

$$a_{893.9} = (b_{893.9} \times h_{893.9}) / 2 = 9$$

$$m/z (\text{exp} + H^+) = 1201.5 \text{ Da}$$

$$a_{1201.5} = (b_{1201.5} \times h_{1201.5}) / 2 = 15$$

$$\text{Para } m/z (\text{teór.} + H^+) = 893.9 \text{ Da}$$

$$m_i = m/z (\text{teór.} + H^+) - H^+$$

$$m_i = 892.9 \text{ Da}$$

$$\text{Para } m/z (\text{teór.} + H^+) = 1201.5 \text{ Da}$$

$$m_i = [m/z (\text{teór.} + H^+) - H^+ - 78.13] \text{ Da}$$

$$m_i = 1122.4 \text{ Da}$$

Para calcular Mw y Mn deben considerarse también los grados de polimerización (n) de cada componente, o sea que en forma simplificada obtendríamos la siguiente expresión

$$\mathbf{Mn}_{49}=[(\dots 9(892.9) + \dots + 15(1122.4) + \dots)/(\dots + 9 + \dots + 15)] \text{ g/mol}=\mathbf{1626g/mol}$$

$$\mathbf{Mw}_{49}=[(\dots 9(892.9)^2 + \dots + 15(1122.4)^2 + \dots)/(\dots + 9(989) + \dots + 15(1122.4))] \text{ g/mol}=\mathbf{1694g/mol}$$

A continuación se presentarán los mismos cálculos realizados para el producto **50**:

Tabla 6.5.d Especie, n y m/z (teór.+ X⁺, X = H o Na) determinadas para m/z exp. = 1201.7 y 1954.3 Da

m/z (exp.)	Especies	n	m/z (teór. + H ⁺)	m/z (teór. + Na ⁺)
.
.
1315.5	TA' ₁₀ B' ₂ H	12	.	1315.5
.
.
1954.3	TA' ₁₂ B' ₆ H	18	1954.3	.

$$m/z (\text{teór.} + \text{Na}^+) = 1315.5 \text{ Da}$$

$$\mathbf{a}_{1315.5} = (b_{1315.5} \times h_{1315.5}) / 2 = \mathbf{24}$$

$$m/z (\text{exp} + \text{H}^+) = 1954.3 \text{ Da}$$

$$\mathbf{a}_{1954.3} = (b_{1954.3} \times h_{1954.3}) / 2 = \mathbf{101}$$

$$\text{Para } m/z (\text{teór.} + \text{Na}^+) = 1315.5 \text{ Da}$$

$$m_i = [m/z (\text{teór.} + \text{Na}^+) - \text{Na}^+] \text{ Da}$$

$$\mathbf{m_i = 1297.5 Da}$$

$$\text{Para } m/z (\text{teór.} + \text{H}^+) = 1954.3 \text{ Da}$$

$$m_i = [m/z (\text{teór.} + \text{H}^+) - \text{H}^+] \text{ Da}$$

$$\mathbf{m_i = 1953.3 Da}$$

Al igual que en el caso del producto **49** para calcular Mw y Mn deben considerarse los grados de polimerización (n) de cada componente, o sea que en forma simplificada obtendríamos la siguiente expresión

$$\mathbf{Mn}_{50}=[(\dots 24(1297.5) + \dots + 101(1953.3) + \dots)/ (\dots 24 + \dots + 101 + \dots)] \text{ g/mol}=\mathbf{1883g/mol}$$

$$Mw_{50} = [(\dots 24(1297.5)^2 + \dots + 101(1953.3)^2 + \dots)] / (\dots + 24(1297.5) + \dots + 101(1953.3)) \text{g/mol} = 1956 \text{g/mol}$$

Quinto paso

Una vez determinados los pesos moleculares promedios M_w y M_n se determina la polidispersión del producto (PD):

$$PD = M_w/M_n$$

Para el producto **49**

$$PD_{49} = (1694 \text{g/mol}) / (1626 \text{g/mol}) = 1.04$$

Mientras que para el producto **50** tendrá el siguiente valor

$$PD_{50} = (1956 \text{g/mol}) / (1883 \text{g/mol}) = 1.04$$

Sexto paso

Esta etapa del trabajo consistió en poder establecer las fracciones molares de A', B' y C'. En el caso de los productos **50-53** fue posible calcular la fracción molar de A' y B' a partir de las siguientes expresiones aplicables a cada componente.

$$x_{A'} = x / x + y$$

$$y_{B'} = y / x + y$$

Para establecer la fracción molar de A' y B' de cada producto se utilizan las siguientes expresiones

$$X_{A'} = \sum a_i x_i / \sum a_i (x_i + y_i)$$

$$Y_{B'} = \sum a_i y_i / \sum a_i (x_i + y_i)$$

A continuación se presenta un ejemplo de aplicación resumido con las señales asignadas en la sección 6.4.1.1.c.

Para m/z (Teór. + Na^+)

$$X_{A'50} = (24(10)\dots + 101(12)) / (\dots + 24(12) + \dots + 101(18) + \dots) = \mathbf{0.46}$$

$$Y_{B'50} = (24(2)\dots + 101(6)) / (\dots + 24(12) + \dots + 101(18) + \dots) = \mathbf{0.54}$$

En los casos de los productos **47-49** esto no fue factible debido a que la mayoría de las señales tiene dos estructuras más probables para asignar, una que considera que las cadenas poseen en uno de sus extremos T y la otra que considera en esta posición a T'. Sin embargo, se pudo calcular la fracción molar de C' a partir de la expresión **f** ya que el grado de polimerización (n) de cada cadena no varía a pesar la situación comentada.

$$x_{C'} = z' / x' + y' + z' \quad (\mathbf{f})$$

Al igual que en los casos de las fracciones molares de x e y, para establecer la fracción molar de C' de cada producto se utilizan las siguientes expresiones:

$$X_{C'} = \sum a_i x_i / \sum a_i (x_i + y_i)$$

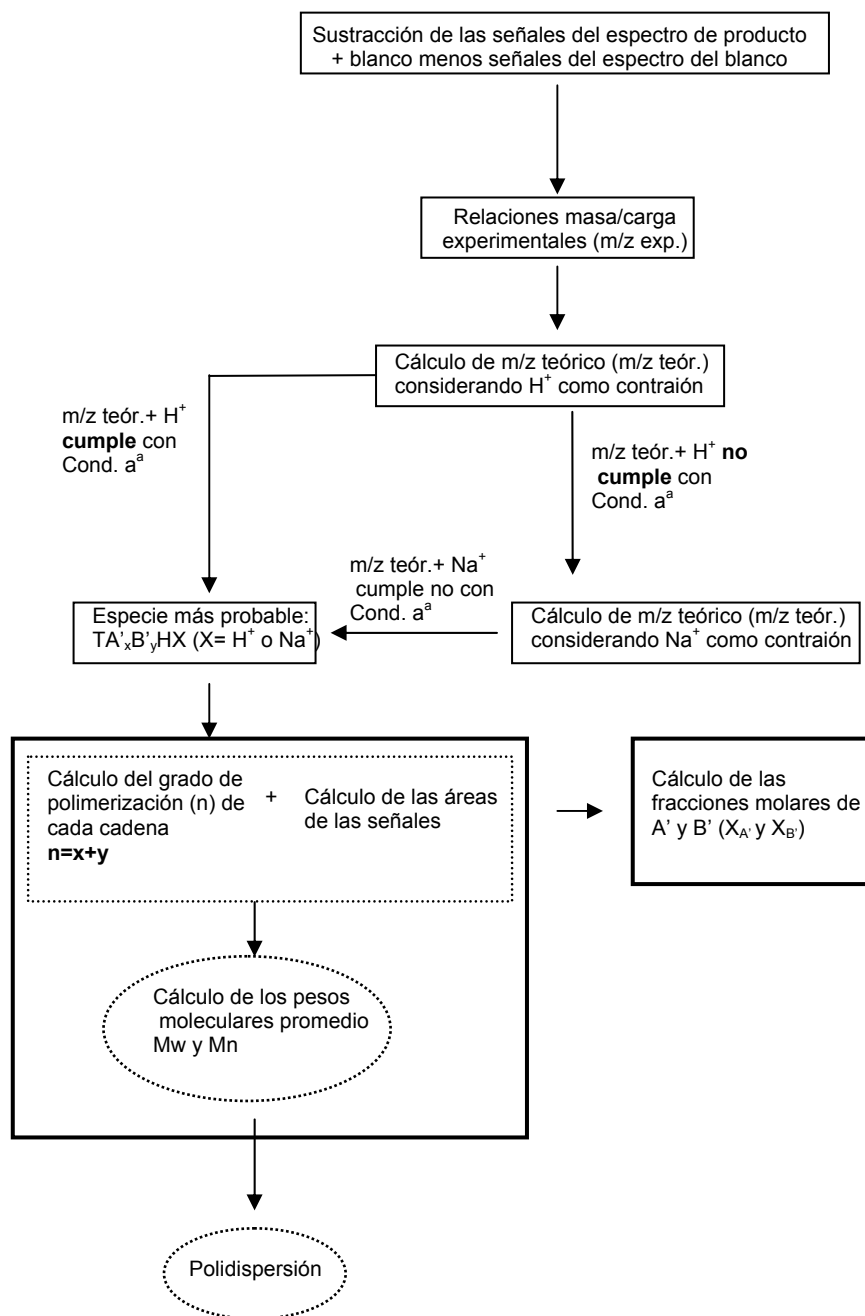
$$X_{C'49} = (9(3) + \dots + 15(0)) / (\dots + 9(9) + \dots + 15(10) + \dots) = \mathbf{0.1}$$

En resumen, se han presentado en los Pasos 1 a 6 con algunos ejemplos de aplicación, la metodología utilizada para determinar en forma parcial la estructura de los productos **47-53**. En este sentido, debe considerarse que la elucidación estructural es parcial ya que las herramientas analíticas utilizadas no permitieron establecer la secuencia de las unidades en las cadenas poliméricas que se supone que es al azar.

En los Esquemas 6.19 y 6.20 se presenta en forma simplificada la metodología seguida para determinar las siguientes propiedades de los compuestos **47-53**:

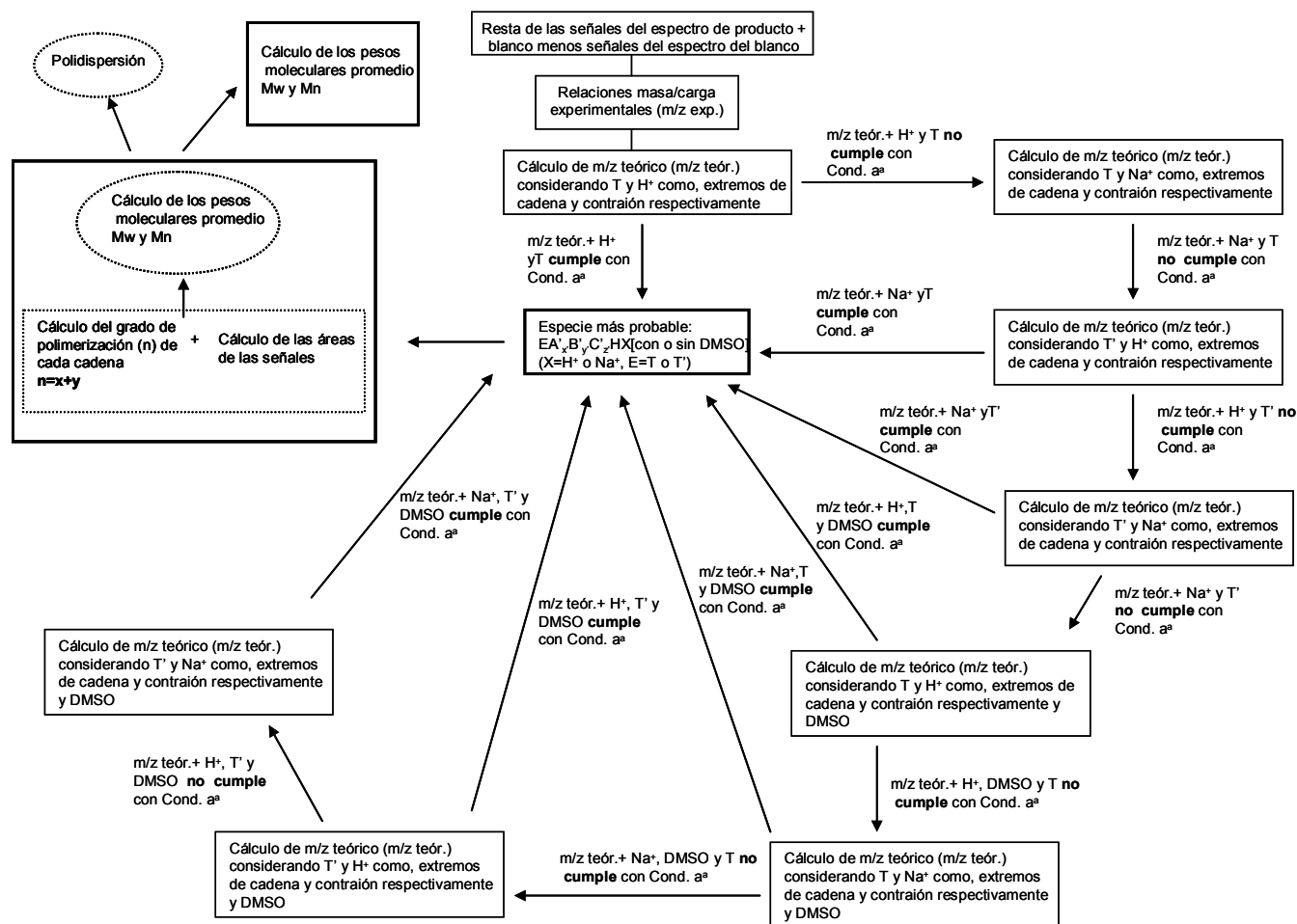
- Estructura más probable de cada una de las componentes de cada producto
- Grado de polimerización de cada cadena polimérica
- Pesos moleculares promedio
- Fracciones molares de los grupos amida y éster en los casos de los productos **50-53**, y fracción molar de los grupos pendientes ácido en los casos de los compuestos **47-49**

- Polidispersión de los productos



^a. Condición a: la diferencia entre m/z exp. y m/z teor. + X⁺ (X=H o Na) es ±2

Esquema 6.19. Metodología seguida para caracterizar los compuestos **50-53** a partir de espectrometría de masa UV-MALDI-TOF



Esquema 6.20. Metodología seguida para caracterizar los compuestos 47-49 a partir de espectrometría de masa UV-MALDI-TOF

En la Tabla 6.7 se presentan los valores calculados de Mw, Mn y PD de los productos **47-53**. Además en los casos en que fue posible se informan las fracciones molares de los diferentes monómeros.

Tabla 6.7. Pesos moleculares, polidispersión y composición de los productos **47-53**

Producto	Etanolamina/Acrilato de etilo	Mw	Mn	PD	Fracción molar		
					Amida	Éster	Ácido
47	0.05	981	897	1.09	ND	ND	0.32
48	0.1	1231	1140	1.09	ND	ND	0.25
49	0.25	1694	1626	1.04	ND	ND	0.1
50	0.5	1956	1883	1.04	0.54	0.46	ND
51	1	851	801	1.06	0.86	0.14	ND
52	2.5	554	491	1.13	0.73	0.27	ND
53	5	537	484	1.11	0.62	0.38	ND

ND: no determinado

6.3.2. Análisis estructural de los compuestos **47-53** por espectroscopía de RMN uni- y bidimensional

6.3.2.1. Compuestos **47-49**

Como indicamos anteriormente los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de los compuestos obtenidos eran muy complejos. A modo de ejemplo se presentan los espectros de RMN ^1H (Figura 6.6) y ^{13}C (Figura 6.7) del producto **49**.

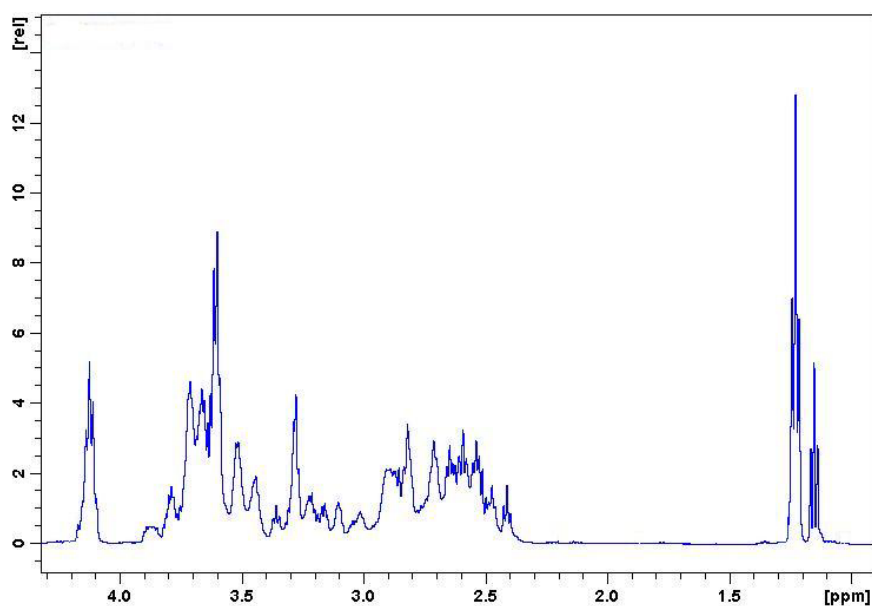


Figura 6.6. Espectro de RMN de ^1H del producto **49** en NaOD

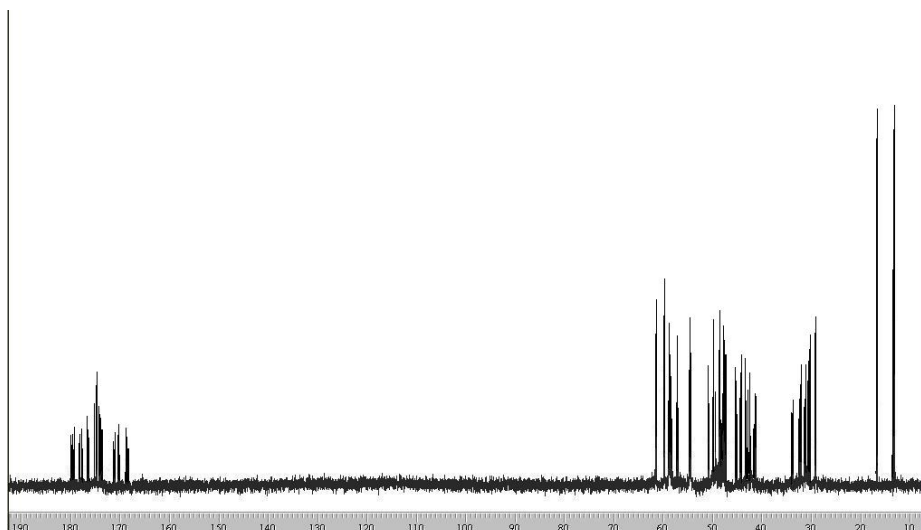


Figura 6.7. Espectro de RMN de ^{13}C del producto **49** en NaOD

En los espectros se observaban señales correspondientes a dos grupos metilos diferentes. Con el objeto de comprobar que las señales observadas en el espectro de ^{13}C a 14.2 y 17.7 ppm correspondían a grupos metilo se realizó un espectro de RMN con acoplamientos ^1H - ^{13}C (Figura 6.8).

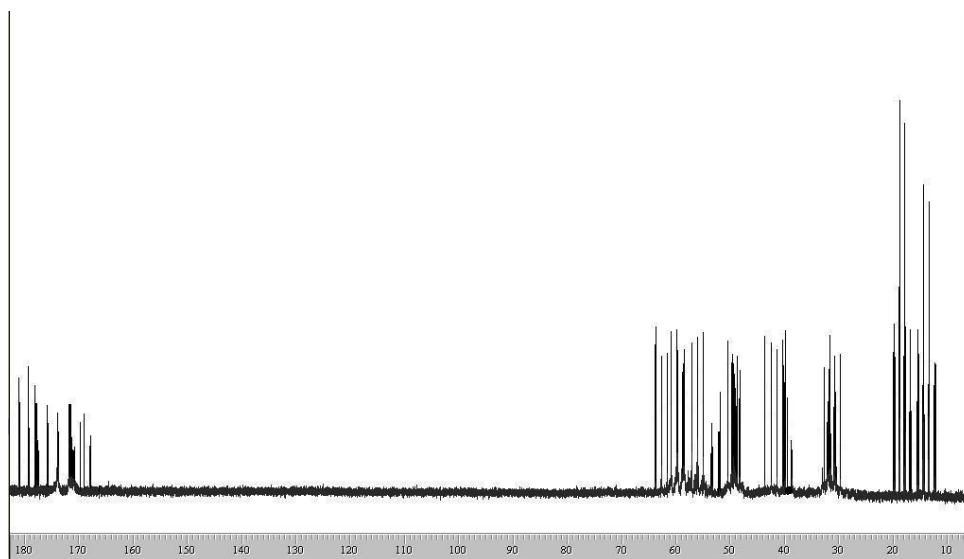


Figura 6.8. Espectro de RMN con acoplamientos ^1H - ^{13}C del producto **49** en NaOD

Por comparación de las zonas de interés del espectro de ^{13}C desacoplado y el espectro con acoplamientos ^1H - ^{13}C (Figura 6.9) se pudo concluir que estas señales correspondían a grupos metilo, ya que en el espectro acoplado las señales en análisis presentaban una multiplicidad acorde con las esperables para grupos metilo (a y e'), es decir dos cuartetos.

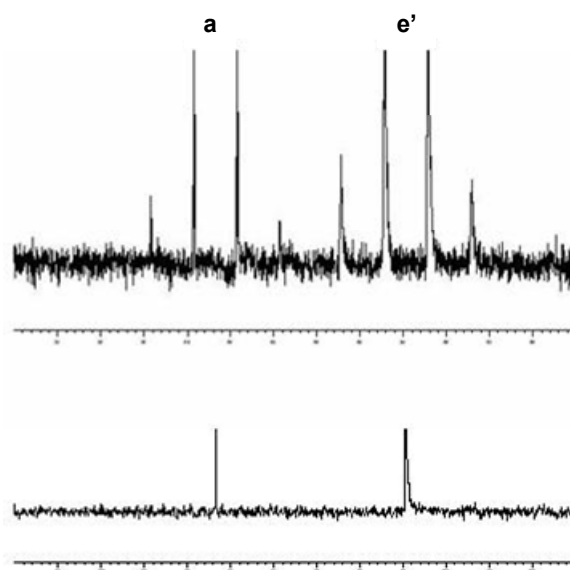
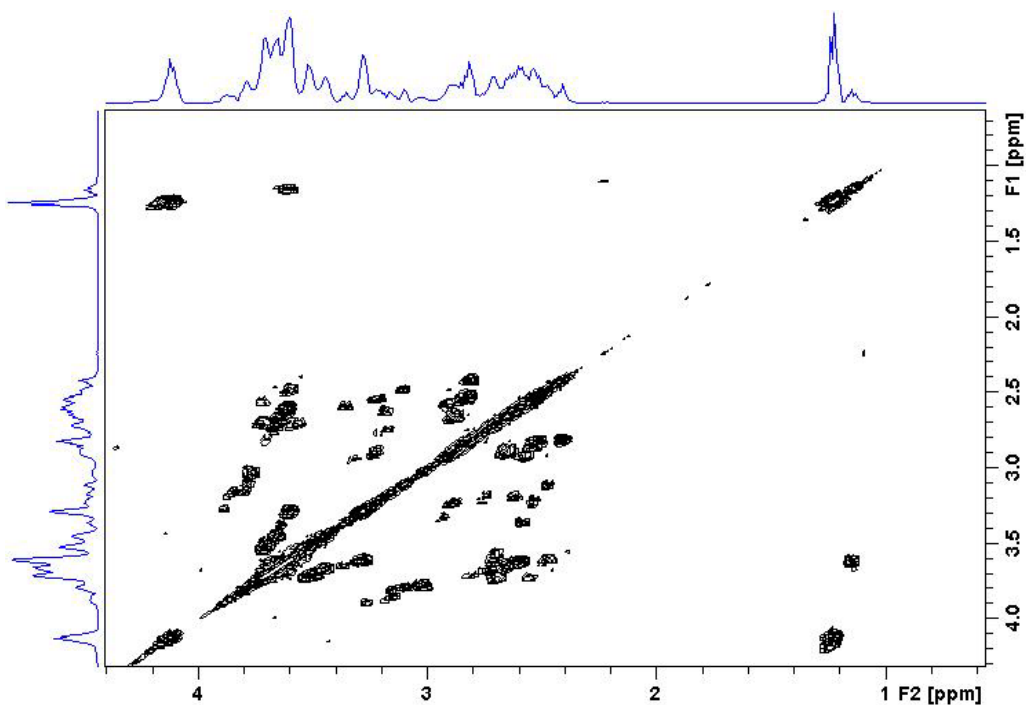
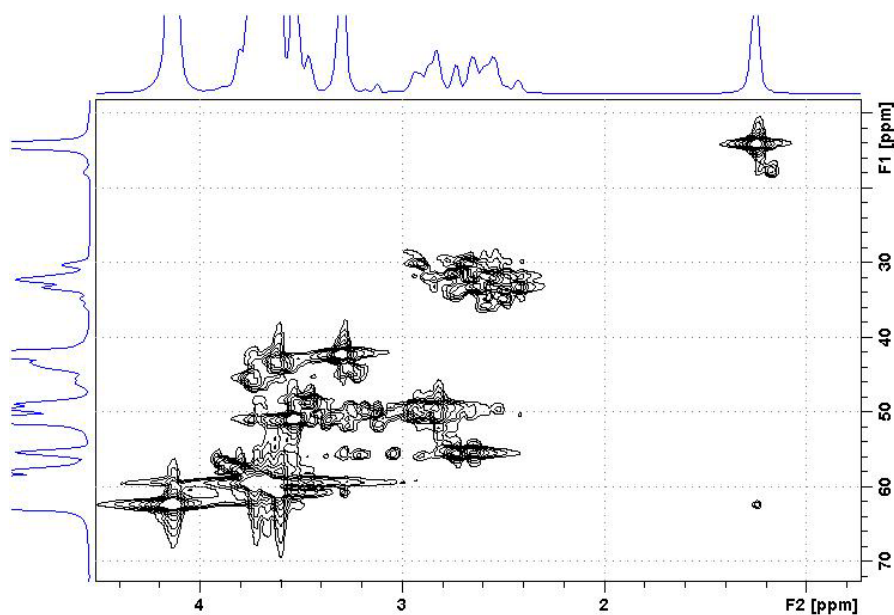


Figura 6.9. Ampliación del espectro de RMN con acoplamiento protón- ^{13}C del producto **49** en NaOD

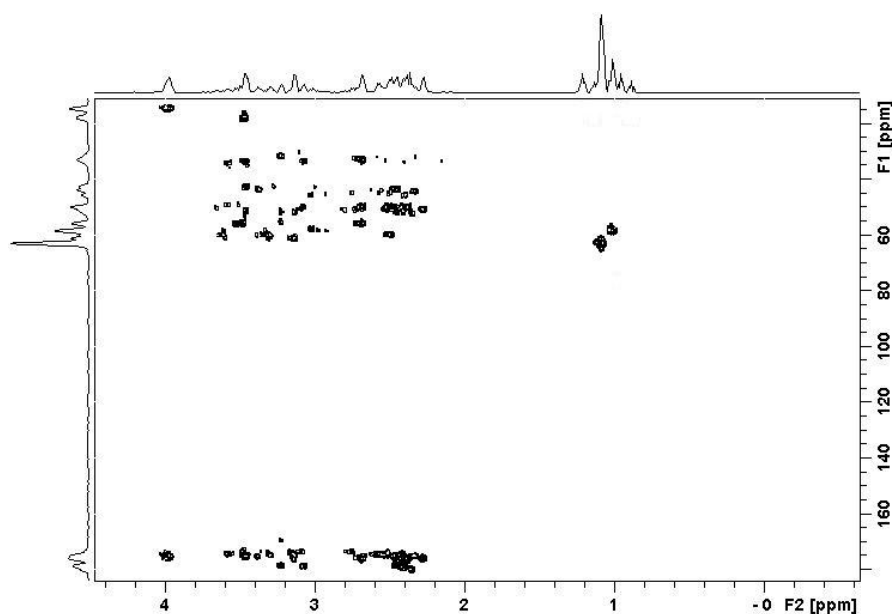
Para realizar una asignación más detallada de las señales asignadas en los espectros anteriormente presentados correspondientes al compuesto **49** se realizaron espectros de RMN bidimensionales COSY (Figura 6.10), HSQC (Figura 6.11) y HMBC (Figura 6.12).



Esquema 6.10. Espectro de RMN bidimensional COSY del producto **49** en NaOD



Esquema 6.11. Espectro de RMN bidimensional HSQC del producto **49** en NaOD



Esquema 6.12. Espectro de RMN bidimensional HMBC del producto **49** en NaOD

A partir de las correlaciones ^1H - ^1H observadas en el espectro COSY, las correlaciones ^1H - ^{13}C a un enlace presentes en el espectro HSQC y las correlaciones ^1H - ^{13}C a larga distancia observadas en el espectro HMBC se pudieron asignar los diferentes grupos presentes del compuesto en análisis. Esta asignación permitió corroborar la propuesta estructural en base a la cual se realizó la caracterización de los productos **47-49** haciendo uso de espectrometría de masa UV-MALDI-TOF.

En las Tabla 6.8 y 6.9 se presentan las asignaciones de las señales observadas en los espectros de ^1H y ^{13}C del compuesto **49** (Figura 13 y Figura 14), respectivamente.

Tabla 6.8. Asignaciones del espectro de ^1H del compuesto **49**

Desplazamiento de ^1H (ppm)	Grupo	Asignación								
1.24	CH_3	a								
4.20	CH_2	b								
3.35-3.70	CH_2	c								
3.53-3.91	CH_2	d								
3.60-3.94	CH_2	e								
1.17	CH_3	e'								
2.35-2.80	CH_2	f								
3.74	CH_2	f'								
2.84-3.27	CH_2	g								
3.73-3.89	CH_2 </tr <tr> <td>2.82-3.50</td> <td>CH</td> <td>h,j,l</td> </tr> <tr> <td>2.34-2.93</td> <td>CH_2</td> <td>i</td> </tr> <tr> <td>2.34-2.93</td> <td>CH_2</td> <td>k</td> </tr>	2.82-3.50	CH	h,j,l	2.34-2.93	CH_2	i	2.34-2.93	CH_2	k
2.82-3.50	CH	h,j,l								
2.34-2.93	CH_2	i								
2.34-2.93	CH_2	k								

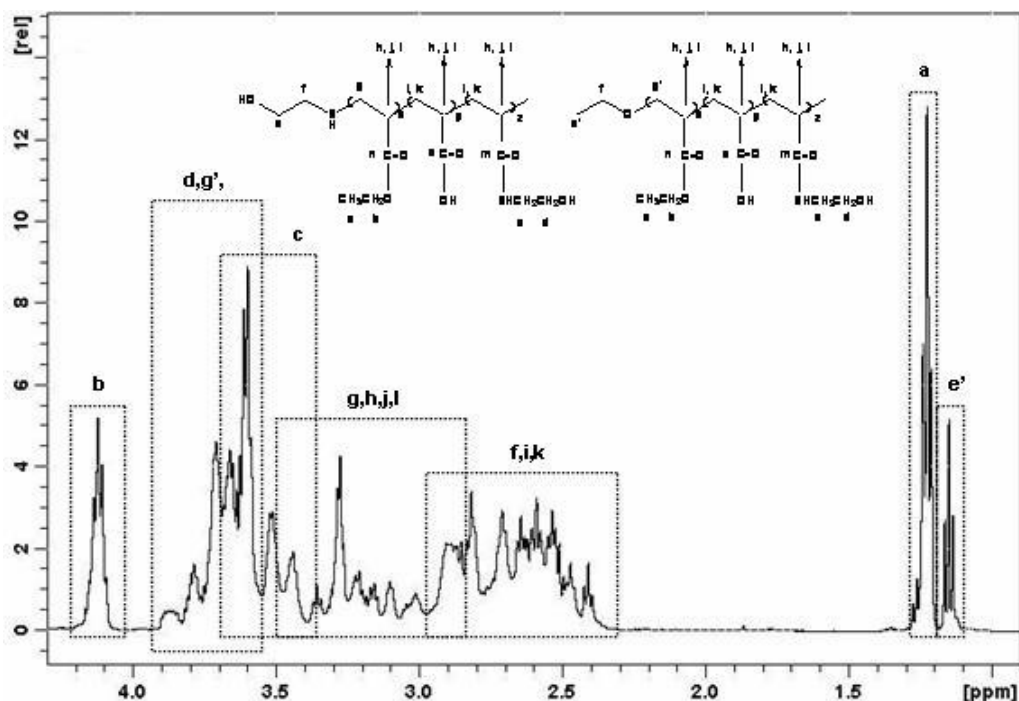


Figura 6.13. Espectro de RMN de ^1H con las asignaciones correspondientes al producto **49** en NaOD

Como se mencionó anteriormente el espectro de ^1H NMR del compuesto **49** fue asignado utilizando técnicas de RMN bidimensionales. De esta manera pudo comprobarse que las

cadena polimérica pueden tener dos grupos diferentes en uno de sus extremos: hidroxietilamino (T) o etoxilo (T'). Los protones de los grupos metileno de la cadena de poliacrilato (i) y (k) presentan señales entre 2.34 y 2.93 ppm. Los protones del metileno (g) de la primera unidad en las cadenas poliméricas que poseen el grupo T en su extremo muestran señales entre 2.84 y 3.27 ppm, los mismos grupos pero en el caso en que las cadenas terminen con el grupo T' presentan un desplazamiento entre 3.73 y 3.89 ppm (g'). Los protones de los grupos metino de las cadenas de poliacrilato (h, j y l) muestran señales en el rango de 2.82-3.50 ppm. Las señales observadas a 1.24 y 4.20 ppm corresponden a los grupos metilo (a) y metileno (b) respectivamente, pertenecientes a los grupos éster pendientes de la cadena de poliacrilato.

Las señales correspondientes a los grupos metilo (e') y metileno (f') de los grupos etoxilo de los extremos de las cadenas fueron observados a 1.17 y 3.74 ppm respectivamente. Las señales en la zona de 3.35-3.70 ppm (c) pudieron ser asignadas a los grupos metileno unidos al grupo amino de los grupos hidroxietilamido pendientes de las cadenas de poliacrilato, las señales en el rango de 3.53-3.91 ppm (d) corresponden a los grupos metileno unidos al grupo hidroxilo de los grupos pendientes hidroxietilamida. Por último, los protones de los metilenos unidos al grupo amino (f) y los protones de los metilenos unidos al grupo hidroxilo (e) de los grupos T fueron observados en las regiones 2.35-2.80 ppm (f) y 3.60-3.94 ppm (e).

Tabla 6.9. Asignaciones del espectro de ^{13}C del compuesto **49**

Desplazamiento de ^{13}C (ppm)	Grupo	Asignación
17.7	CH ₃	a
62.5	CH ₂	b
49.0-51.5	CH ₂	c
52.5-59.6	CH ₂	d
58.0-60.8	CH ₂	e
14.2	CH ₃	e'
50.5-53.6	CH ₂	f
51.5	CH ₂	f'
49.0-50.5	CH ₂	g
56.9-59.7	CH ₂	g'
41.5-46.0	CH	h,j,l
29.0-34.8	CH ₂	i
29.0-34.8	CH ₂	k
169.5-171.1	CONH	m
176.8-179.1	COOEt	n
180.9-181.9	COOH	o

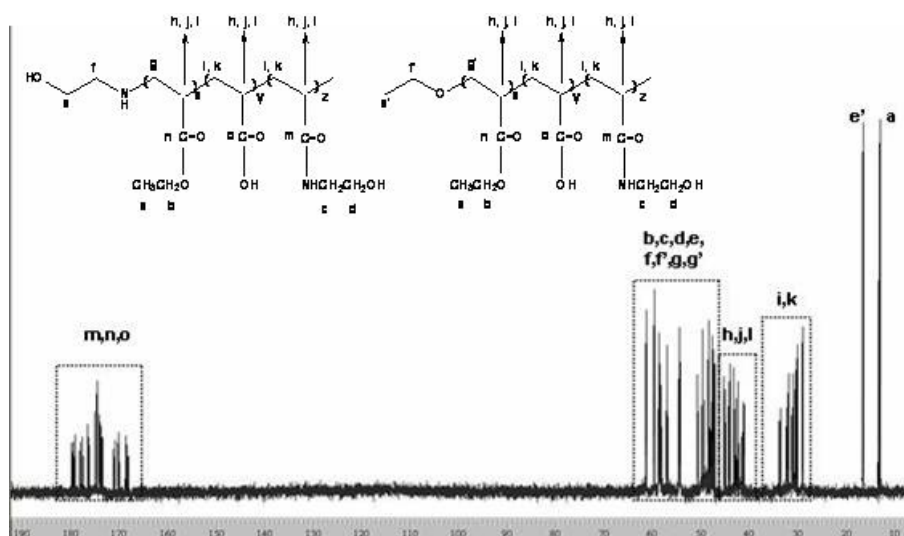


Figura 6.14. Espectro de RMN de ^{13}C con las asignaciones correspondientes al producto **49** en NaOD

Las asignaciones de los diferentes desplazamientos químicos observados en el espectro de ^{13}C del compuesto **49** fueron realizadas utilizando las técnicas bidimensionales mencionadas anteriormente y el espectro con acoplamientos protón- ^{13}C .

Los carbonos carbonílicos de los grupos éster pendientes de las cadenas de poliacrilato (n) aparecieron a 176.8-179.1 ppm, los carbonos carbonílicos de las unidades de hidroxietilamida (m) a 169.5-171.1 ppm y las señales de los carbonos carbonílicos de los grupos ácido carboxílico pendientes (o) a 180.9-181.9 ppm. Los grupos metilo (a) y metileno (b) de los grupos pendientes carboxietilo fueron observados a 17.7 y 62.5 ppm, respectivamente. Las señales de los grupos metileno unidos a $-\text{OH}$ (d) y $-\text{NH}$ (c) de los grupos pendientes amida aparecieron a 52.5-59.6 y en la zona de 49.0-51.5, respectivamente. Las señales correspondientes a los grupos $-\text{CH}-$ (h, j y l) de las cadenas de poliacrilato aparecieron entre 41.5 y 46.0 ppm, mientras que las señales asignadas a los grupos $-\text{CH}_2-$ (i y k) se observaron entre 29.0 y 34.8 ppm. Los grupos metileno (g) de la primera unidad de las cadenas terminadas en T dieron señales entre 49.0 y 50.5 ppm, cuando las cadenas terminaban con T' los desplazamientos de estos grupos (g') dieron señales entre 56.9 y 59.7 ppm. Los carbonos de los metilenos adyacentes al nitrógeno de la etanolamina (f) dieron señales entre 50.5 y 53.6 ppm, mientras que las señales de los metilenos unidos al grupo hidroxilo de la etanolamina (e) fueron observadas entre 58.0 y 60.8 ppm. Los grupos metilo (e') y metileno (f') de los grupos T' mostraron señales a 14.2 y 51.3 ppm, respectivamente.

6.3.2.2. Compuestos 50-53

Los espectros de ^1H y ^{13}C de los compuestos **50-53** resultaron ser tan complejos como los correspondientes a los de los productos **47-49**. Por lo tanto se utilizaron las mismas técnicas de espectroscopía de RMN bidimensionales para poder asignar las diferentes regiones en los espectros. A modo de ejemplo se presentan en las Figuras 6.15, 6.16 y 6.17 los espectros COSY, HSQC y HMBC respectivamente del producto **50**.

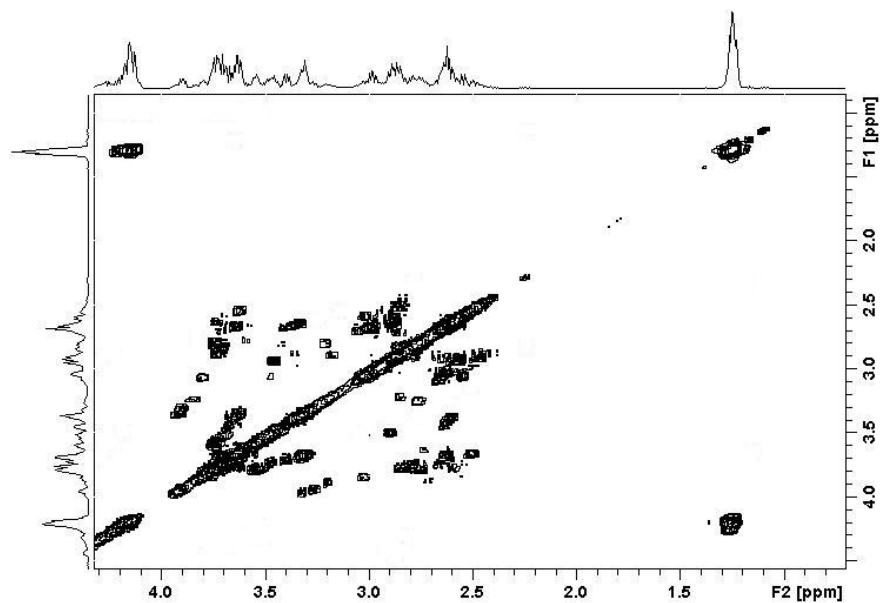


Figura 6.15. Espectro de RMN bidimensional COSY del producto **50** en D_2O

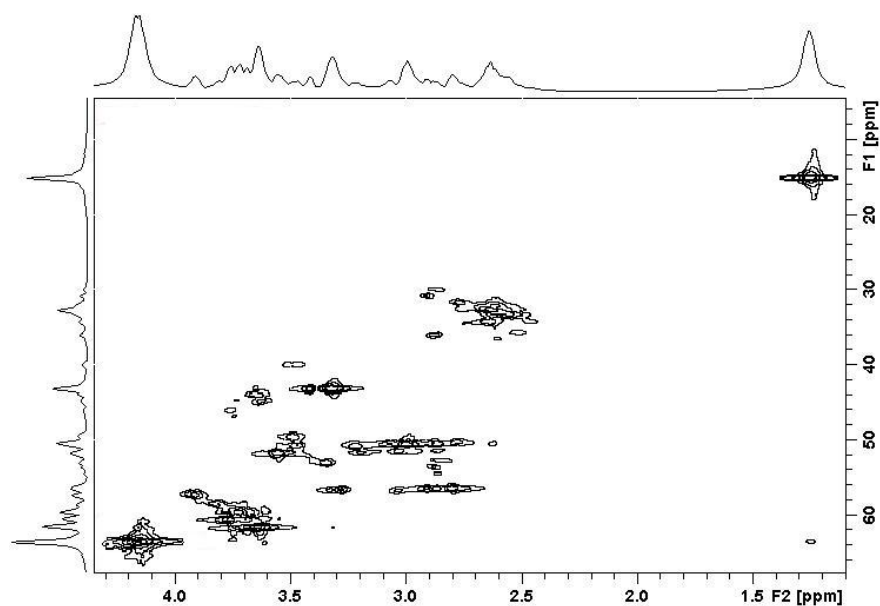


Figura 6.16. Espectro de RMN bidimensional HSQC del producto **50** en D_2O

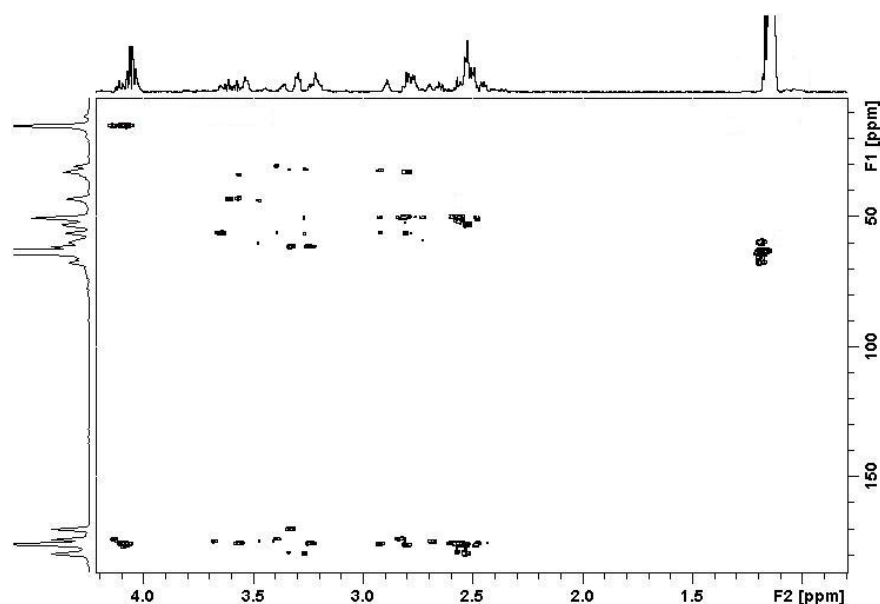


Figura 6.17. Espectro de RMN bidimensional HMBC del producto **50** en D₂O

En base a las correlaciones observadas en los espectros se pudo construir la Tabla 6.10 y asignar las diferentes señales observadas en el espectro de ¹H (Figura 6.18).

Tabla 6.10. Asignaciones del espectro de ¹H del compuesto **50**

Desplazamiento de ¹ H (ppm)	Grupo	Asignación
1.25	CH ₃	a
4.19	CH ₂	b
3.35-3.65	CH ₂	c
3.64-3.95	CH ₂	d
3.60-3.94	CH ₂	e
2.41-2.98	CH ₂	f,i
2.60-3.10	CH ₂	g
3.16-3.47	CH	h,j

De la información presentada en la Tabla 6.10 y la Figura 6.18 se puede concluir que: los protones de los metilenos adyacentes al nitrógeno de la etanolamina (f) y aquellos correspondientes a los metilenos de las cadenas de poliacrilato (i) presentan señales entre 2.41 y 2.98 ppm. Los protones de los metilenos (g) de la primera unidad de las cadenas de poliacrilato dieron señales en la zona de 2.60-3.10 ppm. Las señales presentes entre 3.16 y 3.47 ppm fueron asignadas a los protones de los metilenos (h y j). A 1.25 y 4.19 ppm se observaron señales que se asignaron a los protones de los metilos (a) y metilenos (b) de los grupos etoxilos de los grupos éster pendientes de las cadenas

de poliacrilato. Debe notarse que en la región de 1.25 ppm no se observó un segundo grupo de señales como en el caso de los compuestos **47-49** lo cual permite concluir que las cadenas tienen sólo grupos T y no T y T' como en los casos de los compuestos **47-49**. Las señales en la región de 3.35-3.65 ppm fueron asignadas a los protones de los grupos metileno (c) unidos al grupo amino de los grupos pendientes hidroxietilamida. Los protones de los metilenos (d) adyacentes al grupo hidroxilo de los grupos pendientes hidroxietilamida mostraron señales entre 3.64 y 3.95 ppm. En esta región también fueron observadas las señales correspondientes a los protones de los metilenos adyacentes al grupo hidroxilo de T (e).

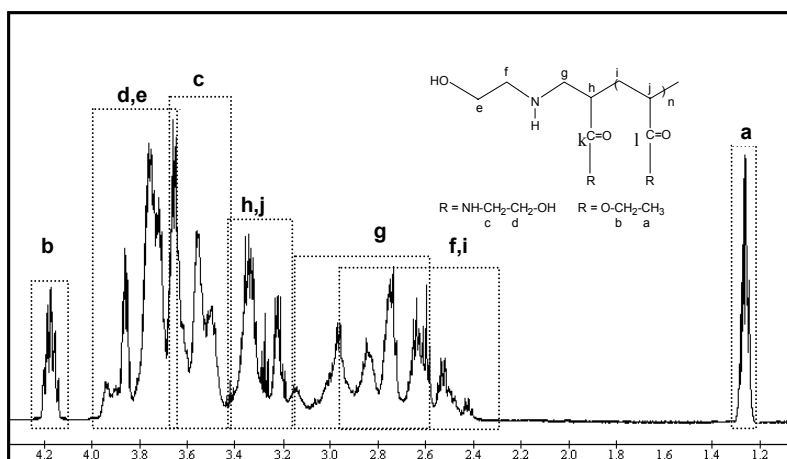


Figura 6.18. Espectro de RMN de ^1H con las asignaciones correspondientes al producto **50** en D_2O

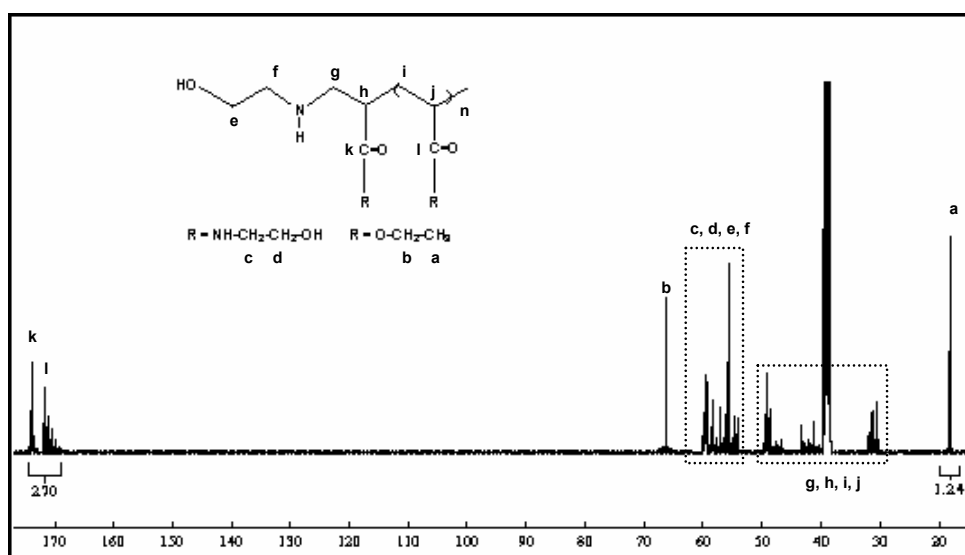
Haciendo uso de las técnicas bidimensionales mencionadas anteriormente se pudieron asignar las diferentes señales observadas en el espectro de ^{13}C del compuesto **50**. Con la información obtenida se pudo construir la Tabla 6.11.

Como puede observarse en la Tabla 6.11 y la Figura 6.19 las señales correspondientes a los carbonos carboxílicos de las unidades carboxietilo (k) y amida (l) fueron detectadas a 173.8 y 169.5-172.2 ppm, respectivamente. A 18.9 ppm se observó una señal asignada al grupo metilo de los grupos ésteres carboxietilo (a), las señales asignadas al grupo metileno adyacente al metilo fueron observadas a 67.7 ppm (b).

El metileno unido al grupo $-\text{OH}$ (d) dio señales entre 59.0 y 60.5 ppm, mientras que las señales de los protones del metileno unido al grupo $-\text{NH}$ de la amida (c) fueron observadas entre 49.2 y 50.5 ppm. Las señales correspondientes a los grupos metinos (h y j) y metilenos (i) de las cadenas de poliacrilato fueron observadas en las regiones entre 40.3-44.0 ppm y 29.4-34.8 ppm. Entre 49.0 y 50.5 ppm aparecieron señales asignadas al grupo metileno (g) de la primera unidad de las cadenas de polímero. Las señales observadas entre 53.9 y 58.4 ppm fueron asignadas al carbono del metileno adyacente al nitrógeno en T (f), mientras que las señales observadas entre 56.2 y 60.4 ppm correspondieron al carbono del metileno adyacente al $-\text{OH}$ de T (e).

Tabla 6.11. Asignaciones del espectro de ^{13}C del compuesto **50**

Desplazamiento de ^{13}C (ppm)	Grupo	Asignación
18.9	CH_3	a
67.7	CH_2	b
49.2-50.5	CH_2	c
59.0-60.5	CH_2	d
56.2-60.4	CH_2	e
53.9-58.4	CH_2	f
49.0-50.5	CH_2	g
40.3-44.0	CH	h,j
29.4-34.8	CH_2	i
173.8	COOEt	k
169.5-172.2	CONH	l

**Figura 6.19.** Espectro de RMN de ^{13}C con las asignaciones correspondientes al producto **50** en MeOD

La espectroscopía de RMN de ^{13}C fue utilizada también como herramienta en la determinación de la relación de grupos pendientes éster/amida. Para tal fin se consideraron las áreas relativas de las señales de los carbonos carbonílicos (k y l) y el carbono del grupo metilo de las unidades pendientes carboxietilo (a). Este análisis fue posible ya que las señales se encuentran bien separadas y pudieron ser medidas fácilmente. La relación entre las áreas relativas de las señales de los carbonos carbonílicos ($A_{\text{C=O}}$) y el metilo (A_{Me}) permitió calcular la fracción molar de acrilato de etilo ($X_{\text{A}'}$) (ecuación **g**) en el copolímero **50**.

$$X_{\text{A}'} = A_{\text{Me}}/A_{\text{C=O}} \quad (\text{g})$$

Kim y Hardwood¹⁶ aplicaron esta metodología en el análisis de copolímeros de acrilato de metilo y metacrilato de metilo. Las composiciones obtenidas de esta manera fueron similares a las calculadas a partir de un método teórico que considera la composición de la mezcla de reactivos, las relaciones de reactividad y conversión de los monómeros.

Sin embargo para poder aplicar la metodología espectroscópica de ^{13}C debe tenerse en cuenta que las señales de los núcleos de ^{13}C en análisis tengan la misma respuesta bajo las condiciones de trabajo aplicadas.

Para tal fin se sintetizó el homopolímero de poli(acrilato de etilo) **101** y se determinó la relación entre las áreas relativas de los carbonos carbonílicos ($A_{\text{C=O}}$) y el metilo (A_{Me}), cuyo resultado fue 1 (Figura 6.20). Este resultado mostró que la cantidad de grupos metilos y carbonilos en los grupos pendientes en el espectro del homolímero era la misma, lo cual indicaba la equivalencia en la respuesta de los núcleos de ^{13}C analizados y por lo tanto que la metodología era aplicable.

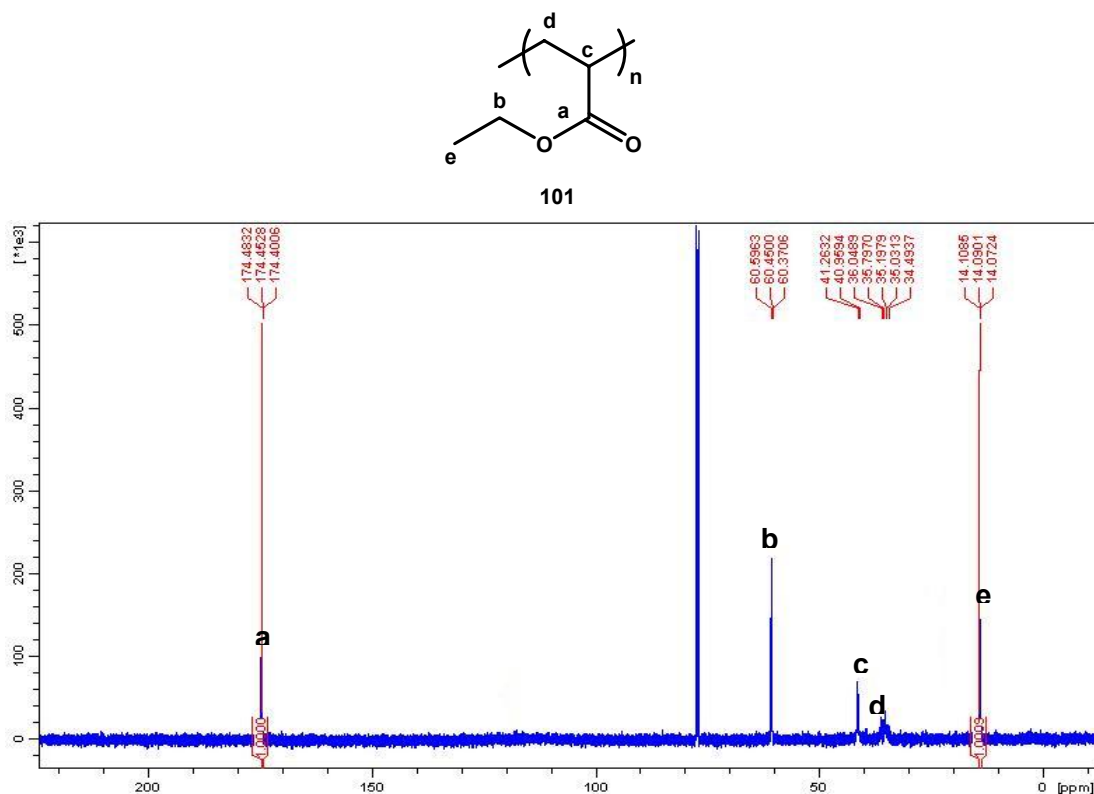


Figura 6.20. Espectro de RMN de ^{13}C con las asignaciones correspondientes al producto **101** en CDCl_3

El área de los grupos carbonílicos (k y l) era 2.70 (Figura 6.19) mientras que el área de los grupos metilos (a) era 1.24. Por lo tanto utilizando la ecuación **g** se obtuvo que la fracción molar de grupos éster pendientes, calculado por este método, en el compuesto **50** era 0.46. Este valor coincidió con el valor determinado a partir de los datos de espectrometría de masa UV-MALDI-TOF.

6.4. Comportamiento de los productos 47-53 en medio acuoso

Además de las diferencias comentadas sobre las dos familias de productos **47-49** y **50-53**, se observaron otras como la solubilidad. Los productos del primer grupo (**47-49**) eran insolubles en agua y completamente solubles en una solución de hidróxido de sodio, mientras que los intentos de disolverlos en otros solventes fueron fallidos con excepción del DMSO en los casos de los productos **48** y **49**. En cambio, los integrantes del segundo grupo (**50-53**) mostraron ser solubles en agua.

Posteriormente se decidió medir el pH de los productos en agua y se encontró otra diferencia importante. Mientras que las soluciones acuosas de los productos **50-53** tenían un pH cercano a 7, las dispersiones de **47-49** mostraban valores de pH entre 3 y 4, es decir ácidos. Esto permitía asumir que en el transcurso de la reacción, por la hidrólisis de los grupos ésteres pendientes de las cadenas de poliacrilato se generaban ácidos carboxílicos. Este resultado era una consecuencia esperable al no haber trabajado bajo condiciones anhidras de reacción.

Por último, debe mencionarse que los productos **47-49** que no eran solubles en agua manifestaban propiedades de hidrogeles. En efecto, su volumen aumentaba cuando se los ponía en contacto con el agua. Por lo tanto, se decidió estudiar el fenómeno que producía el mencionado aumento de volumen o “hinchamiento” (Swelling). Esta propiedad se midió sumergiendo en agua una cantidad previamente pesada (**m**) de cada uno de los productos **47-49** secados al vacío durante 48 horas, luego de 5 minutos se retiraron las muestras del agua. Se secaron las muestras sobre papel y se volvieron a pesar (**m'**). El cociente entre **m'** y **m** permitió obtener el conocido coeficiente de hinchamiento (swelling ratio) de los productos (Tabla 6.12).

Tabla 6.12. Swelling ratio (SR) de los compuestos **47-49**

Compuestos	SR
47	2.15
48	2.03
49	2.10

De los datos presentados en la Tabla 6.12 se puede concluir que los terpolímeros **47-49** pueden absorber una cantidad de agua dos veces mayor a su peso original. Estos valores son similares a los informados en literatura para polimetacrilamidas que tienen la capacidad de formar hidrogeles.¹⁷

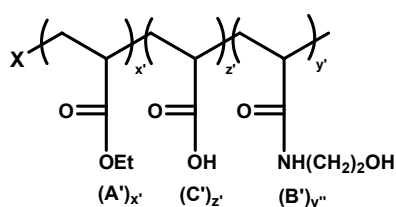
6.5. CONCLUSIÓN

Los resultados presentados en las secciones anteriores permiten concluir que las reacciones realizadas con diferentes relaciones molares de acrilato de etilo y etanolamina catalizadas por CAL B posibilitan la obtención de dos familias de polímeros diferentes:

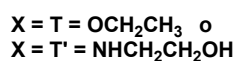
A bajas relaciones molares de etanolamina/acrilato de etilo (0.25 o menores), se observaron tres tipos de reacciones diferentes, todas ellas catalizadas por la lipasa:

- polimerización del acrilato para formar cadenas poliméricas
- aminólisis de los grupos ésteres utilizando el grupo amino de la etanolamina como nucleófilo, obteniéndose grupos pendientes hidroxietilamida
- hidrólisis de los grupos ésteres obteniéndose en esta reacción grupos pendientes de ácido carboxílico

La triple actividad de la lipasa permitió obtener terpolímeros (**47-49**), conteniendo tres grupos pendientes sobre la cadena de poli(acrilato), utilizando acrilato de etilo como único monómero vinílico de partida.



47-49

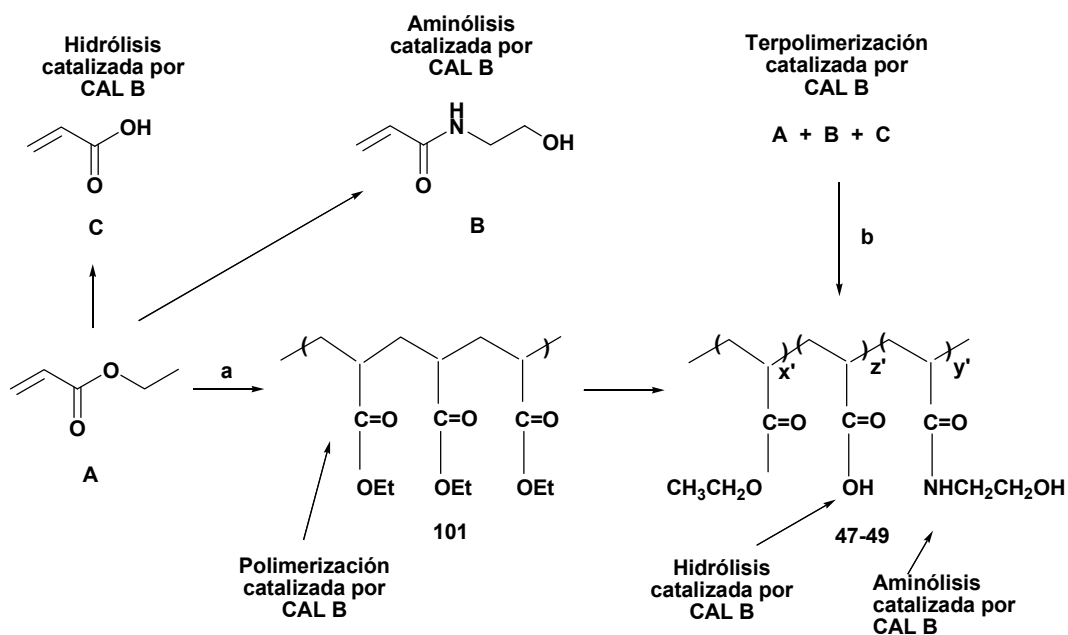


Estos resultados sugieren tres caminos posibles para obtener los productos **47-49**:

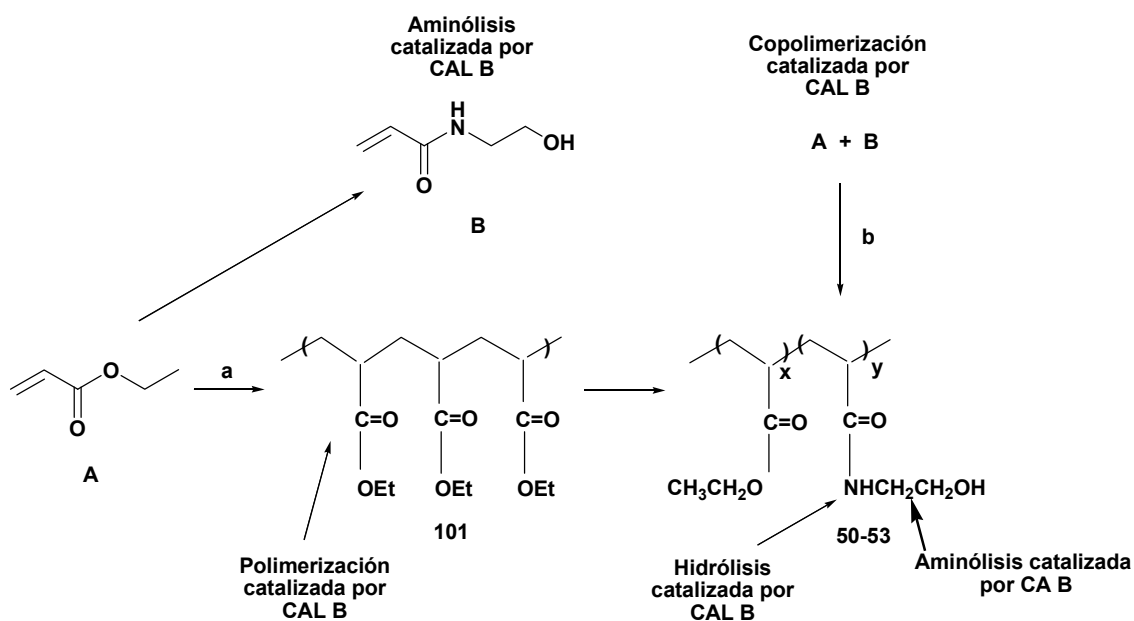
a) En una primera etapa la enzima catalizaría la formación de la cadena de poli(acrilato de etilo) **101**. Luego, en una segunda etapa se produciría la aminólisis e hidrólisis de los grupos pendientes carboxietilo (CAMINO a Esquema 6.21.).

b) Inicialmente la enzima cataliza la hidrólisis de algunas moléculas de acrilato de etilo (A) para dar ácido acrílico y la aminólisis de A para dar la N-hidroxietilacrilamida (B).

Posteriormente la lipasa catalizaría la terpolimerización de A, B y C (CAMINO b Esquema 6.21).



Esquema 6.21. Posibles caminos enzimáticos para la formación de los terpolímeros 47-49



Esquema 6.22. Posibles caminos enzimáticos para la formación de los copolímeros 50-53

Cuando se trabajó con relaciones molares etanolamina/acrilato de etilo mayores a 0.5 se obtuvieron los copolímeros 50-53. Las vías de formación de los productos serían similares a las descritas para la obtención de los compuestos 47-49. La única diferencia sería que no se observaron evidencias de productos de hidrólisis (Esquema 6.22).

Pudo observarse que cuando se realizó la reacción en ausencia de CAL B sólo se obtuvieron como productos los materiales de partida.

La reacción de la polimerización de monómeros vinílicos catalizada por lipasas, presentada en este capítulo, constituye un nuevo ejemplo de promiscuidad enzimática ya que la reacción de polimerización de acrilato de etilo no es una actividad normal en las lipasas.

Todos los productos fueron caracterizados por técnicas unidimensionales y bidimensionales de espectroscopía de RMN y espectrometría de masa UV-MALDI-TOF.

Por otra parte los terpolímeros mostraron coeficientes de *swelling* similares a los informados en literatura para polimetacrilamidas que presentan propiedades de hidrogeles.

Por último, debe indicarse que este trabajo de investigación es el primer antecedente informado sobre la obtención de co- y terpolímeros de poli(acrilato de etilo), poli(N-(2-hidroxietil)acrilamida) y ácido poliacrílico catalizada por lipasas y utilizando acrilato de etilo como único monómero de partida.¹⁸

Bibliografía

1. J. Hernandez-Barajas, D. Hunkeler, *Polymer*, 38 (1997) 437.
2. B. Tamami, M. Kolahdoozan, *Tetrahedron Lett.*, 45 (2004) 1535.
3. KD Jensen, A. Nori, M. Tijerina, P. Kopečková P, J. Kopeček, *J Controlled Release*, 87 (2003) 89.
4. E-R. Kenawy, M. El-Newehy, F. Abdel-Hay, R.M. Ottenbrite, *Biomacromolecules*, 8 (2007) 196.
5. B.S. Sumerlin, A.B. Lowe, D.B. Thomas, C.L. McCormick, *Macromolecules*, 36 (2003) 5982.
6. B. Tamami, A. Fadavi, *Catal. Commun.*, 6 (2005) 747.
7. a) S. Kobayashi, H. Ritter, D. Kaplan D. Enzyme-catalyzed synthesis of polymers. In: *Advances in polymer science series*, vol. 194. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2006; b) RA Gross, HN Cheng. Biocatalysis in polymer science. In: *ACS symposium series*, vol. 840. Washington: ACS; 2002.
8. S. Kobayashi, H. Uyama, M. Ohmae, *Bull Chem. Soc. Jpn.*, 74 (2001) 613.
9. B.J. Kline, E.J. Beckman, A.J. Russell, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (1998) 9475.
10. A. Mahapatro, A. Kumar, B. Kalra, R.A. Gross, *Macromolecules*, 37 (2004) 35.
11. L.E. Iglesias, Y. Fukuyama, H. Nonami, R. Erra-Balsells, A. Baldessari, *Biotechnol. Tech.*, 13 (1999) 923.
12. R. Ghan, T. Shutava, A. Patel, V.T. John, Y. Lvov, *Macromolecules* 37 (2004) 4519.
13. A. Singh, D.L. Kaplan, In vitro enzyme-induced vinyl polymerization. In: *Enzyme-catalyzed synthesis of polymers. Advances in polymer science series*, vol. 194. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2006. p. 211-224.
14. B. Karla, R.A. Gross, *Biomacromolecules*, 1 (2000) 501.
15. O. Torre, V. Gotor-Fernández, I. Alfonso, L.F. García-Allés, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal*, 347 (2005) 1007.
16. Y. Kim, H.J. Harwood, *Polymer*, 43 (20029) 3229.
17. C.F. van Nostrum, T.F.J. Veldhuis, G.W. Bos, W.E. Hennink, *Macromolecules*, 37 (2004) 2113.
18. E.M. Rustoy, S. Yasuto, H. Nonami, R. Erra-Balsells, A. Baldessari, *Polymer*, 48 (2007) 1517.

Capítulo VII

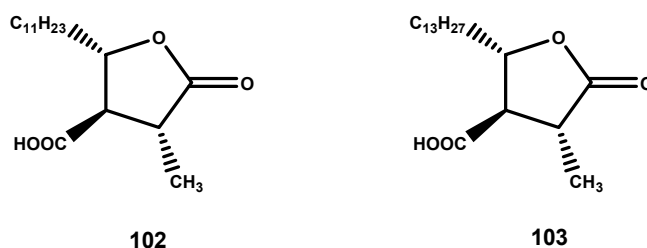
Resultados y discusión

7. LIPASAS Y MICROORGANISMOS COMO CATALIZADORES EN ESTERIFICACIÓN, REDUCCIÓN Y DESCARBOXILACIÓN DE α -CETOÁCIDOS

7.1. INTRODUCCIÓN

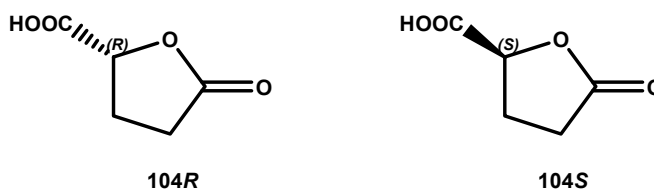
Los hidroxiésteres quirales son utilizados como bloques de construcción en síntesis asimétrica. Por ejemplo, los derivados de los γ - y δ -hidroxiácidos pueden ser transformados en las correspondientes lactonas, algunas de las cuales están presentes una gran variedad de productos naturales.¹ Además las lactonas son importantes bloques de construcción en la obtención de productos naturales como alcaloides y terpenoides² y son objeto de numerosos trabajos debido a sus actividades farmacológicas.³

Hay varios ejemplos en literatura de γ -butirolactonas que contienen un grupo carboxílico como sustituyente en el anillo lactónico. Los ácidos (-)-nefrosteránico **102** y (-)-rocellárico **103**, conocidos como ácidos paracónicos, pertenecen a esta clase de butirolactonas con propiedades antibacterianas (Esquema 7.1).⁴



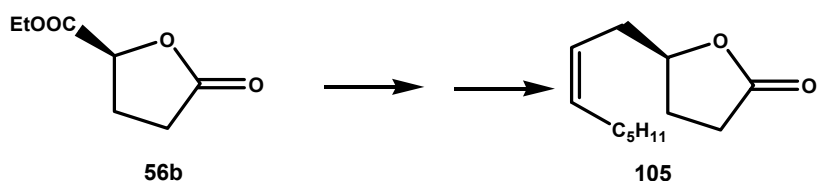
Esquema 7.1

Por otra parte, algunos derivados del ácido tetrahidro-5-oxo-2-furancarboxílico **104S** o **104R** (Esquema 7.2) enantioméricamente puros son productos naturales presentes en una gran variedad de frutas y en algunos insectos como componentes de feromonas de atracción sexual.⁵



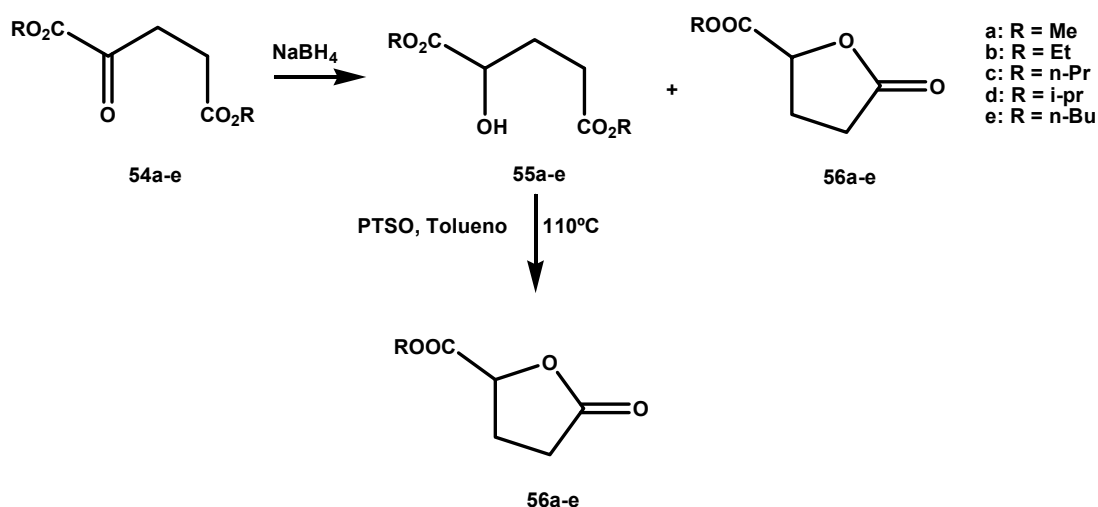
Esquema 7.2

Además, el éster etílico del ácido (S) tetrahidro-5-oxo-2-furancarboxílico **56b** es utilizado como material de partida en la síntesis de la feromona 4-(Z)-6-dodecenil- γ -butirolactona **105** (Esquema 7.3).



Esquema 7.3. Obtención de la feromona **105** a partir del ester enantioméricamente puro **56b**

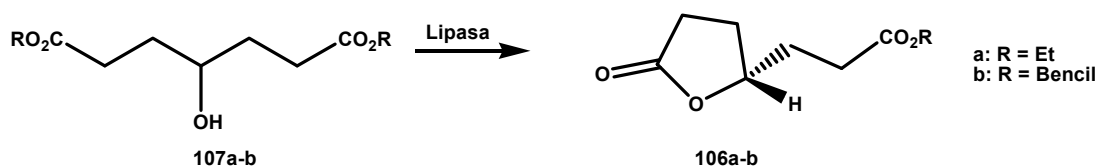
La síntesis química de los ésteres racémicos derivados del ácido tetrahidro-5-oxo-2-furancarboxílico ha sido reportada a través de un proceso agresivo que requiere condiciones de reacción extremas (Esquema 7.4).⁶



Esquema 7.4. Obtención de las mezclas racémicas de los ésteres alquílicos del ácido tetrahidro-5-oxo-2-furancarboxílico **56a-e**

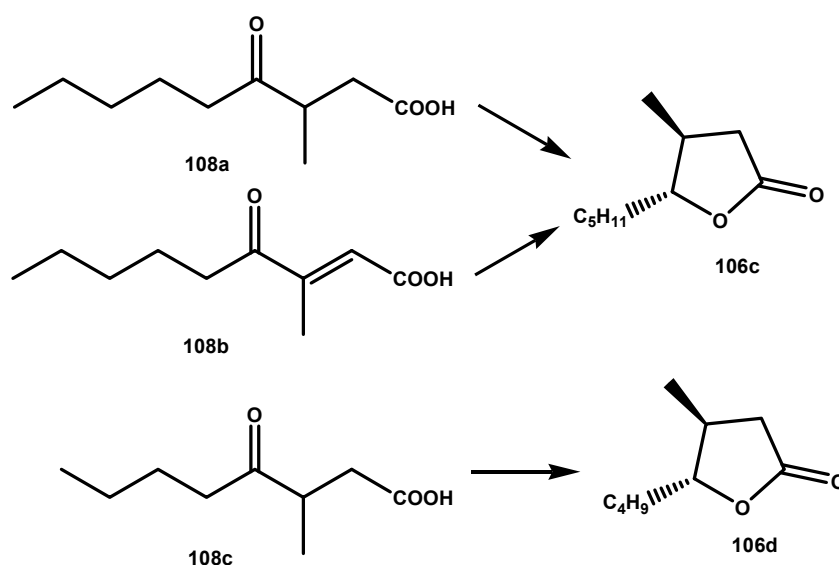
En este procedimiento químico se hacen reaccionar los 2-oxoglutaratos de alquilo **54a-e** con borohidruro de sodio obteniéndose una mezcla de los hidroxíesteres **55a-e** y los ésteres lactónicos racémicos **56a-e** en una relación 3:1. La lactonización se completa tratando los hidroxíesteres con ácido *p*-toluensulfónico a 110°C. Se debe notar que a través de esta metodología sólo se pueden obtener los racematos de los ésteres lactónicos correspondientes.

También se han informado algunos caminos en los cuales se utilizan enzimas aisladas o bien células enteras, estos métodos ofrecen una alternativa más amigable para el medio ambiente que la síntesis química. Existen en literatura algunos ejemplos referidos a la preparación de γ -butirolactonas sustituidas **106a-b** aplicando métodos enzimáticos consistente en la lactonización de hidroxíesteres **107** catalizada por lipasas (Esquema 7.5).⁷



Esquema 7.5. Obtención de las γ -butirolactonas sustituidas **106a-b** catalizada por lipasas

También a través de la reducción microbiana (levaduras de panadería) de 1,4-cetoácidos **108** (Esquema 7.6).⁸



Esquema 7.6. Obtención de las γ -butirolactonas sustituidas **106c-d** a partir de la reducción microbiana de los 1,4-cetoácidos **108a-c**

En ambos casos los productos fueron obtenidos con excelentes rendimientos y purezas enantioméricas superiores al 95%.

Utilizando células enteras como biocatalizadores, nuestro grupo reportó la reducción estéreo selectiva de una serie de ésteres alquílicos de β -cetoácidos **109**.⁹



Esquema 7.7. Obtención de los (3S)-hidroxiésteres **110** por reducción con células enteras.

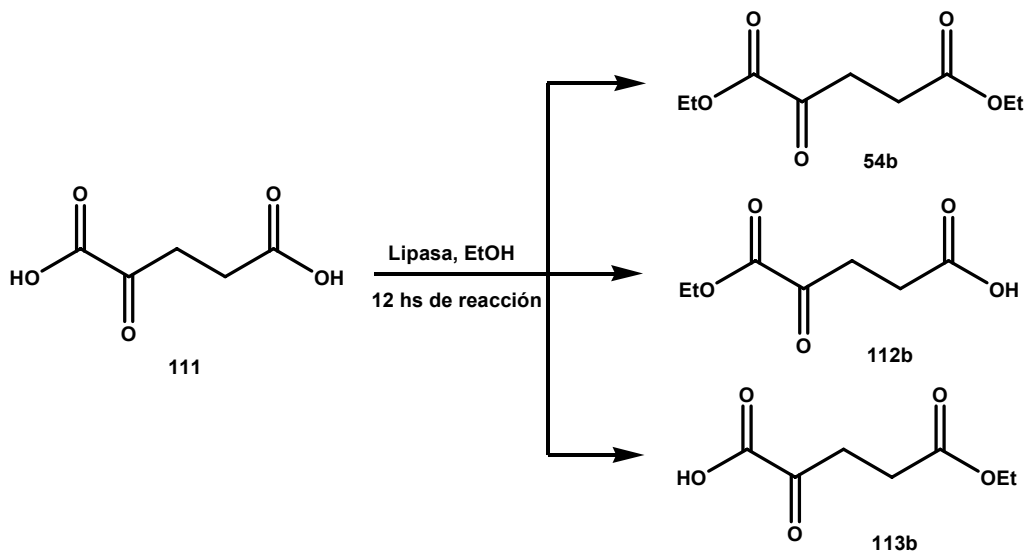
Considerando estos antecedentes, en la última etapa de esta investigación se decidió explorar la combinación dos estrategias enzimáticas: enzimas aisladas y células enteras, utilizando α -cetoácidos como sustratos, como por ejemplo el ácido 2-oxoglutámico.

Es así como se estudió la esterificación del ácido 2-oxoglutámico con diferentes alcoholes y la reducción de los 2-cetoésteres obtenidos en la etapa anterior, empleando como fuente de enzimas células enteras de *Saccharomyces cerevisiae* y *Mucor rouxii*. Este último microorganismo fue utilizado en dos formas diferentes, como cultivos frescos y cultivos liofilizados.

7.2. ESTERIFICACIÓN DEL ÁCIDO 2-OXOGLUTÁMICO CATALIZADA POR LIPASAS

Inicialmente se emplearon condiciones estándar de reacción optimizadas para esterificaciones catalizadas por lipasas en otros sistemas.¹⁰ Las reacciones fueron desarrolladas a 30°C y 55°C, empleando una relación enzima/sustrato de 5.0 y lipasas de cinco fuentes diferentes: lipasa de *Candida rugosa* (CRL), lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CAL B), lipasa de *Rhizomucor miehei* (LIP) y dos lipasas diferentes de *Pseudomonas sp.* (PS-C y PSL-C). Para estos primeros ensayos se utilizaron: ácido 2-oxoglutámico **111** como donador de acilo y etanol como nucleófilo y solvente.

Luego de 12 horas, se realizó el análisis de las mezclas de reacción por cromatografía en capa delgada y se observó en todos los casos la aparición de dos manchas de mayor R_f que el compuesto de partida. No se observaron diferencias importantes entre los resultados obtenidos entre las reacciones realizadas a 30°C y 55°C. En el ensayo realizado con CAL B, de las dos manchas nuevas, la de menor R_f era mucho menos intensa que en cualquiera de los otros casos. Ante estos resultados se aislaron los productos del ensayo realizado con CAL B y se separaron por cromatografía en columna. Las dos fracciones así obtenidas fueron analizadas por espectroscopia de RMN de ¹H pudiéndose comprobar que la fracción correspondiente al mayor R_f era el 2-oxoglutarato de dietilo **54b**, mientras que la otra fracción era una mezcla de los monoésteres **112b** y **113b**. Trabajando bajo las condiciones descritas y utilizando CAL B como catalizador el producto **54b** fue obtenido con un rendimiento del 47% (Esquema 7.8).



Esquema 7.8. Esterificación del ácido 2-oxoglutarico en presencia de etanol catalizada por lipasas durante 12 horas de reacción

Debido a los resultados anteriormente expuestos se eligió CAL B como catalizador para los sucesivos ensayos que se realizaron.

7.2.1. Optimización de condiciones experimentales

En vista de los resultados obtenidos en la esterificación del ácido 2-oxoglutarico con etanol catalizada por lipasas, se continuó trabajando con el objetivo de optimizar el rendimiento de la reacción. Con este fin se analizaron los efectos del tiempo de reacción, la relación enzima sustrato (E/S), la naturaleza del alcohol utilizado como nucleófilo y el solvente sobre la esterificación del ácido **111**.

7.2.1.1. Efecto del tiempo de reacción

Se comenzó analizando el efecto del tiempo de reacción para lo cual se utilizó el ácido **111** como donador de acilo, etanol como nucleófilo y solvente y CAL B como catalizador. Las reacciones se efectuaron a 30°C y utilizando una relación E/S de 5.0. La representación gráfica de los datos obtenidos en estos experimentos se muestra en (Figura 7.1).

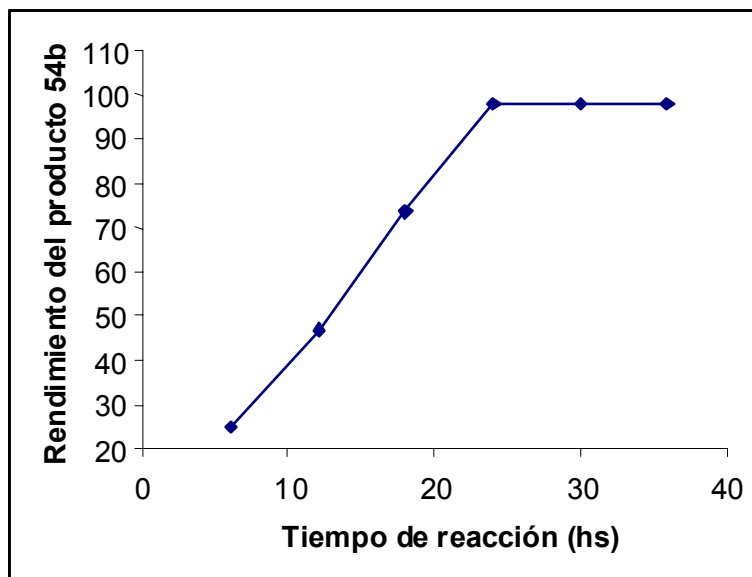


Figura 7.1. Efecto del tiempo de reacción en la reacción de esterificación del ácido 2-oxoglutarico con etanol catalizada por CAL B

De la información presentada en la Figura 1 podemos concluir que el rendimiento de la reacción alcanza su valor máximo (100%) para tiempos de reacción superiores a 24 horas. Debe aclararse que bajo las condiciones de trabajo anteriormente mencionadas no se observó la presencia de los monoésteres **112b** y **113b**.

7.2.1.2. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S)

Para estudiar el efecto de la relación E/S se trabajó a 30°C utilizando un tiempo de reacción de 24 horas y CAL B como catalizador. En la Tabla 7.1 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 7.1. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S) sobre la esterificación del ácido 2-oxoglutarico con etanol catalizada por CAL B

E/S	Rendimiento del producto 54b
3	75
5	98
7	98
10	98

En la Tabla 7.1 puede observarse que se alcanza el máximo rendimiento para relaciones (E/S) mayores o iguales a 5.0. Este valor es el que se utilizó a partir de los primeros

ensayos realizados y es el mismo que se eligió, a partir de ese momento, como condición óptima para la reacción de esterificación del ácido 2-oxoglutarico **111** en presencia de etanol catalizada por CAL B.

7.2.1.3. Efecto del alcohol

Por último se decidió investigar la influencia de la naturaleza del alcohol. En la Tabla 7.2 se presentan los resultados obtenidos al llevar a cabo la reacción utilizando diferentes alcoholes como nucleófilos a 30°C y 24 horas de reacción, empleando CAL B como catalizador y una relación E/S de 5.0.

Tabla 7.2. Efecto del alcohol en la esterificación del ácido 2-oxoglutarico catalizada por CAL B

Alcohol	Producto	Rendimiento (%)
Metanol	54^a	94
Etanol	54^b	98
n-Propanol	54^c	99
<i>iso</i> -Propanol	54^d	99
n-Butanol	54^e	96
<i>iso</i> -Butanol	54^f	94

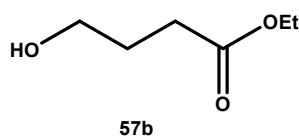
Los resultados resumidos en la Tabla 7.2 muestran rendimientos similares para todos los alcoholes luego de 24 horas de reacción. Este comportamiento indicó que la naturaleza del alcohol no produce cambios significativos en el rendimiento de la reacción.

Como conclusión las condiciones óptimas de la esterificación enzimática del ácido 2-oxoglutarico son:

Parámetro	Condición óptima
Enzima	CAL B
Temperatura	30°C
Tiempo de reacción	24 hs.
Rel. E/S	5.0

7.3. HIDRÓLISIS, DESCARBOXILACIÓN Y REDUCCIÓN DE ÉSTERES DEL ÁCIDO 2-OXOGLUTÁRICO CATALIZADA POR CÉLULAS ENTERAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

En esta etapa de la investigación se estudió la reacción de los ésteres obtenidos en el paso anterior. Para comenzar se utilizó el 2-oxoglutarato de dietilo **54b** como sustrato modelo y cepas industriales de levaduras de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) como catalizador. Estos ensayos fueron realizados utilizando una relación biomasa-sustrato de 17 (g/mmol), una temperatura de 30°C y solventes de diferente polaridad o mezcla de algunos de ellos. Las conversiones de los diferentes ensayos fueron determinadas a partir del análisis por cromatografía gaseosa de alícuotas tomadas a las 24 horas de reacción. El producto obtenido fue purificado por cromatografía en columna, e identificado por espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C como el 3-hidroxi-butanoato de etilo **57b** (Esquema 7.9).



Esquema 7.9

Las conversiones obtenidas en cada uno de los ensayos realizados son presentadas en la Tabla 7.3.

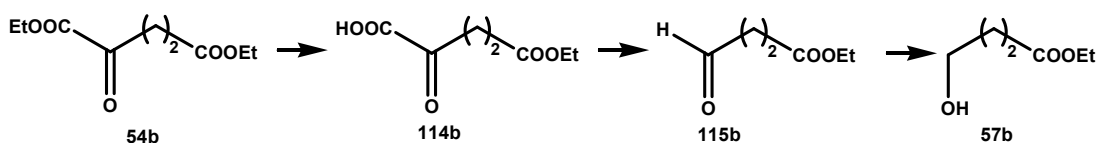
Tabla 7.3. Reacción del 2-oxoglutarato de dietilo catalizada por *Saccharomyces cerevisiae*

Solvente	Conversión al producto 57b (%)
Agua	100
Hexano	100
Hexano-agua	100
Tolueno	89
Tolueno-agua	75
Dioxano	18
Dioxano-agua	19
Acetato de etilo	22
Acetato de etilo-agua	22

De los datos presentados en la Tabla 7.3 podemos concluir que las mejores conversiones fueron obtenidas cuando se utilizó agua como solvente un solvente orgánico poco polar

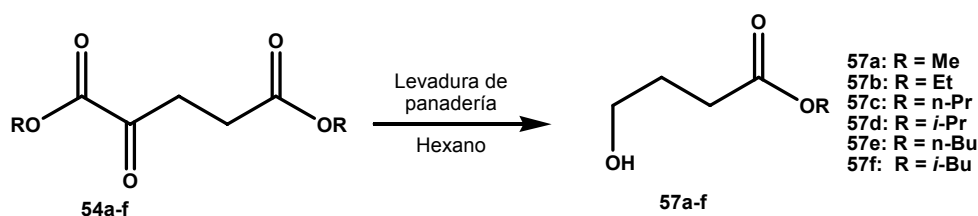
como el hexano o el tolueno o una mezcla de hexano/agua, mientras que para solventes orgánicos de polaridad mayor como el caso del dioxano o el acetato de etilo la conversión fue mucho menor. Por razones operativas se eligió hexano ya que permite obtener el producto **57b** con una conversión del 100% y además facilita su posterior aislamiento y purificación. La cantidad de impurezas en el extracto de hexano provenientes del metabolismo y producidas por destrucción del microorganismo que actúa como catalizador es mucho menor que la observada trabajando con otros solventes.

Otro hecho digno de atención fue que en todos los ensayos el único producto obtenido fue el hidroxíster **57b**, que según información bibliográfica reportada se generaría en un proceso de tres etapas.⁶ En la primera de estas etapas se produciría la hidrólisis regioselectiva del éster **54b** en posición en alfa al grupo ceto formándose el ácido **114b**, el cual en una segunda etapa de descarboxilación se transformaría en el cetoéster **115b**. En la última etapa se obtiene el hidroxíster **57b** que se generaría por la reducción del grupo ceto ubicado en la posición γ del cetoéster **115b** (Esquema 7.10).



Esquema 7.10. Obtención del 4-hidroxibutanoato de etilo **57b** catalizada por *Saccharomyces cerevisiae*

En vista de los resultados obtenidos en la reacción del cetoéster **54b** catalizada por levaduras de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*), se aplicó la misma metodología pero utilizando como sustratos el resto de la serie de los ésteres **54** sintetizados en la etapa anterior, es decir los ésteres **54a y 54c-f** (Esquema 7.11).



Esquema 7.11. Reacción de los 4-hidroxísteres de alquilo **54a-f** catalizada por *Saccharomyces cerevisiae*

Estos ensayos permitieron estudiar el efecto del tamaño del sustrato sobre los resultados obtenidos. En la Tabla 7.4 se comparan los rendimientos obtenidos en las reacciones realizadas a 30°C durante 24 horas utilizando una relación biomasa-sustrato de 17 (g/mmol).

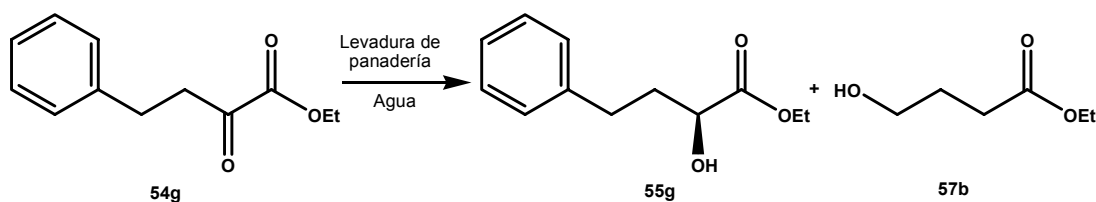
Tabla 7.4. Efecto del tamaño del sustrato en la reacción catalizada con *Saccharomyces cerevisiae*

Sustrato	Producto	Conversión (%)
54a	57a	100
54b	57c	100
54c	57c	97
54d	57d	97
54e	57e	31
54f	57f	22

Como puede apreciarse en la Tabla 7.4 los rendimientos de los productos **57** disminuyeron a medida que el tamaño de los sustratos aumentó. En este sentido podemos observar que cuando R¹ es metilo o etilo (**57a y 57b**) las conversiones son del 100% y la menor conversión es observada cuando R¹ es butilo (**57e**) o isobutilo (**57f**)

7.4. REDUCCIÓN DE ÉSTERES ALQUÍLICOS DE α -CETOÁCIDOS CATALIZADA POR EL HONGO *MUCOR ROUXII*

Con el fin de extender el estudio de la metodología descrita anteriormente a otros microorganismos, en esta etapa de la investigación se estudió el comportamiento del hongo *Mucor rouxii* en la reducción de la serie de cetoésteres **54a-f** y del 2-oxo-4-fenilbutanoato de etilo **54g**. El interés en el uso del sustrato **54g** residía en comparar los resultados reportados por Nakamura sobre la reducción de este cetoéster catalizada por levaduras de panadería cuando se trabajó en agua.¹¹ Según esta publicación no sólo se obtenía el producto de reducción **55g** sino también el hidroxíéster **57b** como producto secundario (Esquema 7.12).

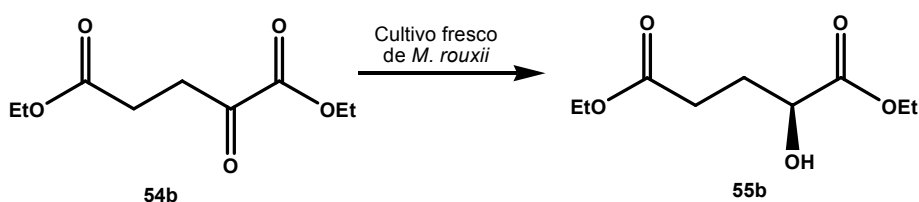


Esquema 7.12. Reacción del 2-oxo-4-fenilbutanoato de etilo (**54g**) catalizada por levaduras de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*)¹¹

El hongo *Mucor rouxii* es dimórfico. Es decir esta especie mucoral es capaz de adoptar uno de los dos mecanismos alternativos de crecimiento dependiendo de las condiciones ambientales y crecer bajo la morfología de micelio en condiciones aerobias o bien como levaduras cuando el desarrollo del microorganismo se lleva a cabo en condiciones anaerobias. En la presente investigación se trabajó con el hongo en la morfología de levaduras en las formas de cultivo fresco y liofilizado. En ambos casos los cultivos fueron obtenidos en forma anaerobia empleando un tiempo de incubación de 20 a 24 horas.

7.4.1. Reducción quimio- y estereoselectiva de ésteres alquílicos de α -cetoácidos catalizada por cultivos frescos de *Mucor rouxii*

Las primeras reacciones se ensayaron utilizando el cetoéster **54b** como sustrato tanto en medio acuoso como en medio orgánico trabajando a 30°C y variando la relación biomasa-sustrato. De esta manera se pudo obtener el hidroxíéster **55b** como único producto (Figura 7.13).



Esquema 7.13. Reacción del 2-oxoglutarato de dietilo **54b** catalizada por cultivo fresco de *M. rouxii*

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.5, en la cual los valores de las relaciones biomasa-sustrato fueron aquellos que permitieron obtener los mejores resultados.

Tabla 7.5. Reducción quimio- y estereoselectiva del cetoéster **54b** catalizada por cultivo fresco de *Mucor rouxii*

Solvente	Biomasa/sustrato (g/mmol)	Tiempo (hs)	Conversión (%)	e.e. (%)
Agua	8	24	100	48(S)
Hexano	17	24	100	98(S)
Agua-hexano	17	24	100	79(S)
Tolueno	17	24	63	75(S)
Agua-Tolueno	17	24	76	63(S)
Dioxano	17	36	0	---
Agua-dioxano	17	36	0	---
Acetato de etilo	17	36	0.3	---
Agua-acetato de etilo	17	36	0.9	---

En la Tabla 7.5 podemos apreciar que el catalizador fue activo en la mayoría de los solventes ensayados con excepción del dioxano, del acetato de etilo y sus mezclas con agua. Las mejores conversiones (100%) fueron obtenidas cuando se utilizó agua, hexano o una mezcla de estos solventes. Estos resultados indicarían que un aumento en la polaridad del solvente orgánico utilizado disminuye notablemente la conversión de la reacción.

En todos los casos se observó la reducción quimioselectiva del grupo carbonílico a alcohol, mientras que la función éster se mantuvo inalterada. Estos resultados son muy diferentes a los observados en la etapa anterior de esta investigación en la cual el uso de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* dio como único producto el hidroxieéster **57b**.

Por otra parte pudo determinarse que en medio acuoso el producto obtenido presentaba una baja pureza enantiomérica. Los mejores resultados en este sentido fueron obtenidos cuando se trabajó con hexano donde el exceso enantiomérico (% e.e.) alcanzó el 98% a favor del estereoisómero S.

En todo los casos el producto sintetizado en mayor proporción por el *Mucor rouxii* fue el alcohol S. Estos datos indicaron que la reductasa mayoritaria de este microorganismo se comporta en forma similar a la mayoría de las deshidrogenadas, es decir, de acuerdo a la regla de Prelog,¹² según la cual, las deshidrogenadas catalizan la transferencia de hidruro por la cara *Re* del sustrato carbonílico (Figura 7.2).

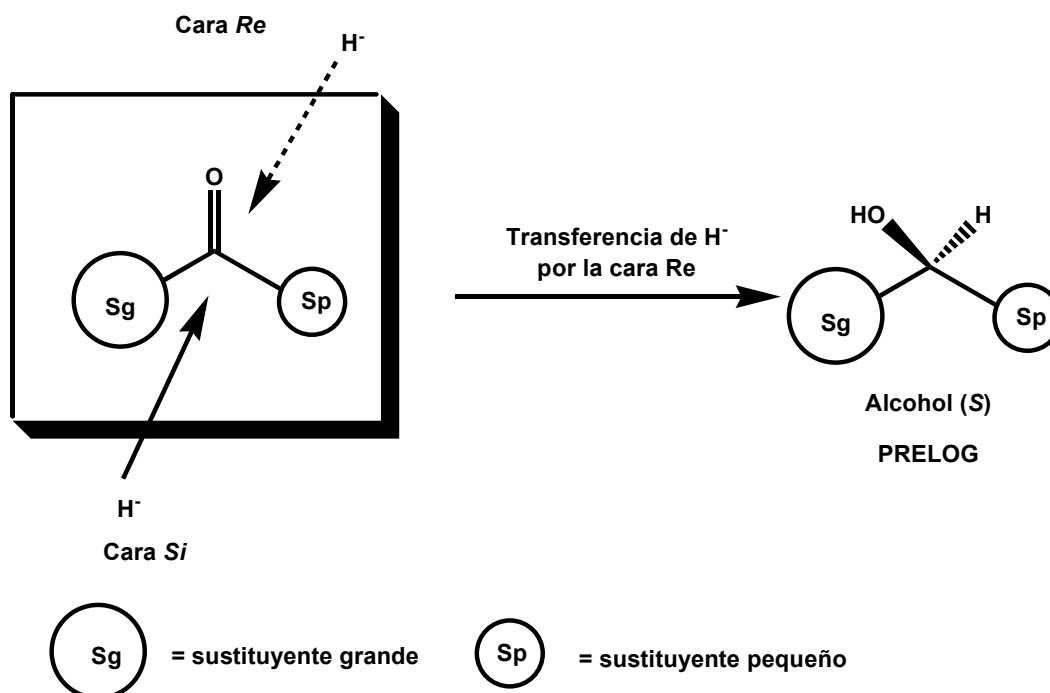


Figura 7.2. Regla de Prelog

En vista de los resultados obtenidos se continuaron los estudios optimizando el tiempo de reacción y la relación biomasa-sustrato. Para estos ensayos se eligió al hexano como solvente de reacción ya que permitió obtener el producto **55b** con mayor rendimiento y pureza enantiomérica más alta.

7.4.1.1. Optimización de condiciones experimentales

Se comenzó estudiando el efecto del tiempo de reacción de reducción del sustrato **54b**. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando una relación biomasa-sustrato de 17 g/mmol. Para determinar el valor óptimo de este parámetro experimental se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de reacción que fueron analizadas por cromatografía gaseosa. La información obtenida se representa en la Figura 7.3.

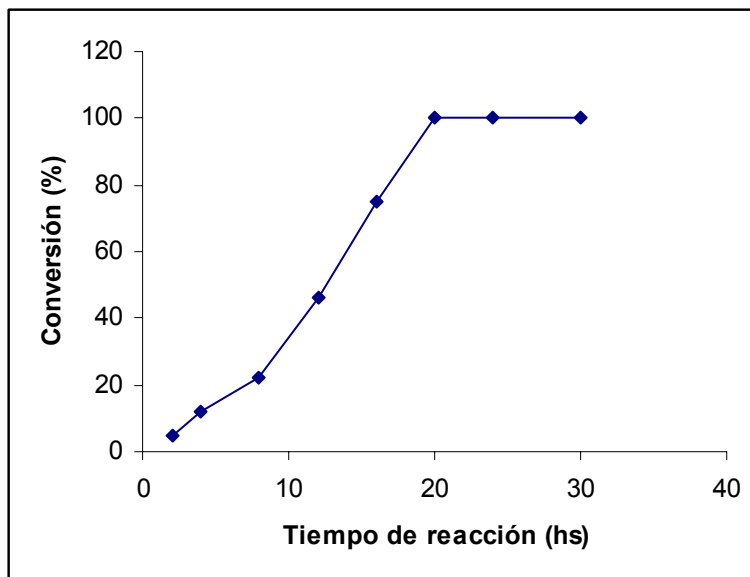
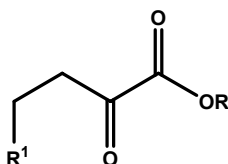


Figura 7.3. Efecto del tiempo de reacción sobre la conversión en la reacción de reducción del sustrato **54b** catalizada por cultivo fresco de *Mucor rouxii*

En la Figura 7.3 puede observarse que a partir de las 20 horas de reacción la conversión es máxima, es decir 100%.

Los estudios se continuaron analizando la capacidad de la levadura fresca de *Mucor rouxii* en la reducción de otros α -cetoésteres. Para estos ensayos se utilizaron como sustratos los compuestos **54a**, **54c-f** y **54g** (Esquema 7.14).



R	R ¹	Sustrato
Me	COOMe	54a
Et	COOEt	54b
n-Pr	COOPr	54c
<i>i</i> -Pr	COO <i>i</i> -Pr	54d
n-Bu	COOn-Bu	54e
<i>i</i> -Bu	COO <i>i</i> -Bu	54f
Et	Ph	54g

Esquema 7.14

Las condiciones óptimas encontradas fueron hexano como solvente, una relación biomasa-sustrato de 17g/mmol, 24 horas y 30°C.

En la Tabla 7.6 se resumen las conversiones alcanzadas así como los porcentajes de exceso enantiomérico determinados en cada caso.

Tabla 7.6. Reducción de ésteres derivados de α -cetoácidos catalizada por cultivo fresco de levaduras de *M. rouxii*

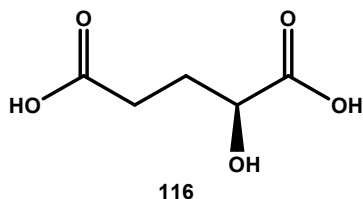
Sustrato	Producto	Conversión (%)	e.e. (%)
54^a	55a	100	95(S)
54b	55b	100	98 (S)
54c	55c	100	94(S)
54d	55d	98	99(S)
54e	55e^a	40	93(S)
54f	55f^a	26	95(S)
54g	55g	96	91(S)

a: tiempo de reacción, 40 hs

Si se observan los resultados obtenidos puede inferirse que las cadenas alcoxilo en la serie de α -cetoésteres **54a-f** afectaron el grado de conversión pero no la pureza enantiomérica de los productos. La actividad reductásica celular fue afectada por el volumen del sustituyente alquílico del éster R como en los casos de los grupos n-butilo en **54e** e *isobutilo* **54f** para los cuales las conversiones fueron del 40% y 26% respectivamente.

El producto 2-hidroxiglutarato de diisobutilo **55f** no fue reportado previamente en bibliografía. Este nuevo compuesto fue identificado en forma completa por métodos espectroscópicos: FTIR, ^1H y ^{13}C RMN y espectrometría de masa de alta resolución (EM-AR).

Con el objeto de determinar la configuración de este nuevo compuesto se lo sometió a una hidrólisis catalizada por CAL B para obtener como producto el ácido 2-hidroxiglutarico. Para asegurar que la hidrólisis enzimática no afectaba la configuración del C-2, el procedimiento fue evaluado previamente utilizando el (2S)-hidroxiglutarato de diisopropilo **55d** de configuración conocida: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -1.2$.⁶ La hidrólisis catalizada por CAL B de este producto dio como resultado el ácido (2S)-hidroxiglutarico **116**; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -2.0$, demostrando que la hidrólisis enzimática no afectaba la estereoquímica del centro quiral. Tratando el producto **55f**, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -5.2$, bajo las mismas condiciones se obtuvo el ácido **116**, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -1.85$.



A partir de estos resultados se pudo concluir que la configuración del C-2 en el producto **55f** era (S).

Respecto a los resultados obtenidos cuando se utilizó el compuesto **54g** como sustrato se debe indicar que a diferencia de los resultados reportados por Nakamura y col,¹¹ en la reacción catalizada por cepas industriales de *Saccharomyces cerevisiae* el único producto obtenido fue el (2S)-hidroxi-4-fenilbutanoato de etilo **57b** generado por la reducción quimio- y estereoselectiva del grupo carbonilo ubicado en C-2.

7.4.2. Reducción quimio- y estereoselectiva de 2-oxoglutaratos de alquilo catalizada por células liofilizadas de *Mucor rouxii*

En esta etapa comenzamos estudiando la reacción del sustrato **54b** catalizada con levaduras liofilizadas de *Mucor rouxii*. El catalizador fue rehidratado antes del agregado de los diferentes solventes orgánicos en los cuales se desarrolló cada reacción.

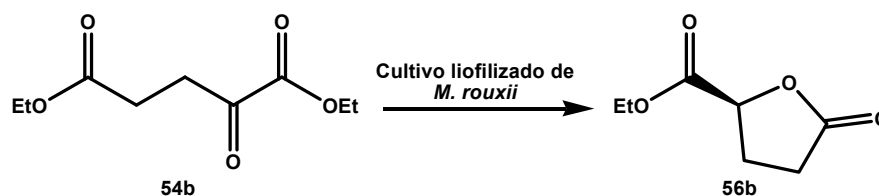
Para estos ensayos se utilizó una relación biomasa-sustrato de 17 g/mol a 30°C. En la Tabla 7.7 se presentan los resultados obtenidos, los tiempos de reacción informados en cada caso corresponden a la máxima conversión y el mayor exceso enantiomérico (e.e.) del producto obtenido.

Tabla 7.7. Reducción quimio- y estereoselectiva del cetoéster **54b** catalizada por cultivo liofilizado de *Mucor rouxii*

Solvente	Biomasa/sustrato (g/mmol)	Tiempo (hs)	Conversión (%)	e.e. (%)
Agua	8	24	89	48(S)
Hexano	17	24	90	98(S)
Tolueno	17	24	65	72(S)
Dioxano	17	36	0.2	---
Acetato de etilo	17	36	0.7	---

Coincidiendo con el comportamiento observado en los casos en los que se trabajó con cultivos frescos, las levaduras no mostraron actividad en solventes más polares como dioxano y acetato de etilo, y los mejores resultados en conversión y pureza enantiomérica se alcanzaron cuando se utilizó hexano como solvente.

Sin embargo el resultado más relevante fue, que a diferencia de los cultivos frescos, en este caso se obtuvo como único producto la γ -butirolactona **56b** (Esquema 7.15).



Esquema 7.15. Reacción del α -cetoéster **54b** catalizada por cultivos liofilizados de *M. rouxii*

El producto se obtuvo en un solo paso y fue identificado por espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C .

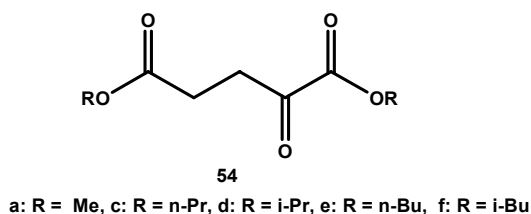
El estudio de la reacción continuó con el análisis del efecto de la relación biomasa-sustrato empleando hexano como solvente. En la Tabla 7.8 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 7.8. Influencia de la relación biomasa-sustrato en la reacción del sustrato **54b** en hexano con cultivos liofilizados de *M. rouxii*

Relación biomasa-sustrato (g/mmol)	Conversión%
5.0	25
10.0	60
17.0	90
20.0	100
25.0	100

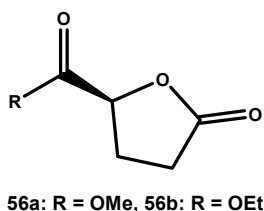
Como puede observarse en la Tabla 7.8, existe una marcada dependencia entre la conversión y la biomasa empleada. Para relaciones biomasa-sustrato mayores de 20 g/mmol no sólo se obtuvo una mayor conversión sin que se viera afectada la pureza enantiomérica del producto, sino que el tiempo a partir del cual se obtuvieron los mejores resultados disminuyó de 30 horas a 24 horas. Esto significa una ventaja energética y operativa ya que un menor tiempo de reacción significa una generación menor de impurezas debido al deterioro de las células del biocatalizador.

La investigación se continuó analizando el comportamiento de la levadura liofilizada de *Mucor rouxii* utilizando como sustratos la serie de 2-oxoglutaratos de alquilo **54a**, **c**, **d**, **e** y **f** (Esquema 7.16).



Esquema 7.16

Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento muy diferente al observado en las reducciones catalizadas por levadura de *Mucor rouxii* fresco. Dependiendo del tamaño de la cadena alcoxilo del sustrato **54**, se obtuvieron diferentes productos. Para cadenas mayores o iguales a tres carbonos los productos obtenidos fueron los hidroxíesteres **55c-f** indicando el mismo comportamiento observado en las levaduras liofilizadas y en cultivo fresco. Pero en el caso de los sustratos **54a** y **54b** se obtuvieron las γ -butirolactonas correspondientes **56a** y **56b**.



A pesar de estas variaciones la estereoselectividad del microorganismo no cambió obteniéndose preferencialmente, en todos los casos, el esteroisómero S.

Los grados de conversión fueron similares a los observados en los casos en que se utilizó el cultivo fresco, pudiéndose determinar la misma tendencia de reactividad (Tabla 7.9).

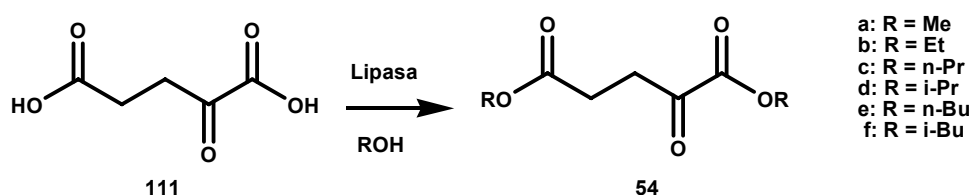
Tabla 7.9. Reducción de ésteres derivados de α -cetoácidos catalizada por cultivo liofilizado de levaduras de *M. Rouxii*

Sustrato	Producto	Conversión (%)	E.e. (%)
54a	56a	88	97(S)
54b	56b	100	98 (S)
54c	55c	100	97(S)
54d	55d	100	98(S)
54e	55e	35	94(S)
54f	55f	14	92(S)

Es decir para los grupos alcoxilo muy voluminosos como en el caso de los grupos n-butilo e isobutilo las conversiones fueron mucho menores que en los otros casos.

CONCLUSIÓN

En este capítulo se utilizó una combinación de caminos enzimáticos para obtener diferentes hidroxiésteres a partir de α -cetoésteres. La primera etapa consistió en obtener los ésteres alquílicos **54a-f** a partir de la esterificación ácido 2-oxoglutarico con diferentes alcoholes catalizada por lipasas (Esquema 7.17).

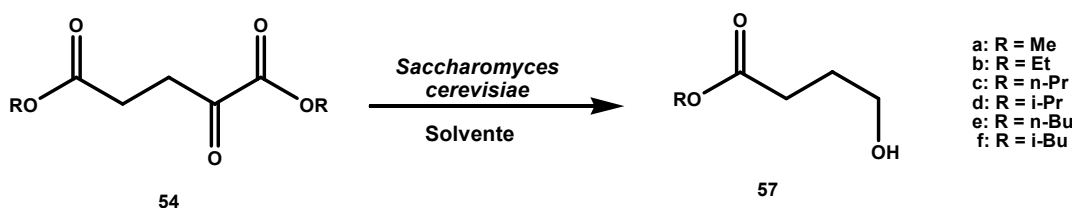


Esquema 7.17

La segunda etapa consistió en el estudio comparativo del comportamiento catalítico de cepas industriales de levaduras de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) y del hongo *Mucor rouxii* en la reducción de α -cetoésteres.

A partir de la información obtenida se puede concluir que ambos biocatalizadores actúan de forma muy diferente.

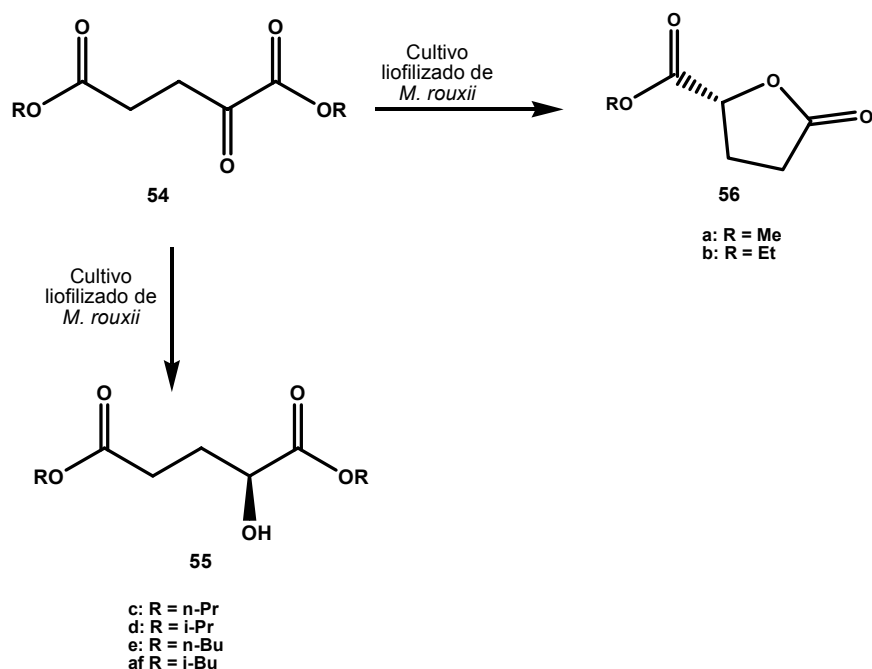
Cuando se utilizaron levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* los únicos productos que se obtuvieron fueron la serie de hidroxiésteres **57** (Esquema 7.18).



Esquema 7.18

El grado de conversión fue dependiente del medio de reacción. Cuando se utilizó agua, solventes de baja polaridad o mezclas bifásicas agua-solventes orgánicos de baja polaridad los grados de conversión fueron los máximos alcanzados. En cambio, cuando se aumentó la polaridad del solvente como en el caso del dioxano la conversión fue nula. Por esta razón se eligió al hexano como medio de reacción.

Cuando se analizó el efecto del sustituyente R en el sustrato se apreció que para grupos voluminosos como el n-butilo o el isobutilo la conversión disminuía en forma importante. Respecto al estudio del comportamiento del hongo *Mucor rouxii* se debe indicar que resultó un excelente biocatalizador para la reducción quimio- y enantioselectiva de los α -cetoésteres **54**. En los ejemplos estudiados donde se trabajó con cultivos liofilizados del hongo se pudieron obtener dos productos diferentes dependiendo del tamaño del grupo alcoxilo (R) unido al sustrato. Cuando R fue metoxilo o etoxilo los productos obtenidos fueron las (S)-3-carboximetil- y (S)-3-carboxietil- γ -butirolactonas **56a** y **56b** respectivamente. Cuando R fue más voluminoso (**54c-f**) se obtuvieron los (S)-hidroxiésteres **55c-f** (Esquema 7.19).

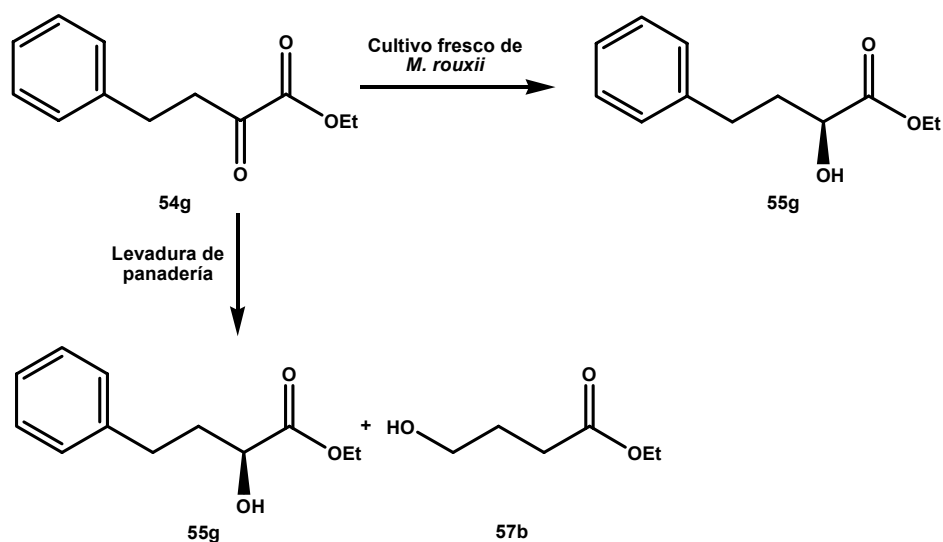


Esquema 7.19

En el caso en que se utilizaron cultivos frescos de *Mucor rouxii* sólo se obtuvieron los (S)-hidroxiésteres **55** como productos.

Trabajando con cultivos frescos como liofilizados el grado de conversión de las diferentes reacciones fue dependiente del tamaño del sustituyente R en el sustrato, observándose que para los sustratos **54e** y **54f** se obtuvieron los menores valores de conversión.

La reacción del 2-oxo-4-fenilbutanoato de etilo catalizada por cultivos frescos de *Mucor rouxii* produjo el (2S)-hidroxi-4-fenilbutanoato **55g** de etilo como único producto. Este resultado contrasta con el reportado por Nakamura y col.¹¹ que, utilizando levaduras de panadería como biocatalizador, obtuvieron el producto de reducción **55g** y también el 4-hidroxibutanoato de etilo (**57b**) como producto secundario (Esquema 7.20).



Esquema 7.20

Estos resultados evidencian una mayor quimioselectividad en el caso del *Mucor rouxii* en comparación con las levaduras de panadería utilizadas por Nakamura y col.¹¹

La reducción catalizada por el mencionado microorganismo mostró ser altamente estereoselectiva, ya que todos los casos, el producto sintetizado preferentemente fue el estereoisómero S.

La investigación presentada en este capítulo es la primera referencia sobre un procedimiento totalmente enzimático a partir del cual, en una primera etapa de esterificación catalizada por lipasas el ácido 2-oxoglutarico es transformado en los correspondientes α -cetoésteres. En un segundo paso a través de la reducción de los ésteres mencionados, catalizada por *Mucor rouxii*, se pudieron obtener los (2S)-hidroxiglutaratos de alquilo correspondientes cuando se trabajó con el cultivo fresco del biocatalizador. En cambio cuando se utilizó el cultivo liofilizado se obtuvieron las γ -butirolactonas **56a-b** empleando los ésteres metílico o etílico, en el caso de sustratos más voluminosos (**54c-f**) los productos fueron los (S) hidroxieésteres **55**.

En referencia al estudio realizado utilizando las cepas industriales de *Saccharomyces cerevisiae*, los únicos productos obtenidos fueron los γ -hidroxieésteres **57** generados por la hidrólisis, descarboxilación y reducción de los sustratos.

Los buenos resultados obtenidos en cada uno de los casos presentados muestran que este procedimiento totalmente biocatalítico es una alternativa más limpia y eficiente que los procedimientos clásicos de síntesis.

Bibliografía

1. (a) C. García, T. Martin, V.S. Martin, *J. Org. Chem.*, 66(2001) 1420; (b) M.-H., Xu, W. Wang, L.-J. Xia, G.-Q Lin, *J. Org. Chem.*, 66(2001) 3953.
2. (a) J. Mulzer, In *Comprehensive Organic Functional Group Transformations*; Elsevier: Oxford, 1995; Vol. 5, pp 121–179; (b) H. Fukui, Y. Tsuchiya, K. Fujita, T. Nakawaga, H. Koshino, T. Nakata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7(1997) 2081.
3. M.M. Murta, M.B.M. de Azevedo, A.E. Greene, *J. Org. Chem.*, 58(1993) 7537, y referencias presentadas en los mismos.
4. M.P. Sibi, P. Liu, J. Ji, S. Hajra, J. Chen, *J. Org., Chem.*, 67(2002) 1738.
5. A.W. Sledski, J. Boukouvalas, In *Stud. Nat. Prod. Chem.*; Elsevier: Amsterdam, 1989; Vol. 3, pp 157–171.
6. S. Drioli, P. Nitti, G. Pittaco, L Tossut, E. Valentin, *Tetrahedron: Asymmetry*, 10(1999) 2713.
7. A.L. Gutman, T. Bravdo, *J. Org. Chem.*, 54(1989) 4263.
8. E. Brenna, C. Dei Negri, C. Fuganti, S. Serra, *Tetrahedron: Asymmetry*, 12(2001) 1871.
9. C.P. Mangone, E.N. Pereyra, S. Argimon, S. Moreno, A. Baldessari, *Enzyme Microb. Technol.*, 30(2002) 596.
10. A. Baldessari, C.P.Mangone, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 11(2001) 335.
11. K. Nakamura, S. Kondo, Y. Kawai, A Ohno, *Tetrahedron Lett.*, 32(1991)7075.
12. V. Prelog, *Pure Appl. Chem.*, 9(1968)119.

Capítulo VIII
Parte experimental

8.1. Generalidades

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fisher-Johns y no fueron corregidos.

Los poderes rotatorios se midieron en un Polarímetro Perkin-Elmer 343 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 indicada para cada caso.

Las técnicas de liofilizado se realizaron con un liofilizador Labconco Lyph Lock 4.5.

Biocatalizadores

a) Lipasas

Las lipasas utilizadas fueron en todos los casos de origen comercial y las especificaciones de cada *batch* se detallan a continuación:

Lipasa de *Candida antarctica* (CAL) (Novozym 435, Novo Nordisk)

Lipasa inmovilizada sobre una resina acrílica, producida por el organismo huésped *Aspergillus oryzae* luego de transferirle el gen que codifica para lipasa B de *Candida antarctica*.

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°C durante 15 minutos.

PLU/g sólido: 7400

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 a 37°C):

Unidades/mg de sólido: 46; 53; 43.

Unidades/mg de proteína: 220; 190; 135.

Lipasa de *Candida rugosa* (CRL) (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 pH 7,2 y a 37°C):

Unidades/mg de sólido: 110; 905; 860.

Unidades/mg de proteína: 7770; 4570; 2425.

Lipozyme^R IM 20 (LIP) (Lipasa de *Mucor miehei*, Novo Nordisk)

La enzima se encuentra inmovilizada sobre una resina aniónica y deriva de una cepa seleccionada del hongo. Usualmente, puede emplearse en un rango de temperaturas de 40 a 70°.

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.

BIU/g sólido: 25, 25.

Lipasa de *Pseudomonas cepacia* (Lipasa PS-C, Amano)

Lipasa inmovilizada sobre partículas de cerámica.

Actividad (una unidad produce un micromol de glicerol por minuto a pH 7,0 y a 50°C, en presencia de seroalbúmina bovina):

Unidades/mg de sólido: 30.

b) Células enteras

Se emplearon células enteras de los microorganismos que se detallan a continuación:

Saccharomyces cerevisiae: (LEVEX®)

Corresponde a cepas industriales de levadura de panadería manufacturada para el consumo humano.

Mucor rouxii: Cepa NRRL 1894.

La obtención de esporas y los cultivos de este microorganismo fueron realizados en el Departamento de Química Biológica de La Universidad de Buenos Aires por el grupo de investigación integrado por la Dra. Elba Pereyra y la Dra Silvia Moreno de Colonna.

A continuación se describe la metodología empleada para la obtención de biomasa de este microorganismo así como los distintos tratamientos a los cuales fue sometida para lograr su conservación:

1) Preparación de esporas: Para la obtención de las esporas se cultivó el hongo en medio agar 6% tomate (1:1) en botellas de Roux. Se sembraron en cada botella 1000 esporas y se incubaron a 28-30 °C durante 4-6 días, en oscuridad. Para efectuar la cosecha se agregó a cada botella 20 ml de agua destilada estéril, lavando la superficie del cultivo para desprender las esporas de los esporangios. Se filtró la suspensión obtenida por una malla de nylon. El filtrado fue centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos, descartando el sobrenadante, la operación se repitió hasta que el sobrenadante quedó límpido. Se concentró la suspensión en agua destilada estéril hasta una

concentración aproximada de 10^9 esporas/ ml. Las esporas se mantuvieron a 4°C en tubos estériles.

Todos los ensayos se realizaron con esporas recién cosechadas .

2) Preparación de cultivo fresco: Los cultivos para la obtención de biomasa se realizaron en medio rico YPG a partir de las esporas del microorganismo, las cuales fueron inoculadas a una concentración de 1×10^6 esporas/ml para los cultivos aerobios y 2×10^6 esporas/ml para los anaerobios. Las células se incubaron en un agitador rotatorio a 120 rpm y 28°C durante diferentes tiempos según se indica en cada caso. Los cultivos anaeróbicos se realizaron en erlenmeyer sellado y bajo flujo constante de CO₂ al 100%. La biomasa así obtenida fue filtrada y lavada con agua estéril. Una vez removido el exceso de agua se realizaron las incubaciones con los sustratos para medir la actividad oxidirreductásica.

3) Técnicas de secado:

3.1. Liofilización directa: La biomasa proveniente de un cultivo anaeróbico (levaduras), filtrada y pesada, se sumergió en nitrógeno líquido y se distribuyó en balones previamente enfriados a -20 °C , liofilizándose durante 1-2 horas.

3.2. Liofilización con trehalosa: La biomasa proveniente de un cultivo anaeróbico (levaduras), filtrada y pesada se resuspendió en una solución de trehalosa 20% peso en volumen, se fraccionó en balones y se congeló a -20°C, liofilizándose durante 3-4 horas.

3.3 Secado en corriente de aire caliente: La biomasa proveniente de un cultivo anaeróbico (levaduras), filtrada y pesada se disgregó con espátula, se colocó en una red de nylon de aproximadamente 50 μ m de poro y se le aplicó una corriente de aire caliente; la temperatura no superó los 38 °C durante 4 horas, se continuó la operación durante 12 horas más a 20 °C.

El material deshidratado se pesó y se conservó en desecador a 4 °C.

Todas reacciones biocatalizadas se llevaron a cabo en un incubador rotatorio digital tipo orbital INNOVA™ 4000 (New Brunswick) equipado con control de temperatura y de velocidad y en un agitador rotatorio ubicado en un cuarto termostatzado a 28-30°C.

Las centrifugaciones se efectuaron empleando una centrifuga analítica Adams y una microcentrifuga COSTAR® para tubos eppendorf a 10000 rpm.

Métodos espectroscópicos

Los espectros de absorción infrarroja (IR) se determinaron con un espectrofotómetro Nicolet Magna-IR 550 (FT/IR) en película o pastilla de bromuro de potasio.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ^1H) se realizaron a 200,1 MHz en un espectrómetro Bruker AC-200 y a 500 MHz en un espectrómetro Bruker AM-500. Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN- ^{13}C) se obtuvieron a 50,2 y 125,8 MHz en los espectrómetros Bruker AC-200 y AM-500 respectivamente. Las muestras se analizaron en tubos de 5 mm de diámetro y los solventes empleados se indican para cada caso.

En algunos casos, la asignación de las señales de ^{13}C y ^1H , se realizó utilizando una combinación de técnicas mono y bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC).

Los desplazamientos químicos se expresan en todos los casos en la escala δ , en partes por millón (ppm) respecto de la resonancia del tetrametilsilano, empleado como referencia interna (0,00 ppm). Las señales se indican en cada caso como singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (q), doble doblete (dd), multiplete (m) o singulete ancho (s_a). Los desplazamientos químicos para RMN- ^{13}C se expresan en ppm utilizando como referencia el pico correspondiente al solvente deuterado. En algunos casos se presenta la fórmula de los compuestos con la asignación de los núcleos de ^{13}C y en otros casos con la asignación de los núcleos de ^1H de acuerdo al orden decreciente de sus desplazamientos y con el objetivo de simplificar la identificación.

Los espectros de masa (EM) por introducción directa se determinaron en los espectrómetros de masa TRIO-2 VG Masslab y SHIMADZU QP-5000 y fueron obtenidos por ionización por impacto electrónico a 70 eV. Para obtener espectros de masa de ionización por desorción láser asistida por una matriz (MALDI) se utilizaron los espectrómetros de masa: Shimadzu Kompact MALDI III y Shimadzu Kompact MALDI 4 equipados con una fuente láser ultravioleta (UV) pulsada para la desorción con una longitud de onda de emisión de 337nm y 3 ns de ancho de pulso y como analizador poseen un TOF, ubicado en el Laboratorio de Investigación de Bioquímica/Biofísica de plantas de la Facultad de Agricultura de la Universidad Ehime, Japón. Para los espectros de masa de alta resolución (EMAR) se empleó un espectrómetro VG-ZAB BEQ.

Métodos cromatográficos

Las cromatografías analíticas en capa delgada se realizaron con placas de aluminio de sílicagel de 0.2 mm de espesor (Sílicagel 60 F₂₅₄, Merck).

Los agentes de revelado utilizados fueron: luz Ultravioleta a 254 nm y a 365 nm; vapores de yodo; ácido sulfúrico 5 % en etanol; molibdato de amonio (50g/l):sulfato cérico (1g/l) en ácido sulfúrico acuoso 10% v/v y pulverizado con solución de ninhidrina 0,01 % en

etanol. En los tres últimos casos se culminó el revelado por calentamiento de la placa con pistola de aire caliente.

Las cromatografías en columna se llevaron a cabo empleando como adsorbente sílicagel (Sílicagel 60, malla 230-400, Merck).

Las cromatografías gas-líquido (CGL) fueron realizadas en un cromatógrafo Thermo Finnigan Focus GC asociado a la work station Chrom Card y dos cromatógrafos Hewlett Packard 5840A y 5890, ambos equipados registradores Hewlett Packard, los tres cromatógrafos utilizaban detectores de ionización de llama (FID). En todos los casos se empleó nitrógeno como gas portador.

Las cromatografías gas-líquido acopladas a espectrometría de masa (CG-EM) se efectuaron en un sistema compuesto por un cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard 5890 acoplado a un espectrómetro de masa VG-TRIO-2/2000 y en un equipo SHIMADZU compuesto por un cromatógrafo GC-17A acoplado a un espectrómetro de masa QP-5050A.

En la tabla 1.1 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	Longitud y diámetro interno	Características de la fase estacionaria	Temperatura máx. de operación
ULTRA-2	25m; 0,2mm	PhMe siloxano entrecruzado 5%	280°C
HP-17	10m; 0,53mm	PhMe siloxano entrecruzado 50%	300°C
CARBOWAX 20M	25m ; 0,2mm	Polietilenglicol-film de 0,2 µm de espesor	220°C
CHIRALDEX G-TA	40m ; 0,32mm	Gamma Trifluoroacetil ciclodextrinas	180°C

Solventes

Los solventes para cromatografía (en columna y en capa delgada), extracción y para recristalización fueron purificados por destilación fraccionada. En los casos restantes, se emplearon 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 a 40°.

8.2. Biotransformaciones catalizadas por enzimas aisladas

8.2.1. Síntesis quimioenzimática de Cloruro de Lapirio

Procedimiento general para las reacciones enzimáticas de esterificación, transesterificación y aminólisis

El sustrato se disolvió en el solvente en la relación indicada para cada caso. A la solución obtenida se le agregó secuencialmente el nucleófilo y la enzima, la cual se empleó sin ningún tratamiento previo. La cantidad de nucleófilo y de biocatalizador, así como la temperatura de reacción se indican en cada caso. La suspensión se agitó a 200 rpm y el transcurso de la reacción se siguió por CGL utilizando una columna ULTRA-2 y el siguiente programa de temperatura: 120°C (1 min)/10°C/min/280°C (5 min). Alcanzado el grado de conversión máximo, la enzima se filtró y se lavó con pequeñas cantidades de solvente. El filtrado se evaporó a presión reducida, en el caso del procedimiento one-pot, la mezcla resultante se purificó por cromatografía en columna. La identidad de los productos aislados se determinó por FT/IR, EM, RMN-¹H y RMN-¹³C de 200 MHz.

Cloroacetato de Etilo (72) .

A una solución de ácido cloroacético (284 mg 3,0 mmoles) en etanol (5 ml), se le agregaron 150 mg de CAL. La suspensión se agitó a 25°C durante 36 hs. Por filtración se obtuvieron 357 mg de **72** (97 %).

IR (Film, cm⁻¹): 2986, 1759.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4,29 (q, 2H, -COOCH₂CH₃, J= 7,1 Hz), 4,10 (s, 1H, ClCH₂COO-), 1,30 (t, 3H, -COOCH₂CH₃, J= 7,1 Hz).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 169,5 (ClCH₂COO-), 62,6 (-COOCH₂CH₃), 41,2 (ClCH₂COO-), 15,3 (-COOCH₂CH₃).

EM (IE, m/z,%) 107 [M⁺] (1), 79 (9), 77 (27), 51 (4), 49 (13), 29 (100).

2-Cloro-N-(2-hidroxietil)acetamida (60) .

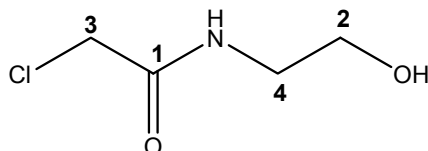
A una solución de **72** (366 mg, 3,0 mmoles) y etanolamina (183 mg, 3 mmoles) en acetona (5 ml), se le agregaron 366 mg de LIP. La suspensión se agitó a 55°C durante 24 hs y el progreso de la reacción fue monitoreado por CGL. Por filtración se obtuvieron 526 mg de **60** (96%).

IR (Film, cm⁻¹): 3300, 1641, 1545.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4,07 (s, 1H, H-3), 3,62 (t, J= 5.5 Hz, H-2), 3,35 (t, J= 5.5 Hz, H-4).

RMN-¹³C (CDCl₃:CD₃OD) δ (ppm): 162,5 (C-1), 65,4 (C-2), 58,9 (C-3), 49,3 (C-4).

EM (IE, m/z, %): 140 (34, M⁺ + 2), 138 (100, M⁺), 120 (42), 106 (18), 94 (20), 72 (20), 60 (10).



Dodecanoato de 2-(2-cloroacetilamino)etilo (61).

Laurato de etilo como agente acilante

A una solución de laurato de etilo (1,8 g, 8,0 mmoles) y **60** (480 mg, 3,5 mmoles) en acetona (10 ml), se le agregaron 200 mg de tamices moleculares y 1,5 g de LIP. La suspensión se agitó a 30°C y 200 r.p.m durante 24 hs y el progreso de la reacción fue monitoreado por CGL. Por filtración se obtuvo un residuo el cual fue lavado con hexano, obteniéndose 840 mg de **61** (75%).

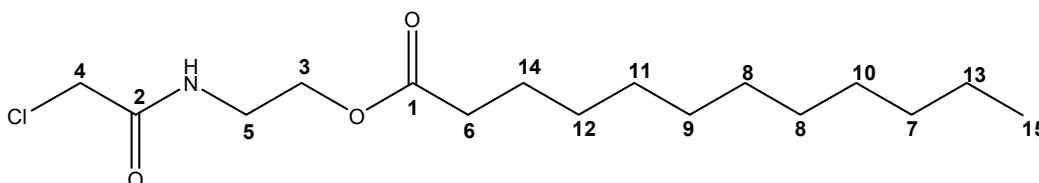
P.F.: (67-70)°C

IR (KBr, cm⁻¹): 2900, 2877, 1732, 1625.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4,19 (t, 2H, J= 5,8 Hz, H-3), 4,07 (s, 2H, H-4), 3,59 (t, 2H, J= 5,8 Hz, H-5), 2,32 (t, J= 7,0 Hz, H-6), 1,61 (m, 2H, H-14), 1,35-1,21 (m, 16H, H-7 a H-13), 0,89 (t, 3H, J=7,1 Hz, H-15).

RMN-¹³C (CDCl₃:CD₃Cl) δ (ppm): 173,9 (C-1), 166,3 (C-2), 62,4 (C-3), 42,4 (C-4), 39,1 (C-5), 34,1 (C-6), 33,9 (C-7), 31,8 (C-8), 29,5 (C-9), 29,4 (C-10), 29,2 (C-11), 29,0 (C-12), 24,7 (C-14), 22,6 (C-13), 14,0 (C-15).

EM (IE, m/z, %) : 319 (1, M⁺), 200 (2), 183 (23), 119 (98), 84 (54), 55 (51), 43 (100).



Acido láurico como agente acilante

El procedimiento fue similar al utilizado en el caso del laurato de etilo pero empleando ácido láurico (720 mg, 3,5 mmoles) como agente acilante. Rendimiento: 1,07 g (95%) de **61**.

Procedimiento one pot

A una solución de cloroacetato de etilo **72** (366 mg, 3,0 mmoles) y etanolamina (183 mg, 3,0 mmoles) en acetona (5 ml), se le agregaron 366 mg de LIP. La suspensión se agitó a 30°C y 200 r.p.m durante 24 hs y el progreso de la reacción fue monitoreado por CGL.

Una vez que **72** fue convertido en **60** (98%, 48 hs) se agregó ácido láurico (720 mg, 3,5 mmoles), acetona (5 ml), LIP (1,2 g) y tamices moleculares (200 mg). Luego de 24 hs se filtró la enzima, el solvente fue evaporado y el residuo crudo fue purificado por cromatografía en columna y elución con acetato de etilo:hexano (1:3) obteniendo 695 mg (62%) de un producto identificado a través de espectroscopía de ^1H RMN como **61**.

Cloruro de 1-[(2-dodecanoiloxietilcarbamoil)metil]piridinio (Cloruro de Lapirio) 58

A 440 mg (1,37 mmoles) de **61**, colocados en un baño de hielo, se le agregaron 4 ml de piridina.

La mezcla de reacción fue agitada durante toda una noche, luego se agregó hexano (35 ml) obteniéndose un precipitado blanco identificado como **58** (477 mg, 87%).

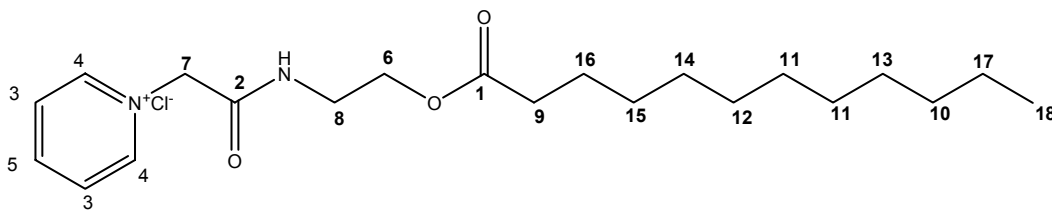
P.F.: (141-144)°C

IR (KBr, cm^{-1}): 3360, 2988, 2830, 1738, 1622.

RMN- ^1H (CDCl_3) δ (ppm): 9,37 (d, 2H, J= 5,5 Hz, H-4), 8,45 (t, 1 H, J= 7,3 Hz, H-5) 8,05 (t, 2H, J= 6.6, H-3), 5,99 (s, 2H, H-7), 4,18 (t, 2H, J= 5,8 Hz, H-6), 3,50 (t, 2H, J= 5,8 Hz, H-8), 2,34 (t, 2H, J= 7,4 Hz, H-9), 1,58 (m, 2H, H-16), 1,34-1,22 (m, 16H, H-10 a H-15 y H-17), 0,88 (t, 3H, J=7,0 Hz, H-18).

RMN- ^{13}C ($\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{Cl}$) δ (ppm): 173,8 (C-1), 164,3 (C-2), 146,0 (C-3), 145,1 (C-4), 127,6 (C-5), 62,3 (C-6), 61,7 (C-7), 39,0 (C-8), 34,2 (C-9), 33,9 (C-10), 31,8 (C-11), 29,6 (C-12), 29,3 (C-13), 29,1 (C-14), 29,0 (C-15), 24,8 (C-16), 22,6 (C-17), 14,1 (C-18).

EM (IE, m/z, %) : 363 (4, M^+), 183 (14), 119 (55), 98 (19), 84 (21), 79 (100), 57 (33), 52 (91).



8.2.2. Síntesis enzimática regioselectiva de ésteres de ácidos grasos de 3,17 β - estradiol

Procedimiento general para las reacciones enzimáticas de acilación

El 17 β - estradiol se disolvió en el solvente en solvente indicado para cada caso. A la solución obtenida se le agregó secuencialmente el donador de acilo correspondiente y la enzima, la cual se empleó sin ningún tratamiento previo. La cantidad de donador de acilo y de biocatalizador, así como la temperatura de reacción se indican en cada caso. La suspensión se agitó a 200 rpm y el transcurso de la reacción se siguió por CCD (hexano/diclorometano 1:3) y CGL, utilizando una columna HP-17 y el siguiente programa de temperatura: 100°C (1 min)/5°C/min/280°C (5 min). Alcanzado el grado de conversión máximo, la enzima se filtró y se lavó con pequeñas cantidades de solvente. El filtrado se evaporó a presión reducida. En el caso del procedimiento one-pot, la mezcla resultante se purificó por cromatografía en columna. La identidad de los productos aislados se determinó por FT/IR, EM y RMN-¹H y RMN-¹³C de 500 MHz.

Pentanoato de (17 β)-estra-1,3,5-(10)-trien-3,17-diol (41a) .

A una solución de 17 β - estradiol (1g, 3,7 mmoles) en tolueno (300 ml) se agregaron 1,08 mg (9,25 mmoles) de ácido pentanoico y 5 g de CRL. La suspensión se agitó a 55°C y 200 r.p.m durante 72 horas y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD y CGL. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con hexano:diclorometano (1:3) condujo a la obtención de 882mg de **41a** (67%).

P.F.: (146-147)°C.

IR (KBr, cm⁻¹): 3440, 3015, 2985, 2885, 1700.

RMN-1H (CDCl₃) δ (ppm): 7,14 (d, 1H, J= 8,2 Hz, H-1), 6,63 (dd, 1H, J= 8,2 y 2,7 Hz, H-2), 6,57 (d, 1H, J= 2,7, H-3), 4,70 (dd, 1H, J= 8,0 y 7,8 Hz, H-17), 2,81 (m, 2H, H-6a,b), 2,32 (t, 2H, J=7,4 Hz, H-20), 2,35-2,13 (m, 2H, H-16a, H-10), 1,90-1,82 (m, 2H, H-12a, H-7a), 1,78-1,66 (m, 1H, H-15a), 1,68-1,58 (m, 4H, H-12b, H-16b, H-21), 1,57-1,22 (m, 7H, H-22, H-15b, H-14, H-11, H-7b), 0,93 (t, 3H, J= 7,4 Hz, H-W), 0,83 (s, 3H, H-18).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 174.1 (C-19), 153,4 (C-3), 138,1(C-5), 132,5 (C-9), 126,5 (C-1), 115,2 (C-4), 112,7 (C-2), 82,5 (C-17), 49,7 (C-14), 43,7 (C-10), 42,9 (C-13), 38,6 (C-8), 36,9 (C-12), 34,4 (C-20), 29,6 (C-12, C-6), 27,6 (C-16), 27,3 (C-21), 27,2 (C-7), 23,6 (C-15), 22,2 (C-22), 14,1 (C-W), 13,1 (C-18).

EM (IE,m/z,%): 356 [M⁺] (17), 281 (2), 255 (100), 159 (67), 69 (25), 55 (40), 41 (18).

Hexanoato de (17β)-estra-1,3,5-(10)-trien-3,17-diol (41b) .

A una solución de 17β- estradiol (1g, 3,7 mmoles) en tolueno (300 ml) se agregaron 940 mg (9,25 mmoles) de ácido hexanoico y 5 g de CRL. La suspensión se agitó a 55°C y 200 r.p.m durante 72 horas y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD y CGL.

La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con hexano:diclorometano (1:3) condujo a la obtención de 898 g de **41b** (66%).

P.F.: (118-121)°C.

IR (KBr, cm⁻¹): 3467, 3015, 2985, 2885, 1700.

RMN-1H (CDCl₃) δ(ppm): 7,14 (d,1H, J= 8,3 Hz, H-1), 6,62 (dd, 1H, J= 8,4 y 2,8 Hz, H-2), 6,57 (d, 1H, J= 2,7, H-4), 4,69 (dd, 1H, J= 9,1 y 7,8 Hz, H-17), 2,81 (m, 2H, H-6a,b), 2,32 (t, 2H, J=7,4 Hz, H-20), 2,38-2,18 (m, 2H, H-16a, H-10), 1,91-1,82 (m, 2H, H-12a, H-7a), 1,79-1,73 (m, 1H, H-15a), 1,70-1,53 (m, 4H, H-12b, H-16b, H-21), 1,52-1,19 (m, 9H, H-23, H-22, H-15b, H-14, H-11, H-7b), 0,93 (t, 3H, J= 7,0 Hz, H-W), 0,81 (s, 3H, H-18).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 174.1 (C-19), 153,4 (C-3), 138,2(C-5), 132,5 (C-9), 126,7 (C-1), 115,2 (C-4), 112,7 (C-2), 82,5 (C-17), 49,8 (C-14), 43,8 (C-10), 42,9 (C-13), 38,5 (C-8), 36,9 (C-12), 34,6 (C-20), 31,3 (C-22), 29,6 (C-12, C-6), 27,6 (C-16), 27,2 (C-7), 25,2 (C-21), 23,6 (C-15), 22,7 (C-23), 14,1 (C-W), 13,1 (C-18).

EM (IE,m/z,%): 370 [M⁺] (100), 254 (13), 225 (14), 172 (22), 159 (28), 71 (33), 55 (20), 43 (72). EM-AR: 370, 5359 (C₂₄H₃₄O₃⁺; calc. 370.5366).

Decanoato de (17β)-estra-1,3,5-(10)-trien-3,17-diol (41c) .

A una solución de 17β- estradiol (1g, 3,7 mmoles) en tolueno (300 ml) se agregaron 1,08 g (9,25 mmoles) de ácido decanoico y 5 g de CRL. La suspensión se agitó a 55°C y 200 r.p.m durante 72 horas y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD y CGL.

La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con hexano:diclorometano (1:3) condujo a la obtención de 1,08 g de **41c** (69%).

P.F.: (94-99)°C.

IR (KBr, cm⁻¹): 3450, 3009, 2989, 2853, 1701.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 7,08 (d, 1H, J= 8,5 Hz, H-1), 6,56 (dd, 1H, J= 8,4 y 2,8 Hz, H-2), 6,50 (d, 1H, J= 2,8 Hz, H-4), 4,64 (dd, 1H, J= 9,1 y 7,9 Hz, H-17), 2,83 (m, 2H, H-6a,b), 2,25 (t, 2H, J=7,6 Hz, H-20), 2,27-2,11 (m, 2H, H-16a, H-10), 1,90-1,83 (m, 2H, H-12a, H-7a), 1,78-1,70 (m, 1H, H-15a), 1,69-1,50 (m, 4H, H-12b, H-16b, H-21), 1,49-1,19 (m, 15H, H-23 a 27, H-15b, H-14, H-11, H-7b), 0,84 (t, 3H, J= 7,4 Hz, HW), 0,76 (s, 3H, H18).
 RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 174.1 (C-19), 153,3 (C-3), 138,2(C-5), 132,6 (C-9), 126,5 (C-1), 115,2 (C-4), 112,6 (C-2), 82,4 (C-17), 49,8 (C-14), 43,8 (C-10), 42,9 (C-13), 38,5 (C-8), 36,9 (C-12), 34,6 (C-20), 31,8 (C-26), 29,7 (C-24), 29,6 (C-12, C-6), 29,4 (C-25, C-23), 29,3 (C-22), 27,6 (C-16), 27,1 (C-7), 26,2 (C-21), 22,7 (C-27), 14,1 (C-W) 12,1 (C-W).
 EM (IE,m/z,%): 426 [M⁺] (100), 254 (20), 172 (28), 159 (44), 146 (31), 133 (39), 71 (26), 57 (48), 43 (78). EM-AR: 426, 6454 (C₂₈H₄₂O₃⁺; calc. 426.6450).

Dodecanoato de (17β)-estra-1,3,5-(10)-trien-3,17-diol (41d) .

A una solución de 17β- estradiol (1g, 3,7 mmoles) en tolueno (300 ml) se agregaron 1,85 g (9,25 mmoles) de ácido dodecanoico y 5 g de CRL. La suspensión se agitó a 55°C y 200 r.p.m durante 72 horas y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD y CGL. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con hexano:diclorometano (1:3) condujo a la obtención de 1,22 g de **41d** (73%).

P.F.: (70-71)°C.

IR (KBr, cm⁻¹): 3460, 3009, 2989, 2853, 1705.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 7,14 (d, 1H, J= 8,2 Hz, H-1), 6,63 (dd, 1H, J= 8,2 y 2,8 Hz, H-2), 6,55 (d, 1H, J= 2,8 Hz, H-4), 4,70 (dd, 1H, J= 8,5 y 7,8 Hz, H-17), 2,82 (m, 2H, H-6), 2,32 (t, 2H, J=7,7 Hz, H-20), 2,34-2,16 (m, 2H, H-16a, H-10), 1,90-1,83 (m, 2H, H-12a, H-7a), 1,78-1,69 (m, 1H, H-15a), 1,67-1,59 (m, 4H, H-12b, H-16b, H-21), 1,58-1,20 (m, 19H, H-23 a 29, H-15b, H-14, H-11, H-7b), 0,88 (t, 3H, J= 6,9 Hz, HW), 0,82 (s, 3H, H18).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 174.2 (C-19), 153,8 (C-3), 138,1(C-5), 132,5 (C-9), 126,5 (C-1), 115,2 (C-4), 112,7 (C-2), 82,5 (C-17), 49,8 (C-14), 43,8 (C-10), 42,9 (C-13), 38,5 (C-8), 36,9 (C-12), 34,6 (C-20), 31,9 (C-28), 29,7-29,6 (C-25, C-26), 29,5 (C-24), 29,4 (C-27), 29,3 (C-23), 29,2 (C-22), 27,6 (C-16), 27,1 (C-7), 25,1(C-21), 23,2 (C-15), 22,7 (C-29), 14,1 (C-W), 12,1 (C-18).

EM (IE,m/z,%): 454 [M⁺] (100), 255 (15), 159 (31), 57 (37), 43 (56). EM-AR: 454, 6995 (C₃₀H₄₆O₃⁺; calc. 454,6992).

Tetradecanoato de (17β)-estra-1,3,5-(10)-trien-3,17-diol (41e) .

A una solución de 17 β - estradiol (1g, 3,7 mmoles) en tolueno (300 ml) se agregaron 2,10 g (9,25 mmoles) de ácido tetradecanoico y 5 g de CRL. La suspensión se agitó a 55°C y 200 r.p.m durante 72 horas y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD y CGL. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con hexano:diclorometano (1:3) condujo a la obtención de 1,38 g de **41e** (78%).

P.F.: (72-68)°C.

IR (KBr, cm⁻¹): 3431, 3011, 2989, 2863, 1706.

RMN-1H (CDCl₃) δ (ppm): 7,14 (d, 1H, J= 8,2 Hz, H-1), 6,63 (dd, 1H, J= 8,2 y 2,7 Hz, H-2), 6,55 (d, 1H, J= 2,7 Hz, H-4), 4,78 (dd, 1H, J= 8,1 y 7,7 Hz, H-17), 2,87 (m, 2H, H-6), 2,23 (t, 2H, J=7,6 Hz, H-20), 2,34-2,16 (m, 2H, H-16a, H-10), 1,91-1,83 (m, 2H, H-12a, H-7a), 1,78-1,69 (m, 1H, H-15a), 1,67-1,59 (m, 4H, H-12b, H-16b, H-21), 1,58-1,19 (m, 25H, H-23 a 31, H-15b, H-14, H-11, H-7b), 0,87 (t, 3H, J= 6,9 Hz, HW), 0,79 (s, 3H, H18).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 174,1 (C-19), 153,4 (C-3), 138,2(C-5), 132,5 (C-9), 126,5 (C-1), 115,2 (C-4), 112,7 (C-2), 82,5 (C-17), 49,8 (C-14), 43,8 (C-10), 42,9 (C-13), 38,5 (C-8), 36,9 (C-12), 34,6 (C-20), 31,3 (C-30), 29,7-29,6 (C-22 a 25), 29,5 (C-26), 29,4 (C-27), 29,2 (C-28), 29,1 (C-29), 27,6 (C-16), 27,1 (C-7), 24,8 (C-21), 23,3 (C-31), 14,1 (C-W), 12,1 (C-18).

EM (IE, m/z, %): 482 [M⁺] (52), 255 (13), 172 (14), 159 (38), 146 (24), 133 (23), 71 (16), 43 (100). EM-AR: 482,7529 (C₃₀H₄₆O₃⁺; calc. 482,7532).

Hexadecanoato de (17 β)-estra-1,3,5-(10)-trien-3,17-diol (41f) .

A una solución de 17 β - estradiol (1g, 3,7 mmoles) en tolueno (300 ml) se agregaron 2,40 g (9,25 mmoles) de ácido hexadecanoico y 5 g de CRL. La suspensión se agitó a 55°C y 200 r.p.m durante 72 horas y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD y CGL. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con hexano:diclorometano (1:3) condujo a la obtención de 1,31 g de **41f** (70%).

P.F.: (73-71)°C.

IR (KBr, cm⁻¹): 3423, 3015, 2990, 2871, 1701.

RMN-1H (CDCl₃) δ (ppm): 7,14 (d, 1H, J= 8,3 Hz, H-1), 6,63 (dd, 1H, J= 8,3 y 2,8 Hz, H-2), 6,55 (d, 1H, J= 2,8 Hz, H-4), 4,70 (dd, 1H, J= 7,9 y 7,6 Hz, H-17), 2,82 (m, 2H, H-6), 2,31 (t, 2H, J=7,1 Hz, H-20), 2,32-2,15 (m, 2H, H-16a, H-10), 1,90-1,84 (m, 2H, H-12a, H-7a), 1,78-1,66 (m, 1H, H-15a), 1,64-1,58 (m, 4H, H-12b, H-16b, H-21), 1,55-1,22 (m, 27H, H-23 a 33, H-15b, H-14, H-11, H-7b), 0,88 (t, 3H, J= 6,9 Hz, HW), 0,82 (s, 3H, H18).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 174,1 (C-19), 153,4 (C-3), 138,2(C-5), 132,6 (C-9), 126,6 (C-1), 115,3 (C-4), 112,7 (C-2), 82,5 (C-17), 49,8 (C-14), 43,8 (C-10), 43,0 (C-13), 38,6 (C-8)

36,9 (C-12), 34,8 (C-20), 31,6 (C-32), 29,7-29,6 (C-30 a 25), 29,5 (C-24), 29,4 (C-31), 29,3 (C-23), 29,2 (C-22), 27,6 (C-16), 27,2 (C-7), 23,3 (C-33), 14,2 (C-W), 12,1 (C-18).
EM (IE,m/z,%): 510 [M⁺] (50), 255 (13), 172 (14), 159 (34), 146 (21), 133 (28), 71 (16), 43 (100).

Octadecanoato de (17β)-estra-1,3,5-(10)-trien-3,17-diol (41g) .

A una solución de 17β- estradiol (1g, 3,7 mmoles) en tolueno (300 ml) se agregaron 2,63 g (9,25 mmoles) de ácido octadecanoico y 5 g de CRL. La suspensión se agitó a 55°C y 200 r.p.m durante 72 horas y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD y CGL. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con hexano:diclorometano (1:3) condujo a la obtención de 1,40 g de **41g** (71%).

P.F.: (67-65)°C.

IR (KBr, cm⁻¹): 3439, 3011, 2983, 2851, 1708.

RMN-1H (CDCl₃) δ (ppm): 7,14 (d,1H, J= 8,3 Hz, H-1), 6,63 (dd, 1H, J= 8,3 y 2,9 Hz, H-2), 6,55 (d, 1H, J= 2,9 Hz, H-4), 4,70 (dd, 1H, J= 7,9 y 7,6 Hz, H-17), 2,82 (m, 2H, H-6), 2,31 (t, 2H, J=7,1 Hz, H-20), 2,34-2,14 (m, 2H, H-16a, H-10), 1,90-1,82 (m, 2H, H-12a, H-7a), 1,77-1,67 (m, 1H, H-15a), 1,66-1,17 (m, 35H, H-23 a 35, H-21, H-16b, H-15b, H-14, H-12b, H-11, H-7b), 0,88 (t, 3H, J= 7,0 Hz, HW), 0,83 (s, 3H, H18).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 174,1 (C-19), 153,4 (C-3), 138,2(C-5), 132,6 (C-9), 126,6 (C-1), 115,3 (C-4), 112,7 (C-2), 82,5 (C-17), 49,8 (C-14), 43,8 (C-10), 43,0 (C-13), 38,6 (C-8) 37,0 (C-12), 34,7 (C-20), 32,0 (C-34), 29,8 (C-32 a 25), 29,6 (C-24), 29,5 (C-33), 29,4 (C-23), 29,3 (C-22), 27,6 (C-16), 27,2 (C-7), 22,7, (C-35), 14,2 (C-W), 12,1 (C-18).

EM (IE,m/z,%): 538 [M⁺] (100), 255 (35), 159 (60), 57 (53), 43 (78).

Cis-9-octadecanoato de (17β)-estra-1,3,5-(10)-trien-3,17-diol (41h) .

A una solución de 17β- estradiol (1g, 3,7 mmoles) en tolueno (300 ml) se agregaron 2,60 g (9,25 mmoles) de ácido *cis*-9-octadecanoico y 5 g de CRL. La suspensión se agitó a 55°C y 200 r.p.m durante 72 horas y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD y CGL.

La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con hexano:diclorometano (1:3) condujo a la obtención de 1,50 g de **41h** (76%).

P.F.: (37-35)°C.

IR (KBr, cm⁻¹): 3414, 3005, 2981, 2849, 1703.

RMN-1H (CDCl₃) δ (ppm): 7,14 (d,1H, J= 8,3 Hz, H-1), 6,63 (dd, 1H, J= 8,3 y 2,5 Hz, H-2), 6,55 (d, 1H, J= 2,5 Hz, H-4), 5,43-5,29 (m, 4H, H-27 y H-28), 4,70 (dd, 1H, J= 7,9 y 7,4 Hz

, H-17), 2,86-2,72 (m, 4H, H-29 y H-6), 2,31 (t, 2H, J=7,6 Hz, H-20), 2,34-2,14 (m, 2H, H-16a, H-10), 2,09-1,99 (m, 4H, H-32 y H-26), 1,90-1,83 (m, 2H, H-12a, H-7a), 1,80-1,70 (m, 1H, H-15a), 1,67-1,59 (m, 2H, H-21, H-12b y H-16b), 1,58-1,19 (m, 25H, H-35 a 30 y H-25 a H-22, H-15b, H-14, H-11, H-7b), 0,87 (t, 3H, J= 7,0 Hz, HW), 0,82 (s, 3H, H18).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 174,1 (C-19), 153,4 (C-3), 138,2(C-5), 131,9 (C-9), 131,0 (C-28), 130,3 (C-27), 126,6 (C-1), 115,3 (C-4), 112,8 (C-2), 82,5 (C-17), 49,8 (C-14), 43,8 (C-10), 42,3 (C-13), 38,6 (C-8) 36,9 (C-12), 33,8 (C-20), 31,9 (C-34), 29,7 (H-30), 29,6 (C-32), 29,4 (C-33 y C-31), 29,2-29,1 (C-22 a C-24), 27,6 (C-16), 27,2 (C-26, C-29 y C-7), 22,7 (C-35), 14,2 (C-W), 12,1 (C-18).

EM (IE,m/z,%): 536 [M⁺] (20), 255 (100), 159 (74), 55 (43), 41 (29).

***Trans*-9-octadecanoato de (17β)-estra-1,3,5-(10)-trien-3,17-diol (41i) .**

A una solución de 17β- estradiol (1g, 3,7 mmoles) en tolueno (300 ml) se agregaron 2,63 g (9,25 mmoles) de ácido *trans*-9-octadecanoico y 5 g de CRL. La suspensión se agitó a 55°C y 200 r.p.m durante 72 horas y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD y CGL.

La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con hexano:diclorometano (1:3) condujo a la obtención de 1,48 g de **41i** (75%).

P.F.: (64-60)°C.

IR (KBr, cm⁻¹): 3429, 3000, 2983, 2850, 1710.

RMN-1H (CDCl₃) δ (ppm): 7,14 (d,1H, J= 8,4 Hz, H-1), 6,65 (dd, 1H, J= 8,4 y 2,8 Hz, H-2), 6,57 (d, 1H, J= 2,8 H-4), 5,39-5,30 (m, 2H, H-27 y H-28), 4,70 (dd, 1H, J= 7,9 y 7,1 Hz, H-17), 2,82 (m, 2H, H-6), 2,32 (t, 2H, J=7,6 Hz, H-20), 2,36-2,15 (m, 2H, H-16a, H-10), 2,06-1,98 (m, 4H, H-26 y H-29), 1,90-1,83 (m, 2H, H-12a, H-7a), 1,80-1,70 (m, 1H, H-15a), 1,67-1,59 (m, 2H, H-21, H-12b y H-16b), 1,58-1,19 (m, 25H, H-35 a 30 y H-25 a H-22, H-15b, H-14, H-11, H-7b), 0,87 (t, 3H, J= 7,0 Hz, HW), 0,82 (s, 3H, H18).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 174,1 (C-19), 153,4 (C-3), 138,2(C-5), 131,9 (C-9), 131,0 (C-28), 130,3 (C-27), 126,6 (C-1), 115,3 (C-4), 112,8 (C-2), 82,5 (C-17), 49,8 (C-14), 43,8 (C-10), 42,3 (C-13), 38,6 (C-8) 36,9 (C-12), 33,8 (C-20), 31,9 (C-34), 29,7 (H-30), 29,6 (C-32), 29,4 (C-33 y C-31), 29,2-29,1 (C-22 a C-24), 27,6 (C-16), 27,2 (C-26, C-29 y C-7), 22,7, (C-35), 14,2 (C-W), 12,1 (C-18).

EM (IE,m/z,%): 534 [M⁺] (20), 255 (100), 159 (74), 55 (43), 41 (29).

***Cis,cis* -9,12-octadecandienoato de (17β)-estra-1,3,5-(10)-trien-3,17-diol (41j) .**

A una solución de 17 β - estradiol (1g, 3,7 mmoles) en tolueno (300 ml) se agregaron 2,61 g (9,25 mmoles) de ácido *cis,cis*-9,12-octadecanoico y 5 g de CRL. La suspensión se agitó a 55°C y 200 r.p.m durante 72 horas y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD y CGL.

La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con hexano:diclorometano (1:3) condujo a la obtención de 1,41 g de **41j** (72%).

P.F.: (37-35)°C.

IR (KBr, cm⁻¹): 3414, 3005, 2981, 2849, 1703.

RMN-1H (CDCl₃) δ (ppm): 7,14 (d, 1H, J= 8,3 Hz, H-1), 6,63 (dd, 1H, J= 8,3 y 2,5 Hz, H-2), 6,55 (d, 1H, J= 2,5 Hz, H-4), 5,42-5,28 (m, 4H, H-30, H-29, H-28 y H-27), 4,70 (dd, 1H, J= 7,9 y 7,1 Hz, H-17), 2,82-2,71 (m, 4H, H-29 y H-6), 2,31 (t, 2H, J=7,2 Hz, H-20), 2,36-2,15 (m, 2H, H-16a, H-10), 2,08-2,01 (m, 4H, H-32 y H-26), 1,90-1,83 (m, 2H, H-12a, H-7a), 1,78-1,59 (m, 5H, H-21, H-16b, H-15a y H-12b), 1,58-1,18 (m, 19H, H-35 a 33 y H-25 a H-22, H-15b, H-14, H-11, H-7b), 0,88 (t, 3H, J= 7,0 Hz, HW), 0,83 (s, 3H, H18).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 174,2 (C-19), 153,4 (C-3), 138,2(C-5), 132,5 (C-9), 130,3, 130,1, 128,1, 127,9(C-31, C-30, C-28 y C-27), 126,6 (C-1), 115,3 (C-4), 112,7 (C-2), 82,5 (C-17), 49,8 (C-14), 43,8 (C-10), 42,3 (C-13), 38,6 (C-8) 36,9 (C-12), 34,6 (C-20), 31,6 (C-34), 29,7 (C-33 y H-24), 29,6 (C-23), 29,2 (C-22), 27,6 (C-16), 27,3 (C-32, C-26 y C-7), 25,6 (C-29), 25,2 (C-21), 23,2 (C-35), 14,2 (C-W), 12,12 (C-18).

EM (IE, m/z, %): 532 [M⁺] (100), 255 (35), 133 (29), 55 (48), 41 (67).

***Cis,cis,cis*-9,12,15-octadecantrienoato de (17 β)-estra-1,3,5-(10)-trien-3,17-diol (41k) .**

A una solución de 17 β - estradiol (1g, 3,7 mmoles) en tolueno (300 ml) se agregaron 2,60 g (9,25 mmoles) de ácido *cis,cis,cis*-9,12,15-octadecanoico y 5 g de CRL. La suspensión se agitó a 55°C y 200 r.p.m durante 72 horas y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD y CGL.

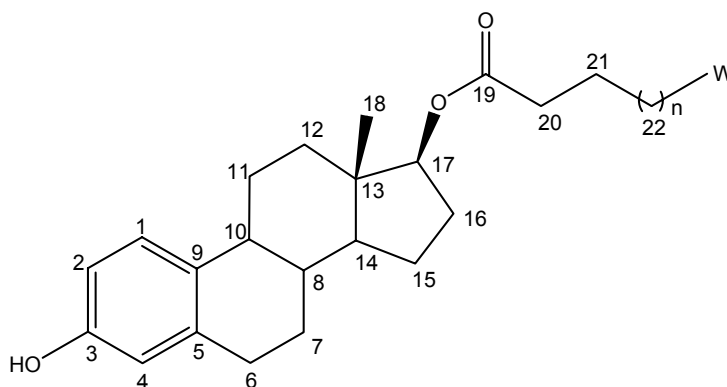
La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con hexano:diclorometano (1:3) condujo a la obtención de 1,51 g de **41k** (77%).

IR (KBr, cm⁻¹): 3433, 3010, 2980, 2846, 1705.

RMN-1H (CDCl₃) δ (ppm): 7,14 (d, 1H, J= 8,3 Hz, H-1), 6,63 (dd, 1H, J= 8,3 y 2,5 Hz, H-2), 6,55 (d, 1H, J= 2,5 Hz, H-4), 5,44-5,28 (m, 6H, H-34, H-33 H-30, H-29, H-28 y H-27), 4,70 (dd, 1H, J= 7,9 y 7,9 Hz, H-17), 2,88-2,70 (m, 6H, H-32, H-29 y H-6), 2,31 (t, 2H, J=7,6 Hz, H-20), 2,36-2,14 (m, 2H, H-16a, H-10), 2,11-1,99 (m, 4H, H-35 y H-26), 1,90-1,82 (m, 2H, H-12a, H-7a), 1,78-1,59 (m, 5H, H-21, H-16b, H-15a y H-12b), 1,58-1,16 (m, 13H, H-25 a H-22, H-15b, H-14, H-11 y H-7b), 0,97 (t, 3H, J= 7,4 Hz, HW), 0,83 (s, 3H, H18).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 174,2 (C-19), 153,4 (C-3), 138,2(C-5), 132,5 (C-9), 132,0, 130,3, 130,1, 128,3, 128,2, 127,9(C-34, C-33, C-31, C-30, C-28, y C-27), 126,3 (C-1), 118,6 (C-4), 112,8 (C-2), 82,5 (C-17), 49,8 (C-14), 43,8 (C-10), 42,3 (C-13), 38,6 (C-8) 36,9 (C-12), 33,8 (C-20), 31,9 (C-34), 29,7 (C-35 y H-30), 29,6 (C-32), 29,4 (C-33 y C-31), 29,2-29,1 (C-22 a C-24), 27,6 (C-16), 27,2 (C-26, C-29 y C-7), 22,7, (C- 35), 14,2 (C-W), 12,1 (C-18).

EM (IE,m/z,%): 530 [M⁺] (100), 255 (35), 133 (29), 55 (48), 41 (67).



***Cis*-9-dioctadecanoato de (17β)-estra-1,3,5-(10)-trien-3,17-diol (43h) .**

Síntesis química¹

A una solución de 17β- estradiol (10 g, 37 mmoles) en piridina (41 ml) se agregaron 20 g (71,2 mmoles) de cloruro de *cis*-9-octadecanoilo y 20 ml de piridina. La solución se agitó a temperatura ambiente durante una noche. De esta manera se obtiene un sólido al cual se agregaron 500 ml de una solución de HCl al 10%. Luego se realizaron extracciones sucesivas con éter etílico (8*100 ml). Posteriormente se realizaron lavados con NaHCO₃ hasta pH 8-9. Finalmente se lavó con agua destilada hasta pH 5-6, se secó la fase orgánica con Na₂SO₄ y se evaporó obteniéndose 22 g de una mezcla oleosa. El producto **42h** fue aislado desde la mezcla de productos por cromatografía en columna y elución con hexano:diclorometano (1:3). Rendimiento: 16,9 g de **43h** (57%).

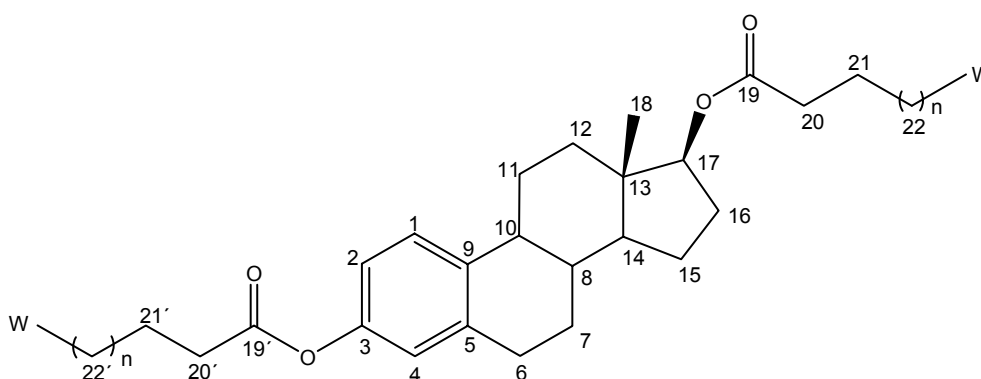
IR (KBr, cm⁻¹): 3007, 2990, 2835, 1735, 1702.

RMN-1H (CDCl₃) δ (ppm): 7,27 (d,1H, J= 8,5 Hz, H-1), 6,82 (dd, 1H, J= 8,5 y 2,5 Hz, H-2), 6,78 (d, 1H, J= 2,5 H-4), 5,39-5,30 (m, 4H, H-27, H-27', H-28' y H-28), 4,70 (dd, 1H, J= 7,9 y 7,9 Hz, H-17), 2,82 (m, 2H, H-6), 2,31 (t, 2H, J=7,6 Hz, H-20 y H-20'), 2,34-2,17

(m, 2H, H-16a, H-10), 2,10-1,95 (m, 8H, H-26 y H-29), 1,92-1,81 (m, 2H, H-12a, H-7a), 1,80-1,70 (m, 1H, H-15a), 1,67-1,59 (m, 6H, H-21', H-21, H-12b y H-16b), 1,58-1,15 (m, 4,55H, H-35' y H-35 a H-30' y H-30, H-25' y H-25 a H-22' y H-22, H-15b, H-14, H-11 y H-7b), 0,88 (t, 6H, J= 6,9 Hz, HW), 0,83 (s, 3H, H18).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 173,9 (C-19), 172,5 (C-19'), 148,5 (C-3), 138,1(C-5), 137,7 (C-9), 130,0, 129,9 (C-28', C-28), 129,7, 129,6 (C-27'-C-27), 126,3 (C-1), 121,4 (C-4), 118,6 (C-2), 82,5 (C-17), 49,8 (C-14), 44,0 (C-10), 43,0 (C-13), 38,2 (C-8) 36,9 (C-12), 34,6 (C-20), 34,4 (C-20'), 29,8, 29,7 (C-34', C-34), 29,6, 29,5, 29,4, 29,3 29,2, 29,1 (C-24', C-24, C-23', C-23, C22' y C-22), 27,6 (C-16), 27,3, 27,2 (C-26', C-26 y C-7), 25,2, 25,1 (C-21' y C-21), 25,0 (C-29), 21,1 (C-35), 14,1 (C-W), 12,1 (C-18).

EM (IE,m/z,%): 535 (25), 255 (100), 159 (74), 55 (43), 41 (29).



Hidrólisis quimioselectiva¹ del producto 43h

A 500 mg (0,32 mmoles) de se agregaron 20 ml de una solución saturada de carbonato de sodio. La solución se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Luego se realizaron extracciones sucesivas con éter etílico (8*100 ml). Posteriormente se realizaron lavados con agua destilada hasta pH 5-6, se secó la fase orgánica con Na₂SO₄ y se evaporó obteniéndose 22 g de una mezcla oleosa. El producto **41h** fue aislado desde la mezcla de productos por cromatografía en columna y elución con hexano:diclorometano (1:3). Rendimiento: 156 mg de **41h** (91%).

Síntesis enzimática

A una solución de 17β- estradiol (1g, 3,7 mmoles) y 9,80 g (34,7 mmoles) de ácido *cis*-9-octadecanoico se agregaron 5 g de CRL. La suspensión se agitó a 55°C y 200 r.p.m durante 72 horas y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD y CGL.

La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con hexano:diclorometano (1:3) condujo a la obtención de 2,82 g de **43h** (92%). Los datos espectroscópicos obtenidos fueron coincidentes con aquellos correspondientes al producto sintetizado químicamente.

Alcoholisis enzimática del producto 43h

A una solución de **43h** (500 mg, 0,62 mmoles) en 10 ml de alcohol etílico absoluto se agregaron 2,5 g de CAL B. La suspensión se agitó a 55°C y 200 r.p.m durante 48 horas y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD y CGL.

La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con hexano:diclorometano (1:3) condujo a la obtención de 316 mg de **41h** (95%). Los datos espectroscópicos obtenidos fueron coincidentes con aquellos correspondientes al producto sintetizado por acilación enzimática.

8.2.3 Preparación enzimática quimioselectiva de N-(hidroxial)-quilacrilamidas

N-(2-hidroxietyl)-acrilamida (46a)

A una solución de BHT (3% p/p) en diisopropiléter (70 ml) se agregaron 1 g de CAL B y acrilato de etilo (0,5 ml, 5 mmol) y 2-amino-1-etanol (0,3 ml, 5 mmol). La solución se agitó a 200 r.p.m y 30°C y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD. Luego de 24 hs la enzima fue filtrada y lavada con acetona (2*15 ml). Finalmente el solvente fue evaporado obteniéndose 485 mg (93%) de **46a**.

RMN-1H (CDCl₃) δ (ppm): 6,31 (dd, 1H, J= 16,9 y 1,4 Hz, H-2), 6,19 (br, 1H, NH), 6,11 (dd, 1H, J= 16,9 y 10,3 Hz, H-3a), 5,68 (dd, 1H, J = 10,3 y 1,4 Hz, H-3b), 3,78 (t, 2H, J= 5,8 Hz, H-W), 3,52 (dd, 2H, J = 5,8 y 5,3 Hz, H-4), 2,27 (br, 1H, OH).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 173,6 (C-1), 130,5 (C-2), 126,9 (C-3), 62,4 (C-W), 42,5 (C-4).

EM (IE,m/z,%): 115 [M⁺] (7), 97 (14), 84 (38), 74 (20), 56 (42), 42 (100).

N-(3-hidroxi-propil)-acrilamida (46b)

A una solución de BHT (3% p/p) en diisopropiléter (70 ml) se agregaron 1 g de CAL B y acrilato de etilo (0,5 ml, 5 mmol) y 3-amino-1-propanol (0,35 ml, 5 mmol). La solución se

agitó a 200 r.p.m y 30°C y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD. Luego de 24 hs la enzima fue filtrada y lavada con acetona (2*15 ml). Finalmente el solvente fue evaporado obteniéndose 515 mg (89%) de **46b**.

RMN-1H (CDCl₃) δ (ppm): 6,39 (br,1H, NH), 6,29 (dd, 1H, J= 17,0 y 1,4 Hz, H-2), 6,13 (dd, 1H, J= 17,0 y 10,3 Hz, H-3a), 5,66 (dd, 1H, J = 10,3 y 1,4 Hz, H-3b), 3,66 (t, 2H, J= 5,5 Hz, H-W), 3,50 (t, 2H, J = 5,5 Hz, H-4), 2,04 (br, 1H, OH), 1,73 (dt, J= 5,5 y 5,5 Hz, H-5).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 169,7 (C-1), 130,4 (C-2), 126,9 (C-3), 59,4 (C-W), 38,0 (C-4), 32,1 (C-5).

EM (IE,m/z,%): 129 [M⁺] (5), 112 (3), 100 (7), 84 (20), 74 (21), 55 (49), 44 (100).

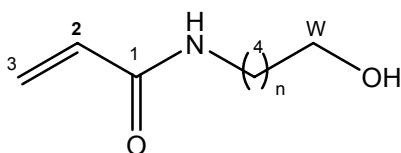
N-(2-hidroxibutil)-acrilamida (**46c**)

A una solución de BHT (3% p/p) en diisopropiléter (70 ml) se agregaron 1 g de CAL B y acrilato de etilo (0,5 ml, 5 mmol) y 4-amino-1-butanol (0,45 ml, 5 mmol). La solución se agitó a 200 r.p.m y 30°C y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD. Luego de 24 hs la enzima fue filtrada y lavada con acetona (2*15 ml). Finalmente el solvente fue evaporado obteniéndose 605 mg (94%) de **46c**.

RMN-1H (CDCl₃) δ (ppm): 6,27 (dd, 1H, J= 17,1 y 1,5 Hz, H-2), 6,08 (dd, 1H, J= 17,1 y 10,3 Hz, H-3a), 5,82 (br,1H, NH) 5,64 (dd, 1H, J = 10,3 y 1,5 Hz, H-3b), 3,70 (t, 2H, J= 5,9 Hz, H-W), 3,50 (t, 2H, J = 5,9 Hz, H-4), 1,79-1,55 (m, 5H, OH, H-6 y H-5).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 169,5 (C-1), 130,9 (C-2), 126,4 (C-3), 52,4 (C-W), 39,7 (C-4), 32,1 (C-5), 26,2 (C-6).

EM (IE,m/z,%): 143 [M⁺] (6), 84 (68), 70 (22), 55 (100), 42 (77).



N-(2-amino-2-metil-1-hidroxipropil)-acrilamida (**46e**)

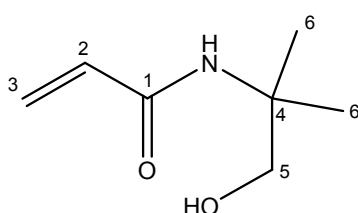
A una solución de BHT (3% p/p) en diisopropiléter (60 ml) se agregaron 1 g de CAL B y acrilato de etilo (0,5 ml, 5 mmol) y 2-amino-2-metil-1-propanol (0,45 ml, 5 mmol). La

solución se agitó a 200 r.p.m y 30°C y el progreso de la reacción fue monitoreado por CCD. Luego de 24 hs la enzima fue filtrada y lavada con acetona (2*15 ml). Finalmente el solvente fue evaporado obteniéndose 685 mg (96%) de **46e**.

RMN-1H (CDCl₃) δ (ppm): 6,26 (dd, 1H, J= 16,91 y 1,6 Hz, H-2), 6,08 (dd, 1H, J= 16,9 y 10,8 Hz, H-3a), 5,78 (br, 1H, NH) 5,64 (dd, 1H, J = 10,38 y 1,6 Hz, H-3b), 3,61 (s, 2H, H-5), 2,9 (br, 1H, OH) 1,33 (s, 6H, H-6).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 168,6 (C-1), 131,0 (C-2), 127,2 (C-3), 70,0 (C-5), 42,5 (C-4), 25,3 (C-6).

EM (IE,m/z,%): 143 [M⁺] (1), 84 (13), 72 (42), 58 (100), 41 (53).



8.2.4. Síntesis de poliacrilamidas modificadas hidrofobicamente

Procedimiento general para las reacciones enzimáticas de esterificación, transesterificación y aminólisis

A una solución de acrilato de etilo (9,1 mmoles) en acetonitrilo (2 ml) se agregaron 467 mg de CAL B y una cantidad variable de etanolamina (relación etanolamina/acrilato de etilo de 0,05 a 5) obteniéndose siete compuestos diferentes. La suspensión resultante se agitó a 200 rpm y 25 °C de temperatura. El curso de la reacción, determinado por espectrometría de ¹H-RMN, se continuó hasta lograr la mayor conversión posible del monómero en la poliacrilamida correspondiente. La identidad de los compuestos se determinó por espectroscopía de IR y espectrometrías de masa UV-MALDI y de resonancia magnética unidimensional (de ¹H y ¹³C) y bidimensional (COSY, HSQC y HMBC).

Compuesto 47

1 ml de acrilato de etilo (9,1 mmoles) en 2 ml de acetonitrilo y 27 µl de etanolamina (0,45 mmoles) reaccionaron en presencia de 467 mg de CAL B. La solución se agitó a 200

r.p.m y 25°C y el progreso de la reacción fue monitoreado por ^1H -RMN. Luego de seis días la enzima fue filtrada y lavada con dioxano (4*10 ml). El exceso de acrilato de acrilato que no reaccionó fue arrastrado con una corriente de nitrógeno sobre una solución saturada de KMnO_4 , una vez eliminado el monómero se evaporó el solvente obteniéndose 26 mg de **47**.

IR (KBr, cm^{-1}): 3398, 2931, 2874, 1731, 1647.

RMN- ^1H (NaOD) δ (ppm): 3,82-3,45 (m, H-1, H-3', H-4', H-3, H-4, H-5, H-6, H-10 y H-11), 3,40-3,18 (m, H-8), 2,87-2,63, 2,48-2,25 (m., H-7), 1,18 (t, J = 7,0 Hz, H-2).

RMN- ^{13}C (NaOD) δ (ppm): 186,6, 182,3, 179,1 ($-\underline{\text{C}}\text{OOH}$), 169,3, 162,8 ($-\underline{\text{C}}\text{OONH}$), 74,6-72,5 (C-5, C-4', C-1), 63,6-60,7 (C-11), 59,7 (C-4), 55,1-45,2 (C-10, C-5, C-3', C-3), 44,7-37,2 (C-7, C-6), 36,1-27,2 (C-8), 19,8-19,6 (C-2).

EM (UV-MALDI): 981(M_n), 897 (M_w).

Compuesto 48

1 ml de acrilato de etilo (9,1 mmoles) en 2 ml de acetonitrilo y 55 μl de etanolamina (0,90 mmoles) reaccionaron en presencia de 467 mg de CAL B. La solución se agitó a 200 r.p.m y 25°C y el progreso de la reacción fue monitoreado por ^1H -RMN. Luego de seis días la enzima fue filtrada y lavada con dioxano (4*10 ml). El exceso de acrilato de acrilato que no reaccionó fue arrastrado con una corriente de nitrógeno sobre una solución saturada de KMnO_4 , una vez eliminado el monómero se evaporó el solvente obteniéndose 58 mg de **48**.

IR (KBr, cm^{-1}): 3410, 2967, 2859, 1731, 1648, 1604.

RMN- ^1H (DMSO d_6) δ (ppm): 4,08 (m, H-12), 3,80-3,00 (m, H-1, H-3, H-4, H-5, H-6, H-10 y H-11, H-8), 2,94-2,34 (m., H-7), 1,18 (m, H-13), 1,04 (t, J = 7,0 Hz, H-2).

RMN- ^{13}C (NaOD) δ (ppm): 176,6-167,6 ($-\underline{\text{C}}\text{OOR}$), 66,3 (C-5 y C-1), 62,8 (C-12), 60,2-58,0 (C-11, C-4), 56,2-48,3 (C-10, C-5 y C-3), 44,7-37,2 (C-7, C-6), 34,1-27,6 (C-8), 19,6 (C-2), 14,0 (C-13).

EM (UV-MALDI): 1231(M_n), 1140 (M_w).

Compuesto 49

1 ml de acrilato de etilo (9,1 mmoles) en 2 ml de acetonitrilo y 140 μl de etanolamina (2,20 mmoles) reaccionaron en presencia de 467 mg de CAL B. La solución se agitó a 200

r.p.m y 25°C y el progreso de la reacción fue monitoreado por ^1H -RMN. Luego de seis días la enzima fue filtrada y lavada con dioxano (4*10 ml). El exceso de acrilato de acrilato que no reaccionó fue arrastrado con una corriente de nitrógeno sobre una solución saturada de KMnO_4 , una vez eliminado el monómero se evaporó el solvente obteniéndose 245 mg de **49**.

IR (KBr, cm^{-1}): 3395, 2960, 2869, 1734, 1640.

RMN- ^1H ($\text{DMSO } d_6$) δ (ppm): 4,10 (m, H-12), 3,73-3,20, 3,16-2,99 (m., H-1, H-3, H-4, H-5, H-6, H-10 y H-11, H-8), 2,97-2,05 (m, H-7), 1,18 (m, H-13), 1,04 (t, $J = 6,9$ Hz, H-2).

RMN- ^{13}C (NaOD) δ (ppm): 177,3-166,6 ($-\underline{\text{C}}\text{OOR}$), 65,4 (C-5 y C-1), 63,0 (C-12), 61,2-58,4 (C-11, C-4), 57,2-48,9 (C-10, C-5 y C-3), 45,9-36,8 (C-7, C-6), 34,6-27,6 (C-8), 19,1 (C-2), 14,3 (C-13).

EM (UV-MALDI): 1694(M_n), 1626 (M_w).

Compuesto 50

1 ml de acrilato de etilo (9,1 mmoles) en 2 ml de acetonitrilo y 280 μl de etanolamina (4,5 mmoles) reaccionaron en presencia de 467 mg de CAL B. La solución se agitó a 200 r.p.m y 25°C y el progreso de la reacción fue monitoreado por ^1H -RMN. Luego de 48 hs la enzima fue filtrada y lavada con dioxano (4*10 ml), se evaporó el solvente, se suspendió la mezcla en agua y se agregó por último se evaporó el solvente obteniéndose 0,74 mg de **50**.

IR (KBr, cm^{-1}): 3390, 2990, 2880, 1732, 1629.

RMN- ^1H (CD_3OD) δ (ppm): 4,16 (m, H-12), 3,97-3,18 (m., H-3, H-4, H-5, H-6, H-10 y H-11, H-8), 3,05-2,30 (m, H-7), 1,20 (m, H-13).

RMN- ^{13}C (NaOD) δ (ppm): 181,0-170,6 ($-\underline{\text{C}}\text{OOR}$), 69,4 (C-5 y C-1), 64,8-57,5 (C-12, C-11 y C-4), 54,9-50,5 (C-10, C-5, C-3', C-3), 48,2-42,7 (C-7, C-6), 38,1-28,3 (C-8), 19,6 (C-2), 16,1 (C-13).

EM (UV-MALDI): 1956 (M_n), 1883 (M_w).

Compuesto 51

1 ml de acrilato de etilo (9,1 mmoles) en 2 ml de acetonitrilo y 560 μl de etanolamina (9,1 mmoles) reaccionaron en presencia de 467 mg de CAL B.). La solución se agitó a 200 r.p.m y 25°C y el progreso de la reacción fue monitoreado por ^1H -RMN. Luego de 48 hs la

enzima fue filtrada y lavada con dioxano (4*10 ml), por último se evaporó el solvente obteniéndose 1,47 g de **51**.

IR (KBr, cm^{-1}): 3420, 2970, 2850, 1733, 1635, 1602.

RMN- ^1H (CD_3OD) δ (ppm): 4,11 (m, H-12), 3,95-3,06 (m., H-1, H-3, H-4, H-5, H-6, H-10 y H-11, H-8), 3,12-2,40 (m, H-7), 1,26 (m, H-13), 1,19 (t, $J = 6,9$ Hz, H-2).

RMN- ^{13}C (NaOD) δ (ppm): 176,5-170,6 ($-\text{COOR}$), 60,7 (C-11), 60,0-59,3 (C-12 y C-4), 51,6-50,4, 49,1-48,3, 47,6-45,1 (C-10, C-5 y C-3), 44,4-44,2, 44,0-43,2, 42,5-42,2 (C-7, C-6), 37,5-27,5 (C-8), 16,1 (C-13).

EM (UV-MALDI): 851 (M_n), 801 (M_w).

Compuesto 52

1 ml de acrilato de etilo (9,1 mmoles) en 2 ml de acetonitrilo y 560 μl de etanolamina (22,8 mmoles) reaccionaron en presencia de 467 mg de CAL B. La solución se agitó a 200 r.p.m y 25°C y el progreso de la reacción fue monitoreado por ^1H -RMN. Luego de 48 hs la enzima fue filtrada y lavada con dioxano (4*10 ml), se evaporó el solvente y se agregó al crudo, con agitación, una solución saturada de ácido oxálico (20 ml), una vez que se formó el oxalato de etanolamina, se filtró la sal formada y se evaporó el agua. El exceso de ácido oxálico fue eliminado por el agregado de alcohol isopropílico (3 x 15 ml). En este medio se precipita el producto y el ácido oxálico queda en solución. Finalmente, por filtración se separaron 1,47 g del producto **52**.

IR (KBr, cm^{-1}): 3420, 2970, 2850, 1733, 1635, 1602.

RMN- ^1H (D_2O) δ (ppm): 4,25 (H-11), 3,85-3,63 (H-10 y H-4), 3,62-3,32 (H-9), 3,47-3,14 (H-8 y H-6), 3,12-2,54 (H-5), 3,00-2,45 (H-7 y H-3)), 1,14 (H-12).

RMN- ^{13}C (NaOD) δ (ppm): 173,1-167,2, (C-13), 63,2 (C-10) 60,7-60,0 (C-10), 59,9-58,3 (C-4), 57,3-56,6 (C-3), 50,2-49,9 (C-9 y C-5), 44,3-42,1 (C-8, C-6), 33,1-31,7 (C-7), 17,7 (C-12).

EM (UV-MALDI): 554 (M_n), 491 (M_w).

Compuesto 53

1 ml de acrilato de etilo (9,1 mmoles) en 2 ml de acetonitrilo y 1,38 ml de etanolamina (45.5 mmoles) reaccionaron en presencia de 467 mg de CAL B.). La solución se agitó a 200 r.p.m y 25°C y el progreso de la reacción fue monitoreado por ^1H -RMN. Luego de 48 hs la enzima fue filtrada y lavada con dioxano (4*10 ml), se evaporó el solvente y se

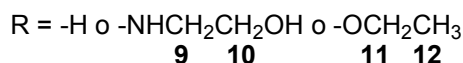
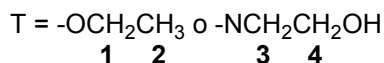
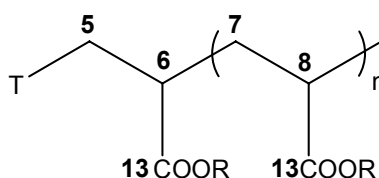
agregó al crudo, con agitación, una solución saturada de ácido oxálico (20 ml), una vez que se formó el oxalato de etanolamina, se filtró la sal formada y se evaporó el agua. El exceso de ácido oxálico fue eliminado por el agregado de alcohol isopropílico (3 x 15 ml). En este medio se precipita el producto y el ácido oxálico queda en solución. Finalmente, por filtración se separaron 1,47 g de **53** (100% de rendimiento).

IR (KBr, cm^{-1}): 3400, 2985, 2895, 1720, 1706, 1670.

RMN-1H (CD_3OD) δ (ppm): 4,30 (H-11), 3,92-3,64 (H-10 y H-4), 3,63-3,30 (H-9), 3,48-3,14 (H-8 y H-6), 3,15-2,54 (H-5), 3,00-2,41 (H-7, H-3), 1,20 (H-12)

RMN- ^{13}C (NaOD) δ (ppm): 173,1-164,2 (C-13), 65,1 (C-11), 60,8-60,3 (C-10), 60,4-56,2 (C-4), 56,1-51,6 (C-3), 50,5-48,3 (C-9 y C5), 44,4-42,2 (C-8, C-6), 37,5-27,5 (C-7), 16,1 (C-12).

EM (UV-MALDI): 537 (M_n), 448 (M_w).



Síntesis química de poliacrilato de etilo (101)

A una solución de azoisobutironitrilo (AIBN) (365 mg, 2,3 mmoles) en THF (5 ml), se le agregaron 5 ml (45 mmoles) de acrilato de etilo. La solución resultante se agitó a 30°C durante una hora. La reacción se detuvo agregando una mezcla de agua/metanol (2:1). El precipitado obtenido fue lavado con dos porciones de 20 ml de agua destilada y resuspendido en diclorometano (20 ml). A la solución se agregó sulfato de sodio, luego se filtro y finalmente se evaporó el solvente obteniéndose 2,5 g de producto.

RMN-1H (CDCl_3) δ (ppm) = 4,08 (-OCH₂CH₃), 2,28 (-CH-), 2,00-1,52 (-CH₂-), 1,22(-OCH₂CH₃).

RMN- ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) = 174,4 (-COO), 60,4 (-OCH₂CH₃), 41,6-40,6(-CH-), 36,7-33,5 (-CH₂-), 14,1 (-OCH₂CH₃).

8.3. Biotransformaciones catalizadas por células enteras

8.3.1. Condiciones generales para las reducciones catalizadas por *Mucor rouxii*

La biomasa (2 g) obtenida de cultivos en distintas etapas de crecimiento, fresca o liofilizada fue suspendida en agua o mezclas de solvente orgánico o bien en solvente orgánico solo (volumen total de solvente 5 ml. Las esporas fueron resuspendidas en 2 ml de agua estéril, previo al agregado del solvente orgánico. Los sustratos fueron agregados a estos sistemas (0.12 mmoles para los ensayos estándar) e incubados a 30° y 200 rpm durante los tiempos indicados. Se terminó la reacción por centrifugación a 10000 rpm y, según el caso, se separó el sobrenadante o se extrajeron las fases acuosas con acetato de etilo. Los extractos fueron analizados por CGL para la determinación del rendimiento (Carbowax 20M, condiciones de corrida: 1' a 80°C, 2°/min hasta 200°C) y la pureza enantiomérica (Chiraldex G-TA, condiciones de corrida: 80°C isotérmica, split 1:200). La configuración absoluta de los productos se determinó mediante la medición de su poder rotatorio y comparación con datos bibliográficos (productos **55** a **56**), en el caso que esta información no existía la configuración absoluta fue obtenida indirectamente por medición del poder rotatorio del ácido 2-hidroxi-glutárico obtenido de la hidólisis del producto correspondiente (**55f**). La identidad del producto **55f** se determinó por FT/IR, EM, RMN-¹H y RMN-¹³C.

8.3.2. Preparación de sustratos

Debido a que los α -cetoésteres utilizados como sustratos en las reducciones no son comerciales, fue necesario prepararlos a partir de sus ácidos correspondientes.

2-Oxoglutarato de di-metilo (54a).

A una solución de ácido α -cetoglutárico (200 mg, 1,4 mmoles) en metanol (5 ml), se le agregaron 230 mg de CAL. La suspensión resultante se agitó a 200 rpm y 30°C durante una noche. La reacción se detuvo filtrando la enzima. Por evaporación del solvente, se obtuvieron 179 mg de **54a** (94%).

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 3,88 (s, 3H, -COCOOCH₃), 3,68 (s, 3H, -CH₂COOCH₃), 3,17 (t, 2H, -CH₂CH₂COO-), 2,68 (t, 2H, -CH₂CH₂COO-).

2-Oxoglutarato de di-etilo (54b).

A una solución de ácido α -cetoglutarico (200 mg, 1,4 mmoles) en etanol (5 ml), se le agregaron 230 mg de CAL. La suspensión resultante se agitó a 200 rpm y 30°C durante una noche. La reacción se detuvo filtrando la enzima. Por evaporación del solvente, se obtuvieron 198 mg de **54b** (98%).

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4,33 (q, 2H, -COCOOCH₂CH₃), 4,14 (q, 2H, -CH₂COOCH₂CH₃), 3,15 (t, 2H, -CH₂CH₂ COCOO-), 2,66 (t, 2H, -CH₂CH₂ COO-), 1,37 (t, 3H, -COCOOCH₂CH₃), 1,26 (t, 3H, -COCOOCH₂CH₃).

2-Oxoglutarato de di-n-propilo (54c).

A una solución de ácido α -cetoglutarico (200 mg, 1,4 mmoles) en 1-propanol (5 ml), se le agregaron 230 mg de CAL. La suspensión resultante se agitó a 200 rpm y 30°C durante una noche. La reacción se detuvo filtrando la enzima. Por evaporación del solvente, se obtuvieron 228 mg de **54c** (99%).

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4,22 (t, 2H, -COCOOCH₂), 4,04 (t, 2H, -CH₂COOCH₂), 3,16 (t, 2H, -CH₂CH₂ COCOO-), 2,67 (t, 2H, -CH₂CH₂ COO-), 1,76 (dd, 2H, -COCOOCH₂CH₂), 1,64 (dd, 2H, -CH₂COOCH₂CH₂), 0,98 (t, 3H, -COCOOCH₂CH₂CH₃), 0,93 (t, 3H, -COCOOCH₂CH₂CH₃).

2-Oxoglutarato de di-isopropilo (54d).

A una solución de ácido α -cetoglutarico (200 mg, 1,4 mmoles) en 2-propanol (5 ml), se le agregaron 230 mg de CAL. La suspensión resultante se agitó a 200 rpm y 30°C durante una noche. La reacción se detuvo filtrando la enzima. Por evaporación del solvente, se obtuvieron 228mg de **54d** (99%).

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 5,12 (q, 1H, -COCOOCH(CH₃)₂), 4,98 (q, 2H, -CH₂COOCH(CH₃)₂), 3,11 (t, 2H, -CH₂CH₂ COCOO-), 2,60 (t, 2H, -CH₂CH₂ COO-), 1,32 (d, 6H, -COCOOCH(CH₃)₃), 1,21 (d, 6H, -CH₂COOCH(CH₃)₃).

2-Oxoglutarato de di-n-butilo (54e).

A una solución de ácido α -cetoglutarico (200 mg, 1,4 mmoles) en 1-butanol (5 ml), se le agregaron 230 mg de CAL. La suspensión resultante se agitó a 200 rpm y 30°C durante

una noche. La reacción se detuvo filtrando la enzima. Por evaporación del solvente, se obtuvieron 248 mg de **54e** (96%).

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm) = 4,26 (t, 2H, -COCOOCH₂), 4,14 (t, 2H, -CH₂COOCH₂), 3,15 (t, 2H, -CH₂CH₂ COCOO-), 2,66 (t, 2H, -CH₂CH₂ COO-), 1,74 (m, 4H, -COCOOCH₂CH₂CH₂ y -CH₂COOCH₂CH₂CH₂), 1,30 (m, 4H, -CCOOCH₂CH₂CH₂ y -CH₂COOCH₂CH₂CH₂) 0,94 (t, 3H, -COCOOCH₂CH₂CH₂CH₃), 0,92 (t, 3H, -COCOOCH₂CH₂CH₂CH₃).

2-Oxoglutarato de di-isobutilo (54f).

A una solución de ácido α-cetoglutarico (200 mg, 1,4 mmoles) en 2-butanol (5 ml), se le agregaron 230 mg de CAL. La suspensión resultante se agitó a 200 rpm y 30°C durante una noche. La reacción se detuvo filtrando la enzima. Por evaporación del solvente, se obtuvieron 243 mg de **54f** (94%).

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4,12 (q, 1H, -COCOOCH₂CH(CH₃)₂), 3,89 (q, 2H, -CH₂COOCH₂CH(CH₃)₂), 3,16 (t, 2H, -CH₂CH₂ COCOO-), 2,68 (t, 2H, -CH₂CH₂ COO-), 2,05 (m, 2H, -COCOOCH₂CH(CH₃)₃), 1,91 (m, 1H, CH₂COOCH₂CH(CH₃)₃), 0,98 (d, 6H, -COCOOCH₂CH(CH₃)₃), 0,93 (d, 6H, -CH₂COOCH₂CH(CH₃)₃).

8.3.3. Preparación de compuestos mediante reducciones.

8.3.3.1. Uso de cultivos frescos de *Mucor rouxii*

(S)-2-Hidroxiglutarato de di-metilo (55a).

A 2 g de *Mucor rouxii* fresco se le agregaron 5 ml de hexano y 20 μl de 2-oxoglutarato de di-metilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 100%; (S): ee = 95%. El producto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo:hexano 1:4) para la posterior determinación de su rotación óptica específica.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4,25 (dd, 1H, -CHOH-), 3,80 (s, 3H, -CH(OH)COOCH₃), 3,68 (s, 3H, -CH₂COOCH₃), 2,49 (dd, 2H, -CH₂CH₂ CHOHC(O)O-), 2,09-2,22 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOHC(O)O-), 1,80-1,90 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOHC(O)O-).

[α]_D²⁵ (c=0,38, MeOH) = -5,2° (lit.⁵ [α]_D²⁵ (c=0,22, MeOH) = -4,5°).

(S)-2-Hidroxiglutarato de di-etilo (55b).

A 2 g de *Mucor rouxii* fresco se le agregaron 5 ml de hexano y 24 μ l de 2-oxoglutarato de di-etilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 100%; (S): ee = 98%. El producto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo:hexano 1:4) para la posterior determinación de su rotación óptica específica.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4,25 (dd, 1H, -CHOH-), 4,22 (q, 2H, -CH(OH)COOCH₂), 4,13 (q, 2H, -CH₂COOCH₂), 2,49 (dd, 2H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 2,09-2,30 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOH COO-), 1,80-2,30 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOH COO-), 1,28 (t, 3H, -CH(OH)COOCH₂CH₃), 1,27 (t, 3H, -CH₂COOCH₂CH₃).

$[\alpha]_D^{25}$ (c=0,45, MeOH) = -4,1° (lit.⁵ $[\alpha]_D^{25}$ (c=0,47, MeOH) = -4,9°).

(S)-2-Hidroxiglutarato de di-n-propilo (55c).

A 2 g de *Mucor rouxii* fresco se le agregaron 5 ml de hexano y 28 μ l de 2-oxoglutarato de di-n-propilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 100%; (S): ee = 98%. El producto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo:hexano 1:4) para la posterior determinación de su rotación óptica específica.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4,15 (dd, 1H, -CHOH-), 4,05 (t, 3H, -CH(OH)COOCH₂), 4,04 (t, 3H, -CH₂COOCH₂), 2,52 (dd, 2H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 2,10-2,28 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOH COO-), 1,81-1,97 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOH COO-), 1,67 (m, 4H, -CH(OH)COOCH₂CH₂ y -CH₂COOCH₂CH₂), 0,94 (t, 3H, CH(OH)COOCH₂CH₂CH₃), 0,92 (t, 3H, -CH₂COOCH₂CH₂CH₃).

$[\alpha]_D^{25}$ (c=0,38, MeOH) = -5,2° (lit.⁵ $[\alpha]_D^{25}$ (c=0,22, MeOH) = -4,5°).

(S)-2-Hidroxiglutarato de di-isopropilo (55d).

A 2 g de *Mucor rouxii* fresco se le agregaron 5 ml de hexano y 28 μ l de 2-oxoglutarato de di-isopropilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 98%; (S): ee = 98%. El producto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo:hexano 1:4) para la posterior determinación de su rotación óptica específica.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 5,10 (m, 1H, (CH₃)₂CH₂OCOCHOH-), 5,02 (m, 1H, (CH₃)₂CHOCOCH₂-), 4,17 (dd, 1H, -CHOH-), 2,88 (s_a, 1H, OH), 2,48 (dd, 2H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 2,07-2,24 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 1,81-1,99 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 1,29 (d, 6H, -CHOHCOOCH(CH₃)₂), 1,24 (d, 6H, -COOCH(CH₃)₂).

[α]_D²⁰ (c=1,4, MeOH) = -3.7° (lit.⁵ [α]_D²⁰ (c=1,4, MeOH) = -3.7°).

(S)-2-Hidroxioglutarato de di-n-butilo (55e).

A 2 g de *Mucor rouxii* fresco se le agregaron 5 ml de hexano y 32 μl de 2-oxoglutarato de di-n-butilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 48%; (S): ee = 98%. El producto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo:hexano 1:4) para la posterior determinación de su rotación óptica específica.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4,20 (dd, 1H, -CHOH-), 4,16 (t, 3H, -CH(OH)COOCH₂), 4,04 (t, 3H, -CH₂COOCH₂), 2,48 (dd, 2H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 2,05-2,23 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 1,81-1,99 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 1,67 (m, 4H, -CH(OH)COOCH₂CH₂CH₂ y -CH₂COOCH₂CH₂CH₂), 1,35 (m, 4H, -CH(OH)COOCH₂CH₂CH₂ y -CH₂COOCH₂CH₂CH₂), 0,94 (t, 3H, CHOHCOOCH₂CH₂CH₂CH₃), 0,93 (t, 3H, -CH₂COOCH₂CH₂CH₂CH₃).

[α]_D²⁵ (c=0,76, MeOH) = -4,6° (lit.⁵ [α]_D²⁵ (c=0,76, MeOH) = -2,2°).

(S)-2-Hidroxioglutarato de di-isobutilo (55f).

A 2 g de *Mucor rouxii* fresco se le agregaron 5 ml de hexano y 32 μl de 2-oxoglutarato de di-isobutilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 26%; (S): ee = 95%. El producto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo:hexano 1:4) para la posterior determinación de su rotación óptica específica.

RMN-¹H (CDCl₃) δ(ppm): 4,23 (dd, 1H, -CHO-), 3,97(m, 2H, (CH₃)₂CHCH₂OCOCHOH-), 3,87 (m, 1H, (CH₃)₂CHCH₂OCOCH₂-), 2,88 (s_a, 1H, OH), 2,45 (dd, 2H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 2,07-2,24 (m, 5H, -CH₂CH₂CHOHCOO-, -CHOHCOOCH₂CH(CH₃)₂ y COOCH₂CH(CH₃)₂), 1,81-1,99 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 1,95 (m, 1H, -CHOHCOOCH₂CH(CH₃)₂ y -COOCH₂CH(CH₃)₂), 0,94 (d, 6H, -CHOHCOOCH₂CH(CH₃)₂), 0,93 (d, 6H, -COOCH₂CH(CH₃)₂).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 174,8 (-CH₂CO-), 173,2 (-CHOHCO-), 71,9 (-CHOH-), 70,6 (-CHOHCOOCH₂CH (CH₃)₂), 69,6 (-COOCH₂CH (CH₃)₂), 30,6 (-OCOCH₂CH₂CHOHCOO-), 29,9 (-CH₂CHOHCOO-), 27,7 (-CHOHCOOCH₂CH(CH₃)₂), 19,0 (-CHOHCOOCH₂CH(CH₃)₂), 18,9 (-COOCH₂CH(CH₃)₂).

EM (IE, m/z, %) : 259[M+·](1), 245 (4), 187 (41), 103 (59), 59 (100).

[α]_D²⁰ (c=0,68, MeOH) = -5,2°.

(2S)-hidroxi-4-fenilbutanoato de etilo (55g)

A 2 g de *Mucor rouxii* fresco se le agregaron 5 ml de hexano y 27 μl de 2-oxo-4-fenilbutanoato de etilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 96%; (S): ee = 91%. El producto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo:hexano 1:4) para la posterior determinación de su rotación óptica específica.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 7,35-7,10 (m, 5H, Hs aromáticos), 4,20 (q, 2H, -COOCH₂CH₃), 4,17 (m, 1H, -CH(OH)-), 2,93 (s, 1H, OH), 2,77 (t, 2H, PhCH₂CH₂CH(OH)COO-), 2,17-1,89 (m, 2H, PhCH₂CH₂CH(OH)COO-), 1,28 (t, 3H, -COOCH₂CH₃).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 175,8 (CO), 142,3, 128,7, 128,0, 125,5 (C aromáticos), 69,5 (-CHOH-), 60,9 (-COOCH₂CH₃), 34,8 (-CH₂CH₂CHOH COO-), 32,6 (-CH₂CH₂CHOH COO-), 14,0 (-COOCH₂CH₃).

EM (IE, m/z, %) : 208[M+·](4), 190 [M⁺ - H₂O](6), 163 [M⁺ - OCH₂CH₃](49), 145 (69), 91 (100).

[α]_D²⁰ (c=1,1, CHCl₃) = + 19,4 ° (lit. [α]_D²⁴ (c=1,1, CHCl₃) = + 21,6 °)

8.3.3.2. Uso de cultivos frescos de *Mucor rouxii*

(S)-4-Metiloxycarbonil-γ-butirolactona (56a).

865 mg de *Mucor rouxii* liofilizado se resuspendieron en 2 ml de agua estéril. A la suspensión resultante se le agregaron 5 ml de hexano y 20 μl de 2-oxoglutarato de dimetilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL):

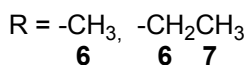
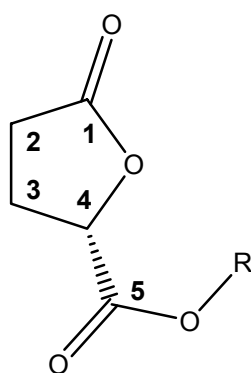
88%; ee = 97%. El producto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo:hexano 1:4) para la posterior determinación de su rotación óptica específica.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 5,00 (m, 1H, H-4), 3,80 (s, 3H, H-6), 2,62 (m, 2H,H-2), 2,29 (m, 2H,H-3).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 177,4 (C-1), 169,9 (C-5), 76,2 (C-4), 64,5 (C-6), 28,5 (C-3), 27,4 (C-2).

EM (IE, m/z, %) : 144[M+](1), 130 (20), 114 (30), 55 (100)).

[α]_D²⁰ (c=1,08 , MeOH) = + 14,9° (lit.¹ [α]_D²⁵ (c=0,65 , MeOH) = + 15,8°).



(S)-4-Etiloxycarbonil-γ-butirolactona (56b).

865 mg de *Mucor rouxii* liofilizado se resuspendieron en 2 ml de agua estéril. A la suspensión resultante se le agregaron 5 ml de hexano y 24 μl de 2-oxoglutarato de etilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 100%; ee = 97%. El producto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo:hexano 1:4) para la posterior determinación de su rotación óptica específica.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 5,02 (m, 1H, H-4), 4,28 (q, 2H, H-6), 2,61 (m, 2H,H-2), 2,32 (m, 2H,H-3), 1,33 (t, 3H, H-7).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 176,28 (C-1), 170,85 (C-5), 75,87 (C-4), 61,45 (C-6), 27,34 (C-3), 26,05 (C-2), 13,99 (C-7).

EM (IE, m/z, %) : 158[M+](1), , 143 (4), 129 (15), 113 [M+ - OCH₂CH₃] (9), 97 (18), 83 (26), 73 (50), 55 (100)).

[α]_D²⁰ (c=0,6 , EtOH) = + 14,6° (lit.² [α]_D²⁵ (c=0,6 , EtOH) = + 15,1°)

(S)-2-Hidroxi-glutarato de di-n-propilo (55c).

2 g de *Mucor rouxii* fresco se resuspendieron en 2 ml de agua estéril. A la suspensión resultante se le agregaron 5 ml de hexano y 28 μ l de 2-oxoglutarato de di-n-propilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 100%; (S): ee = 98%. El producto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo:hexano 1:4) para la posterior determinación de su rotación óptica específica.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4,15 (dd, 1H, -CHOH-), 4,05 (t, 3H, -CH(OH)COOCH₂), 4,04 (t, 3H, -CH₂COOCH₂), 2,52 (dd, 2H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 2,10-2,28 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 1,81-1,97 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 1,67 (m, 4H, -CH(OH)COOCH₂CH₂ y -CH₂COOCH₂CH₂), 0,94 (t, 3H, CH(OH)COOCH₂CH₂CH₃), 0,92 (t, 3H, -CH₂COOCH₂CH₂CH₃).

$[\alpha]_D^{25}$ (c=0,38, MeOH) = -5,2° (lit.⁵ $[\alpha]_D^{25}$ (c=0,22, MeOH) = -4,5°).

(S)-2-Hidroxi-glutarato de di-isopropilo (55d).

2 g de *Mucor rouxii* fresco se resuspendieron en 2 ml de agua estéril. A la suspensión resultante se le agregaron 5 ml de hexano y 28 μ l de 2-oxoglutarato de di-isopropilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 100%; (S): ee = 98%. El producto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo:hexano 1:4) para la posterior determinación de su rotación óptica específica.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 5,10 (m, 1H, (CH₃)₂CHOCOCHOH-), 5,02 (m, 1H, (CH₃)₂CHOCOCH₂-), 4,17 (dd, 1H, -CHOH-), 2,88 (s_a, 1H, OH), 2,48 (dd, 2H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 2,07-2,24 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 1,81-1,99 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 1,29 (d, 6H, -CHOHCOOCH(CH₃)₂), 1,24 (d, 6H, -COOCH(CH₃)₂).

$[\alpha]_D^{20}$ (c=1,4, MeOH) = -3.5° (lit.⁵ $[\alpha]_D^{20}$ (c=1,4, MeOH) = -3.7°).

(S)-2-Hidroxi-glutarato de di-n-butilo (55e).

2 g de *Mucor rouxii* fresco se resuspendieron en 2 ml de agua estéril. A la suspensión resultante se le agregaron 5 ml de hexano y 32 μ l de 2-oxoglutarato de di-n-butilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 35%; (S): ee = 98%. El producto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo:hexano 1:4) para la posterior determinación de su rotación óptica específica.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4,20 (dd, 1H, -CHOH-), 4,16 (t, 3H, -CH(OH)COOCH₂), 4,04 (t, 3H, -CH₂COOCH₂), 2,48 (dd, 2H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 2,05-2,23 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOH COO-), 1,81-1,99 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOH COO-), 1,67 (m, 4H, -CH(OH)COOCH₂CH₂CH₂ y -CH₂COOCH₂CH₂CH₂), 1,35 (m, 4H, -CH(OH)COOCH₂CH₂CH₂ y -CH₂COOCH₂CH₂CH₂) 0,94 (t, 3H, CHOHCOOCH₂CH₂CH₂CH₃), 0,93 (t, 3H, -CH₂COOCH₂CH₂CH₂CH₃).

[α]_D²⁵ (c=0,76, MeOH) = -4,9° (lit.⁵ [α]_D²⁵ (c=0,76, MeOH) = -2,2°).

(S)-2-Hidroxi-glutarato de di-isobutilo (55f).

2 g de *Mucor rouxii* fresco se resuspendieron en 2 ml de agua estéril. A la suspensión resultante se le agregaron 5 ml de hexano y 32 μl de 2-oxoglutarato de di-isobutilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 14%; (S): ee = 95%. El producto se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo:hexano 1:4) para la posterior determinación de su rotación óptica específica.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4,23 (dd, 1H, -CHO-), 3,97 (m, 2H, (CH₃)₂CHCH₂OCOCHOH-), 3,87 (m, 1H, (CH₃)₂CHCH₂OCOCH₂-), 2,88 (sa, 1H, OH), 2,45 (dd, 2H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 2,07-2,24 (m, 5H, -CH₂CH₂CHOHCOO-, -CHOHCOOCH₂CH(CH₃)₂ y COOCH₂CH(CH₃)₂), 1,81-1,99 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOH COO-), 1,95 (m, 2H, -CHOHCOOCH₂CH(CH₃)₂ y -COOCH₂CH(CH₃)₂), 0,94 (d, 6H, -CHOHCOOCH₂CH(CH₃)₂), 0,93 (d, 6H, -COOCH₂CH(CH₃)₂).

RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 174,8 (-CH₂CO-), 173,2 (-CHOHCO-), 71,9 (-CHOH-), 70,6 (-CHOHCOOCH₂CH(CH₃)₂), 69,6 (-COOCH₂CH(CH₃)₂), 30,6 (-OCOCH₂CH₂CHOHCOO-), 29,9 (-CH₂CHOH COO-), 27,7 (-CHOHCOOCH₂CH(CH₃)₂), 19,0 (-CHOHCOOCH₂CH(CH₃)₂), 18,9 (-COOCH₂CH(CH₃)₂).

EM (IE, m/z, %): 259[M+1](1), 245 (4), 187 (41), 103 (59), 59 (100).

[α]_D²⁰ (c=0,68, MeOH) = -5,3°.

8.3.4. Hidrólisis enzimática de los productos 55d y 55f

A una solución de los productos **55d** o **55f** (1 mmol) en buffer fosfato pH 0.7 (16 ml), se agregaron 300mg de CAL B. El progreso de la reacción fue monitoreado por CGL. Cuando el éster fue convertido en el ácido 2-hidroxi-glutárico, la solución fue acidificada hasta pH = 1 con una solución de ácido clorhídrico 2N (20 ml) y extraída éter etílico (4*25 ml). Las fracciones orgánicas fueron reunidas y secadas con sulfato de sodio anhidro, se evaporó el solvente. El residuo blanco así obtenido fue purificado por cromatografía de

columna con una fase móvil de acetato de etilo : metanol (95:5), recuperándose finalmente 120 mg (81% de rendimiento) y 115 mg (77% de rendimiento) de ácido 2-hidroxi-glutárico en el caso de **55d** y **55f** respectivamente.

RMN-¹H (D₂O) δ (ppm): 4,23 (dd, 1H,-CHHOH-), 2,99(s_a, 1H, OH), 2,40 (dd, 2H,-CH2CH₂CHOHCOO-), 2,01-2,12 (m, 1H,-CH₂CH2CHOHCOO-), 1,76-1,89 (m, 1H,-CH₂CH2CHOHCOO-).

La rotación específica obtenida para el ácido obtenido a partir de los productos **55d** y **55f** fue: $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (c=1,0 , Agua) = -2,0° y $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (c=0,90 , Agua) = -1,85° (lit.^{xx} $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ (c=1,4 , MeOH) = -1,1°) respectivamente.

8.3.5. Condiciones generales para las reducciones catalizadas por levadura de panadería

2g de levadura de panadería fue suspendida en hexano (5 ml). Los sustratos fueron agregados a este sistema (0.12 mmoles para los ensayos estándar) e incubados a 30° y 200 rpm durante los tiempos indicados. Se terminó la reacción por centrifugación a 10000 rpm y, según el caso, se separó el sobrenadante o se extrajeron las fases acuosas con acetato de etilo. Los extractos fueron analizados por CGL para la determinación del rendimiento (Carbowax 20M, condiciones de corrida: 1' a 80°C, 2°/min hasta 200°C). La identidad de los productos de reacción se determinó por RMN-¹H.

4-Hidroxi-butanoato de etilo (57a)

A 2 g de levadura de panadería se le agregaron 5 ml de hexano y 20 μl de 2-oxoglutarato de di-metilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 100%.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 3,82 (q, 3H, -CH₂COOCH3), 3,71 (t, 2H,-CH2OH), 2,46 (t, 2H,-CH2COO-), 1,86 (m, 2H,HOCH₂CH2CH₂COO-).

4-Hidroxi-butanoato de etilo (57b)

A 2 g de levadura de panadería se le agregaron 5 ml de hexano y 24 μl de 2-oxoglutarato de di-etilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 100%.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4,14 (q, 2H, -CH₂COOCH₂), 3,70 (t, 2H, -CH₂OH), 2,44 (t, 2H, --CH₂COO-), 1,89 (m, 2H, HOCH₂CH₂CH₂COO-), 1,26 (t, 3H, -COOCH₂CH₃).

4-Hidroxibutanoato de n-propilo (57c)

A 2 g de levadura de panadería se le agregaron 5 ml de hexano y 24 μl de 2-oxoglutarato de di-n-propilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 97%.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4,09 (t, 2H, -CH₂COOCH₂), 3,70 (t, 2H, -CH₂OH), 2,45 (t, 2H, --CH₂COO-), 1,89 (m, 2H, HOCH₂CH₂CH₂COO-), 1,63 (m, 2H, -COOCH₂CH₂CH₃), 0,94 (t, 3H, -COOCH₂CH₂CH₃).

4-Hidroxibutanoato de isopropilo (57d)

A 2 g de levadura de panadería se le agregaron 5 ml de hexano y 24 μl de 2-oxoglutarato de di-isopropilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 97%.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 5,02 (m, 1H, (CH₃)₂CHOOC-), 3,69 (t, 2H, -CH₂OH), 2,40 (t, 2H, -CH₂COO-), 2,07-2,24 (m, 1H, -CH₂CH₂CHOHCOO-), 1,88 (m, 2H, HOCH₂CH₂CH₂COO), 1,24 (d, 6H, -COOCH(CH₃)₂).

4-Hidroxibutanoato de n-butilo (57e)

A 2 g de levadura de panadería se le agregaron 5 ml de hexano y 32 μl de 2-oxoglutarato de di-n-butilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 31%.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 4,11 (t, 2H, -CH₂COOCH₂), 3,69 (t, 2H, -CH₂OH), 2,48 (t, 2H, --CH₂COO-), 1,89 (m, 2H, HOCH₂CH₂CH₂COO-), 1,67 (m, 2H, -COOCH₂CH₂CH₂CH₃), 1,33 (m, 2H, -COOCH₂CH₂CH₂CH₃), 0,91 (t, 3H, -COOCH₂CH₂CH₂CH₃).

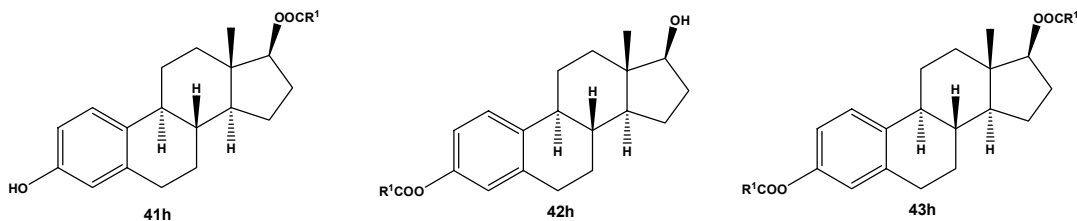
4-Hidroxibutanoato de isobutilo (57f)

A 2 g de levadura de panadería se le agregaron 5 ml de hexano y 32 μ l de 2-oxoglutarato de di-isobutilo (0.12 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. Rendimiento (CGL): 22%.

RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 3,96 (m, 1H, (CH₃)₂CHCHOCOCOHOH-), 3,72 (t, 2H, -CH₂OH), 2,49 (t, 2H, --CH₂ COO-), 1,93 (m, 1H, -CHOHCOOCH₂CH (CH₃)₂), 1,01 (t, 6H, -COO CH₂CH(CH₃)₂).

Bibliografía

1. S. Mellon-Nussbaum, L. Ponticorvo, F. Schatz, R.B. Hochberg, J. Biol. Chem., 257 (1982) 5678.
-



Capítulo IV, Página 74, Esquema 4.1, los núcleos asignados sobre el compuesto **40**, como 9 y 10, deberían ser 10 y 9 respectivamente.

Capítulo IV, Página 75, Renglón 32, donde dice: "... metilo 20...", debería decir "... "metilo 18..."

Capítulo IV, Página 76, Tabla 4.1., donde dice: "H-20", debería decir "H-18".

Capítulo V, Página 94, Renglón 9, donde dice: "En el año 1998 Garner y Kusukawa...", debería decir "En el año 1998 Zhang, Garner y Kusukawa..."

Capítulo V, Página 105, Renglón 19, donde dice: "...Además el costo de acrilato...", debería decir "...Además el costo del acrilato..."

Capítulo VI, Página 109, Esquema 6.2, donde dice: PVA **88** ó PAA **89**, debería decir PVA **87** ó PAA **88**.

Capítulo VI, Página 129, Renglón 13, donde dice: "... $m/z = [(M_B - 1) + M_H$ (o M_{Na}) + ($xM_{A'}$ + $yM_{B'}$) + M'_H] Da... ", debería decir "... $m/z = [(M_{\text{etanolamina}} - 1) + M_H$ (o M_{Na}) + ($xM_{A'}$ + $yM_{B'}$) + M'_H] Da..."

Capítulo VI, Página 129, Renglón 14, donde dice: " $(M_B - 1) = m/z$ de B-1...", debería decir " $(M_{\text{etanolamina}} - 1) = m/z$ de etanolamina -1..."

Capítulo VI, Página 130, Renglón 9, donde dice: "... $T = (M_B - 1.01 \text{ Da}) = \text{masa de } (B - 1.01) \text{ Da...}$ ", debería decir "... $T = (M_{\text{etanolamina}} - 1.01 \text{ Da}) = \text{masa de } (\text{etanolamina} - 1.01) \text{ Da...}$ ".

Capítulo VI, Página 132, renglón 16, donde dice: "... $[893.9 - T$ (o T') + M_H (o M_{Na}) + ($x'M_{A'}$ + $y'M_{B'}$ + $z'M_{C'}$) + M'_H + M_{DMSO}] Da ≈ 0 Da...", debería decir "... $[893.9 - T$ (o T') - M_H (o M_{Na}) - ($x'M_{A'}$ + $y'M_{B'}$ + $z'M_{C'}$) - M'_H - M_{DMSO}] Da ≈ 0 Da

Capítulo VI, Página 136, Renglón 3, donde dice: "...Tabla 6.6...", debería decir "...Tabla 6.5..."

Capítulo VI, Página 161, Esquema 6.22, donde dice: "...enzimáticas...", debería decir "...enzimáticos...".

Capítulo VIII, Página 193, Renglón 4, donde dice: "... tranesterificación...", debería decir "...transesterificación...".

Capítulo VIII, Página 196, Renglón 24, donde dice: "... H-3...", debería decir "...H-4...".

Capítulo VIII, Páginas 196-205, donde dice: "...C-9..." y "...C-10...", debería decir "...C-10..." y "...H-9...", respectivamente.

Capítulo VIII, Páginas 196-205, donde dice: "...H-10..." debería decir "...H-9...".

Capítulo VIII, Página 203, Renglón 20, donde dice: "...Posteriormente realizaron, debería decir "...Posteriormente se realizaron...".

Capítulo VIII, Página 204, Renglón 20, donde dice: "...Posteriormente realizaron, debería decir "...Posteriormente se realizaron...".

Capítulo VIII, Página 212, Renglones 1-4, donde dice: "... 4,08 (-OCH₂CH₃), 2,28 (-CH-), 2,00-1,52 (-CH₂-), 1,22 (-OCH₂CH₃." y "... 60,4 (-OCH₂CH₃), 41,6-40,6 (-CH-), 36,7-33,5 (-CH₂-), 14,1 (-OCH₂CH₃), debería decir "... 4,08 (-OCH₂CH₃), 2,28 (-CH-), 2,00-1,52 (-CH₂-), 1,22 (-OCH₂CH₃." y "... 60,4 (-OCH₂CH₃), 41,6-40,6 (-CH-), 36,7-33,5 (-CH₂-), 14,1 (-OCH₂CH₃).