

Tesis Doctoral

Biocatálisis aplicada a reacciones de esteroides, terpenos y dicetonas y a la síntesis de poliamidoaminas lineales

Monsalve, Leandro Nicolás

2009

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

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

Cita tipo APA:

Monsalve, Leandro Nicolás. (2009). Biocatálisis aplicada a reacciones de esteroides, terpenos y dicetonas y a la síntesis de poliamidoaminas lineales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Monsalve, Leandro Nicolás. "Biocatálisis aplicada a reacciones de esteroides, terpenos y dicetonas y a la síntesis de poliamidoaminas lineales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**BIDCATÁLISIS APLICADA A REACCIONES DE ESTEROIDES,
TERPENOS Y DICETONAS Y A LA SÍNTESIS DE
POLIAMIDAMINAS LINEALES**

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

Leandro Nicolás Monsalve

Directora de tesis: Alicia Baldessari
Consejera de estudios: Alicia Baldessari

Buenos Aires, 2009

ADVERTENCIA

Si bien el desarrollo del trabajo que a continuación se describe ha dado lugar a la proclamación de maldiciones diversas e invocación de conjuros satánicos varios, no existe evidencia fundamentada que pueda vincular a éstos con las eventuales maldiciones que pudieren pesar sobre el lector luego de leer este libro.

No obstante, el autor no se hace responsable por las ocasionales desgracias acaecidas, daño físico, moral o mental que los usuarios de este volumen sufrieren como consecuencia de su lectura; así como de cualquier otro uso que se le diere al presente ejemplar.

*A mi primer maestro en la transformación de la materia:
para mi papá por sus fuegos y sus asados,
que ahora también son míos...*

“-¡que diga unas palabras!-”

PREFACIO

Finalmente el momento ha llegado (de decir unas palabras, claro).

En primer lugar deseo agradecer a Alicia por haberme dado este espacio. Su guía y su confianza en mí tuvieron que ver con todo este trabajo.

Agradezco también a las instituciones: a la Universidad de Buenos Aires, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica por su apoyo financiero y brindar sus instalaciones para el desarrollo de mi trabajo.

No puedo olvidarme de mis compañeros de cada día: personal de apoyo, no docentes, alumnos, becarios e investigadores que se desempeñan en el Departamento de Química Orgánica y en UMYMFOR. No voy a dar nombres, discúlpenme. Primero porque mi memoria falla y no quiero excluir injustamente a nadie de la lista. Segundo porque cuando la gente mira las tesis un tiempo después lee los nombres en los agradecimientos y comienza a hacer cuentas: “uh, ¡mirá! Ésta era compañera de tal otra. La verdad que la hacía más viejita pero no, ¡se ve que los años la pasaron por arriba!”. En este sentido las mujeres me lo van a agradecer. No obstante, no creo que la gratitud sea indeleble. La concibo más bien como un bien que muere y se renueva con cada día, con cada gesto y cada palabra.

Doy gracias a mi familia más cercana, en especial a Gloria, Viviana y Darío, por tolerarme varios desvaríos, muchos de ellos asociados a mi tesis, y por ayudar en la corrección de este libro.

Desde que decidí embarcarme en esta pequeña aventura vi su culminación como un destino tan inexorable como la muerte. Tal vez la comparación suene amarga, pero muestra que hubo vida más atrás. Vida de personas que dedican su tiempo a buscar nuevas maneras de transformar la materia. Personas que respiran esta disciplina que se hace llamar ciencia, pero que he aprendido a apreciar como un arte, sobre todo en este último tiempo. Personas de las que he aprendido mucho.

Y si ha llegado el momento de esta pequeña muerte, la impronta que quede luego sólo será un pobre reflejo de lo que se ha dejado atrás. Tal vez mañana salga el sol y despertemos, como todos los días: un poco iguales, un poco cambiados, pero nunca los mismos.

Un gran abrazo a los que fueron, y caminaron a mi lado. A ellos los invito hoy a morir conmigo. A quienes les toque leer aunque sea un fragmento de esta tesis, les dejo mi deseo de que sigan celebrando el cambio de la materia y de sus mentes con cada amanecer.

L. N. M.

Buenos Aires, 06 de octubre de 2009.

BIDCATÁLISIS APLICADA A REACCIONES DE ESTEROIDES, TERPENOS Y DICETONAS Y A LA SÍNTESIS DE POLIAMIDAMINAS LINEALES

Leandro N. Monsalve

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires, 2009

Resumen:

En el presente trabajo de tesis se evaluó la aplicación de biocatálisis en la transformación y síntesis de compuestos de muy diversa naturaleza con potencial utilidad para múltiples aplicaciones.

Primeramente se propuso la aplicación de lipasas en la acilación selectiva de varios pregnanos hidroxilados en la posición 20. Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron la preparación de nueve productos novedosos y la inclusión de un paso biocatalítico en la síntesis de 20β -hemisucciniloxi- $5\alpha H$ -pregnan-3-ona, un intermediario en la síntesis de un conjugado esteroide-proteína.

En segundo lugar se estudió la acilación quimioenzimática de quinicina. Este sesquiterpenoide natural ha mostrado interesantes propiedades en cuanto a su actividad biológica. Por otro lado posee una estructura muy compleja y lábil, con lo que su derivatización requiere de varias precauciones. La utilización de lipasas en este caso permitió la preparación de diez derivados, siete de ellos novedosos, de este producto natural.

A continuación se describió la aplicación de células enteras de *Rhodotorula minuta* en la preparación de una serie de α -hidroxicetonas y α -dioles quirales. Estos compuestos son importantes en la preparación de bloques de construcción, auxiliares y catalizadores quirales.

Finalmente se emplearon lipasas en la primera síntesis de poliamidoaminas lineales a partir de acrilato de etilo y *N*-metil-1,3-diaminopropano en un solo paso. En este caso, la capacidad de las lipasas para catalizar tanto reacciones de aminólisis como de adición de Michael permitió la obtención de un material polimérico altamente regular y monodisperso.

Palabras clave: lipasas, *Rhodotorula minuta*, pregnanos, quinicina, α -dicetonas, acrilato de etilo, *N*-metil-1,3-diaminopropano, acilación, desacilación, reducción, aminólisis, adición de Michael.

BIOCATALYSIS APPLIED TO REACTIONS OF STEROIDS, TERPENES AND DIKETONES AND TO THE SYNTHESIS OF LINEAR POLIAMIDAMINES

Leandro N. Monsalve

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires, 2009

Abstract:

In this thesis work we have evaluated the application of biocatalysis to the transformation and synthesis of natural and synthetic compounds of a very different nature, that have the potential to be utilized in multiple applications.

The first step was the application of lipases on the selective acylation of various hydroxylated pregnanes in position 20. The results obtained in this work allowed the preparation of nine novel products and the inclusion of a biocatalytic step in the synthesis of 20 β -hemisucciniloxy-5 α H-pregnane-3-one, an intermediate product in the synthesis of a steroid-protein conjugate.

Secondly, the chemoenzymatic acylation of cnicin was studied. This natural sesquiterpenoid has shown interesting properties regarding its biological activity. On the other hand, its very complex and labile structure requires that its derivation be accomplished following certain precautionary measures. The use of lipases in this case allowed the preparation of ten acyl derivatives of this natural product. Seven of these derivatives are novel.

Following, the description of the application of whole cells of *Rhodotorula minuta* in the preparation of a series of chiral α -hydroxyketones y α -diols was made. These compounds are very important as precursors of chiral building blocks, auxiliaries and catalysts.

Finally, lipases were employed on the first single-step synthesis of linear poliamidoamines from ethyl acrylate and *N*-methyl-1,3-diaminopropane. In this case, the ability of lipases to catalyze aminolysis reactions as well as Michael additions, allowed to obtain a highly regular and monodisperse polymeric material.

Keywords: lipases, *Rhodotorula minuta*, pregnanes, cnicin, α -diketones, ethyl acrylate, *N*-methyl-1,3-diaminopropane, acylation, deacylation, reduction, aminolysis, Michael addition.

ABREVIATURAS

- a.C.: antes de Cristo
 Ac: acetilo
 AcO: acetato
 AcOEt: acetato de etilo
 AcOiPr: acetato de isopropenilo
 AcOVin: acetato de vinilo
 Ala: alanina
 AM1: *Austin Model 1*
 Asp: ácido aspártico
 ATCC: *American Type Culture Collection*
 BIU: *Batch Interesterefication Units*
 Bn: bencilo
 BzO: benzoato
 CAL A: lipasa de *Candida antactica A*
 CAL B: lipasa de *Candida antactica B*
 CCD: cromatografía en capa delgada
 CGL: cromatografía gas-líquido
 CNT: nanotubos de carbono
 Conv.: conversión
 COSY: *Correlation Spectroscopy*
 CRL: lipasa de *Candida rugosa*
 Da: Dalton
 DCC: *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida
 DEPT: *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*
 DIAD: azodicarboxilato de diisopropilo
 DIPE: éter diisopropílico
 DMAP: 4-dimetilaminopiridina
 EC: *Enzyme Commission*
 ed: exceso diastereomérico
 ee: exceso enantiomérico
 EM-IE: espectrometría de masa por impacto electrónico
 E/S: relación enzima/sustrato
 Et: etilo
 EtO: etóxido
 EtOH: etanol
 FAD: flavín adenin dinucleótido
 FID: detector de ionización por llama
 FMN: flavín mononucleótido
 FT-IR: espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
 GA: ácido genticóico
 Gln: glutamina
 Gly: glicina
 His: histidina
 HMBC: *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
 HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Coherence*
 Ile: isoleucina
 IUBMB: *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*
 LIP: lipasa de *Rhizomucor miehei*
 Me: metilo
 MeOH: metanol
 MIC: concentración inhibitoria mínima
 M_n : peso molecular promedio en número
 M_v : peso molecular promedio en viscosidad
 M_w : peso molecular promedio en peso
 M_z : peso molecular promedio Z
 m/z : relación masa/carga
 NAD⁺: nicotinamida adenín dinucleótido
 NADH: nicotinamida adenín dinucleótido (forma reducida)
 NADP⁺: nicotinamida adenín dinucleótido fosfato
 NADPH: nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (forma reducida)
 norHo: norharmano
 PCC: clorocromato de piridinio
 PDI: índice de polidispersión
 p.eb.: punto de ebullición
 Pf: punto de fusión
 PLU: *propyl laurate units*
 PPL: lipasa de páncreas porcino
 ppm: partes por millón
 Pro: prolina
 PS-C: lipasa de *Pseudomonas sp.*
 RMN: espectroscopia de resonancia magnética nuclear
 RMN ¹³C: espectroscopia de resonancia magnética nuclear de carbono 13
 RMN ¹H: espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón
 rpm: revoluciones por minuto
 Ser: serina
 t: tiempo
 T: temperatura
 TBS: *terbutil dimetil sililo*
t-Bu: *terbutilo*
 THAP: 2',4',6'-trihidroxiacetofenona
 THF: tetrahidrofurano
 Thr: treonina
 Trp: triptofano
 UV-MALDI-TOF: espectrometría de masa de desorción por láser ultravioleta asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo
 V: volumen

CONTENIDO

PREFACIO	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
ABREVIATURAS	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Catálisis.....	1
1.2. Catálisis y organismos vivos.....	2
1.2.1. Influencia en la historia de la química.....	2
1.2.2. Biocatálisis y biotransformaciones.....	3
1.3. Historia de la biocatálisis.....	3
1.4. Características de los biocatalizadores.....	6
1.4.1. Medio de reacción: biocatálisis en medios no convencionales.....	7
1.4.2. Aumento de velocidad.....	9
1.4.3. Selectividad.....	13
1.4.4. Promiscuidad.....	14
1.5. Clasificación de las enzimas.....	15
1.6. Biocatálisis aplicada.....	16
1.6.1. Fuentes y aplicación de biocatalizadores.....	17
1.6.1.1. Enzimas aisladas.....	17
1.6.1.2. Células enteras.....	18
1.7. Lipasas.....	19
1.7.1. Función.....	19
1.7.2. Fuentes.....	21
1.7.3. Mecanismo.....	21
1.7.4. Estructura.....	22
1.7.5. Selectividad.....	24
1.7.6. Promiscuidad.....	28
1.7.7. Aplicación de lipasas en síntesis de productos de interés industrial: cloruro de lapirio.....	30
1.8. Células enteras en la reducción de compuestos carbonílicos.....	31
1.8.1. Aplicación de células enteras en la síntesis de productos de interés industrial: Trimegestona.....	33
1.9. Conclusión.....	34
Bibliografía.....	36

II. OBJETIVOS	39
II.1. Síntesis enzimática de ésteres de 20-hidroxi-pregnanos	40
II.2. Obtención de derivados acilados de quinicina	41
II.3. Reducción biocatalítica de dicetonas vecinales.....	42
II.4. Síntesis de poliamidoaminas lineales catalizada por lipasas	43
Bibliografía	44
III. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE 20-HIDROXI-PREGNANOS	45
III.1. Introducción	45
III.2. Optimización de las variables experimentales para las reacciones de acilación	50
III.2.1. Reacciones de acetilación enzimática de $3\beta,20\alpha$ -dihidroxi-pregn-5-eno (III-1) y $3\beta,20\beta$ -dihidroxi-pregn-5-eno (III-2)	50
III.2.1.1. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S).....	53
III.2.1.2. Efecto de la relación agente acilante/sustrato.....	54
III.2.1.3. Efecto del tiempo de reacción	55
III.2.1.4. Condiciones óptimas.....	55
III.2.2. Reacción de 3β -acetoxi- 20α -hidroxi-pregn-5-eno (III-3) y 3β -acetoxi- 20β -hidroxi-pregn-5-eno (III-4) con ácido succínico y derivados	56
III.2.2.1. Efecto del solvente de reacción y fuente de la lipasa	60
III.2.2.2. Efecto de la temperatura.....	60
III.2.2.3. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S).....	63
III.2.2.4. Efecto de la relación agente acilante/sustrato.....	64
III.2.2.5. Efecto de la naturaleza del agente acilante: dos pasos en una sola operación.....	65
III.2.2.6. Condiciones óptimas.....	66
III.2.3. Aplicación de la acilación con succinato de dietilo a otros 20-hidroxi-pregnanos	67
III.2.4. Aplicación de la acilación enzimática a la síntesis de 20β -hemisucciniloxi- 5α H-pregnan-3-ona (III-28)	70
III.3. Conclusión	76
Bibliografía	78
IV. OBTENCIÓN DE DERIVADOS ACILADOS DE QUINICINA	81
IV.1. Introducción	81
IV.2. Reacciones de acetilación de quinicina.....	84
IV.2.1. Influencia del biocatalizador	84
IV.2.2. Efecto del solvente	86
IV.2.3. Efecto del agente acilante.....	87

IV.2.4. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S)	89
IV.2.5. Condiciones óptimas	91
IV.3. Alcohólisis e hidrólisis enzimática de quinicina y de sus derivados acilados por vía química	92
IV.3.1. Alcohólisis e hidrólisis enzimática de quinicina	92
IV.3.2. Preparación química de derivados acetilados de quinicina.....	93
IV.3.3. Alcohólisis de derivados acetilados de quinicina.....	97
IV.4. Obtención de derivados acilados de quinicina de cadena media y larga	98
IV.4.1. Efecto de la temperatura y del agente acilante	100
IV.4.2. Efecto de la relación agente acilante/sustrato.....	101
IV.4.3. Condiciones óptimas	102
IV.4.4. Obtención de 4'-caprato de quinicina (IV-9), 4'-miristato de quinicina (IV-10) y 4'-oleato de quinicina (IV-11).....	103
IV.5. Conclusión.....	104
Bibliografía.....	107
V. REDUCCIÓN BIOCATALÍTICA DE DICETONAS VECINALES.....	109
V.1. Introducción.....	109
V.2. Reducción de dicetonas cíclicas	112
V.2.1. Efecto del solvente	112
V.2.2. Efecto de la relación biomasa/sustrato	114
V.2.3. Reducción de enol ésteres de 1,2-ciclohexanodiona.....	116
V.2.4. Reducción de 1,2-cicloalcanodionas sustituidas V-9 y V-10	118
V.2.5. Empleo de cultivo liofilizado	119
V.2.6. Condiciones óptimas.....	120
V.3. Reducción de dicetonas acíclicas.....	120
V.4. Conclusión.....	123
Bibliografía.....	125
VI. SÍNTESIS DE POLIAMIDOAMINAS LINEALES CATALIZADA POR LIPASAS.....	127
VI.1. Introducción.....	127
VI.2. Condiciones modelo	131
VI.3. Caracterización del producto obtenido en las condiciones B	133
VI.3.1. Resonancia magnética nuclear	133
VI.3.2. Curva de titulación, pH y solubilidad	136
VI.3.3. Espectroscopia infrarroja	137
VI.3.4. Espectrometría de masa UV-MALDI-TOF.....	138

VI.3.4.1. Elucidación de grupos terminales	138
VI.3.4.2. Distribución de pesos moleculares	139
VI.3.4.3. Experimentos llevados a cabo con ácido gentísico como matriz.....	140
VI.3.4.4. Experimentos llevados a cabo con norharmano como matriz.....	147
VI.3.5. Aporte de la espectrometría UV-MALDI-TOF en la interpretación del espectro de RMN ¹ H.....	150
VI.4. Estudio de los parámetros de reacción	152
VI.4.1. Efecto del solvente.....	152
VI.4.2. Fuente de la enzima	153
VI.4.3. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S).....	154
VI.4.4. Efecto de la relación agente acilante/sustrato	156
VI.4.5. Efecto del agente acilante.....	157
VI.4.6. Efecto del soporte de la enzima	158
VI.4.7. Efecto del tiempo de reacción.....	159
VI.4.8. Efecto de la temperatura	160
VI.4.9. Efecto de la concentración	160
V.5. Estudio del mecanismo de la reacción	161
V.6. Conclusión	165
Bibliografía	167
VII. PARTE EXPERIMENTAL.....	169
VII.1. Generalidades	169
VII.1.1. Solventes y reactivos	169
VII.1.2. Biocatalizadores.....	169
VII.1.3. Reactores.....	171
VII.1.4. Separaciones.....	172
VII.1.5. Parte analítica	172
VII.2. Síntesis enzimática de ésteres de 20-hidroxi-pregnanos	175
VII.2.1. Procedimiento general para la optimización de condiciones de reacción	175
VII.2.2. Procedimiento general para la preparación enzimática de derivados acetilados de 3 β ,20 α - dihidroxipregn-5-eno (III-1) y 3 β ,20 β -dihidroxipregn-5-eno (III-2) III-3, III-4, III-15 y III-16.....	175
VII.2.3. Procedimiento general para la preparación de los succinatos mixtos III-17 a III-25	176
VII.2.4. Procedimiento de dos pasos en una sola operación para la preparación de III-17	177
VII.2.5. Preparación de ésteres de ácido succínico para la transesterificación enzimática con los 20- hidroxipregnanos III-1 a III-14.....	180
VII.2.6. Experimentos de modelado molecular y docking.....	182
VII.3. Obtención de derivados acilados de quinicina.....	182

<i>VII.3.1. Reacciones de acetilación enzimática de IV-1</i>	182
<i>VII.3.2. Acetilación química de IV-1</i>	184
<i>VII.3.3. Alcohólisis enzimática de IV-3 y IV4</i>	185
<i>VII.3.4. Preparación de derivados acilados de quinicina IV-8 a IV-11</i>	186
<i>VII.3.4.1. Optimización de las condiciones de reacción para obtener IV-8</i>	186
<i>VII.3.4.2. Obtención de IV-8 a IV-11 en escala preparativa</i>	187
<i>VII.3.5. Modelado molecular de quinicina</i>	189
<i>VII.4. Reducción biocatalítica de dicetonas vecinales</i>	190
<i>VII.4.1. Reducción química de las dicetonas V-1, V-11, V-12 y V-13</i>	190
<i>VII.4.2. Síntesis de los enol carboxilatos V-4 y V-5</i>	190
<i>VII.4.3. Procedimiento para la reducción de dicetonas vecinales empleando R. Minuta</i>	191
<i>VII.4.3.1. Análisis de los productos de reacción</i>	191
<i>VII.4.3.2. Aislamiento de los productos</i>	192
<i>VII.5. Síntesis de poliamidoaminas lineales catalizada por lipasas</i>	193
<i>VII.5.1. Condiciones modelo</i>	193
<i>VII.5.2. Optimización de las condiciones experimentales para la obtención de VI-1</i>	194
<i>VII.5.3. Obtención de N-[3-(metilamino)propil]acrilamida (VI-2)</i>	194
<i>VII.5.4. Seguimiento de la reacción por FT-IR</i>	195
Bibliografía.....	196
VIII. CONCLUSIONES FINALES	197

CAPÍTULO I

Introducción

THR 40

GLN 106

SER 105

HIS 224

ASP 187



I. INTRODUCCIÓN

I.1. Catálisis

En una primera aproximación la catálisis puede definirse como la transformación química motivada por sustancias que no se alteran con el curso de la reacción.¹ Todos los catalizadores tienen en común la capacidad de aumentar la velocidad de una reacción química determinada y poder ser recuperados luego de finalizado el proceso en la misma forma en que fueron introducidos al iniciarlo. Esta última propiedad permite que el mismo catalizador, una vez recuperado, pueda ser utilizado de manera efectiva en un nuevo proceso sin ningún tratamiento previo.

Por otro lado, el aumento de la velocidad de una reacción química determinada tiene tres consecuencias importantes:

- Permite el empleo de condiciones de reacción menos agresivas (temperatura, presión, etc.) que aquellas que deberían aplicarse en ausencia del catalizador.
- Reduce el tiempo necesario para que la reacción ocurra. Este hecho no es trivial porque en muchos casos las velocidades de reacción alcanzadas en presencia de un catalizador pueden ser cientos de miles de millones mayores o aún más que en su ausencia. En no pocas ocasiones el empleo de catalizadores posibilitó la implementación de procesos que de otra manera hubieran sido inalcanzables.
- Hace posible el establecimiento de una *selectividad* entre varias reacciones químicas posibles. Un catalizador determinado puede proveer una ruta con una barrera de activación menor para una reacción en particular, por lo que ésta podrá ocurrir más rápidamente que otras que se desarrollen paralelamente.

Los beneficios alcanzados para la actividad humana en general y para el desarrollo de procesos químicos novedosos en particular debidos a la investigación, desarrollo y aplicación de catalizadores son incontables. Basta con nombrar el proceso Haber² para la obtención de amoníaco o el empleo de los catalizadores de Ziegler-Natta³ para la síntesis a escala industrial de polímeros estereorregulares, entre otros innumerables ejemplos relevantes, para describir la magnitud del impacto que ha tenido el empleo de catalizadores para la síntesis química en la humanidad.

1.2. Catálisis y organismos vivos

En los organismos vivos ocurren una gran variedad de reacciones químicas. La gran mayoría de ellas se encuentra ligada a equilibrios muy complejos que son causa, al menos en parte, del fenómeno que conocemos como vida. Cabe destacar que muchas de estas reacciones químicas no ocurren con la misma velocidad, o simplemente no ocurren, si no existe una participación directa o indirecta de algún organismo vivo en el proceso.

1.2.1. Influencia en la historia de la química

El hecho recién mencionado fue advertido por los químicos en el siglo XVIII, que recurrieron a la corriente filosófica conocida como *vitalismo* para explicar las características distintivas de aquellas sustancias que eran aisladas de los organismos vivos. A la luz de esta corriente, se postulaba que debía existir alguna “fuerza vital” que llevara a cabo la transformación de los compuestos de origen mineral para dar lugar a la formación de compuestos que solamente podían ser aislados de plantas o animales. De acuerdo con esta hipótesis, en 1807 Berzelius (quien también introdujo el concepto de catálisis en química) clasificó a los compuestos como *orgánicos* o *inorgánicos* según cuál fuera su origen, distinguiendo por primera vez entre dos grandes disciplinas: la *Química Inorgánica* y la *Química Orgánica*.

Pocos años más tarde, Wöhler, Kolbe y Berthelot lograron sintetizar compuestos orgánicos a partir de compuestos inorgánicos sin recurrir a los organismos vivos (con excepción de ellos mismos o, tal vez, algún ayudante de laboratorio). Con estos resultados, el pensamiento vitalista sucumbió ante la evidencia experimental y a partir de allí la Química Orgánica dejó de lado las cuestiones relacionadas al origen de la “fuerza vital”. Estos temas serían prontamente abordados en investigaciones en el área de la *Bioquímica*, como se verá más adelante.⁴

1.2.2. Biocatálisis y biotransformaciones

Hoy en día se sabe que en los organismos vivos existe una diversidad de moléculas que juegan el rol de catalizadores. Estas moléculas reciben el nombre de *enzimas*. Este término fue acuñado por Kühne en 1878 para designar a los extractos de levadura con actividad catalítica. La extensa mayoría de las enzimas son proteínas, aunque también existen moléculas de ácido ribonucleico que poseen actividad catalítica.

Estas moléculas de origen biológico con actividad catalítica, aplicadas a alguna reacción sobre algún compuesto en particular, reciben comúnmente el nombre de *biocatalizadores*. Análogamente, se puede definir a la *biocatálisis* como la disciplina que involucra el uso de biocatalizadores en la transformación química de la materia. El compuesto que sufre la transformación en estas condiciones se llama *sustrato*. Es importante señalar que los sustratos empleados en una reacción biocatalítica no son necesariamente aquellos que son transformados por la enzima en las reacciones que forman parte del metabolismo del organismo del cual proviene la misma. Las enzimas utilizadas en biocatálisis pueden emplearse tanto integradas en el organismo vivo (o sea, usar células enteras o tejidos como biocatalizadores) como aisladas de los mismos con mayor o menor grado de pureza.

También existe otro término asociado al uso de biocatalizadores que se conoce como *biotransformación*. Una biotransformación puede definirse como cualquier proceso en el cual un organismo vivo modifica un compuesto químico. Esta expresión tiene una aplicación que excede a la biocatálisis, ya que es empleada con el mismo significado en el campo de la toxicología, farmacología y biorremediaciones. No obstante, es necesario aclarar que ambos biocatálisis y biotransformación no tienen acepción equivalente al referirse al empleo de biocatalizadores con fines de síntesis de algún compuesto de interés, ya que las biotransformaciones no involucran el uso de enzimas aisladas.

1.3. Historia de la biocatálisis

El hombre ha hecho uso de la biocatálisis para su provecho desde tiempos muy remotos. En el período neolítico la introducción de la agricultura y la ganadería hizo posible el establecimiento de las primeras comunidades sedentarias. Estos nuevos hábitos generaban

grandes excedentes de alimentos en época de cosecha de granos o frutos que debían ser conservados para su consumo en otras épocas del año. Del mismo modo, la actividad ganadera generaba leche, un producto alimenticio altamente perecedero. En este contexto se comenzaron a desarrollar los primeros procesos fermentativos sobre granos, frutos, leche, miel, etc., utilizando hongos, levaduras y enzimas digestivas procedentes del cuajo de rumiantes. Inicialmente estos procesos ocurrían de manera accidental, pero poco a poco fueron puestos a punto por el hombre. De esta manera surgieron los primeros ejemplos de biocatálisis aplicada a la producción de nuevos alimentos: vino, cerveza, pan, queso, hidromiel, etc.

No es posible establecer con precisión el momento del nacimiento de estas tecnologías, pero se puede situar entre el 8000 y el 4000 a.C. aproximadamente. Este período, si bien es posterior a la introducción del fuego como herramienta es decididamente anterior a la aparición de los primeros procesos metalúrgicos.⁵

Si bien el hombre siguió produciendo (y consumiendo) estos productos de fermentación desde el neolítico por varios miles de años hasta la actualidad, no fue sino hasta el siglo XVIII, en los albores de la química moderna, que se decidió explorar el fenómeno de la fermentación por sí mismo. No obstante, recién en 1837 Cagniard-Latour, Schwann y Kützing identificaron a las levaduras como responsables de la fermentación. Luego, con las investigaciones de Pasteur, junto con las de Cohn, Koch, Beijerinck y Winogradsky se comenzó a estudiar a los microorganismos de una manera más sistemática dando origen a una nueva disciplina: la *Microbiología*. La caracterización morfológica y funcional de los microorganismos, además del desarrollo de técnicas para su cultivo y aislamiento permitió, entre otras cosas, la realización de fermentaciones con un control mucho más estricto que hasta entonces.

Paralelamente a la fundación de la Microbiología, se comenzaron a dar los primeros pasos en el área de la Bioquímica. En 1833 Payen y Persoz aislaron por primera vez un precipitado obtenido al agregar etanol a un extracto acuoso de malta. Este precipitado podía ser utilizado para llevar a cabo la hidrólisis del almidón y recibió el nombre de *diastasa*. En los años sucesivos, se aislaron distintas fracciones de extractos de orígenes diversos con variada actividad catalítica.

Durante el siglo XX se realizaron grandes avances con relación a las enzimas en el campo de la Bioquímica. Primeramente, se determinó que muchas enzimas eran proteínas. En 1926 Summer logró aislar y cristalizar una proteína con actividad catalítica, la ureasa de poroto gigante (semilla de la planta *Canavalia ensiformis*). La estructura secundaria y terciaria de las enzimas pudo ser determinada en los años siguientes gracias al desarrollo de la espectroscopia de difracción de rayos X y las contribuciones de Pauling. Para la década de 1950 ya se habían aislado y caracterizado cientos de enzimas. En 1960 Hirs, Moore y Stein lograron determinar la secuencia de la ribonucleasa. A partir de entonces se ha contado con un número cada vez mayor de herramientas útiles para una caracterización estructural completa de los biocatalizadores.⁶

Los conocimientos adquiridos en el campo de la Microbiología y la Bioquímica a mediados del siglo XIX contribuyeron rápidamente al desarrollo y optimización de la biocatálisis. Pasteur pudo identificar a los microorganismos responsables de la fermentación alcohólica y la fermentación láctica. Este hecho derivó en una importante mejora en los procesos de producción de bebidas alcohólicas. También hizo económicamente viable la obtención de etanol y metanol a escala industrial mediante procesos fermentativos. El conocimiento de los microorganismos también permitió la producción de otros productos químicos como el ácido L-ascórbico.⁷ El empleo de enzimas aisladas proveyó también alternativas industrialmente viables para la obtención de productos químicos. Por ejemplo, la diastasa aislada por Payen y Persoz pudo ser utilizada en lugar de los ácidos minerales para la obtención de glucosa a partir de almidón.

Durante el siglo XX los progresos de la biocatálisis fueron enormes. Las nociones provenientes de la Microbiología y la Bioquímica fueron aplicadas en el desarrollo de procesos fermentativos para la obtención de, entre otros productos, metabolitos primarios y secundarios, entre los que se encuentran muchos antibióticos que han revolucionado la calidad de vida de la humanidad y se producen a escala industrial en la actualidad. Además, el empleo de microorganismos y enzimas aisladas ha permitido llevar a cabo un sinnúmero de transformaciones sobre sustratos naturales y sintéticos de complejidad muy diversa. Sin embargo, hoy en día algunos aspectos de la biocatálisis no han sido elucidados completamente y la necesidad de progreso de la ciencia y la tecnología presenta nuevos

desafíos en los cuales la biocatálisis puede ser empleada como herramienta para brindar soluciones.

1.4. Características de los biocatalizadores

Los biocatalizadores reúnen todas las características propias de los catalizadores, con las particularidades que surgen como consecuencia de que los mismos se encuentran preparados para desarrollar su actividad en un medio biológico. Si se traza una analogía con las características principales de los catalizadores, desarrollada en la Sección 1.1, se podrá decir que el empleo de biocatalizadores en un determinado proceso tiene tres consecuencias importantes:

- Las condiciones de reacción podrán ser aquellas que garanticen la estabilidad del biocatalizador. Las enzimas pueden emplearse en medio acuoso, solventes orgánicos o fluidos supercríticos siempre que la temperatura de trabajo no produzca su desnaturalización. Asimismo, la presencia de ácidos o bases fuertes, agentes caotrópicos y sustancias con grupos funcionales que puedan reaccionar irreversiblemente con las enzimas no son compatibles.
- La extensa mayoría de las reacciones que catalizan las enzimas, directamente no ocurren si la enzima no está presente y se mantiene el resto de las condiciones. Comparado con el empleo de condiciones distintas (otros reactivos, catalizadores, etc.) esta diferencia puede no ser tan notoria.
- La selectividad de las reacciones biocatalíticas es quizás la característica más sobresaliente de las tres. Las enzimas son moléculas muy complejas que se unen a sus sustratos de una manera bastante específica y catalizan una reacción química determinada. Además, son moléculas quirales, por lo que suele ser posible aplicar biocatalizadores en resolución de mezclas racémicas y reacciones de síntesis asimétrica.

Cada una de estas características tiene sus particularidades que serán desarrolladas conjuntamente a continuación.

1.4.1. Medio de reacción: biocatálisis en medios no convencionales

Si bien los biocatalizadores pueden ser empleados en un rango limitado de condiciones, se ha descubierto que éstas pueden exceder por mucho las condiciones en las que normalmente se desarrollan los organismos vivos (medios acuosos de pH y fuerza iónica controlados, temperatura compatible con el crecimiento de un organismo determinado). El empleo de medios no convencionales en biocatálisis permitió extender enormemente su aplicación.

En 1936 Sym⁸ comenzó a evaluar el desempeño de enzimas hidrolíticas en solventes orgánicos para la síntesis de ésteres sencillos. Las investigaciones en este campo no fueron continuadas hasta que en 1984 Klivanov y colaboradores estudiaron los efectos del empleo de solventes orgánicos en reacciones catalizadas por enzimas aisladas: la estabilidad del biocatalizador y la selectividad de la reacción.⁹

En primer lugar, el uso de solventes orgánicos en reacciones catalizadas por enzimas permitió extender su aplicación a la transformación de sustratos que no son solubles en agua. El hecho de que esta metodología se haya aplicado con éxito no solamente demuestra que las enzimas son capaces de mantener su estabilidad en el medio orgánico, sino que la especificidad de sustrato de un biocatalizador puede ser lo suficientemente amplia como para aceptar sustratos muy distintos a los que son transformados en el medio biológico por el mismo biocatalizador. Una explicación sobre la estabilidad de las enzimas en medio orgánico fue ensayada por Klivanov.¹⁰ Según su hipótesis, el medio acuoso permite que las enzimas sean conformacionalmente lábiles, por lo que se desnaturalizan con la temperatura o en presencia de agentes caotrópicos o solventes orgánicos. En el medio orgánico, en ausencia de agua, las enzimas se vuelven más rígidas, por lo que resultan aún más estables que en medio acuoso. No obstante, se requiere una cantidad de agua mínima unida a la enzima (a la que llamó “agua esencial”) para que exista una movilidad que permita la catálisis. Estudios más recientes en los cuales se realizaron experimentos de dinámica molecular de la lipasa de *Candida antarctica* B (CAL B) en solventes orgánicos parecen confirmar la hipótesis de Klivanov. Estas experiencias *in silico* mostraron una enzima menos flexible en medio orgánico que en medio acuoso, con moléculas de agua formando una red ordenada alrededor de la enzima.¹¹

En segundo lugar, la introducción del medio orgánico hace necesario que la enzima se encuentre en una fase distinta a la que se encuentra el sustrato. Las enzimas en estos casos pueden emplearse en fase líquida dispersa en el medio orgánico formando emulsiones con ayuda de un detergente o bien en fase sólida. En este último caso el biocatalizador puede utilizarse como polvo liofilizado o bien inmovilizado sobre un soporte inerte. Muchas enzimas han sido inmovilizadas por adsorción o covalentemente sobre soportes orgánicos e inorgánicos muy diversos. Las enzimas inmovilizadas han mostrado frecuentemente actividad y estabilidad térmica superior a sus contrapartes libres. Este efecto fue estudiado por Klivanov¹² incluso antes de que él mismo se abocara al estudio de las enzimas en solventes orgánicos. No obstante, la utilización de diversos métodos de inmovilización en la aplicación de algún biocatalizador específico a cada reacción en particular sigue siendo objeto de estudio.¹³ El empleo de enzimas en fase sólida tiene una consecuencia notable: la enzima puede ser separada del medio de reacción por una simple operación mecánica, con lo que se facilita la recuperación del catalizador en una operación por lotes y permite su utilización en forma inmovilizada en un reactor de flujo continuo.

El empleo de enzimas hidrolíticas aisladas en solventes orgánicos merece atención especial, porque estas enzimas, en su ambiente natural, catalizan reacciones de sus sustratos con el agua. En medio orgánico se pueden emplear nucleófilos distintos del agua y llevar a cabo reacciones distintas a la hidrólisis: alcoholisis, aminólisis, tiólisis y acidólisis. Este hecho permite ampliar notablemente los horizontes de la biocatálisis aplicada a la química orgánica de síntesis.

En los últimos años se ha estudiado el uso de otros medios de reacción como los fluidos supercríticos¹⁴ y los líquidos iónicos¹⁵ en biocatálisis. Estos medios están siendo introducidos con el objeto de minimizar el impacto ambiental en este tipo de procesos, aunque los efectos de los mismos sobre la eficiencia y la selectividad también merecen su evaluación.

En cuanto al empleo de células enteras en medios no convencionales, se ha notado que éstas mantienen su estabilidad en un rango de condiciones más limitado que las enzimas aisladas. No obstante, el empleo de sistemas bifásicos, emulsiones y solventes orgánicos en biotransformaciones resulta ventajoso si se considera que:

- El empleo de solventes orgánicos permite mantener concentraciones altas de sustratos y cosustratos en el medio de reacción.
- La elección adecuada de sistemas bifásicos o emulsiones permite regular la concentración de sustratos o productos en la fase en la que se encuentra el biocatalizador, disminuyendo así los efectos negativos que ocurrieren por inhibición o toxicidad.

Asimismo, se han desarrollado métodos de inmovilización para células enteras en diversas matrices, lo que ha contribuido a mejorar la estabilidad de estos biocatalizadores y facilitar su separación del medio de reacción.

1.4.2. Aumento de velocidad

Los catalizadores aceleran el curso de una reacción determinada por medio de una estabilización del estado de transición con respecto al estado fundamental. Este efecto puede atribuirse a interacciones específicas entre el reactivo, o sustrato si se emplea un biocatalizador, y el catalizador. Según Jencks, lo que distingue a la catálisis enzimática de otros procesos catalíticos es la presencia de interacciones del catalizador con el sustrato en sitios alejados al que ocurre la catálisis.¹⁶ Esta hipótesis permite explicar tanto el aumento de velocidad de reacción como la selectividad que se puede alcanzar en las reacciones biocatalíticas. En este contexto, múltiples interacciones con el sustrato maximizan la posibilidad de estabilización de estados de transición si todas ellas están favorecidas en este punto de la reacción.

La catálisis enzimática no suele alterar el equilibrio de una reacción reversible. Dicho en otras palabras, las enzimas tienen la capacidad de aumentar la velocidad de una reacción tanto en un sentido como en el opuesto.

En términos de eficiencia catalítica para la transformación de los sustratos en el medio biológico todas las enzimas producen un cambio en la velocidad de reacción de varios órdenes de magnitud con respecto a aquella en ausencia de catalizadores. En la Tabla 1.1 se muestran algunos ejemplos en donde este factor oscila entre 460000 y $1,4 \times 10^{17}$.

Para tener una idea aproximada de la eficiencia catalítica en el medio biológico, se puede calcular el tiempo de vida media de la orotidina-5'-fosfato, considerando que únicamente

se descompone por descarboxilación. En ausencia de la enzima éste resulta ser mayor a 78 millones de años, mientras que en su presencia es menor a 18 milisegundos. Además, se puede observar que en presencia de la enzima más “lenta” de la tabla, la quimotripsina, el tiempo de vida media de un enlace peptídico hidrolizable por la misma es de apenas 17 segundos.

Tabla I.1. Ejemplos de aceleración de reacciones mediante catálisis enzimática.

Enzima	Constante de velocidad sin enzima k_{no} (s^{-1})	Constante de velocidad con enzima k_{cat} (s^{-1})	Factor de aceleración k_{cat}/k_{no}
Ciclofilina ^a	$2,8 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^4$	$4,6 \times 10^5$
Anhidrasa carbónica ^a	$1,3 \times 10^{-1}$	10^6	$7,7 \times 10^6$
Corismato mutasa ^a	$2,6 \times 10^{-5}$	50	$1,9 \times 10^6$
Quimotripsina ^b	4×10^{-9}	4×10^{-2}	10^7
Triosafosfato isomerasa ^b	6×10^{-7}	2×10^3	3×10^9
Fumarasa ^b	2×10^{-8}	2×10^3	10^{11}
Cetoesteroide isomerasa ^a	$1,7 \times 10^{-7}$	$6,6 \times 10^4$	$3,9 \times 10^{11}$
Carboxipeptidasa A ^a	3×10^{-9}	578	$1,9 \times 10^{11}$
Adenosina desaminasa ^a	$1,8 \times 10^{-10}$	370	$2,1 \times 10^{12}$
Ureasa ^b	3×10^{-10}	3×10^4	10^{14}
Fosfatasa alcalina ^b	10^{-15}	10^2	10^{17}
Orotidina-5'-fosfato descarboxilasa ^a	$2,8 \times 10^{-16}$	39	$1,4 \times 10^{17}$

^a Radizca, A.; Wolfenden, R. *Science*, **1995**, 267, 90-93.

^b Horton, H. R.; Moran, L. A.; Ochs, R. S.; Rawn, J. D.; Scrimgeour, K. G. *Principles of Biochemistry*; Neil Patterson: Englewood Cliffs, NJ, 1993.

Este efecto, que resulta bastante impresionante a la luz de los números que se acaban de mostrar, se puede explicar en base a los mecanismos que gobiernan la catálisis enzimática:

- Desolvatación: siempre que un sustrato en solución penetra la enzima para alcanzar el sitio activo deberá deshacerse de las moléculas de solvente que lo rodean. Esto produce una desestabilización del estado fundamental (Figura I.1), sobre todo si el

sustrato posee grupos polares o cargados ya que la constante dieléctrica en el sitio activo es menor que en solución. La constante dieléctrica en el interior de las proteínas se ha estimado, *in silico*, muy inferior a la del agua y comparable a la del benceno o el dioxano.¹⁷

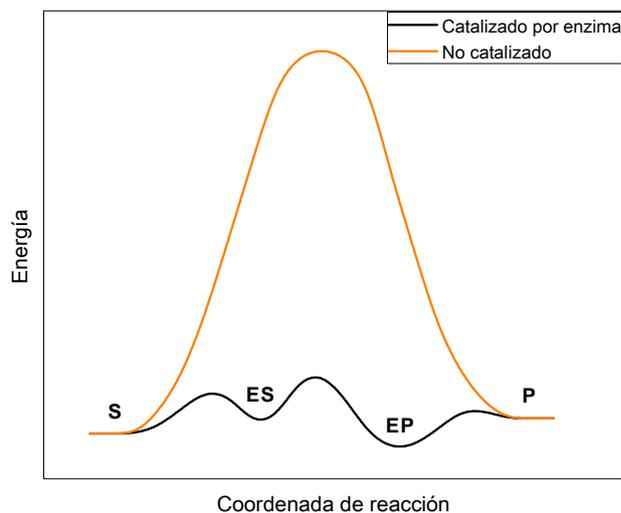


Figura 1.1. Efectos energéticos de la catálisis enzimática. Una reacción que ocurre en un solo paso en ausencia de catalizador tiene al menos tres barreras de activación si existe catálisis enzimática: la desolvatación del sustrato (**S**) y su interacción con el sitio activo para formar el complejo enzima-sustrato (**ES**), la transformación química del mismo para formar el complejo enzima-producto (**EP**) y la liberación del producto (**P**).

- Interacciones específicas: los residuos que interaccionan con el sustrato se encuentran en una posición relativa más o menos fija. La ubicación de residuos polares y cargados proveen una forma de estabilizar distribuciones de carga eléctrica muy específicas, por ejemplo de los estados de transición. Asimismo, hace posible la coexistencia de grupos ácidos y básicos en un mismo entorno, cosa imposible de lograr en solución. También los parámetros de acidez y basicidad de grupos funcionales (como el pKa), tanto de residuos de la enzima como del sustrato en el sitio activo, se ven fuertemente afectados por la distribución espacial que éstos tienen con respecto a los residuos que se encuentran próximos a ellos. Algunos mecanismos de catálisis enzimática también incluyen la formación de intermediarios unidos covalentemente con la enzima o algún cofactor para acelerar un paso de reacción posterior.

- Proximidad: como consecuencia de las interacciones específicas recién descritas, una enzima puede ser capaz de ubicar a dos o más especies reactivas en su sitio activo con una disposición espacial favorable para que se produzca una reacción entre ellos. Este efecto fue ampliamente discutido por Bruice en sus publicaciones a lo largo de más de cuarenta años.¹⁸
- Tensión y distorsión: Koshland sugirió que la conformación de una enzima cuando se une al sustrato no es necesariamente la más estable.¹⁹ Teniendo en cuenta esta hipótesis, la enzima debe unirse al sustrato en un estado conformacionalmente excitado. La relajación conformacional del complejo puede facilitar el paso catalítico debido a una distorsión estructural del sustrato o a una correcta alineación de los grupos funcionales que participan en la catálisis.

Si bien estos mecanismos siguen siendo los motores de la catálisis enzimática cuando ésta se aplica a la transformación de sustratos de diversa índole en medios no convencionales, los incrementos de velocidad no suelen ser tan drásticos. Esta reducción relativa del aumento de la velocidad con respecto a procesos no enzimáticos en solventes orgánicos puede tener varias causas:

- El efecto de la desolvatación del sustrato no es tan pronunciado porque la diferencia entre la constante dieléctrica del medio y la del sitio activo es menor en estos casos.
- Para un sustrato que no es el habitual para la enzima en el medio biológico se espera un menor número de interacciones intermoleculares catalíticamente favorables con el biocatalizador.
- La enzima en el medio orgánico presenta mayores restricciones conformacionales.
- Muchos procedimientos en Química Orgánica de síntesis pueden llevarse a cabo utilizando una combinación adecuada de reactivos, solventes y catalizadores distintos a las enzimas.

A modo de ejemplo, en nuestro laboratorio se han llevado a cabo reacciones de acilación sobre una variedad de sustratos, tanto por vía enzimática como no enzimática.²⁰ Las reacciones en las cuales se emplearon métodos tradicionales, como por ejemplo anhídridos o cloruros de ácido en piridina, alcanzaron sus conversiones máximas a las pocas horas. Las

reacciones en las cuales se emplearon lipasas como catalizadores y ácidos carboxílicos o sus ésteres como donores de acilo se completaron en tiempos variables entre unas pocas horas y cinco días. De estos hechos salta a la vista que el tiempo necesario para llevar a cabo una reacción dada empleando enzimas puede ser comparable a aquél que se precise utilizando una combinación adecuada de reactivos.

1.4.3. *Selectividad*

Esta es la característica en la cual los biocatalizadores presentan su mayor potencial. Selectividad, por ejemplo, es una palabra clave en síntesis orgánica. La posibilidad de discriminar entre grupos funcionales reactivos tiene una gran relevancia a la hora de armar una estrategia para la construcción de moléculas. La síntesis de moléculas complejas puede comprender muchos pasos de síntesis que suelen incluir el empleo de grupos protectores, resoluciones de mezclas racémicas y separaciones de productos secundarios. El uso de biocatalizadores en Química Orgánica de síntesis suele permitir la discriminación entre varios grupos reactivos de una molécula o la reacción selectiva con un componente determinado de alguna mezcla. Esta característica se puede aplicar en la implementación de caminos sintéticos con un número menor de pasos de reacción y mayor eficiencia global comparada con estrategias que no involucren el uso de biocatalizadores.

La palabra selectividad en biocatálisis se emplea en un contexto un poco más amplio que en síntesis orgánica. En esta última disciplina, la *selectividad* se aplica a la capacidad de algún reactivo o catalizador para transformar diferencialmente grupos funcionales distintos o con distinta disposición espacial en un reactivo dado, rindiendo una mezcla de productos siendo uno de ellos mayoritario. En cambio, cuando una reacción lleva a la obtención de un único producto se dice que ésta es *específica* (asociado al término *especificidad*).²¹ En el ámbito de la biocatálisis, la palabra selectividad suele hacer referencia a cualquiera de estas dos situaciones.²²

La selectividad de una reacción puede ser caracterizada según permita discriminar entre grupos con características químicas similares del sustrato (*quimioselectividad*), entre grupos funcionales idénticos en distintas posiciones del sustrato (*regioselectividad*), o entre centros asimétricos, átomos, grupos funcionales o caras proquirales del sustrato (*estereoselectividad*).

Los biocatalizadores muestran frecuentemente un comportamiento regio-, quimio- y estereoselectivo característico en las reacciones que catalizan. Las rutas metabólicas de los organismos vivos presentan múltiples ejemplos de este comportamiento. En particular, las enzimas son catalizadores quirales, con lo cual suelen presentar un comportamiento *enantioselectivo*.

La selectividad de los biocatalizadores puede explicarse en función de las interacciones específicas que tiene una enzima con el sustrato. En algunos casos pueden enunciarse reglas más o menos generales que describen el comportamiento selectivo de un biocatalizador, como la regla de Prelog,²³ que describe la estereoselectividad de las deshidrogenasas en la reducción de compuestos carbonílicos (se describirá en detalle más adelante). Sin embargo, estas reglas no son aplicables a la totalidad de las reacciones catalizadas por un tipo de enzima determinado. La gran diversidad de fuentes (arqueas, bacterias, hongos, levaduras, vegetales, animales) que puede existir para una enzima, junto con la amplia variedad de sustratos que pueden ser empleados en condiciones muy disímiles (distintos solventes, formas de inmovilizar el biocatalizador, etc.) hacen que la selectividad de un biocatalizador sea objeto de estudio para cada reacción en particular.

1.4.4. Promiscuidad

La promiscuidad enzimática se puede definir como la capacidad de una enzima para aceptar varios sustratos estructuralmente no relacionados (promiscuidad de sustrato) o catalizar reacciones distintas a aquellas que catalizan en medio biológico (promiscuidad catalítica). La idea de promiscuidad enzimática fue introducida por Jensen,²⁴ quien sostuvo que la misma tiene origen en la evolución de las enzimas. La hipótesis supone unos pocos ancestros comunes para todas las enzimas. Estos ancestros comunes habrían tenido la capacidad para aceptar muchos sustratos y catalizar varias reacciones. La duplicación del material genético y las mutaciones sucesivas habrían producido la divergencia para la aparición de un número mayor de enzimas con un grado mayor de especialización.

La Tabla 1.2 muestra algunas enzimas que poseen promiscuidad catalítica.

Tabla I.2. Ejemplos de promiscuidad catalítica.

Enzima	Actividad primaria	Actividad promiscua
L-asparaginasa	Amidohidrolasa	Nitrilasa
A-esterasa	Esterasa	Fosfotriesterasa
Anhidrasa carbónica II	Hidratación de CO ₂ /esterasa	Fosfotriesterasa
Anhidrasa carbónica III	Hidratación de CO ₂ /esterasa	Fosfomonoesterasa
Quimotripsina	Amidasa	Fosfotriesterasa
Citosina metiltransferasa	Metilación de citosina	Desaminación de citosina
Mioglobina	Unión a O ₂	Sulfoxidación
Pepsina A	Amidasa	Sulfito hidrolasa
Fosfotriesterasa bacteriana	Fosfotriesterasa	Fosfodiesterasa
Fitasa	Fosfomonoesterasa	Sulfoxidación
Albúmina de suero	-	Esterasa
Ureasa	Ureasa	Hidrólisis de fosforoamidato

1.5. Clasificación de las enzimas

En su nomenclatura la mayoría de las enzimas contiene el sufijo *-asa* para que sean distinguidas como tales. En general, el prefijo está asociado a la reacción que catalizan (peptidasas hidrolizan enlaces peptídicos, lipasas hidrolizan lípidos, oxidasas oxidan diversos compuestos, etc.).

La Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, acrónimo de *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) es el organismo que ha tomado a su cargo la clasificación y nomenclatura de las enzimas. Según la IUBMB, existen dos nomenclaturas para una enzima: una trivial (como los ejemplos que aparecen en el párrafo anterior) y otra sistemática. La clasificación sistemática consta de una serie de cuatro números asignados por la Comisión de Enzimas (EC, acrónimo de *Enzyme Commission*) que siempre van antepuestos por la sigla EC y separados por puntos. El primer número indica el tipo de reacción que la enzima cataliza y las divide en seis clases. El segundo número (subclase) y el tercer número (sub-subclase) caracterizan la reacción con mayor precisión y el cuarto número es un número de serie particular para la enzima.

La Tabla 1.3 resume de un modo general el sistema de clasificación de enzimas normalizado por la IUBMB.

Por ejemplo, las lipasas de triglicéridos son EC 3.1.1.3. Esto significa que pertenecen a la clase 3 (hidrolasas), subclase 1 (actúa sobre uniones éster), sub-subclase 1 (hidrólisis de ésteres derivados de ácidos carboxílicos) y número de serie 3.

Para la clasificación completa de un biocatalizador, además de las nomenclaturas descriptas deberá indicarse la fuente de la enzima y el soporte si se encuentra inmovilizada.

Tabla 1.3. Clasificación sistemática de las enzimas según la IUBMB.

Clase	Reacción que catalizan	Subclase
EC 1 oxidoreductasas	Oxidaciones, reducciones	Indica grupo oxidado en el dador de hidrógeno
EC 2 transferasas	Transferencia de grupo funcional	Indica el grupo que se transfiere
EC 3 hidrolasas	Hidrólisis	Indica el tipo de enlace que se hidroliza
EC 4 liasas	Adición/eliminación no hidrolítica	Indica el enlace que se forma o rompe
EC 5 isomerasas	Isomerizaciones	Indica el tipo de isomerización
EC 6 ligasas	Formación de enlaces con consumo de ATP	Indica el tipo de enlace que se forma

1.6. Biocatálisis aplicada

La biocatálisis aplicada se define 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 o células enteras.²⁵

Si bien se puede considerar que la aplicación de la biocatálisis es tan antigua como su origen, no fue hasta el nacimiento de la Microbiología y la Bioquímica que fue posible entender y controlar eficientemente los procesos biocatalíticos. En este contexto, la aplicación de biocatalizadores a diversos procesos industriales comenzó a crecer a fines del siglo XIX con el advenimiento de la segunda revolución industrial.

Una búsqueda de patentes que describan el aislamiento, producción o empleo de biocatalizadores puede reflejar su evolución en los últimos cien años. La historia de la biocatálisis aplicada moderna se puede dividir en tres períodos:

- 1894 – 1945: comenzaron a aparecer las primeras aplicaciones. Principalmente se trataba de mejoras en procesos de producción de alimentos, tratamiento de fibras textiles y cueros, papel y obtención de gomas. Hasta 1922 no existían más de 65 patentes. A partir de ese momento el número de patentes creció a un mayor ritmo y se sumaron nuevas aplicaciones como ser la producción de enzimas y su uso en productos de limpieza. Se encontraron 915 patentes correspondientes a ese período.
- 1945 – 1960: se introducen aplicaciones en síntesis de productos de química fina, principalmente antibióticos, esteroides y algunos metabolitos primarios (1273 patentes).
- 1960 – presente: al haberse desarrollado conocimientos más profundos en bioquímica, se pueden encontrar patentes donde se protege la utilización de cepas específicas de microorganismos (mutantes y no mutantes) y genes (para la producción de enzimas recombinantes) en la fabricación de diversos productos (más de 448.000 patentes).

1.6.1. Fuentes y aplicación de biocatalizadores

Los biocatalizadores están omnipresentes en la naturaleza. La fuente más abundante y económica son los microorganismos. También es posible aislar enzimas de forma económica de órganos de animales superiores. El reino vegetal es una fuente más limitada de biocatalizadores, con lo que las enzimas y células vegetales se usan menos frecuentemente.

1.6.1.1. Enzimas aisladas

Las enzimas aisladas tienen aplicación industrial y existen varios proveedores de enzimas en el mundo. Se estima que durante el año 2000 el mercado de enzimas generó ventas por

2000 millones de euros,²⁶ con una participación mayoritaria de las enzimas hidrolíticas (lipasas, proteasas, glicosidasas). La principal ventaja que poseen estas enzimas es que no requieren cofactores.

La mayor parte de las ventas de enzimas fueron para la industria de alimentos, seguida por la de fabricación de detergentes. Entre estas dos concentran cerca de un 80% del mercado de enzimas. El 20% restante se destina a otras aplicaciones: industria textil, tratamiento de residuos industriales, industria farmacéutica, química fina y química analítica.

1.6.1.2. Células enteras

Existe una gran variedad de bancos de células, públicos y privados que tienen sus cultivos disponibles para diversas aplicaciones. El mercado de levaduras solamente en Europa durante el año 2007 alcanzó un volumen de ventas de 560 millones de dólares, aunque para tener una idea mejor de las ganancias que generan las células enteras hay que tener en cuenta también el mercado de enzimas aisladas (en la sección precedente) y la producción mundial de muchos antibióticos, vacunas, bebidas alcohólicas, productos lácteos y panificados, entre otros.

El empleo de células enteras puede ser más económico que el uso de enzimas aisladas. Esto se debe a que es posible hacer crecer un cultivo celular en condiciones adecuadas (que obviamente no ocurre con las enzimas aisladas) y al costo que insume el aislamiento de enzimas. Además, existen muchas enzimas, como por ejemplo las deshidrogenasas, que requieren cofactores para cumplir su función. En estos casos resulta más ventajoso el empleo de células enteras que contienen a la enzima que cataliza la reacción de interés, junto con los cofactores y rutas metabólicas para la regeneración de estos últimos.

Por otro lado, las células poseen una gran cantidad de enzimas, con lo que se corre riesgo de perder selectividad en las transformaciones que se desean efectuar.

Al igual que con enzimas aisladas, se han ensayado metodologías de inmovilización de microorganismos para mejorar su estabilidad y facilitar su separación del medio de reacción. Asimismo, se ha estudiado el empleo de células enteras en solventes orgánicos, mezclas bifásicas y emulsiones para mejorar la solubilidad de sustratos hidrofóbicos. En

este punto las células enteras son, en general, menos tolerantes que las enzimas aisladas a medios de reacción distintos al medio acuoso.

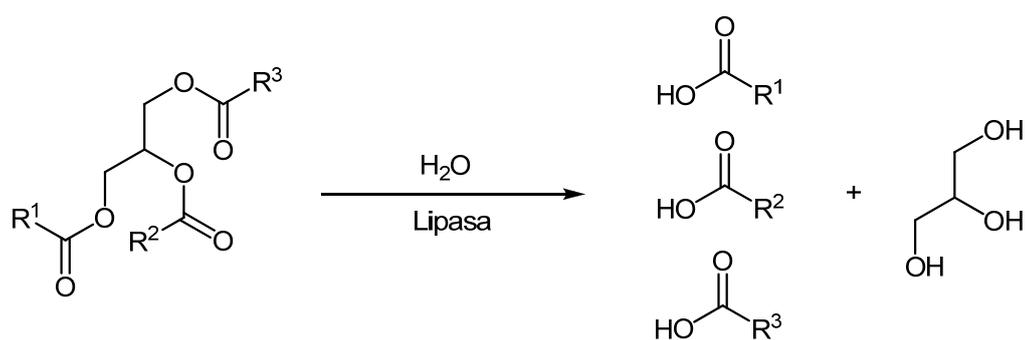
El desarrollo de herramientas de ingeniería genética ha permitido ampliar los horizontes del empleo de células enteras, permitiendo expresar enzimas de diferentes organismos en microorganismos de crecimiento rápido, buena tolerancia a los productos químicos y fácil manipulación.²⁷

1.7. Lipasas

Para llevar a cabo una gran parte de este trabajo de tesis se emplearon lipasas de triglicéridos (EC 3.1.1.3) de origen comercial. Estas enzimas tienen la capacidad de catalizar la hidrólisis de enlaces éster en sustratos no solubles en agua. En este contexto resulta importante desarrollar las características particulares de este biocatalizador.

1.7.1. Función

En su función fisiológica, las lipasas catalizan la hidrólisis de los triglicéridos generando como productos mono-, diglicéridos, ácidos grasos y glicerol (Esquema 1.1).

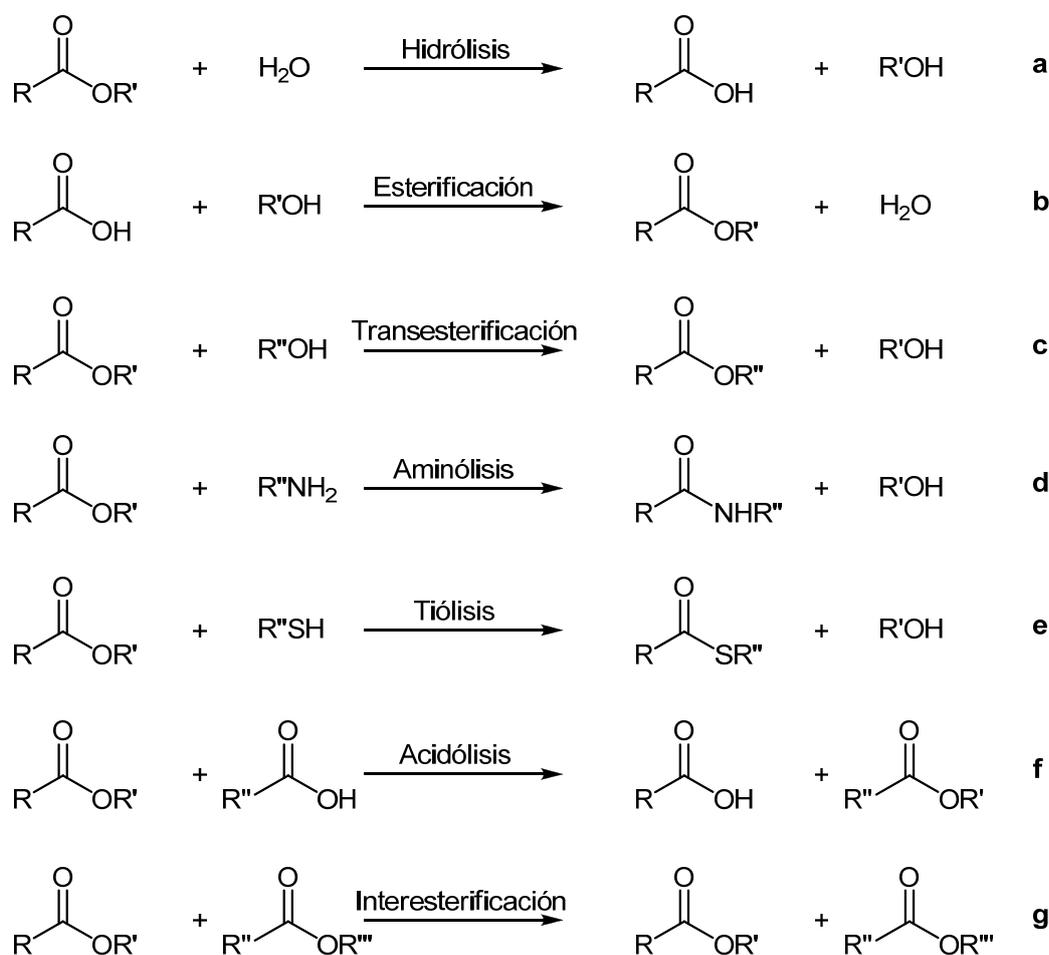


$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3$: cadena alquílica lineal

Esquema 1.1. Hidrólisis total de un triglicérido catalizada por lipasas.

La capacidad que tienen las lipasas para aceptar sustratos hidrofóbicos las han hecho atractivas para su aplicación en síntesis orgánica. El uso de las mismas ha demostrado que

son capaces de aceptar como sustratos a compuestos de estructura y complejidad muy diversa. Particularmente, se ha descubierto que su empleo como catalizadores en solventes orgánicos ha permitido ampliar mucho su versatilidad, pudiendo catalizar reacciones de hidrólisis (a), esterificación (b), transesterificación (c), aminólisis (d), tiólisis (e), acidólisis (f) e interesterificación (g). El Esquema 1.2 muestra la variedad de reacciones que pueden ser catalizadas por lipasas.



Esquema 1.2. Reacciones catalizadas por lipasas.

La utilidad que presentan estos biocatalizadores ha traído como consecuencia la existencia de una amplia variedad de catalizadores comerciales conteniendo lipasas. Estos han sido usados exitosamente en el procesamiento de alimentos y en la síntesis de productos de química fina, entre otras aplicaciones.

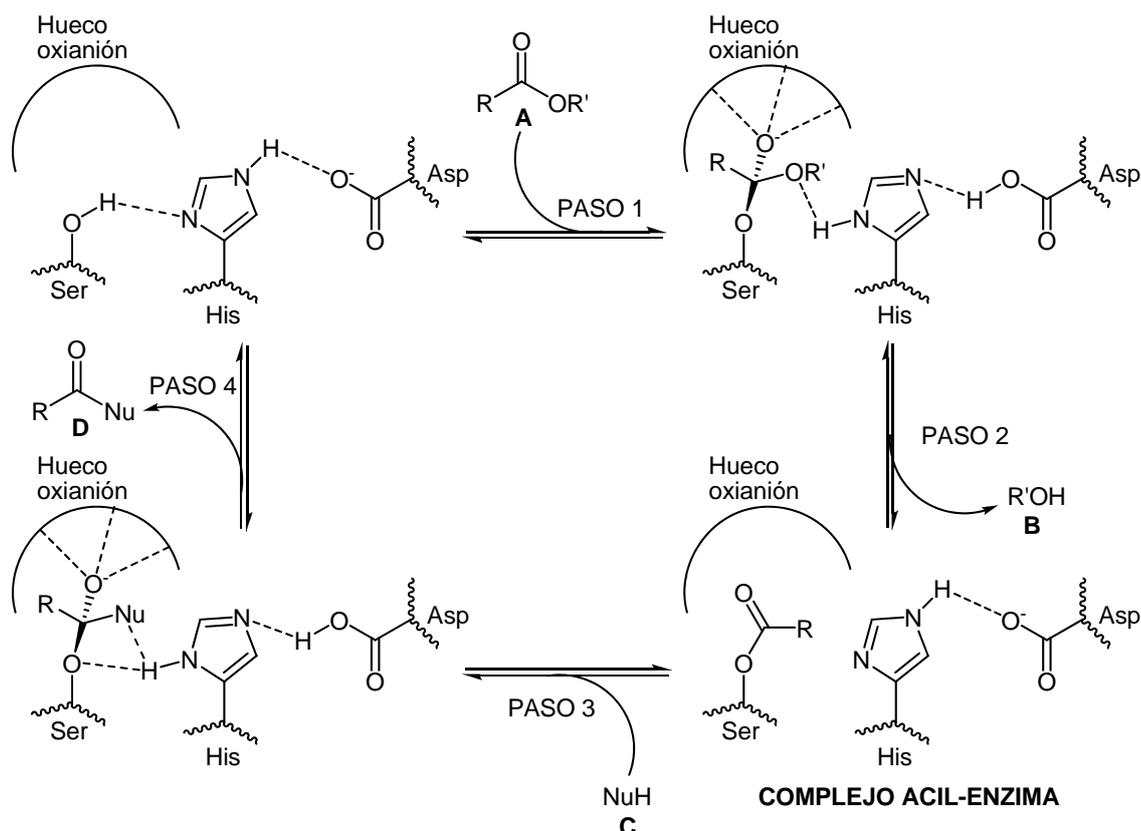
1.7.2. Fuentes

Las lipasas pueden ser aisladas de una gran variedad de fuentes: microbiana, vegetal o animal. Las lipasas que están disponibles en el mercado son en su mayoría de origen microbiano. No obstante, las técnicas de ingeniería genética permiten la producción sencilla y a gran escala de enzimas de cualquier origen empleando microorganismos recombinantes. Muchas de las lipasas que actualmente se comercializan se encuentran inmovilizadas sobre diversos soportes, lo que facilita su manejo y recuperación.

1.7.3. Mecanismo

Las lipasas son capaces de catalizar una amplia variedad de sustituciones nucleofílicas sobre grupos acilo (descriptas en el Esquema 1.2) mediante un mecanismo de catálisis nucleofílica. En su sitio activo existe un residuo que es capaz de unirse covalentemente al acilo para luego ser desplazado por un nucleófilo. El residuo que cumple esta función en las lipasas es una serina. En el sitio activo, el hidroxilo de la serina es altamente nucleofílico gracias a una disposición adecuada de un residuo de histidina y de aspartato. Estos tres residuos juntos conforman lo que se conoce como *triada catalítica*.

El mecanismo de reacción, descrito en el Esquema 1.3, puede resumirse de la siguiente manera: en el paso 1 el acilo del éster que actúa como sustrato es atacado por el oxígeno de la serina, que es altamente nucleofílico gracias a los puentes de hidrógeno que forman la serina con la histidina y ésta con el aspartato. Esta adición genera un intermediario tetraédrico que es estabilizado por los residuos del llamado *hueco oxianión*. Este hueco posee residuos dadores de puente de hidrógeno que estabilizan la carga negativa del intermediario. En el segundo paso, la eliminación del alcohol produce el complejo acil-enzima. En el tercer paso, la adición de un nucleófilo al complejo acil-enzima produce nuevamente un intermediario tetraédrico que colapsa en el paso 4 con la eliminación del residuo de serina, la liberación del producto y la regeneración del sitio activo para otro ciclo de catálisis. El nucleófilo que ataca al complejo acil-enzima puede ser agua, un alcohol, una amina primaria o secundaria o un tiol según el tipo de reacción que se lleve a cabo (Esquema 1.2).



Esquema 1.3. Ciclo catalítico de las lipasas. El hidroxilo de la serina (Ser) se adiciona al carbonilo del éster **A**. La carga negativa se transfiere al intermediario tetraédrico desde el carboxilato del aspartato (Asp) mediante puentes de hidrógeno con el imidazol de la histidina (His) y de éste con oxígeno de la serina. El intermediario se estabiliza por la presencia del hueco oxianión. Luego se elimina el alcohol **B**, se produce el ataque del nucleófilo **C** y finalmente se elimina el producto **D**.

Este tipo de mecanismo es común a las lipasas, como también a muchas otras hidrolasas (esterasas, proteasas). El criterio más adecuado para diferenciar a una lipasa de otras hidrolasas es su afinidad preferencial por triacilgliceroles de cadena larga, más que su mecanismo.

1.7.4. Estructura

A partir de 1990 se llevaron a cabo trabajos en los cuales se describieron la estructura y datos bioquímicos de muchas lipasas. Estos trabajos contribuyeron a rechazar al fenómeno de activación interfacial como característica distintiva de las lipasas.²⁸ Este fenómeno ilustra el incremento de actividad que poseen algunas lipasas cuando el sustrato se encuentra en una fase distinta a la enzima, en forma de micelas o vesículas. En principio,

se creyó que esta activación respondía a la presencia de un segmento peptídico anfipático que actúa como tapa protegiendo el sitio activo. Sin embargo, algunas lipasas como la CAL B²⁹ no presentan el fenómeno de activación interfacial a pesar de poseer la tapa anfipática. En general, la estructura terciaria de las lipasas es común a una gran cantidad de hidrolasas. El plegamiento α/β hidrolasa constituye un motivo cuyo núcleo generalmente consta de ocho láminas beta paralelas que se encuentran conectadas por hélices alfa (Figura I.1).³⁰

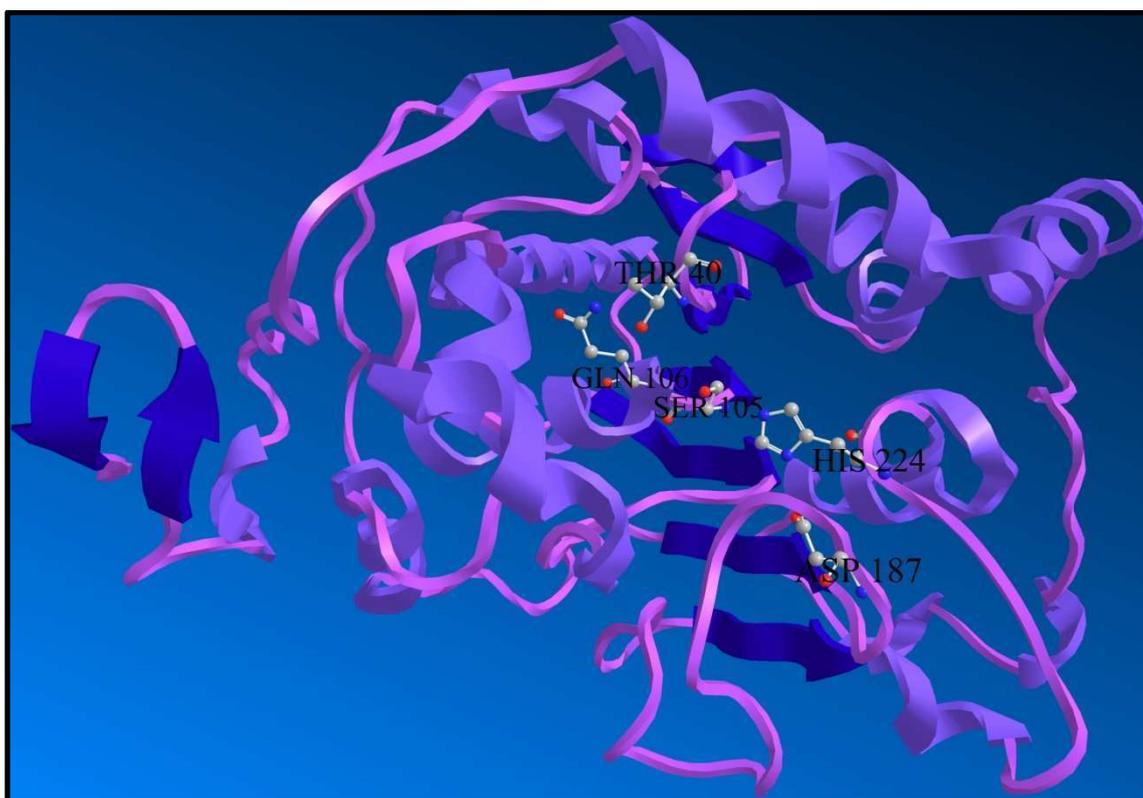
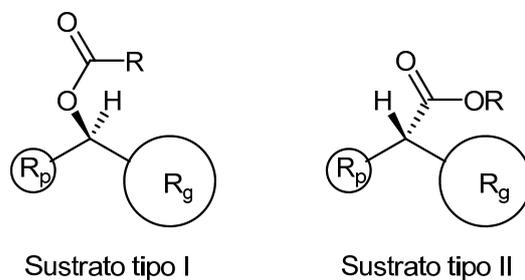


Figura I.1. Estructura de la CAL B²⁹ que se muestra como ejemplo de un plegamiento α/β hidrolasa. Se pueden observar siete láminas beta paralelas (en azul). En la posición central se encuentra la tríada catalítica (Ser 105, His 224, Asp 187) y los residuos del hueco oxianión (Gln 106, Thr 40).

Con motivo de establecer características estructurales que distingan a las lipasas, Pleiss y colaboradores³¹ analizaron la estructura de varias serina hidrolasas (hidrolasas que poseen serina en su tríada catalítica) clasificadas como lipasas o esterasas. Se analizaron las estructuras de los sitios de unión del acilo y del alcohol. Se encontró que básicamente la diferencia entre las esterasas y las lipasas consistía en las dimensiones del sitio de unión del acilo (mucho más pequeño en la acetilcolinesterasa, por ejemplo, que en las lipasas), lo que refuerza el concepto de clasificación enunciado en sección anterior. No obstante, se

hizo hincapié en que la especificidad de longitud de cadena en lipasas se ve influenciada no sólo por la topología del sitio de unión del acilo, sino también por los solventes empleados, soporte de inmovilización y otros factores estructurales como la geometría de la tapa anfipática.

En las lipasas el sitio de unión del alcohol es bastante más pequeño. Su forma y tamaño es considerada clave para el comportamiento selectivo de las lipasas. Se considera que este sitio tiene dos bolsillos, uno más grande y otro más pequeño, donde se alojan los sustituyentes del nucleófilo. En función de este parámetro estructural, Kazlauskas³² propuso una regla general que describe el comportamiento estereoselectivo de las lipasas (Esquema 1.4). Se ha determinado que, en general, se observa comportamiento estereoselectivo en la hidrólisis de ésteres de alcoholes quirales con preferencia hacia los que tienen configuración absoluta *R* en el carbono vecino al oxígeno. Más raramente, se ha observado estereoselectividad hacia la hidrólisis de ésteres de ácidos quirales. En este último caso, la configuración del centro asimétrico vecino al acilo es preferentemente *S*.

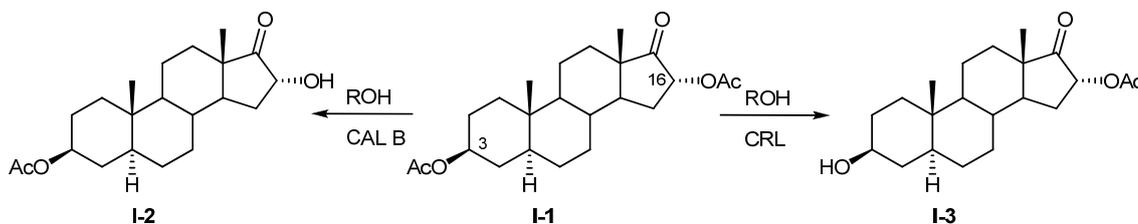


Esquema 1.4. Regla de Kazlauskas. Los sustratos tipo I (izquierda) son ésteres de alcoholes secundarios quirales y se hidrolizan preferentemente a su enantiómero. Los sustratos de tipo II (derecha) son ésteres de ácidos quirales y se hidrolizan preferentemente a su enantiómero, aunque más raramente que los sustratos tipo I. Las configuraciones absolutas de los centros asimétricos son: *R* para el sustrato tipo I y *S* para el sustrato tipo II, siempre que R_g (sustituyente grande) tenga mayor prioridad que R_p (sustituyente pequeño) al aplicar las reglas de Cahn-Ingold-Prelog. R: alquilo lineal de tres o más carbonos.

1.7.5. Selectividad

Las enzimas suelen mostrar comportamientos quimio-, regio- y estereoselectivos y las lipasas no son la excepción. Como ejemplo del comportamiento regioselectivo de las mismas, se pueden mencionar los trabajos realizados en nuestro laboratorio en la alcoholisis del diacetato de 17-oxo-5 α H-androstan-3 β ,16 α -diilo **I-1** (Esquema 1.5).³³ Al

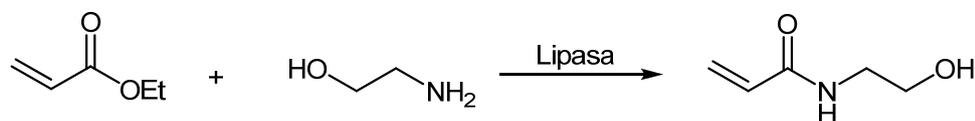
emplear CAL B se puede obtener selectivamente el producto de desacetilación en la posición 16 (**I-2**), mientras que la lipasa de *Candida rugosa* (CRL) mostró regioselectividad complementaria catalizando la alcoholisis en la posición 3 para dar el producto **I-3**.



Esquema I.5. Comportamiento regioselectivo de lipasas en la alcoholisis de acetatos de androstanos. La numeración de los carbonos sustituidos con acetato se muestra en la estructura del sustrato **I-1**.

Como se puede ver en este ejemplo, lipasas de distintas fuentes pueden mostrar diferente selectividad.

También se pueden ilustrar el comportamiento quimioselectivo de las lipasas mediante la reacción de acrilato de etilo y etanolamina catalizada por CAL B.³⁴ En este caso, se determinó que en ciertas condiciones sólo se produce la reacción de aminólisis para dar la (2-hidroxi)etil-acrilamida como único producto. El grupo hidroxilo suele participar como nucleófilo en muchas reacciones catalizadas por lipasas, como en las alcoholisis descritas en el párrafo anterior. Sin embargo, éste no reacciona en las condiciones en las que se realizó el experimento, tal como se muestra en el Esquema I.6.

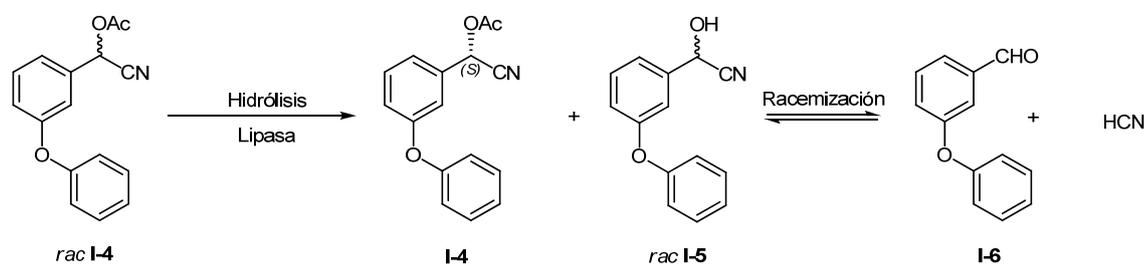


Esquema I.6. Reacción de acrilato de etilo y etanolamina catalizada por lipasas.

En cuanto a la estereoselectividad en las reacciones catalizadas por lipasas, se pueden señalar dos aspectos:

- Reconocimiento de centros asimétricos presentes en el sustrato. En este contexto se han desarrollado reglas más o menos generales como la regla de Kazlauskas. Sin embargo, la estereoselectividad que se pueda alcanzar en un proceso particular

catalizado por lipasas puede variar con el sustrato, el tipo de lipasa empleada y las condiciones de reacción. Como ejemplo se presenta un proceso de resolución de la cianohidrina acetilada racémica **I-4**.³⁵ La hidrólisis de la misma en solución acuosa se produce en la mayoría de los casos para los ésteres con configuración *R*, de acuerdo a la regla de Kazlauskas. No obstante, el exceso enantiomérico alcanzado para el éster que no se hidroliza varía empleando lipasas de distintas fuentes. Además, el empleo de CRL produce la hidrólisis selectiva del éster con configuración opuesta (Esquema 1.7).

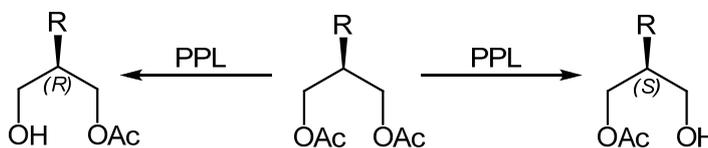


Lipasa	Configuración (I-4)	ee% (I-4)
CRL	<i>R</i>	70
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>S</i>	93
<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>S</i>	93
<i>Chromobacterium</i> sp.	<i>S</i>	96
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>S</i>	>99

Esquema 1.7. Hidrólisis estereoselectiva del acetato de cianohidrina **I-4**. El producto de hidrólisis **I-5** racemiza espontáneamente en el medio de reacción al estar en equilibrio con el aldehído **I-6**.

- Desimetrización de ésteres proquirales. En este caso la transformación química crea un nuevo centro asimétrico en la molécula o rinde un producto de manera estereoselectiva a partir de un sustrato *meso*. Por ejemplo, se ha llevado a cabo un trabajo sobre la hidrólisis selectiva de diacetatos de varios 1,3-propanodiolos y glicerolos sustituidos empleando lipasa de páncreas porcino (PPL).³⁶ En el Esquema 1.8 se resumen los resultados. Se puede observar que tanto la presencia

de diferentes sustituyentes como el uso de distintos cosolventes influyen radicalmente en la selectividad obtenida.



R	Cosolvente	Configuración	ee%
<i>n</i> -C ₇ H ₅ -	DIPE	<i>S</i>	70
(<i>E</i>)- <i>n</i> -C ₅ H ₁₁ CH=CH-	-	<i>S</i>	84
(<i>E</i>)- <i>n</i> -C ₅ H ₁₁ CH=CH-	DIPE	<i>S</i>	95
(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₂ -	DIPE	<i>S</i>	72
(<i>E</i>)-(CH ₃) ₂ CHCH=CH-	-	<i>S</i>	90
(<i>E</i>)-(CH ₃) ₂ CHCH=CH-	DIPE	<i>S</i>	97
(<i>Z</i>)- <i>n</i> -C ₅ H ₁₁ CH=CH-	DIPE	<i>R</i>	53
(<i>Z</i>)-(CH ₃) ₂ CHCH=CH-	DIPE	<i>R</i>	15
Ph-	-	<i>S</i>	85-92
Ph-	Tolueno	<i>S</i>	99
2-naftil-	-	<i>S</i>	>96
BzO-	DIPE	<i>R</i>	88-91
BzO-	DIPE	<i>R</i>	>94 ^a

^aSe utilizó el dipropionato como sustrato en lugar del diacetato.

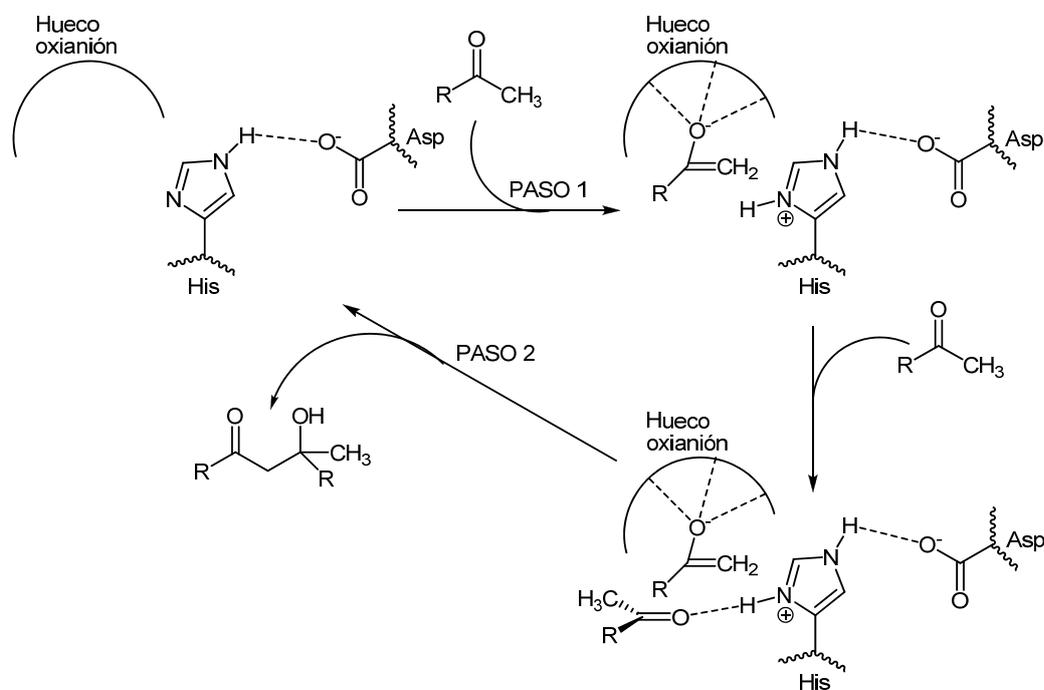
Esquema I.8. Desimetrización de diésteres de 1,3-propanodiolos y glicerol sustituidos catalizada por PPL.

En los casos mencionados anteriormente se puede observar que, aún en sistemas relativamente sencillos, el comportamiento de las lipasas puede ser difícil de predecir. Es por ello que resulta de interés el estudio de aplicación de lipasas en transformaciones sobre sustratos de diversa complejidad probando varias condiciones de reacción.

1.7.6. Promiscuidad

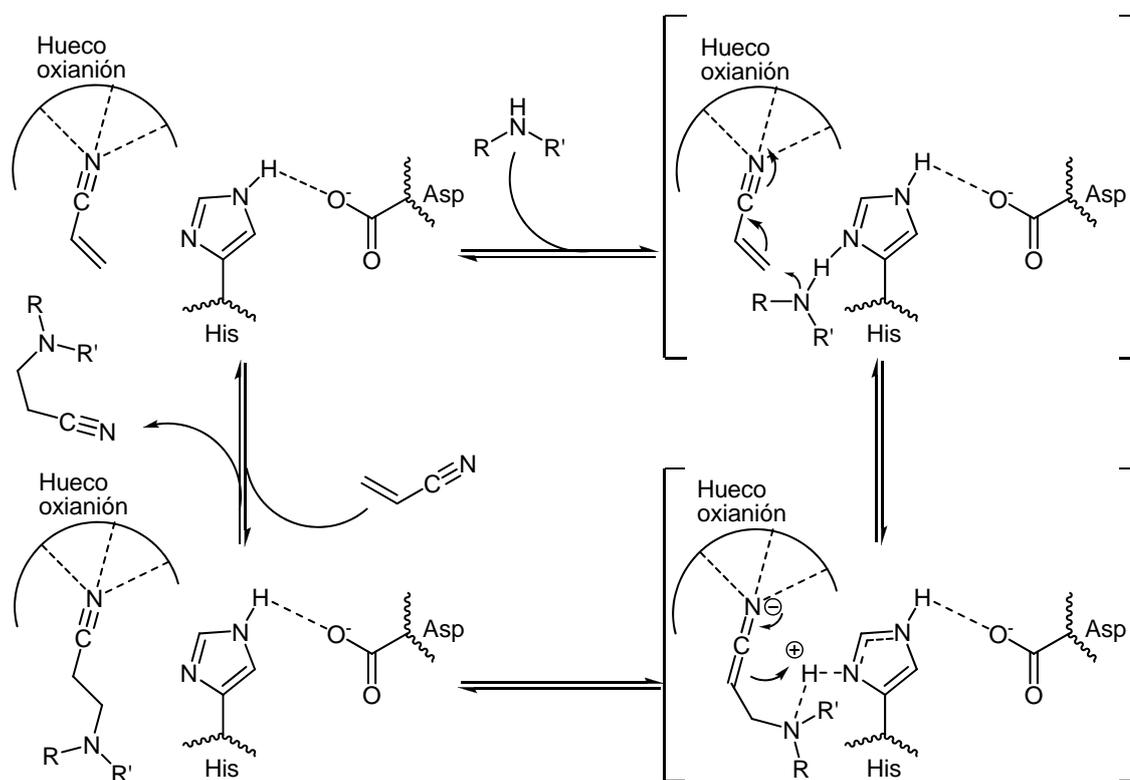
En los ejemplos relacionados a la utilización de lipasas, desarrollados en las secciones anteriores podemos recoger evidencias tanto de la promiscuidad de sustrato como de la promiscuidad catalítica que presentan las lipasas. Estas enzimas han podido catalizar reacciones sobre sustratos de muy diverso tamaño y complejidad estructural. Asimismo, la utilización de solventes orgánicos ha podido ampliar la variedad de reacciones que pueden catalizar las lipasas, como se mostró en el Esquema 1.2. No obstante, la promiscuidad catalítica observada en lipasas es aún más amplia.

A principios de esta década se presentó una CAL B mutante con capacidad para catalizar condensaciones aldólicas.³⁷ A esta enzima se le reemplazó la serina de la tríada catalítica (Ser 105) por una alanina, por lo que la actividad hidrolasa de este mutante se vio fuertemente disminuida. En función de los estudios realizados sobre este mutante (Ser105Ala) se pudo plantear un mecanismo tentativo en el cual participan la histidina y el hueco oxianión (Esquema 1.9). Además, se pudo comprobar que la CAL B salvaje también podía catalizar condensaciones aldólicas, aunque con una velocidad menor.



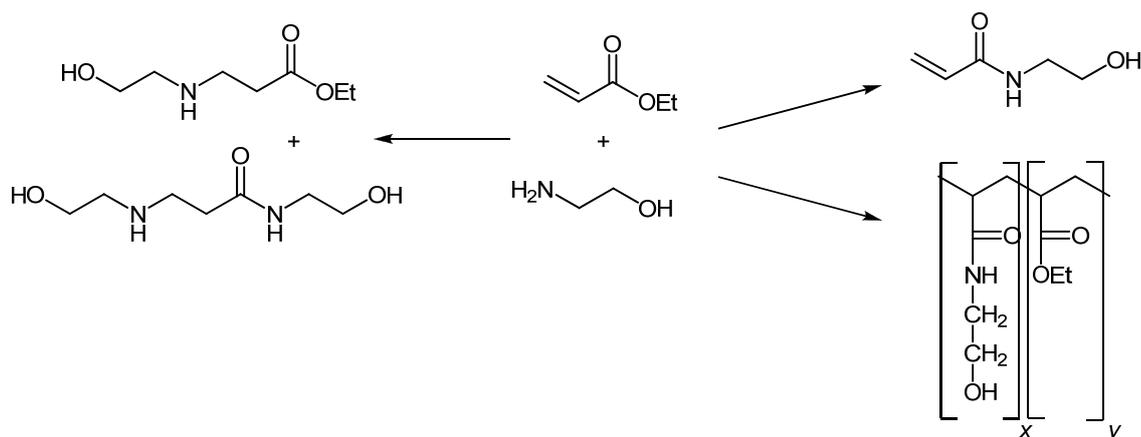
Esquema 1.9. Mecanismo en dos pasos propuesto para la reacción de condensación aldólica de acetaldehído (R=H) o acetona (R=CH₃) catalizada por CAL B mutante Ser105Ala. El paso 1 consta de la formación del enolato estabilizado por el hueco oxianión mediante la abstracción de un hidrógeno en el carbono vecino al carbonilo por parte del residuo de histidina. El electrófilo se acerca al enolato formado por unión mediante puente de hidrógeno al imidazol de la histidina protonada para que en el paso 2 se forme el enlace carbono-carbono y se complete el ciclo.

Más recientemente, y en base a la nueva promiscuidad catalítica descubierta en la CAL B mutante, se decidió evaluar el desempeño de esta enzima en su forma salvaje para catalizar adiciones de Michael de aminas secundarias sobre acrilonitrilo.³⁸ En este trabajo se demostró que en presencia de CAL B la adición de Michael podía proceder hasta cien veces más rápido que en ausencia de catalizador. Análogamente, se propuso un mecanismo para esta reacción, donde en este caso es el electrófilo el que se une primero al hueco oxianión y el nucleófilo es luego activado por el par histidina-aspartato (lo que recuerda más al mecanismo de sustitución nucleofílica en acilo ilustrado en el Esquema 1.3), tal como muestra el Esquema 1.10.



Esquema 1.10. Mecanismo propuesto para la adición de Michael de aminas secundarias sobre acrilonitrilo catalizada por CAL B.

Paralelamente, en nuestro laboratorio se verificó que, empleando diferentes condiciones de reacción se han podido obtener aductos de Michael, acrilamidas y copolímeros acrílicos a partir de etanolamina y acrilato de etilo utilizando lipasas como catalizadores (Esquema 1.11).^{34,39} En este último caso también se ha podido llevar a cabo una polimerización en cadena catalizada por lipasas.



Esquema I.11. Productos de reacción de etanolamina y acrilato de etilo catalizada por lipasas en diferentes condiciones de trabajo.

1.7.7. Aplicación de lipasas en síntesis de productos de interés industrial: cloruro de lapirio

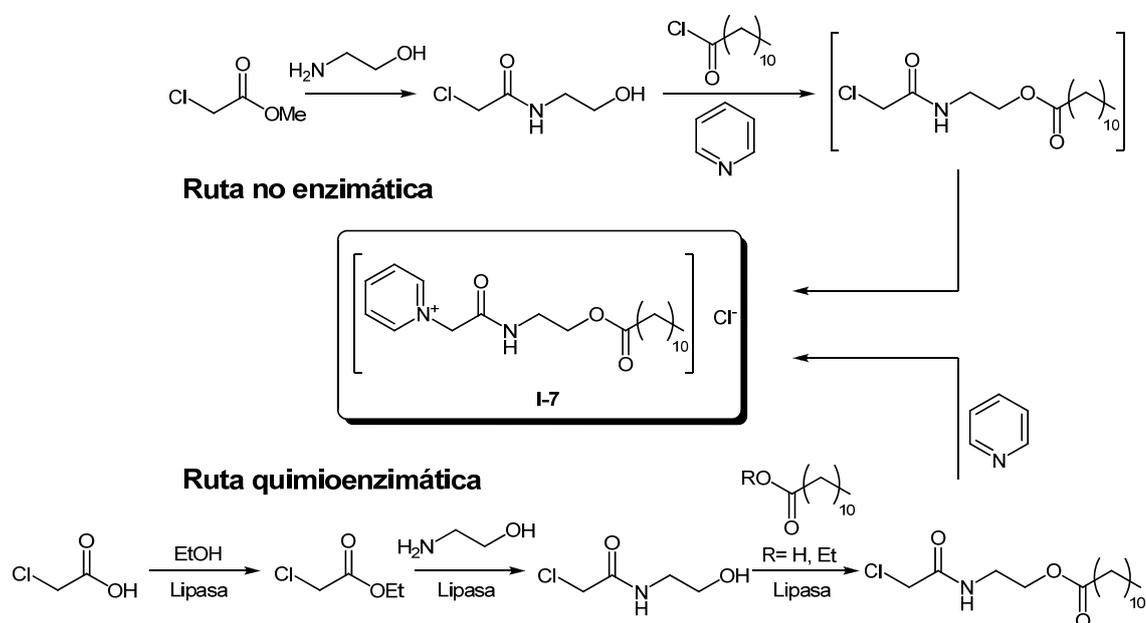
El cloruro de 1-[(2-Dodecanoiloxietilcarbamoyl)-metil]piridinio **I-7** es conocido comercialmente como cloruro de lapirio. Este compuesto es un surfactante y bactericida de amplio espectro. Se utiliza para desinfectar piel sana, heridas, ropa, instrumental, superficies y ambiente. Como no quema ni mancha, no tiene olor fuerte y su toxicidad en humanos es muy baja, se emplea también en formulaciones de productos de higiene personal, tratamiento de efluentes domiciliarios e inhibidores de corrosión.

La síntesis de este producto se encontraba reportada previamente utilizando métodos no enzimáticos.⁴⁰ En estos procedimientos se indica la utilización de cloruro de lauroilo en la reacción de esterificación (Esquema I.12). Además de los inconvenientes que presenta el manejo de este reactivo, el desprendimiento de cloruro de hidrógeno hace que el producto final quede contaminado con cloruro de piridinio. Esto hace necesario implementar operaciones de purificación que, empleando métodos más limpios, no serían necesarios.

En nuestro laboratorio se desarrolló una ruta sintética alternativa en cuatro pasos, tres de los cuales fueron catalizados por lipasas.⁴¹ Este nuevo camino tiene algunas ventajas claras con respecto a sus predecesores:

- Permite una síntesis con reactivos y solventes más económicos, ya que emplea ácido cloroacético, etanolamina, ácido láurico y piridina como bloques de construcción, y como solventes acetona y etanol.
- Todos los pasos proceden en condiciones suaves y se evita el uso de cloruros de ácido. El producto final tiene menor acidez, con lo que su aislamiento resulta más sencillo y posee una mejor aptitud para su uso en formulaciones farmacéuticas y cosméticas.

El Esquema I.12 muestra ambas rutas, tradicional (no enzimática) y quimioenzimática.

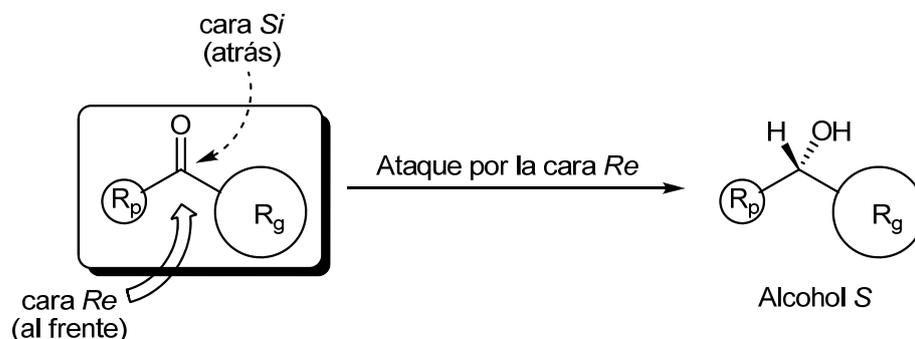


Esquema I.12. Ruta sintética tradicional y quimioenzimática para la obtención de cloruro de lapirio I-7.

I.8. Células enteras en la reducción de compuestos carbonílicos

La reducción asimétrica de cetonas puede ser llevada a cabo empleando una clase de oxidorreductasas conocida como deshidrogenasas, que se caracterizan por requerir cofactores (NAD^+ , NADP^+) o coenzimas (FAD, FMN) como aceptores de hidruro. El curso estereoselectivo de estas reacciones puede ser predicho mediante la regla de Prelog²³ (Esquema I.13). No obstante, existen varias excepciones a esta regla. Entre ellas se puede mencionar la alcohol deshidrogenasa de *Thermoanaerobium Brockii* que muestra una

selectividad anti-Prelog en metilcetonas con sustituyentes etilo, isopropilo y ciclopropilo.⁴²



Esquema I.13. Ilustración de la regla de Prelog. El ataque de hidruro se produce por el frente ubicando al sustituyente grande (R_g) a la derecha y el sustituyente pequeño (R_p) a la izquierda. En la mayoría de los casos este comportamiento puede interpretarse como un ataque por la cara *Re* del sustrato que genera un alcohol con configuración *S* como producto si el sustituyente grande posee una mayor prioridad que el sustituyente pequeño al aplicar las reglas de Cahn-Ingold-Prelog.

El uso de deshidrogenasas aisladas precisa de sistemas para el reciclado de cofactores, lo cual en algunos casos puede ser complicado de implementar. Una alternativa económica para salvar este inconveniente es emplear células enteras. Éstas contienen varias deshidrogenasas y caminos metabólicos capaces de regenerar los cofactores. Sin necesidad de aislar enzimas y utilizando fuentes de carbono económicas como la glucosa es posible contar con un biocatalizador para realizar reacciones de reducción sobre compuestos carbonílicos.

Si bien puede ser más sencillo y más económico a nivel operativo, el uso de células enteras lleva consigo algunas desventajas:

- La productividad es baja si el sustrato presenta toxicidad para la células, por lo que generalmente se tienen que emplear concentraciones bajas de sustrato y relaciones biomasa/sustrato grandes.
- Relaciones de biomasa/sustrato grandes pueden dificultar el aislamiento de los productos, sobre todo si éstos tienden a acumularse en el interior de las células. Además, el propio metabolismo celular puede generar productos indeseables que contaminen los productos.

- Al emplear microorganismos, la eficiencia y selectividad de cada reacción particular puede variar entre diferentes cepas de un mismo microorganismo.
- Al existir varias enzimas capaces de catalizar una misma reacción, la selectividad puede ser función de la relación biomasa/sustrato y de la concentración de sustrato. También pueden influir en este sentido las condiciones de la fermentación, la inmovilización de las células, su estado de crecimiento, el uso de sustratos modificados o protegidos y el agregado de inhibidores.

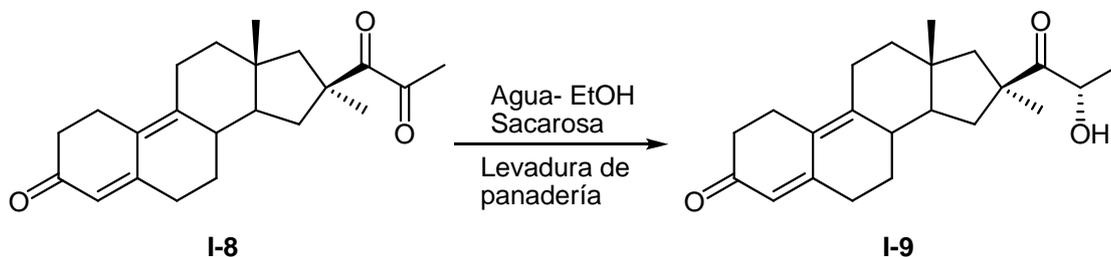
Aún así, el empleo de microorganismos suele ser una buena opción en estos casos. En especial, el uso de levaduras provee una forma muy sencilla y económica de llevar a cabo la reducción de compuestos carbonílicos. Las levaduras no suelen requerir el empleo de fermentadores estériles, con lo que su manejo resulta muy sencillo. La levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) ha sido empleada para reducir cetonas poseyendo un gran diversidad de grupos funcionales. En cetonas sencillas se observó que la reacción transcurrió con la selectividad predicha por la regla de Prelog.⁴³ En general se pueden alcanzar buenos excesos enantioméricos. La principal desventaja que presenta la levadura de panadería en este sentido es que no acepta sustratos muy voluminosos.

La diversidad tanto de condiciones de reacción que se pueden emplear como de especies que pueden ser utilizadas en este tipo de biotransformaciones hace que el resultado de una reacción determinada empleando un biocatalizador específico sea difícil de predecir. Es por ello que el estudio de reducciones biocatalíticas novedosas de compuestos carbonílicos es de interés en el campo de la biocatálisis.

1.8.1. Aplicación de células enteras en la síntesis de productos de interés industrial: Trimegestona

La trimegestona es un compuesto progestomimético desarrollado para el tratamiento de enfermedades postmenopáusicas. El paso clave en su camino sintético es la reducción quimio-, regio- y estereoespecífica del esteroide tricarbonílico **I-8** para obtener el producto final, la trimegestona **I-9** (Esquema 1.14). En 1997 se reportó un procedimiento donde este paso de reducción podía ser llevado a cabo empleando levadura de panadería en medio acuoso.⁴⁴ En estas condiciones se pudo generar selectivamente un nuevo centro

asimétrico en la posición 21 con configuración *S*, con un rendimiento de 51% y un exceso diastereomérico de 99%.



Esquema I.14. Paso biocatalítico para la obtención de trimegestona.

I.9. Conclusión

La biocatálisis es una de las disciplinas más antiguas desarrolladas por el hombre. No obstante, es al día de hoy que muchos procesos biocatalíticos no son comprendidos a fondo. Además, la diversidad biológica existente constituye una fuente muy rica de biocatalizadores, cuyas posibilidades permanecen aún sin explorar completamente.

La aplicación de la biocatálisis a la preparación de productos químicos puros tiene menos de doscientos años de antigüedad. Recién durante el siglo pasado se desarrollaron las herramientas necesarias para el estudio de la estructura y función de los biocatalizadores. De este modo fue posible comprender los procesos que llevan a cabo a nivel molecular. La ingeniería genética, con menos de cuarenta años de antigüedad, permitió incrementar enormemente la disponibilidad de biocatalizadores, tanto en calidad como en cantidad.⁴⁵

Hoy en día muchas lipasas se encuentran disponibles comercialmente en el mercado para diversas aplicaciones. En cuanto a su uso en Química Orgánica de síntesis, se demostró su gran versatilidad al ser empleadas en medio no acuoso. Si bien su utilización en medios no convencionales viene extendiéndose desde hace casi treinta años, todavía se siguen encontrando nuevas aplicaciones y nuevas actividades catalíticas (condensaciones aldólicas, adiciones de Michael).

Las células enteras de microorganismos constituyen biocatalizadores muy económicos para la reducción asimétrica de compuestos carbonílicos. A diferencia de cuando se emplean deshidrogenasas aisladas, no es necesario agregar cofactores o acoplar otros procesos para

su regeneración. Al poseer muchas enzimas capaces de catalizar una misma reacción, los resultados de una biotransformación catalizada por microorganismos pueden diferir radicalmente según la cepa que se utilice, su estado de crecimiento, las características del sustrato y las condiciones de reacción.

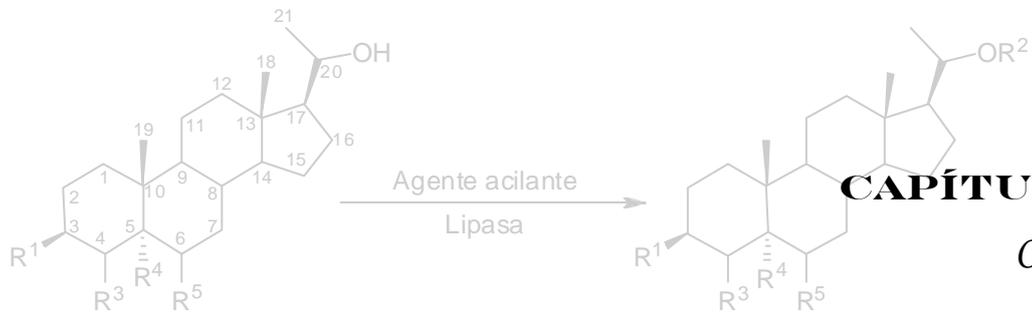
Es sabido que existe una necesidad creciente de procesos económicos (en dinero, energía y materiales) que utilicen recursos renovables para la producción de los bienes que el mundo consume. La biocatálisis aplicada a la síntesis orgánica ofrece una herramienta para efectuar transformaciones químicas de manera selectiva, en condiciones suaves y poco contaminantes. Los trabajos incluidos en esta tesis intentan conformar un avance en el conocimiento relacionado a este ámbito.

Bibliografía

1. Real Academia Española *Diccionario de la Lengua Española*, 22ª edición; Espasa-Calpe: Madrid, 2000.
2. Haber, F. *The synthesis of ammonia from its elements*, Conferencia por el Premio Nobel, 2 de junio de 1920.
3. Corradini, P.; Guerra, G.; Cavallo, L. *Acc. Chem. Res.*, **2004**, *37*, 231-241.
4. Asimov, I. *Breve Historia de la Química*, 1ª edición, Alianza Editorial: Madrid, 1985.
5. McNall Burns, E. *Civilizaciones de Occidente, su historia y su cultura*, Tomo I, 14ª edición; Ediciones Siglo Veinte: Buenos Aires, 1983.
6. Silverman, R. B. *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*, Academic Press: San Diego, 2000.
7. Turner, M. K. *Trends Biotechnol.*, **1995**, 173-177.
8. Sym., E. A. *Biochem. J.*, **1936**, *30*, 609-617.
9. Klivanov, A. M. *Trends Biochem. Sci.*, **1989**, *14*, 141-144.
10. Klivanov, A. M. *Nature*, **2001**, *409*, 241-246.
11. Trodler, P.; Pleiss, J. *BMC Struct. Biol.*, **2008**, *8*:9 doi:10.1186/1472-6807-8-9
12. Klivanov, A. M. *Anal. Biochem.*, **1979**, *93*, 1-25.
13. Sheldon, R. A. *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, *349*, 1289-1307.
14. Mesiano, A. J.; Beckman, E. J.; Russell, A. J. *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 623-634.
15. Sureshkumar, M.; Lee, C.-K. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2009**, *60*, 1-12.
16. Jencks, W. P. *Adv. Enzymol.*, **1975**, *43*, 219-410.
17. Simonson, T.; Brooks, C. L. III. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 8452-8458.
18. Bruice, T. C. *Acc. Chem. Res.*, **2002**, *35*, 139-148.
19. Koshland, D. E. Jr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1958**, *44*, 98-104.
20. (a) Rustoy, E. M.; Ruiz Arias, I. E.; Baldessari, A. *Arkivoc*, **2005**, (xii), 175-180;
(b) Monsalve, L. N.; Roselli, S.; Bruno, M.; Baldessari, A. *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 2106-2115.
21. Smith, M. B. *Organic Synthesis*, 2nd Ed.; McGraw-Hill Higher Education: New York, 2002.

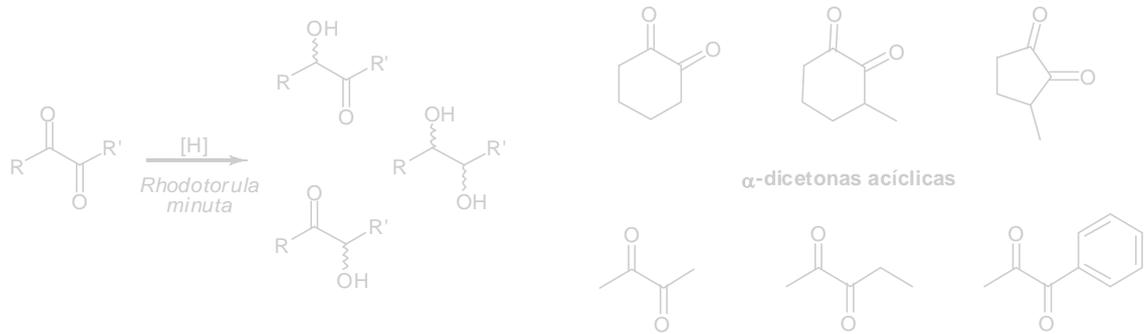
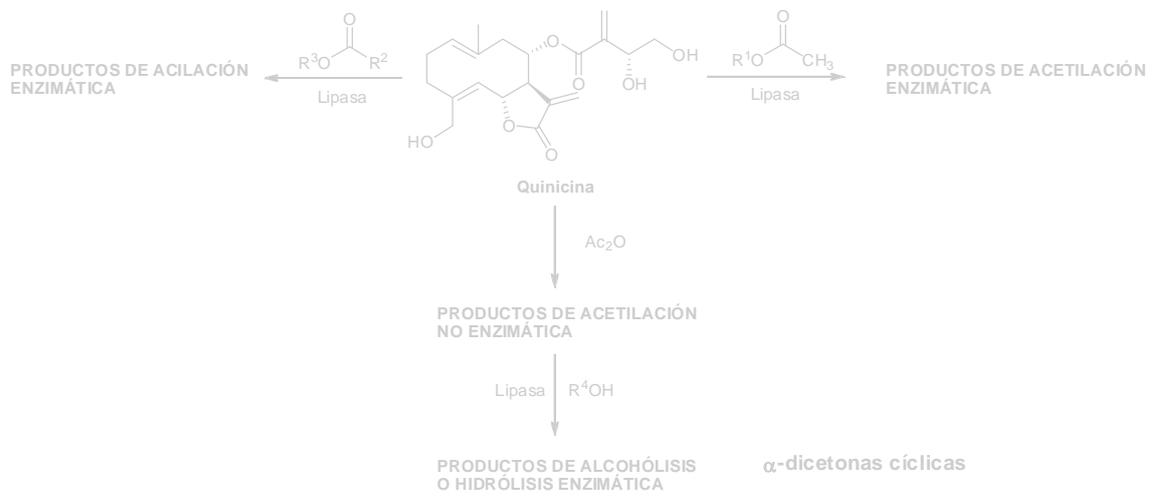
-
22. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 5th Ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: New York, 2004.
23. Prelog, V. *Pure Appl. Chem.*, **1968**, 9, 119-130.
24. Jensen, R. A. *Annu. Rev. Microbiol.*, **1976**, 30, 409-425.
25. Straathoff, A. J. J.; Adlercreutz *Applied Biocatalysis*, 2nd Ed.; Harwood Academic Publisher: Amsterdam, 2000.
26. Buchholz, K.; Kasche, V.; Bornscheuer, U. T. *Biocatalysts and enzyme technology*, Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2005.
27. Engelking, H.; Pfaller, R.; Wich, G.; Weuster-Botz, D. *Enzyme Microb. Technol.*, **2006**, 38, 536-544.
28. Sarda, L.; Desnuelle, P. *Biochim. Biophys. Acta*, **1958**, 30, 513-521.
29. Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A. *Structure*, **1994**, 2, 293-308.
30. Ollis, D. L.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S. M.; Harel, M.; Remington, S. J.; Silman, I.; Schrag, J.; Sussman, J. L.; Verschueren, K. H. G.; Goldman, A. *Protein Eng.*, **1992**, 5, 197-211.
31. (a) Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. D. *Chem. Phys. Lipids*, **1998**, 93, 67-80; (b) Tyagi, S.; Pleiss, J. *J. Biotechnol.*, **2006**, 124, 108-116.
32. Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T. A.; Cuccia, L. A. *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 2656-2665.
33. Brutomesso, A. C.; Baldessari, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, 29, 149-153.
34. Rustoy E. M., Baldessari A. *J Mol Catal B Enzym*, **2006**, 39, 50-54.
35. Mitsuda, S.; Nabeshima, S.; Hirohara, H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1989**, 31, 334-337.
36. Guanti, G.; Banfi, L.; Narisano, E. *Synthesis*, **1993**, 1029-1056.
37. (a) Branneby, C.; Carlqvist, P.; Magnusson, A.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 874-875; (b) Branneby, C.; Carlqvist, P.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, 31, 123-128.
38. Torre, O.; Alfonso, I.; Gotor, V. *Chem. Commun.*, **2004**, 1724-1725.
39. Rustoy, E. M.; Sato, Y.; Nonami, H.; Erra-Balsells, R.; Baldessari, A. *Polymer*, **2007**, 48, 1517-1525.

40. (a) Epstein, A. K.; Harris, B. R. US 2,290,173 (Cl. 167–22), 21 Jul 1942, Appl. 355,032, 31 Aug 1940; 10 pp; (b) Gordon, J. E.; Ralston, R. A. US 4,017,501 (Cl. 260–295), 24 Oct 1975, Appl. 625,407, 12 Apr 1977; 4 pp.
41. Rustoy, E. M.; Baldessari, A. *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 4628-4632.
42. Keinan, E.; Hafeli, E. K.; Seth, K. K.; Lamed, R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 162-169.
43. Macleod, R.; Prosser, H.; Fikentscher, L.; Lanyi, J.; Mosher, H. S. *Biochemistry*, **1964**, *3*, 838-846.
44. Croq, V.; Masson, C.; Winter, J.; Richard, C.; Lemaitre, G.; Lenay, J.; Vivat, M.; Buendía, J.; Prat, D. *Org. Proc. Res. Dev.*, 1997, *1*, 2-13.
45. Cohen, S. N.; Chang, A. C. Y.; Boyer, H. W.; Helling, R. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1973**, *70*, 3240-3244.



CAPÍTULO II

Objetivos



II. OBJETIVOS

Se ha resaltado en el capítulo anterior el comportamiento selectivo de los biocatalizadores. Esta característica permite plantear caminos sintéticos con menor número de pasos y potencialmente más eficientes, si es posible incluir en ellos reacciones catalizadas por enzimas. Además, la estereoselectividad de los biocatalizadores permite que puedan ser utilizados en reacciones de síntesis asimétrica. En este aspecto presentan ventajas con respecto a otros catalizadores en cuanto a su bajo costo y toxicidad, ya que los últimos suelen incluir iones de metales pesados en su estructura.

Las condiciones suaves de reacción en las que se utilizan los biocatalizadores constituyen otra importante característica de los mismos. Esta variable resulta muy importante a la hora de efectuar transformaciones sobre compuestos químicamente lábiles, en donde los métodos no enzimáticos pueden dar resultados poco satisfactorios.

Por último, la promiscuidad enzimática constituye un campo poco explorado en las reacciones catalizadas por lipasas. Existen, por lo tanto, muchas preguntas por responder en cuanto al curso que tomará un dado sistema que pudiera mostrar reactividad hacia más de un tipo de reacción en presencia de este tipo de enzimas.

En base a lo mencionado, se planteó como objetivo en el presente trabajo el estudio de reacciones biocatalíticas sobre distintos tipos de compuestos orgánicos a fin de:

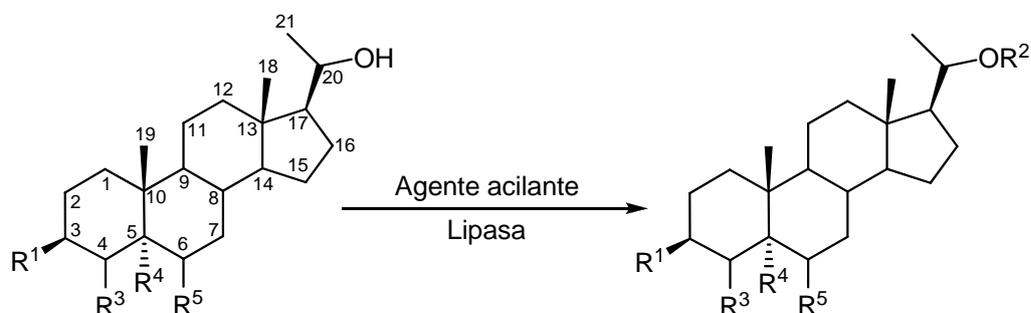
- Construir caminos eficientes de síntesis para determinados productos
- Comprender los resultados obtenidos: selectividad, rendimiento, condiciones de reacción, etcétera.
- Explorar el potencial de los biocatalizadores en situaciones donde no han sido puestos a prueba con anterioridad

En este marco, se ha estudiado la aplicación de la biocatálisis a la Química Orgánica a través del desarrollo de los siguientes temas:

- Síntesis enzimática de ésteres de 20-hidroxi-pregnanos
- Obtención de derivados acilados de quinicina
- Reducción biocatalítica de dicetonas vecinales
- Síntesis de poliamidoaminas lineales catalizada por lipasas

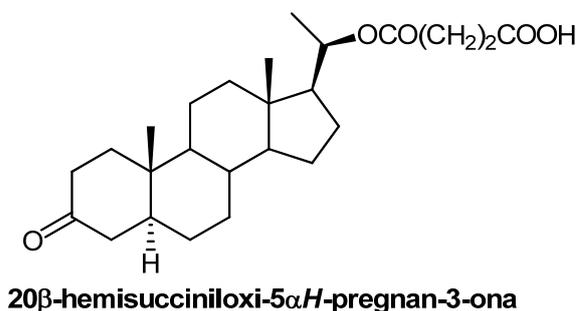
II.1. Síntesis enzimática de ésteres de 20-hidroxi-pregnanos

En la introducción se ha hecho referencia a los trabajos realizados en nuestro laboratorio sobre reacciones de alcoholisis de androstanos conteniendo diversos grupos funcionales.¹ Continuando en el campo de los esteroides y tomando como base trabajos previos, también llevados a cabo en nuestro laboratorio,² en el presente trabajo de tesis se decidió encarar el estudio de reacciones de acilación de varios pregnanos hidroxilados en la posición 20. Se utilizaron lipasas como catalizadores con el objeto de extender el conocimiento relacionado al desempeño de éstos en la transformación de esteroides (Esquema II.1).



Esquema II.1. Obtención de derivados de pregnanos acilados en la posición 20. R¹: -OH, -OAc, -OTBS, =O; R²: -CO(CH₂)₂COOEt, -CO(CH₂)₂COOBn, -Ac; R³, R⁴, R⁵: -H, Δ.

En este contexto, se propuso la estudiar la síntesis de ésteres de ácido succínico en pregnanos en la posición 20. Esto resulta particularmente importante debido a que esta reacción no ha podido ser llevada a cabo de manera satisfactoria mediante metodologías de síntesis tradicionales. Estos derivados succinilados son intermediarios clave en la síntesis de conjugados esteroide-proteína. Concretamente nos hemos propuesto la preparación de varios de estos derivados con el objeto de aplicarlos en la síntesis quimioenzimática de 20β-hemisucciniloxi-5αH-pregnan-3-ona.



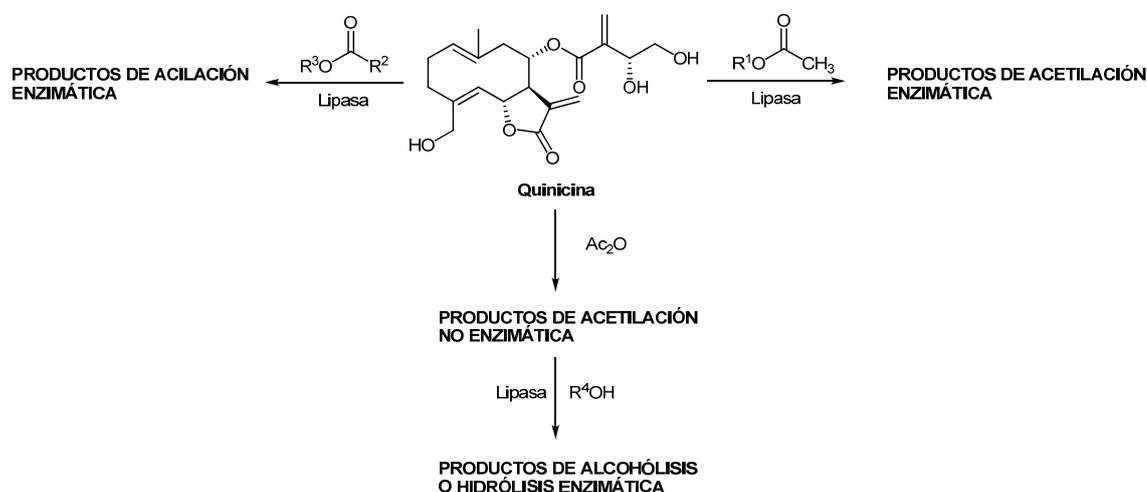
II.2. Obtención de derivados acilados de quinicina

La quinicina es un sesquiterpenoide natural que ha probado tener amplia actividad biológica. Este compuesto se encuentra presente en cantidades abundantes en las partes aéreas de plantas del género *Centaurea*, conteniendo tres grupos hidroxilo en su estructura y siendo su esqueleto es especialmente lábil, con lo que su modificación química controlada no es sencilla.

Esta molécula presenta un desafío en cuanto a la obtención de derivados acilados en forma selectiva, con lo que el empleo de lipasas resulta una estrategia atractiva debido a su gran selectividad y a que pueden ser utilizadas en condiciones suaves de reacción.

En base a lo que se acaba de mencionar, se propuso como objetivo la aplicación de metodologías quimioenzimáticas para la obtención de derivados acetilados de quinicina de manera selectiva en distintas posiciones de su estructura.

Asimismo, la obtención de derivados acilados de cadena media y larga de un producto bioactivo resulta atractiva debido a que éstos pueden presentar actividad incrementada con respecto a su precursor. Este hecho puede deberse a la mejora en las propiedades de penetración de los mismos al ser más lipofílicos. En este contexto, se propuso aplicar los conocimientos adquiridos en la síntesis de derivados acetilados en la preparación de derivados de quinicina acilados con ácidos de cadena media y larga. El Esquema II.2 resume las estrategias empleadas en la obtención de derivados acilados de quinicina.



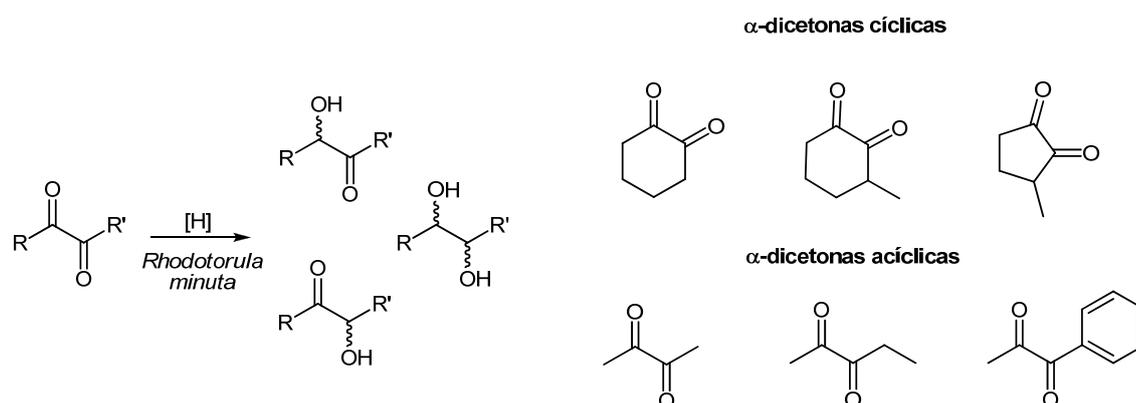
Esquema II.2. Estrategias empleadas en la obtención de derivados de quinicina.

II.3. Reducción biocatalítica de dicetonas vecinales

En el capítulo anterior se ha discutido el empleo de células enteras en la reducción de compuestos carbonílicos. En este sentido, las levaduras se han empleado con éxito en la obtención de compuestos de interés farmacológico.

Por otro lado, muchas α -hidroxicetonas y α -dioles quirales pueden ser utilizados en la síntesis de fármacos y auxiliares quirales para síntesis asimétrica entre otros productos. La utilización de levaduras para su obtención resulta una estrategia interesante para su obtención.

Se proyectó estudiar el desempeño de la levadura *Rhodotorula minuta* en la reducción asimétrica de compuestos α -dicarbonílicos para la obtención de α -hidroxicetonas y α -dioles quirales. Para ello se decidió utilizar varias α -dicetonas cíclicas y acíclicas con diferentes sustituyentes y enol ésteres de algunas de las mismas como sustratos. Se estudiaron los parámetros de la reacción enzimática variando las condiciones experimentales: sistemas de solventes, tiempo, relación biomasa/sustrato, cultivos frescos y liofilizados, etc.. El Esquema II.3 resume los objetivos planteados en esta sección.



Esquema II.3. Reducción de dicetonas vecinales empleando *Rhodotorula minuta* como biocatalizador. A la derecha aparecen las α -dicetonas que se propusieron como sustratos en esta reacción.

II.4. Síntesis de poliamidoaminas lineales catalizada por lipasas

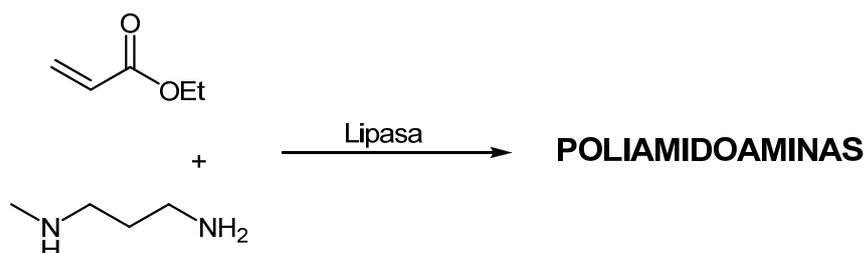
La promiscuidad catalítica en lipasas ha sido discutida en la introducción. En este contexto se pueden diferenciar dos aspectos:

- Catálisis en otras sustituciones nucleofílicas sobre un grupo acilo diferentes de la hidrólisis de ésteres.
- Catálisis en reacciones distintas a la sustitución nucleofílica sobre un grupo acilo: condensaciones aldólicas, adiciones de Michael, polimerizaciones en cadena.

Sobre el primero se ha realizado un sinnúmero de trabajos sobre la aplicación de lipasas en reacciones de esterificación, transesterificación, aminólisis y tiólisis de sustratos de muy variada naturaleza en los últimos treinta años. En cambio, sobre el segundo aspecto existe un desarrollo mucho menor. Es muy poco lo que se conoce sobre la selectividad con la que operan estas nuevas reacciones promiscuas y sobre cuál será la preferencia catalítica de las lipasas en sistemas donde puede tener lugar más de un tipo de reacción.

Siguiendo este razonamiento, nos hemos propuesto estudiar un sistema en el cual sea hipotéticamente posible que ocurran reacciones de aminólisis, adición de Michael y polimerización en cadena. El objetivo en este caso fue el estudio de la reacción de acrilato de etilo y *N*-metil-1,3-diaminopropano catalizada por lipasas.

Se planteó el estudio de diversas condiciones de reacción y su impacto en los productos obtenidos. En especial, se enfocó el trabajo en la síntesis y caracterización de una poliamidoamina con arquitectura novedosa, sacando provecho de la capacidad de las lipasas para catalizar tanto reacciones de aminólisis como adiciones de Michael. El Esquema II.4 resume gráficamente este objetivo.



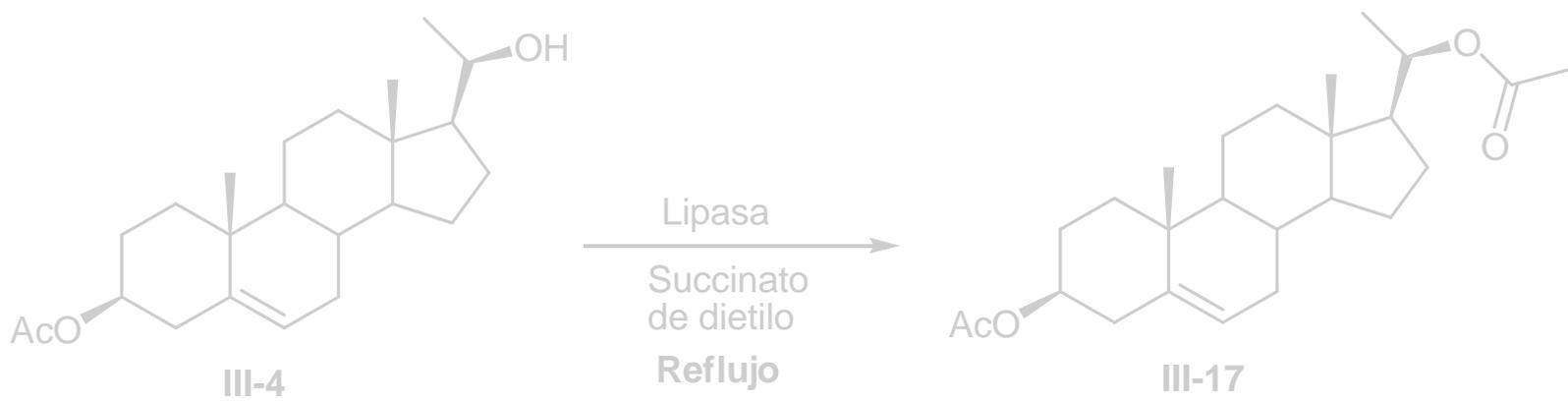
Esquema II.4. Obtención de poliamidoaminas a partir de acrilato de etilo y *N*-metil-1,3-diaminopropano empleando una lipasa como biocatalizador.

Bibliografía

1. Brutomesso, A. C.; Baldessari, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, 29, 149-153.
2. (a) Rustoy, E. M.; Ruiz Arias, I. E.; Baldessari, A. *Arkivoc*, **2005**, (xii), 175-180;
(b) Brutomesso, A. C.; Tiscornia, A.; Baldessari, A. *Biocatal. & Biotransf.*, **2004**, 22, 215-220; (c) Baldessari, A.; Bruttomesso, A. C.; Gros, E. G. *Helv. Chim. Acta*, **1996**, 79, 999-1004; (d) Baldessari, A.; Maier, M. S.; Gros, E. G. *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 4349-4352.

CAPÍTULO III

Resultados y discusión



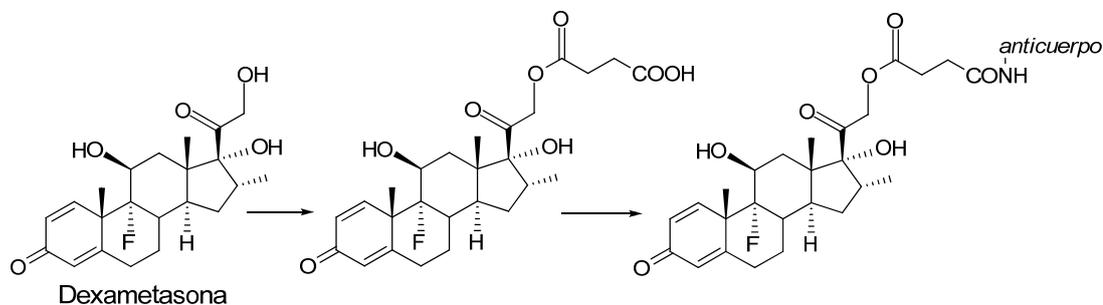
III. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE 20-HIDROXI-PREGNANOS

III.1. Introducción

Los ésteres de varios esteroides hidroxilados han sido empleados exitosamente como productos farmacéuticos y nutracéuticos, ya que este tipo de modificación suele mejorar su biodisponibilidad.^{1,2} Los derivados de pregnanos en el carbono 20 se utilizan en la preparación de conjugados proteína-esteroide que pueden emplearse como agentes antihormonales. En el campo de la endocrinología, estos agentes antihormonales son capaces de contrarrestar los efectos fisiológicos de las hormonas endógenas y pueden servir como herramientas clínicas y bioquímicas muy útiles.³

Los conjugados se pueden preparar por unión de derivados acilados de esteroides en el anillo D con grupos pendientes de los aminoácidos que integran la cadena proteica.

Los conjugados esteroide-proteína presentan múltiples aplicaciones. Se utilizan en cromatografía de afinidad para el aislamiento de proteínas específicas que posean sitios de unión a esteroides,⁴ y en novedosas estrategias de liberación controlada de fármacos. Como ejemplo de esto último se puede mencionar la liberación intracelular selectiva de dexametasona en las células endoteliales mediante la administración de un conjugado de la misma con un anticuerpo.⁵ En el Esquema III.1 se muestra la preparación de este conjugado esteroide-proteína.



Esquema III.1. Preparación de un conjugado esteroide-proteína.

En muchos trabajos se ha demostrado la eficacia de los esteroides succinilados en la síntesis de conjugados. Por ejemplo, Erlanger y colaboradores demostraron que 20 de los 60

grupos amino superficiales de la seroalbúmina bovina pudieron ser conjugados con 21-hemisuccinato de desoxicorticosterona, lo que representa una eficiencia de 33,33% en la reacción de conjugación.⁶ Cuando se empleó el 11 α -hemisuccinato de progesterona se lograron conjugar hasta 36 moléculas de esteroide por molécula de proteína.⁷ Estos conjugados pudieron ser preparados formando un enlace amida con los grupos amino libres en los residuos de lisina superficiales de la seroalbúmina bovina haciéndolos reaccionar con un anhídrido mixto.⁸

Teniendo en cuenta la preparación de succinatos de esteroides, la correspondiente al 21-hemisuccinato de dexametasona, por ejemplo, es muy sencilla. El producto, que puede obtenerse con alto rendimiento, se prepara haciendo reaccionar la dexametasona con anhídrido succínico en exceso y 4-dimetilaminopiridina durante 24 horas a temperatura ambiente.⁹ Se ha descrito así la preparación de una variedad de hemisuccinatos de esteroides, siendo algunos de ellos productos comerciales. Para muchos hemiésteres de ácido succínico y esteroides en varias posiciones de su esqueleto se pueden encontrar varios ejemplos de aplicación.

En la posición 3:

hemisuccinato de colesterol^{10a}

hemisuccinato de pregnenolona;^{10b}

en la posición 6:

hemisuccinato de 6 β -hidroxiprogesterona;^{10c}

en la posición 11 α :

hemisuccinato de 11 α -hidroxiprogesterona;^{10d}

en la posición 17:

17-hemisuccinato de medroxiprogesterona^{10e}

17-hemisuccinato de 17 β -estradiol,^{10f}

y fundamentalmente en la posición 21:

21-hemisuccinato de dexametasona (ya mencionado anteriormente),⁸

21-hemisuccinato de 6 α -metilprednisolona,^{10g}

21-hemisuccinato de hidrocortisona,^{10h}

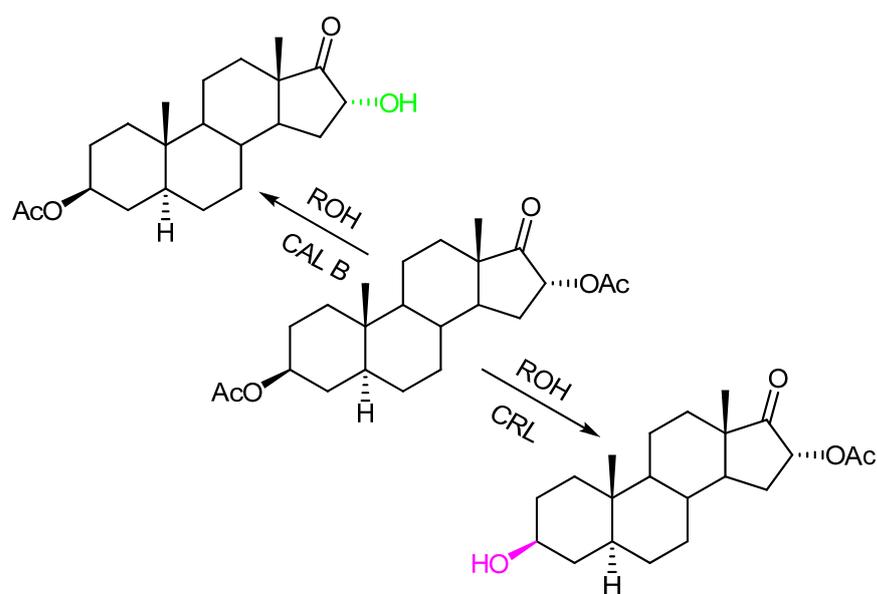
21-hemisuccinato de 6 β -hidroxicortisol,¹⁰ⁱ entre otros.

En contraste con lo mencionado anteriormente, la preparación de estos hemisuccinatos de esteroides en la posición 20 por la vía química convencional no ha dado buenos resultados. Es por ello que hemos considerado el uso de lipasas para llevar a cabo esta reacción, ya que han constituido una alternativa económica y efectiva para la preparación de varios ésteres de esteroides, partiendo de ésteres etílicos, metílicos o ácidos carboxílicos en condiciones suaves de reacción.

En particular, se ha encontrado que es posible la esterificación selectiva de esteroides polihidroxilados mediante catálisis enzimática, jugando ésta un rol importante en la interconversión de grupos funcionales por medio de transformaciones regioselectivas.¹¹⁻¹⁴

En nuestro laboratorio hemos estudiado la aplicación de lipasas en reacciones de acilación y alcoholisis sobre una variedad de sustratos esteroidales.¹⁵⁻¹⁹ En el caso de las reacciones de esterificación y transesterificación de esteroides polifuncionales, hemos observado que las lipasas pueden actuar sobre sustituyentes tanto del anillo A como del D.¹⁵⁻¹⁷

Además, se ha observado, en androstanos y pregnanos, que la lipasa de *Candida rugosa* mostraba preferencia por los grupos hidroxilo o acilo del C-3, mientras que la lipasa de *Candida antarctica* catalizaba las mismas reacciones sobre el anillo D.¹⁷

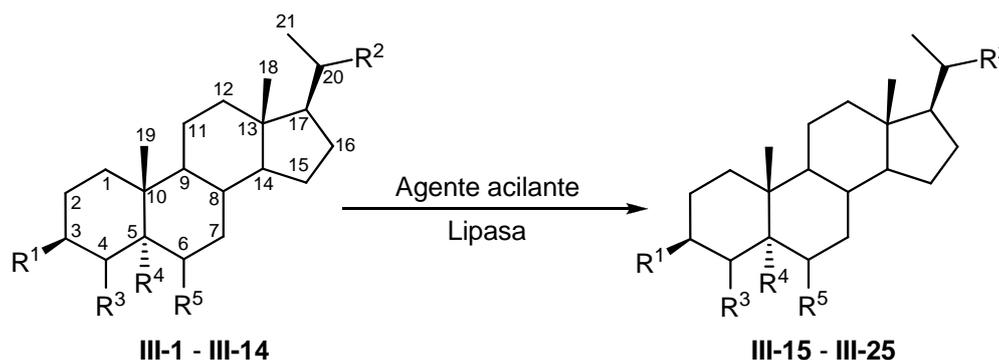


Teniendo en cuenta estas propiedades, hemos preparado distintas series de ésteres de ácidos grasos de la dehidroepiandrosterona¹⁸ y del 3,17 β -estradiol.¹⁹

Tabla III.1. Sustratos empleados y productos obtenidos en acilación enzimática de 20-hidroxipregnanos.

Sustrato	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Producto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
III-1	-OH	- α -OH	-H	Δ^5		III-15	-OH	- β -OAc	-H	Δ^5	
III-2	-OH	- β -OH	-H	Δ^5		III-16	-OAc	- β -OAc	-H	Δ^5	
III-3	-OAc	- α -OH	-H	Δ^5		III-17	-OAc	- β -OCO(CH ₂) ₂ COOEt	-H	Δ^5	
III-4	-OAc	- β -OH	-H	Δ^5		III-18	-OH	- β -OCO(CH ₂) ₂ COOEt	-H	Δ^5	
III-5	-OAc	- α -OH	-H	-H	-H	III-19	-OAc	- β -OCO(CH ₂) ₂ COOEt	-H	-H	-H
III-6	-OAc	- β -OH	-H	-H	-H	III-20	-OSiMe ₂ <i>t</i> -Bu	- β -OCO(CH ₂) ₂ COOEt	-H	Δ^5	
III-7	-OSiMe ₂ <i>t</i> -Bu	- α -OH	-H	Δ^5		III-21	=O	- β -OCO(CH ₂) ₂ COOEt	Δ^4		-H
III-8	-OSiMe ₂ <i>t</i> -Bu	- β -OH	-H	Δ^5		III-22	=O	- β -OCO(CH ₂) ₂ COOEt	-H	-H	-H
III-9	=O	- α -OH	Δ^4		-H	III-23	-O(CH ₂)O-	- β -OCO(CH ₂) ₂ COOEt	-H	Δ^5	
III-10	=O	- β -OH	Δ^4		-H	III-24	-OAc	- β -OCO(CH ₂) ₂ COOCH ₂ C ₆ H ₅	-H	Δ^5	
III-11	=O	- α -OH	-H	-H	-H	III-25	-OSiMe ₂ <i>t</i> -Bu	- β -OCO(CH ₂) ₂ COOCH ₂ C ₆ H ₅	-H	Δ^5	
III-12	=O	- β -OH	-H	-H	-H						
III-13	-O(CH ₂)O-	- α -OH	-H	Δ^5							
III-14	-O(CH ₂)O-	- β -OH	-H	Δ^5							

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en esta sección del presente trabajo de tesis se describen los pasos realizados para la obtención de acetatos y succinatos de pregnanos hidroxilados en la posición 20. Los sustratos empleados y los productos obtenidos se detallan en la Tabla III.1 y el Esquema III.2.



Esquema III.2. Obtención de derivados acilados de 20-hidroxipregnanos. La identidad de los productos se detalla en la Tabla III.1.

Para llevar a cabo este emprendimiento se plantearon los siguientes objetivos:

- Acetilación de 3,20-dihidroxi-pregn-5-eno con acetato de etilo empleando lipasas y distintos agentes acetilantes.
- Acilación enzimática de pregnanos hidroxilados en la posición 20 empleando ácido succínico y derivados del mismo.
- Aplicación de los resultados obtenidos en la síntesis de 20 β -hemisucciniloxi-5 α H-pregnan-3-ona.

Para los dos primeros ítems la estrategia se centró en la optimización de condiciones que mostraran diferentes comportamientos de regio y estereoselectividad, ya que el hidroxilo 20 puede encontrarse en la configuración α o β . En el último ítem se optimizaron las condiciones para la obtención estereoselectiva de ésteres mixtos de ácido succínico y pregnanos hidroxilados en la posición 20. Como ya se mencionó, estos ésteres son intermediarios útiles para la preparación de conjugados esteroide-proteína. Se estudió la influencia de distintos sustituyentes en la posición 3 y de la presencia de insaturaciones en las posiciones 4 y 5 de los sustratos, en el rendimiento de las reacciones enzimáticas. También se realizaron experimentos computacionales que permitieron justificar la estereoselectividad obtenida.

III.2. Optimización de las variables experimentales para las reacciones de acilación

Se comenzó evaluando la actividad desarrollada por lipasas de diferentes fuentes en distintos solventes para los sustratos $3\beta,20\alpha$ -dihidroxi-pregn-5-eno (**III-1**) y $3\beta,20\beta$ -dihidroxi-pregn-5-eno (**III-2**), y luego para el resto de los sustratos que se presentaron en la Tabla III.1. Las primeras reacciones se llevaron a cabo a 55°C con una relación enzima/sustrato de 10 usando lipasas provenientes de 5 orígenes diferentes: lipasa de *Candida antarctica* B (CAL B), lipasa de *Rhizomucor miehei* (LIP), lipasa de *Candida rugosa* (CRL), lipasa pancreática porcina (PPL) y lipasa de *Pseudomonas* sp. (PS-C); y 7 solventes: alcohol teramílico, acetona, acetonitrilo, éter diisopropílico, cloroformo, tolueno y hexano. El curso de todas las reacciones se controló, en primera instancia, por medio de cromatografía en capa delgada.

III.2.1. Reacciones de acetilación enzimática de $3\beta,20\alpha$ -dihidroxi-pregn-5-eno (**III-1**) y $3\beta,20\beta$ -dihidroxi-pregn-5-eno (**III-2**)

Las reacciones de acetilación se estudiaron evaluando el desempeño de las distintas lipasas mencionadas en la sección anterior sobre los epímeros con hidroxilo 20α y 20β , **III-1** y **III-2**, empleando acetato de etilo como solvente y agente acilante. También se utilizaron otros agentes acilantes: acetato de vinilo y acetato de isopropenilo, empleando los solventes mencionados al principio de la Sección III.2. Como productos de estas reacciones se obtuvieron los derivados acilados **III-3**, **III-4**, **III-15** y **III-16** cuyas proporciones fueron variables dependiendo de los sustratos y las condiciones de reacción empleadas. En la Tabla III.2 se muestran los resultados obtenidos.

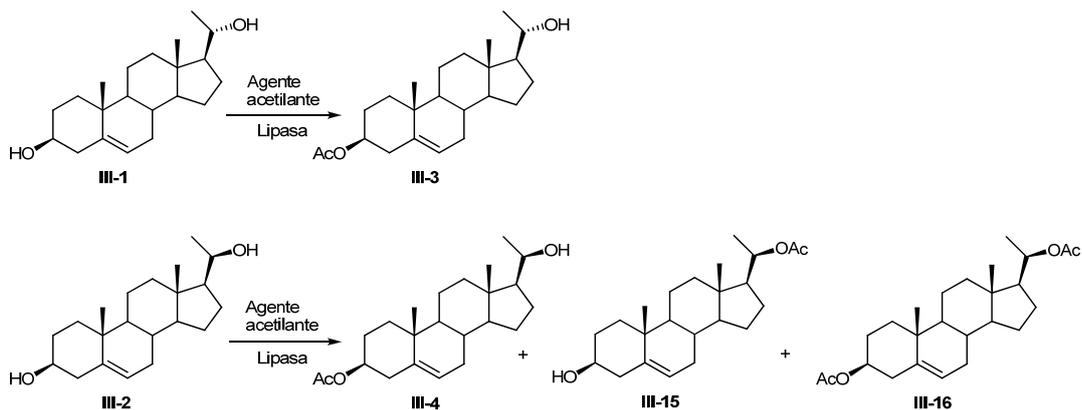


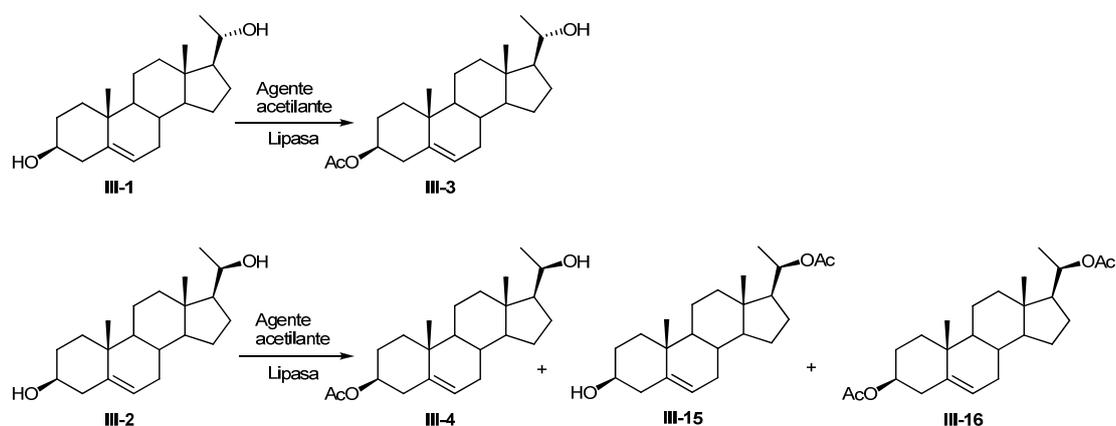
Tabla III.2. Acetilación enzimática de III-1 y III-2.

Sustrato	Enzima	Solvente	Agente acilante	Rendimiento%			
				III-3	III-4	III-15	III-16
III-1	CRL	AcOEt	AcOEt	17	-	-	-
III-1	PS-C	AcOEt	AcOEt	34	-	-	-
III-1	CAL B	AcOEt	AcOEt	33	-	-	-
III-1	LIP	AcOEt	AcOEt	-	-	-	-
III-2	CRL	AcOEt	AcOEt	-	17	-	-
III-2	PS-C	AcOEt	AcOEt	-	27	12	-
III-2	CAL B	AcOEt	AcOEt	-	23	26	15
III-2	LIP	AcOEt	AcOEt	-	-	13	-
III-1	PS-C	Hexano	AcOEt	22	-	-	-
III-1	PS-C	Acetona	AcOEt	-	-	-	-
III-1	PS-C	Dioxano	AcOEt	-	-	-	-
III-1	PS-C	DIPE	AcOEt	12	-	-	-
III-1	PS-C	Tolueno	AcOEt	-	-	-	-
III-1	PS-C	Acetonitrilo	AcOEt	-	-	-	-
III-2	PS-C	Hexano	AcOEt	-	20	-	33
III-2	PS-C	Acetona	AcOEt	-	-	-	-
III-2	PS-C	Dioxano	AcOEt	-	-	-	-
III-2	PS-C	DIPE	AcOEt	-	36	-	19
III-2	PS-C	Tolueno	AcOEt	-	-	-	-
III-2	PS-C	Acetonitrilo	AcOEt	-	-	-	-
III-1	LIP	DIPE	AcOEt	-	-	-	-
III-1	LIP	Hexano	AcOEt	-	-	-	-
III-2	LIP	DIPE	AcOVin	-	-	33	-
III-2	LIP	DIPE	AcOiPr	-	-	24	-
III-2	PS-C	DIPE	AcOVin	-	58	-	24
III-2	PS-C	DIPE	AcOiPr	-	40	-	16

DIPE: éter diisopropílico, AcOVin: acetato de vinilo, AcOiPr: acetato de isopropenilo.

Todas las reacciones se llevaron a cabo a 55° C, agitadas a 200 rpm durante 72 horas. La relación agente acilante/sustrato empleada en las reacciones en las que el agente acilante no era a su vez solvente fue de 10.

En estos experimentos se encontró que las reacciones en las cuales se empleó CAL B como catalizador fueron poco selectivas, dando como resultado sólo **III-3** cuando el sustrato era **III-1** y una mezcla de **III-4**, **III-15** y **III-16** cuando el sustrato era **III-2**. Al emplear LIP, la acilación fue selectiva sobre el hidroxilo 20 sólo cuando se intentó acetilar **III-2**, mientras que **III-1** no rindió ningún producto de reacción en estas condiciones. La acilación fue totalmente selectiva sobre el hidroxilo en la posición 3 si el biocatalizador utilizado era CRL, aunque con rendimientos modestos. La utilización de PS-C en vez de CRL dio lugar, al igual que cuando se empleó CAL B, a **III-3** a partir de **III-1** y permitió el incremento en **III-4** a partir de **III-2** con respecto a CAL B. No obstante una cierta cantidad de derivado monoacetilado en la posición 3 **III-16** aparecía como producto secundario en estas condiciones con **III-2** como sustrato. Aparentemente este producto se forma únicamente a partir de **III-4**, ya que no se pudo detectar la presencia de **III-15** durante el transcurso de la reacción.



Estos resultados indican que la acilación en la posición 20 es totalmente estereoselectiva, obteniéndose los derivados acilados de los epímeros cuyo carbono 20 tiene configuración absoluta *R* (configuración relativa β). Las tres enzimas LIP, PS-C y CAL B mostraron el mismo comportamiento estereoselectivo.

Teniendo en cuenta la selectividad alcanzada, se continuó estudiando el resto de los parámetros de reacción con el objeto de lograr las condiciones óptimas para los casos con mejores resultados de selectividad y rendimiento: LIP/DIPE/AcOVin para hidroxilo en posición 20 y PS-C/DIPE/AcOVin para hidroxilo en posición 3. Para ello se analizó la

influencia de los siguientes parámetros experimentales sobre la reacción: relación enzima/sustrato (E/S) y relación agente acilante/sustrato.

III.2.1.1. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S)

La relación E/S óptima se estudió a través de la reacción de **III-2** con acetato de vinilo en una relación agente acilante/sustrato de 10, empleando PS-C y LIP como catalizadores y DIPE como solvente. El tiempo de reacción fue de 72 horas. Las conversiones fueron estimadas mediante RMN ^1H , comparando las áreas de la señal del protón del metino en carbono 3 y carbono 20, acilado y sin acilar. El protón del metino en carbono 3 tiene un desplazamiento químico de 3,59 ppm cuando está sustituido con hidroxilo y de 4,58 ppm cuando está sustituido con acetato. Del mismo modo, el protón del metino en carbono 20 presenta un desplazamiento químico de 3,72 ppm cuando está sustituido con hidroxilo y de 4,88 ppm cuando está sustituido con acetato. Estos son los valores experimentales hallados para los compuestos aislados, que también pudieron corroborarse consultando datos bibliográficos.²⁰ Los resultados obtenidos con ambos sistemas se presentan conjuntamente en la Figura III.1.

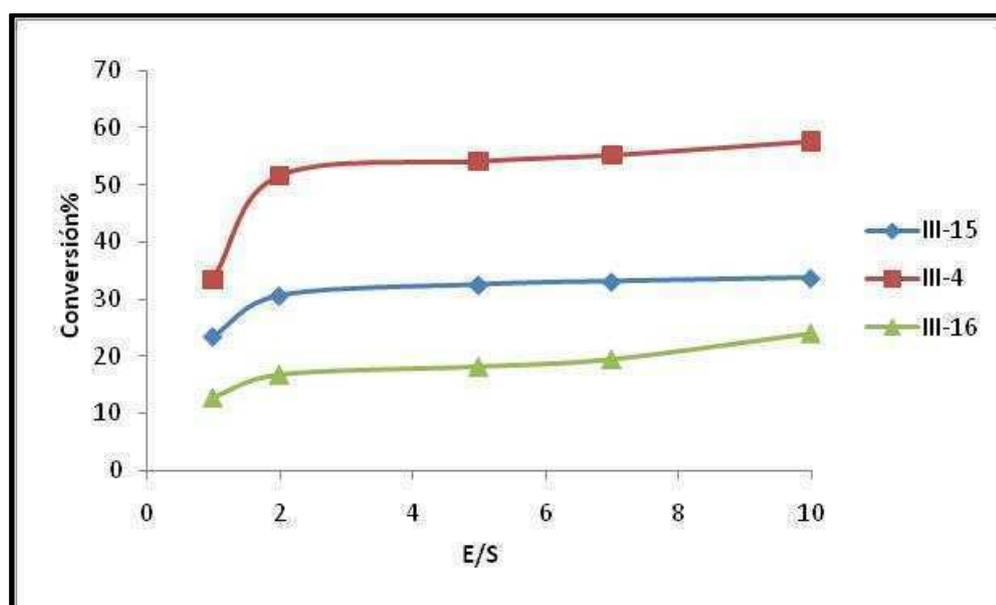


Figura III.1. Conversión de **III-2** en **III-15** vs. E/S en reacción empleando LIP y conversión de **III-2** en **III-4** y **III-16** vs E/S para reacción empleando PS-C.

En la figura se observa que empleando una relación E/S de 2 se pueden obtener buenos rendimientos para el producto de acetilación selectiva de **III-2** en la posición 3. Un incremento de carga de catalizador aumenta la producción del derivado diacetilado **III-16** sin provocar un aumento significativo de la conversión a **III-4**, lo que va en detrimento de la selectividad alcanzada.

III.2.1.2. Efecto de la relación agente acilante/sustrato

Finalmente se decidió estudiar la acetilación de **III-2** con LIP y PS-C en DIPE empleando varias relaciones de agente acilante/sustrato. Las reacciones se llevaron a cabo a 55° C, 200 rpm, con una relación E/S de 2 durante 72 horas. Las conversiones fueron estimadas mediante RMN ¹H, comparando las áreas de las señales de protón de metinos en carbono 3 y carbono 20 acilados y sin acilar, tal como se describió en la sección anterior. Los resultados se presentan en la Figura III.2.

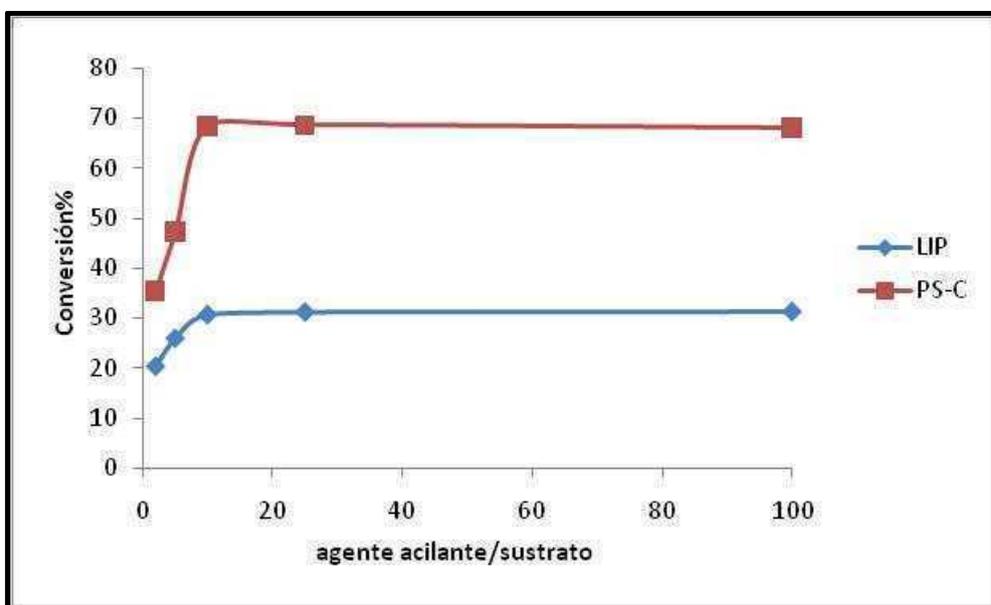


Figura III.2. Efecto de la relación agente acilante/sustrato sobre la conversión de **III-2** empleando LIP y PS-C.

Para las reacciones de acilación con PS-C se observó que la relación de conversión a productos **III-4** y **III-16** fue igual a 3 y se mantuvo constante en todas las reacciones.

III.2.1.3. Efecto del tiempo de reacción

A partir del análisis por CCD de las reacciones en estudio, se estimó que para la acetilación selectiva de **III-2** en el hidroxilo en la posición 3, las conversiones máximas eran alcanzadas luego de 4 horas de reacción. Por ello, se decidió repetir la reacción de **III-2** con acetato de vinilo catalizada por PS-C a 55° C, empleando DIPE como solvente, relación E/S de 2 y relación de agente acilante/sustrato de 10 dejando progresar la reacción por 4 horas. El análisis del crudo por RMN ¹H según ya se ha descrito, arrojó una conversión a **III-4** de 53% y al producto diacetilado **III-16** de 17%. Estos valores no difirieron significativamente de aquellos obtenidos luego de 72 horas de reacción.

III.2.1.4. Condiciones óptimas

En función de los parámetros estudiados, las condiciones óptimas para la obtención selectiva de derivados de **III-1** acetilados en la posición 3 y de **III-2** acetilados en la posición 3 o 20, fueron las siguientes:

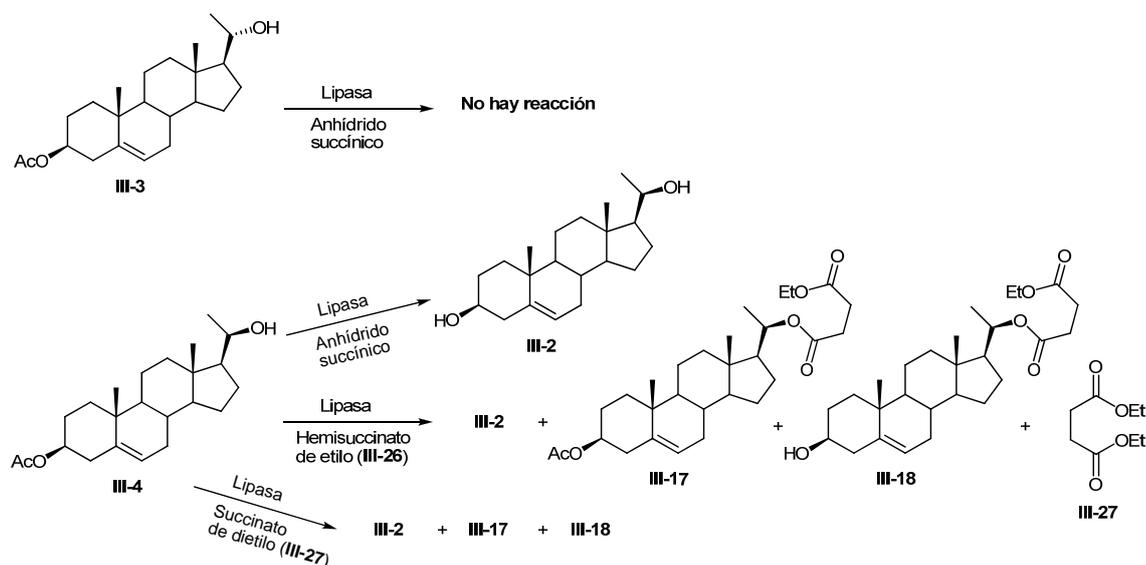
	Acetilación en 3	Acetilación en 20
Enzima	PS-C	LIP
Solvente	DIPE	DIPE
Temperatura	55° C	55° C
Tiempo de reacción	4 h	72 h
Enzima/sustrato	2	2
Agente acilante/sustrato	10	10

III.2.2. Reacción de 3 β -acetoxi-20 α -hidroxi-pregn-5-eno (**III-3**) y 3 β -acetoxi-20 β -hidroxi-pregn-5-eno (**III-4**) con ácido succínico y derivados

Como se había comentado anteriormente, la obtención de hemisuccinatos esteroidales en la posición 20 es difícil, por lo que en esta sección del trabajo se probaron condiciones diversas y varios agentes acilantes.

Inicialmente se llevaron a cabo reacciones de acilación de **III-3** y **III-4** en las condiciones descritas en la Sección III.2.1.4, empleando ácido succínico y anhídrido succínico como agentes acilantes en una relación agente acilante/sustrato de 10. Sólo con **III-4**, empleando CAL B y CRL como catalizadores y hexano y DIPE como solventes se obtuvo, luego de 48 horas, una señal de menor R_f que resultó ser el producto de hidrólisis del acetato en la posición 3 (**III-2**).

Con estos resultados se decidió cambiar el agente acilante por hemisuccinato de etilo (**III-26**), trabajando en las mismas condiciones. Este último se preparó a partir de anhídrido succínico y etanol, disolviendo la mezcla de ambos reactivos en piridina y dejándolos reaccionar durante una noche. Las reacciones en las cuales se utilizaron CAL B, CRL y LIP mostraron varios productos luego de 36 horas de reacción. Entre estos se identificaron los productos de hidrólisis en la posición 3, junto con los ésteres mixtos **III-18** y **III-17**, además de succinato de dietilo (**III-27**) (Esquema III.3).



Esquema III.3. Obtención de derivados succinilados de **III-4** empleando lipasas a 55° C.

Este hecho llevó a considerar el uso del succinato de dietilo como agente acilante. Este compuesto fue preparado en forma sencilla a partir de anhídrido succínico y etanol empleando CAL B como catalizador, de acuerdo a un procedimiento muy similar al desarrollado previamente en nuestro laboratorio.²¹ Luego de 48 horas de reacción, se detectaron los mismos productos que en los casos anteriores: **III-17** y **III-18**.

La identificación de los productos obtenidos se basó en el análisis comparativo de espectros de RMN ¹H entre los sustratos y los productos, teniendo en cuenta las asignaciones disponibles en bibliografía.²⁰ Las señales en las cuales se focalizó la atención fueron las correspondientes al protón del metino en la posición 3, metino en la posición 20 y metilo en la posición 18 (Tabla III.3).

Tabla III.3. Desplazamientos químicos de los protones 3, 18 y 20 de **III-4** y sus productos de reacción.

Compuesto	δ (ppm)			
	H-3	H-20	H-18	CH ₃ COO-
III-2	3,59	3,72	0,77	-
III-4	4,58	3,72	0,78	2,03
III-17	4,59	4,86	0,64	2,03
III-18	3,51	4,86	0,64	-

En los productos **III-2** y **III-18** se puede observar claramente el desplazamiento hacia campos más altos de la señal del protón en la posición 3 en aproximadamente 1 ppm con respecto a **III-4**. Esta observación es consistente con la hidrólisis de acetato, que también puede constatarse por la desaparición del singulete a 2,03 ppm en los espectros de RMN ¹H de ambos productos. La acilación en la posición 20 se verifica por el corrimiento de la señal del protón en esa posición de 3,72 a 4,86 ppm. El corrimiento del singulete correspondiente a los protones del metilo 18 de 0,77 a 0,64 ppm también es debido a la acilación en 20. La sustitución de acetato en la posición 3 y etil succinato en la posición 20 de **III-17** pudo verificarse mediante experimentos de RMN bidimensionales de correlación ¹H-¹³C HSQC y HMBC. La Figura III.3 muestra, por ejemplo, la correlación que existe entre los carbonos carbonílicos y algunas señales de protón.

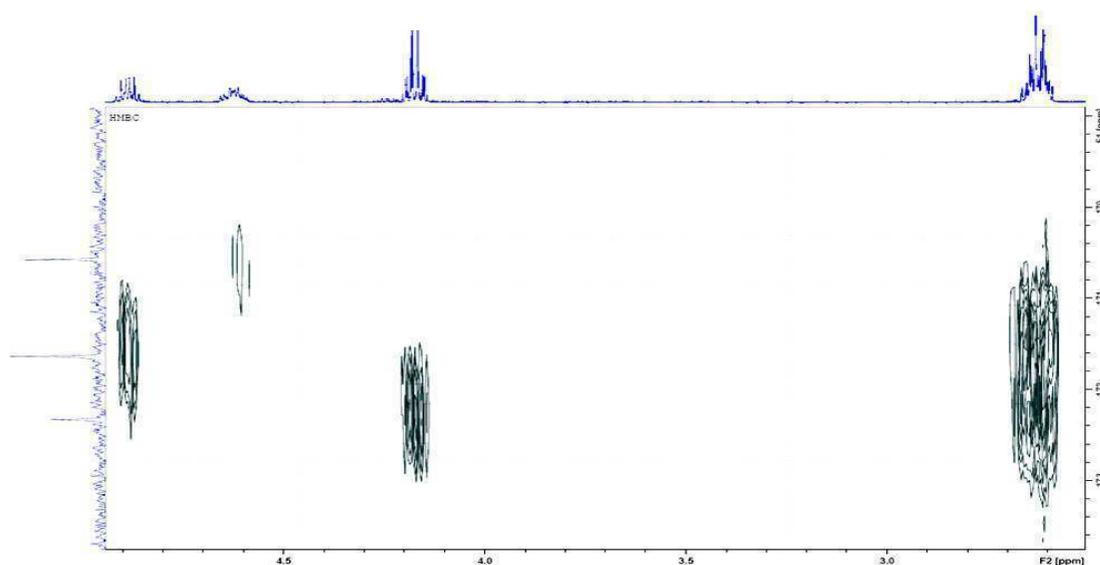


Figura III.3. Ampliación del espectro HMBC del compuesto **III-17**. Se muestran las correlaciones de los protones del segmento proveniente del ácido succínico ($\delta = 2,59$), metileno del éster etílico, metino en carbonos 3 y 20 con los tres carbonos carbonílicos ($\delta = 170,6; 171,6; 172,3$). Se puede observar que los carbonos carbonílicos que resuenan a 171,6 y 172,3 ppm correlacionan ambos con los protones a 2,59 ppm. La señal del carbonilo a 171,6 ppm correlaciona sólo con la señal del protón en carbono 20, mientras que la señal a 172,3 ppm correlaciona con los protones del metileno del éster etílico. La señal del carbonilo a 170,6 ppm correlaciona con la señal del protón en carbono 3 y con la señal del protón del acetato (no se muestra en la figura).

Para la señal de protones de metileno correspondiente al éster etílico ($\delta = 4,14$ ppm) se observó un acoplamiento con el metilo vecino ($\delta = 1,26$ ppm) cuya constante resultó ser 7,1 Hz. Esta señal evidenció además que ambos protones del metileno no son equivalentes, por lo que se observaron dos cuartetos superpuestos y fuertemente acoplados, tal como se muestra en la Figura III.4.

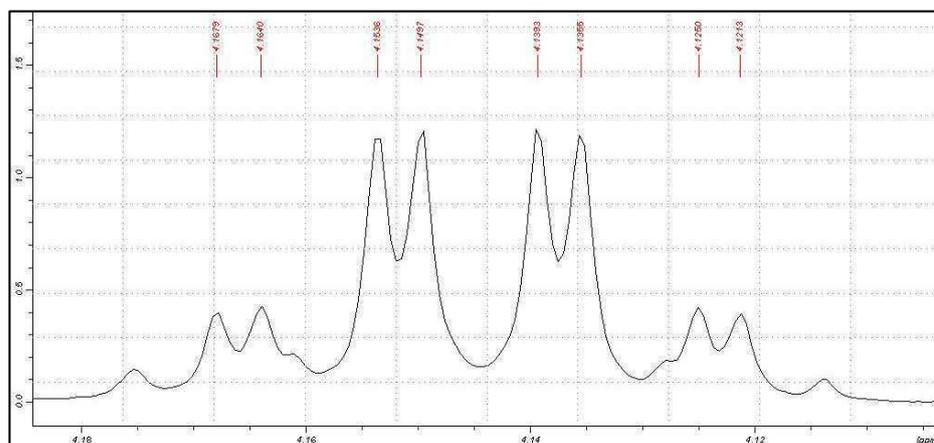


Figura III.4. Señal de metilenos del éster etílico para el compuesto **III-17** que muestra no equivalencia entre ambos protones.

Este no equivalencia química entre los protones del metileno demuestra que el éster etílico se encuentra efectivamente unido al esteroide. El espectro COSY de la Figura III.5 muestra sólo la correlación entre estos protones y el triplete a 1,26 ppm, mientras que el espectro HMBC muestra claramente cuál es la conectividad en la dirección opuesta: la correlación con el carbonilo a 172,3 ppm, la de éste con los protones de los metilenos de ácido succínico, y la de éstos con el carbonilo a 171,6 ppm y el protón en el metino 20.

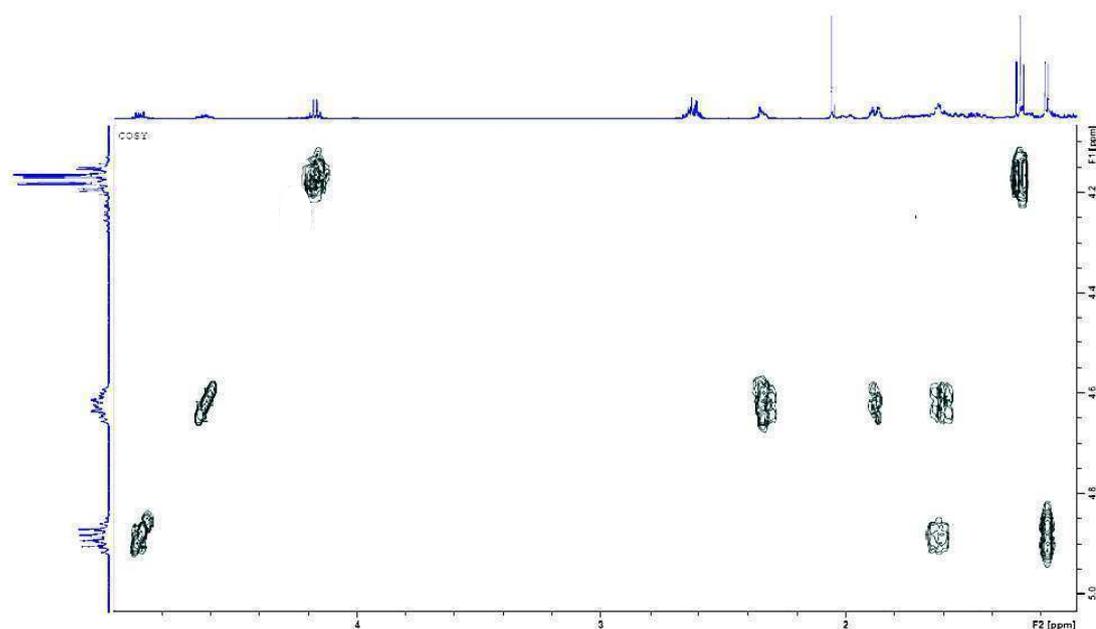


Figura III.5. Ampliación del espectro COSY del compuesto **III-17**. Se observan las correlaciones protón-protón para las señales correspondientes al éster etílico (4,14 y 1,26 ppm), entre otras.

La importancia de los resultados en las reacciones de succinilación radica no sólo en la regioselectividad lograda a través de la catálisis enzimática, que ya había sido observada en reacciones con compuestos relacionados,¹⁵⁻¹⁸ sino también en la estereoselectividad alcanzada con respecto a la configuración del carbono 20. Solamente reaccionaron los sustratos que poseían el hidroxilo en carbono 20 con configuración β . Aquellos cuyo hidroxilo en carbono 20 poseía la configuración α no fueron acilados en ninguna de las condiciones ensayadas.

Teniendo en cuenta la selectividad alcanzada, se continuó trabajando para optimizar las condiciones de reacción. Para ello se analizó la influencia de los siguientes parámetros experimentales sobre la misma: efecto de solvente, temperatura, relación enzima/sustrato (E/S), relación agente acilante/sustrato y naturaleza del agente acilante.

III.2.2.1. Efecto del solvente de reacción y fuente de la lipasa

Como se había mencionado anteriormente, CAL B, CRL y LIP fueron las enzimas que catalizaron la formación de productos a partir de **III-4** y succinato de dietilo. En la Tabla III.4 se muestran los productos obtenidos con estas enzimas en distintos solventes. Las reacciones se dejaron proseguir por 120 horas a 55° C, agitándose a 200 rpm. Se empleó una relación E/S de 10 y se usaron 10 equivalentes de agente acilante.

Los compuestos fueron separados por cromatografía en columna e identificados por métodos espectroscópicos.

Tabla III.4. Influencia del origen de la lipasa y solvente en los rendimientos de productos en la reacción de **III-4** con succinato de dietilo.

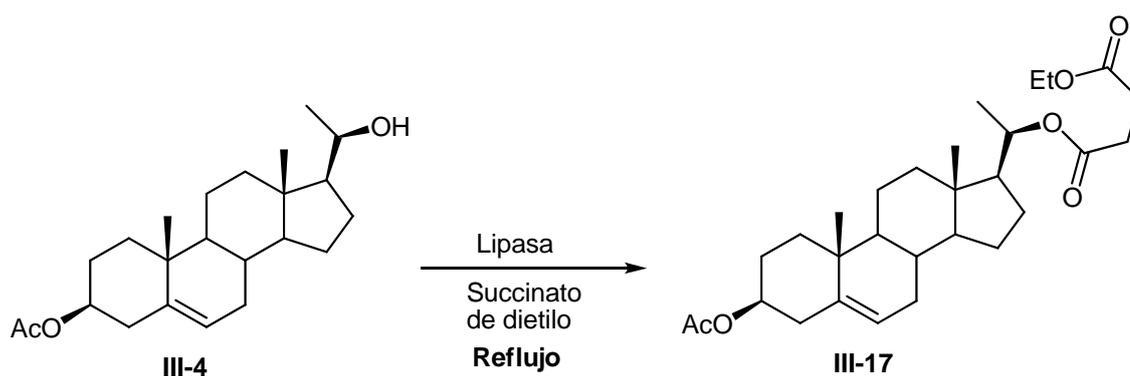
Solvente \ Lipasa	CAL B			CRL			LIP		
	III-2	III-17	III-18	III-2	III-17	III-18	III-2	III-17	III-18
Terbutanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetonitrilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetona	-	-	-	-	-	-	-	-	-
éter diisopropílico	-	-	-	10	9	21	-	-	-
Cloroformo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tolueno	2	5	6	9	-	3	5	4	6
Hexano	5	20	12	-	-	-	7	10	5

De estos resultados se puede inferir que CAL B y LIP, trabajando en solventes poco polares como hexano y tolueno, resultaron las más activas. No obstante, en ninguna de las condiciones ensayadas se pudo evitar la hidrólisis del acetato en la posición 3.

III.2.2.2. Efecto de la temperatura

Para analizar la influencia de la temperatura se efectuó nuevamente la reacción de acilación de **III-4** con succinato de dietilo, empleando CAL B y LIP como enzimas y hexano y tolueno como solventes. La relación E/S y sustrato/agente acilante utilizada fue 10. Se

comparó en todos los casos la reacción a 55° C con la temperatura de reflujo de los solventes empleados. No se observaron diferencias significativas en los tiempos de reacción necesarios ni en los productos obtenidos cuando se usó *n*-hexano (p.eb.: 69° C) como solvente. Sin embargo, el empleo de tolueno a reflujo significó una reducción de los tiempos de reacción y condujo a la obtención de **III-17** como único producto de reacción. A 55° C las mayores conversiones se habían logrado con hexano como solvente. A partir de estos resultados se puede inferir que la hidrólisis del acetato en la posición 3 ocurre paralelamente con la acilación en la posición 20, y que la última se acelera a la temperatura de reflujo de tolueno (p.eb.: 110° C), mientras que la primera no lo hace. Este hecho puede deberse a un efecto cinético o bien a la reducción de la actividad de agua causada por el reflujo de tolueno. En base a todo lo mencionado, se decidió probar también isooctano (p.eb.: 99° C) como solvente, debido a su similitud en polaridad con el hexano y su mayor punto de ebullición. Se efectuaron 2 reacciones en las condiciones anteriormente mencionadas, una a 55° C y la otra a reflujo. La reacción a temperatura más baja no presentó diferencias en rendimientos comparada con la reacción en hexano, mientras que a reflujo fue posible obtener **III-17** como único producto en 4 horas con un rendimiento de 43%. Este resultado es interesante debido a que un aumento de temperatura condujo a un aumento de selectividad de la enzima, tal como se muestra en el Esquema *III.4*.



Esquema III.4. Obtención selectiva del derivado succinilado **III-17** a partir de **III-4** empleando lipasas a temperaturas de reflujo de tolueno (110° C) e isooctano (99° C).

Existen antecedentes en los cuales se llevaron a cabo reacciones de acilación con CAL B a altas temperaturas con buenos resultados.²² A pesar de que la levadura de la cual proviene

CAL B es un microorganismo mesófilo y la temperatura con la que se trabajó es muy superior a la temperatura óptima de crecimiento del organismo, la enzima mostró una notable estabilidad. Esta característica de la enzima, de conservar su estabilidad a temperaturas elevadas puede explicarse mediante el efecto que producen el medio orgánico y la inmovilización. Ambos actuarían como una contención que impide la desnaturalización de la proteína. No se puede estimar con certeza en qué extensión actúan los dos efectos, pero la falta de reactividad de CRL a alta temperatura da cuenta de la estabilización adicional que produce la inmovilización de la enzima. Mientras que las enzimas CAL B y LIP empleadas están inmovilizadas sobre un soporte polimérico, la CRL utilizada se encuentra en su forma nativa, liofilizada y sin inmovilizar. La Tabla III.5 muestra todos los resultados obtenidos.

Tabla III.5. Efecto de la temperatura en la acilación de **III-4** con succinato de dietilo en diferentes condiciones.

Enzima	Solvente	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Rendimiento%		
				III-2	III-17	III-18
CAL B	Tolueno	55	120	2	5	6
CAL B	Tolueno	110	4	-	27	-
CAL B	Hexano	55	120	5	20	12
CAL B	Hexano	69	4	-	-	-
CAL B	Isooctano	55	120	4	19	13
CAL B	Isooctano	99	4	-	43	-
LIP	Tolueno	55	120	5	4	6
LIP	Tolueno	110	4	-	21	-
LIP	Hexano	55	120	7	10	5
LIP	Hexano	69	4	-	-	-
LIP	Isooctano	55	120	8	11	5
LIP	Isooctano	99	4	-	22	-

Por lo desarrollado anteriormente, se decidió analizar la estabilidad de CAL B en condiciones de reflujo, llegándose a la conclusión de que la misma no pierde su actividad en forma significativa luego de ocho ciclos de reacción, como se muestra en la Tabla III.6.

Tabla III.6. Conversión de **III-4** a **III-17** a lo largo de ocho ciclos empleando la misma enzima.

Ciclo	Conversión%	Ciclo	Conversión%
1	43	5	42
2	44	6	38
3	43	7	40
4	40	8	41

Condiciones: CAL B, isooctano, reflujo, $t = 4$ h, $E/S = 10$, agente acilante/sustrato = 10. La conversión fue estimada por RMN 1H como se describió anteriormente.

III.2.2.3. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S)

El estudio de la relación E/S se realizó a través de la reacción de **III-4** con succinato de dietilo empleando una relación agente acilante/sustrato de 10, CAL B como catalizador e isooctano a reflujo como solvente. El tiempo de reacción fue de 4 horas. Las conversiones fueron estimadas mediante RMN 1H , comparando las áreas de las señales del protón del metino en carbono 20 acilado y sin acilar. La Figura III.6 muestra los resultados obtenidos.

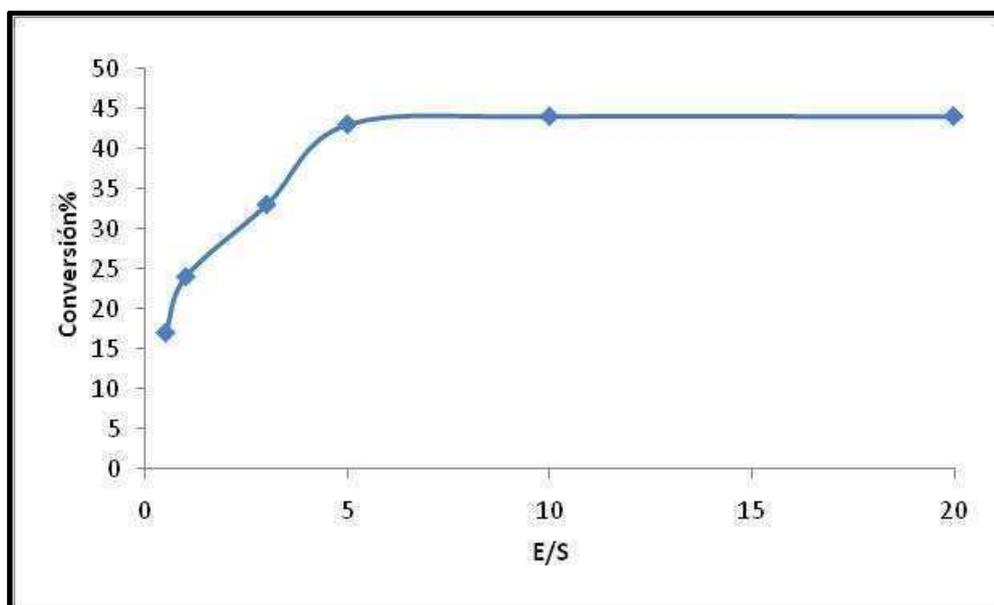


Figura III.6. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S) en la acilación de **III-4** con succinato de etilo catalizada por CAL B.

A partir de los mismos puede concluirse que la relación $E/S = 5$ es la más conveniente, ya que incrementos en esta relación no produjeron aumentos significativos en el rendimiento.

III.2.2.4. Efecto de la relación agente acilante/sustrato

Como último parámetro de ajuste, se decidió estudiar la succinilación de **III-4** con CAL B en isooctano a reflujo, empleando succinato de dietilo en diferentes proporciones. El tiempo de reacción fue de 4 horas y la relación E/S fue de 5. En todos los casos se verificó la obtención de **III-17** como único producto mediante cromatografía en capa delgada. Las conversiones fueron estimadas mediante RMN 1H , comparando las áreas de las señales del protón del metino 20 acilado y sin acilar.

A partir de los resultados presentados en la Figura III.7, se determinó que empleando una relación agente acilante/sustrato de 3,6 se obtuvieron las mayores conversiones. Se observó también una ligera disminución en las conversiones al emplear mayor relación de agente acilante/sustrato que podría deberse a un aumento de la polaridad del medio de reacción.

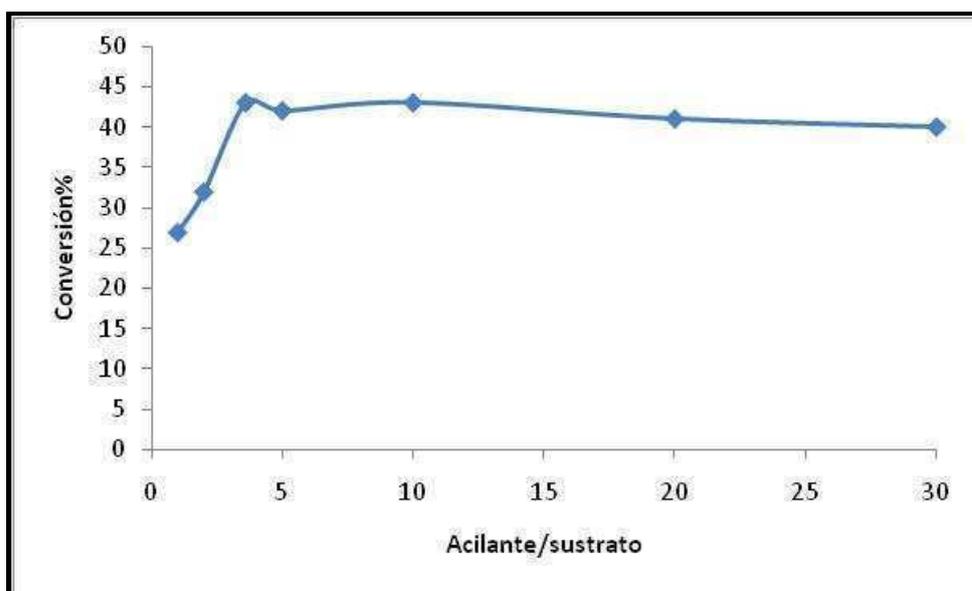


Figura III.7. Efecto de la relación agente acilante/sustrato en la acilación de **III-4** con succinato de dietilo catalizada por CAL B.

III.2.2.5. Efecto de la naturaleza del agente acilante: dos pasos en una sola operación

Como se comentó en la introducción de este capítulo, el planteo del camino enzimático tenía como objetivo la obtención de hemisuccinatos en la posición 20, de modo que se comenzó este estudio utilizando anhídrido succínico como agente acilante de **III-3** y **III-4** con diferentes solventes y lipasas. A 55° C sólo se logró obtener el producto de hidrólisis de **III-4** en la posición 3 (**III-2**) (Esquema *III.3*). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta parte del estudio, se repitió la reacción de succinilación enzimática en isoocetano a reflujo con ácido succínico y anhídrido succínico, sin que se obtuvieran productos de reacción.

El empleo de hemisuccinato de etilo permitió obtener, en cambio, el etilsucciniloxi derivado en la posición 20 de **III-4** (**III-17**); junto con succinato de dietilo. Este hecho llevó a pensar que el agente acilante es efectivamente el succinato de dietilo. Las reacciones llevadas a cabo con succinato de dietilo condujeron a la obtención del mismo derivado. Debido a que este agente acilante también puede ser preparado enzimáticamente²¹ se decidió intentar una reacción de dos pasos en una sola operación: en el primero la esterificación del anhídrido succínico para dar succinato de dietilo y en el segundo paso la transesterificación del éster formado con el esteroide hidroxilado en la posición 20. En un mismo recipiente se agregaron **III-4**, anhídrido succínico, CAL B y etanol; y se dejó reaccionar la mezcla a reflujo por 4 horas. La relación E/S empleada fue 5 y la proporción de anhídrido succínico:etanol:**III-4** fue 3:6:1. De este modo fue posible obtener **III-17** como único producto de reacción con un rendimiento de 39%, el cual no difiere significativamente de aquél que se obtiene empleando succinato de dietilo directamente. La Tabla *III.7* resume las reacciones de **III-4** con diferentes agentes acilantes.

Tabla III.7. Acilación de **III-4** con distintos derivados de ácido succínico.

Agente acilante	Relación acilante/ III-4	Rendimiento% de III-17
ácido succínico	10	-
anhídrido succínico	10	-
hemisuccinato de etilo	10	20
succinato de dietilo	3	43
anhídrido succínico + etanol	3	39

Condiciones: CAL B (E/S = 5) e isooctano a reflujo. t = 4 h.

III.2.2.6. Condiciones óptimas

A partir de los estudios realizados se eligieron las condiciones experimentales de reacción óptimas, que son las siguientes:

Enzima	CAL B
Solvente	Isooctano
Temperatura	99°C
Tiempo de reacción	4 h
Enzima/sustrato	5
Agente acilante/sustrato	3,6

En estas condiciones se pudo obtener **III-17** con un rendimiento de 43%. La reacción fue totalmente estereoselectiva, ya que 3 β -acetoxi-20 α -hidroxi-pregn-5-eno (**III-3**) no reacciona en estas condiciones.

III.2.3. Aplicación de la acilación con succinato de dietilo a otros 20-hidroxi-pregnanos

En vista de los resultados obtenidos se decidió extender la metodología descrita a la obtención de derivados succinilados de los 20-hidroxi-pregnanos **III-1**, **III-2** y **III-5-III-14** (Tabla III.8), con el objeto de verificar si los parámetros de selectividad encontrados con **III-3** y **III-4** se conservaban.

Tabla III.8. Reacciones de 20-hidroxi-pregnanos con succinato de dietilo y CAL B.

Sustrato	Producto	Rendimiento%
3 β ,20 α -dihidroxi-pregn-5-eno (III-1)	-	-
3 β ,20 β -dihidroxi-pregn-5-eno (III-2)	-	-
3 β -acetoxi-20 α -hidroxi-5 α H-pregnano (III-5)	-	-
3 β -acetoxi-20 β -hidroxi-5 α H-pregnano (III-6)	III-19	42
3 β -tert-Butildimetilsililoxi-20 α -hidroxi-pregn-5-eno (III-7)	-	-
3 β -tert-Butildimetilsililoxi-20 β -hidroxi-pregn-5-eno (III-8)	III-20	38
20 α -hidroxi-pregn-4-en-3-ona (III-9)	-	-
20 β -hidroxi-pregn-4-en-3-ona (III-10)	III-21	72
20 α -hidroxi-5 α H-pregnan-3-ona (III-11)	-	-
20 β -hidroxi-5 α H-pregnan-3-ona (III-12)	III-22	77
3,3-Etilendioxi-20 α -hidroxi-pregn-5-eno (III-13)	-	-
3,3-Etilendioxi-20 β -hidroxi-pregn-5-eno (III-14)	III-23	30

Las condiciones experimentales utilizadas fueron en todos los casos las especificadas en la Sección III.2.2.6. Los productos se purificaron por cromatografía en columna, obteniéndose en todos los casos sólidos de aspecto ceroso. La identidad de todos ellos fue confirmada por métodos espectroscópicos.

Los desplazamientos químicos de RMN ¹H típicos de los protones del metilo en carbono 18 y del metino en carbono 20 de los productos obtenidos son muy similares a los encontrados para los productos **III-17** y **III-18** (Tabla III.3). Esto es indicativo de la acilación del hidroxilo en carbono 20. Además se observó para todos los productos un

multiplete a 2,59 ppm correspondiente a los metilenos del segmento proveniente del ácido succínico, junto con un triplete a 1,25 ppm y dos cuartetos a 4,15 ppm. Estas últimas señales indican la presencia del éster etílico.

Los resultados mostraron que la estereoselectividad de la reacción se conservó en todos los casos, ya que sólo reaccionaron los epímeros con el hidroxilo 20 en configuración β (**III-6**, **III-8**, **III-10**, **III-12** y **III-14**); y los rendimientos fueron influenciados por la naturaleza del sustituyente presente en la posición 3. Como excepción, se puede destacar que $3\beta,20\beta$ -dihidroxi-pregn-5-eno (**III-2**) no reaccionó en las condiciones ensayadas, a pesar de diferir solamente en la identidad del sustituyente en el carbono 3.

Este comportamiento estereoselectivo de la enzima fue racionalizado mediante el uso de herramientas de modelado molecular. Existen antecedentes en los cuales el comportamiento selectivo de CAL B fue explicado con esta metodología.²³ Para ello se buscaron conformaciones estables de todos los sustratos ensayados, se situó el acilo en una estructura de CAL B obtenida de RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>)²⁴ y se sometieron los sustratos a experimentos de *docking* sobre el complejo acil-enzima generado.

Al realizar los experimentos de *docking*, se observó que la orientación más favorable para el hidroxilo de carbono 20 respecto al complejo acil-Ser 105 resultó ser aquél en el que el anillo A del esqueleto esteroideal se ubicaba en el extremo más interno del bolsillo catalítico, cerca del lazo formado por los residuos 38 a 44 (Pro-Gly-Thr-Gly-Thr-Thr-Gly) de la lipasa. El triptofano 104 permanece muy cerca del esteroide, forzando a los metilos 18 y 19 a ubicarse del lado opuesto a este residuo con respecto al plano imaginario formado por los anillos A-D. Para que la reacción se produzca, es necesario que el hidroxilo unido al carbono 20 presente una orientación adecuada, es decir, debe atacar directamente al carbono carbonílico del complejo acil-enzima por el lado opuesto al que lo hace la histidina 224 de la tríada catalítica. De este modo, podemos observar que la diferencia en reactividad entre los epímeros 20α y 20β -hidroxi puede ser explicada por la restricción conformacional que tiene el metilo 21 dentro del bolsillo catalítico (Figura III.8).

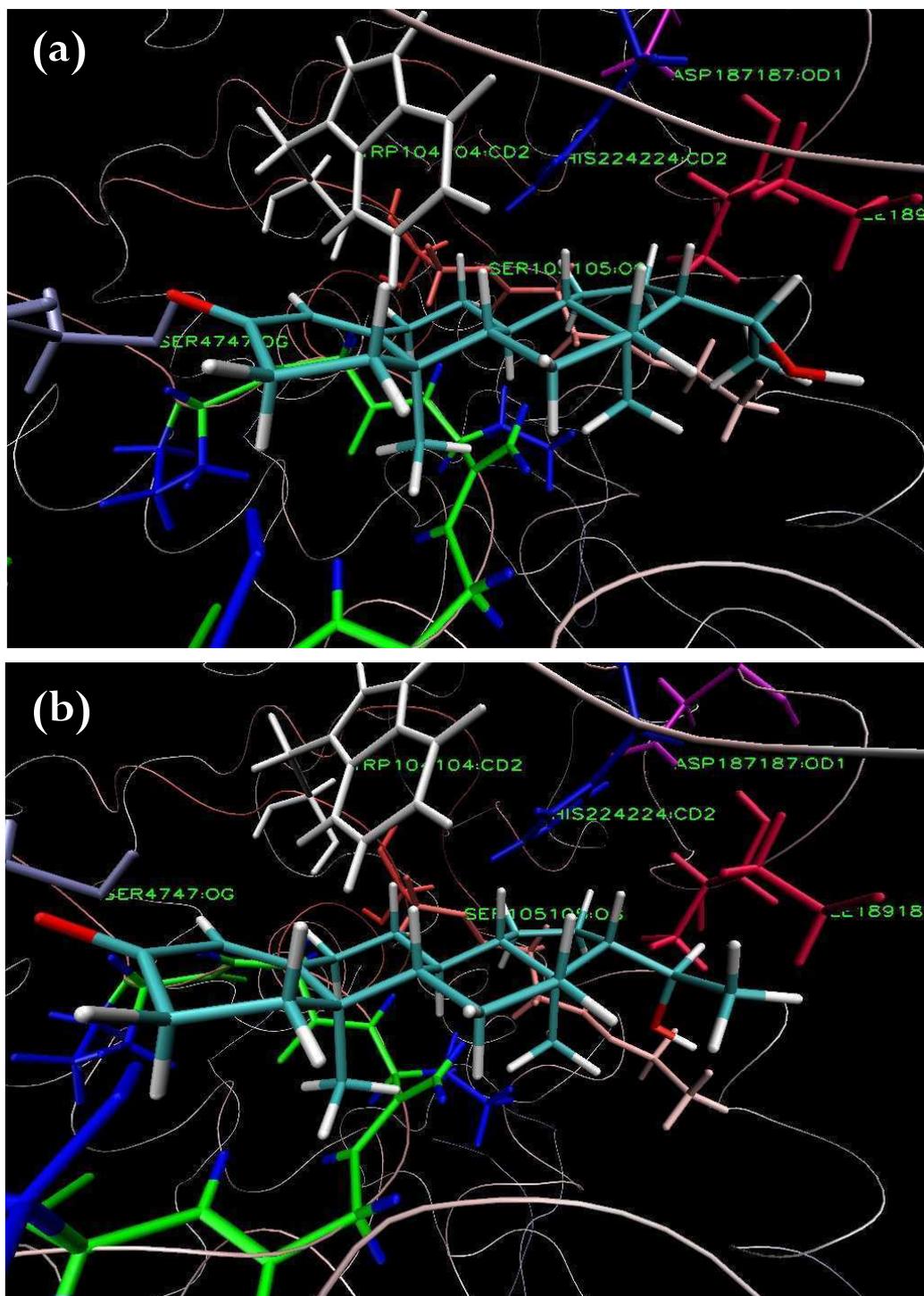


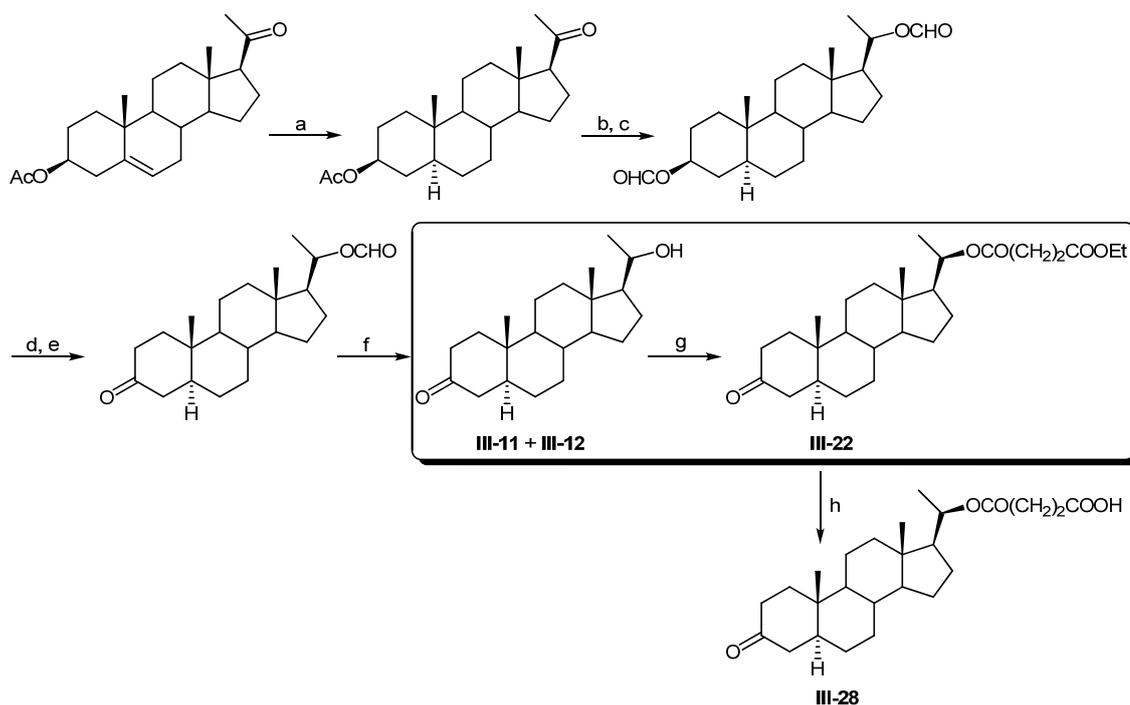
Figura III.8. (a) *Docking* de **III-9**. Trp 104 (blanco) e Ile 189 (rojo) hacen que todos los metilos se ubiquen por debajo de los anillos esteroidales. En este caso, el hidroxilo en posición 20 apunta hacia arriba del plano del papel, opuesto a la tríada catalítica: etilsucciniloxi-Ser 105 (marrón), His 224 (azul) y Asp 187 (violeta), y la reacción no es posible. También se puede observar la interacción de enlace hidrógeno entre el carbonilo y Ser 47 (gris) y la posición relativa de los residuos 38 a 44 (enlaces peptídicos verdes). (b) *Docking* de **III-10**. Para esta configuración, el hidroxilo en posición 20 puede atacar al acilo en el sitio activo, lo que explica la selectividad hacia los 20-(*R*)-hidroxipregnanos en la reacción de transesterificación catalizada por CAL B.

En los resultados de los experimentos de *docking* se pudo observar que existe una interacción estérica entre este metilo y la isoleucina 189, ubicada a una distancia aproximada de 3 ángstrom. De los sustituyentes del carbono 20, aquél que puede ubicarse más cerca de la isoleucina 189 es el hidrógeno. De este modo, si el hidroxilo en posición 20 es alfa, esta restricción en la rotación del enlace carbono 17 – carbono 20 ubica al metilo 21 más cerca del sitio activo y al hidroxilo alejándose del mismo; avalando esta observación la falta de reactividad de los sustratos con el hidroxilo en carbono 20 con configuración α . En cambio, si el hidroxilo en posición 20 tiene configuración β , el mínimo impedimento estérico entre la isoleucina 189 y el metilo 21 se alcanza con una conformación en la cual es el grupo hidroxilo el que está orientado hacia el sitio activo, pudiendo reaccionar libremente con el complejo acil enzima.

III.2.4. Aplicación de la acilación enzimática a la síntesis de 20 β -hemisucciniloxi-5 α H-pregnan-3-ona (III-28)

La metodología enzimática desarrollada permitió la síntesis de **III-28** a partir de acetato de pregnenolona. Este hemisuccinato es un compuesto novedoso que se puede aplicar como precursor en la síntesis de un conjugado esteroide-proteína que puede utilizarse en el estudio de la relación entre la esteroidogénesis y la espermatogénesis en anfibios machos *in vivo*.²⁵

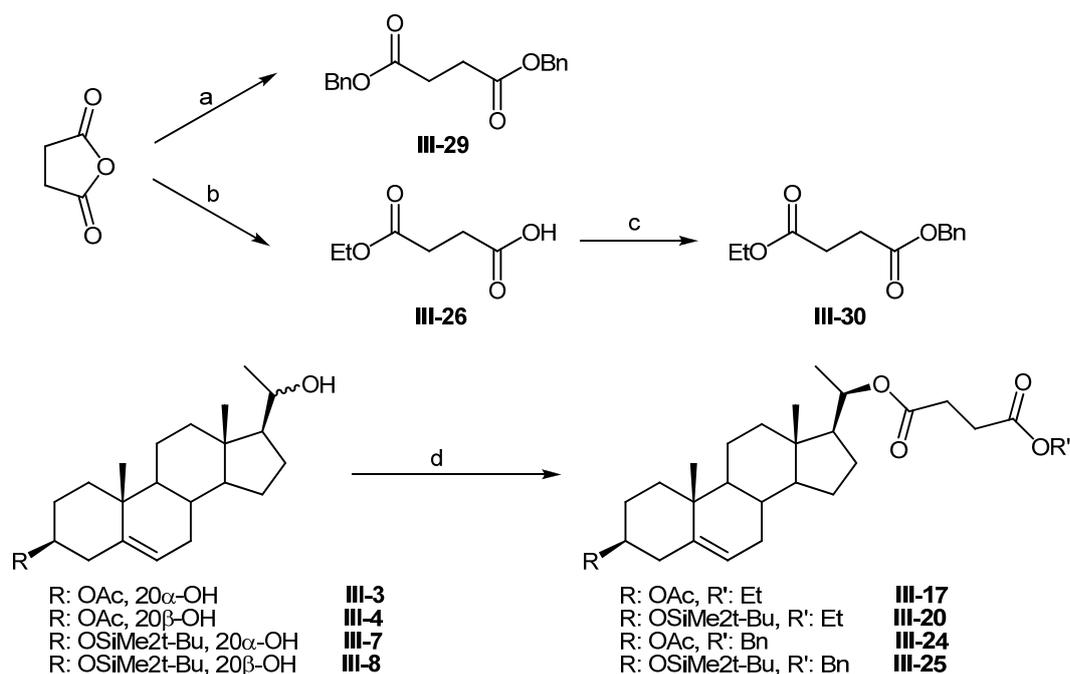
El Esquema *III.5* muestra la ruta sintética en la cual se incluye el paso enzimático de succinilación. Los pasos no enzimáticos fueron realizados por la Lic. Mayra Y. Machado Rada bajo la dirección del Dr. Alberto A. Ghini en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Buenos Aires. La ruta sintética completa involucrando la succinilación enzimática se encuentra publicada.²⁶



Esquema III.5. Síntesis quimioenzimática de 20β-hemisucciniloxy-5αH-pregnan-3-ona (**III-28**). El paso enzimático se encuentra recuadrado. Condiciones y reactivos: (a) H₂/Pd; (b) LiAlH₄, THF; (c) HOCOCOCH₃, piridina; (d) KHCO₃, MeOH; (e) PCC, BaCO₃, CH₂Cl₂; (f) KOH, MeOH; (g) anhídrido succínico, EtOH, CAL B, isooctano, reflujo; (h) óxido de bis-tributilestano, tolueno.²⁶

Con el objetivo de optimizar esta ruta sintética se sintetizaron también ésteres mixtos de ácido succínico con los esteroides **III-4** y **III-8**, y alcohol bencílico. Para ello primeramente se sintetizaron los posibles ésteres precursores: succinato de dibencilo (**III-29**) y succinato mixto de etilo y bencilo (**III-30**) (Esquema III.6). El primero se pudo sintetizar fácilmente a partir de alcohol bencílico y anhídrido succínico empleando CAL B como catalizador con un rendimiento de 65%. El alcohol bencílico excedente fue separado del producto por cromatografía en columna.

El compuesto **III-30** se sintetizó en 2 pasos: en el primero se obtuvo el hemisuccinato de etilo (**III-26**) y en el segundo paso se trató el producto **III-26** con alcohol bencílico y *N,N'*-diclohexilcarbodiimida en presencia de 4-dimetilaminopiridina como catalizador. El empleo de dos agentes acilantes diferentes tuvo como fin comparar rendimientos y selectividades en la reacción de transesterificación enzimática con los sustratos esteroidales.



Esquema III.6. Síntesis de los succinatos de bencilo esteroidales **III-24** y **III-25**. Condiciones: a) alcohol bencílico, CAL B; b) EtOH, piridina; c) alcohol bencílico, DCC, DMAP; d) **III-29** o **III-30**, CAL B. Cuando se empleó el succinato mixto **III-29** se obtuvieron también los productos **III-17** o **III-20** según el sustrato que se hubiera empleado (ver Tabla **III.9**).

La Tabla **III.9** muestra los resultados obtenidos de la reacción de **III-3**, **III-4**, **III-7** y **III-8** con ambos agentes acilantes.

Tabla III.9. Obtención de derivados acilados de **III-3**, **III-4**, **III-7** y **III-8** con los ésteres **III-29** y **III-30**.

Sustrato	Agente acilante	Rendimiento%			
		III-17	III-20	III-24	III-25
III-3	III-29	-	-	-	-
III-3	III-30	-	-	-	-
III-4	III-29	-	-	27	-
III-4	III-30	12	-	15	-
III-7	III-29	-	-	-	-
III-7	III-30	-	-	-	-
III-8	III-29	-	-	-	16
III-8	III-30	-	8	-	10

Condiciones: Isooctano; reflujo; CAL B; E/S = 5; Agente acilante/sustrato = 2,1; t = 4 h.

Se observó, al igual que en todas las reacciones anteriores, que la estereoselectividad hacia el hidroxilo 20 β continuó manteniéndose, ya que los sustratos **III-3** y **III-7** que tienen hidroxilo en carbono 20 con configuración α no reaccionaron en las condiciones empleadas. Los rendimientos comparados con los obtenidos de las reacciones con succinato de dietilo fueron algo menores. Este hecho puede deberse a que se empleó una relación de agente acilante/sustrato menor. Si bien un exceso mayor de agente acilante podría aumentar el rendimiento, esto mismo dificulta la purificación de los productos de reacción. El empleo del succinato mixto de etilo y bencilo (**III-30**) como acilante no incrementó sensiblemente los rendimientos globales y dio lugar a la obtención de los etilsucciniloxi derivados **III-17** y **III-20** (ya obtenidos por transesterificación con succinato de dietilo) junto con los bencilsucciniloxi derivados **III-24** y **III-25** respectivamente. De ello resulta evidente que no existe una selectividad de la enzima por etilo o bencilo hacia la reacción de transesterificación.

La identidad de los compuestos **III-24** y **III-25** fue confirmada por métodos espectroscópicos. El espectro de RMN ^1H de estos derivados muestra la señal característica de protón del metino en carbono 20 acilado ($\delta = 4,86$ ppm), la señal correspondiente a los metilenos provenientes del segmento del ácido succínico ($\delta = 2,65$ ppm) y las señales de la región bencílica ($\delta = 5,12$; $5,16$ y $7,35$ ppm). La existencia de dos señales para los protones del metileno bencílico en este caso que muestran diferente desplazamiento químico evidencia la no equivalencia entre ellos, al igual que lo que se había hallado para las señales del metileno del éster etílico anteriormente. En este caso, se observó un acoplamiento mutuo entre estas señales de cada protón del metileno con una constante de acoplamiento de $12,3$ Hz. Este hecho demuestra claramente la presencia de un acoplamiento geminal en los derivados preparados con alcohol bencílico. El espectro COSY de la Figura *III.9* muestra la presencia del acoplamiento entre ambos dobletes.

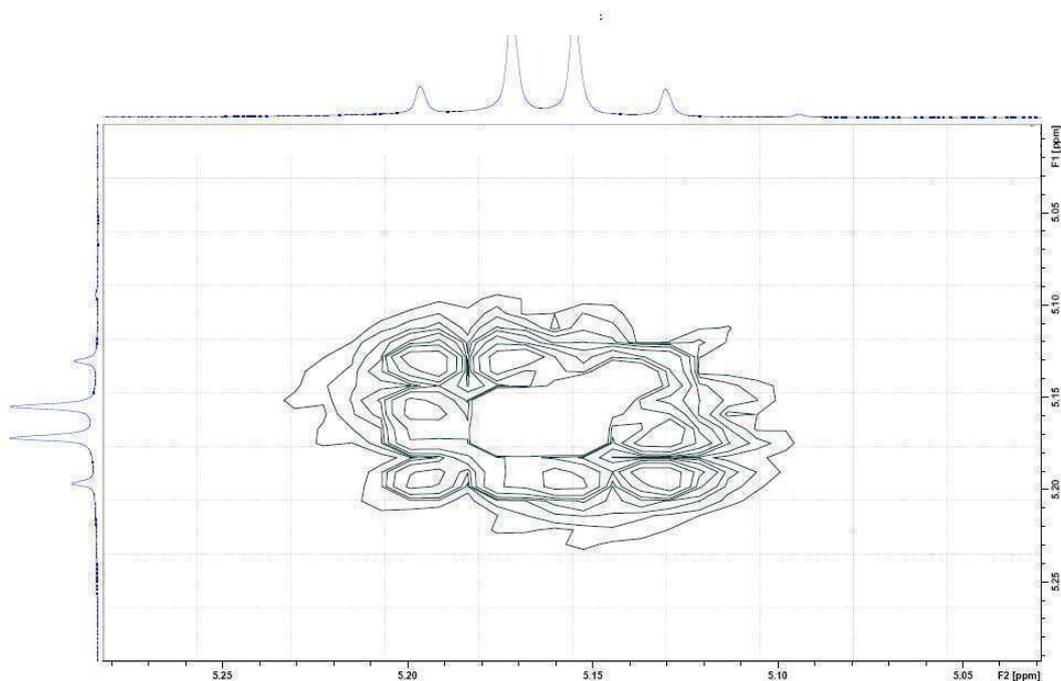
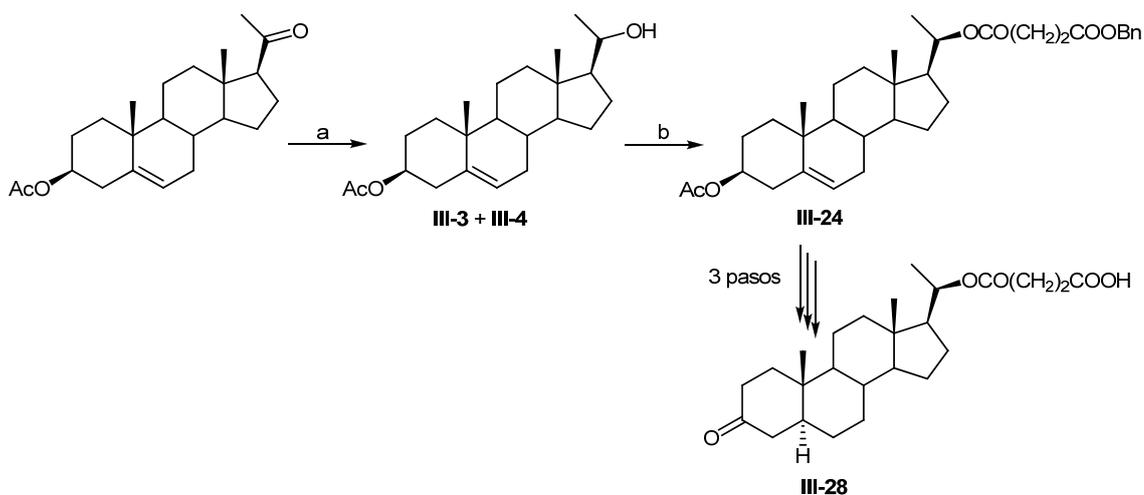


Figura III.9. Ampliación del espectro COSY del compuesto **III-24** en la región en la que aparecen las señales de los protones de metileno bencílico.

Estos nuevos derivados podrían ser útiles como intermediarios en una síntesis alternativa de **III-28**. La síntesis ya descrita consta de 8 pasos partiendo de acetato de pregnenolona (Esquema III.6). Utilizando el derivado **III-24**, por ejemplo, podría efectuarse en un solo paso la hidrólisis parcial del éster mixto generado de la reacción enzimática, con la hidrogenación del doble enlace en la posición 5. Del mismo modo, sería posible eliminar los pasos de formilación exhaustiva e hidrólisis selectiva en la posición 3. La síntesis de **III-28** de este modo podría llevarse a cabo en 5 pasos, ahorrándose hasta 3 pasos de síntesis (Esquema III.7).



Esquema III.7. Obtención de **III-24** y aplicación hipotética a la síntesis de **III-28**. Los 3 pasos finales deben involucrar un paso de hidrogenación, luego hidrólisis del grupo protector en la posición 3 y finalmente una oxidación del hidroxilo resultante.

Si bien la estrategia más corta resultó atractiva en un principio, analizándola en detalle no resulta conveniente. El etilsucciniloxi derivado **III-22** se pudo obtener enzimáticamente con un 77% de rendimiento empleando tanto succinato de dietilo como etanol y anhídrido succínico en el proceso de dos pasos en una sola operación. En cambio, la síntesis de **III-24** tuvo un rendimiento menor al 30%. Asimismo, no nos fue posible reproducir exitosamente condiciones de síntesis en una sola operación empleando alcohol bencílico y anhídrido succínico como las que se habían logrado cuando se empleó etanol. Tomando en cuenta estos resultados, consideramos que la alternativa sintética planteada a partir de la síntesis de ésteres bencílicos es menos eficaz que la propuesta en una primera instancia. No obstante, este planteo muestra que el empleo de lipasas en la síntesis del producto **III-28** habilitó la postulación de más de una estrategia sintética. Este hecho da cuenta de la versatilidad demostrada por el biocatalizador en esta aplicación.

III.3. Conclusión

El empleo de lipasas permitió la acilación regio- y estereoselectiva de pregnanos hidroxilados en las posiciones 3 y 20 del esqueleto esteroidal. Según las condiciones empleadas, fue posible dirigir la acetilación hacia uno u otro hidroxilo.

Con respecto a las reacciones de acetilación podemos destacar que:

- la acetilación sobre el hidroxilo 20 probó ser estereoselectiva, dando lugar a la formación de productos solamente si este grupo funcional poseía configuración relativa β ;
- la optimización de las condiciones de reacción permitió controlar la regioselectividad y así obtener derivados acetilados en la posición 20 o 3 con buenos rendimientos.

En relación a las reacciones de succinilación concluimos que:

- la reacción fue totalmente estereoselectiva, ya que sólo se obtuvieron los 20 β -etilsucciniloxi derivados;
- también se encontró que el rendimiento de la reacción dependía fuertemente de la sustitución del esteroide en la posición 3;
- los experimentos de *docking* mostraron una relación clara entre los rendimientos obtenidos y los factores estéricos que gobiernan el proceso de acilación en el sitio activo de la enzima. Estos mismos experimentos también lograron explicar de un modo adecuado el curso estereoselectivo de la reacción;
- se ensayaron varios agentes acilantes, siendo el succinato de dietilo el más efectivo. A raíz de esta circunstancia, el agente acilante también pudo ser preparado *in situ* para la acilación de los sustratos ensayados y así llevar a cabo reacciones de dos pasos en una única operación;
- las lipasas soportaron temperaturas del orden de los 100° C. Utilizando isooctano a reflujo como solvente la enzima no se inactivó y pudo volver a utilizarse en reacciones posteriores sin pérdidas significativas en el rendimiento;
- estos resultados pudieron encontrar aplicación en la síntesis quimioenzimática de 20 β -hemisucciniloxi-5 α H-pregnan-3-ona (**III-28**), un precursor sintético para la

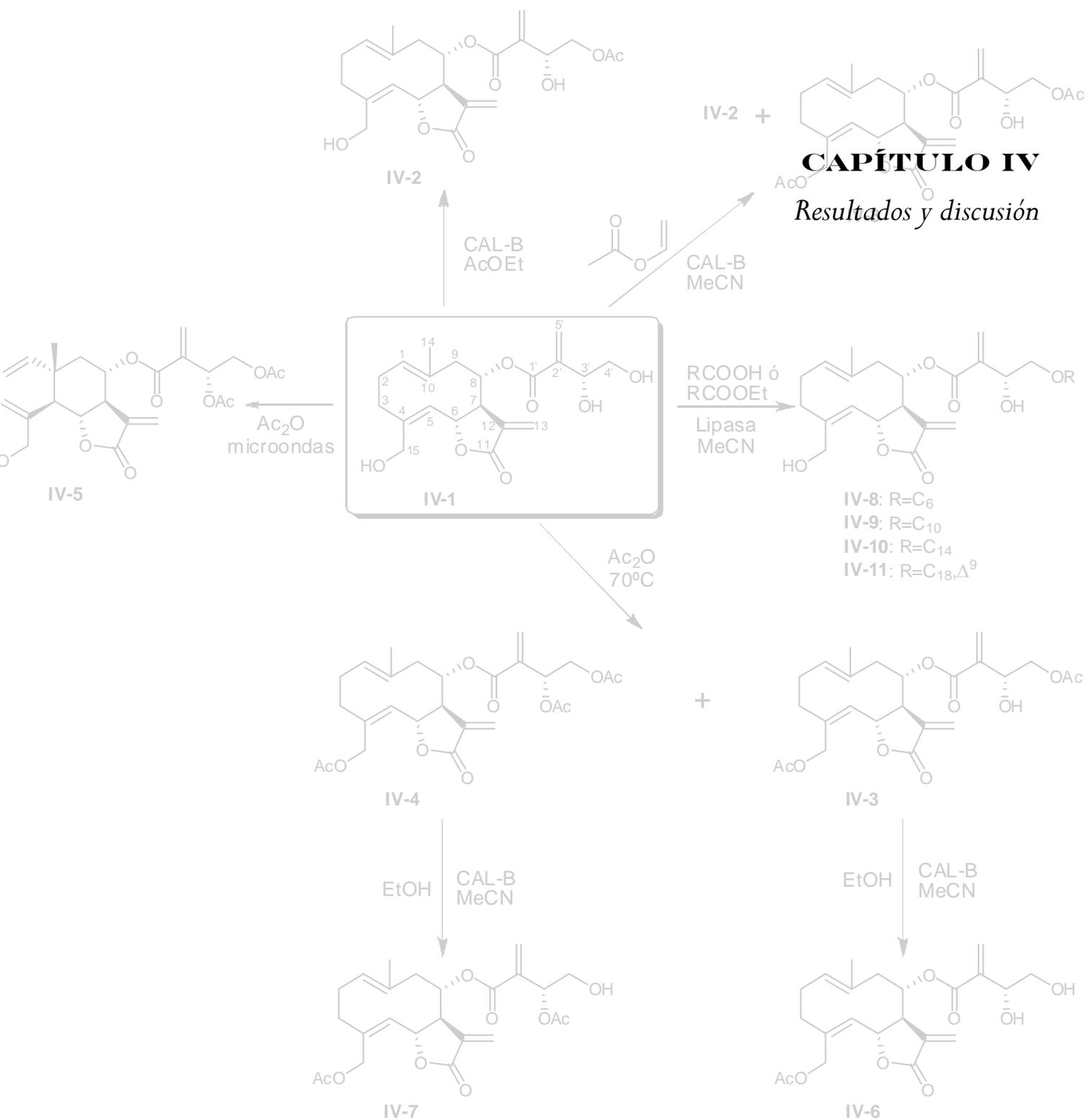
formación de un conjugado esteroide-proteína de aplicación específica en estudios metabólicos de anfibios;

- la versatilidad de la reacción enzimática permitió la síntesis de nueve derivados succinilados de pregnanos hidroxilados en la posición 20, todos ellos novedosos. En particular, la obtención de ésteres mixtos de ácido succínico con esteroides hidroxilados en la posición 20 y alcohol bencílico permite postular variaciones en la estrategia sintética para la obtención de 20β -hemisucciniloxi- $5\alpha H$ -pregnan-3-ona (**III-28**). Si bien esta alternativa conduciría a ahorrar pasos sintéticos, consideramos en este caso que el bajo rendimiento de estas últimas reacciones con respecto a la que permitió la obtención de **III-22** en la síntesis que se llevó a cabo mostró que la alternativa planteada es potencialmente menos eficaz.

Bibliografía

1. Koshiro, A. Jpn. Kokai Tokkyo Koho 62 296 894, 1987; *Chem. Abstr.* **1989**, *110*, 210969p.
2. Sato, H.; Nave, R.; Nonaka, T.; Yoshihisa, N.; Atsuhiko, N.; Mochizuki, T.; Takahama, S.; Kondo, S.; Wingerzahn, M. *BMC Pharmacology*, **2007**, *7*, doi: 10.1186/1471-2210-7-7.
3. Grunwell, J. F.; Benson, H. D.; Johnston, J. O.; Petrow, V. *Steroids*, **1976**, *27*, 759-771.
4. Joe, I.; Ramirez, V. D. *Steroids*, **2001**, *66*, 529-538.
5. Everts, M.; Kok, R. J.; Asgeirsdottir, S. A.; Melgert, B. N.; Moolenaar, T. J. M.; Koning, G. A.; van Luyn, M. J. A.; Meijer, D. K. F.; Molema, G. *J. Immunol.*, **2002**, *168*, 883-889.
6. Erlanger, F. B.; Borek, F.; Beiser, S. M.; Lieberman, S. *J. Biol. Chem.*, **1959**, *234*, 1090-1094.
7. Uscheva, A. A.; Stankov, B. M.; Zachariev, S. G.; Marinova, C. P.; Kanchev, L. N. *J. Steroid Biochem.*, **1986**, *24*, 699-702.
8. Melgert, B. N.; Olinga, P.; Jack, V. K.; Molema, G.; Meijer, D. K. F.; Poelstra, K. *J. Hepatol.*, **2000**, *32*, 603-611.
9. McLeod, A. D.; Friend, D. R.; Tozer, T. N. *Int. J. Pharm.*, **1993**, *92*, 105-111.
10. (a) Ding, W.; Qi, X.; Li, P.; Maitani, Y.; Nagai, T. *Int. J. Pharm.*, **2005**, *300*, 38-47; (b) Kuwada, M.; Sugano, S.; Maki, J. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2001**, *49*, 417-431; (c) Prakash, B. S.; Meyer, H. H. D.; Schallenberger, E.; van Der Wiel, D. F. M. *J. Steroid Biochem.*, **1987**, *28*, 623-627; (d) Arevalo, J. H.; Hassig, C. A.; Stura, E. A.; Sims, M. J.; Taussig, M. J.; Wilson, I. A. *J. Mol. Biol.*, **1994**, *241*, 663-690; (e) Kim, J. K.; Adam, A.; Loo, J. C. K.; Ong, H. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1995**, *13*, 885-891; (f) Feng, W.; Graumann, K.; Hahn, R.; Jungbauer, A. *J. Chromatogr., A*, **1999**, *852*, 161-173; (g) Mehvar, R. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, **2000**, *744*, 293-298; (h) Foroutan, S. M.; Watson, D. G. *Int. J. Pharm.*, **1997**, *157*, 103-111; (i) Patel, S. B.; Khatkatay, I.; Desai, M. P.; Betrabet, S. S.; Toddywalla, V. S. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1994**, *48*, 293-296.

11. Ferrero, M.; Gotor, V. In: *Stereoselective Biocatalysis*; Patel, R. M. Ed.; Marcel Dekker: New York, **2000**; pp 579-631.
12. Cruz Silva, M. M.; Riva, S.; Sá e Melo, M. L. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 3065-3073.
13. Secundo, F.; Carrea, G.; De Amici, M.; Joppolo di Ventimiglia, S.; Dordick, J. S. *Biotechnol. Bioeng.*, **2003**, *81*, 391-396.
14. Cruz Silva, M. M.; Sá e Melo, M. M.; Parolin, M.; Tessaro, D.; Riva, S.; Danieli, B. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, *15*, 1173-1179.
15. Baldessari, A.; Maier, M.S.; Gros, E. G. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 4349-4352.
16. Baldessari, A.; Bruttomeso, A.C.; Gros, E. G. *Helv. Chim. Acta*, **1996**, *79*, 999-1004.
17. Brutomeso, A.C.; Baldessari, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, *29*, 149-153.
18. Brutomeso, A.C.; Tiscornia, A.; Baldessari, A. *Biocatal. & Biotransf.*, **2004**, *22*, 215-220.
19. Rustoy, E. M.; Ruiz Arias, I. E.; Baldessari, A. *Arkivoc*, **2005**, (xii), 175-180.
20. Hill, R. A.; Kirk, D. N.; Makin, H. L. J.; Murphy, G. M. *Dictionary of Steroids*; Chapman and Hall: Cambridge, 1991; p 735.
21. Baldessari, A.; Mangone, C. P.; Gros, E. G. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2001**, *11*, 335-341.
22. Kennedy, J. F.; Kumar, H.; Panessar, P. S.; Marwaha, S. S.; Goyal, R.; Parmar, A.; Kaur, S. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2006**, *81*, 866-876.
23. Solares, L. F.; Lavandera, I.; Gotor-Fernandez, V.; Brieva, R.; Gotor, V. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 3284-3291.
24. Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A. *Structure*, **1994**, *2*, 293-308.
25. Rosemblyt, C.; Pozzi, A. G.; Ceballos, N. R. *J. Comp. Physiol. B*, **2006**, *176*, 559-566.
26. Monsalve, L. N.; Machado Rada, M. Y.; Ghini, A. A.; Baldessari, A. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 1721-1730.



IV. OBTENCIÓN DE DERIVADOS ACILADOS DE QUINICINA

IV.1. Introducción

Los terpenos y terpenoides constituyen familias de productos naturales de muy amplia diversidad y complejidad estructural. Esta variedad trae como consecuencia que su ámbito de aplicación sea muy heterogéneo, yendo desde la industria alimenticia y cosmética como componentes de fragancias y sabores, hasta compuestos activos en productos farmacéuticos, productos de limpieza y de higiene personal y pesticidas.

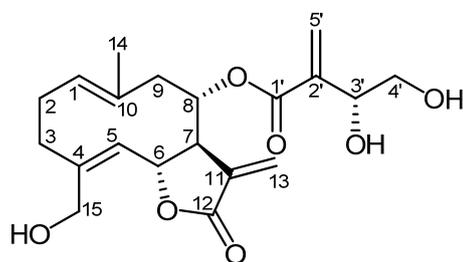
Por otro lado, los avances en el descubrimiento de productos naturales hacen que nuevos terpenos y terpenoides sean caracterizados tanto desde el punto de vista de su identidad química como de sus propiedades biológicas y potenciales aplicaciones.

Dentro de los terpenoides, las lactonas sesquiterpénicas constituyen una clase de metabolitos secundarios que pueden encontrarse en algunas familias vegetales, principalmente en varios géneros de *Asteraceae* como por ejemplo *Centaurea*.¹ Este género comprende alrededor de 1000 especies y las partes aéreas de muchas de ellas son utilizadas en medicina popular. En muchos casos, las preparaciones obtenidas a partir de estas plantas medicinales han mostrado actividad antimicrobiana,² antibacteriana,³ citotóxica y fitotóxica.⁴

Los metabolitos más importantes encontrados en plantas del género *Centaurea* comprenden compuestos acetilénicos, flavonoides y terpenoides. Estos últimos son principalmente sesquiterpenos con esqueletos de guaiano, germacrano y eudesmano.



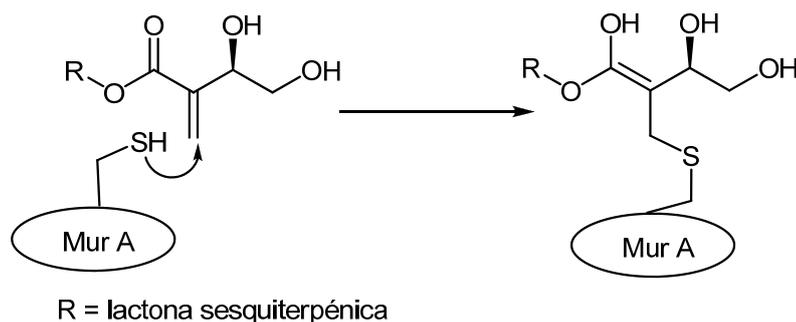
En algunas especies del género *Centaurea* el sesquiterpeno aislado más abundante es el germacranólido quinicina (IV-1). Este compuesto ha sido muy estudiado con el objeto de investigar sus propiedades antibacterianas, citotóxicas y antifúngicas.⁵⁻⁷



Quinicina (IV-1)

Con respecto a su actividad antibacteriana, es interesante observar que la presencia de una función éster en el carbono 8 del esqueleto germacrano es importante para su función biológica, siendo los derivados acilados en esta posición activos contra bacterias Gram positivas.³ La quinicina es un inhibidor irreversible de la enzima bacteriana Mur A (EC 2.5.1.7). Esta enzima es responsable del primer paso de biosíntesis de precursores de peptidoglicano en citoplasma. Los metabolitos producidos por Mur A son esenciales para la vida de la bacteria, y es por eso que esta enzima es un blanco muy utilizado para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos.⁸

El mecanismo de acción de la quinicina puede ser explicado en términos moleculares si se tiene en cuenta el sistema carbonílico α , β insaturado en la cadena lateral de la molécula (5', 2', 1', oxígeno). Se postula que la inactivación de Mur A se produce vía la adición nucleofílica del tiol de la cisteína 115 al doble enlace formando un complejo estable. La alquilación de este residuo produce una completa inhibición del sitio activo. El mecanismo propuesto se encuentra representado en el Esquema IV.1.



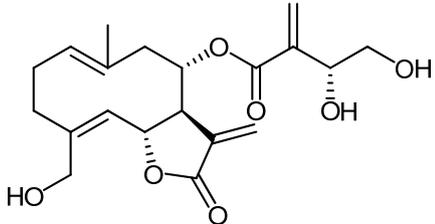
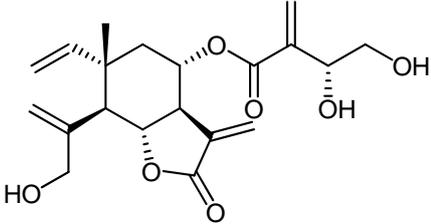
Esquema IV.1. Reacción de la cisteína 115 de Mur A con la cadena lateral de lactonas sesquiterpénicas.

La preparación de derivados semisintéticos de quinicina ha sido llevada a cabo utilizando métodos no enzimáticos^{3,9-11} y empleando hongos.¹²

En particular, se han ensayado entre otras reacciones oxidaciones, epoxidaciones, hidrólisis, acilaciones e isomerizaciones empleando metodologías propias de la química orgánica tradicional. Dentro de las isomerizaciones fue posible llevar a cabo reacciones de reordenamiento de Cope sobre derivados de quinicina de manera espontánea en solución a temperatura ambiente.

Se ha observado que el elemanólido 8 α -(3',4'-dihidroxi-2'-metilen-butanoiloxi)-11,13-dehidromelitensina, producto de reordenamiento de Cope de quinicina, muestra una actividad antibacteriana menor que esta última.³ En la Tabla IV.1 se muestran resultados de ensayos de actividad antibacteriana de ambos compuestos, extraídos de *Centaurea paniculata* subespecie *castellana*.

Tabla IV.1. Concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) para el germacranólido quinicina (IV-1) y su elemanólido isómero.

Compuesto	Cepa	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
 <p>Quinicina</p>	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	6,25
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12,5
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	25
	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212	3,12
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12,5
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	25
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	50
	<i>Salmonella typhi</i> Ty2 ATCC 19430	25
	 <p>8α-(3',4'-Dihidroxi-2'-metilen-butanoiloxi)-11,13-dehidromelitensina</p>	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633		25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922		50
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212		12,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		25
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933		50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		50
<i>Salmonella typhi</i> Ty2 ATCC 19430		25

La presencia de varios hidroxilos en la molécula de quinicina posibilita la síntesis de ésteres. El empleo de lipasas para tal fin resulta atractivo, ya que las acilaciones en las que se emplea este biocatalizador suelen ser altamente selectivas y se realizan en condiciones moderadas de temperatura y pH. Esta última característica resulta especialmente importante para transformar este sustrato, ya que el esqueleto germacrano de quinicina es altamente reactivo.

Las estrategias empleadas en el desarrollo de esta parte del trabajo de tesis pueden dividirse en tres partes:

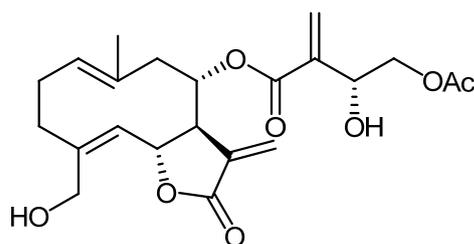
- Acetilación enzimática de quinicina. (IV.2)
- Alcohólisis e hidrólisis enzimática de quinicina y de sus derivados acilados por vía química. (IV.3)
- Obtención de derivados acilados de quinicina de cadena media y larga. (IV.4)

IV.2. Reacciones de acetilación de quinicina

IV.2.1. Influencia del biocatalizador

Se comenzó el trabajo sometiendo **IV-1** a reacciones de acetilación enzimática empleando lipasas de seis fuentes diferentes: lipasa de *Candida antarctica* A (CAL A), lipasa de *Candida antarctica* B (CAL B), lipasa de *Rhizomucor miehei* (LIP), lipasa de *Candida rugosa* (CRL), lipasa pancreática porcina (PPL) y lipasa de *Pseudomonas sp.* (PS-C). Se utilizó acetato de etilo como solvente y agente acilante. La reacción se estudió a dos temperaturas diferentes: 33° C y 55° C. El curso de las reacciones se siguió por CCD por un período máximo de 48 horas con agitación a 200 rpm. La relación enzima sustrato empleada en todos los casos fue de 10.

En todos los casos se observó que se obtenía un solo producto de reacción. Al emplear CAL B como biocatalizador a 55° C luego de 36 horas la reacción fue casi cuantitativa. El producto de reacción en este caso fue identificado como 4'-acetato de quinicina (**IV-2**).



4'-Acetato de quinicina (IV-2)

La identidad del producto fue confirmada por RMN ^1H . Las señales que se asignan a los protones del metileno 4' en **IV-1** aparecen como 2 dobles dobletes a 3,47 y 3,71 ppm. La acilación del hidroxilo en esta posición produce un aumento del desplazamiento químico de estas mismas señales hacia 4,21 y 4,28 ppm. El 4'-acetato de quinicina es un producto natural que también puede ser aislado de partes aéreas de plantas del género *Centaurea*,¹³ aunque en cantidades menores que **IV-1**.¹⁴ Los datos espectroscópicos del producto aislado coinciden con aquellos que están reportados en literatura.¹⁵ Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.2.

Tabla IV.2. Acetilación enzimática de quinicina con lipasas de origen diverso.

Lipasa	Rendimiento de IV-2 (%)	
	33°C	55°C
CAL A	20	22
CAL B	43	97
CRL	23	29
LIP	13	17
PPL	9	9
PS-C	34	64

Condiciones: E/S = 10, AcOEt como solvente y agente acilante. t = 36 h.

Se observó que tiempos mayores de reacción en estas condiciones produjeron, en su análisis por CCD múltiples manchas atribuibles a productos de reacciones laterales sobre el sustrato. Los espectros de RMN ^1H practicados sobre crudos de reacción a tiempos largos mostraron cambios en el patrón de señales vinílicas que pueden atribuirse a reacciones de reordenamiento sobre el esqueleto germacrano y señales de aldehído atribuibles a productos de oxidación, presumiblemente sobre el carbono 15.

IV.2.2. Efecto del solvente

Como los efectos de solvente muchas veces influyen en los rendimientos y selectividad de las reacciones, se estudió su influencia utilizando sólo las enzimas que permitieron la obtención de **IV.2** con mejor rendimiento: CAL B y PS-C. Los solventes probados para evaluar este efecto fueron alcohol teramílico, acetonitrilo, acetona, éter diisopropílico (DIPE) y tolueno. Todas las reacciones se realizaron a 55° C y 200 rpm por un período de 36 horas. La Tabla IV.3 muestra los resultados obtenidos.

Tabla IV.3. Efecto del solvente en la acetilación de quinicina.

Enzima	Solvente	Rendimiento de IV-2 (%)
CAL B	alcohol teramílico	-
CAL B	acetonitrilo	95
CAL B	acetona	71
CAL B	DIPE	14
CAL B	tolueno	-
PS-C	alcohol teramílico	-
PS-C	acetonitrilo	60
PS-C	acetona	42
PS-C	DIPE	<5
PS-C	tolueno	-

Condiciones: T = 55° C, 200 rpm, t = 36 h, E/S = 10, agente acilante/sustrato = 100.

En este caso, se observó que el solvente no tuvo influencia en la selectividad alcanzada, aunque tuvo un importante impacto sobre el rendimiento. El alcohol teramílico no parece ser un solvente adecuado para esta reacción, mientras que los demás solventes que son totalmente miscibles con el agua (acetona y acetonitrilo) fueron efectivos. En especial, el empleo de acetonitrilo produjo una conversión de quinicina a **IV-2** de manera cuantitativa. El empleo de solventes de menor polaridad no rindió ningún producto de reacción, a excepción del éter diisopropílico, que procedió con un rendimiento muy bajo. Este hecho puede deberse a que el sustrato es poco soluble en estos solventes, de baja y mediana polaridad.

IV.2.3. Efecto del agente acilante

Si bien la reacción de acetilación con acetato de etilo fue altamente selectiva, se decidió estudiar el efecto del empleo de agentes acetilantes activados, que posibilitarían la obtención de otros derivados acetilados de **IV-1**. Para tal fin se utilizaron dos agentes acetilantes: acetato de vinilo (AcOVin) y acetato de isopropenilo (AcOiPr). Nuevamente se ensayaron CAL B y PS-C como biocatalizadores. Los solventes probados para evaluar este efecto fueron los que mostraron resultados positivos en la sección anterior: acetonitrilo, acetona y DIPE. Todas las reacciones se realizaron a 55° C, 200 rpm por un período de 24 horas. A tiempos mayores no se observaron cambios significativos, además de la lenta aparición de productos laterales de reacción no enzimática del sustrato. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.4.

Tabla IV.4. Efecto de agentes acetilantes activados y solvente en la acetilación de quinicina.

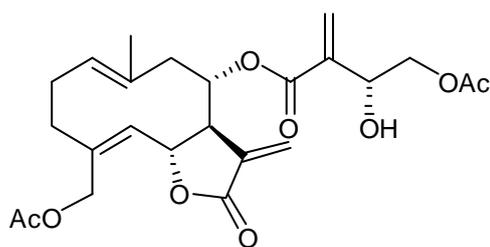
Enzima	Solvente	Agente acetilante	Rendimiento de IV-2 (%)
CAL B	acetonitrilo	AcOiPr	95
CAL B	acetona	AcOiPr	70
CAL B	DIPE	AcOiPr	17
CAL B	acetonitrilo	AcOVin	81 ^a
CAL B	acetona	AcOVin	82
CAL B	DIPE	AcOVin	16
PS-C	acetonitrilo	AcOiPr	84
PS-C	acetona	AcOiPr	60
PS-C	DIPE	AcOiPr	<5
PS-C	acetonitrilo	AcOVin	95
PS-C	acetona	AcOVin	80
PS-C	DIPE	AcOVin	<5

Condiciones: T = 55° C, 200 rpm, t = 24 h, E/S = 10, agente acilante/sustrato = 100.

^aSe obtuvo también **IV-3** con 17% de rendimiento.

En estos experimentos se observó que el empleo de acetatos activados no incrementó significativamente la actividad del sistema; ya que en general no se obtuvieron

rendimientos mayores que con acetato de etilo. En casi todos los casos se obtuvo **IV-2** como único producto de reacción. Empleando CAL B como biocatalizador, acetonitrilo como solvente y acetato de vinilo como agente acilante la reacción fue un poco menos selectiva, obteniéndose también 4',15-diacetato de quinicina (**IV-3**): producto de acetilación de ambos hidroxilos primarios de quinicina.



4',15-Diacetato de quinicina (IV-3)

La acetilación en el hidroxilo primario del carbono 15 fue confirmada por RMN ^1H . Los protones del metileno 15 de **IV-1** aparecen como dos dobletes centrados en 4,09 y 4,29 ppm. Cuando el sustituyente pasa a ser un acetato la señal se transforma en un singulete cuyo desplazamiento químico es de 4,61 ppm. Esta diferencia en la multiplicidad puede ser atribuida a la desaparición de una restricción conformacional existente en la molécula de quinicina, probablemente debido a la presencia de un enlace de puente de hidrógeno entre el hidroxilo en el metileno 15 y el oxígeno de la lactona en el metino 6. Este hecho se ilustra en la estructura de un mínimo local de quinicina en la Figura IV.1. En el espectro, también se observa un nuevo singulete a 2,11 ppm que corresponde a los protones de acetato.

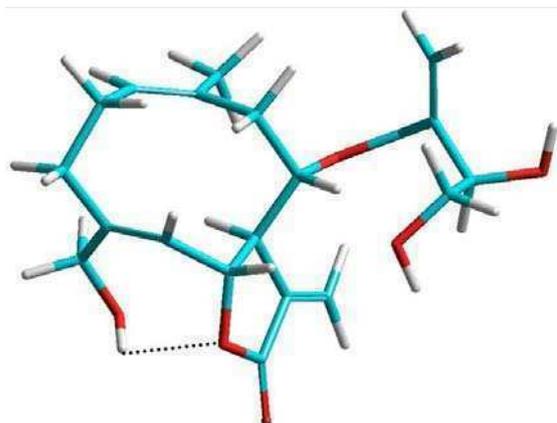


Figura IV.1. Mínimo local de quinicina. Se muestra el enlace puente de hidrógeno como línea punteada negra.

IV.2.4. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S)

Utilizando CAL B como biocatalizador se realizó un estudio de la relación enzima/sustrato óptima para la reacción de **IV-1** con acetato de vinilo en acetonitrilo. Las reacciones se llevaron a cabo en las condiciones descritas para los experimentos anteriores: 55° C, 200 rpm, 24 horas, relación agente acilante/sustrato 100. Se ensayaron relaciones de enzima/sustrato entre 1 y 20. En la Figura IV.2 se pueden observar los rendimientos obtenidos en función de la variable de estudio.

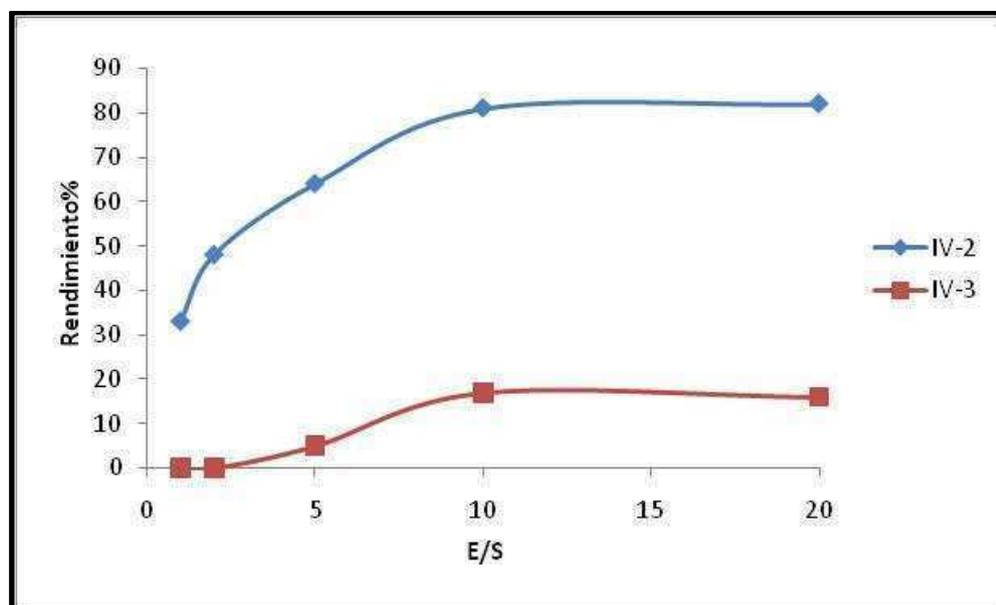


Figura IV.2. Efecto de la relación enzima/sustrato en la reacción de acetilación de **IV-1** con acetato de vinilo en acetonitrilo.

De aquí se puede concluir que una mayor carga de catalizador no fue efectiva para aumentar el rendimiento de **IV-3**.

También en este ámbito se evaluó el efecto de la relación enzima/sustrato en reacciones de acetilación de **IV-1** en acetato de etilo, ya que resultaron ser las mejores condiciones para obtener selectivamente **IV-2**. Las condiciones empleadas fueron 55° C, 200 rpm y 36 horas de reacción. Como en el caso anterior, se ensayaron relaciones de enzima/sustrato entre 1 y 20. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura IV.3.

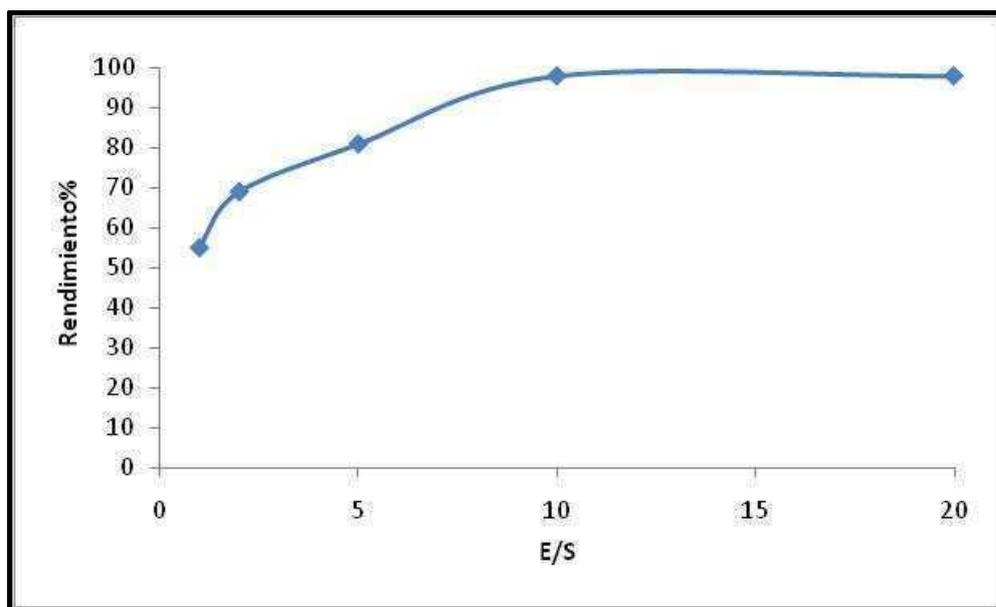


Figura IV.3. Efecto de la relación enzima/sustrato en la acetilación de **IV-1** con acetato de etilo.

En ambos casos se observa que resulta necesario utilizar una cantidad importante de catalizador para que la reacción sea cuantitativa. Este hecho puede atribuirse a una interacción pobre entre el sustrato y la enzima soportada.

Con el objeto de analizar la influencia del soporte se estudió la reacción de acetilación con CAL B comercial inmovilizada en dos soportes distintos. Una de ellas fue la que se comercializa bajo el nombre de Novozym[®] 435 por Novozymes[®], que es la que se ha empleado por defecto en este trabajo de tesis y se encuentra soportada en esferas macroporosas de poli(acrilato de butilo-co-ácido acrílico-co-divilínbenzeno). La otra es conocida como Chirazyme[®] L-2, c-f, C3, lyo (era producida por Roche[®] y su fabricación está discontinuada) y está soportada sobre polipropileno.

Se realizó una comparación entre el desempeño de ambas formas comerciales de CAL B para la esterificación de **IV-1** en acetato de etilo a dos relaciones enzima/sustrato distintas sin que se observaran diferencias apreciables. A la hora de realizar una comparación de este tipo es importante tener en cuenta las actividades de los biocatalizadores empleados. Se sabe a partir de la información suministrada por los proveedores que ambas formas comerciales de CAL B presentan las siguientes actividades: Novozym[®] 435 presenta 7400 PLU/g (micromoles de laurato de propilo que sintetiza a partir de ácido láurico y 1-propanol por gramo de biocatalizador por minuto), mientras que Chirazyme[®] L-2, c-f,

C3, Iyo tiene 6300 U/g (micromoles de ácido butírico liberados mediante la hidrólisis de tributirina en solución reguladora de fosfatos de pH 7,0 por gramo de biocatalizador por minuto). Si bien las condiciones de ensayo de actividad por parte de los fabricantes no fueron las mismas, los resultados arrojaron valores en el mismo orden de magnitud. Además, los ensayos que se realizaron utilizando quinicina como sustrato en acetato de etilo como solvente y agente acilante demostraron que, al menos para los fines de esta preparación, resulta equivalente utilizar cualquiera de las dos formas comerciales de CAL B. La Tabla IV.5 muestra los resultados obtenidos.

Tabla IV.5. Efecto del soporte sobre la actividad de CAL B en la acetilación de quinicina.

Enzima	E/S	Rendimiento de IV-2 (%)
Novozym [®] 435	5	81
Chirazyme [®] L-2, c-f, C3, Iyo	5	86
Novozym [®] 435	10	98
Chirazyme [®] L-2, c-f, C3, Iyo	10	100

Condiciones: T = 55° C, 200 rpm, t = 36 horas, acetato de etilo como solvente y agente acilante.

IV.2.5. Condiciones óptimas

En virtud de los resultados obtenidos en las variables estudiadas anteriormente, se presentan las condiciones óptimas para la acetilación de quinicina:

	Productos	
	IV-2	IV-2 + IV-3
Enzima	CAL B	CAL B
Solvente	Acetato de etilo	Acetonitrilo
Agente acilante	Acetato de etilo	Acetato de vinilo
Temperatura	55° C	55° C
Tiempo de reacción	36 h	24 h
Enzima/sustrato	10	10
Agente acilante/sustrato	-	100

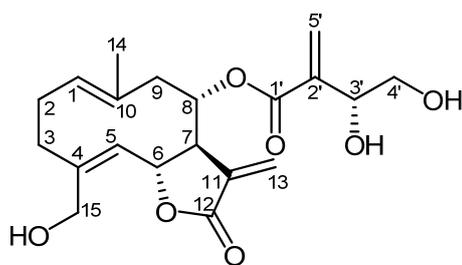
Con esta metodología fue posible preparar por primera vez el 4'-acetato de quinicina a partir de quinicina con alto rendimiento.

IV.3. Alcohólisis e hidrólisis enzimática de quinicina y de sus derivados acilados por vía química

Con el objeto de obtener otros derivados de quinicina, se planteó el empleo de reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas por acción de un nucleófilo: alcohólisis si el nucleófilo es un alcohol o bien hidrólisis si el nucleófilo es agua. Para ello se ha usado como sustrato tanto **IV-1** directamente como sus derivados acetilados.

IV.3.1. Alcohólisis e hidrólisis enzimática de quinicina

En su estructura la quinicina posee dos grupos éster. Uno es el que vincula el esqueleto germacrano con la cadena lateral y el otro es una lactona de cinco miembros. La remoción selectiva de la cadena lateral ha sido reportada tanto por métodos químicos³ como empleando células enteras de hongos.¹²



Quinicina (IV-1)

Primeramente se evaluó el uso de etanol como nucleófilo en reacciones de alcohólisis de **IV-1**. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando etanol como solvente y nucleófilo, con las seis lipasas ensayadas para las reacciones de acetilación, a 55° C y 200 rpm, controlando las reacciones por CCD durante un período de 36 horas. La relación enzima/sustrato utilizada fue de 10. No se observaron productos de reacción en ninguno de los casos. Luego de 36 horas el sustrato comenzó a descomponerse como en el caso de las acetilaciones discutidas previamente.

Para completar el estudio de las alcoholisis enzimáticas también se utilizaron otros alcoholes como nucleófilos: n-butanol y n-octanol. Se emplearon los mismos solventes que habían dado buenos resultados en la acetilación: acetonitrilo, DIPE y acetona. Las reacciones se llevaron a cabo a 55° C, 200 rpm, empleando los seis biocatalizadores y fueron monitoreadas por CCD durante 36 horas. La relación enzima/sustrato fue de 10 y la de nucleófilo/agente acilante de 100. Tampoco se obtuvieron resultados satisfactorios en este caso.

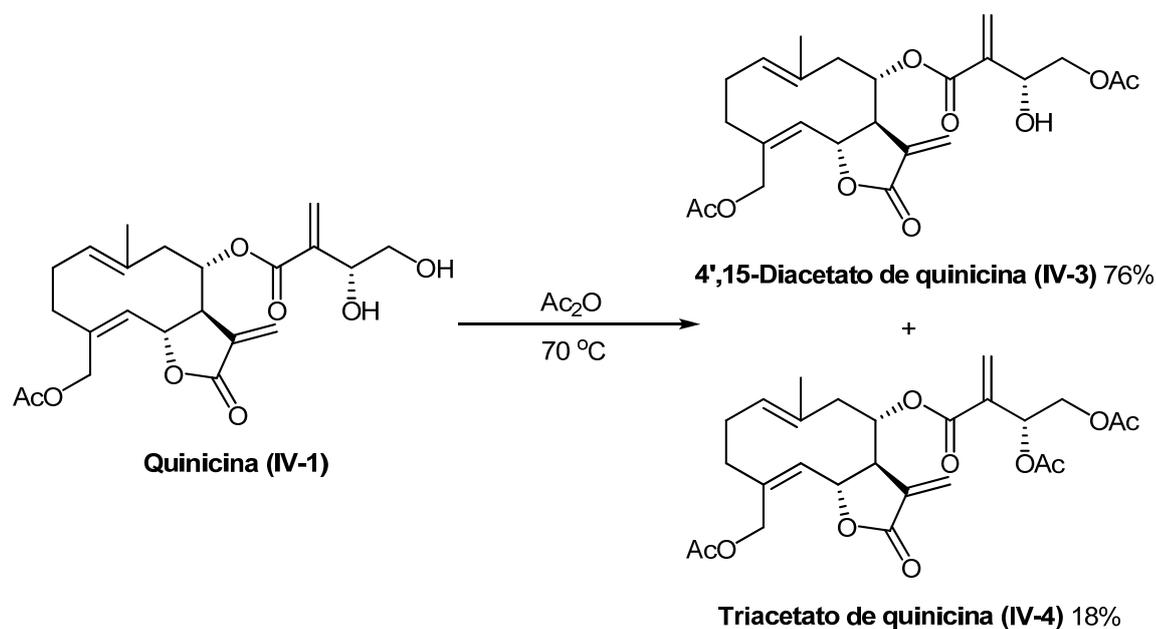
También se ensayó una reacción de hidrólisis empleando una mezcla de iguales volúmenes de solución reguladora de fosfato pH 7,4 50 mM con tetrahidrofurano. El tetrahidrofurano se agregó con el objeto de disolver el sustrato en el medio de reacción. Se ensayó el desempeño de CAL B como biocatalizador en estas condiciones en una relación enzima/sustrato de 10. La reacción se llevó a cabo a 55° C, 200 rpm durante un período de 36 horas sin resultados satisfactorios.

IV.3.2. Preparación química de derivados acetilados de quinicina

Como se ha comentado, las lipasas muchas veces mantienen la selectividad tanto en reacciones de acilación como de alcoholisis.^{16,17} Una estrategia quimioenzimática posibilitaría la obtención selectiva de derivados acetilados de **IV-1** en posiciones distintas a 4'. Para ello se prepararon primeramente derivados acetilados de quinicina por metodologías de síntesis química tradicional para luego someter los mismos a reacciones de alcoholisis enzimática.

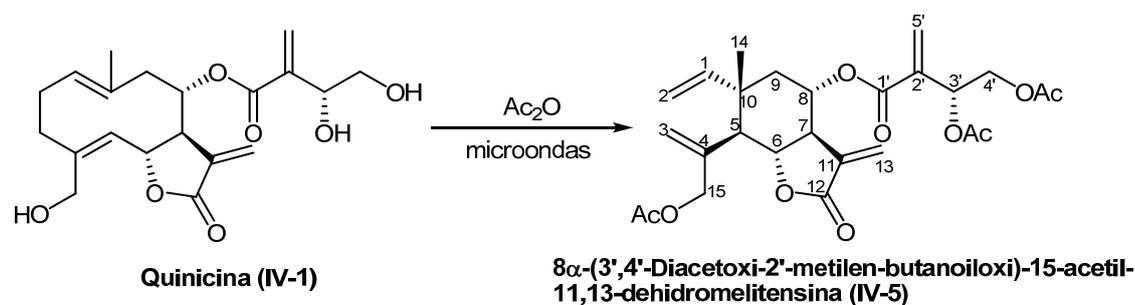
La bibliografía consultada describe diversos métodos de acetilación de alcoholes.¹⁸ La posibilidad de aplicación de cada uno de ellos depende de la reactividad tanto de los hidroxilos que se desean acetilar como de otras funciones presentes en la molécula. También se deben tener en cuenta la sencillez del procedimiento experimental y el costo de los reactivos a la hora de realizar la elección de la metodología más adecuada.

Para comenzar se procedió a la acetilación de quinicina por tratamiento con anhídrido acético a 70° C por 2 horas. Esta técnica se encuentra descrita en bibliografía¹⁹ y rinde una mezcla de productos: 4',15-diacetato de quinicina (**IV-3**) y triacetato de quinicina (**IV-4**) con 76% y 18% de rendimiento respectivamente (Esquema IV.2).



Esquema IV.2. Acetilación química de quinicina con anhídrido acético.

Si bien el procedimiento fue efectivo, resultó poco eficiente para obtener **IV-4**, ya que no se logró la acetilación completa de **IV-1**. Debido a ello se intentó optimizar la síntesis mediante el empleo de radiación de microondas. Se irradió por 30 minutos a 100°C una solución de **IV-1** en anhídrido acético en un reactor monomodo. En estas condiciones se obtuvo un único producto. El análisis del mismo dio como resultado que no sólo la acetilación había sido completa, sino que se había producido un reordenamiento de Cope totalmente estereoespecífico. El producto obtenido en estas condiciones resultó ser el elemanólido **IV-5**, cuya estructura pudo corroborarse por RMN (Esquema IV.3).



Esquema IV.3. Reacción de quinicina con anhídrido acético en presencia de microondas.

La aplicación de técnicas de RMN bidimensional de correlación protón-protón (COSY) y protón-carbono (HSQC y HMBC) permitió la asignación estructural del compuesto **IV-5**. De hecho, las señales de protón a 5,76; 5,07 y 5,02 ppm (H-1, H-2a y H-2b; señales de carbono 13 a 145,3 y 113,5 ppm de carbonos 1 y 2 respectivamente) y los singuletes anchos a 5,43 y 5,04 ppm (H-3a y H-3b; señales de carbono 13 a 117,1 y 138,4 ppm de carbonos 3 y 4 respectivamente) indicaron la presencia de dos grupos vinílicos; uno monosustituído y otro disustituído. Las correlaciones protón-carbono a un enlace para las señales vinílicas de carbonos 1, 2 y 3 se muestra en la Figura IV.4.

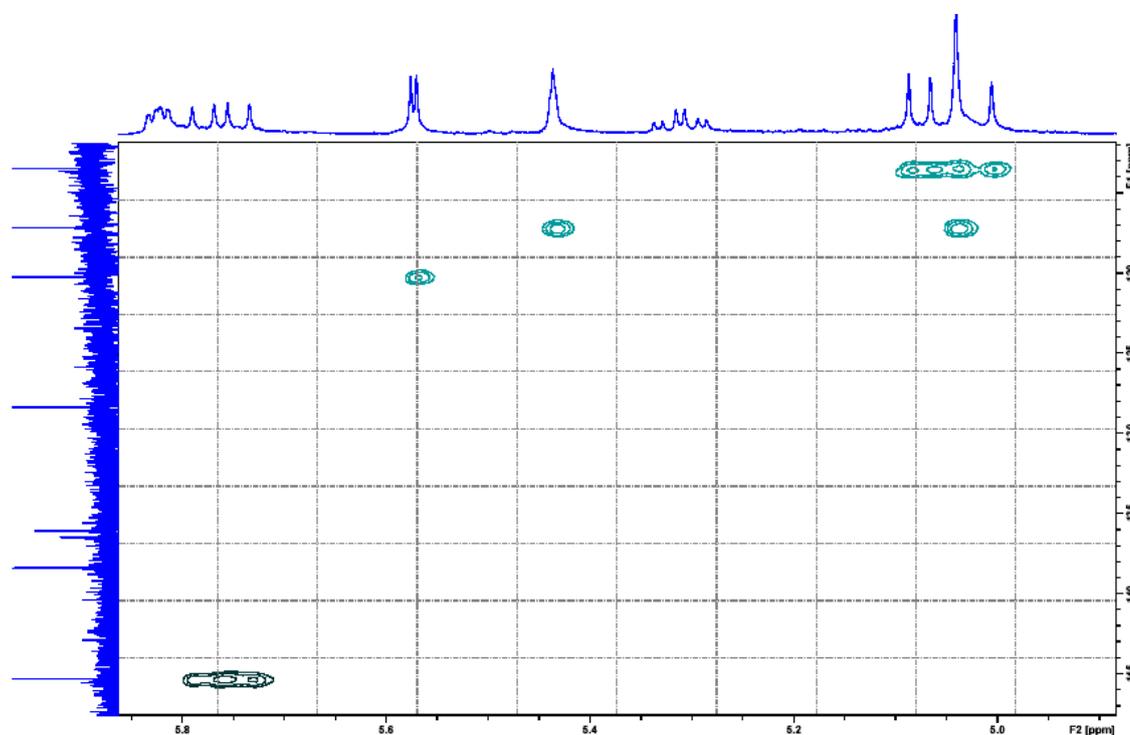


Figura IV.4. Espectro HSQC-DEPT 135° de **IV-5**. Se muestran las correlaciones para los protones en carbonos 1, 2 y 3. Las señales positivas se muestran en negro y las negativas en verde.

La acetilación se corroboró por la presencia de tres singuletes 2,12; 2,09 y 2,05 ppm y por el corrimiento de las señales de protón sobre carbono 15, 3' y 4' a campos más bajos con respecto a aquellas asignadas para el derivado de **IV-5** totalmente desacetilado. Este último fue aislado de *Centaurea cineraria* subespecie *umbrosa* y sus datos espectroscópicos se encuentran en literatura.¹⁵ La estereoquímica en carbonos 5 y 10 se verificó mediante las señales de protón del metilo 14 y del metino 5. La primera es un singulete a 1,17 ppm mientras que el protón del metino 5 resuena como doblete a 2,47 ppm. La constante de acoplamiento con protón de carbono 6 (4,22 ppm) de esta señal es de aproximadamente

12 Hz. Este valor indica que ambos hidrógenos de carbonos 5 y 6 se encuentran en posición axial, al igual que el metilo 14. De este modo se definen las estereoquímicas relativas al centro asimétrico en posición 6, cuya configuración es conocida.

Para intentar optimizar la obtención de triacetato de quinicina se probó la acetilación de **IV-1** con anhídrido acético en piridina. En estas condiciones se obtuvo una mezcla muy compleja de productos cuyos espectros de RMN ^1H evidenciaron la desaparición de señales vinílicas. También se intentaron acetilaciones empleando catalizadores básicos como la 4-dimetilaminopiridina y catalizadores ácidos como el ácido p-toluensulfónico y el triflato de trimetilsililo con resultados no satisfactorios.

Como última estrategia, se intentaron obtener derivados acetilados con la configuración en carbono 3' invertida para investigar la dependencia de la estereoquímica de ese centro con la selectividad de las reacciones enzimáticas. Se intentó realizar este paso sobre **IV-1** y **IV-3** utilizando la reacción de Mitsunobu. Esta reacción se ha utilizado sobre una gran variedad de compuestos para la inversión de configuración de alcoholes secundarios quirales.²⁰ Se empleó trifenilfosfina, azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) y ácido acético (los tres reactivos en exceso con respecto al alcohol entre 3 y 6 equivalentes) en tetrahydrofurano como solvente. Como es un hecho conocido que el orden de agregado de reactivos puede ser importante en la efectividad de la reacción,²¹ se probó agregando DIAD al final y también mezclando primero la trifenilfosfina con DIAD para agregar luego el alcohol y finalmente el ácido. Lamentablemente, la reacción no fue exitosa en ninguna de las condiciones ensayadas.

Como resultado de estos experimentos, no fue posible incrementar el rendimiento en la obtención de triacetato de quinicina. En las condiciones que se describen en literatura y ensayadas en este trabajo como se describe en el Esquema *IV.2*, este producto se obtiene como componente minoritario de una mezcla con el diacetato **IV-3**. Como consecuencia, se procedió a la preparación de triacetato de quinicina (**IV-4**) y del diacetato **IV-3** mediante esta última metodología. Ambos compuestos fueron separados por cromatografía en columna de silicagel e identificados por métodos espectroscópicos para luego ser utilizados como sustratos en las reacciones que se describirán a continuación.

IV.3.3. Alcohólisis de derivados acetilados de quinicina

Una vez obtenidos químicamente los derivados diacetilado (**IV-3**) y triacetilado (**IV-4**) de quinicina se procedió a ensayar reacciones de alcohólisis enzimática sobre los mismos. Se probaron varios nucleófilos: etanol, *n*-butanol y *n*-octanol en una relación nucleófilo/sustrato de 100. Se utilizó CAL B como biocatalizador en una relación enzima/sustrato de 10. Como solvente se emplearon acetonitrilo y etanol. Las reacciones procedieron a 55° C y 200 rpm por un período de 36 horas. La selectividad de la enzima se mantuvo hacia el hidroxilo en 4', obteniéndose 15-acetato de quinicina (**IV-6**) a partir de **IV-3** y 3',15-diacetato de quinicina (**IV-7**) a partir de **IV-4**. Los resultados se encuentran desarrollados en la Tabla IV.6.

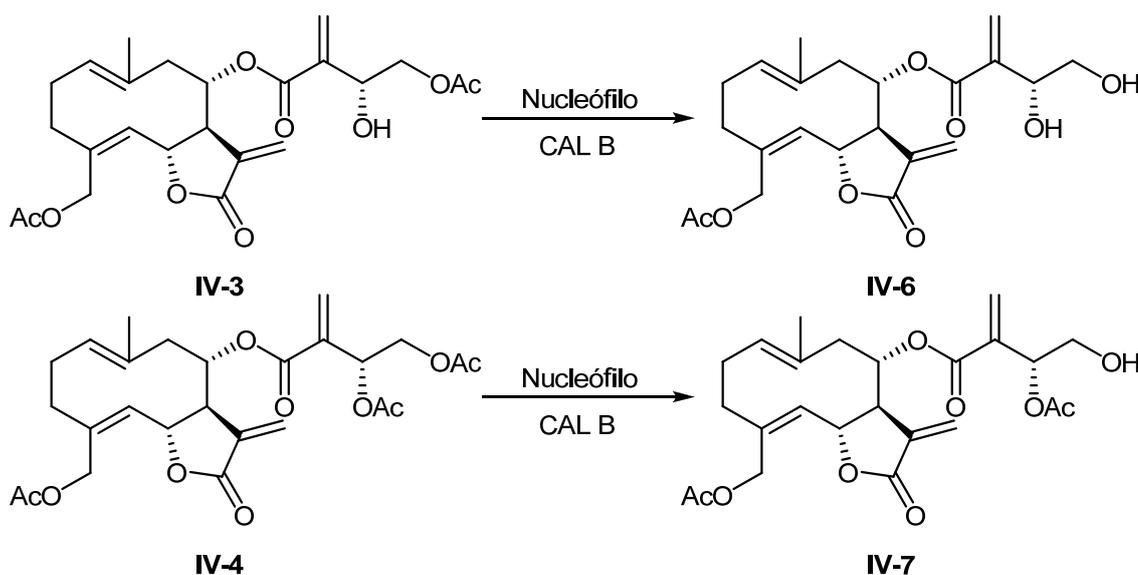


Tabla IV.6. Alcohólisis enzimática de derivados acetilados de quinicina.

Sustrato	Nucleófilo	Solvente	Rendimiento (%)	
			IV-6	IV-7
IV-3	etanol	acetonitrilo	98	-
IV-3	etanol	etanol	75	-
IV-4	etanol	acetonitrilo	-	99
IV-4	etanol	etanol	-	72
IV-4	<i>n</i> -butanol	acetonitrilo	-	23
IV-4	<i>n</i> -octanol	acetonitrilo	-	-

Se observó que el acetonitrilo como solvente siguió siendo el más adecuado para llevar a cabo las reacciones, ya que las alcoholisis sobre ambos sustratos con etanol como nucleófilo fueron prácticamente cuantitativas (98% con **IV-6** y 99% con **IV-7**). Se observó además que el empleo de alcoholes de cadena más larga fue en detrimento del rendimiento obtenido. La utilización de etanol como solvente y nucleófilo tampoco fue tan efectiva.

IV.4. Obtención de derivados acilados de quinicina de cadena media y larga

En la sección *IV.2* se describió la preparación del derivado monoacetilado de quinicina **IV-2**. Los resultados obtenidos en la misma llevaron a proponer la extensión de la reacción para obtener derivados del mismo sustrato con grupos acilo de cadena media y larga. La derivatización de compuestos bioactivos con grupos acilo de estas características ha probado mejorar la absorción de los mismos, mejorando su biodisponibilidad y potenciando sus efectos.²² También se ha comprobado, tanto en este trabajo como en anteriores^{16,17} que la regioselectividad de las lipasas para llevar a cabo reacciones de esterificación, transesterificación e hidrólisis suele ser constante. De este modo, es bastante probable que los derivados acilados obtenidos por este método se hidrolicen en el medio biológico dando lugar a la liberación controlada del compuesto bioactivo.

Primeramente se evaluó la efectividad de caproato de etilo y ácido caproico como agentes acilantes en una relación de agente acilante/sustrato de 100. Se comenzó ensayando las reacciones de acilación sobre **IV-1** con cuatro enzimas: CRL, CAL B, PS-C y LIP en una relación enzima/sustrato de 10, empleando tres solventes: acetonitrilo, acetona y éter diisopropílico. Se probaron las reacciones a 55° C y 200 rpm por un período de 36 horas, controlando su avance por CCD. Estas dieron como producto el derivado acilado en la posición 4': 4'-caproato de quinicina (**IV-8**). Los resultados obtenidos en las condiciones se resumen en la Tabla *IV.7*.

Tabla IV.7. Acilación de quinicina con caproato de etilo y ácido caproico a 55° C.

Enzima	Agente acilante	Solvente	Conversión a IV-8 (%)
CAL B	Caproato de etilo	acetonitrilo	34
PS-C	Caproato de etilo	acetonitrilo	27
LIP	Caproato de etilo	acetonitrilo	16
CRL	Caproato de etilo	acetonitrilo	<10
CAL B	Caproato de etilo	acetona	16
PS-C	Caproato de etilo	acetona	<10
LIP	Caproato de etilo	acetona	-
CRL	Caproato de etilo	acetona	-
CAL B	Caproato de etilo	DIPE	<10
PS-C	Caproato de etilo	DIPE	-
LIP	Caproato de etilo	DIPE	-
CRL	Caproato de etilo	DIPE	-
CAL B	Ácido caproico	acetonitrilo	61
PS-C	Ácido caproico	acetonitrilo	36

Condiciones: t = 36 h, agente acilante/sustrato = 100.

Las conversiones en todos los casos fueron estimadas mediante la comparación de las señales de RMN ¹H de los protones en carbono 4' con hidroxilo acilado y sin acilar. Como las señales del metileno 15 se superponen a las del metileno 4' O-acilado, la estimación se hizo mediante el siguiente cálculo: Se tomaron las áreas de los protones del carbono 4' sin acilar, A₁ y A₂. Las señales del metileno 4' de producto superpuesta con las del metileno 15 de ambos sustrato y producto también se integraron y se nombraron como A₃. De este modo, si se toma la suma de todas las áreas como referencia de la cantidad de sustrato y producto en la muestra, ésta integra para cuatro protones por molécula. Del mismo modo, la suma de A₁ y A₂ representará a dos protones por molécula de sustrato. De aquí se extrae que la conversión puede ser estimada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{conversión \%} = \left(1 - \frac{2 \cdot (A_1 + A_2)}{A_1 + A_2 + A_3} \right) \cdot 100$$

La Figura IV.5 muestra un ejemplo de aplicación de esta metodología.

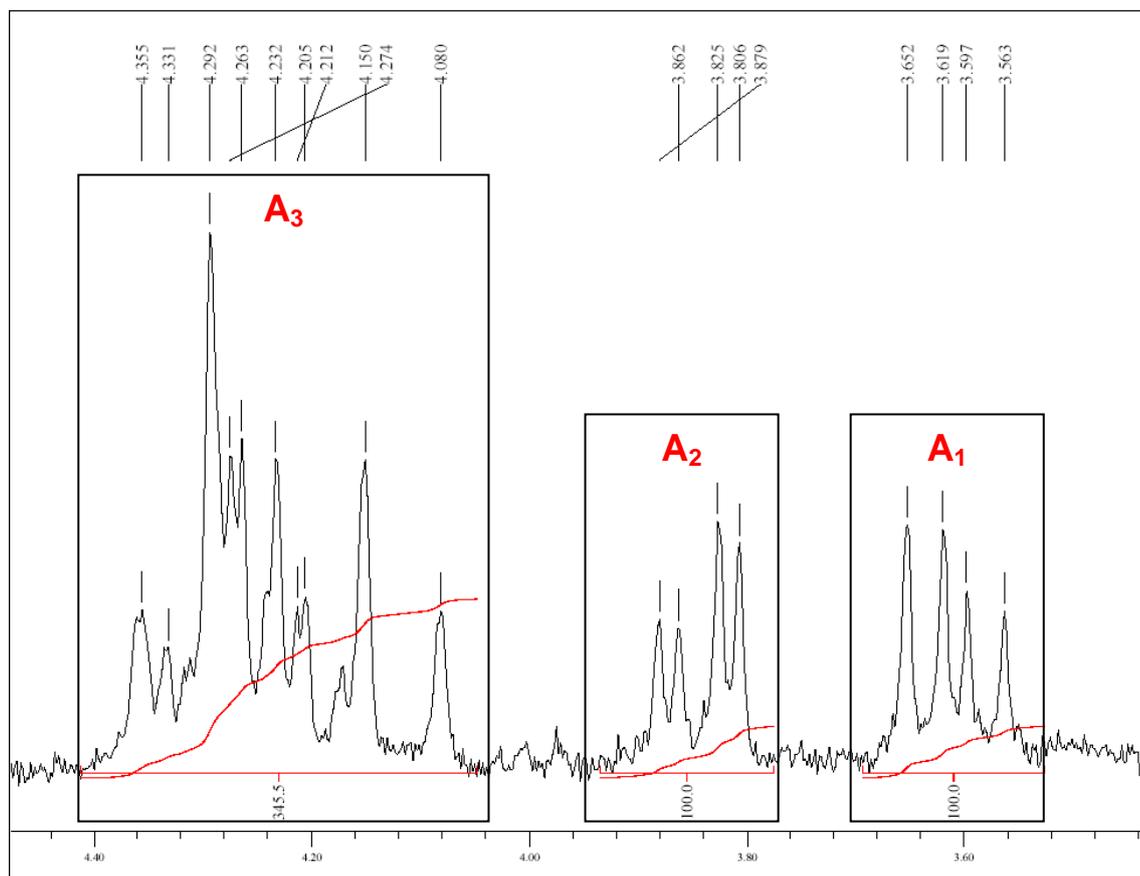


Figura IV.5. Ampliación de la zona entre 3,50 y 4,45 ppm del espectro de RMN ^1H de crudo de quinicina con caproato de etilo luego de 36 horas de reacción. Condiciones: $T = 55^\circ\text{C}$, 200 rpm, enzima PS-C, $E/S = 10$, agente acilante/sustrato = 100, $t = 36\text{ h}$. Conversión 27%.

A partir de estas estimaciones fue posible calcular las conversiones para cada caso.

Las conversiones en ambos casos fueron pobres con respecto a las obtenidas en las acetilaciones. Tiempos mayores de reacción dieron lugar a la descomposición del sustrato como se había observado en casos anteriores.

IV.4.1. Efecto de la temperatura y del agente acilante

Como las reacciones de descomposición pueden atribuirse a reordenamientos térmicamente inducidos en el esqueleto germacrano,¹⁰ se decidió intentar minimizar este efecto disminuyendo la temperatura. Se probaron tres lipasas: CAL B, PS-C y LIP y los dos agentes acilantes ensayados anteriormente en las condiciones que siguen: 10°C , 200

rpm, relación enzima/sustrato de 10, relación de agente acilante/sustrato de 100 y acetonitrilo como solvente. Las reacciones fueron monitoreadas por CCD durante 120 horas y las conversiones finales estimadas por RMN ^1H según lo indicado previamente. En la Tabla IV.8 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla IV.8. Acilación de quinicina a 10° C.

Enzima	Agente acilante	Conversión a IV-8 (%)
CAL B	Caproato de etilo	47
PS-C	Caproato de etilo	36
LIP	Caproato de etilo	22
CAL B	Ácido caproico	72
PS-C	Ácido caproico	50
LIP	Ácido caproico	33

Condiciones: E/S = 10, agente acilante/sustrato = 100, solvente: acetonitrilo.

No se observaron cambios en la selectividad de la reacción, pero el empleo de bajas temperaturas tuvo un impacto muy favorable en el rendimiento. Si bien las reacciones requirieron más tiempo, en estas condiciones no se formaron productos de descomposición. Las distintas enzimas mostraron un desempeño relativo comparable al que mostraron a 55° C.

En cuanto al agente acilante, parece que en este caso el ácido carboxílico resultó ser más efectivo que el éster etílico (CAL B: 72% con ácido caproico y 47% con caproato de etilo). Este hecho se encuentra en concordancia con resultados obtenidos en nuestro laboratorio en la acilación enzimática de esteroides.^{23,24}

IV.4.2. Efecto de la relación agente acilante/sustrato

Como última variable de reacción se decidió averiguar si se podían utilizar relaciones menores de agente acilante/sustrato. El empleo de ácidos y ésteres de cadena media y larga en grandes concentraciones hace muy laboriosa la purificación de los productos de reacción y es por ello que se decidió intentar optimizar la reacción en este aspecto. Se

ensayaron relaciones de ácido caproico/**IV-1** entre 10, y 1. Las reacciones fueron llevadas a cabo en acetonitrilo, con CAL B como biocatalizador en una relación E/S de 10, a 10° C y 200 rpm por un período de 120 horas. Las conversiones fueron estimadas según lo indicado previamente. Los resultados se muestran en la Figura IV.6.

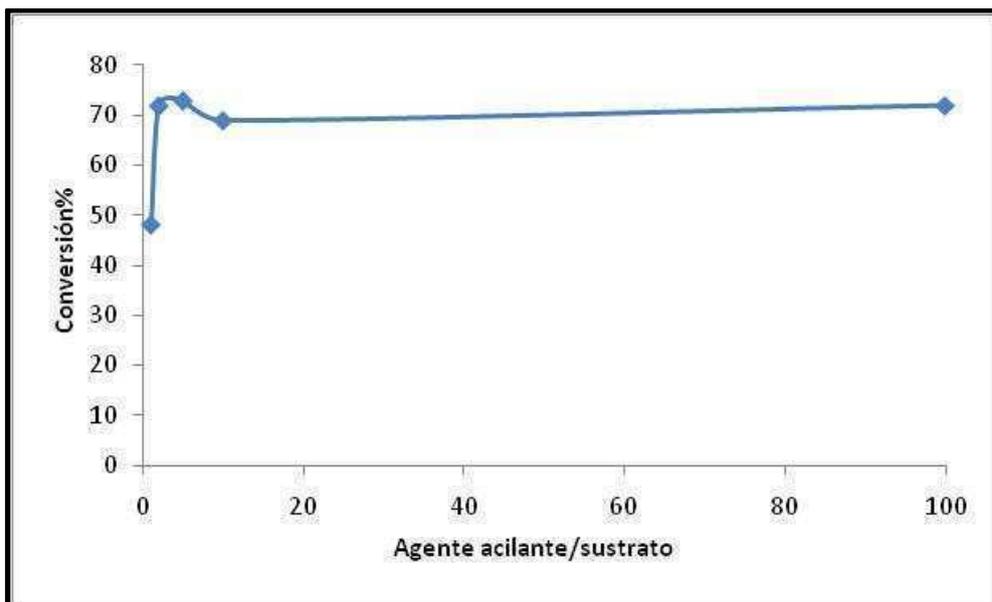


Figura IV.6. Efecto de la relación agente acilante/sustrato para la acilación de quinicina con ácido caproico.

De este estudio se puede concluir que el empleo de relaciones de agente acilante/sustrato mayores que 2, no afectó sensiblemente la conversión, por lo que resultó muy ventajoso reducir esta relación hasta ese valor.

I.V.4.3. Condiciones óptimas

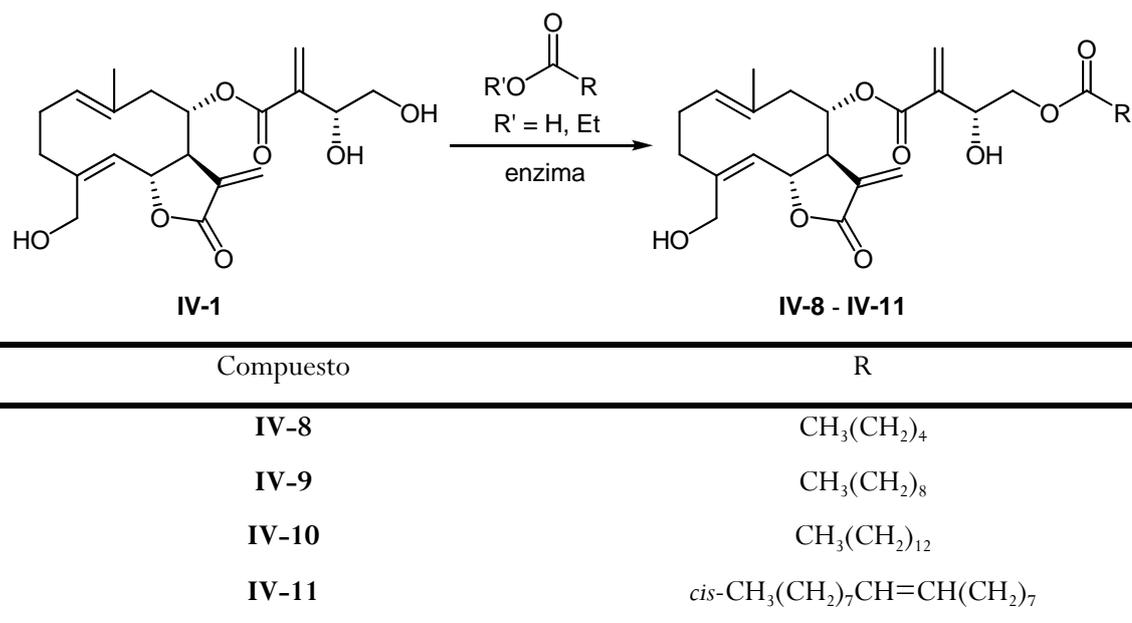
En virtud de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores se puede concluir que las condiciones óptimas obtenidas para la síntesis de **IV-8** son las siguientes:

Enzima	CAL B
Solvente	acetonitrilo
Agente acilante	Ácido caproico
Temperatura	10° C
Tiempo de reacción	120 h
Enzima/sustrato	10
Agente acilante/sustrato	2

IV.4.4. Obtención de 4'-caprato de quinicina (IV-9), 4'-miristato de quinicina (IV-10) y 4'-oleato de quinicina (IV-11)

Considerando los resultados obtenidos para la obtención de 4'-caprato de quinicina se sintetizaron además tres derivados con cadenas de mayor longitud: 4'-caprato de quinicina (IV-9), 4'-miristato de quinicina (IV-10) y 4'-oleato de quinicina (IV-11).

Los compuestos sintetizados en esta sección se ilustran en el Esquema IV.4.



Esquema IV.4. Obtención de derivados acilados de IV-1.

En la obtención de **IV-9**, **IV-10** y **IV-11** se utilizaron los ácidos carboxílicos correspondientes, en las condiciones óptimas para la obtención de 4'-caproato de quinicina descritas en la sección anterior. También se evaluaron los respectivos ésteres etílicos a modo de comparación.

Todos los ésteres pudieron sintetizarse con rendimientos similares y la selectividad se mantuvo hacia el mismo hidroxilo. Comparativamente los ésteres etílicos tuvieron desempeños más pobres que los ácidos como agentes acilantes, con lo cual resultó más ventajoso utilizar los ácidos. Además, estos últimos tienen menor costo que los ésteres y su separación de los productos de reacción suele ser más sencilla.

La Tabla *IV.9* muestra los resultados obtenidos para la acilación de quinicina con ácidos y ésteres etílicos de cadena media y larga en las condiciones de reacción optimizadas.

Tabla IV.9. Obtención de derivados acilados de quinicina.

Agente acilante	Producto	Rendimiento (%)
Caproato de etilo	IV-8	47
Ácido caproico	IV-8	72
Caprato de etilo	IV-9	35
Ácido cáprico	IV-9	68
Miristato de etilo	IV-10	38
Ácido mirístico	IV-10	70
Oleato de etilo	IV-11	44
Ácido oleico	IV-11	66

IV.5. Conclusión

La acilación de quinicina catalizada por lipasas probó ser altamente regioselectiva, pudiendo discriminar entre dos hidroxilos primarios (4' y 15).

Fue posible obtener por primera vez el producto acetilado en la posición 4' **IV-2** de manera cuantitativa y completamente regioselectiva empleando acetato de etilo como solvente y agente acilante y CAL B como lipasa.

Se encontró que el acetonitrilo es un buen solvente para favorecer la reactividad del sistema, aunque provoca una ligera pérdida de la selectividad cuando se emplea acetato de vinilo como agente acilante. Esto último permitió la obtención del producto diacetilado **IV-3** por una vía enzimática.

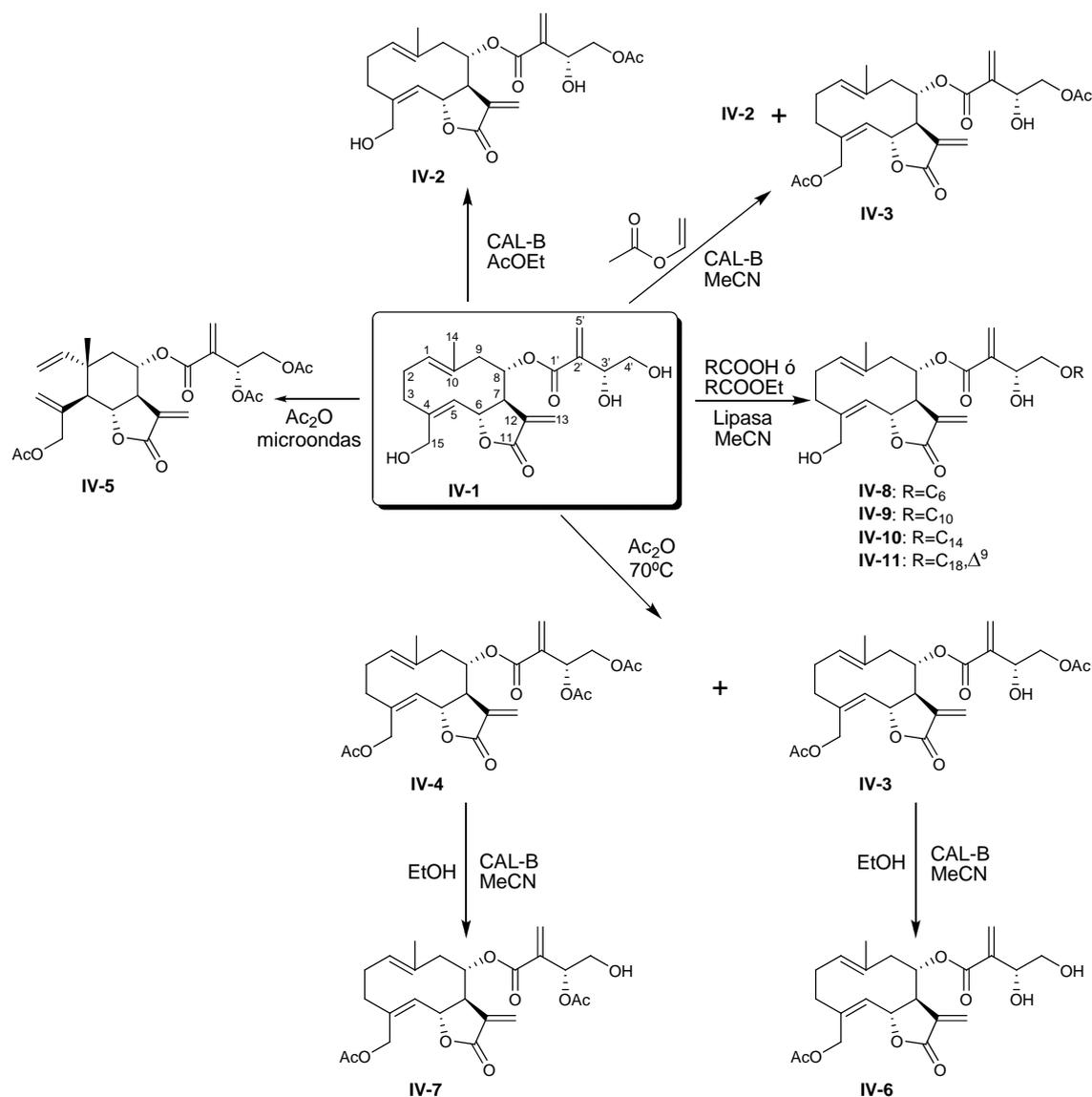
Por otro lado, la acetilación química completa de quinicina no pudo realizarse de modo que rindiera un único producto sin que se produjeran otras reacciones laterales. La aplicación de varios métodos de acetilación no pudo salvar este inconveniente, llevando a la descomposición del sustrato en muchos casos. Tampoco pudo llevarse a cabo la propuesta de invertir el centro asimétrico en 3' mediante una reacción de Mitsunobu.

El empleo de microondas permitió la obtención del derivado **IV-5**, producto de acetilación exhaustiva y reordenamiento de Cope estereoespecífico.

La alcoholisis enzimática de quinicina no resultó exitosa. Sin embargo, esta misma reacción sobre derivados poliacetilados procedió con la misma regioselectividad que la acetilación; posibilitando la obtención de dos nuevos derivados acetilados **IV-6** y **IV-7**. En especial, la utilización de etanol como nucleófilo y acetonitrilo como solvente permitió obtener estos productos de manera casi cuantitativa.

Por último, el empleo de bajas temperaturas permitió la obtención de cuatro derivados de quinicina con ácidos de cadena media y larga no descritos previamente en literatura, en condiciones suaves y sin formación de productos laterales. Estas reacciones de acilación mantuvieron la regioselectividad observada en los casos anteriores. Los ácidos grasos mostraron una mayor efectividad que los ésteres etílicos como agentes acilantes, pudiéndose emplear en relaciones agente acilante/sustrato relativamente bajas.

Como conclusión, el empleo de estrategias químicas y quimioenzimáticas permitió la obtención de seis novedosos derivados acilados de quinicina con muy buenos a excelentes rendimientos, junto con el elemanólido triacetilado **IV-5**. En total se obtuvieron diez derivados sesquiterpénicos acilados. En el Esquema *IV.5* se presentan todos los productos obtenidos en esta parte del trabajo de tesis.



Esquema IV.5. Productos de reacción acilados de quinicina obtenidos por vía enzimática, química y quimioenzimática.

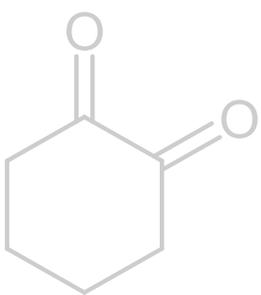
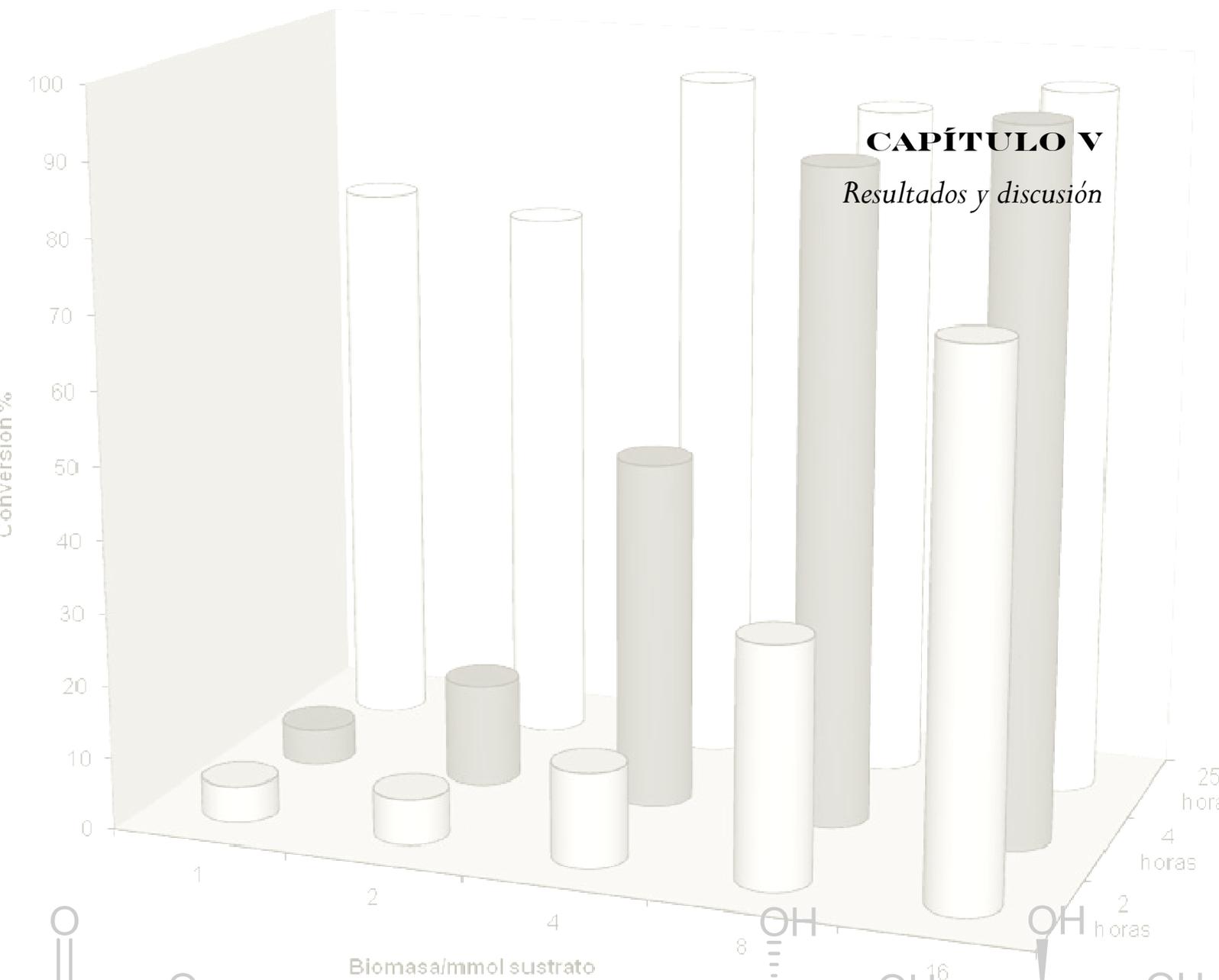
Bibliografía

1. Seaman, F. C.; Cronquist, A. (Ed.), *The Botanical Review-Sesquiterpene Lactones as Taxonomic Characters in Asteraceae*, vol. 48, no. 2, New York Botanical Garden, New York, 1982; p121-140.
2. Suchy, M.; Herout, V. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **1962**, 27, 1510-1512.
3. Bruno, M.; Rosselli, S.; Maggio, A.; Raccuglia, R. A.; Napolitano, F.; Senatore, F. *Planta Med.*, **2003**, 69, 277-281.
4. Stevens, K. L.; G.B. Merrill, G. B. *ACS Symp. Ser. (Chem. Allelopathy)*, **1985**, 268, 83-98.
5. Vanhaelen-Fastrè, R.; Vanhaelen, M. *Planta Med.*, **1976**, 29, 179-189.
6. Barrero, A. F.; Oltra, J. E.; Rodriguez, I.; Barragán, A.; Grávalos, D. G.; Ruiz, P. *Fitoterapia*, **1995**, 66, 227-230.
7. González, A. G.; Darias, V.; Alonso, G.; Boada, J. N.; Feria, N. *Planta Med.*, **1978**, 33, 356-359.
8. Eschenburg, S.; Priestman, M. A.; Abdul-Latif, F. A.; Delachaume, C.; Fassy, F.; Schonbrunn, E. *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 14070-14073.
9. Barrero, A. F.; Oltra, J. E.; Morales, V.; Álvarez, M. *J. Nat. Prod.*, **1997**, 60, 1034-1035.
10. Rosselli, S.; Maggio, A.; Raccuglia, R. A.; Bruno, M. *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 2690-2694.
11. Bruno, M.; Rosselli, S.; Maggio, A.; Raccuglia, R. A.; Bastow, K. F.; Wu, C.-C.; Lee, K.-H. *Planta Med.*, **2005**, 71, 1176-1178.
12. Barrero, A. F.; Oltra, J. E.; Raslan, D. S.; Saúde, D. A. *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62, 726-729.
13. Bruno, M.; Fazio, C.; Diaz, G. J.; Herz, W. *Planta Med.*, **1995**, 61, 374-375.
14. Fernández, I.; Pedro, J. R.; Polo, E. *Phytochemistry*, **1995**, 38, 655-657.
15. Bruno, M.; Herz, W. *Phytochemistry*, **1988**, 27, 1873-1875.
16. Monsalve, L. N.; Roselli, S.; Bruno, M.; Baldessari, A. *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 2106-2115.
17. Bruttomesso, A. C.; Baldessari, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, 29, 149-153.

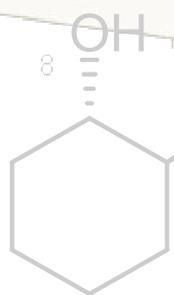
18. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M.; *Protective groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999, p150-159.
19. Rustaiyan, A.; Niknejad, A.; Aynehchi, Y. *Planta Med.*, **1984**, *50*, 185-186.
20. Smith, M. B.; *Organic Synthesis*, 2nd Ed., McGraw-Hill, New York, 2002, p110-112.
21. Volante, R. *Tetrahedron Lett.*, **1981**, *22*, 3119-3122.
22. (a) Zhao, L.; Fang, L.; Xu, Y.; Liu, S.; He, Z.; Zhao, Y. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2008**, *69*, 199-213; (b) Pujals, S.; Giralt, E. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, *60*, 473-484.
23. Rustoy, E. M.; Ruiz Arias, I. E.; Baldessari, A. *ARKIVOC*, **2005**, *xii*, 175-180.
24. Bruttomesso, A. C.; Tiscornia, A.; Baldessari, A. *Biocatal. Biotransform.*, **2004**, *22*, 215-220.

CAPÍTULO V

Resultados y discusión

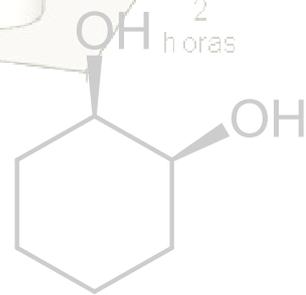


V-1



V-2

+



V-3

V. REDUCCIÓN BIOCATALÍTICA DE DICETONAS VECINALES

V.1. Introducción

La generación de centros asimétricos en una molécula mediante reacciones estereoselectivas constituye una importante herramienta para la producción de sustancias químicas quirales distintas a aquellas que se pueden encontrar en la naturaleza. Estos productos sintéticos pueden tener aplicación como sintones de productos de interés farmacológico, así como también de precursores de auxiliares quirales para síntesis asimétrica.

Entre las posibles reacciones de síntesis asimétrica, se ha focalizado la atención en la obtención de dioles vecinales y α -hidroxicetonas quirales mediante reacciones de condensación aldólica, reducción de productos dicarbonílicos y oxidación de olefinas proquirales.¹⁻⁴ Estos productos en forma enantiopura tienen aplicación en la producción de productos farmacéuticos, como por ejemplo inhibidores de formación de fibra amiloide,⁵ drogas antidepresivas⁶ o agentes antitumorales⁷ entre otros. También resultan precursores muy convenientes para la síntesis de diaminas y difosfinas quirales útiles como inductores quirales en síntesis asimétrica.

Para la preparación de dioles vecinales y α -hidroxicetonas por medio de síntesis asimétrica se han desarrollado catalizadores que contienen boro o metales de transición. Estos suelen tener algunos inconvenientes en su aplicación, como ser toxicidad o costo elevado.

Las dicetonas vecinales pueden actuar como precursores inmediatos en la obtención de este tipo de compuestos.⁸ En este punto suelen existir problemas a la hora de mantener un buen control en el estado de oxidación de los productos y de prevenir la reducción excesiva de los mismos.

Para resolver este problema se han desarrollado varios métodos: entre ellos procesos electroquímicos,⁹ haluros de titanio, vanadio y cinc^{10,11} y alquil fosfinas activadas.¹² Si bien estas metodologías han permitido la obtención de α -hidroxicetonas con buenos rendimientos, no han tenido en cuenta la estereoselectividad en ninguno de estos casos.

La biocatálisis ofrece una alternativa para la reducción regio- y estereoselectiva de compuestos dicarbonílicos. En este ámbito se han realizado trabajos en los cuales se han

podido obtener dioles e hidroxicetonas enantiopuras empleando alcohol deshidrogenasas de fuentes diversas.^{13,14} Si bien estos resultados fueron muy satisfactorios a nivel sintético, el empleo de enzimas aisladas que requieran cofactores conlleva una desventaja importante en lo que respecta al costo monetario que implica llevar a cabo una síntesis en esas condiciones. Este costo tiene dos fuentes: la obtención de la enzima en estado puro por un lado y la necesidad de utilizar cofactores (NADH o NADPH cuando se emplean deshidrogenasas) en cantidades estequiométricas, siendo este último mucho más importante ya que se incrementa proporcionalmente con la escala de la síntesis.

Una manera de salvar este inconveniente involucra el empleo de células enteras. De esta forma, tanto la enzima que cataliza la reducción del sustrato como los cofactores necesarios se encuentran en un mismo organismo, regenerándose estos últimos por medio de las rutas metabólicas que el organismo posee. En especial, el empleo de microorganismos provee una fuente económica de enzimas y cofactores para efectuar reducciones biocatalíticas de compuestos carbonílicos.

Sin embargo, esta alternativa también acarrea desventajas desde el punto de vista sintético si se la compara con el empleo de enzimas aisladas. El uso de células enteras para realizar biotransformaciones puede derivar en pérdida de selectividad como consecuencia de la potencial participación de varias enzimas en el proceso. El medio de reacción también es limitante cuando se emplean células enteras, ya que debe garantizar la estabilidad de todo el sistema enzimático que participa en el proceso. Además, muchas veces resulta necesario emplear grandes cantidades de biomasa en relación al sustrato, con lo cual la producción a gran escala mediante esta metodología puede presentar complicaciones.

Se han empleado microorganismos en la reducción de dicetonas vecinales; como las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*¹⁵ y *Pichia glucozyma*;¹⁶ y los hongos *Aspergillus oryzae* y *Fusarium roseum*.¹⁷

Las células enteras de *Rhodotorula minuta* han demostrado ser eficientes como catalizadores en un amplio rango de biotransformaciones efectuadas en medio acuoso,¹⁸ macroemulsiones¹⁹ y medio orgánico.²⁰ En nuestro laboratorio, se han empleado estas células para efectuar la reducción regio- y estereoselectiva de ésteres alquílicos del ácido 2-oxoglutarico.²⁰

Teniendo todos estos antecedentes en cuenta, se decidió evaluar la efectividad de células enteras de *Rhodotorula minuta* como biocatalizadores para llevar a cabo la reducción de una serie de dicetonas vecinales. Los sustratos utilizados abarcaron dicetonas alquílicas y arílicas, cíclicas y acíclicas, y dos enol ésteres (Figura V.1). Con el objeto de optimizar los resultados, se estudió la influencia de diversos parámetros de reacción como ser el medio, la relación biomasa/sustrato y el tiempo de reacción en la selectividad y conversión obtenidas.

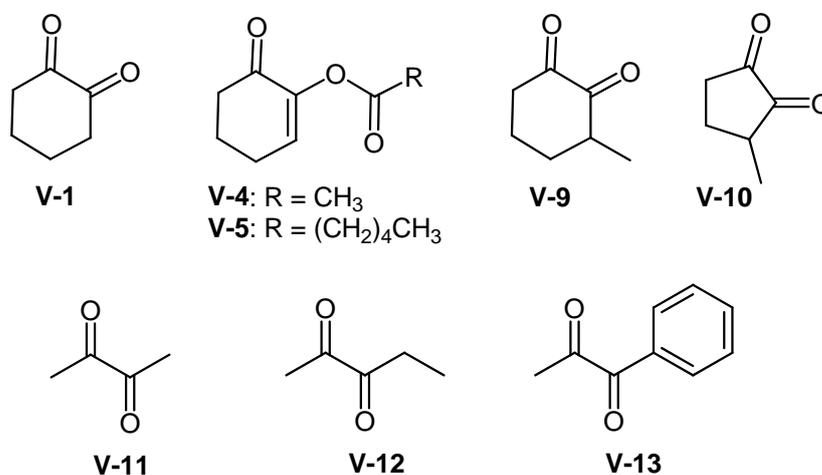


Figura VI.1. Sustratos empleados en la reducción catalizada por *Rhodotorula minuta*.

El estudio que se presenta aquí se puede dividir en dos secciones principales:

- Reducción de las dicetonas cíclicas **V-1**, **V-9** y **V10**, y los enol ésteres derivados **V-4** y **V-5** catalizada por *Rhodotorula minuta*. En esta sección se optimizaron las condiciones de reacción (solvente, relación biomasa/sustrato, tiempo de reacción, empleo de cultivo fresco o liofilizado).
- Reducción de las dicetonas acíclicas **V-11**, **V-12** y **V-13**.

V.2. Reducción de dicetonas cíclicas

V.2.1. Efecto del solvente

Se comenzó estudiando la reducción de 1,2-ciclohexanodiona (**V-1**) empleando cultivo fresco de *Rhodotorula minuta* como biocatalizador.

Se evaluó el desempeño de la reducción en varios sistemas de solventes: como ser agua, glicerol, hexano, tolueno y mezclas bifásicas de agua con hexano, tolueno, isooctano y acetato de etilo. Se empleó una relación biomasa/sustrato de 4 (g/mmol) en todos los casos. La temperatura de reacción fue de 33° C. Las reacciones se monitorearon por CCD y CGL a distintos tiempos para evaluar conversión y selectividad.

Los productos de reducción fueron identificados en todos los casos como una mezcla de dioles vecinales, sin que se pudiera obtener la α -hidroxicetona intermediaria en ninguno de ellos. Se obtuvieron los tres estereoisómeros, mayoritariamente (*S,S*)-1,2-ciclohexanodiol (**V-2**) y *meso*-1,2-ciclohexanodiol (**V-3**). Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla V.1.

De los resultados obtenidos se puede observar que la actividad se ve favorecida por la presencia de agua en el medio de reacción. En mezclas bifásicas, la actividad fue comparable con aquella obtenida en agua sólo al emplear solventes de muy baja polaridad, como hexano e isooctano en los cuales el sustrato es muy poco soluble. En cuanto a la selectividad se puede observar que a tiempos cortos la reducción es más selectiva, pero la conversión es baja. A tiempos más largos se alcanza una conversión cuantitativa, pero se obtiene una mayor proporción del producto *meso* **V-3**. A su vez, el exceso enantiomérico de **V-2** es ligeramente menor a las 24 horas.

La selectividad resultó moderada y se obtuvieron mayoritariamente alcoholes con configuración absoluta *S*, siguiendo el curso predicho por la regla de Prelog.²¹ Esta regla ilustra el comportamiento general de la mayoría de las reductasas en la reducción de compuestos carbonílicos. Se postula que el ataque de hidruro en condiciones biocatalíticas se produce preferentemente por la cara *Re* del sustrato, tal como muestra el Esquema V.1.

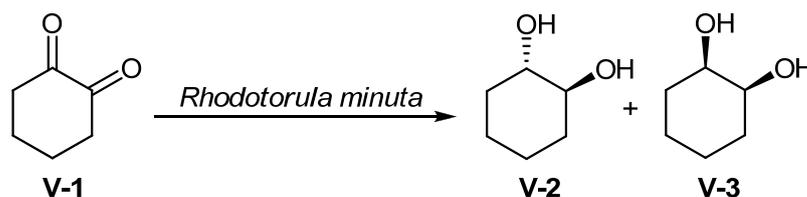
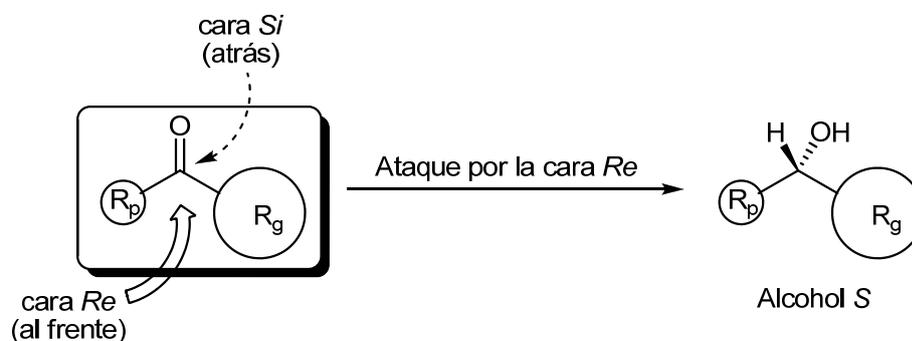


Tabla V.1. Reducción de 1,2-ciclohexanodiona en distintos medios de reacción.

Solvente	Tiempo (h)	Producto V-2		Producto V-3
		Conversión (%)	ee (%)	Conversión (%)
agua	2	4	73	5
agua	24	19	58	74
glicerol	2	-	-	-
glicerol	24	4	61	14
hexano	2	-	-	-
hexano	24	8	54	50
tolueno	2	-	-	-
tolueno	24	9	56	23
agua:hexano ^a	2	5	69	15
agua:hexano ^a	24	17	55	67
agua:isooctano ^a	2	-	-	7
agua:isooctano ^a	24	13	57	50
agua:tolueno ^a	2	-	-	-
agua:tolueno ^a	24	7	57	24
agua:acetato de etilo ^a	2	-	-	-
agua:acetato de etilo ^a	24	7	53	25

^amezclas bifásicas 1:1 en volumen.



Esquema V.1. Ilustración de la regla de Prelog. El ataque de hidruro se produce por el frente ubicando al sustituyente grande (R_g) a la derecha y el sustituyente pequeño (R_p) a la izquierda. En la mayoría de los casos este comportamiento puede interpretarse como un ataque por la cara *Re* del sustrato que genera un alcohol con configuración *S* como producto si el sustituyente grande posee una mayor prioridad que el sustituyente pequeño al aplicar las reglas de Cahn-Ingold-Prelog.

La selectividad moderada que se alcanzó en la reducción de **V-1** indicaría la participación de varias enzimas en el proceso de biotransformación. El camino enzimático correspondiente a la reducción de α -dicetonas acíclicas fue investigado en levadura de panadería, comprobándose este hecho para ese caso particular.¹⁵ Además, se observó que con este microorganismo tampoco fue posible obtener cantidades significativas de la α -hidroxicetona intermediaria. Aparentemente, la reducción de este compuesto ocurriría muy rápidamente como para poder ser detectado.

V.2.2. Efecto de la relación biomasa/sustrato

Con el objeto de establecer la influencia de la relación biomasa/sustrato en el comportamiento de la reducción biocatalítica de 1,2-ciclohexanodiona, se registró la evolución de la reducción a lo largo del tiempo en reacciones en agua a distintas relaciones biomasa/sustrato. En la Figura V.2 se muestran las conversiones alcanzadas y en la Figura V.3 la selectividad obtenida.

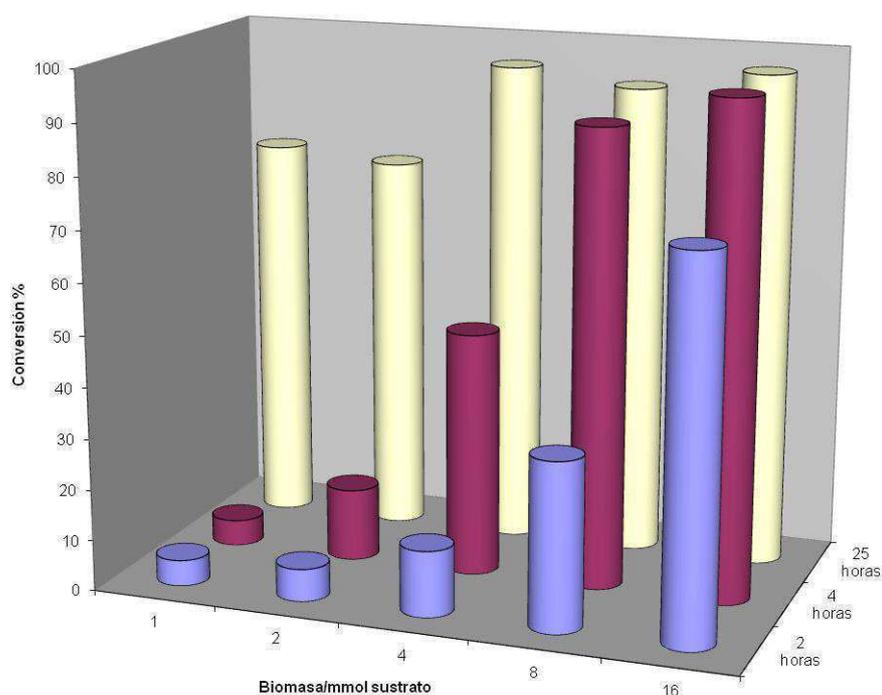


Figura V.2. Conversión de 1,2-ciclohexanodiona a diferentes tiempos empleando distintas relaciones de biomasa/sustrato.

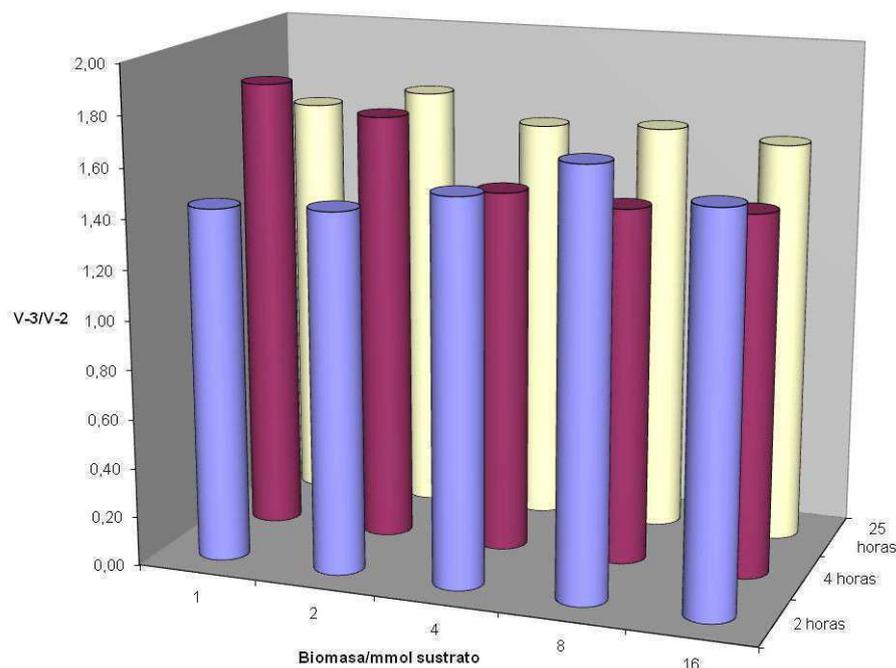


Figura V.3. Relación entre V-3 y V-2 en función de la biomasa y el tiempo de reacción.

Analizando los datos se pudo observar que se obtuvieron altas conversiones a las 25 horas empleando relaciones de biomasa a sustrato mayores o iguales a 4 y a las 4 horas con relaciones de biomasa a sustrato mayores o iguales a 8. En todos los casos se obtuvo como producto mayoritario *meso*-1,2-ciclohexanodiol en relaciones con *trans*-1,2-ciclohexanodiol que fueron entre 1,4 y 1,8. La variación de esta relación parece ser aleatoria, por lo que podría ser considerada independiente de las variables de estudio.

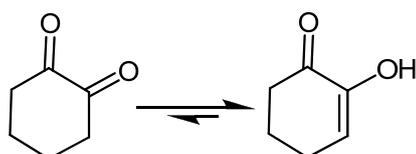
En todos los casos el segundo producto más abundante fue (*S,S*)-1,2-ciclohexanodiol (V-2). En cuanto a los excesos enantioméricos alcanzados, sólo fueron ligeramente mayores a tiempos cortos (hasta 4 horas, 63% ee en promedio) que a las 25 horas (55% ee en promedio). La Tabla V.2 muestra los excesos enantioméricos para cada caso.

Tabla V.2. Excesos enantioméricos para V-2 en función del tiempo y la relación de biomasa empleada.

		Biomasa (g/mmol)				
		1	2	4	8	16
Tiempo (h)	2	71	68	73	65	66
	4	65	67	63	60	58
	25	54	50	58	61	52

V.2.3. Reducción de enol ésteres de 1,2-ciclohexanodiona

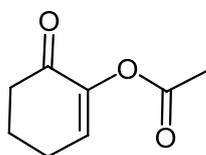
Con vistas a lograr la obtención de nuevos productos de reducción, se procedió a la preparación de derivados de 1,2-ciclohexanodiona para ser utilizados como sustratos. La existencia del sistema 1,2 dicarbonílico en este compuesto da lugar a un equilibrio ceto-enólico con preponderancia de la forma enólica, tal como se describe en el Esquema V.2.



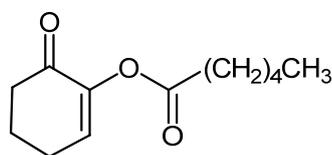
Esquema V.2. Equilibrio ceto enólico de 1,2-ciclohexanodiona.

Teniendo en cuenta este hecho se procedió a la preparación de derivados esterificados de **V-1**, que posteriormente fueron utilizados como nuevos sustratos para reducción biocatalítica.

Se sintetizaron: enol acetato de 1,2-ciclohexanodiona **V-4** y enol caproato de 1,2-ciclohexanodiona **V-5**, por tratamiento de **V-1** con el anhídrido correspondiente en piridina. Los productos se obtuvieron con muy buenos rendimientos y fueron caracterizados por métodos espectroscópicos.



2-acetoxi-2-ciclohexenona (V-4)

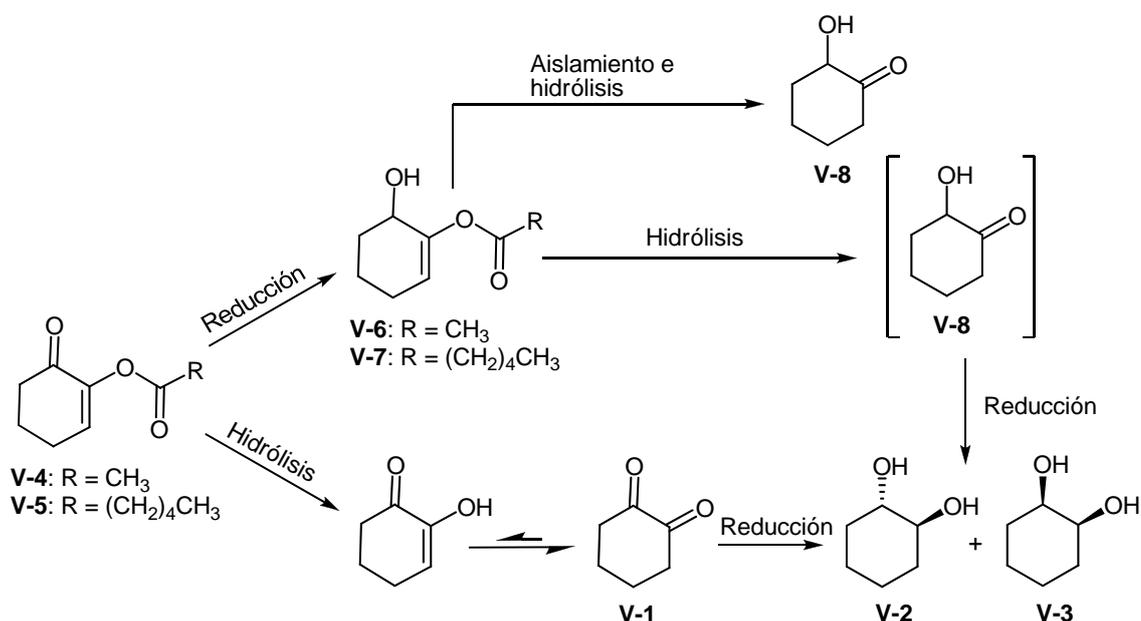


2-hexanoiloxi-2-ciclohexenona (V-5)

Alternativamente, se intentó también una acilación enzimática de la 1,2-ciclohexanodiona empleando CAL B como biocatalizador y acetato de etilo como solvente y donador de acilo, sin que se obtuvieran resultados satisfactorios.

Se podría postular, en principio, que el enol éster (**V-4** o **V-5**) puede ser objeto de dos reacciones biocatalíticas por parte del microorganismo: la hidrólisis y la reducción. Si la *Rhodotorula minuta* catalizara la reducción a mayor velocidad que la hidrólisis se podría

obtener el enol éster correspondiente de la 2-hidroxiciclohexanona (**V-6** o **V-7**). Estos productos podrían ser aislados del medio de reacción e hidrolizados o bien podrían experimentar una hidrólisis en el mismo medio de reacción para que la obtención de la 2-hidroxiciclohexanona (**V-8**) fuera posible. Esta hidroxicetona, si bien es un intermediario razonable en la reducción de **V-1** a **V-2** y **V-3**, no ha podido ser detectada hasta el momento. El Esquema *V.3* muestra los procesos que se acaban de describir.



Esquema V.3. Posibles caminos de reacción para los enol ésteres **V-4** y **V-5**. Si la velocidad de hidrólisis para **V-6** o **V-7** empleando *Rhodotorula minuta* es muy baja o nula, la hidroxicetona **V-8** podría ser aislada (camino superior). Una velocidad de hidrólisis mayor a la de reducción de los enol ésteres conduciría a la obtención de los mismos productos que en la reducción de **V-1**.

Con el objeto de poner a prueba esta hipótesis, se procedió a ensayar la transformación de **V-4** y **V-5** catalizada por *Rhodotorula minuta*. Las condiciones empleadas fueron las óptimas ya descritas para la reducción de **V-1**. El curso de las reacciones se siguió por CCD y CGL. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla *V.3*.

Tabla V.3. Biotransformación de los enoles acilados de 1,2-ciclohexanodiona **V-4** y **V-5** catalizada por *Rhodotorula minuta*.

Sustrato	Tiempo (h)	Producto V-2		Producto V-3
		Conversión (%)	ee (%)	Conversión (%)
V-4	2	4	57	6
V-4	24	42	56	57
V-5	2	2	-	5
V-5	24	32	57	64

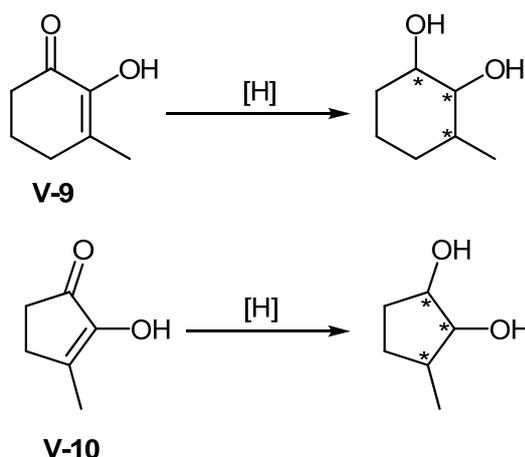
Condiciones: 33° C, solvente: agua, biomasa/sustrato = 4.

Para estas reacciones se observó que no fue posible obtener otros productos de reducción distintos a los obtenidos anteriormente. Tampoco se observaron cambios significativos en la selectividad, con lo que se puede proponer que ninguno de los enoles acilados son buenos sustratos para la reducción en las condiciones de trabajo y que la reducción se produce como paso posterior a la hidrólisis de los ésteres. Este hecho concuerda con referencias encontradas sobre la reducción de enol ésteres empleando microorganismos.²²

Para la transformación del sustrato **V-5** se encontraron cantidades menores de producto que cuando se empleó **V-4**. Este hecho puede deberse a una menor velocidad de hidrólisis para el hexanoato, más voluminoso, que para el acetato.

V.2.4. Reducción de 1,2-cicloalcanodionas sustituidas V-9 y V-10

Con el objetivo de extender el estudio del desempeño de *Rhodotorula minuta* como biocatalizador en reducciones de α -dicetonas cíclicas, se ensayaron como sustratos 3-metil-1,2-ciclohexanodiona **V-9** y 3-metil-1,2-ciclopentanodiona **V-10**. Al predominar en sus formas enólicas más estables, estos compuestos no poseen quiralidad. Una reducción de los mismos generará hasta tres nuevos centros asimétricos (Esquema V.4), con lo que resulta muy interesante explorar la selectividad de un biocatalizador con estos compuestos.



Esquema V.4. Formas enólicas de 3-metil-1,2-ciclohexanodiona **V-9** y 3-metil-1,2-ciclopentanodiona **V-10** y generación de centros asimétricos mediante la reducción de estos compuestos.

Se probó la actividad de *Rhodotorula minuta* para transformar estos compuestos. Se llevaron a cabo reacciones en agua, a 33° C y empleando una relación de biomasa/sustrato de 4. El curso de las reacciones se siguió por CCD sin que se detectaran productos de reacción para ninguno de los dos sustratos luego de 48 horas.

Estos resultados podrían explicarse en función del biocatalizador. La especificidad de sustrato para alcohol deshidrogenasas de levaduras reside en el tamaño de su sitio activo. Éste es pequeño y no acepta compuestos carbonílicos demasiado voluminosos.^{23,24} En el caso que hemos estado estudiando, tanto la presencia de un acilo como de un grupo metilo han marcado la diferencia entre la aceptación o no del sustrato.

V.2.5. Empleo de cultivo liofilizado

Para estudiar la factibilidad de utilización de *Rhodotorula minuta* en formas en las cuales se pudiera conservar más fácilmente, un lote de la levadura fue dividido en dos porciones iguales y se liofilizó una de ellas. Luego se evaluó el desempeño de ambas fracciones en la reducción de 1,2-ciclohexanodiona. Las reacciones fueron llevadas a cabo a 33° C en agua y su progreso fue controlado por CGL. La Tabla V.4 muestra los resultados alcanzados luego de 24 horas de reacción.

Tabla V.4. Comparación de desempeño de *Rhodotorula minuta* en cultivo fresco y liofilizado.

Cultivo	Producto V-2		Producto V-3
	Conversión (%)	ee (%)	Conversión (%)
fresco	40	55	53
liofilizado ^a	12	54	15

^a Se empleó la relación biomasa sustrato equivalente a 4 g/mmol en cultivo fresco (0,6 g/mmol). La suspensión acuosa de la levadura se dejó agitando media hora antes de agregar el sustrato.

Como se puede observar en los resultados, la liofilización no resultó ventajosa desde el punto de vista de las conversiones alcanzadas. El empleo de cultivo liofilizado produjo una importante reducción en la capacidad de transformación el sustrato.

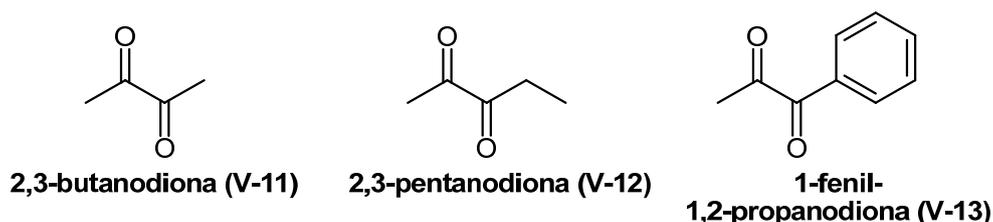
V.2.6. Condiciones óptimas

A partir de las variables estudiadas para la reducción de 1,2-ciclohexanodiona catalizada por células enteras de *Rhodotorula minuta*, se puede concluir que las condiciones óptimas son las siguientes:

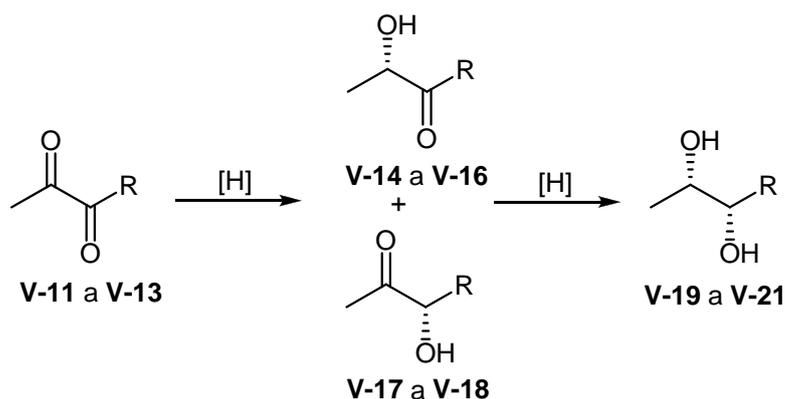
Solvente	agua
Relación biomasa/sustrato (g/mmol)	4
Tiempo (h)	24
Tipo de cultivo	fresco

V.3. Reducción de dicetonas acíclicas

Posteriormente se estudió la aplicación de *Rhodotorula minuta* en la reducción de α -dicetonas acíclicas utilizando tres sustratos: 2,3-butanodiona (V-11), 2,3-pentanodiona (V-12) y 1-fenil-1,2-propanodiona (V-13).



Las condiciones empleadas para las reacciones fueron las que se determinaron óptimas para la reducción de 1,2-ciclohexanodiona. El curso de las reacciones se siguió por CCD y CGL. Los productos obtenidos fueron aislados para confirmar su identidad por métodos espectroscópicos, CGL quiral y valores de rotación óptica.⁹ En la reacción de reducción de las α -dicetonas acíclicas se obtuvieron, además de los dioles, algunas α -hidroxicetonas tal cual se muestra en el Esquema V.5.



Compuesto	R	Compuesto	R
V-11	metilo	V-17	etilo
V-12	etilo	V-18	fenilo
V-13	fenilo	V-19	metilo
V-14	metilo	V-20	etilo
V-15	etilo	V-21	fenilo
V-16	fenilo		

Esquema V.5. Reducción de α -dicetonas acíclicas catalizada por *Rhodotorula minuta*.

La reducción biocatalítica de estos sustratos rindió varios productos: las hidroxicetonas V-14 a V-16 (hidroxicetonas tipo I), las hidroxicetonas V-17 a V-18 (hidroxicetonas tipo II) y los α -dioles V-19 a V-21. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla V.5.

Tabla V.5. Reducción biocatalítica de α -dicetonas acíclicas.

Sustrato	Tiempo (h)	Hidroxiketona tipo I ^a		Hidroxiketona tipo II ^a		α -diol	
		Conv. (%)	ee (%)	Conv. (%)	ee (%)	Conv. (%)	ed (%)
V-11	2	V-14(39)	99	- ^b	-	V-19(58)	33
V-12	2	V-15(57)	97	V-17(28)	95	V-20(14)	40
V-13	2	V-16(82)	99	-	-	V-21(15)	95
V-11	24	-	-	- ^b	-	V-19(91)	85
V-12	24	-	-	-	-	V-20(88)	77
V-13	24	V-16(5)	97	-	-	V-21(82)	95

^a la clasificación indica la regioselectividad en la reducción con respecto al sustituyente R.

^b para la reducción de V-8, la reducción de cualquiera de los dos carbonilos resulta equivalente.

Se observó que para la reducción de las α -dicetonas acíclicas la estereoselectividad fue mucho más elevada que para la reducción de 1,2-ciclohexanodiona, obteniéndose siempre mayoritariamente los alcoholes de configuración *S*. En todos los casos se observó una selectividad bastante marcada hacia la obtención de alcoholes con configuración *S*, de acuerdo a la regla de Prelog (Esquema V.1). Esto es válido siempre y cuando se considere que el sustituyente que contiene al grupo hidroxilo vecino al carbonilo en posición 3 de los sustratos V-11, V-12 y V-13 es más voluminoso que el sustituyente restante. Para el caso de la reducción de V-13 (sustituyente fenilo) esta suposición resulta bastante dudosa, pero los valores de rotación óptica que arrojaron las soluciones de V-21 indican que se trata casi totalmente del diol con configuración *S,S*.

Para la obtención de los dioles V-19 y V-20, la estereoselectividad parece aumentar con el tiempo. Este hecho puede deberse a la participación de reductasas de variada estereoselectividad en el segundo paso de reducción, cuya participación puede ir progresivamente disminuyendo, ya sea por inactivación o por efectos de concentración. El diol V-21, en cambio, puede obtenerse con la misma selectividad sin importar el tiempo de reacción. En este caso el número de enzimas participantes en la biotransformación puede quedar reducido por efectos estéricos con un sustrato más voluminoso.

La estereoselectividad en la obtención de hidroxicetonas fue alta independientemente del tiempo de reacción, a diferencia de lo encontrado para los dioles. En cuanto a la regioselectividad, se pudo observar que aumentaba conforme al incremento en el tamaño

del sustrato. La levadura parece tener preferencia a reducir primero el carbonilo unido al sustituyente menos voluminoso.

Al considerar los trabajos previos en los cuales se practicó la reducción de **V-12** catalizada por microorganismos, ha sido posible tanto la obtención de **V-20**⁹ como la de su diasterómero (2*S*,3*R*)-2,3-pentanodiol.²⁴

Cabe mencionar que en la reducción biocatalítica de dicetonas acíclicas, a diferencia de lo ocurrido con 1,2-ciclohexanodiona, las α -hidroxicetonas correspondientes pudieron ser obtenidas con regioselectividades moderadas a muy buenas y excelente estereoselectividad.

V.4. Conclusión

En esta sección del presente trabajo de tesis se han sometido algunas α -dicetonas a reacciones de biotransformación empleando células enteras de *Rhodotorula minuta* como biocatalizador.

Primeramente se optimizaron las condiciones experimentales para la reducción de 1,2-ciclohexanodiona. Se produjo la reducción de la misma directamente a 1,2-ciclohexanodiol con estereoselectividad moderada, sin que se pudiera detectar la α -hidroxicetona intermediaria.

El empleo de enol ésteres tampoco permitió la obtención de este producto de reducción intermedio, ya que estos no resultaron sustratos aceptables para las deshidrogenasas de la levadura y fueron hidrolizados como paso previo a la reducción.

La reducción biocatalítica de 1,2-cicloalcanodionas sustituidas no pudo ser llevada a cabo con éxito. Es probable que estos sustratos sean estéricamente incompatibles con el sitio activo de las deshidrogenasas del microorganismo.

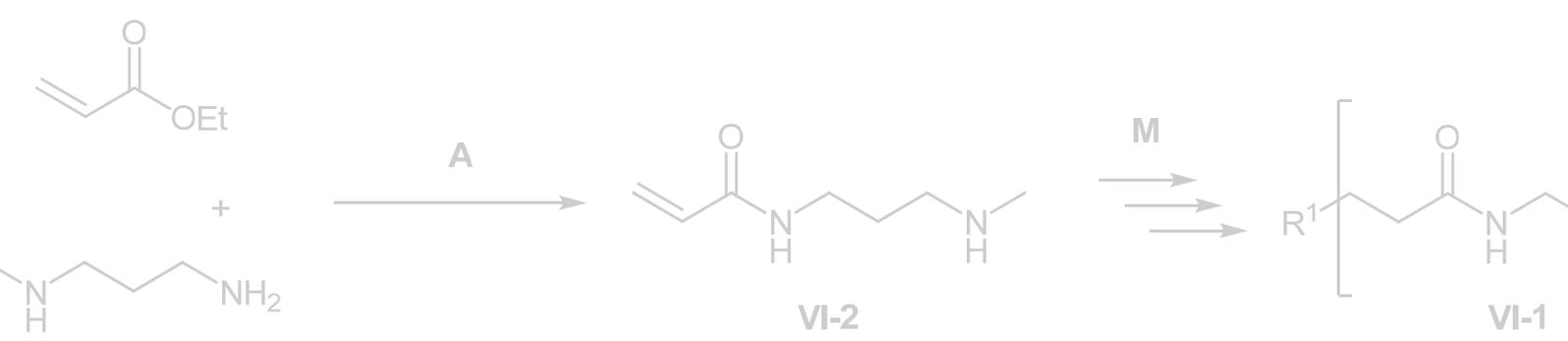
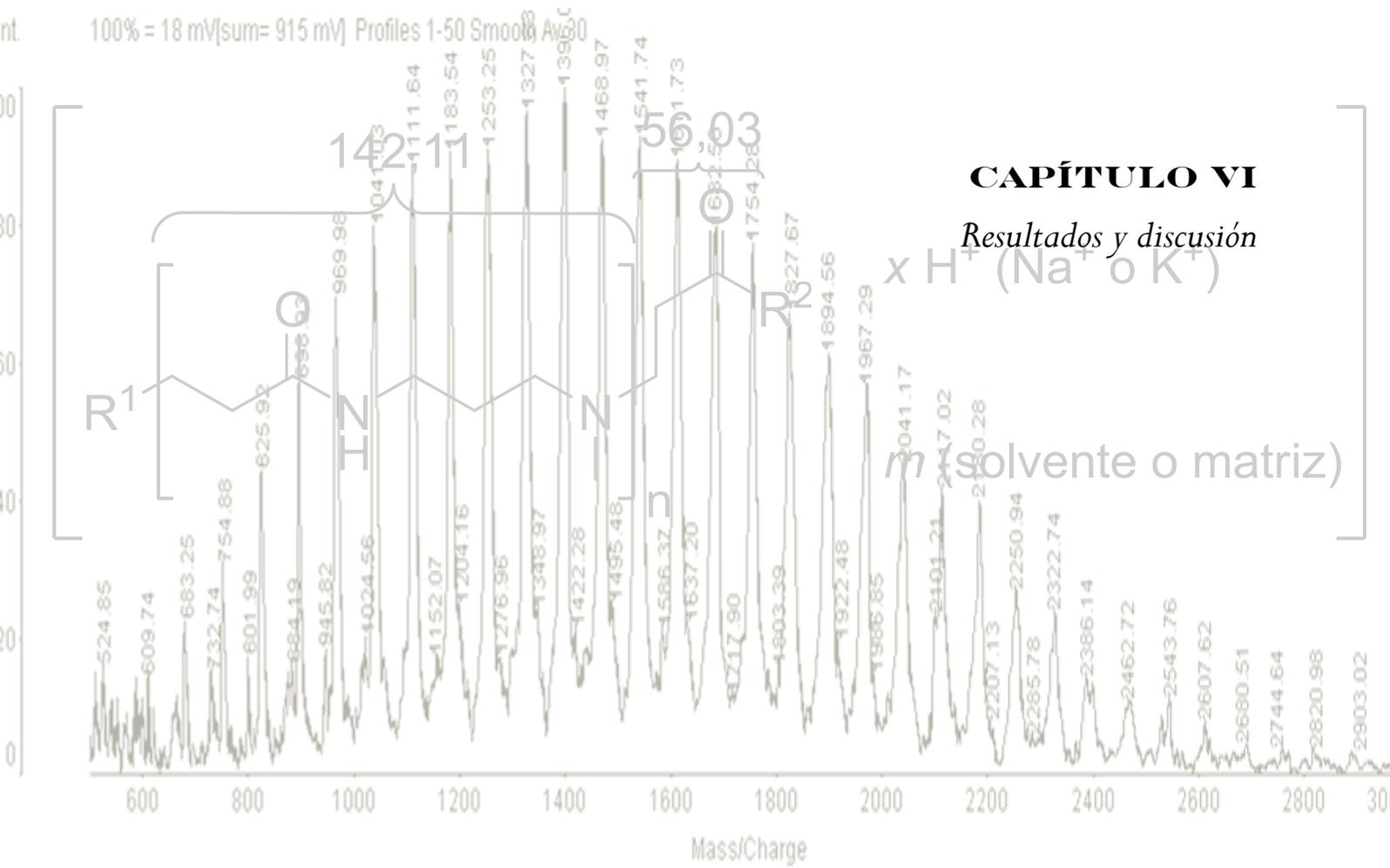
La reducción de α -dicetonas acíclicas procedió con una estereoselectividad más marcada. Para estos casos sí fue posible encontrar α -hidroxicetonas como productos intermedios de reducción, pero no fue posible en ningún caso frenar la reducción en este punto. La estereoselectividad en la obtención de dioles fue variable con el tiempo, lo cual indicaría la participación de múltiples enzimas en el proceso. En cuanto a la regioselectividad, ésta se vio influenciada por la naturaleza de los sustituyentes del sustrato. Cuando se empleó

V-13 como sustrato, siempre la reducción ocurrió primero por reacción sobre el carbonilo menos impedido. Este hecho permitió la obtención de de la hidroxicetona **V-16**, un intermediario en la síntesis de productos de interés farmacológico, con muy buen rendimiento y excelente estereoselectividad.

Bibliografía

1. Bode, S. E.; Wolberg, M.; Müller, M. *Synthesis*, **2006**, 557-588.
2. Biradar, A. V.; Sathe, B. R.; Umbarkar, S. B.; Dongare, M. K. *J. Mol. Catal. A: Chemical*, **2008**, *285*, 111-119.
3. Neisius, N. M.; Plietker, B. *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 3218-3227.
4. Samanta, S.; Zhao, C.-G. *Tetrahedron Letters*, **2006**, *47*, 3383-3386.
5. Wallace, O. B.; Smith, D. W.; Desphande, M. S.; Polson, C.; Felsenstein, K. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 1203-1206.
6. Fang, Q. K.; Han, Z.; Grover, P.; Kessler, D.; Senanayade, C. H.; Wald, S. A. *Tetrahedron Asymmetry*, **2000**, *11*, 3659-3663.
7. Anisimov, V. N. *Current Drug Target*, **2006**, *7*, 1485-1503.
8. Nakamura, K.; Yamanaka, R. Matsuda, T.; Harada, T. *Tetrahedron Asymmetry*, **2003**, *14*, 2659-2681.
9. Boutoute, P.; Mousset, G.; Veschambre, H. *New J. Chem.*, **1998**, 247-251.
10. Clerici, A.; Porta, O. *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 76-81.
11. Hayakawa, R.; Sahara, T.; Shimizu, M. *Tetrahedron Letters*, **2000**, *41*, 7939-7942.
12. Zhang, W.; Shi, M. *Chem. Commun.*, **2006**, 1218-1220.
13. Stampfer, W.; Kosjek, B.; Faber, K.; Kroutil, W. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 402-406.
14. Kosjek, B.; Stampfer, W.; Pogorevc, W.; Goessler, W.; Faber, K.; Kroutil, W. *Biotechnol. Bioeng.*, **2004**, *86*, 55-62.
15. Besse, P.; Bolte, J.; Fauve, A.; Veschambre, H. *Bioorg. Chem.*, **1993**, *21*, 342-353.
16. Hoyos, P.; Sansottera, G.; Fernández, M.; Molinari, F.; Sinisterra, J. V.; Alcantara, A. R. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 7929-7936.
17. Demir, A. S.; Hamamchi, H.; Ayhan, P.; Duygu, A. N.; Igdır, A. C.; Campanoglu, D. *Tetrahedron Asymmetry*, **2004**, *15*, 2579-2582.
18. Yang, W.; Xu, J. H.; Xie, Y.; Xu, Y.; Zhao, G.; Lin, G. Q. *Tetrahedron Asymmetry*, **2006**, *17*, 1769-1774.
19. Cinelli, G.; Cuomo, F.; Hochkoeppler, A.; Ceglie, A.; Lopez, F. *Biotechnol. Prog.*, **2006**, *22*, 689-695.

20. Rustoy, E. M.; Cerrutti, P.; Galvagno, M.; Baldessari, A. *Biocatal. Biotransf.*, **2008**, *26*, 204-209.
21. Prelog, V. *Pure Appl. Chem.*, **1968**, *9*, 119-130.
22. Kume, Y.; Ohta, H. *Tetrahedron Letters*, **1992**, *33*, 6367-6370.
23. Trivić, S.; Leskovac, V. *J. Serb. Chem.*, **2000**, *65*, 207-227.
24. Ramaswamy, S.; Kratzer, D. A.; Hershey, A. D.; Rogers, P. H.; Arnone, A.; Eklund, H.; Plapp, B. V. *J. Mol. Biol.*, **1994**, *235*, 777-779.
25. Edegger, K.; Stampfer, W.; Seisser, B.; Faber, K.; Mayer, S. F.; Oehrlein, R.; Hafner, A.; Kroutil, W. *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 1904-1909.



VI. SÍNTESIS DE POLIAMIDOAMINAS LINEALES CATALIZADA POR LIPASAS

VI.1. Introducción

Las poliamidoaminas conforman una familia de polímeros sintéticos biodegradables que se caracteriza por la presencia de grupos funcionales amida y amino, siendo estos últimos generalmente terciarios. El desarrollo en la síntesis de estos polímeros ha dado lugar a la preparación de poliamidoaminas lineales,^{1,2} ramificadas³ y dendríméricas.⁴

Además de ser biodegradables, estos polímeros presentan grupos ionizables a pH fisiológico y aceptores de puente de hidrógeno. Esta característica los ha hecho atractivos para su uso en aplicaciones de nanotecnología y biotecnología.² Por ejemplo, se ha descrito el uso de poliamidoaminas en liberación controlada de fármacos,⁵ diseño de vectores no virales para terapia génica,^{2,6} secuestro de iones de metales pesados,⁷ diseño de catalizadores^{8,9} y desarrollo de soportes biocompatibles para crecimiento celular y fabricación de implantes.^{10,11} Por otro lado, las poliamidoaminas son utilizadas para la preparación de resinas que, agregadas a la pulpa de celulosa, permiten mejorar las propiedades mecánicas del papel que se obtiene a partir de ella.¹²

Para su uso como vector en terapia génica, algunas poliamidoaminas han demostrado tener eficiencias de transfección comparables a lípidos cationizados como Lipofectamine[®], comercializado por InVivoGen.

Muchas de estas aplicaciones requieren el uso de estos polímeros *in vivo*, con lo cual se han llevado a cabo estudios de citotoxicidad de los mismos. En general, no han demostrado una toxicidad elevada.¹³ Para los dendrímeros, se encontró que su citotoxicidad crecía con el tamaño y la densidad de carga superficial. Sin embargo, este efecto puede depender de los grupos funcionales específicos en la superficie, como los grupos amino primarios.¹⁴

Se ha sintetizado una gran cantidad de poliamidoaminas dendríméricas, algunas de las cuales están disponibles comercialmente. Este tipo de polímero es preferido por sobre los lineales y ramificados porque, entre otras cosas, su síntesis permite un control muy estricto de su peso molecular y su regularidad estructural. Para la síntesis de dendrímeros, primero se elige una molécula que oficia como núcleo del polímero. Para este fin se han

utilizado diaminas primarias, como la etilendiamina o la cisteamina, entre otras. También se han elegido compuestos polihidroxilados como núcleos de dendrímeros, como el pentaeritritol o el inositol. El primer paso de reacción consiste en hacer reaccionar al núcleo con acrilato de metilo, por ejemplo, mediante una adición de Michael exhaustiva. El segundo paso consiste en la aminólisis de los ésteres terminales con una diamina primaria, para generar las primeras funciones amida y ubicar grupos amino primario en los extremos del dendrímero. Repitiendo alternadamente el primer y el segundo paso, es posible hacer crecer y ramificar el polímero de manera controlada. El número de veces que se repite la secuencia define el tamaño molecular y recibe el nombre de generación (G0, G1, etc.), tal como se muestra en la Figura VI.1.

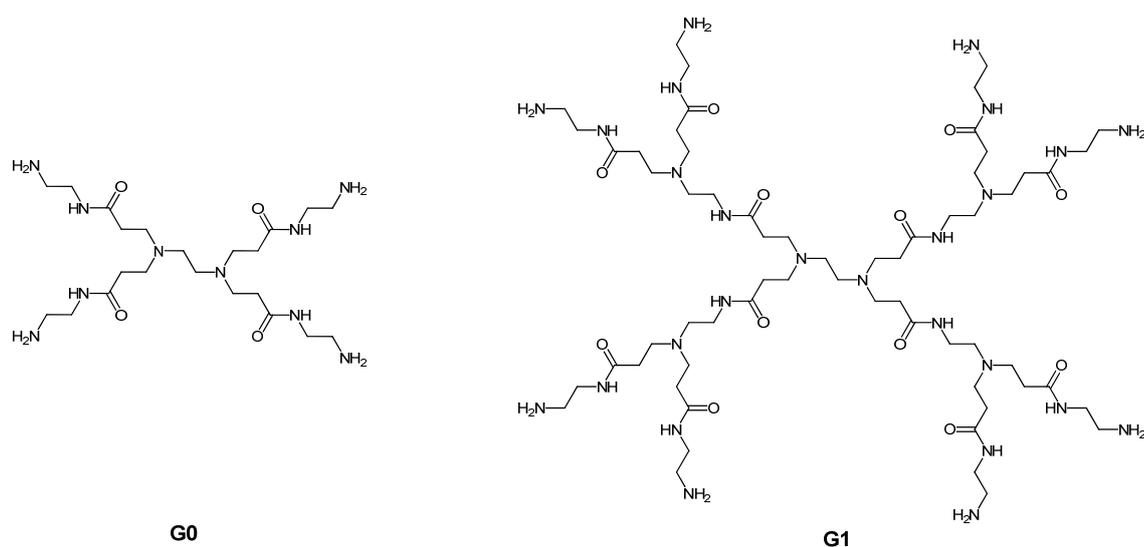
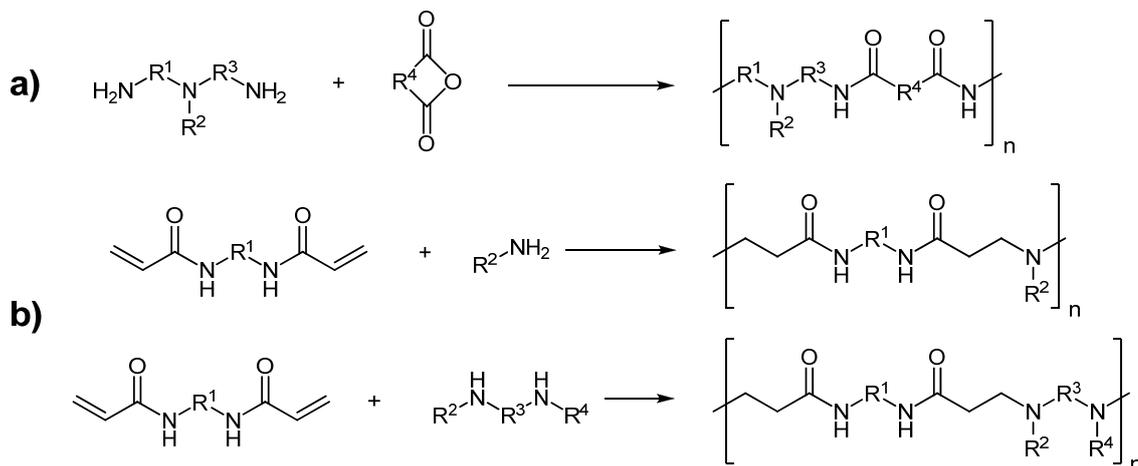


Figura VI.1. Poliamidoaminas dendríméricas sintetizadas por pasos a partir de etilendiamina y acrilato de metilo en dos pasos (G0) y cuatro pasos (G1) de síntesis.

Por otro lado, la síntesis de poliamidoaminas lineales y ramificadas puede realizarse en un solo paso, obteniéndose polímeros más irregulares y de peso molecular más disperso. Esta característica conlleva la ventaja de poder introducir, aunque de manera aleatoria, una gran variedad de funciones (amino, ácido carboxílico, puentes disulfuro, cadenas hidrofóbicas, conjugados con otros polímeros o moléculas bioactivas) en una misma molécula partiendo de una mezcla adecuada de monómeros. Usualmente se emplea un solo tipo de reacción, formación de amidas o adiciones de Michael, para llevar a cabo la polimerización. Para la síntesis de poliamidoaminas lineales siempre se ha empleado como

material de partida una mezcla de bisacrilamidas con monoaminas primarias o diaminas secundarias,^{2,15,16} o bien una mezcla de compuestos derivados de ácidos dicarboxílicos con aminas secundarias sustituidas con cadenas alquílicas que poseen grupos amino primario en sus extremos (Esquema VI.1).¹⁷



Esquema VI.1. Estrategias empleadas tradicionalmente en la síntesis de poliamidoaminas lineales: a) aminólisis de derivados de compuestos dicarboxílicos, b) adición de Michael sobre bisacrilamidas.

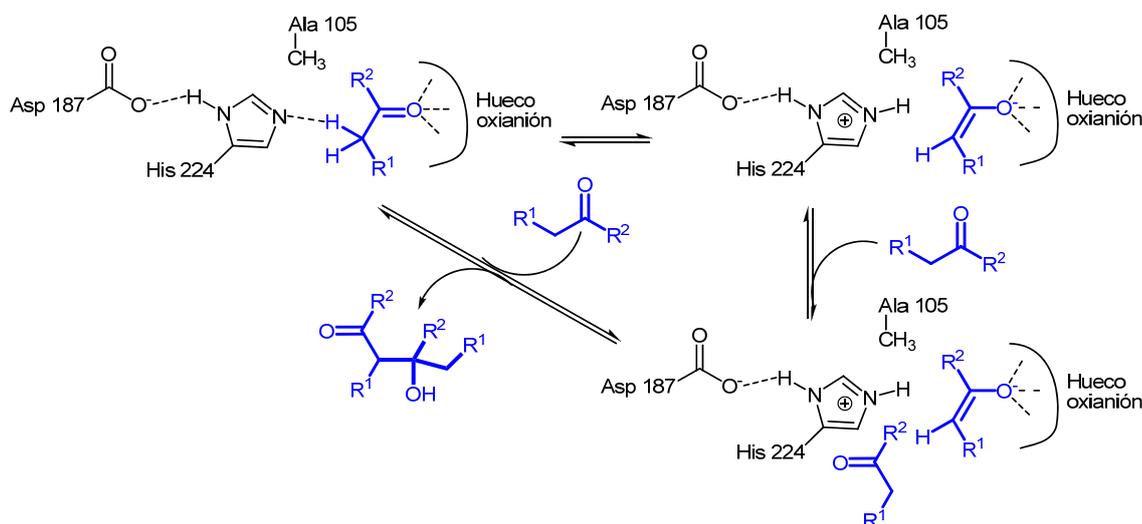
Es un hecho bien establecido que las enzimas son capaces de officiar de catalizadores en la síntesis de materiales poliméricos. La presencia de polisacáridos, poliésteres, polienos y polifenoles en la naturaleza avala esta afirmación. Por ejemplo, para muchos polisacáridos naturales la ruta biosintética se encuentra bien definida, con enzimas que actúan específicamente en el ensamblaje de las unidades monoméricas.

Para la síntesis enzimática de polímeros *in vitro*, la realidad es bien distinta. Si bien es posible llevar a cabo exitosamente la síntesis de muchos polímeros empleando enzimas fuera del entorno biológico, una misma enzima es capaz de producir polímeros distintos con gran variedad funcional y estructural.

En el caso específico de las polimerizaciones catalizadas por lipasas, se ha podido obtener una diversidad de poliésteres,¹⁸ poliamidas¹⁹ y polímeros acrílicos.²⁰ Cabe resaltar que en muchos de estos casos se obtuvieron polímeros con índice de polidispersión cercano a la unidad.

Es de particular interés el hecho de que una lipasa sea capaz de catalizar la obtención de polímeros acrílicos, formando enlaces carbono-carbono. Si bien este mecanismo no se

encuentra todavía bien establecido, existen estudios mecánicos relacionados a la obtención de productos de condensación aldólica catalizada por lipasas mutantes²¹ en donde se sugiere la participación de la histidina del sitio activo y del hueco oxianión de la enzima (Esquema VI.2).



Esquema VI.2. Mecanismo de condensación aldólica propuesto para el compuesto carbonílico resaltado en azul (R^1 , R^2 = hidrógeno o alquilo) en presencia de CAL B mutante (Ser105Ala).

Además de las reacciones de sustitución sobre un acilo, se ha encontrado que las lipasas pueden catalizar la adición de Michael de aminas secundarias sobre acrilonitrilo²² y de bencilamina a carbonilos α , β insaturados.²³

Teniendo en cuenta la experiencia adquirida en nuestro laboratorio en reacciones de acrilato de etilo con alcanolaminas catalizada por lipasas,^{20,24} en esta sección del presente trabajo de tesis, se decidió poner a prueba esta capacidad catalítica polivalente de las lipasas y estudiar los productos de reacción de acrilato de etilo con *N*-metil-1,3-diaminopropano catalizada por este tipo de enzima.

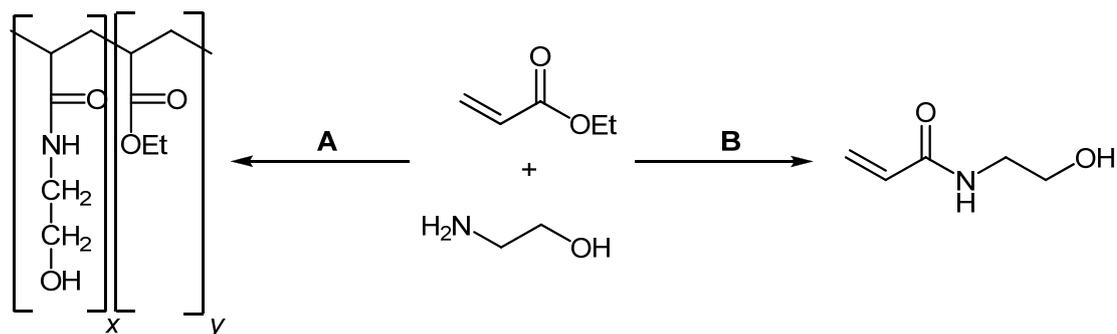
El trabajo que aquí se presenta puede dividirse en tres partes:

- Estudio de la reacción en condiciones modelo establecidas por la experiencia adquirida previamente en nuestro laboratorio.
- Caracterización del polímero obtenido en una de las condiciones empleadas. Se determinaron varios parámetros moleculares, como la identidad de la estructura repetitiva, grupos terminales, pesos moleculares promedio e índice de polidispersión; así como su solubilidad y comportamiento ácido-base.

- Análisis de la influencia de diversos parámetros de reacción, como el solvente, la concentración, la relación enzima/sustrato, relación agente acilante/sustrato, el agente acilante y fuente de la lipasa entre otros, en la obtención del polímero.

VI.2. Condiciones modelo

Basándose en los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, se decidió comenzar el trabajo ensayando dos condiciones de reacción optimizadas previamente para la obtención de derivados de etanolamina con acrilato de etilo. Una de ellas había permitido la preparación de *N*-(2-hidroxiethyl)-acrilamida²⁴ y la otra posibilitó la obtención de poli[*N*-(2-hidroxiethyl)-acrilamida-co-acrilato de etilo].²⁰ Las condiciones empleadas se muestran a continuación en el Esquema VI.3.



Condiciones	A	B
Solvente	acetonitrilo	DIPE
Temperatura	33° C	
Tiempo	24 h	
Enzima	CAL B	
E/S	1	
Agente acilante/Sustrato	1	
Concentración de sustrato	3 M	0,12 M

Esquema VI.3. Condiciones de reacción iniciales empleadas para estudiar la reacción de acrilato de etilo con *N*-metil-1,3-diaminopropano.

La reacción en la cual se empleó la concentración más elevada de ambos reactivos (condiciones A) dio lugar a la obtención de un líquido que contenía una mezcla de

productos. El espectro de RMN ^1H de la mezcla de productos en cloroformo deuterado reveló la presencia de ésteres etílicos (triplete a 1,24 ppm y cuarteto a 4,11 ppm) y amidas secundarias (multiplete a 3,25 ppm). No se observaron señales de protones vinílicos. Se hallaron singuletes a 2,40 y 2,20 ppm. Estas señales corresponden a las resonancias de los protones de metilo vecino a nitrógeno como sustituyente, tanto en amina secundaria (en *N*-metil-1,3-diaminopropano los protones de metilo resuenan como singulete a 2,34 ppm) como terciaria (el singulete debería encontrarse a desplazamientos químicos levemente más bajos). Si se comparan las áreas de las señales de los metilenos de éster etílico (4,11 ppm) con las de metileno vecino a amida (3,25 ppm) y las de metileno que está equidistante de ambos nitrógenos (1,66 ppm) vemos que la relación es 1:1:2. Esto indica que existe igual cantidad de funciones amida que éster, y que la mitad del *N*-metil-1,3-diaminopropano reaccionó para dar aductos de Michael, mientras que la otra mitad dio producto de aminólisis.

De este análisis se obtiene como conclusión que la mezcla se compone principalmente de aductos de Michael de acrilato de etilo y *N*-[3(metilamino)propil]-acrilamida con *N*-metil-1,3-diaminopropano. La Figura VI.2 muestra la posible composición cualitativa de la mezcla.

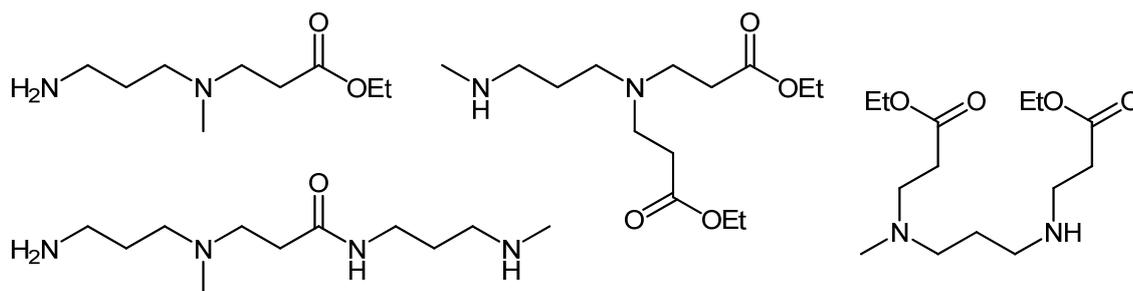


Figura VI.2. Mezcla de aductos de Michael producto de la reacción de acrilato de etilo y *N*-metil-1,3-diaminopropano catalizada por CAL B en las condiciones A.

El resultado obtenido empleando las condiciones B fue bien diferente. Luego de 24 horas se encontró que de la solución de reacción se había separado un aceite muy viscoso, adherido a las paredes de vidrio del recipiente reacción y reteniendo las partículas del biocatalizador. Se separó el sobrenadante y el aceite mencionado se disolvió en una mezcla

de cloroformo:etanol 2:1 y se filtró para separarlo de la enzima. Se evaporó el solvente y se obtuvo nuevamente el aceite viscoso libre de la enzima.

Durante la operación de filtración de la enzima se observó que las soluciones del producto eran tixotrópicas. Fue por ello que se aceleró la operación de filtrado evitando que la solución se estancara en el embudo. Este hecho permite, en principio, postular la existencia de un producto polimérico o que forma agregados estables en solución.

VI.3. Caracterización del producto obtenido en las condiciones B

VI.3.1. Resonancia magnética nuclear

Se realizaron espectros de RMN ^1H y ^{13}C del producto en agua. Se observaron señales anchas en el espectro protónico.

El espectro protónico de la Figura VI.3 muestra un multiplete a aproximadamente 1,6 ppm. Esta señal evidencia al metileno en la posición central de la cadena que une ambos nitrógenos. También se observa un grupo de señales que no se encuentran completamente resueltas entre 2,2 y 3 ppm. Entre ellas se distingue el singulete correspondiente a los metilos que sustituyen uno de los nitrógenos a 2,2 ppm. A 3,2 ppm aparece un multiplete que corresponde a uno de los metilenos unidos a nitrógeno.

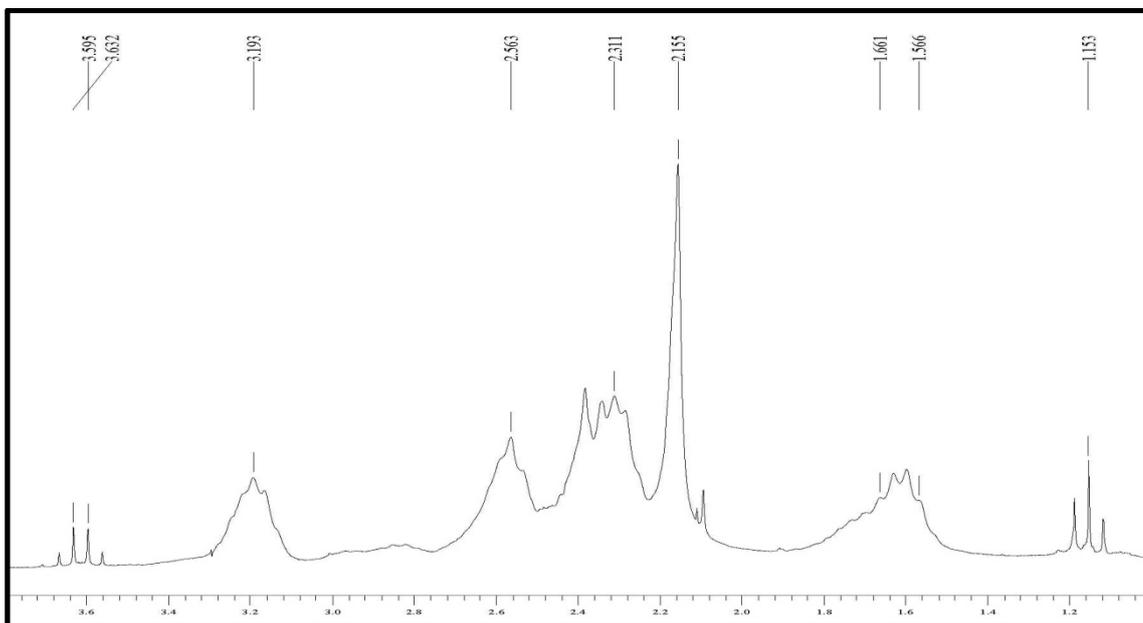


Figura VI.3. Espectro RMN ^1H del producto obtenido en las condiciones B.

Este corrimiento a campos más bajos con respecto a las señales de metileno vecino a nitrógeno en la diamina empleada como nucleófilo, evidencia que se ha formado una amida a partir de, al menos uno de los dos grupos amino. La diferencia en desplazamiento químico con la señal correspondiente al metilo nuestra que en la reacción de aminólisis del acrilato de etilo empleando esta diamina ha participado selectivamente el grupo amino primario. En nuestro laboratorio se han practicado reacciones de aminólisis de otro éster empleando la misma diamina, obteniéndose la misma selectividad que se observó en este caso.²⁵

Otro hecho es que no se encontraron señales asignables a protones vinílicos, a partir de lo cual se puede inferir que los dobles enlaces carbono-carbono del sustrato han reaccionado, presumiblemente mediante una adición de Michael. La adición de Michael explica no sólo la desaparición de las señales vinílicas, sino también que los nuevos metilenos generados a partir del acrilato se encuentren entre 2,2 y 3 ppm: uno de ellos vecino a un grupo carbonilo y el otro vecino a un grupo amino. Además se observaron dos señales de baja intensidad con respecto a las demás: un triplete a 1,2 ppm y un cuarteto a 3,6 ppm. Este hecho indica la presencia de unidades de etóxido, presumiblemente en forma de aductos de Michael. Considerando la hipótesis de la formación de un producto polimérico, estos grupos etóxido bien pueden indicar los extremos de las cadenas. La relación de áreas entre el multiplete a 1,6 ppm y el cuarteto a 3,6 ppm es de 17. Las relaciones de área de las demás señales con respecto a la primera son de aproximadamente 4,5 para el grupo de señales entre 2,2 y 3 ppm y de 1 para la señal a 3,2 ppm.

El espectro de RMN ¹³C del producto obtenido presenta 7 señales: 26,7; 33,5; 37,2; 41,4; 53,7; 54,7 y 172,5 ppm. Esta cantidad de señales es igual a la suma del número de carbonos provenientes la función acrílica y de la diamina empleada, lo cual da cuenta de que la estructura del producto es altamente regular. También en este caso se pudo verificar la ausencia de señales vinílicas.

Se realizó un espectro DEPT 135 en el que se puede observar que sólo la señal a 41,4 ppm es positiva, mientras que las demás son negativas (a excepción de la señal a 172,5 ppm que no aparece por tratarse de un carbono cuaternario). Este hecho permitió identificar al carbono que corresponde al grupo metilo, además de proveer información para descartar una estructura del poliacrilamida para el producto (Figura VI.4).

La confección de espectros de correlación bidimensionales COSY, HSQC y HMBC permitió realizar la asignación completa del producto. A partir de estos resultados se puede proponer la estructura del mismo como una poliamidoamina lineal, tal como se muestra en la estructura de Figura VI.5 (VI-1).

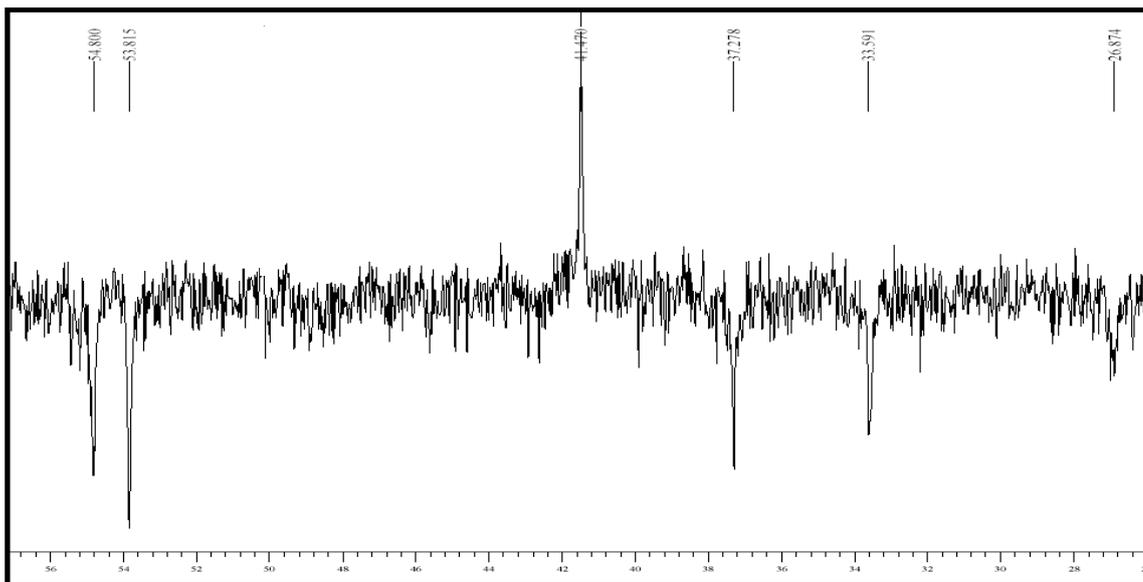


Figura VI.4. Espectro DEPT 135 del producto obtenido.

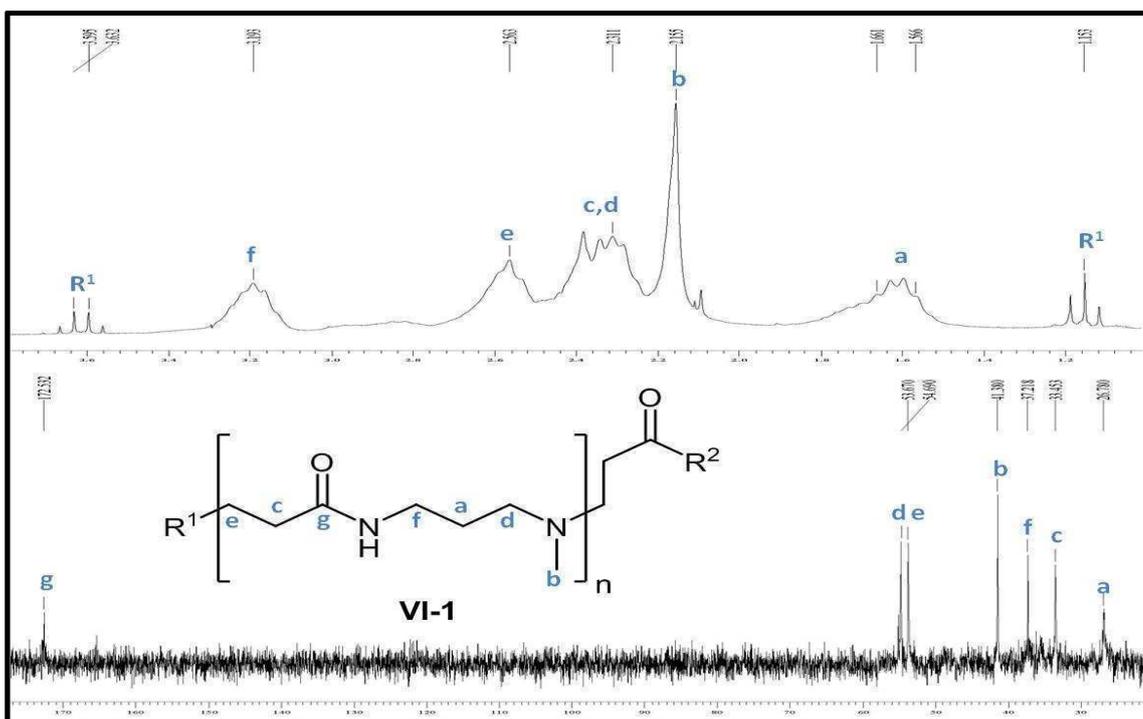


Figura VI.5. Estructura repetitiva propuesta para el producto VI-1 obtenido en las condiciones B, junto con las asignaciones de las señales de RMN ^1H y ^{13}C realizadas mediante correlaciones con espectros bidimensionales COSY, HSQC y HMBC.

La estructura propuesta muestra la alta regularidad observada por RMN. Además, sugiere que ambas reacciones, tanto la aminólisis del éster como la formación del aducto de Michael por parte de la amina fueron altamente regioselectivas. El grupo amino primario de la diamina solamente participó en la formación de la amida mientras que el grupo amino secundario actuó como nucleófilo exclusivamente en la reacción de adición de Michael.

VI.3.2. Curva de titulación, pH y solubilidad

El aceite es muy soluble en mezclas de cloroformo y metanol o etanol. Es parcialmente soluble en cloroformo y en agua. La solución acuosa del compuesto al 1%, concentración a la cual es completamente soluble en agua, tiene un pH de 9,5.

Se realizó la titulación potenciométrica con ácido clorhídrico 0,1 N para obtener el peso equivalente. Este ensayo arrojó un valor de peso equivalente de 142 g. La Figura VI.6 muestra la curva de titulación.

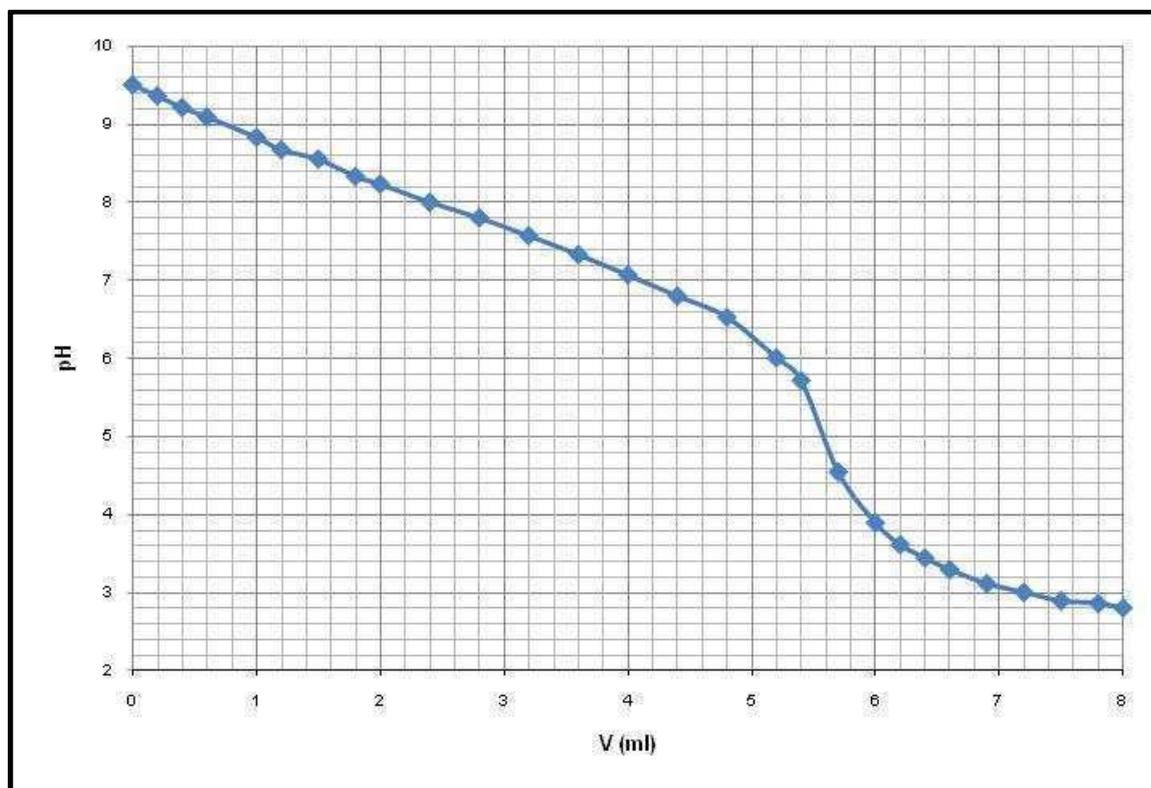


Figura VI.6. Curva de titulación del producto obtenido.

Esta curva describe el estado de protonación del polímero en solución acuosa en función del pH. Se puede observar que el pH desciende linealmente con el agregado de titulante en un rango amplio de pH (entre 9,5 y 6). Este fenómeno se debe seguramente a que no todos los grupos amino son igualmente accesibles al solvente, de modo que no es posible definir una única constante de equilibrio que describa el comportamiento ácido-base del producto obtenido. Sin embargo, es posible afirmar que a pH 7,8 la mitad de los grupos amino se encuentra protonado.

VI.3.3. Espectroscopia infrarroja

El espectro infrarrojo del producto fue realizado en film y se muestra a continuación en la Figura VI.7.

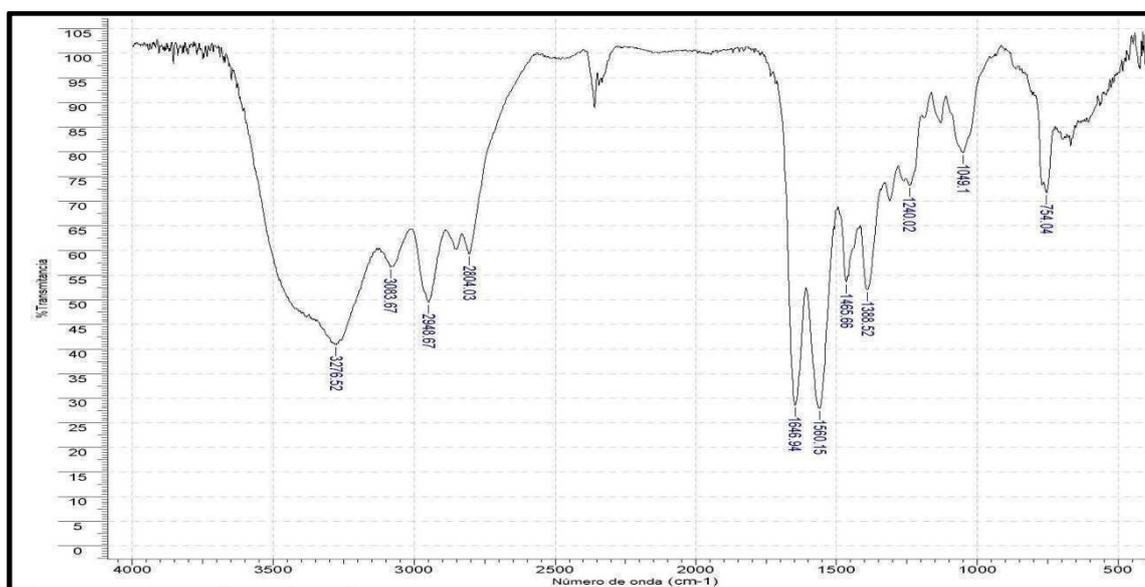


Figura VI.7. Espectro FT-IR de la poliamidoamina obtenida.

Se observaron bandas características de amida secundaria. El espectro presenta bandas correspondientes a este grupo funcional a 3278, 1647 y 1560 cm^{-1} .

VI.3.4. Espectrometría de masa UV-MALDI-TOF

Con el objeto de determinar el peso molecular de la poliamidoamina obtenida se efectuaron espectros de masa utilizando la técnica UV-MALDI-TOF.

Los experimentos de espectrometría de masa fueron realizados empleando varias matrices, entre ellas norharmano (norHo), ácido gentísico (GA), mezclas de norHo y GA, 2',4',6'-trihidroxiacetofenona (THAP) y nanotubos de carbono (CNT). Se realizaron experimentos tanto en modo positivo como negativo.

A continuación se describirán las metodologías empleadas para la interpretación de los resultados. Luego se mostrará el análisis de los espectros obtenidos con estas herramientas.

VI.3.4.1. Elucidación de grupos terminales

La relación masa/carga de una determinada señal en un espectro UV-MALDI-TOF puede expresarse como indica la Ecuación VI.1:

$$m/z = \frac{R^1 + R^2 + 56,03 + n \cdot 142,11 + m \cdot A + x \cdot B}{q} \quad (VI.1)$$

Donde m/z representa el valor de masa/carga para un determinado ion expresando las masas monoisotópicas en Dalton y las cargas en unidades de carga elemental. R^1 y R^2 son las masas de los grupos terminales señalados en la Figura VI.5; 56,03 es la masa de los dos metilenos y el grupo carbonilo que conectan a la estructura repetitiva con R^2 ; 142,11 es la masa de la unidad repetitiva; A corresponde a la masa de moléculas de solvente o matriz que puedan estar formando agregados; B a la masa de algún ión asociado a/o dissociado de la molécula analizada que le confiera carga (generalmente H^+ , pero también puede ser Na^+ o K^+ en modo positivo) y q es la carga del ión en unidades de carga elemental. Las magnitudes n y m son números naturales, mientras que x puede tomar los valores -1, 0 o 1. La Figura VI.8 muestra el análisis de una manera más gráfica.

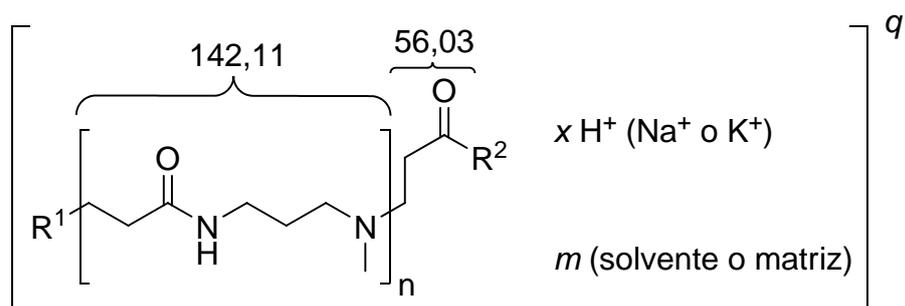


Figura VI.8. Contribuciones a la relación masa/carga de los iones observados.

La ecuación expuesta permite calcular la relación masa/carga de un ión de composición determinada y comparar con los resultados experimentales. Teniendo en cuenta la información proveniente del análisis del compuesto por RMN, que sugiere una unidad repetitiva regular, y las bases químicas de las reacciones que llevaron a la formación del producto, es posible postular un número acotado de funciones terminales R^1 y R^2 .

VI.3.4.2. Distribución de pesos moleculares

La gran mayoría de los polímeros sintéticos (con excepción de los dendrímeros u otros polímeros que hayan sido sintetizados agregando un único bloque o un número definido de bloques moleculares por operación) no poseen un peso molecular definido, sino se componen de poblaciones de moléculas de diferentes pesos moleculares. Por lo tanto, es de esperar que el espectro de masa de un polímero conste de varios picos de diferente relación masa/carga. La distribución que exista en sus intensidades relativas (que resultan proporcionales a la abundancia relativa de cada especie) y sus valores de m/z determinarán los valores de los pesos moleculares promedio y cuán homogéneas son las poblaciones moleculares del polímero en lo que respecta a su peso molecular.

El promedio de pesos moleculares puede determinarse de varias maneras. Existen varias magnitudes que pueden emplearse para obtener estimaciones, tales como el peso molecular promedio en número (M_n), el peso molecular promedio en peso (M_w), el peso molecular promedio en viscosidad (M_v) y el peso molecular promedio Z (M_z). El peso molecular promedio en número es la relación entre la suma total de pesos moleculares y el número total de moléculas, que puede calcularse según la Ecuación VI.2.

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i}{\sum_i N_i} \quad (VI.2)$$

Donde N_i representa el número de moléculas i , cuyo peso molecular es M_i . N_i se puede estimar como la intensidad relativa de la señal de $m/z = M_i/q$.

El peso molecular promedio en peso, en cambio, resulta de comparar la suma de los pesos moleculares pesados por su peso molecular con la suma total de pesos moleculares. Esta magnitud puede calcularse mediante la Ecuación VI.3.

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i^2}{\sum_i N_i \cdot M_i} \quad (VI.3)$$

Finalmente, es posible comparar ambos valores en una magnitud que se conoce como índice de polidispersión (*PDI*) que puede calcularse como indica la Ecuación VI.4.

$$PDI = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} \quad (VI.4)$$

El *PDI* es un indicativo de la homogeneidad y amplitud de distribución de los pesos moleculares de un polímero. Un índice de polidispersión cercano a la unidad es característico de polímeros con una distribución de pesos moleculares homogénea y acotada en un rango de pesos moleculares pequeño.

VI.3.4.3. Experimentos llevados a cabo con ácido gentísico como matriz

Al emplear ácido gentísico como matriz en modo positivo, se observó un peine en el cual los picos estaban separados unas 71 unidades aproximadamente. Las intensidades de los picos presentaban una distribución en forma de campana con un máximo a 1396, tal como se muestra en la Figura VI.9.

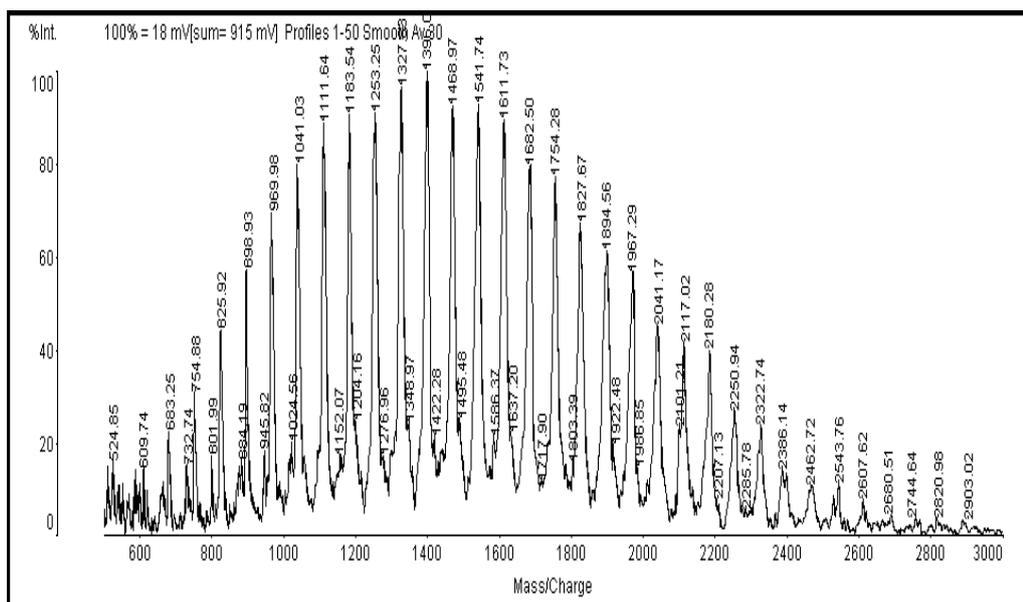


Figura VI.9. Espectro UV-MALDI-TOF de la poliamidoamina VI-1. Modo positivo, matriz: ácido gntísico.

El primer hecho que resultó llamativo en esta distribución fue la distancia entre picos. Si la masa de la unidad repetitiva propuesta era 142,11; ¿por qué la diferencia de masa entre picos era aproximadamente la mitad? Si se tratara de iones doblemente cargados, hubiera sido posible ver también otra distribución correspondiente a los iones con una única carga y duplicando el valor de m/z de los primeros. Se repitieron los experimentos empleando diferentes potencias de radiación láser observándose el mismo perfil. El modo negativo no permitió ver iones en este caso. Como consecuencia, es más lógico pensar que los iones tienen carga unitaria y existen dos distribuciones superpuestas (con distintos R^1 y/o R^2).

La identidad de los posibles grupos terminales se puede acotar en función de la química de la reacción y los reactivos empleados. Por ejemplo, R^1 debe ser un nucleófilo que forme un aducto de Michael terminal. Del análisis por RMN se observó claramente que uno de ellos debía ser el etanol liberado en la reacción de aminólisis del éster. El cuarteto a 3,6 ppm indica que existe un grupo etóxido unido mediante una unión éter. De este modo, se puede asignar un valor de masa de 45,03 Da a R^1 en la Ecuación VI.1.

La diamina como posible aducto de Michael terminal no puede ser descartada. El grupo terminal amino no se observa tan claramente en el RMN protónico como el etóxido, debido a que las señales correspondientes a este grupo terminal están superpuestas con aquellas de la unidad repetitiva. De hecho, el área de la señal a 1,6 ppm es ligeramente

mayor al área de la señal a 3,2 ppm (Figura VI.5, página 135). La primera corresponde a los hidrógenos del metileno central entre los dos nitrógenos, tanto en la estructura repetitiva como en un aducto de Michael terminal; mientras que la última se asignó a los hidrógenos del metileno vecino al nitrógeno de amida, función que no está presente en R^1 . Este resultado apoya la hipótesis sobre la presencia de aductos de Michael terminales con la diamina. Si este es el caso, R^1 debe ser igual a la masa monoisotópica de *N*-metil-1,3-diaminopropano menos la masa de un hidrógeno: 87,09.

En cuanto al sustituyente sobre el acilo terminal, R^2 , hay que considerar tres posibilidades:

- El éster etílico, proveniente de una reacción de Michael sobre una molécula de acrilato de etilo, queda inalterado ($R^2 = 45,03$)
- Se produjo la aminólisis, pero el grupo amino secundario libre no participa en una reacción de Michael, quedando una aminoamida terminal ($R^2 = 87,09$)
- La presencia de agua en pequeñas cantidades produce la hidrólisis del éster etílico para generar un carboxilo terminal ($R^2 = 17,00$)

La primera posibilidad puede ser descartada, en virtud de que no se observó en el espectro de RMN protónico ningún cuarteto a desplazamientos químicos mayores a 4 ppm. Las otras dos posibilidades deberán ser tenidas en cuenta para los cálculos.

La Tabla VI.1 muestra las cuatro posibilidades para las combinaciones de grupos terminales R^1 y R^2 .

Tabla VI.1. Posibles combinaciones de grupos terminales para la poliamidoamina VI-1.

Combinación	R^1	R^2	R^1	R^2
1	-OEt	-NH(CH ₂) ₃ NHCH ₃	45,03	87,09
2	-OEt	-OH	45,03	17,00
3	-N(CH ₃)((CH ₂) ₃ NH ₂)	-NH(CH ₂) ₃ NHCH ₃	87,09	87,09
4	-N(CH ₃)((CH ₂) ₃ NH ₂)	-OH	87,09	17,00

A partir de las combinaciones descritas es posible calcular el peso molecular de cada una de ellas en función del número de unidades repetitivas n utilizando la Ecuación VI.1,

fijando m y x igual a cero. A modo de ejemplo, en la Tabla VI.2 se muestran las masas calculadas hasta n igual a 9.

Tabla VI.2. Pesos moleculares calculados para VI-1 en función de n (0-9) e identidad de grupos terminales.

n	<i>Combinación</i>			
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
0	188,15	118,06	230,21	160,12
1	330,26	260,17	372,32	302,23
2	472,37	402,28	514,43	444,34
3	614,48	544,39	656,54	586,45
4	756,59	686,50	798,65	728,56
5	898,70	828,61	940,76	870,67
6	1040,81	970,72	1082,87	1012,78
7	1182,92	1112,83	1224,98	1154,89
8	1325,03	1254,94	1367,09	1297,00
9	1467,14	1397,05	1509,20	1439,11

Si se observan los valores calculados, se puede ver que para un determinado número de unidades repetitivas la diferencia de peso molecular entre las combinaciones *1* y *2* es de 70,09 Da. Lo mismo sucede con las diferencias de peso molecular entre las combinaciones *3* y *4*, ya que la misma surge del reemplazo de la función terminal R^2 entre las dos posibles (aminoamida o ácido carboxílico).

De este modo, la diferencia de m/z entre los picos consecutivos en los resultados experimentales de la Figura VI.9 puede explicarse por la presencia de un grupo R^1 fijo y un grupo R^2 alternante entre pico y pico.

Las combinaciones *1* y *2* ($R^1 = \text{etóxido}$) se ajustan a los datos experimentales. En la Figura VI.10 se muestran las series alternantes coloreadas, junto con las estructuras que corresponden a las combinaciones *1* y *2*. En la Tabla VI.3 se comparan los valores de m/z experimentales con los calculados para $[M+H]^+$. El valor de m/z de $[M+H]^+$ para cada valor de n se puede obtener mediante la Ecuación VI.1, tomando m igual a cero, x igual a 1, q igual a 1 y B igual a 1,01.

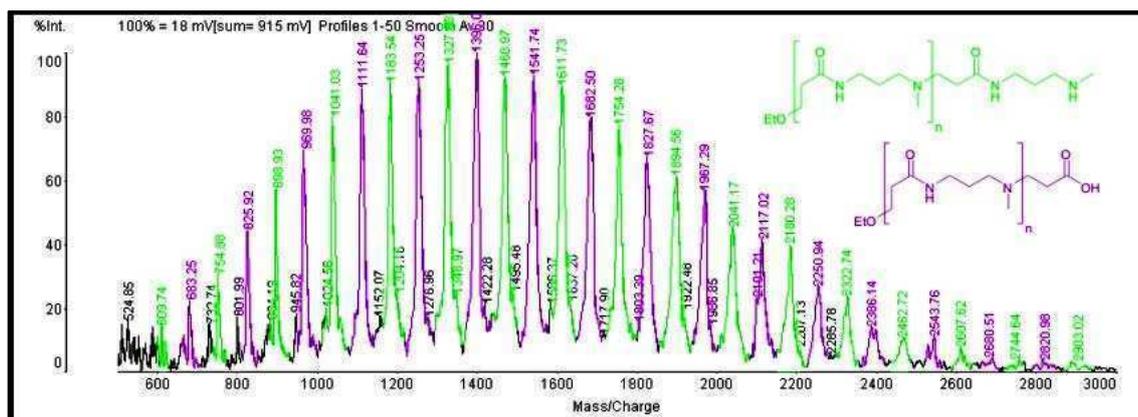


Figura VI.10. Asignaciones para el espectro UV-MALDI-TOF de la poliamidoamina **VI-1** (modo positivo, matriz: ácido gentísico). Se muestran las señales con $R^2 = -\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_3$ (verde) diferenciadas de aquellas que corresponden a $R^2 = -\text{OH}$ (violeta). En ambos casos $R^1 = -\text{OEt}$.

Tabla VI.3. Valores de m/z experimentales y calculados para la poliamidoamina **VI-1** ($R^1 = \text{etóxido}$).

m/z experimental	n	R^2	m/z calculado	diferencia	m/z experimental	n	R^2	m/z calculado	diferencia
683,25	4	carboxilo	687,51	-4,26	1611,73	10	aminoamida	1610,26	1,47
754,88	4	aminoamida	757,60	-2,72	1682,50	11	carboxilo	1682,28	0,22
825,92	5	carboxilo	829,62	-3,70	1754,28	11	aminoamida	1752,37	1,91
898,93	5	aminoamida	899,71	-0,78	1827,67	12	carboxilo	1824,39	3,28
969,98	6	carboxilo	971,73	-1,75	1894,56	12	aminoamida	1894,48	0,08
1041,03	6	aminoamida	1041,82	-0,79	1967,29	13	carboxilo	1966,50	0,79
1111,64	7	carboxilo	1113,84	-2,20	2041,17	13	aminoamida	2036,59	4,58
1183,54	7	aminoamida	1183,93	-0,39	2117,02	14	carboxilo	2108,61	8,41
1253,25	8	carboxilo	1255,95	-2,70	2180,28	14	aminoamida	2178,70	1,58
1327,83	8	aminoamida	1326,04	1,79	2250,94	15	carboxilo	2250,72	0,22
1396,07	9	carboxilo	1398,06	-1,99	2322,74	15	aminoamida	2320,81	1,93
1468,97	9	aminoamida	1468,15	0,82	2386,14	16	carboxilo	2392,83	-6,69
1541,74	10	carboxilo	1540,17	1,57	2462,72	16	aminoamida	2462,92	-0,20

Como se ha visto, esta aproximación ha permitido identificar los grupos funcionales terminales presentes en la muestra analizada. También es posible realizar estimaciones de peso molecular promedio y calcular el índice de polidispersión utilizando las ecuaciones descritas en la Sección VI.3.4.2. Si tomamos las intensidades de las señales asignadas para cada tipo de funcionalidad terminal por separado, se pueden obtener dos valores de M_n , M_w y PDI como muestra la Tabla VI.4.

Tabla VI.4. Resultados de M_n , M_w , n_{promedio} y PDI para las poliamidoaminas con combinaciones de grupos terminales 1 y 2.

Combinación	n_{promedio}	M_n	M_w	PDI
1	9 - 10	1499,7	1620,6	1,08
2	9 - 10	1472,6	1589,0	1,08

El número aproximado de unidades repetitivas, obtenido a partir de datos provenientes de la espectrometría de masa, puede correlacionarse con información derivada de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de hidrógeno de la siguiente manera: si tomamos el área de la señal correspondiente a los hidrógenos del metileno vecino a oxígeno del grupo etóxido presente en el extremo R¹ (cuarteto a 3,6 ppm) y la comparamos con el área de la señal de resonancia de los hidrógenos pertenecientes al metileno que equidista entre dos nitrógenos y que proviene de la diamina empleada como reactivo (multiplete a 1,6 ppm); la relación entre estas debería ser coherente con el número de unidades repetitivas estimado por espectrometría de masa. Para el caso de la combinación 1, el multiplete a 1,6 ppm corresponde a dos hidrógenos por unidad repetitiva más dos hidrógenos de la amidoamina terminal R². En tal caso debería esperarse una relación de áreas de las señales mencionadas de RMN de entre 10 y 11 a 1; ya que el cuarteto a 3,6 ppm sólo corresponderá a dos hidrógenos del extremo R¹. Si realizamos la misma estimación para la combinación 2, veremos que esta misma relación de áreas debería ser de entre 9 y 10 a 1; ya que en este caso el multiplete a 1,6 ppm es sólo asignable a dos hidrógenos por cada unidad repetitiva. Si suponemos la abundancia relativa para ambas combinaciones 1 y 2 igual (para lo cual se deberá suponer idéntica sensibilidad

en el experimento de masa para las mismas), la relación de áreas entre las señales en RMN mencionadas debería ser entre 9,5 y 10,5.

Como se ha señalado anteriormente en la Sección VI.3.1, esta relación de áreas había sido calculada y resultó ser de 17. Este hecho, más allá de las diferencias en sensibilidad que pudieran existir entre las moléculas con diferentes grupos terminales, está señalando claramente que deben existir moléculas cuya combinación de grupos terminales no incluye al grupo etóxido y que no pueden ser detectadas claramente por espectrometría de masa en las condiciones empleadas.

VI.3.4.4. Experimentos llevados a cabo con norharmano como matriz

Al emplear norharmano como matriz en modo positivo, se observó un peine en el cual los picos estaban separados unas 71 unidades aproximadamente, al igual que cuando se usó ácido gentsico. En cambio, las intensidades de los picos presentaban una distribución en forma de campana con un máximo a 1012, tal como se muestra en la Figura VI.11.

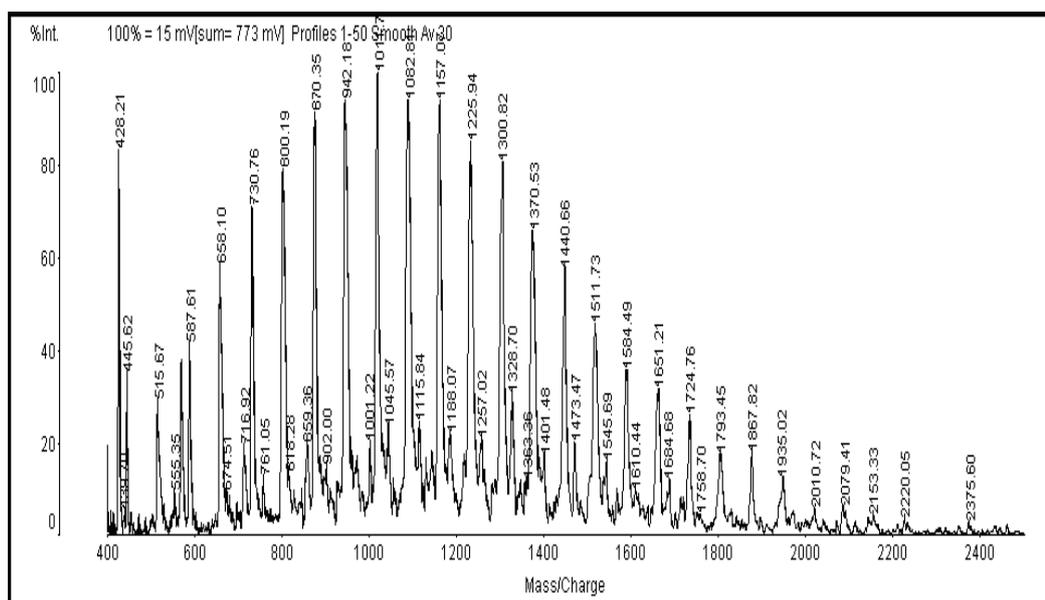


Figura VI.11. Espectro UV-MALDI-TOF de la poliamidoamina VI-1. Modo positivo, matriz: norharmano.

En base a los resultados obtenidos anteriormente y a las similitudes y diferencias encontradas, se decidió averiguar si estas señales podían corresponder a las combinaciones restantes 3 y 4 señaladas en la Tabla VI.1. En ellas, los grupos terminales R^1 corresponden a la diamina *N*-metil-1,3-diaminopropano formando un aducto de Michael, tal como se muestra en la Figura VI.12.

En la Figura VI.12 se muestran también las series alternantes coloreadas, junto con las estructuras que corresponden a las combinaciones 3 y 4. En la Tabla VI.5 se comparan los valores de m/z experimentales con los calculados para $[M+H]^+$. El valor de m/z de $[M+H]^+$ para cada valor de n se puede obtener mediante la Ecuación VI.1, tomando m igual a cero, x igual a 1, q igual a 1 y B igual a 1,01.

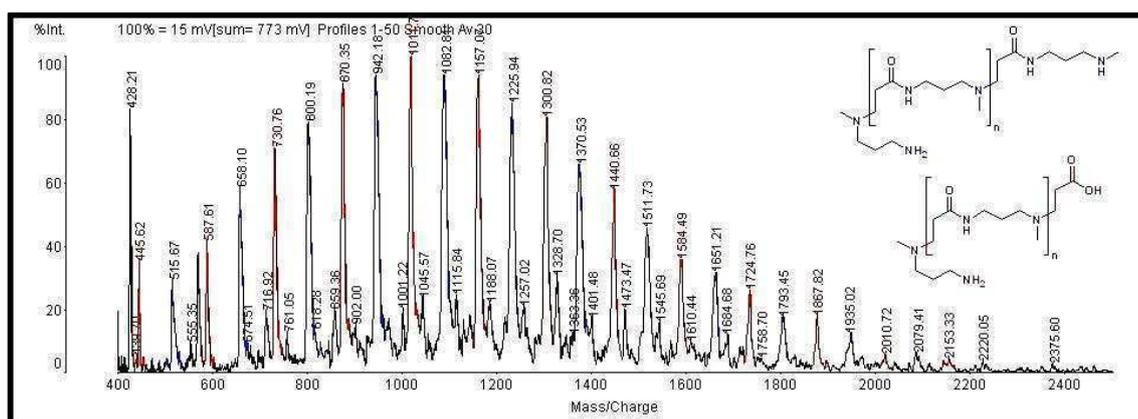


Figura VI.12. Asignaciones para el espectro UV-MALDI-TOF de la poliamidoamina VI-1 (modo positivo, matriz: norharmano). Se muestran las señales con $R^2 = -NH(CH_2)_3NHCH_3$ (azul) diferenciadas de aquellas que corresponden a $R^2 = -OH$ (rojo). En ambos casos $R^1 = -NH(CH_2)_3NHCH_3$.

Tabla VI.5. Valores de m/z experimentales y calculados para la poliamidoamina **VI-1** ($R^1 = -NH(CH_2)_3NHCH_3$).

m/z experimental	n	R^2	m/z calculado	diferencia	m/z experimental	n	R^2	m/z calculado	diferencia
445,62	2	carboxilo	445,35	0,27	1370,53	8	aminoamida	1368,10	2,43
515,67	2	aminoamida	515,44	0,23	1440,66	9	carboxilo	1440,12	0,54
587,61	3	carboxilo	587,55	0,06	1511,73	9	aminoamida	1510,21	0,52
658,10	3	aminoamida	657,55	0,55	1584,49	10	carboxilo	1582,23	2,26
730,76	4	carboxilo	729,57	1,19	1651,21	10	aminoamida	1652,32	-1,11
800,19	4	aminoamida	799,66	0,53	1724,76	11	carboxilo	1724,34	0,42
870,35	5	carboxilo	871,68	-1,33	1793,45	11	aminoamida	1794,43	-0,98
942,18	5	aminoamida	941,77	0,41	1867,82	12	carboxilo	1866,45	1,37
1011,78	6	carboxilo	1013,79	-2,01	1935,02	12	aminoamida	1936,54	-1,52
1082,81	6	aminoamida	1083,88	-1,07	2010,72	13	carboxilo	2008,56	2,16
1157,07	7	carboxilo	1155,90	1,17	2079,41	13	aminoamida	2078,65	0,76
1225,94	7	aminoamida	1225,99	-0,05	2153,33	14	carboxilo	2150,67	2,66
1300,82	8	carboxilo	1298,01	2,81	2220,05	14	aminoamida	2220,76	-0,71

Como en el caso anterior, esta aproximación ha permitido identificar los grupos funcionales terminales presentes en la muestra analizada. También fue posible realizar estimaciones de peso molecular promedio y calcular el índice de polidispersión utilizando las ecuaciones descritas en la Sección VI.3.4.2. Si tomamos nuevamente las intensidades señales asignadas para cada tipo de funcionalidad terminal por separado, se pueden obtener dos valores de M_n , M_w y PDI como se muestra en la Tabla VI.6.

Tabla VI.6. Resultados de M_n , M_w y PDI para las poliamidoaminas con combinaciones de grupos terminales 3 y 4.

Combinación	n_{promedio}	M_n	M_w	PDI
3	6 - 7	1130,4	1249,3	1,11
4	6 - 7	1104,7	1230,5	1,08

VI.3.5. Aporte de la espectrometría UV-MALDI-TOF en la interpretación del espectro de RMN ^1H

Conocidos los resultados de los experimentos UV-MALDI-TOF se decidió continuar con el análisis del espectro de RMN ^1H con el objeto de obtener información sobre la abundancia relativa de las diferentes combinaciones de grupos terminales.

Se había indicado anteriormente la presencia de señales bien distinguibles en el espectro de RMN ^1H , un triplete a 1,2 ppm y un cuarteto a 3,6 ppm, que revelaban la existencia de grupos terminales etóxido como aductos de Michael. La relación de áreas entre el cuarteto a 3,6 ppm y el multiplete a 1,6 ppm resulta igual a la relación estequiométrica entre las unidades de amina y de etóxido. Por lo observado en los espectros de masa, las unidades de amina contribuyen tanto a la unidad repetitiva como a ambos extremos R^1 y R^2 mientras que las unidades de etóxido sólo lo hacen a los extremos R^1 . La relación de áreas de las señales correspondientes en el espectro de RMN ^1H de la Figura VI.3 es de 17. En la Tabla VI.7 se muestra el número de unidades de amina esperado para cada combinación por separado en función de la longitud de cadena para cada combinación de grupos terminales.

Tabla VI.7. Número de unidades de *N*-metil-1,3-diaminopropano para las cuatro combinaciones de grupos terminales identificadas en función del número de unidades repetitivas por molécula.

Combinación	1	2	3	4
Número de unidades de amina	$n+1$	n	$n+2$	$n+1$

Definición de combinaciones 1, 2, 3 y 4 en la Tabla VI.1.

Dada una población de moléculas de polímero con una dada proporción de combinaciones de grupos terminales 1, 2, 3 y 4; la relación estequiométrica amina/etóxido presente podrá predecirse mediante la Ecuación VI.5.

$$\text{amina/etóxido} = \frac{j \cdot (n_j + 1) + k \cdot n_k + l \cdot (n_l + 2) + m \cdot (n_m + 1)}{j + k} \quad (\text{VI.5})$$

Donde j , k , l y m representan las proporciones relativas de las combinaciones 1, 2, 3 y 4 respectivamente; y n_j , n_k , n_l y n_m es el número de unidades repetitivas para las combinaciones indicadas por el subíndice. Teniendo en cuenta que $j+k+l+m=1$ es posible hacer una estimación sobre el valor de estas magnitudes.

Al contar con 2 ecuaciones solamente será posible acotar los valores de $j+k$ y $l+m$. Para este propósito se utilizarán los valores de longitud de cadena estimados por UV-MALDI-TOF que figuran en la Tablas VI.4 y VI.6. El valor de $j+k$ se maximiza tomando k y m iguales a cero. Si consideramos n_j , $n_k = 9$ y n_l , $n_m = 6$ queda $j+k = 0,533$. En cambio, si tomamos j y l iguales a cero el valor de $j+k$ se minimiza. Considerando las mismas longitudes de cadena que en el caso anterior queda $j+k = 0,467$. Teniendo en cuenta estas dos cotas podemos afirmar que aproximadamente la mitad de las moléculas de polímero posee un grupo etóxido como aducto de Michael terminal.

La distribución de pesos moleculares es bastante estrecha para cada combinación de grupos terminales, según se puede concluir a partir de los valores de polidispersión que son cercanos a la unidad en todos los casos. El peso molecular del polímero puede estar regulado por el tamaño del bolsillo donde se encuentra el sitio activo de la enzima o la solubilidad del producto. El hecho de que aquellas moléculas con combinaciones que presenten etóxido como aducto de Michael terminal (1 y 2) tengan mayor peso molecular que las correspondientes a las combinaciones 3 y 4, puede explicarse por una mayor

capacidad del etanol para difundir en el sitio activo de la enzima cuando éste está ocupado por el polímero en crecimiento o bien por mayor solubilidad de aquellas cadenas que poseen etóxido terminal.

La espectrometría de masas y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear permitieron caracterizar adecuadamente al producto, permitiendo conocer su distribución de pesos moleculares y la funcionalidad en sus extremos.

VI.4. Estudio de los parámetros de reacción

VI.4.1. Efecto del solvente

Una vez caracterizado producto obtenido, se decidió estudiar los parámetros involucrados en de reacción. Se comenzó analizando el efecto del solvente. Se evaluó la utilización de acetonitrilo, etanol, DIPE, tolueno y hexano como solventes manteniendo el resto de las variables constante.

Al emplear acetonitrilo y etanol se obtuvieron productos de adición de Michael como los que se habían obtenido al emplear las condiciones A (Figura VI.2, página 132), mientras que al utilizar tolueno no hubo reacción. La reacción llevada a cabo en hexano, al igual que en DIPE, rindió como producto una poliamidoamina. La Tabla VI.8 muestra los resultados comparativos para la caracterización de ambos productos de reacción.

Tabla VI.8. Comparación entre los productos obtenidos empleando DIPE y hexano como solvente.

Solvente	Relación amina/etóxido	Combinación	M_n	M_w	PDI
DIPE	17	1	1499,7	1620,6	1,08
		2	1472,6	1589,0	1,08
		3	1130,4	1249,3	1,11
		4	1104,7	1230,5	1,08
Hexano	31	1	1292,4	1382,5	1,07
		2	1280,2	1376,8	1,08
		3	874,8	972,3	1,11
		4	823,8	933,8	1,13

Como puede observarse, el empleo de hexano como solvente tiene dos consecuencias importantes sobre el producto: una proporción sensiblemente menor de grupos etóxido y una disminución del peso molecular en alrededor de 200-250 unidades de masa. En cuanto a los rendimientos obtenidos, en ambos casos es de aproximadamente 60%, considerando que la relación estequiométrica entre ambos reactivos es 1 y que todas las moléculas de acrilato de etilo son transformadas en amida.

VI.4.2. Fuente de la enzima

Se analizó la influencia del tipo de lipasa empleada en los productos de reacción. Se utilizaron cuatro enzimas de distintas fuentes: lipasa de *Candida antarctica* B (CAL B), lipasa de *Rhizomucor miehei* (LIP), lipasa de *Pseudomonas sp.* (PS-C) y lipasa de *Candida rugosa* (CRL). Las reacciones fueron llevadas a cabo empleando DIPE y hexano como solvente manteniendo el resto de las condiciones constante.

No se obtuvieron productos de reacción al emplear CRL como biocatalizador y hexano como solvente. Con DIPE como solvente se logró obtener una mezcla de aductos de Michael similar a la que se muestra en la Figura VI.2, al igual que cuando se utilizó PS-C y hexano. Tampoco se obtuvieron productos de reacción al emplear PS-C combinado con DIPE como solvente. Al utilizar LIP como biocatalizador se encontró, tanto en hexano como en DIPE, que daba lugar mayoritariamente a la formación de aductos de Michael, observándose sólo formación de amida en aproximadamente un 10% (estimado por RMN ^1H). En este caso se verificó también la ausencia de señales vinílicas en el espectro de RMN ^1H . Además, la relación de áreas entre la señal del multiplete a 1,6 ppm y el cuarteto a 4,2 ppm es unitaria. Estos hechos indican la marcada selectividad que posee LIP hacia la formación de aductos de Michael, principalmente aquellos que poseen una relación estequiométrica unitaria entre la diamina y el acrilato de etilo.

VI.4.3. Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S)

Continuando con el estudio de los parámetros de reacción, se llevaron a cabo reacciones empleando diferentes relaciones enzima/sustrato entre 0,2 y 10, utilizando tanto hexano como DIPE como solvente. La Figura VI.13 muestra la correlación entre E/S y la relación amina/etóxido.

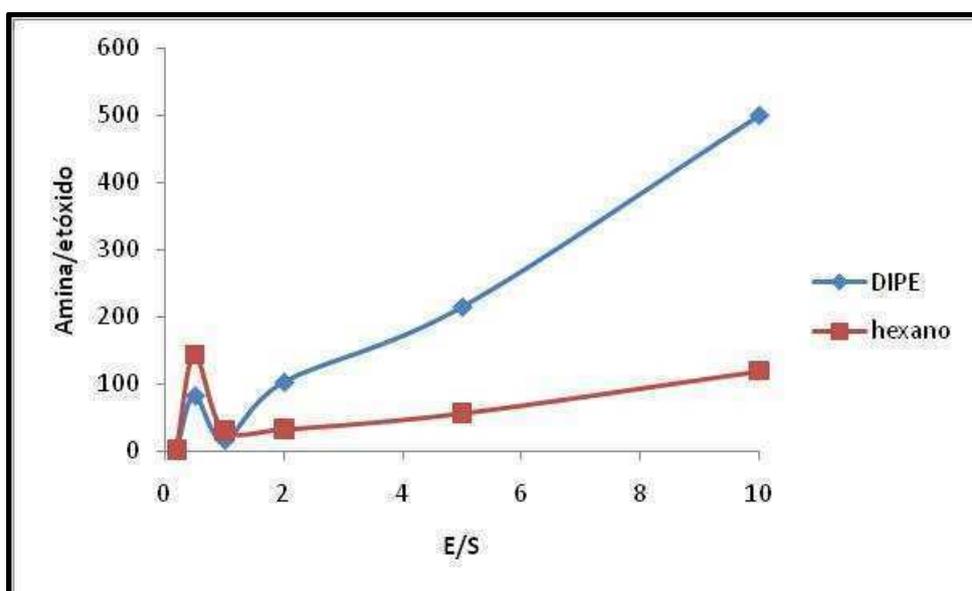


Figura VI.13. Efecto de E/S en la proporción amina/etóxido encontrada en el producto.

Se encontró como tendencia general al utilizar DIPE que la proporción de amina/etóxido aumenta con E/S. Este hecho demuestra una preferencia a la formación de aductos de Michael con grupos amino al aumentar la carga de catalizador. También se observa una tendencia más bien errática al emplear E/S menores a 1. Cabe destacar que el producto es insoluble en el medio de reacción y se deposita principalmente en la superficie del catalizador, dando lugar a la formación de agregados. Si bien la agitación se encuentra controlada, existe una variabilidad no controlada en las condiciones en los que estos agregados se forman, con lo que la difusión de sustratos y productos desde y hacia el catalizador no se encuentran completamente controladas en esas condiciones.

Los espectros de RMN ^1H del producto de las reacciones llevadas a cabo con $E/S = 0,2$ muestran la presencia de un cuarteto adicional a 4,17 ppm, lo que sugiere que la presencia

de etóxido terminal en forma de éster etílico. El área de esta señal relativa al multiplete a 1,6 ppm es de alrededor de 4%.

El análisis de los productos por espectrometría de masa UV-MALDI-TOF muestra también una correlación de los pesos moleculares en función de E/S como muestra la Figura VI.14.

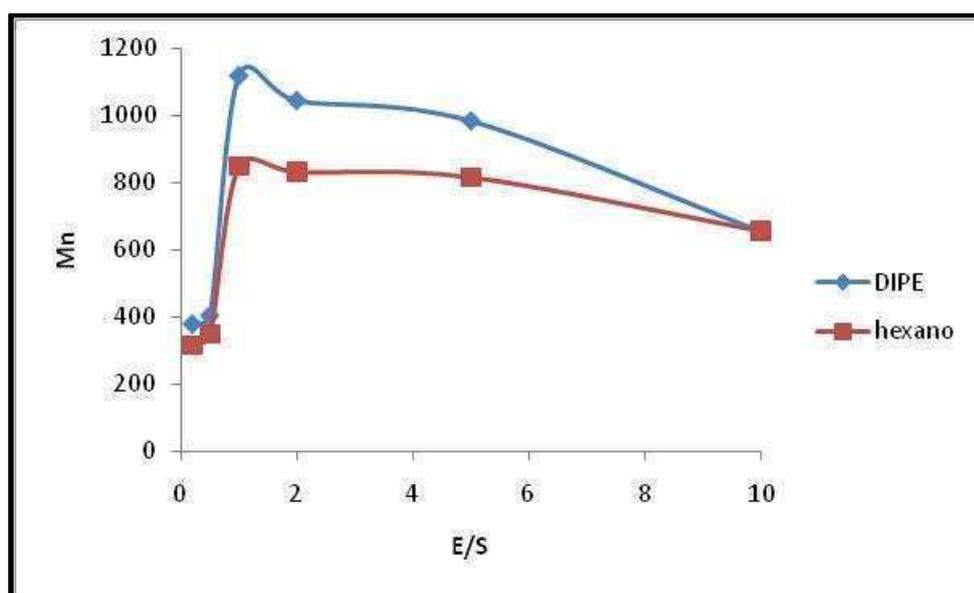


Figura VI.14. M_n para la poliamidoamina con combinación de grupos terminales 3 en función de E/S.

Se pudo observar que a E/S menores a 1 los pesos moleculares son muy bajos, probablemente debido a la agregación de las partículas de catalizador que dificulta sensiblemente la difusión de reactivos y productos. Excesos grandes de catalizador producen un descenso del peso molecular del producto. Esto puede deberse a que una mayor cantidad de enzima sea capaz de ensamblar cadenas pequeñas en menor tiempo.

En los espectros UV-MALDI-TOF del producto obtenido al emplear $E/S = 0,2$ se observaron señales asignables a una combinación diferente a las cuatro que se describieron anteriormente, consistente en dos unidades de etóxido como terminales R^1 y R^2 . Esta observación resulta consistente con la presencia de señales de éster etílico en el espectro de RMN 1H de este compuesto.

En cuanto a los rendimientos obtenidos trabajando con una E/S igual a 1, éstos fueron de alrededor de 60%. Al emplear E/S mayores a 1 no se incrementó sensiblemente el

rendimiento, en tanto que la utilización de E/S menores a 1 disminuyó el rendimiento hasta valores entre 30 y 50%.

VI.4.4. Efecto de la relación agente acilante/sustrato

A continuación se repitieron las reacciones manteniendo constante la concentración de sustrato (*N*-metil-1,3-diaminopropano) y variando la concentración de acrilato de etilo entre 0,5 y 2 veces la de la diamina. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando DIPE como solvente. La Figura VI.15 muestra la evolución del peso molecular y la relación amina/etóxido encontrada en el producto en función de la relación agente acilante/sustrato.

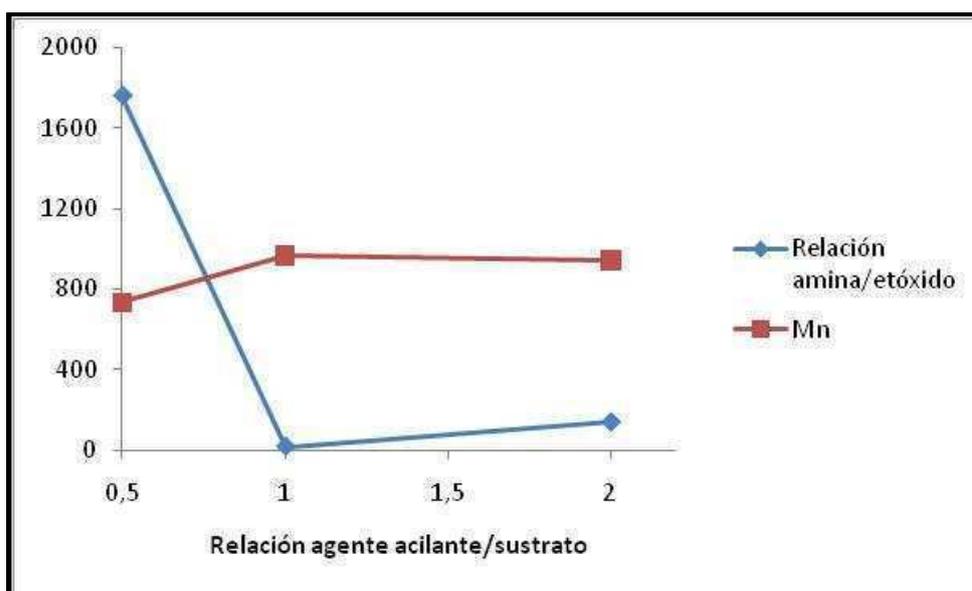


Figura VI.15. M_n y relación amina/etóxido en función de la relación agente acilante/sustrato. Para la estimación de M_n se tomó como referencia la combinación de grupos terminales 3.

Se observó que al emplear relaciones agente acilante/sustrato mayores o menores a 1 la proporción de grupos etóxido disminuyó. Asimismo, la intensidad relativa de las señales correspondientes a las combinaciones 1 y 3 ($R^2 = -NH(CH_2)_3NHCH_3$) en los espectros de masa UV-MALDI-TOF fue mayor en estos casos.

Al utilizar la diamina en exceso se encontró que, si bien se produjo un marcado descenso del peso molecular para las moléculas con combinaciones de grupos terminales *1* y *2* ($M_n = 733,1$), las combinaciones *3* y *4* (desorbidas con ácido gentísico) mantuvieron sus distribuciones alrededor de 1300 a 1400 unidades de masa.

Cuando se empleó acrilato de etilo en exceso se observó que aproximadamente la cuarta parte de los grupos etóxido se encontraban en forma de éster. Asimismo, la distribución de pesos moleculares no fue sensiblemente diferente a aquella obtenida al emplear una relación unitaria entre la diamina y el acrilato de etilo.

En cuanto a los rendimientos alcanzados, en todos los casos fue de alrededor de 60%.

VI.4.5. Efecto del agente acilante

Se ha mencionado repetidamente la presencia de combinaciones de grupos terminales conteniendo grupos etóxido (*1* y *2*). Estos grupos etóxido provienen del etanol, que se libera en el medio de reacción tras la aminólisis de los grupos éster provenientes del acrilato de etilo. La selección de un agente acilante distinto de un éster podría llevar a la obtención de polímeros con combinaciones de grupos terminales donde los grupos alcóxido no estuvieran presentes. Es por ello que se llevaron a cabo reacciones en las cuales se reemplazó el acrilato de etilo por el ácido acrílico, empleando DIPE y hexano como solventes.

Como era de esperar, el espectro RMN ^1H no evidenció señales propias del producto a desplazamientos químicos mayores a 3,2 ppm. Los espectros confirmaron la ausencia de grupos etóxido, ya que al utilizar GA como matriz no se detectaron productos. Las señales encontradas al emplear norHo como matriz fueron de muy bajo peso molecular en ambos casos, siendo la señal de mayor intensidad la de m/z igual a 373 (combinación *3*, $n=1$) seguida de la de m/z igual a 445 (combinación *4*, $n=2$). Además, no se observaron señales correspondientes a un número de unidades repetitivas mayor a 4.

Los rendimientos obtenidos en ambos casos fueron muy pobres, no alcanzándose el 30%. Este hecho puede deberse a la escasa solubilidad que tiene el ácido acrílico en ambos solventes utilizados y la formación de pares iónicos entre los reactivos empleados.

VI.4.6. Efecto del soporte de la enzima

La agregación de las partículas de catalizador por la formación de producto representaba un problema para la eficiencia del proceso ya que dificulta la accesibilidad al sitio activo de la enzima. Por otro lado, se disponía de CAL B comercial inmovilizada en dos soportes distintos. Una de ellas es la que se comercializa bajo el nombre de Novozym[®] 435 por Novozymes[®], que es la que se ha empleado por defecto en este trabajo de tesis y se encuentra soportada en esferas macroporosas de poli(acrilato de butilo-co-ácido acrílico-co-divilbenceno). La otra es conocida como Chirazyme[®] L-2, c-f, C3, lyo (era producida por Roche[®] y su fabricación está discontinuada) y está soportada sobre polipropileno.

Se procedió a evaluar comparativamente el desempeño de la Chirazyme[®] L-2, c-f, C3, lyo frente a la Novozym[®] 435 en la reacción en estudio. Se llevaron a cabo reacciones en DIPE y hexano, empleando E/S igual a 1 en todos los casos. El resto de las condiciones se mantuvo constante.

La Tabla VI.9 muestra la relación amina/etóxido estimada por RMN ¹H y los datos de distribución de pesos moleculares estimada por espectrometría de masa UV-MALDI-TOF de los productos obtenidos empleando ambos catalizadores.

Tabla VI.9. Comparación entre los productos obtenidos empleando CAL B inmovilizada sobre diferentes soportes.

Catalizador	Relación amina/etóxido	Combinación	M_n	M_w	<i>PDI</i>
Novozym [®] 435	17	1	1499,7	1620,6	1,08
		2	1472,6	1589,0	1,08
		3	1130,4	1249,3	1,11
		4	1104,7	1230,5	1,08
Chirazyme [®] L-2, c-f, C3, lyo	∞	1	1515,8	1646,4	1,09
		2	1490,5	1623,2	1,09
		3	820,7	897,4	1,09
		4	802,6	891,0	1,11

Solvente: DIPE

Se observó en primer lugar que al utilizar Chirazyme[®] la agregación del biocatalizador fue mucho menor tanto en hexano como en DIPE. Además, con este último fue posible incrementar el rendimiento de la poliamidoamina hasta un 80% aproximadamente.

A partir de los resultados se puede observar que las combinaciones de grupos terminales que incluyen grupos etóxido (*1* y *2*) mantienen su peso molecular mientras que aquellas que no lo hacen disminuyen su peso molecular en aproximadamente 300 unidades de masa. Los grupos etóxido no fueron detectados por RMN ¹H. Sin embargo, los experimentos de espectrometría de masa UV-MALDI-TOF mostraron una serie de señales correspondientes a las combinaciones *1* y *2* con baja intensidad. Aparte de mejorar el rendimiento, el empleo de CAL B soportada sobre polipropileno permitió enriquecer notablemente el producto en dos de las cuatro combinaciones identificadas.

Ambos efectos, disminución de proporción de grupos etóxido y descenso relativo del peso molecular pueden ser explicados por menor agregación del catalizador. En estas condiciones, la concentración esperada de etanol y de moléculas de mayor peso molecular cerca del catalizador es menor al no existir oclusión por formación de agregados.

Cuando se empleó hexano como solvente, el peso molecular del producto para las combinaciones *3* y *4* no cambió esencialmente. Las combinaciones *1* y *2* en este caso no pudieron ser detectadas ni por espectrometría de masa UV-MALDI-TOF ni por RMN ¹H.

VI.4.7. Efecto del tiempo de reacción

Para estudiar la influencia del tiempo de reacción en el producto obtenido se repitieron las reacciones empleando Chirazyme[®] como catalizador y hexano y DIPE como solventes dejando proseguir la reacción por 96 horas. No se observaron diferencias significativas en los productos obtenidos con respecto a aquellos obtenidos tras 24 horas de reacción. A tiempos menores que 24 horas la reacción no era completa, ya que era posible detectar acrilato de etilo en la mezcla de reacción. No obstante, un tiempo mayor de reacción permitió obtener la poliamidoamina de manera cuantitativa. A raíz de este resultado, se repitió el experimento utilizando Novozym 435[®], obteniéndose en este caso un producto de las mismas características y con el mismo rendimiento que al emplear este mismo catalizador en una reacción de 24 horas.

VI.4.8. Efecto de la temperatura

Con el objeto de evaluar la influencia de la temperatura de reacción en las características de los productos obtenidos se llevó a cabo una reacción empleando Chirazyme® como catalizador y DIPE como solvente por un período de 24 horas a una temperatura de 55°C. Se obtuvo también un producto líquido muy viscoso, oscurecido presumiblemente por la presencia de productos de oxidación de compuestos nitrogenados.

Los espectros UV-MALDI-TOF revelan la presencia de moléculas con combinaciones de grupos terminales 3 y 4 solamente, con un peso molecular levemente mayor y ligeramente más polidisperso que el producto obtenido a 33°C, tal como se muestra en la Tabla VI.10.

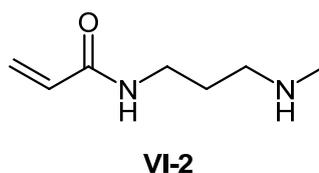
Tabla VI.10. Pesos moleculares e índice de polidispersión para la poliamidoamina obtenida a 33 y 55°C.

T (°C)	Combinación	M_n	M_w	PDI
33	3	820,7	897,4	1,09
	4	802,6	891,0	1,11
55	3	878,4	1010,8	1,15
	4	863,9	992,5	1,15

VI.4.9. Efecto de la concentración

Finalmente, se decidió averiguar el efecto que tenía una disminución de la concentración de reactivos en la reacción en estudio. Se llevaron a cabo reacciones empleando DIPE como solvente, E/S y relaciones agente acilante/sustrato unitarias y Chirazyme® o Novozym® 435 como catalizadores empleando diluciones 1/10 y 1/100 de la concentración de reactivos empleada en los casos anteriores (0,12 M).

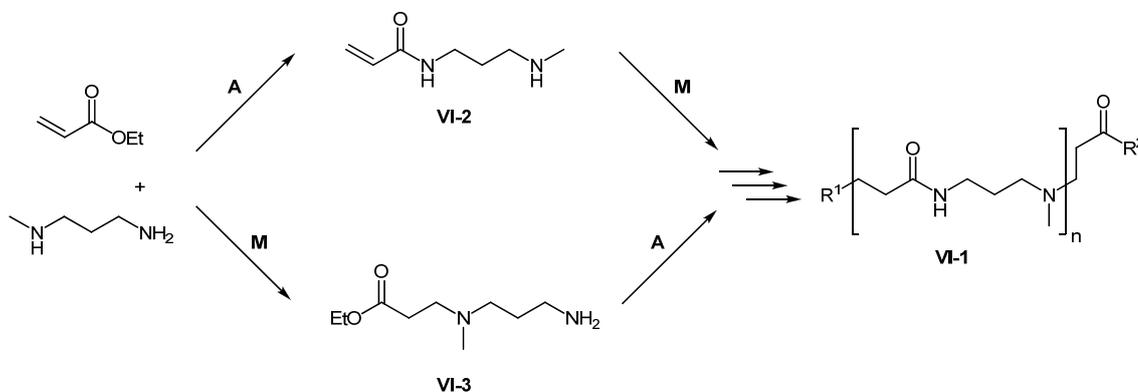
Empleando la dilución 1/100 no se observaron productos de reacción mientras que al utilizar la dilución 1/10 se pudo identificar otro producto de reacción distinto a los obtenidos anteriormente. El mismo pudo ser aislado e identificado como N-[3-(metilamino)propil]acrilamida VI-2.



VI.5. Estudio del mecanismo de la reacción

Para que la obtención de la poliamidoamina sea posible es necesario que la lipasa catalice ambas reacciones: aminólisis de un éster y adición de Michael de una amina sobre una amida o un éster α,β insaturado. Los mecanismos de ambas reacciones por separado son conocidos. No obstante, resulta de interés averiguar cuál de estas dos reacciones ocurre con mayor rapidez, ya que aquella que tenga mayor velocidad será la que controle la selectividad del proceso.

Consideremos el Esquema VI.4. El paso de iniciación para la formación de la poliamidoamina puede ser una reacción de aminólisis (**A**) o una adición de Michael (**M**). Si la velocidad relativa de formación de aductos de Michael es superior a la formación de productos de aminólisis se espera que se forme rápidamente el intermediario *N*-(3-aminopropil)-*N*-metil- β -alaninato de etilo **VI-3**. En cambio, una velocidad de aminólisis superior dará lugar a la formación preferencial de *N*-[3-(metilamino)propil]acrilamida **VI-2**.



Esquema VI.4. Posibles caminos para la formación de la poliamidoamina catalizada por CAL B.

Para averiguar cuál de estos intermediarios alcanza concentraciones más altas se repitieron las reacciones de polimerización empleando DIPE como solvente, E/S y relación agente acilante/sustrato unitarias, concentración de reactivos 0,12 M, 33°C y utilizando Chirazyme® como catalizador. Las especies en solución fueron monitoreadas por FT-IR durante el transcurso de la reacción.

La banda correspondiente al estiramiento de los enlaces dobles carbono-oxígeno son bien distinguibles entre los grupos funcionales amida y éster. El espectro FT-IR de la mezcla de reactivos en DIPE muestra una señal intensa a 1732 cm⁻¹ que puede ser asignada al acrilato de etilo. Además, se pueden identificar varias bandas correspondientes a *N*-metil-1,3-diaminopropano, entre ellas dos bandas de baja intensidad a 3327 y 3392 cm⁻¹ (estiramiento de los enlaces nitrógeno-hidrógeno).

Al progresar la reacción se observa una disminución de la intensidad de la banda de 1732 cm⁻¹ junto con la aparición de una nueva bandas a 1684 cm⁻¹ (estiramiento doble enlace carbono-oxígeno de amida) En las Figuras VI.16 y VI.17 se muestra cómo la banda correspondiente al carbonilo del éster disminuye en intensidad con el tiempo. La intensidad de la banda correspondiente al carbonilo de la amida se incrementa hasta alcanzar un máximo a las 20 horas, luego de lo cual comienza a disminuir hasta su desaparición total a las 72 horas.

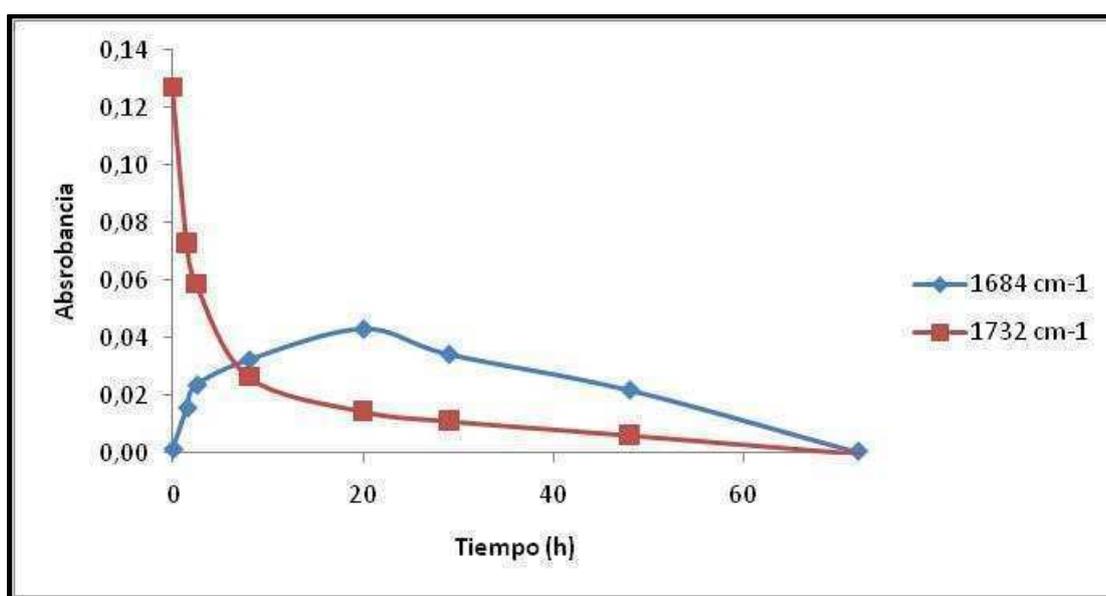


Figura VI.16. Evolución de la absorbancia de las bandas con máximo a 1684 y 1732 cm⁻¹ detectadas en solución durante el progreso de la reacción.

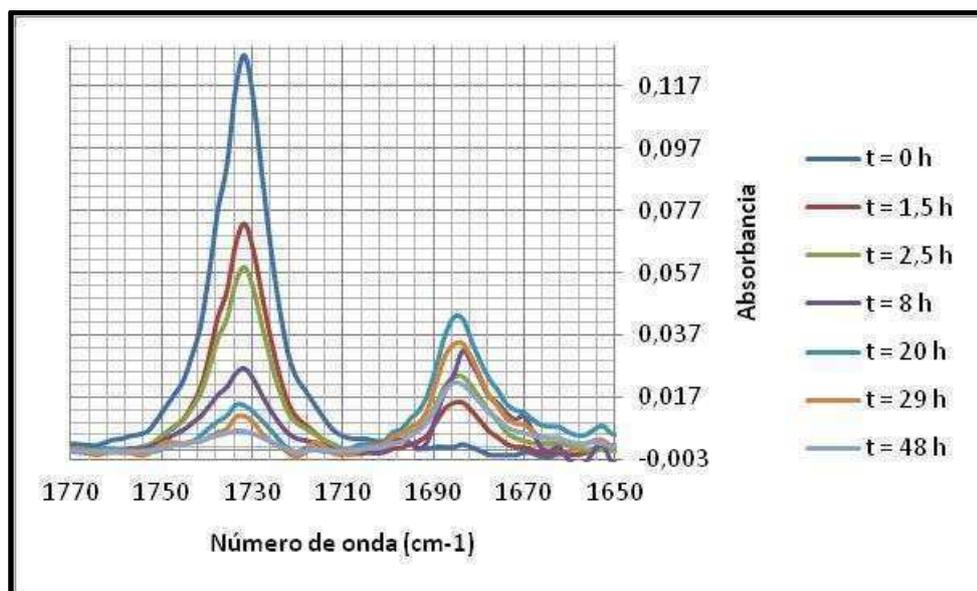


Figura VI.17. Ampliación de los espectros FT-IR a distintos tiempos superpuestos del sobrenadante de reacción entre 1650 y 1770 cm^{-1} .

Mientras estos cambios tienen lugar en la zona del espectro correspondiente a los estiramientos de dobles enlaces carbono-oxígeno, se puede observar también una variación en la zona de 3100-3600 cm^{-1} . Las bandas de 3327 y 3392 cm^{-1} de la diamina van dejando lugar a 2 nuevas bandas a 3336 y 3493 cm^{-1} (Figura VI.18).

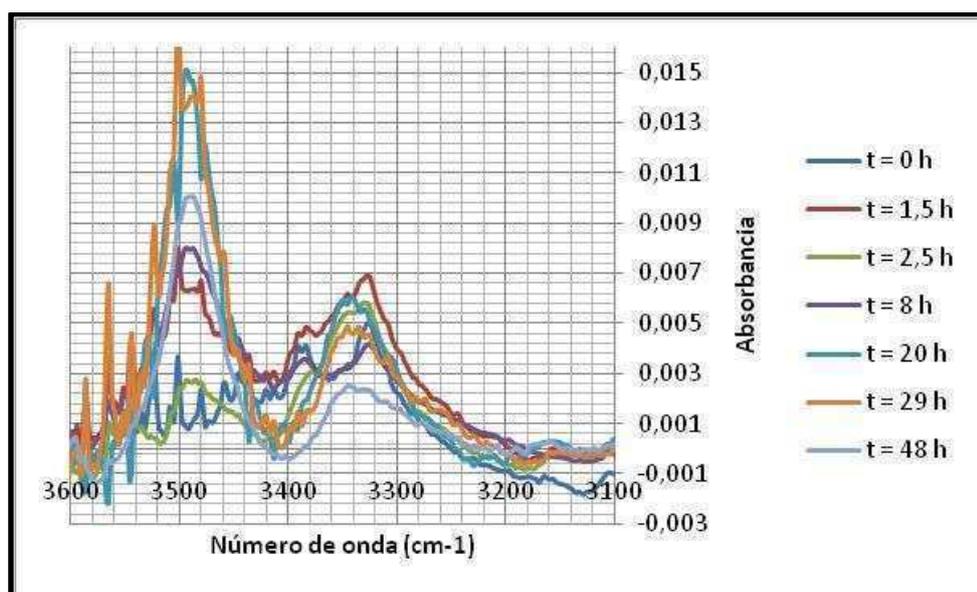


Figura VI.18. Ampliación de los espectros FT-IR a distintos tiempos superpuestos del sobrenadante de reacción entre 3100 y 3600 cm^{-1} .

Las bandas observadas en el tiempo sugieren la presencia de amida en solución. La banda a 1684 cm^{-1} muestra dos etapas: inicialmente se forma rápidamente la amida a partir del acrilato de etilo. A partir de las 20 horas de reacción la velocidad de desaparición de la amida soluble, para dar aductos de Michael insolubles supera a su velocidad de formación y entonces su concentración en solución comienza a disminuir.

Además se pudo determinar que, durante las primeras 48 horas, la inversa del máximo de absorbancia a 1732 cm^{-1} es directamente proporcional al tiempo de reacción (Figura VI.19).

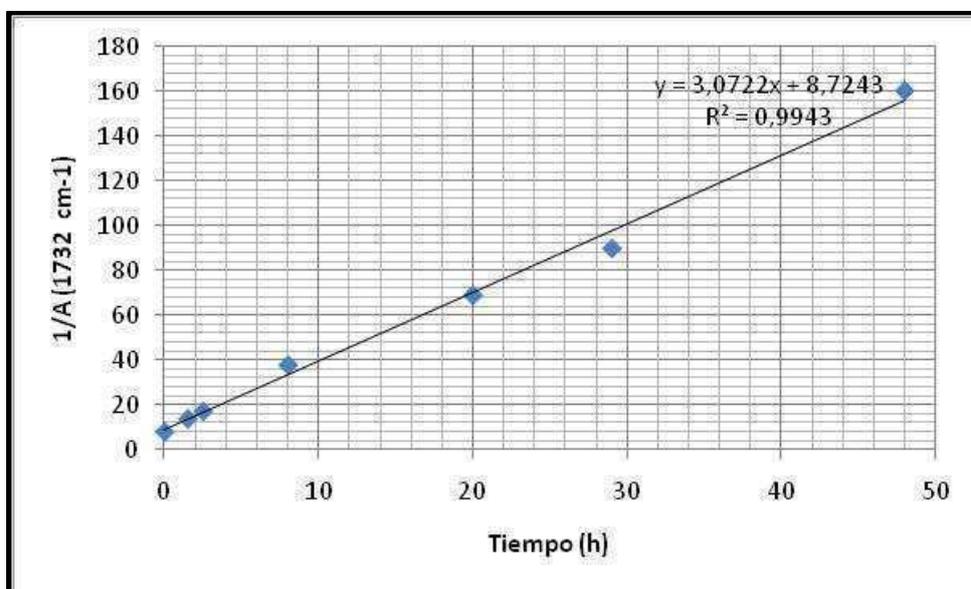
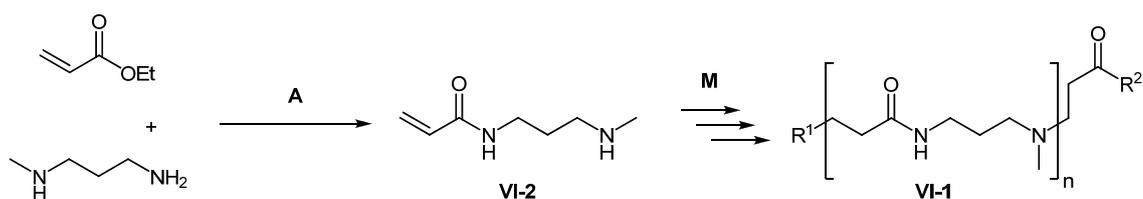


Figura VI.19. Dependencia lineal de la inversa de la absorbancia a 1732 cm^{-1} con el tiempo.

Este resultado es consistente con un mecanismo en el cual la velocidad de reacción tiene una dependencia de primer orden con la concentración de cada uno de los reactivos, considerando que los dos mantienen la misma concentración relativa con el avance de la reacción.

En este contexto es posible plantear un mecanismo de reacción en el cual, en un primer paso, se forma exclusivamente la amida **VI-2**, que es la unidad monomérica. La elongación de la cadena se produce a través de la adición de Michael de estas unidades. El Esquema VI.5 ilustra estas observaciones.



Esquema VI.5. Mecanismo de reacción para la obtención de la poliamidoamina **VI-1**.

A partir de estas observaciones es posible concluir que la enzima cataliza la reacción de aminólisis (**A**) con anterioridad a la adición de Michael (**M**). Experimentos llevados a cabo en ausencia de enzima demuestran la participación de la misma en ambas reacciones. Es interesante observar que la homogeneidad de la cadena de la poliamidoamina **VI-1** es consecuencia de la selectividad con la que proceden ambas reacciones involucradas: la aminólisis y la adición de Michael.

VI.6. Conclusión

En esta parte del trabajo de tesis se ha desarrollado una metodología para la síntesis de una poliamidoamina lineal catalizada por CAL B, a partir de acrilato de etilo y *N*-metil-1,3-diaminopropano.

La caracterización del producto de reacción requirió la combinación de las espectroscopias FT-IR y RMN y la espectrometría de masa UV-MALDI-TOF. Las primeras brindaron información principalmente sobre la identidad de la unidad repetitiva mientras que a partir de la información provista por la espectrometría de masa se pudo identificar a los grupos terminales, así como obtener datos sobre pesos moleculares y su distribución.

En cuanto a las condiciones de reacción empleadas, se observó que la concentración y el solvente empleados son de gran importancia, no sólo para garantizar que ambas reacciones ocurran, sino también que lo hagan en la secuencia tal que permita la formación de un producto de elevada regularidad estructural. Se observó que concentraciones de reactivos altas tienden a dar principalmente productos de adición de Michael de una manera poco selectiva, por lo que no resulta posible obtener el polímero en estas condiciones. A concentraciones bajas, en cambio, la adición de Michael es extremadamente lenta, por lo que fue posible obtener la acrilamida **VI-2**. A la concentración en la cual fue posible

obtener la poliamidoamina **VI-1**, la reacción de adición de Michael es altamente selectiva para el producto de aminólisis **VI-2** y sus dímeros, trímeros, etc.; haciendo posible la formación de una estructura repetitiva altamente regular. La elección del soporte del catalizador jugó un rol fundamental a la hora de maximizar el rendimiento y obtener preferentemente combinaciones de grupos terminales sin etóxido.

El seguimiento de la reacción por FT-IR mostró que la polimerización se producía a partir de la acrilamida **VI-2** que se formaba por aminólisis del acrilato de etilo por parte de *N*-metil-1,3-diaminopropano. Este hecho permite explicar la alta regularidad estructural encontrada en el producto.

Este trabajo posibilitó la síntesis de una poliamidoamina lineal de arquitectura novedosa y de índice de polidispersión cercano a la unidad sacando provecho de la capacidad de CAL B para catalizar ambas reacciones de aminólisis y adición de Michael. Este hecho reviste especial importancia, ya que este trabajo es el primero que utiliza la promiscuidad enzimática de una manera doble para la obtención de este tipo de productos. La participación de la enzima en ambas reacciones queda evidenciada en dos características encontradas en la poliamidoamina obtenida: su alta regularidad estructural y su estrecha distribución de pesos moleculares.

Bibliografía

1. Tanzi, M. C.; Rusconi, L.; Barozzi, C.; Ferruti, P.; Angiolini, L.; Nocentini, M.; Barone, V.; Barbucci, R. *Polymer*, **1984**, *25*, 863-868.
2. Ferruti, P.; Marchisio, M. A.; Duncan, R. *Macromol. Rapid Commun.*, **2002**, *23*, 332-355.
3. Pérignon, N; Mignotaud, A.-N.; Marty, J.-D.; Rico-Lattes, I.; Mignotaud, C. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 4856-4858.
4. Newkome, G. R.; Shreiner, C. D. *Polymer*, **2008**, *49*, 1-173.
5. Svenson, S. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2009**, *71*, 445-462.
6. a) Parkhouse, S. M.; Garnett, M. C.; Chan, W. C. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 6641-6650. b) Vuillaume, P. Y.; Brunelle, M.; Van Calsteren, M.-R.; Laurent-Lewandowski, S.; Bégin, A.; Lewandowski, R.; Talbot, B. G.; ElAzhary, Y. *Biomacromolecules*, **2005**, *6*, 1769-1781.
7. Ferruti, P.; Ranucci, E.; Bianchi, S.; Falciola, L.; Mussini, P. R.; Rossi, M. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2006**, *44*, 2316-2327.
8. Abu-Reziq, R.; Alper, H.; Wang, D.; Post, M. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 5279-5282.
9. Li, P.; Kawi, S. *J. Catal.*, **2008**, *257*, 23-31.
10. Deya, R. K.; Ray, A. R. *Biomaterials*, **2003**, *24*, 2985-2993.
11. Wang, H.; Lia, Y.; Zuo, Y.; Lib, J.; Mab, S.; Cheng, L. *Biomaterials*, **2007**, *28*, 3338-3348.
12. Gu, Q.-M.; Michel, A.; Cheng, H. N.; Maslanka, W. W.; Staib, R. R. US 6,667,384 B2 (Cl. 528-342), 23 Dec 2003, Appl. 10/032,651, 27 Dec 2001; 9 pp.
13. Hill, I. R. C., Garnett, M. C.; Bignotti, F.; Davis, S. S. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1427*, 161-174.
14. Nam, H. Y.; Hahn, H. J.; Nam, K.; Choi, W.-H.; Jeong, Y.; Kim, D.-E.; Park, J.-S. *Int. J. Pharm.*, **2008**, *363*, 199-205.
15. Bich Loan, D. T.; Panayotov, I. M. *Eur. Polym. J.*, **1996**, *32*, 957-962.
16. Ferruti, P.; Manzoni, S.; Richardson, S. C. W.; Duncan, R.; Patrick, N. G.; Mendichi, R.; Casolaro, M. *Macromolecules*, **2000**, *33*, 7793-7800.

17. Hartmann, L.; Krause, E.; Antonietti, M.; Börner, H. G. *Biomacromolecules*, **2006**, *7*, 1239-1244.
18. Iglesias, L. E.; Fukuyama, Y.; Nonami, H.; Erra-Balsells, R.; Baldessari, A. *Biotechnol. Tech.*, **1999**, *13*, 923-926.
19. a) Mosurkal, R.; Samuelson, L. A.; Parmar, V. S.; Kumar, J.; Watterson, A. C. *Macromolecules*, **2007**, *40*, 7742-7744. b) Schwab, L. W.; Kroon, R.; Schonten, A. J.; Loos, K. *Macromol. Rapid Commun.*, **2008**, *29*, 794-797.
20. Rustoy, E. M.; Sato, Y.; Nonami, H.; Erra-Balsells, R.; Baldessari, A. *Polymer*, **2007**, *48*, 1517-1525.
21. Branney, C.; Carlqvist, P.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, *31*, 123-128.
22. Torre, O.; Alfonso, I.; Gotor, V. *Chem. Commun.*, **2004**, 1724-1725.
23. Priego, J.; Ortíz-Nava, C.; Carrillo-Morales, M.; López-Munguía, A.; Escalante, J.; Castillo, E. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 536-539.
24. Rustoy E. M., Baldessari A. *J Mol Catal B Enzym*, **2006**, *39*, 50-54.
25. Baldessari, A.; Mangone, C. P. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2001**, *11*, 335-341.



CAPÍTULO VII

Parte experimental

VII. PARTE EXPERIMENTAL

VII.1. Generalidades

VII.1.1. Solventes y reactivos

Los solventes empleados para cromatografía (en columna y capa delgada), extracción y recristalización fueron purificados por destilación fraccionada. Los solventes empleados en las reacciones son de pureza de grado analítico y fueron utilizados sin ningún tratamiento adicional, salvo que se indique lo contrario.

Todos los reactivos empleados fueron utilizados sin tratamiento previo, salvo que se indique lo contrario.

VII.1.2. Biocatalizadores

a) Lipasas

Las lipasas empleadas fueron de origen comercial en todos los casos y las especificaciones de cada lote se detallan a continuación:

- Lipasa de *Candida antarctica* A (CAL A) (Chirazyme[®] L-5, c-f, lyo; Roche)

Lipasa de *Candida antarctica*, fracción A, liofilizada sin soporte.

Actividad determinada por la velocidad con la que cataliza la liberación de ácido butírico a partir de tributirina en solución reguladora de fosfatos 50 mM a pH 7,0.

Actividad: 2800 U/g

- Lipasa de *Candida antarctica* B (CAL B) (Chirazyme[®] L-2, c-f, C3, lyo; Roche)

Lipasa de *Candida antarctica*, fracción B, inmovilizada sobre polipropileno.

Actividad determinada por la velocidad con la que cataliza la liberación de ácido butírico a partir de tributirina en solución reguladora de fosfatos 50 mM a pH 7,0.

Actividad: 6300 U/g

- Lipasa de *Candida antarctica* B (CAL B) (Novozym[®] 435, Novozymes)

Lipasa de *Candida antarctica*, fracción B, inmovilizada sobre resina acrílica macroporosa. Es producida por el organismo huésped *Aspergillus oryzae*, luego de transferirle el gen que codifica para la lipasa correspondiente.

Actividad determinada por la velocidad con la que se sintetiza laurato de propilo a partir de ácido laurico y 1-propanol (unidades de laurato de propilo, PLU*).

Actividad: 7400 PLU/g

* PLU es el acrónimo de Propyl Laurate Units.

- Lipasa pancreática porcina (PPL) (tipo II, Sigma) contiene amilasa y proteasa

Lipasa de páncreas porcino liofilizada sin soporte (sólido conteniendo aproximadamente 25% en peso de proteína).

Actividad determinada por la velocidad con la que cataliza la liberación de ácido graso a partir de aceite de oliva a pH 7,7.

Actividad: 135 U/mg (masa de proteína), 44 U/mg (masa de sólido)

Contenido proteico del sólido (p/p): 32,6%

- Lipasa de *Candida rugosa* (CRL) (tipo VII, Sigma) contiene lactosa

Lipasa de *Candida rugosa* liofilizada sin soporte.

Actividad determinada por la velocidad con la que cataliza la liberación de ácido graso a partir de aceite de oliva a pH 7,7.

Actividad: 1170 U/mg (masa de sólido)

- Lipasa de *Rhizomucor miehei* (LIP) (Lipozyme[®] RM IM, Novozymes)

Lipasa de cepa seleccionada de *Rhizomucor miehei* inmovilizada sobre resina de intercambio aniónico.

Actividad determinada por la velocidad de incorporación de ácido palmítico en trioleína a 40° C. (unidades de transtesterificación en lote, BIU*).

Actividad: 25 BIU/g (masa de sólido)

* BIU es el acrónimo de Batch Interesterification Units.

- Lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PS-C, Amano)

Lipasa de *Pseudomonas* inmovilizada sobre partículas cerámicas.

Actividad determinada por la velocidad de hidrólisis de triacilglicéridos a pH 7,0 y 50° C en presencia de seroalbúmina bovina.

Actividad: 30 U/mg (masa de sólido)

b) Células enteras

- *Rhodotorula minuta* (cepa 062693)

La cepa proviene del Instituto de Micología Dr. C. Malbrán (Buenos Aires, Argentina). Ésta se encuentra disponible al público en el mencionado instituto bajo el número de cultivo 062693.

Las células, previamente crecidas en medio Sabouraud enriquecido con 0,3% de extracto de levadura a 28° C y 160 rpm, fueron inoculadas en el mismo medio tal que su densidad óptica inicial fuera 0,025 a 630 nm. Los cultivos así preparados fueron incubados a 28° C por 48 horas. Luego las células se recuperaron por centrifugación (10.000 x g por 10 minutos), se lavaron con agua estéril y se centrifugaron nuevamente. Este procedimiento fue realizado por la Dra. Patricia Cerrutti y el Dr. Miguel Galvagno del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Buenos Aires.

Algunos lotes fueron secados por liofilización directa en tubos previamente enfriados a -20° C por un período de 7 horas. Los lotes fueron pesados antes y después de la liofilización y conservados luego a 4° C. La liofilización fue realizada en un liofilizador Labconco Lyph lock 4.5.

VII.1.3. Reactores

Todas las reacciones en las que se emplearon biocatalizadores, a excepción de aquellas que se realizaron a reflujo, se llevaron a cabo dentro de erlenmeyers tapados en un agitador orbital termostatzado a 30-55° C INNOVA[®] 4000 (New Brunswick) o bien en un agitador orbital Sontec[®] (Scientifica) termostatzado a 10-55° C.

Las reacciones en las que se empleó radiación de microondas se llevaron a cabo en un reactor monomodo CEM-Discover[®] en vaso cerrado (tubos de 10 ml de capacidad) con agitación magnética y refrigeración por aire. La potencia de la radiación está limitada por la temperatura máxima de operación que se indica en cada caso.

Todas las demás reacciones se llevaron a cabo en balones con agitación magnética. En los casos en los cuales se indica calentamiento se utilizó una plancha calefactora con baño de aceite y condensador a reflujo refrigerado con agua.

VII.1.4. Separaciones

Métodos cromatográficos

Las cromatografías en columna se llevaron a cabo empleando como adsorbente silicagel (Silicagel 60, malla 230-400, Merck). Las cromatografías en capa preparativa se realizaron en placas de aluminio de 20 x 20 cm con silicagel (0,2 mm de espesor) (Silicagel 60F₂₅₄, Merck).

Centrifugaciones

Las centrifugaciones se realizaron empleando una centrífuga analítica Adams.

VII.1.5. Parte analítica

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns y no fueron corregidos.

Los poderes rotatorios fueron medidos en un polarímetro Perkin-Elmer 343 empleando una lámpara de sodio ($\lambda = 589$ nm) en microceldas de 1 dm de longitud a temperatura ambiente, utilizando el solvente y la concentración que se indica en cada caso.

Los análisis elementales (C, H, N) fueron realizados con un analizador elemental CE-440 (Exeter Analytical, Inc.) y un analizador elemental Perkin-Elmer 240 (C, H).

a) *Métodos espectroscópicos*

Los espectros de absorción infrarroja (IR) se adquirieron en un espectrofotómetro Nicolet Magna-IR 550 (FT-IR) en película sobre bromuro de potasio o en solución en el solvente indicado empleando ventanas de bromuro de potasio con espaciador de 0,25 mm.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H) se realizaron a 200,1 y 500 MHz en un espectrómetro Bruker AC-200 y Bruker AM-500 respectivamente. Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C) se realizaron a 50,2 y 125,8 MHz en un espectrómetro Bruker AC-200 y Bruker AM-500 respectivamente. Todas las muestras se analizaron en tubos de 5 mm de diámetro y los solventes empleados se indican en cada caso.

En algunos casos se realizaron asignaciones estructurales utilizando técnicas de RMN bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC) utilizando un espectrómetro Bruker AM-500.

Los desplazamientos químicos para RMN ^1H se expresan en todos los casos en la escala δ , en partes por millón (ppm) con respecto a la resonancia de tetrametilsilano, empleado como referencia interna (0,00 ppm). La multiplicidad de las señales de RMN ^1H se expresan en cada caso como singulete (s), singulete ancho (sa), doblete (d), doblete ancho (da), doble doblete (dd), doble doblete ancho (dda), doble doble doblete (dddd), triplete (t), cuarteto (c), doble cuarteto (dc) y multiplete (m).

Los desplazamientos químicos de RMN ^{13}C se expresan en todos los casos en la escala δ , en partes por millón (ppm) y se emplea como estándar interno la señal que corresponde al solvente empleado.

Los espectros de masa de ionización por impacto electrónico (EM-IE) se realizaron por introducción directa empleando los espectrómetros de masa TRIO-2 VG Masslab y Shimadzu QP-5000 a 70 eV. Los espectros de masa de ionización por desorción láser ultravioleta asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo (UV-MALDI-TOF) se obtuvieron utilizando los espectrómetros de masa Shimadzu Kompact MALDI III y Shimadzu Kompact MALDI IV equipados con una fuente láser ultravioleta de longitud de onda de emisión de 337 nm y 3 ns de ancho de pulso. Todos los espectros UV-MALDI-TOF se realizaron en el Laboratorio de Investigación de Bioquímica y Biofísica de Plantas

de la Facultad de Agricultura de la Universidad Ehime, en Japón. La matriz empleada se indica en cada caso.

b) Métodos cromatográficos

Las cromatografías analíticas en capa delgada se realizaron con placas de aluminio de silicagel de 0,2 mm de espesor (Silicagel 60F₂₅₄, Merck). Los reveladores utilizados fueron: luz ultravioleta a 254 y 365 nm, vapores de yodo, ácido sulfúrico 5% v/v en etanol, molibdato de amonio (50 g/l):sulfato cérico (1 g/l) en sulfúrico acuoso 10% v/v. En estos dos últimos casos se empleó una pistola de aire caliente para calentar la placa en la última etapa del revelado.

Las cromatografías gas-líquido (CGL) se llevaron a cabo en un cromatógrafo Thermo Finnigan Focus GC asociado a la estación de trabajo Chrom Card y dos cromatógrafos Hewlett-Packard 5840A y 5890, ambos equipados con registradores Hewlett-Packard. Los tres cromatógrafos contaban con detectores de ionización de llama (FID). En todos los casos se empleó nitrógeno como gas portador.

En la Tabla VII.1 se detallan las columnas usadas.

Tabla VII.1. Características de las columnas para cromatografía gas-líquido empleadas.

Denominación de la columna	Longitud y diámetro interno	Características de la fase estacionaria	Temperatura máxima de operación
ULTRA-2	25 m; 0,2 mm	Fenil Metil siloxano entrecruzado 5%	280° C
CHIRALDEX G-TA	40 m; 0,32 mm	γ -trifluoroacetil ciclodextrina	180° C

c) Análisis volumétrico

Las titulaciones ácido-base se realizaron empleando una bureta de 10 ml de capacidad graduada de a 0,1 ml. El pH durante la valoración se determinó con un pHmetro marca Hanna pH 209 (Hanna Instruments), dejando estabilizar la lectura entre cada agregado de

titulante. El pH metro fue calibrado con dos soluciones reguladoras (pH 10,00 y pH 7,00). El reactivo titulante empleado fue una solución de ácido clorhídrico 0,1 N valorada con carbonato de sodio por duplicado previamente al análisis.

VII.2. Síntesis enzimática de ésteres de 20-hidroxipregnanos

VII.2.1. Procedimiento general para la optimización de condiciones de reacción

El sustrato (0,015 mmol) se disolvió en el solvente correspondiente (2 ml), junto con cantidades variables del agente acilante indicado. La lipasa fue agregada sin ningún tratamiento previo y la mezcla agitada en un agitador orbital a 55° C y 200 rpm o calentada a temperatura de ebullición con agitación magnética y un condensador a reflujo según se indique. Las reacciones en el agitador orbital se mantuvieron por un período máximo de 120 horas y las que llevaron a cabo a reflujo durante un máximo de 8 horas. El curso de las reacciones se monitoreó por CCD (hexano:AcOEt 7:3). Una vez finalizada la reacción la enzima fue separada del medio por filtración y enjuagada con diclorometano (2x1 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se evaporó el solvente a presión reducida. La identidad y cantidad de los productos de reacción fue estimada por RMN ¹H sobre el crudo de reacción.

VII.2.2. Procedimiento general para la preparación enzimática de derivados acetilados de 3β,20α-dihidroxipregn-5-eno (III-1) y 3β,20β -dihidroxipregn-5-eno (III-2) III-3, III-4, III-15 y III-16

El sustrato (0,15 mmol) se disolvió éter diisopropílico (20 ml), junto con acetato de vinilo (15 mmol). La lipasa indicada (100 mg) fue agregada sin ningún tratamiento previo y la mezcla agitada en un agitador orbital a 55°C y 200 rpm por un período de 72 horas. Una vez finalizada la reacción la enzima fue separada del medio por filtración y enjuagada con diclorometano (3x5 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se evaporó el solvente a presión reducida. Los productos de reacción fueron separados por cromatografía en columna de silicagel (hexano:AcOEt 9:1). La identificación de los mismos, una vez

aislados, fue realizada por RMN ^1H contra datos espectroscópicos disponibles en literatura.¹

VII.2.3. Procedimiento general para la preparación de los succinatos mixtos III-17 a III-25

El sustrato (0,3 mmol) se disolvió en isooctano (40 ml), junto con el agente acilante indicado (1 mmol para la síntesis de etilsucciniloxi derivados y 0,63 mmol para la síntesis de bencilsucciniloxi derivados). La lipasa CAL B (500 mg) fue agregada sin ningún tratamiento previo y la mezcla calentada a temperatura de ebullición con agitación magnética y un condensador a reflujo por un período de 4 horas. Una vez finalizada la reacción la enzima fue separada del medio por filtración y enjuagada con diclorometano (3x5 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se evaporó el solvente a presión reducida. Los productos de reacción fueron separados por cromatografía en columna de silicagel (hexano:AcOEt 9:1). La caracterización de los mismos, una vez aislados, fue realizada por FT-IR, polarimetría, punto de fusión, análisis elemental de carbono e hidrógeno, RMN ^1H y ^{13}C de 200 MHz y 500 MHz, RMN de correlación COSY, HSQC y HMBC.

3 β -Acetoxi-20 β -etilsucciniloxi-pregn-5-eno (III-17)

Sólido blanco (60 mg, 43% rendimiento). Pf: 71-72° C. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: -25,0 ($c=0,02$; CHCl_3). IR (film, cm^{-1}): 2945, 1732, 1375, 1244, 1163, 1035, 963, 903. RMN ^1H (200,13 MHz; CDCl_3): δ 0,64 (3H, s) (Me-18); 1,00 (3H, s) (Me-19); 1,13 (3H, d, $J=6,1$ Hz) (Me-21); 1,26 (3H, t, $J=7,1$ Hz) (CH_3 , OEt); 2,03 (3H, s) (CH_3 , OAc); 2,59 (4H, m) (CH_2 , succínico); 4,14 (2H, c, $J=7,1$ Hz) (CH_2 , OEt); 4,59 (1H, m, $J=4,2$ Hz) (H-3); 4,86 (1H, dc, $J=6,1$; 10,5 Hz) (H-20); 5,36 (1H, dd) (H-6). RMN ^{13}C (50,32 MHz; CDCl_3): δ 12,3; 14,2; 19,3; 19,9; 20,9; 21,4; 24,3; 25,4; 27,7; 29,2; 29,6; 31,7; 31,8; 36,6; 36,9; 38,1; 39,1; 42,1; 50,0; 54,9; 56,0; 60,6; 73,3; 74,0; 122,4; 139,7; 170,6; 171,6; 172,3. Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_6$: C 71,28%; H 9,08%. Encontrado: C 71,30%; H 9,05%.

VII.2.4. Procedimiento de dos pasos en una sola operación para la preparación de III-17

Se disolvió **III-4** (0,3 mmol) en 40 ml de isooctano, junto con etanol (2 mmol) y anhídrido succínico (1 mmol). Se agregó CAL B (500 mg) y la mezcla se calentó en un balón a reflujo durante 4 horas. Al finalizar la reacción se procedió como en VII.2.1.

20 β -Etilsucciniloxi-3 β -hidroxi-pregn-5-eno (**III-18**)

Sólido blanco (27 mg, 21% rendimiento). Pf: 112-113°C. $[\alpha]_D^{25}$: -23,5 ($c=0,02$; CHCl₃). IR (film, cm⁻¹): 3264, 2936, 2360, 2342, 1732, 1449, 1377, 1163, 1054, 1022, 962. RMN ¹H (200,13 MHz; CDCl₃): δ 0,64 (3H, s) (Me-18); 0,99 (3H, s) (Me-19); 1,14 (3H, d, $J=6,1$ Hz) (Me-21); 1,25 (3H, t, $J=7,1$ Hz) (CH₃, OEt); 2,59 (4H, m) (CH₂, succínico); 3,51 (1H, m, $J=4,2$ Hz) (H-3); 4,14 (2H, c, $J=7,1$ Hz) (CH₂, OEt); 4,86 (1H, dc, $J=6,0$; 10,5 Hz) (H-20); 5,34 (1H, dd) (H-6). RMN ¹³C (50,32 MHz; CDCl₃): δ 12,3; 14,2; 19,4; 19,9; 20,9; 24,3; 25,4; 29,2; 29,6; 31,6; 31,9; 36,5; 37,2; 39,2; 42,2; 42,3; 50,1; 55,0; 56,1; 60,6; 71,7; 73,3; 122,5; 140,8; 171,6; 172,3. Análisis elemental: calculado para C₂₇H₄₂O₅: C 72,61%; H 9,48%. Encontrado: C 72,45%; H 9,50%.

3 β -Acetoxi-20 β -etilsucciniloxi-5 α H-pregnano (**III-19**)

Sólido blanco (59 mg, 42% rendimiento). Pf: 72-73°C. $[\alpha]_D^{25}$: +14,1 ($c=0,01$; CHCl₃). IR (film, cm⁻¹): 2939, 1732, 1375, 1244, 1035, 963, 905, 886. RMN ¹H (200,13 MHz; CDCl₃): δ 0,61 (3H, s) (Me-18); 0,81 (3H, s) (Me-19); 1,15 (3H, d, $J=6,1$ Hz) (Me-21); 1,26 (3H, t, $J=7,1$ Hz); 2,02 (3H, s) (CH₃, OAc); 2,60 (4H, m) (CH₂, succínico); 3,47 (1H, m, $J=4,8$ Hz) (H-3); 4,16 (2H, c, $J=7,1$ Hz) (CH₂, OEt); 4,86 (1H, dc, $J=6,1$; 10,5 Hz) (H-20). RMN ¹³C (50,32 MHz; CDCl₃): δ 12,2; 14,2; 19,9; 21,1; 21,5; 23,0; 24,2; 25,4; 27,5; 28,5; 32,0; 34,0; 35,3; 35,5; 36,7; 38,7; 39,3; 42,4; 54,2; 55,0; 55,8; 60,6; 73,3; 73,7; 170,7; 171,6; 172,3. Análisis elemental: calculado para C₂₇H₄₂O₅: C 70,99%; H 9,45%. Encontrado: C 71,06%; H 9,40%.

3β-tert-Butildimetilsililoxi-20β-etilsucciniloxipregn-5-eno (III-20)

Sólido blanco (51 mg, 38% rendimiento). Pf: 75-77°C. $[\alpha]_D^{25}$: -11,9 ($c=0,02$; CHCl₃). IR (film, cm⁻¹): 2930, 2901, 2857, 1732, 1462, 1379, 1252, 1223, 1161, 1088, 961, 887. RMN ¹H (200,13 MHz; CDCl₃): δ 0,05 (6H, s) (Me₂Si); 0,63 (3H, s) (H-18); 0,88 (9H, s) (t-BuSi); 0,98 (3H, s) (H-19); 1,14 (3H, d, J=6,1 Hz) (Me-21); 1,26 (3H, t, J=7,1 Hz); 2,58 (4H, m) (CH₂, succínico); 3,47 (1H, m, J=4,8 Hz) (H-3), 4,14 (2H, c, J=7,1 Hz) (CH₂, OEt); 4,85 (1H, dc, J=6,1; 10,5 Hz) (H-20); 5,30 (1H, dd) (H-6). RMN ¹³C (50,32 MHz; CDCl₃): δ -4,6; 12,3; 14,2; 18,2; 19,4; 19,9; 21,0; 24,3; 25,3; 26,0; 29,1; 29,6; 31,8; 31,9; 32,1; 36,6; 37,4; 39,2; 42,2; 42,8; 50,2; 55,0; 56,1; 60,7; 72,6; 73,3; 120,9; 141,6; 171,6; 172,3. Análisis elemental: calculado para C₃₃H₅₆O₅Si: C 70,67%; H 10,06%. Encontrado: C 70,99%; H 10,13%.

20β-Etilsucciniloxipregn-4-en-3-ona (III-21)

Sólido blanco (105 mg, 72% rendimiento). Pf: 70-71°C. $[\alpha]_D^{25}$: +82,3 ($c=0,08$; CHCl₃). IR (film, cm⁻¹): 2942, 1732, 1664, 1376, 1230, 1159, 1073, 1027, 963, 864. RMN ¹H (200,13 MHz; CDCl₃): δ 0,66 (3H, s) (Me-18); 1,14 (3H, d, J=6,1 Hz) (Me-21); 1,16 (3H, s) (Me-19); 1,25 (3H, t, J=7,1 Hz); 2,58 (4H, m) (CH₂, succínico); 4,14 (2H, c, J=7,1 Hz) (CH₂, OEt); 4,86 (1H, dc, J=6,1; 10,5 Hz) (H-20); 5,71 (1H, s) (H-4). RMN ¹³C (50,32 MHz; CDCl₃): δ 12,4; 14,2; 17,3; 19,8; 20,9; 24,2; 25,3; 29,1; 29,5; 32,0; 32,8; 33,9; 35,4; 35,6; 38,6; 39,0; 42,2; 53,8; 54,8; 55,2; 60,6; 73,1; 123,8; 171,4; 171,6; 199,6. Análisis elemental: calculado para C₂₇H₄₀O₅: C 72,94%; H 9,07%. Encontrado: C 72,87%; H 9,05%.

20β-Etilsucciniloxi-5αH-pregnan-3-ona (III-22)

Sólido blanco (112 mg, 77% rendimiento). Pf: 68-69°C. $[\alpha]_D^{25}$: +14,7 ($c=0,01$; CHCl₃). IR (film, cm⁻¹): 2945, 1732, 1670, 1375, 1244, 1035, 963, 903, 883. RMN ¹H NMR (200,13 MHz; CDCl₃): δ 0,63 (3H, s) (Me-18); 0,99 (3H, s) (Me-19); 1,13 (3H, d, J=6,1 Hz) (Me-21); 1,25 (3H, t, J=7,1 Hz); 2,58 (4H, m) (CH₂, succínico); 4,14 (2H, c,

$J=7.1$ Hz) (CH_2 , OEt); 4,85 (1H, dc, $J=6,1$; 10,5 Hz) (H-20); RMN ^{13}C (50,32 MHz; CDCl_3): δ 11,4; 12,5; 14,2; 19,8; 21,3; 24,2; 25,4; 28,9; 29,1; 29,5; 31,7; 35,2; 35,6; 38,2; 38,5; 39,2; 42,4; 44,7; 46,7; 53,8; 55,0; 55,6; 56,4; 60,6; 73,2; 171,6; 172,3; 212,0. Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_5$: C 72,61%; H 9,48%. Encontrado: C 72,84%; H 9,53%.

3,3-Etilendioxi-20 β -etilsucciniloxipregn-5-eno (III-23)

Sólido blanco (41 mg, 30% rendimiento). Pf: 120-122°C. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: -8,1 ($c=0,01$; CHCl_3). IR (film, cm^{-1}): 2939, 2888, 2845, 1730, 1431, 1377, 1313, 1244, 1173, 1153, 1101, 1089, 1029, 961, 864. RMN ^1H (200,13 MHz; CDCl_3): δ 0,64 (3H, s) (Me-18); 1,01 (3H, s) (Me-19); 1,14 (3H, d, $J=6,1$ Hz) (Me-21); 1,26 (3H, t, $J=7,1$ Hz); 1,96 (1H, m, $J=2,8$ Hz); 2,11 (1H, dd, $J=2,8$; 14,2 Hz); 2,59 (4H, m) (CH_2 , succínico); 3,94 (4H, m); 4,14 (2H, c, $J=7,1$ Hz) (CH_2 , OEt); 4,86 (1H, dc, $J=6,1$; 10,5 Hz) (H-20); 5,34 (1H, dd) (H-6). RMN ^{13}C (50,32 MHz; CDCl_3): δ 2,3; 14,2; 18,9; 19,9; 20,9; 24,3; 25,4; 29,2; 29,6; 31,0; 31,7; 31,7; 36,3; 36,6; 39,2; 41,8; 42,2; 49,7; 54,9; 56,1; 60,6; 64,2; 64,4; 73,3; 109,4; 122,0; 140,2; 171,6; 172,3. Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_6$: C 71,28%; H 9,08%. Encontrado: C 71,46%; H 9,20%.

3 β -Acetoxi-20 β -bencilsucciniloxipregn-5-eno (III-24)

Sólido blanco (41 mg, 27% rendimiento). Pf: 57-59°C. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: -22,3 ($c=0,01$; CHCl_3). IR (film, cm^{-1}): 2943, 2902, 2870, 2855, 1732, 1456, 1309, 1246, 1158, 1074, 1033, 964, 737, 699. RMN ^1H (200,13 MHz; CDCl_3): δ 0,63 (3H, s) (H-18); 1,00 (3H, s) (H-19); 1,13 (3H, d, $J=6,1$ Hz) (Me-21); 2,03 (3H, s) (CH_3 , OAc); 2,65 (4H, m) (CH_2 , succínico); 4,60 (1H, m, $J=4,8$ Hz) (H-3); 4,86 (1H, dc, $J=6,1$; 10,5 Hz) (H-20); 5,12 (1H, d, $J=12,3$ Hz) (H_a , OCH_2Bn); 5,16 (1H, d, $J=12,3$ Hz) (H_b , OCH_2Bn); 5,37 (1H, dd) (H-6); 7,35 (5H, m). RMN ^{13}C (50,32 MHz; CDCl_3): δ 12,3; 19,3; 19,8; 20,9; 21,4; 24,3; 25,4; 27,7; 29,2; 29,5; 31,7; 31,9; 36,6; 37,0; 38,0; 39,1; 42,1; 50,0; 50,9; 54,9; 56,0; 66,5; 73,3; 73,9; 122,4; 128,2; 128,5; 135,8; 139,7; 170,6; 171,5; 172,2. Análisis

elemental: calculado para $C_{34}H_{46}O_6$: C 74,15%; H 8,42%. Encontrado: C 73,76%; H 8,64%.

3β-tert-Butildimetilsililoxi-20β-bencilsucciniloxipregn-5-eno (III-25)

Sólido blanco (30 mg, 16% rendimiento). Pf: 59-61°C. $[\alpha]_D^{25}$: -12,1 ($c=0,01$; $CHCl_3$). IR (film, cm^{-1}): 2951, 2932, 2903, 2855, 1733, 1471, 1457, 1379, 1254, 1214, 1159, 1091, 1008, 962, 888, 870, 836, 805, 774, 735, 697, 667. RMN 1H (200,13 MHz; $CDCl_3$): δ 0,06 (6H, s) (Me_2Si); 0,63 (3H, s) (H-18); 0,89 (9H, s) (t-BuSi); 0,99 (3H, s) (H-19); 1,14 (3H, d, $J=6,1$ Hz) (Me-21); 2,64 (4H, m) (CH_2 , succínico); 3,47 (1H, m, $J=4,8$ Hz) (H-3); 4,85 (1H, dc, $J=6,1$; 10,5 Hz) (H-20); 5,12 (1H, d, $J=12,3$ Hz) (H_a , OCH_2Bn); 5,16 (1H, d, $J=12,3$ Hz) (H_b , OCH_2Bn); 5,30 (1H, dd) (H-6); 7,35 (5H, m). RMN ^{13}C (50,32 MHz; $CDCl_3$): δ -4,6; 12,3; 18,2; 19,4; 19,9; 20,9; 24,3; 25,4; 25,9; 29,2; 29,5; 31,7; 31,9; 32,1; 36,6; 37,4; 39,2; 42,1; 42,8; 50,2; 54,9; 56,1; 66,5; 72,6; 73,3; 120,9; 128,2; 128,5; 141,6; 171,5; 172,1. Análisis elemental: calculado para $C_{38}H_{58}O_5Si$: C 73,27%; H 9,38%. Encontrado: C 73,04%; H 9,55%.

VII.2.5. Preparación de ésteres de ácido succínico para la transtesterificación enzimática con los 20-hidroxipregnanos III-1 a III-14

Hemisuccinato de etilo (III-26)

A una solución de anhídrido succínico (10 g, 100 mmol) en piridina (20 ml) se le agregó etanol absoluto (5,8 ml). Se dejó reaccionar la mezcla agitándose a 55° C durante una noche y luego fue volcada sobre una mezcla de agua y hielo. Se agregó ácido clorhídrico concentrado gota a gota hasta acidez y luego se extrajo el producto con acetato de etilo (2x20 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con agua (2x20 ml), se secaron y se evaporaron a presión reducida. 90% de rendimiento, líquido incoloro. RMN 1H (200,13 MHz; $CDCl_3$): δ 1,25 (3H, t); 2,65 (4H, m); 4,50 (2H, c). RMN ^{13}C (50,32 MHz; $CDCl_3$): δ 13,9; 28,3; 28,5; 59,4; 171,1; 172,7. Análisis elemental calculado para $C_6H_{10}O_4$: C 49,31%; H 6,90%. Encontrado: C 48,89%; H 6,98%.

Succinato de dietilo (III-27)

Se disolvió anhídrido succínico (500 mg, 5 mmol) en 5 ml de etanol absoluto. Se agregó CAL B (500 mg). La mezcla se dejó en agitación por 24 horas a 55° C. La enzima fue filtrada y lavada con diclorometano (2x10 ml). La fase orgánica se combinó con el crudo y se evaporó a presión reducida. El crudo se redisolvió en acetato de etilo (30 ml) y se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio (2x20 ml) y agua (2x20 ml). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. Líquido incoloro (766 mg, 88% de rendimiento). Propiedades físicas y espectroscópicas coincidentes con las reportadas previamente.² RMN ¹H (200,13 MHz; CDCl₃): δ 1.24 (6H, t), 2.60 (4H, s), 4.13 (4H, c).

Succinato de dibencilo (III-29)

Se disolvió anhídrido succínico (500 mg, 5 mmol) en alcohol bencílico (1,25 ml; 10,5 mmol). Se agregó CAL B (500 mg) y la reacción se dejó en agitación por 48 horas a 55° C. La enzima fue filtrada y lavada con diclorometano (2x10 ml). La fase orgánica se combinó con el crudo y se evaporó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna de silicagel (hexano:AcOEt 95:5; 0,5% ácido fórmico). Sólido blanco (0,97 g; 65% rendimiento). Pf: 38-40°C. RMN ¹H (200,13 MHz; CDCl₃): δ 2,72 (4H, s); 5,14 (4H, s); 7,36 (10H, s). RMN ¹³C (50,32 MHz; CDCl₃): δ 29,1; 66,5; 128,2; 128,5; 172,0. Análisis elemental calculado para C₁₈H₁₈O₄: C 72,47%; H 6,08%. Encontrado: C 72,90%; H 6,44.

Succinato mixto de bencilo y etilo (III-30)

Se disolvió hemisuccinato de etilo (III-27) (500 mg; 3,4 mmol) junto con alcohol bencílico (0,4 ml; 3,4 mmol), *N,N'*-diclohexilcarbodiimida (784 mg; 3,8 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (122 mg, 1 mmol) en 5 ml de diclorometano. La mezcla se dejó a temperatura ambiente con agitación magnética durante una noche. Luego se evaporó el solvente y la mezcla fue resuspendida en éter etílico (20 ml) y filtrada. Se evaporó el

solvente del sobrenadante y el producto fue aislado de allí por cromatografía en columna de silicagel (hexano:AcOEt 1:1). Líquido incoloro (73% de rendimiento). RMN ^1H (200,13 MHz; CDCl_3): δ 1,23 (3H, t); 2,67 (4H, m); 4,12 (2H, c); 5,13 (2H, s); 7,34 (5H, s). RMN ^{13}C (50,32 MHz; CDCl_3): δ 14,1; 29,1; 60,6; 66,4; 128,1; 128,4; 172,1. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_4$: C 66,09%; H 6,83%. Encontrado: C 66,33%; H 7,03.

VII.2.6. Experimentos de modelado molecular y docking

La estructura de CAL B fue obtenida de RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>).³ Se cargó la estructura en HyperChem 7.5 y se le agregó el grupo acilo sobre la serina 105. La geometría del complejo se ajustó según datos publicados en bibliografía⁴ y se optimizó dejando la proteína estática utilizando el método AMBER incluido en el programa mencionado. La geometría de los sustratos se optimizó en el mismo programa mediante el método semiempírico AM1.

Los experimentos de *docking* se realizaron usando el programa GOLD versión 2.0 (CCDC, Cambridge, UK). El radio del sitio activo se fijó en 10 angstrom y se utilizó el algoritmo genético GoldScore incluido en el programa. Para cada sustrato se obtuvieron 20 soluciones.

Las conformaciones de los complejos resultantes, tal cual se muestra como ejemplo en la Figura III.8, fueron visualizadas en el programa VMD 1.8.5.⁵

VII.3. Obtención de derivados acilados de quinicina

VII.3.1. Reacciones de acetilación enzimática de IV-1

Se disolvió quinicina (IV-1) (25 mg; 0,07 mmol) en el solvente correspondiente (10 ml) y se agregó el agente acilante (7 mmol) si el solvente no era acetato de etilo. Se agregó la enzima (250 mg) y se dejó proceder la reacción a 55° C y 200 rpm. Las mismas se controlaron por CCD (AcOEt). Una vez finalizada la reacción la enzima fue separada del medio por filtración y enjuagada con diclorometano (3x2 ml). Las fases orgánicas se

combinaron y se evaporó el solvente a presión reducida. Los productos de reacción se separaron mediante un cartucho de sílica flash (primero Hexano:AcOEt 7:3 para recuperar los productos y luego AcOEt para recuperar el producto sin reaccionar). Los productos obtenidos se identificaron por RMN ^1H y por comparación por CCD con muestras de identidad corroborada.

4'-acetato de quinicina (IV-2)

Se disolvió quinicina (**IV-1**) (25 mg; 0,07 mmol) en acetato de etilo. Se agregó CAL B (250 mg) y la reacción se dejó proceder a 55° C y 200 rpm por un período de 36 horas. Una vez finalizada la reacción la enzima fue separada del medio por filtración y enjuagada con diclorometano (3x2 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se evaporó el solvente a presión reducida. Los productos de reacción se separaron mediante el procedimiento descrito en el párrafo anterior. Sólido vítreo (25,6 mg, 92% de rendimiento). Propiedades físicas coincidentes con las reportadas previamente.^{6,7} RMN ^{13}C (125,8 MHz; CDCl_3): δ 129,8 (C-1); 26,3 (C-2); 34,7 (C-3); 144,0 (C-4); 128,4 (C-5); 76,5 (C-6); 52,9 (C-7); 73,3 (C-8); 48,6 (C-9); 132,3 (C-10); 169,8 (C-11); 135,4 (C-12); 125,4 (C-13); 16,7 (C-14); 61,4 (C-15); 164,5 (C-1'); 138,7 (C-2'); 69,5 (C-3'); 67,3 (C-4'); 127,8 (C-5'); 20,8; 171,3 (OAc en C-4').

4',15-diacetato de quinicina (IV-3)

Se disolvió quinicina (**IV-1**) (40 mg; 0,11 mmol) en acetonitrilo (16 ml). Se agregó acetato de vinilo (1 ml, 11 mmol) y CAL B (400 mg). La reacción se dejó proceder a 55° C y 200 rpm por un período de 24 horas. Una vez finalizada la reacción la enzima fue separada del medio por filtración y enjuagada con diclorometano (3x2 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se evaporó el solvente a presión reducida. Los productos de reacción se separaron mediante cromatografía en columna de silicagel (Hexano:AcOEt 7:3). Se obtuvo **IV-2** (29,8 mg; 81% de rendimiento) junto con **IV-3**. Sólido vítreo (12,1 mg; 17% de rendimiento). Propiedades físicas coincidentes con las reportadas previamente.⁸ RMN ^{13}C (125,8 MHz; CDCl_3): δ 129,6 (C-1); 26,1 (C-2); 34,8 (C-3);

138,9 (C-4); 130,6 (C-5); 76,3 (C-6); 52,8 (C-7); 73,1 (C-8); 48,4 (C-9); 132,1 (C-10); 169,4 (C-11); 135,0 (C-12); 125,2 (C-13); 16,8 (C-14); 61,7 (C-15); 164,4 (C-1'); 138,6 (C-2'); 69,3 (C-3'); 67,2 (C-4'); 127,8 (C-5'); 20,8; 170,6 (OAc en C-15); 20,7; 171,2 (OAc en C-4').

VII.3.2. Acetilación química de IV-1

Triacetato de quinicina (IV-4)

Se disolvió quinicina (IV-1) (50 mg, 0,13 mmol) en 2 ml de anhídrido acético y se calentó la mezcla a 70° C por un período de 2 horas. Luego de esto se agregó metanol (6 ml) y se evaporó el solvente a presión reducida. Los productos de reacción se separaron mediante cromatografía en columna de silicagel (Hexano:AcOEt 8:2). Se obtuvo IV-3 (46 mg, 76% de rendimiento) y IV-4 (12 mg, 18% de rendimiento). IV-4: Propiedades físicas coincidentes con las reportadas previamente.⁸ RMN ¹³C (125,8 MHz; CDCl₃): δ 129,7 (C-1); 26,3 (C-2); 35,0 (C-3); 138,9 (C-4); 130,6 (C-5); 73,4 (C-6); 52,8 (C-7); 69,4 (C-8); 48,4 (C-9); 132,3 (C-10); 135,0 (C-11); 169,4 (C-12); 125,3 (C-13); 16,9 (C-14); 61,7 (C-15); 163,6 (C-1'); 136,3 (C-2'); 69,4 (C-3'); 63,9 (C-4'); 128,1 (C-5'); 20,9; 170,6 (OAc en C-15); 20,9; 170,4 (OAc en C-3'); 20,7; 171,5 (OAc en C-4').

8α-(3',4'-diacetoxi-2'-metilen-butanoiloxi)-15-acetil-11,13-dehidromelitensina (IV-5)

Se disolvió quinicina (IV-1) (50 mg, 0,13 mmol) en 2 ml de anhídrido acético y se calentó la mezcla a 100° C bajo radiación de microondas (potencia 70 W, reactor monomodo, vaso cerrado) por un período de 30 minutos. Luego de esto se agregó metanol (6 ml) y se evaporó el solvente a presión reducida. Sólido vítreo (63 mg, 95% de rendimiento). $[\alpha]_D^{25}$: +67,8 ($c=0,02$; CHCl₃). IR (film, cm⁻¹): 2931, 1777, 1743, 1718, 1369, 1222, 1136, 1044. RMN ¹H (500 MHz; CDCl₃): δ 5,76 (H-1, dd, J=17,4; 11,0 Hz); 5,07 (H-2a, da, J=11,0 Hz); 5,02 (H-2b, da, J=17,4 Hz); 5,43 (H-3a, sa); 5,04 (H-3b, sa); 2,47 (H-5, d, J=12,2 Hz); 4,22 (H-6, dd, J=12,2; 11,2 Hz); 2,95 (H-7, dddd, J=11,2; 10,8; 3,0; 2,8 Hz); 5,31 (H-8, td, J=10,8; 4,6 Hz); 2,09 (H-9a); 1,69 (H-9b, dd, J=12,8; 10,8

Hz); 6,15 (H-13a, d, J=3,0 Hz); 5,57 (H-13b, d, J=2,8 Hz); 1,17 (Me-14, s); 4,51 (H-15a y H-15b, sa); 5,83 (H-3', t, J=4,8 Hz); 4,29 (H-4'a y H-4'b, d, J=4,8 Hz); 6,40 (H-5'a, sa); 5,96 (H-5'b, sa); 2,12 (OAc en C-15, s); 2,09 (OAc en C-3', s); 2,05 (OAc en C-4', s). RMN ^{13}C (125,8 MHz; CDCl_3): δ 145,3 (C-1); 113,5 (C-2); 117,1 (C-3); 138,4 (C-4); 51,4 (C-5); 78,2 (C-6); 52,3 (C-7); 69,6 (C-8); 44,8 (C-9); 41,9 (C-10); 136,5 (C-11); 169,8 (C-12); 120,2 (C-13); 18,6 (C-14); 67,3 (C-15); 163,8 (C-1'); 136,0 (C-2'); 69,8 (C-3'); 64,0 (C-4'); 128,3 (C-5'); 20,9; 170,5 (OAc en C-15); 21,0; 169,6 (OAc en C-3'); 20,7; 171,6 (OAc en C-4'). Análisis elemental calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{10}$: C 61,90%; H 6,39%. Encontrado: C 61,79%; H 6,47%.

VII.3.3. Alcohólisis enzimática de IV-3 y IV4

Se disolvió el sustrato (20 mg) en el solvente indicado (8 ml). Cuando se empleó acetonitrilo, se agregó el nucleófilo correspondiente (4 mmol) y luego CAL B (200 mg). La reacción se dejó proceder a 55° C y 200 rpm por un período de 36 horas. Una vez finalizada la reacción la enzima fue separada del medio por filtración y enjuagada con diclorometano (3x2 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se evaporó el solvente a presión reducida. Los productos de reacción se purificaron mediante cromatografía en columna de silicagel (Hexano:AcOEt 7:3).

15-acetato de quinicina (IV-6)

Sólido vítreo (17,8 mg; 98% de rendimiento). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +49,5 ($c=0,03$; 2-propanol). IR (film, cm^{-1}): 3412, 2934, 2868, 1760, 1732, 1718, 1444, 1377, 1263, 1230, 1144, 1075, 1030, 997, 958, 821. RMN ^1H (500 MHz; $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): δ 5,04 (H-1, da, J=7,0 Hz); 2,27 (H-2a y H-2b, m); 2,54 (H-3a, m); 2,09 (H-3b, m); 5,06 (H-5, d, J=10,0 Hz); 5,14 (H-6, dd, J=10,0; 8,5 Hz); 3,26 (H-7, m); 5,08 (H-8, dda); 2,58 (H-9a, da); 2,52 (H-9b, dd, J=12,0; 12,0 Hz); 6,25 (H-13a, d, J=3,5 Hz); 5,84 (H-13b, d, J=3,0 Hz); 1,55 (Me-14, s); 4,63 (H-15a, d, J=13,1 Hz); 4,69 (H-15b, d, J=13,1 Hz); 4,55 (H-3', dd, J=7,0; 3,5 Hz); 3,76 (H-4'a, dd, J=11,5; 3,5 Hz); 3,51 (H-4'b, dd, J=11,5; 7,0 Hz); 6,41 (H-5'a, sa); 6,13 (H-5'b, sa); 2,12 (OAc en C-15, s). RMN ^{13}C (125,8 MHz;

CDCl₃/CD₃OD): δ 130,7 (C-1); 25,9 (C-2); 34,5 (C-3); 139,2 (C-4); 129,5 (C-5); 77,1 (C-6); 52,7 (C-7); 72,9 (C-8); 48,0 (C-9); 132,1 (C-10); 135,3 (C-11); 170,5 (C-12); 125,1 (C-13); 16,3 (C-14); 61,8 (C-15); 165,1 (C-1'); 140,4 (C-2'); 70,6 (C-3'); 65,5 (C-4'); 126,6 (C-5'); 20,2; 171,2 (OAc en C-15). Análisis elemental calculado para C₂₂H₂₈O₈: C 62,85%; H 6,71%. Encontrado: C 62,70%; H 6,80%.

3'-15'-diacetato de quinicina (IV-7)

Sólido vítreo (18,1 mg; 99% de rendimiento). $[\alpha]_D^{25}$: +102,1 ($c=0,03$; CHCl₃). IR (film, cm⁻¹): 3475, 2956, 2918, 2845, 1741, 1369, 1224, 1144, 1041, 966, 816. RMN ¹H (500 MHz; CDCl₃): δ 5,00 (H-1, da, J=7,0 Hz); 2,22 (H-2a y H-2b, m); 2,52 (H-3a, m); 2,06 (H-3b, m); 4,93 (H-5, d, J=10,0 Hz); 4,90 (H-6, dd, J=10,0; 8,5 Hz); 3,11 (H-7, m); 5,17 (H-8, dda, J=12,0; 11,5 Hz); 2,61 (H-9a, da, J=11,5 Hz); 2,51 (H-9b, dd, J=12,0; 12,0 Hz); 6,32 (H-13a, d, J=3,5 Hz); 5,74 (H-13b, d, J=3,0 Hz); 1,51 (Me-14, s); 4,63 (H-15a, d, J=16,0 Hz); 4,59 (H-15b, d, J=16,0 Hz); 5,62 (H-3', dd, J=7,0; 3,5 Hz); 3,88 (H-4'a, dd, J=11,5; 3,5 Hz); 3,79 (H-4'b, dd, J=11,5; 7,0 Hz); 6,39 (H-5'a, sa); 5,98 (H-5'b, sa); 2,11 (OAc en C-15, s); 2,13 (OAc en C-3', s). RMN ¹³C (125,8 MHz; CDCl₃): δ 129,7 (C-1); 26,2 (C-2); 34,8 (C-3); 138,9 (C-4); 130,7 (C-5); 76,3 (C-6); 52,8 (C-7); 73,3 (C-8); 48,5 (C-9); 132,1 (C-10); 134,9 (C-11); 169,3 (C-12); 125,5 (C-13); 16,7 (C-14); 61,6 (C-15); 164,1 (C-1'); 136,6 (C-2'); 72,4 (C-3'); 63,8 (C-4'); 127,7 (C-5'); 21,0; 170,7 (OAc en C-15); 21,0; 169,7 (OAc en C-3'). Análisis elemental calculado para C₂₄H₃₀O₉: C 62,33%; H 6,54%. Encontrado: C 62,24%; H 6,50%.

VII.3.4. Preparación de derivados acilados de quinicina IV-8 a IV-11

VII.3.4.1. Optimización de las condiciones de reacción para obtener IV-8

Se disolvió IV-1 (5 mg, 0,013 mmol) en el solvente indicado (2 ml). Luego se agrega el agente acilante correspondiente (1,3 mmol) y la lipasa (50 mg). La reacción se dejó proceder en agitación a 200 rpm a la temperatura y por el tiempo que se indica, siendo monitoreadas por CCD (AcOEt). Finalmente la enzima se filtró y se lavó con

diclorometano (2x1 ml). Se evaporó el solvente de las fases orgánicas combinadas y se redisolvieron en cloroformo deuterado (0,5 ml) aquellos crudos de reacción que hubieron presentado una conversión apreciable por CCD.

VII.3.4.2. Obtención de IV-8 a IV-11 en escala preparativa

Se disolvió **IV-1** (40 mg, 0,11 mmol) en acetonitrilo (16 ml). Se agregó el ácido correspondiente (0,22 mmol) y CAL B (400 mg). La reacción se dejó proceder a 10° C y 200 rpm por 120 horas. Una vez finalizada la reacción la enzima fue separada del medio por filtración y enjuagada con diclorometano (3x2 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se evaporó el solvente a presión reducida. Los productos de reacción se separaron mediante cromatografía en columna de silicagel (Hexano:AcOEt 9:1).

4'-hexanoato de quinicina (**IV-8**)

Sólido vítreo (38 mg, 72% de rendimiento). $[\alpha]_D^{25}$: +115,8 ($c=0,02$; CHCl₃). IR (film, cm⁻¹): 3446, 2932, 2865, 1760, 1740, 1716, 1456, 1386, 1276, 1153, 1090, 1000, 954. RMN ¹H (500 MHz; CDCl₃): δ 5,00 (H-1, da, J=7,0 Hz); 2,21 (H-2a y H-2b, m); 2,58 (H-3a, m); 1,97 (H-3b, m); 4,81 (H-5, d, J=10,0 Hz); 5,11 (H-6, dd, J=10,0; 8,5 Hz); 3,09 (H-7, m); 5,17 (H-8, dda, J=12,0; 11,5 Hz); 2,60 (H-9a, da, J=11,5 Hz); 2,49 (H-9b, dd, J=12,0; 12,0 Hz); 6,27 (H-13a, d, J=3,5 Hz); 5,75 (H-13b, d, J=3,0 Hz); 1,50 (Me-14, s); 4,29 (H-15a, d, J=15,0 Hz); 4,09 (H-15b, d, J=15,0 Hz); 4,70 (H-3', dd, J=7,0; 3,5 Hz); 4,28 (H-4'a, dd, J=11,5; 3,5 Hz); 4,21 (H-4'b, dd, J=11,5; 7,0 Hz); 6,38 (H-5'a, sa); 6,10 (H-5'b, sa); 2,32 (t, J=7,5 Hz); 1,61 (m); 1,30 (m); 0,89 (t, J=7,5 Hz) (acilo en C-4'). RMN ¹³C (125,8 MHz; CDCl₃): δ 129,8 (C-1); 26,3 (C-2); 34,7 (C-3); 143,9 (C-4); 128,4 (C-5); 76,5 (C-6); 52,9 (C-7); 73,3 (C-8); 48,6 (C-9); 132,3 (C-10); 135,4 (C-11); 169,7 (C-12); 125,3 (C-13); 16,7 (C-14); 61,5 (C-15); 164,5 (C-1'); 138,6 (C-2'); 69,7 (C-3'); 67,1 (C-4'); 127,7 (C-5'); 13,9; 22,3; 24,5; 31,2; 34,1; 174,2 (acilo en C-4'). Análisis elemental calculado para C₂₆H₃₆O₈: C 65,53%; H 7,61%. Encontrado: C 65,36%; H 7,78%.

4'-decanoato de quinicina (IV-9)

Sólido vítreo (38 mg, 70% de rendimiento). $[\alpha]_D^{25}$: +71,9 ($c=0,02$; CHCl_3). IR (film, cm^{-1}): 3445, 2954, 2826, 1735, 1713, 1458, 1408, 1277, 1144, 1086, 1019, 997, 816. RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3): δ 5,00 (H-1, da, $J=7,0$ Hz); 2,21 (H-2a y H-2b, m); 2,58 (H-3a, m); 1,97 (H-3b, m); 4,81 (H-5, d, $J=10,0$ Hz); 5,11 (H-6, dd, $J=10,0$; 8,5 Hz); 3,09 (H-7, m); 5,17 (H-8, dda, $J=12,0$; 11,5 Hz); 2,60 (H-9a, da, $J=11,5$ Hz); 2,49 (H-9b, dd, $J=12,0$; 12,0 Hz); 6,27 (H-13a, d, $J=3,5$ Hz); 5,75 (H-13b, d, $J=3,0$ Hz); 1,50 (Me-14, s); 4,29 (H-15a, d, $J=15,0$ Hz); 4,09 (H-15b, d, $J=15,0$ Hz); 4,70 (H-3', dd, $J=7,0$; 3,5 Hz); 4,28 (H-4'a, dd, $J=11,5$; 3,5 Hz); 4,21 (H-4'b, dd, $J=11,5$; 7,0 Hz); 6,38 (H-5'a, sa); 6,10 (H-5'b, sa); 2,33 (t, $J=7,5$ Hz); 1,61 (m); 1,25 (m); 0,87 (t, $J=7,5$ Hz) (acilo en C-4'). RMN ^{13}C (125,8 MHz; CDCl_3): δ 129,8 (C-1); 26,3 (C-2); 34,7 (C-3); 143,9 (C-4); 128,4 (C-5); 76,4 (C-6); 53,0 (C-7); 73,3 (C-8); 48,6 (C-9); 132,3 (C-10); 135,4 (C-11); 169,7 (C-12); 125,3 (C-13); 16,7 (C-14); 61,5 (C-15); 164,5 (C-1'); 138,6 (C-2'); 69,7 (C-3'); 67,1 (C-4'); 127,7 (C-5'); 14,1; 22,6; 24,7; 24,9; 29,0; 29,1; 29,2; 29,4; 31,8; 174,2 (acilo en C-4'). Análisis elemental calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_8$: C 67,64%; H 8,33%. Encontrado: C 67,74%; H 8,41%.

4'-tetradecanoato de quinicina (IV-10)

Sólido vítreo (43 mg, 70% de rendimiento). $[\alpha]_D^{25}$: +70,0 ($c=0,02$; CHCl_3). IR (film, cm^{-1}): 3434, 2929, 2851, 1743, 1707, 1454, 1408, 1383, 1274, 1149, 1080, 1021, 994, 952, 813. RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3): δ 5,00 (H-1, da, $J=7,0$ Hz); 2,23 (H-2a y H-2b, m); 2,60 (H-3a, m); 1,97 (H-3b, m); 4,82 (H-5, d, $J=10,0$ Hz); 5,11 (H-6, dd, $J=10,0$; 8,5 Hz); 3,09 (H-7, m); 5,19 (H-8, dda, $J=12,0$; 11,5 Hz); 2,60 (H-9a, da, $J=11,5$ Hz); 2,49 (H-9b, dd, $J=12,0$; 12,0 Hz); 6,28 (H-13a, d, $J=3,5$ Hz); 5,75 (H-13b, d, $J=3,0$ Hz); 1,50 (Me-14, s); 4,30 (H-15a, d, $J=15,0$ Hz); 4,10 (H-15b, d, $J=15,0$ Hz); 4,70 (H-3', dd, $J=7,0$; 3,5 Hz); 4,29 (H-4'a, dd, $J=11,5$; 3,5 Hz); 4,21 (H-4'b, dd, $J=11,5$; 7,0 Hz); 6,38 (H-5'a, sa); 6,10 (H-5'b, sa); 2,32 (t, $J=7,5$ Hz); 1,61 (m); 1,25 (m); 0,87 (t, $J=7,5$ Hz) (acilo en C-4'). RMN ^{13}C (125,8 MHz; CDCl_3): δ 129,8 (C-1); 26,4 (C-2); 34,7 (C-3); 143,9 (C-4); 128,4 (C-5); 76,4 (C-6); 53,0 (C-7); 73,3 (C-8); 48,6 (C-9);

132,4 (C-10); 135,4 (C-11); 169,6 (C-12); 125,3 (C-13); 16,8 (C-14); 61,6 (C-15); 164,5 (C-1'); 138,6 (C-2'); 69,8 (C-3'); 67,1 (C-4'); 127,7 (C-5'); 14,1; 22,7; 23,0; 23,7; 24,9; 29,1; 29,2; 29,3; 29,4; 29,6; 31,9; 34,1; 174,2 (acilo en C-4'). Análisis elemental calculado para $C_{34}H_{53}O_8$: C 69,36%; H 8,90%. Encontrado: C 69,30%; H 8,99%.

4'-cis-9-octadecenoato de quinicina (IV-11)

Sólido vítreo (44,9 mg; 66% de rendimiento). $[\alpha]_D^{25}$: +68,6 ($c=0,02$; $CHCl_3$). IR (film, cm^{-1}): 3448, 3001, 2920, 2856, 1740, 1713, 1454, 1402, 1388, 1277, 1149, 1086, 1049, 1019, 996, 949, 814. RMN 1H (500 MHz; $CDCl_3$): δ 5,00 (H-1, da, $J=7,0$ Hz); 2,22 (H-2a y H-2b, m); 2,60 (H-3a, m); 1,97 (H-3b, m); 4,82 (H-5, d, $J=10,0$ Hz); 5,12 (H-6, dd, $J=10,0$; 8,5 Hz); 3,09 (H-7, m); 5,19 (H-8, dda, $J=12,0$; 11,5 Hz); 2,60 (H-9a, da, $J=11,5$ Hz); 2,49 (H-9b, dd, $J=12,0$; 12,0 Hz); 6,28 (H-13a, d, $J=3,5$ Hz); 5,75 (H-13b, d, $J=3,0$ Hz); 1,50 (Me-14, s); 4,30 (H-15a, d, $J=15,0$ Hz); 4,10 (H-15b, d, $J=15,0$ Hz); 4,70 (H-3', dd, $J=7,0$; 3,5 Hz); 4,29 (H-4'a, dd, $J=11,5$; 3,5 Hz); 4,21 (H-4'b, dd, $J=11,5$; 7,0 Hz); 6,38 (H-5'a, sa); 6,10 (H-5'b, sa); 5,34 (m); 2,34 (t, $J=7,5$ Hz); 1,61 (m); 1,30 (m); 0,91 (t, $J=7,5$ Hz) (acilo en C-4'). RMN ^{13}C (125,8 MHz; $CDCl_3$): δ 129,8 (C-1); 26,3 (C-2); 34,7 (C-3); 143,9 (C-4); 128,4 (C-5); 76,4 (C-6); 53,0 (C-7); 73,3 (C-8); 48,6 (C-9); 132,4 (C-10); 135,3 (C-11); 169,6 (C-12); 125,3 (C-13); 16,7 (C-14); 61,5 (C-15); 164,5 (C-1'); 138,6 (C-2'); 69,7 (C-3'); 67,1 (C-4'); 127,7 (C-5'); 14,1; 22,7; 27,1; 27,2; 29,0; 29,1; 29,3; 29,5; 29,7; 31,9; 33,8; 129,7; 130,0; 174,2 (acilo en C-4'). Análisis elemental calculado para $C_{38}H_{58}O_8$: C 71,00%; H 9,01%. Encontrado: C 69,81%; H 8,98%.

VI.3.5. Modelado molecular de quinicina

La búsqueda conformacional se llevó a cabo utilizando el método semiempírico AM1 integrado en HyperChem 7.5. La geometría de la quinicina fue primero optimizada y se empleó el algoritmo de búsqueda conformacional integrado en el mismo programa para

buscar mínimos locales. Los ángulos de torsión variados fueron C5–C4–C15–O y C4–C15–O–H. La Figura IV.1 fue tomada de la interfaz gráfica de HyperChem 7.5.

VII.4. Reducción biocatalítica de dicetonas vecinales

VII.4.1. Reducción química de las dicetonas V-1, V-11, V-12 y V-13

La dicetona (1 mmol) fue disuelta en metanol (10 ml). Se agregó borohidruro de sodio (74 mg, 2 mmol) a la solución resultante y se agitó la mezcla por 30 minutos. Luego se evaporó el solvente y se agregó nuevamente metanol (10 ml) que finalmente fue evaporado a presión reducida. Los productos de reacción fueron separados por cromatografía en columna (hexano:AcOEt 2:1 a 1:1), caracterizados por métodos espectroscópicos y utilizados como estándares para la identificación cromatográfica.⁹

VII.4.2. Síntesis de los enol carboxilatos V-4 y V-5

Se disolvió 1,2-ciclohexanodiona (180 mg; 1,6 mmol) en una mezcla de iguales volúmenes de piridina con el anhídrido correspondiente. La solución resultante se agitó a 30° C durante una noche y luego fue vertida sobre agua fría (10 ml). Se agregó ácido clorhídrico 20% gota a gota hasta acidez. El producto se extrajo lavando con acetato de etilo (2x15 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con agua (3x10 ml) y se secaron. El solvente se evaporó y el producto se purificó por cromatografía en silicagel (Hexano:AcOEt 7:3).

2-acetoxi-2-ciclohexenona (V-4)

Cristales incoloros (226 mg; 92% de rendimiento). Datos de RMN ¹H coincidentes con reportados en literatura.¹⁰ RMN ¹³C (50,2 MHz; CDCl₃): δ 20,0; 22,2; 24,4; 37,6; 136,1; 144,9; 168,4; 191,5. EM-EI: m/z (intensidad relativa): 154 [M⁺](14), 95(100).

2-hexanoiloxi-2-ciclohexenona (V-5)

Aceite incoloro (255 mg; 76% de rendimiento). RMN ¹H (200,13 MHz; CDCl₃): δ 0,85 (3H, t); 1,2-1,4 (4H, m); 1,64 (2H, m); 1,9-2,1 (4H, m); 2,3-2,6 (4H, m); 6,55 (1H, t). RMN ¹³C (50,2 MHz; CDCl₃): δ 13,9; 20,0; 22,7; 24,4; 25,2; 30,2; 33,8; 37,6; 136,1; 144,9; 171,4; 191,5. EM-EI: m/z (intensidad relativa): 210 [M]⁺(12), 181(7), 153(20), 95(100). Análisis elemental calculado para C₁₂H₁₈O₃: C 68,54%; H 8,63%. Encontrado: C 67,10%; H 8,89%.

VII.4.3. Procedimiento para la reducción de dicetonas vecinales empleando *R. Minuta***VII.4.3.1. Análisis de los productos de reacción**

Se agregó el sustrato (1 mmol) junto con glucosa (50 mg) a una suspensión de la levadura (0,5-8 g de peso húmedo) en el solvente que se indica (10 ml). La mezcla resultante se incubó a 33° C y 200 rpm en erlemneyers con tapón estériles de 25 ml de capacidad. El curso de las reacciones se controló por CCD y CGL. Se tomaron alícuotas (1 ml), se centrifugaron y se extrajo el sobrenadante con acetato de etilo (2x1 ml) y éter etílico (2x1 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el solvente para su análisis por CGL. Para estimar las conversiones se analizaron las fracciones por GC empleando una columna ULTRA-2. Condiciones: flujo de gas portador 1 ml/min, temperatura del inyector 250° C, temperatura del detector 250° C, programa del horno 80° C por 6 minutos, luego rampa 5° C/min hasta 150° C. Los excesos enantioméricos en cada caso se estimaron por CGL empleando una columna CHIRALDEX G-TA. Condiciones: Condiciones: flujo de gas portador 1 ml/min, temperatura del inyector 180° C, temperatura del detector 180° C, programa del horno 80° C durante todo el análisis.

Tiempos de retención en minutos (Ultra-2)

V-1: 6,54. V-2: 8,90. V-3: 8,74. V-4: 7,10. V-5: 8,04. V-11: 6,02. V-12: 6,54. V-13: 9,44. V-14: 7,20. V-15: 7,78. V-17: 7,58. V-18: 10,50. V-19: 9,20 (*eritro*); 9,44 (*treo*). V-20: 10,02 (*eritro*); 9,81 (*treo*). V-21: 12,43 (*eritro*); 13,67 (*treo*).

Tiempos de retención en minutos (Chiraldex)

V-1: 7,92. V-2: 11,30 (*R,R*); 11,42 (*S,S*). V-3: 10,94. V-14: 7,64 (*R*); 7,38 (*S*). V-15: 9,84 (*R*); 9,91 (*S*). V-17: 9,67 (*R*); 9,72 (*S*). V-18: 17,43 (*S*); 17,52 (*R*). V-19: 9,90 (*S,S*); 9,82 (*R,R*); 9,40 (*meso*). V-20: 13,73 (*R,R*); 13,81 (*S,S*); 14,03 (*eritro*). V-21: 18,22 (*S,S*); 18,36 (*R,R*); 18,54 y 18,70 (*eritro*).

VII.4.3.2. Aislamiento de los productos

Se agregó el sustrato (1 mmol) junto con glucosa (50 mg) a una suspensión de la levadura (8 g de peso húmedo) en agua estéril (10 ml). La mezcla resultante se incubó a 33° C y 200 rpm en erlemmeyers con tapón estériles de 25 ml de capacidad. El curso de las reacciones se controló por CCD y CGL. La reacción se detuvo centrifugando para separar las células y el sobrenadante se extrajo con acetato de etilo (2x10 ml) y éter etílico (2x10 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se secaron con sulfato de sodio anhidro para luego evaporar el solvente a presión reducida. Los productos de reacción fueron separados por cromatografía en columna (desde hexano:AcOEt 1:1 hasta hexano:AcOEt 2:1), analizados por CGL (en las mismas condiciones que se detalla en la sección anterior), métodos espectroscópicos y rotación óptica para determinar la estereoquímica del enantiómero más abundante.⁹

VII.5. Síntesis de poliamidoaminas lineales catalizada por lipasas

VII.5.1. Condiciones modelo

Condiciones A

1 ml (9 mmol) de acrilato de etilo se disolvieron en 1 ml de acetonitrilo. La solución resultante se enfrió en un baño de agua-hielo y luego se agregó 1 ml (9 mmol) de *N*-metil-1,3-diaminopropano a la solución anterior muy lentamente. A la solución resultante se le agregó 1 g de Novozym 435[®] y se dejó proceder la reacción a 33° C y 200 rpm por 24 horas. La reacción se detuvo filtrando la enzima, que luego fue lavada con acetonitrilo (2x3 ml). Las fracciones de lavado se juntaron con el sobrenadante y se evaporó el solvente.

Condiciones B

0,1 ml (0,9 mmol) de acrilato de etilo se disolvieron en 7,5 ml de éter diisopropílico. Se agregó luego 0,1 ml (0,9 mmol) de *N*-metil-1,3-diaminopropano a la solución anterior lentamente. A la solución resultante se le agregaron 100 mg de Novozym 435[®] y se dejó proceder la reacción a 33° C y 200 rpm por 24 horas. La reacción se detuvo descartando el sobrenadante y filtrando la enzima, que luego fue lavada con una mezcla de etanol:cloroformo 1:2 (2x3 ml). Las fracciones de lavado se juntaron y se evaporó el solvente. Líquido viscoso anaranjado (85 mg; 60% de rendimiento). pH (solución acuosa 1%): 9,5. Peso equivalente: 142 g. IR (film, cm⁻¹): 3278, 3084, 2949, 2850, 1647, 1560, 1466, 1389, 1311, 1261, 1240, 1188, 1132, 1049, 770, 754. RMN ¹H (200,13 MHz; D₂O): δ 1,2 (t, J=6,9 Hz); 1,6 (m); 2,2 (s); 2,3 (m); 2,4 (m); 2,6 (m); 3,2 (m); 3,6 (c, J=6,9 Hz). RMN ¹³C (50,2 MHz; D₂O): δ 26,8; 33,5; 37,2; 41,4; 53,7; 54,7; 172,5.

VII.5.2. Optimización de las condiciones experimentales para la obtención de VI-1

Procedimiento estándar

Se disolvió acrilato de etilo (0,09-1,8 mmol) en el solvente indicado (7,5 ml). Se agregó luego *N*-metil-1,3-diaminopropano (0,09-0,9 mmol) a la solución anterior lentamente. A la solución resultante se le agregó el biocatalizador adecuado (10-1000 mg) y se dejó proceder la reacción a la temperatura indicada (33-55° C) y 200 rpm por un período adecuado de tiempo. Una vez concluido este plazo se procedió según indica en las *Condiciones B* de la Sección VII.5.1.

Estudio del efecto de la concentración: dilución 1:100

Se disolvió acrilato de etilo (0,09 mmol) en éter diisopropílico (75 ml). Se agregó luego *N*-metil-1,3-diaminopropano (0,09 mmol) a la solución anterior lentamente. A la solución resultante se le agregó CAL B (10 mg) y se dejó proceder la reacción a 33° C y 200 rpm por 24 h. Una vez concluido este plazo se separó el sobrenadante, se lavó la enzima con una mezcla de etanol:cloroformo 1:2 (2x3 ml). Las fracciones de lavado se juntaron con el sobrenadante y se evaporó el solvente.

VII.5.3. Obtención de *N*-[3-(metilamino)propil]acrilamida (VI-2)

Se disolvió acrilato de etilo (0,9 mmol) en éter diisopropílico (75 ml). Se agregó luego *N*-metil-1,3-diaminopropano (0,9 mmol) a la solución anterior lentamente. A la solución resultante se le agregó CAL B (10 mg) y se dejó proceder la reacción a 33° C y 200 rpm por 24 h. Una vez concluido este plazo se filtró la enzima y se lavó la misma con éter diisopropílico (2x5 ml). Las fracciones de lavado se combinaron con el sobrenadante y se evaporó el solvente. El producto se purificó por cromatografía en columna (acetona; 0,1% trietilamina). Líquido viscoso amarillento (68 mg; 53% de rendimiento). IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3446, 3278, 3005, 2951, 2858, 2804, 1664, 1522, 1465, 1435, 1365, 1232, 1157, 1065, 978, 962, 607, 530. RMN ¹H (200,13 MHz; CDCl₃): δ 1,71 (2H, m, J=6,2

Hz); 2,42 (3H, s); 2,70 (2H, t, J=6,2 Hz); 3,43 (2H, m, J=6,2 Hz); 5,60 (1H, dd, J=9,9; 1,8 Hz); 6,06 (1H, dd, J=16,8; 9,9 Hz); 6,24 (1H, dd, J=16,8; 1,8 Hz). RMN ^{13}C (50,2 MHz; CDCl_3): δ 28,3; 35,4; 37,3; 48,7; 126,0; 130,4; 172,3. Análisis elemental calculado para $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$: C 59,12%; H 9,92%; N 19,70%. Encontrado: C 58,56%; H 9,89%; N 19,02%.

VII.5.4. Seguimiento de la reacción por FT-IR

0,1 ml (0,9 mmol) de acrilato de etilo se disolvieron en 7,5 ml de éter diisopropílico. Se agregó luego 0,1 ml (0,9 mmol) de *N*-metil-1,3-diaminopropano a la solución anterior lentamente. A la solución resultante se le agregaron 100 mg de Chirazyme[®] L-2, c-f, C3, lyo y se dejó proceder la reacción a 33° C y 200 rpm. A distintos tiempos se extrajeron alícuotas del sobrenadante que fueron analizadas por FT-IR empleando una celda para película líquida (ventanas de KBr, espesor de película 0,2 mm).

Bibliografía

1. Hill, R. A.; Kirk, D. N.; Makin, H. L. J.; Murphy, G. M. *Dictionary of Steroids*; Chapman and Hall: Cambridge, 1991; p 735.
2. Baldessari, A.; Mangone, C. P.; Gros, E. G. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2001**, *11*, 335-341.
3. Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A. *Structure*, **1994**, *2*, 293-308.
4. Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. D. *Chem. Phys. Lipids*, **1998**, *93*, 67-80.
5. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *J. Mol. Graphics*, **1996**, *14*, 33-36.
6. Bruno, M.; Herz, W. *Phytochemistry*, **1988**, *27*, 1873-1875.
7. J. Jakupovic, J.; Jia, Y.; Pathak, V. P.; Bohlmann, F.; King, R. M. *Planta Med.*, **1986**, *52*, 399-401.
8. Rustaiyan, A.; Niknejad, A.; Aynehchi, Y. *Planta Med.*, **1984**, *50*, 185-186.
9. (a) Boutoute, P.; Mousset, G.; Veschambre, H. *New J. Chem.*, **1998**, 247-251.
(b) Besse, P.; Bolte, J.; Fauve, A.; Veschambre, H. *Bioorg. Chem.*, **1993**, *21*, 342-353.
(c) Hummel, W.; Boermann, F.; Kula, M.-R. *Biocatal. & Biotransf.*, **1989**, *2*, 293-308.
10. Svennebring, A.; Garg, N.; Nilsson, P.; Hallberg, A.; Larhed, M. *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 4720-4725.

CAPÍTULO VIII

Conclusiones finales

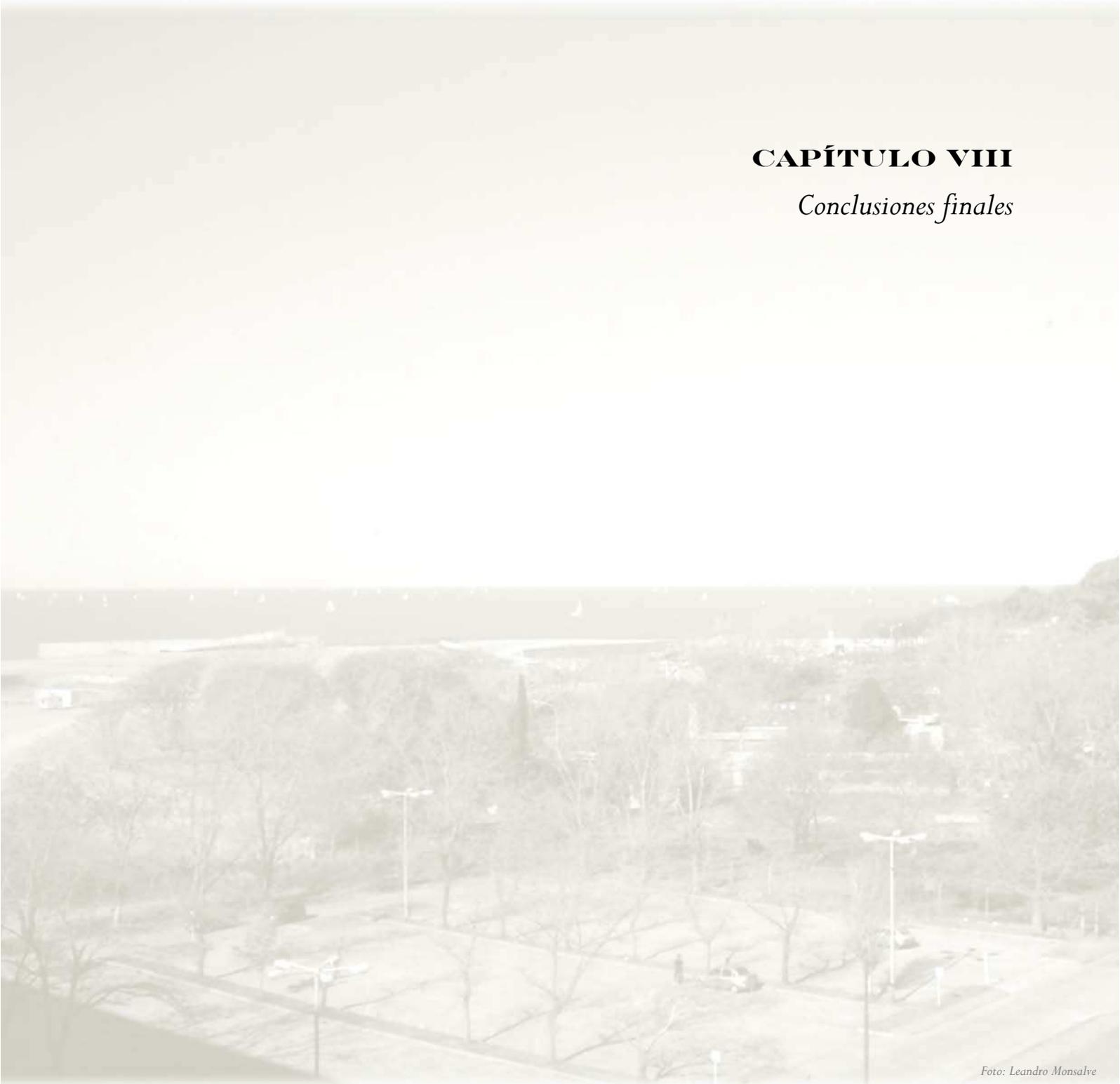


Foto: Leandro Monsalve

VIII. CONCLUSIONES FINALES

En el desarrollo de la presente tesis se aplicaron procesos biocatalíticos en reacciones y síntesis de compuestos orgánicos de muy diversa naturaleza. Se emplearon sustratos muy variados: naturales (esteroides y terpenoides) y sintéticos (dicetonas, acrilatos y diaminas). Los resultados alcanzados en todos ellos muestran la gran versatilidad que presentan los biocatalizadores en síntesis orgánica.

El trabajo comienza con una introducción, en donde se detallan antecedentes relevantes vinculados a la aplicación de enzimas aisladas y células enteras en transformaciones de compuestos orgánicos. La biocatálisis tiene una historia que se remonta hacia el origen de las civilizaciones más antiguas. Esta disciplina se ha ido desarrollando acompañando el progreso de la humanidad hasta el presente, por lo que aún hoy sigue mostrando nuevas posibilidades y aplicaciones.

En el **Capítulo II** se relatan los objetivos específicos a alcanzar. Éstos fueron concebidos teniendo en cuenta la experiencia previa adquirida en temas relacionados dentro y fuera de nuestro laboratorio.

En los cuatro capítulos siguientes se presentan los resultados vinculados al desarrollo experimental y se elabora una discusión sobre los mismos.

Comenzando con el **Capítulo III**, en éste se describe la aplicación de lipasas en reacciones de acilación de una serie de pregnanos hidroxilados en la posición 20 del esqueleto esteroideal. Las lipasas mostraron varias características sobresalientes al emplearse en estas reacciones:

- Regio- y estereoselectividad. Por variación de la fuente del biocatalizador fue posible controlar la regioselectividad para la acetilación en posición 3 o 20 de 3,20-dihidroxi-pregn-5-eno, según se empleara lipasa de *Pseudomonas cepacia* (acetilación en 3) o lipasa fúngica (acetilación en 20). Por otro lado, tanto la acetilación como la succinilación en la posición 20 ocurrió siempre sobre aquellos sustratos cuyo hidroxilo se encontraba en configuración β , ilustrando el comportamiento estereoselectivo del proceso.
- Necesidad de empleo de ésteres para las reacciones de succinilación. La preparación enzimática de esteroides succinilados requirió la utilización de ésteres

de ácido succínico como agentes acilantes, no siendo efectiva con otros agentes acilantes como el ácido acuccínico o el anhídrido succínico.

- Estabilidad térmica. El empleo de temperaturas de reacción de alrededor de 100° C permitió incrementar notablemente los rendimientos de succinilación y reducir ostensiblemente el tiempo de reacción. CAL B se mostró estable en estas condiciones y pudo reutilizarse para catalizar eficientemente hasta cuatro lotes de reacción.

Además del 3,20-dihidroxipregn-5-eno, se evaluaron como sustratos diversos 20-hidroxipregnanos con algunas diferencias estructurales y se encontró que la estereoquímica del carbono 20 era fundamental para que la reacción tuviera lugar. Por otro lado, se pudo correlacionar el rendimiento alcanzado con la identidad del sustituyente en la posición 3. Estas características pudieron ser racionalizadas mediante experimentos de *docking* que permitieron justificar las observaciones desde un punto de vista estrictamente molecular. La succinilación biocatalítica permitió la obtención de nueve derivados esteroidales novedosos.

Finalmente, se estudió la aplicación de la succinilación de estos esteroides en la síntesis de 20 β -hemisucciniloxi-5 α H-pregnan-3-ona, un intermediario clave en la síntesis de conjugados esteroide-proteína. Se evaluaron dos alternativas: una succinilación con succinato de dietilo hacia el final de la síntesis o una succinilación con succinato de dibencilo en una etapa más temprana de la misma. Esta última aproximación tenía como objetivo ahorrar pasos de síntesis para la funcionalización del esteroide sobre el anillo A. Sin embargo, los bajos rendimientos alcanzados hicieron preferible la succinilación enzimática hacia el final de la síntesis. El rendimiento obtenido en la succinilación fue aproximadamente de 80%, mucho mayor al logrado previamente por métodos químicos tradicionales (alrededor de 10%). Además, el agente acilante pudo ser preparado en el mismo medio en el cual se produce la succinilación del esteroide. De este modo, en presencia del biocatalizador la reacción requiere de reactivos sencillos como ácido succínico y etanol. Teniendo en cuenta que el biocatalizador puede ser reutilizado es posible notar que la reacción resulta muy sencilla y económica.

En el **Capítulo IV** se muestra la utilización de lipasas en la obtención de derivados acilados de sesquiterpenos usando como sustrato la quinicina. En este caso, las condiciones

suaves de reacción constituyeron la principal característica y ventaja del uso de este biocatalizador. Este sustrato posee funciones altamente reactivas en su esqueleto, sensibles a la presencia de ácidos y bases, y térmicamente lábiles, con lo que su acilación química no es sencilla.

Las reacciones de acilación enzimática mostraron una marcada regioselectividad sobre el hidroxilo 4' de la quimicina. La aplicación de una metodología quimioenzimática permitió la obtención de derivados acilados en otras posiciones, aprovechando que las reacciones de alcoholisis enzimática mostraron la misma selectividad.

Por último, las propiedades que posee la quimicina con respecto a su actividad biológica hicieron interesante la preparación de sus derivados acilados con ácidos de cadena media y larga. Estos bioconjugados pudieron ser preparados empleando una metodología enzimática con buenos rendimientos (alrededor de 70%) y ofrecen una alternativa para la obtención de derivados de quimicina potencialmente más efectivos en su actividad biológica. En este caso, a diferencia de lo discutido sobre la acilación de esteroides, fue clave la posibilidad de emplear temperaturas de acilación menores a la temperatura ambiente y así minimizar el impacto de reacciones inducidas térmicamente que alteren el esqueleto del sustrato. Este hecho reviste especial importancia, dado que no se han encontrado antecedentes sobre el empleo de bajas temperaturas en reacciones de acilación catalizadas por lipasas. La utilización de lipasas en este caso permitió la preparación de diez derivados sesquiterpénicos acilados, siete de ellos novedosos.

En el **Capítulo V** se estudia el empleo de células enteras de *Rhodotorula minuta* en la reducción asimétrica de dicetonas vecinales.

En primer lugar, se observó que en la reducción de 1,2-ciclohexanodiona se obtuvo solamente el producto de reducción de ambos carbonilos con una estereoselectividad moderada. Con el objeto de obtener el producto de la reducción selectiva de un solo carbonilo de la dicetona mencionada, se ensayó la utilización de enol ésteres de 1,2-ciclohexanodiona como sustratos para la misma reacción. Se observó que éstos no resultaron buenos sustratos para las reductasas del microorganismo, debiendo producirse la hidrólisis de los mismos con anterioridad a la reducción. Por otro lado, la presencia de sustituyentes metilo en las α -dicetonas cíclicas 3-metil-1,2-ciclohexanodiona y 3-metil-

1,2-ciclopentanodiona determinó que no pudiera realizarse la reducción de estos sustratos en las condiciones de estudio.

El desempeño de *Rhodotorula minuta* en la reducción de α -dicetonas acíclicas fue muy diferente, donde mostró una estereoselectividad mucho mayor, resultando adecuado para este tipo de sustratos. En este caso sí fue posible observar un comportamiento regioselectivo y obtener α -hidroxicetonas como productos.

En el **Capítulo VI** se describe la utilización de lipasas en la síntesis de poliamidoaminas lineales. La cualidad sobresaliente del biocatalizador para esta aplicación es su promiscuidad, ya que la lipasa cataliza dos reacciones muy diferentes para que el proceso tenga lugar: una aminólisis y una adición de Michael. La obtención de poliamidoaminas a partir de acrilato de etilo y *N*-metil-1,3-diaminopropano catalizada por lipasas constituye el primer ejemplo en el cual ambas reacciones tienen lugar en forma consecutiva y ambas también son esenciales para la formación del producto.

Deben destacarse en este sistema otras cualidades, además de la promiscuidad enzimática, que resultaron importantes para la obtención de este producto:

- Regioselectividad. La aminólisis y la reacción de Michael procedieron de tal modo que en la primera sólo reaccionaba el grupo amino primario, mientras que en la segunda sólo lo hacía el grupo amino secundario. Esto permitió la obtención de un producto de una gran regularidad estructural y un tipo de unidad repetitiva no obtenida hasta el momento empleando otras metodologías.
- Homogeneidad de peso molecular. Se observa que en presencia de la lipasa fue posible obtener valores de *PDI* sean cercanos a la unidad en todos los polímeros.
- Inmovilización. El soporte de la enzima tuvo un gran impacto en el rendimiento alcanzado. Un soporte hidrofóbico como el polipropileno logró minimizar la adhesión de producto al catalizador y maximizar el rendimiento.
- Concentración y medio de reacción. La concentración de los reactivos y la naturaleza del solvente resultaron fundamentales para la obtención del producto deseado. Se pudo demostrar, siguiendo la reacción por espectroscopia FT-IR, que la reacción de aminólisis se producía con anterioridad a la adición de Michael. Esto resulta clave para la selectividad observada en ambas reacciones. También se observó que la adición de Michael poseía una dependencia más marcada con la

concentración que la aminólisis. A mayor concentración de reactivos se obtuvieron principalmente aductos de Michael, mientras que a concentración menor fue posible aislar la acrilamida que constituye la unidad monomérica para la poliamidoamina.

La caracterización del polímero presentó un desafío, ya que existían dos posibilidades para cada grupo terminal del mismo. La combinación de la espectroscopia de RMN y FT-IR, y la espectrometría de masa UV-MALDI-TOF sirvió como herramienta para este fin.

Finalmente, se puede mencionar que este ejemplo constituye una novedad tanto en la aplicación de lipasas a la síntesis de polímeros como en la síntesis de poliamidoaminas. En cuanto a lo primero, es la primera vez que en una síntesis de polímeros catalizada por lipasas la reacción de polimerización es una adición de Michael. Con respecto a la síntesis de poliamidoaminas, el hecho de que CAL B pueda catalizar ambas reacciones de una manera selectiva permitió la realización de las mismas en una sola operación, obteniéndose una unidad repetitiva altamente regular y muy difícil de obtener por métodos no enzimáticos.

El presente trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

1. *An efficient enzymatic preparation of 20-pregnane succinates: chemoenzymatic synthesis of 20 β -hemisuccinyloxy-5 α H-pregnan-3-one*

Leandro N. Monsalve, Mayra Y. Machado Rada, Alberto A. Ghini, Alicia Baldessari.

Tetrahedron, **2008**, *64*, 1721-1730.

2. *Lipase-catalysed preparation of acyl derivatives of the Germacranolide cnicin*

Leandro N. Monsalve, Sergio Rosselli, Maurizio Bruno, Alicia Baldessari.

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2009**, 57, 40-47.

3. *Rhodotorula minuta mediated bioreduction of 1,2-diketones*

Leandro N. Monsalve, Patricia Cerrutti, Miguel A. Galvagno, Alicia Baldessari.

Biocatalysis & Biotransformation, enviado.