

Tesis Doctoral

Lipasas y células enteras de microorganismos como biocatalizadores en síntesis de derivados de esteroides y ácido 2-oxoglutámico

Quintana, Paula Gabriela

2012-09-28

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:

Quintana, Paula Gabriela. (2012-09-28). Lipasas y células enteras de microorganismos como biocatalizadores en síntesis de derivados de esteroides y ácido 2-oxoglutámico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Quintana, Paula Gabriela. "Lipasas y células enteras de microorganismos como biocatalizadores en síntesis de derivados de esteroides y ácido 2-oxoglutámico". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012-09-28.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO QUÍMICA BIOLÓGICA

**Lipasas y células enteras de microorganismos como biocatalizadores
en síntesis de derivados de esteroides y ácido 2-oxoglutárico**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Química Biológica

Bioquímica Paula Gabriela Quintana

Directora de Tesis: Dra. Alicia Baldessari

Consejera de Estudios: Dra. Silvia Moreno de Colonna

Lugar de Trabajo: UMYMFOR, Lab. 15, 3° piso, Departamento de Química Orgánica,
FCEN-UBA.

Buenos Aires, 2012

*A mi familia, amigos y a
mi fiel compañero*

Agradezco a las siguientes personas e Instituciones, cuya ayuda fue fundamental para la realización de este trabajo:

A mi Directora de Tesis: Alicia Baldessari, por su enseñanza, dedicación y afecto.

A mi Consejera de Estudios: Silvia Moreno de Colonna.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, a la Universidad de Buenos Aires y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el financiamiento de este trabajo.

A UMYMFOR (CONICET – FCEyN) por las determinaciones instrumentales realizadas y a su director, Dr. Gerardo Burton.

A todo el personal de UMYMFOR, en especial a Meri por su ayuda y amistad, Jorge, Gabriel, Gernot y José.

A mis amigas que estuvieron de manera incondicional y hasta altas horas de la noche ayudándome: Stellita, Luchi, Vale, Pupe y Poli (gracias!).

A Virginia (por la impresión y cariño).

A mis amigas de siempre que son mi familia: Naty, Lu y Marina por el cariño de siempre.

A mis amigos y compañeros en general por estar en cada momento y en diferentes situaciones:

Eduardo, Santi, Ale y Gonzalo.

Nil y Bety (por el cariño y los mates)

Coty, Andre, Gaby y Graciela V.

Marce R., Gus y Victor.

Graciela L., Gaby N., Gaby G., Lali, Marce A., Naty, Caro y Pilar.

Adri y Juampi.

Juli, Marian, Lucía, Ore, Gastón, Lau, Tamara, Malena y Alicia.

Maru, Fer, Belén, Javi, Lore, Javier y Andrea.

Vicky, Mati, Bren, Ale, Irene y Adri.

Vicky, Vir, Fer, Pablo, Mario, Alberto y Rosana.

Lala, Mica, Ruby y Rosa

A la gente del Departamento de Orgánica por su buen trato y amabilidad.

Agradezco especialmente a mi familia porque sin ellos nada de lo que soy sería posible y a Corbatita.

LIPASAS Y CÉLULAS ENTERAS DE MICROORGANISMOS COMO BIOCATALIZADORES EN SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ESTEROIDES Y ÁCIDO 2-OXOGLUTÁRICO

Paula G. Quintana

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires, 2012

Resumen:

En el presente trabajo se estudió la aplicación de enzimas aisladas y células enteras de microorganismos en la síntesis y transformación de compuestos orgánicos.

Se estudió la actividad de lipasas comerciales y una proveniente de un agro-residuo, en la síntesis de ésteres de ácido 2-oxoglutarico. Los resultados obtenidos permitieron no sólo la preparación de seis productos novedosos sino también otorgarle un valor y utilidad a un agro-residuo ampliamente disponible.

La aplicación de lipasas en la reacción de acilación de hidrocortisona y en la desacetilación de su derivado peracetilado, permitió la preparación de nueve derivados, ocho de los cuales resultaron novedosos.

Además se estudió una lipasa heteróloga del hongo *Rhizopus oryzae* en la acetilación del esteroide cortexolona. Se evaluó el biocatalizador en su forma nativa e inmovilizado sobre diversos soportes. Se aplicó un modelo matemático con el objetivo de lograr una mejor optimización de los parámetros de reacción.

Finalmente se describió la aplicación de células enteras de diferentes cepas fúngicas del Orden Mucorales en la biotransformación de la drospirenona, progestina de origen sintético usada en terapia hormonal combinada. A través de la biotransformación se obtuvieron cuatro productos, tres de ellos novedosos y uno mayoritario.

Palabras clave: Biocatálisis, lipasas, hongos, diácidos, esteroides.

LIPASES AND MICROORGANISM WHOLE CELLS AS BIOCATALYSTS IN SYNTHESIS OF STEROIDS AND 2-OXO-GLUTARIC ACID DERIVATIVES

Paula G. Quintana

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires, 2012

Abstract:

In this work, the application of lipases and microorganism whole cells in the synthesis and transformation of organic compounds is described.

The activity of commercial lipases and a non-commercial one, obtained from agrowastes, in the synthesis of 2-oxoglutaric esters was studied. The obtained results allowed the preparation of six novel compounds and the possibility of increasing the value of a widely available agrowaste.

The application of lipases in the acylation reaction of hydrocortisone and the desacetylation of its peracetylated derivative allowed us preparing nine derivatives, eight of them novel compounds.

Moreover, the study of a heterologous lipase from the fungus *Rhizopus oryzae* in the acetylation of the steroid cortexolone was carried out. The biocatalyst was evaluated in the native form and immobilized on several supports. With the aim of achieving an optimization in the reaction parameters, a mathematical model was applied.

Finally, the use of whole cells of various fungi strains belonging to the Order Mucorales in the biotransformation of drospirenone, a synthetic progestin used in combined hormone therapy, was studied. The biotransformation afforded four compounds, three of them not reported previously in literature and one as a major constituent.

Keywords: Biocatalysis, lipases, fungi, diacids, steroids.

Contenido

I. INTRODUCCIÓN

<i>I.1. Catálisis, Biocatálisis y Biotransformaciones.....</i>	<i>1</i>
<i> I.1.1. Catálisis.....</i>	<i>1</i>
<i> I.1.2. Biocatálisis y Biotransformaciones.....</i>	<i>2</i>
<i> I.1.3. Historia de la relación entre la Química, la Biología y la Biocatálisis.....</i>	<i>3</i>
<i> I.1.4. Biocatalizadores en medios no convencionales.....</i>	<i>5</i>
<i> I.1.4.1. Actividad catalítica.....</i>	<i>5</i>
<i> I.1.4.2. Selectividad.....</i>	<i>7</i>
<i>I.2. Enzimas aisladas.....</i>	<i>10</i>
<i> I.2.1. Hidrolasas.....</i>	<i>10</i>
<i> I.2.1.1. Lipasas.....</i>	<i>12</i>
<i> I.2.2.1. Función.....</i>	<i>12</i>
<i> I.2.1.2. Estructura.....</i>	<i>13</i>
<i> I.2.1.3. Mecanismo de acción.....</i>	<i>14</i>
<i> I.2.1.4. Fuentes naturales.....</i>	<i>15</i>
<i> I.2.1.5. Reacciones catalizadas por lipasas.....</i>	<i>16</i>
<i> I.2.1.6. Selectividad de las lipasas.....</i>	<i>17</i>
<i> I.2.1.6.1. Quimioselectividad de las lipasas.....</i>	<i>17</i>
<i> I.2.1.6.2. Regioselectividad de las lipasas.....</i>	<i>18</i>
<i> I.2.1.6.3. Estereoselectividad de las lipasas.....</i>	<i>18</i>
<i> I.2.1.7. Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas.....</i>	<i>20</i>
<i>I.3. Células enteras.....</i>	<i>20</i>
<i> I.3.1. Aplicaciones biotecnológicas de células enteras.....</i>	<i>21</i>
<i>I.4. Inmovilización de un biocatalizador.....</i>	<i>22</i>
<i>Conclusión.....</i>	<i>23</i>
<i>Bibliografía.....</i>	<i>25</i>

II. OBJETIVOS

<i>II.1. Síntesis de ésteres de cadena media y larga de ácido 2-oxoglutarico catalizada por lipasas.....</i>	<i>28</i>
<i>II.2. Síntesis enzimática de derivados acilados de hidrocortisona.....</i>	<i>28</i>

II.3. Reacción de acetilación de cortexolona catalizada por una lipasa heteróloga de <i>Rhizopus oryzae</i> inmovilizada.....	29
II.4. Biotransformación de una progestina sintética por microorganismos de diversos géneros fúngicos.....	30
Bibliografía.....	31

III. SÍNTESIS DE ÉSTERES DE ÁCIDO 2-OXOGLUTÁRICO DE CADENA MEDIA Y LARGA CATALIZADA POR LIPASAS

III.1. Introducción.....	32
III.2. Esterificación de ácido 2-oxoglutarico.....	35
III.2.1. Obtención de la lipasa de <i>Carica papaya</i> (CPL).....	36
III.2.2. Optimización de los parámetros de reacción.....	36
III.2.2.1. Fuente enzimática y solvente.....	37
III.2.2.2. Efecto de la temperatura y tiempo de reacción.....	38
III.2.2.3. Efecto de la longitud de cadena del alcohol.....	39
III.2.2.4. Efecto de la relación alcohol/ácido (alcohol/sustrato).....	40
III.2.2.5. Efecto de la relación Enzima/Sustrato (E/S).....	41
Condiciones óptimas de reacción.....	42
III.3. Síntesis de ésteres de ácido 2-oxoglutarico.....	42
Conclusiones.....	44
Bibliografía.....	47

IV. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE DERIVADOS ACILADOS DE HIDROCORTISONA

IV.1. Introducción.....	49
IV.2. Acilación de hidrocortisona.....	54
IV.2.1. Optimización de las variables experimentales.....	54
IV.2.1.1. Selección de enzima y solvente.....	54
IV.2.1.2. Efecto del tiempo de reacción.....	58
IV.2.1.3. Influencia de la temperatura.....	59
IV.2.1.4. Efecto de la relación Enzima/Sustrato (E/S).....	59
IV.2.1.5. Efecto de la relación Agente acilante/Sustrato (A/S).....	60
IV.2.1.5. Efecto de la naturaleza del agente acilante y procedimiento “one- pot”.....	61
IV.2.1.6. Síntesis de monoésteres de hidrocortisona de longitud de cadena variable.....	61
IV.2.1.7. Condiciones óptimas.....	63
IV.3. Alcohólisis de hidrocortisona peracetilada.....	64
IV.3.1. Reacción de peracetilación de hidrocortisona.....	64
IV.3.2. Reacción de alcohólisis enzimática del derivado peracetilado IV-11.....	66
IV.3.3. Condiciones óptimas de la reacción de alcohólisis enzimática.....	68

Conclusión.....	69
Bibliografía.....	72

V. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE UNA LIPASA HETERÓLOGA EN SISTEMAS ESTEROIDALES: ACETILACIÓN DE CORTEXOLONA

V.1. Introducción.....	74
V.2. Obtención de la lipasa heteróloga de <i>Rhizopus oryzae</i>	77
V.3. Inmovilización de la lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i>	79
V.3.1. Ingeniería Conformacional aplicada a lipasas	79
V.3.2. Inmovilización de la lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> en diferentes soportes.....	80
V.3.2.1. Adsorción hidrofóbica.....	82
V.3.2.2. Adsorción hidrofóbica más adsorción iónica.....	82
V.3.2.3. Inmovilización covalente multipuntual.....	83
V.4. Reacción de acetilación de cortexolona catalizada por la lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i>	84
V.4.1. Optimización de los parámetros de reacción. Estudio experimental.....	85
V.4.1.1. Elección del soporte de inmovilización de la lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> , solvente de reacción y agente acilante.....	85
V.4.1.2. Efecto de la temperatura.....	88
V.4.1.3. Efecto del tiempo de reacción.....	88
V.4.1.4. Efecto de las relaciones: Agente acilante/Sustrato y Enzima/Sustrato.....	89
V.4.1.5. Optimización parcial de los parámetros de reacción.....	91
V.4.2. Optimización de los parámetros de reacción. Modelo matemático.....	92
V.4.2.1. Diseño Experimental.....	92
V.4.2.2. Resultados de los experimentos correspondientes al DCCR.....	95
V.5. Reutilización de la enzima.....	97
Conclusión.....	98
Bibliografía.....	101

VI. APLICACIÓN DE HONGOS MUCORALES EN LA BIOTRANSFORMACIÓN DE PROGESTINAS SINTÉTICAS: DROSPIRENONA

VI.1. Introducción.....	104
VI.2. Cepas fúngicas pertenecientes al Orden Mucorales.....	110
VI.3. Metodologías evaluadas en la modificación de drospirenona y resultados preliminares.....	113
VI.4. Análisis de los productos obtenidos.....	117
VI.5. Estudio de los parámetros de Biotransformación de drospirenona.....	122
VI.5.1. Efecto del tamaño del inóculo (concentración de esporas).....	122
VI.5.2. Tiempo de reacción.....	124
VI.5.3. Velocidad de agitación.....	125

VI.5.4. Efectos del pH del medio de cultivo.....	126
VI.5.5. Efecto de la temperatura.....	127
VI.5.6. Efecto del agregado de disolvente.....	128
VI.5.7. Concentración de sustrato.....	129
VI.6. Rendimiento de Biotransformación: cepas fúngicas efectivas.....	129
Conclusión.....	131
Bibliografía.....	133

VII. PARTE EXPERIMENTAL

VII.1. Generalidades.....	136
VII.1.1. Solventes y reactivos.....	136
VII.1.2. Biocatalizadores.....	136
VII.1.3. Reactores.....	141
VII.1.4. Separaciones.....	142
VII.1.5. Parte analítica.....	142
VII.2. Síntesis de ésteres de ácido 2-oxoglutárico de cadena media y larga catalizada por lipasas.....	144
VII.3. Síntesis enzimática de derivados acilados de hidrocortisona.....	148
VII.4. Estudio de la actividad de una lipasa heteróloga en sistemas esteroideos: acetilación de cortexolona.....	156
VII.4.1. Síntesis de 21-Acetato de 17 α -hidroxipregn-4-en-3,20-diona (21-acetato de cortexolona) (V-2).....	156
VII.5. Biotransformación de drospirenona empleando cepas fúngicas del Orden Mucorales.....	157
VII.5.1. Procedimiento general para la preparación del inóculo.....	157
VII.5.2. Análisis de los productos de biotransformación de drospirenona.....	157
VII.3. Aislamiento de los productos de Biotransformación.....	158
VIII. Conclusiones finales.....	162

Capítulo I

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Catálisis, Biocatálisis y Biotransformaciones

I.1.1. Catálisis

Desde hace mucho tiempo se conoce la importancia de la catálisis en relación a los procesos biológicos, siendo ésta de suma importancia para cualquier sistema vivo. La catálisis permite que las reacciones termodinámicamente favorables ocurran de manera rápida y compatible con la vida. En este tipo de reacciones interviene una sustancia que recibe el nombre de catalizador positivo, que es el encargado de acelerar dicha reacción por medio de una estabilización del estado de transición con respecto al estado fundamental, y es recuperado al final del proceso que catalizó en las mismas condiciones en que fue introducido. Cabe destacar que la catálisis no sólo tiene su aplicación centrada en los organismos vivos sino también resulta de gran interés en diversos ámbitos industriales.

Según la naturaleza del catalizador la catálisis se puede clasificar en:

- Quimiocatálisis: donde el catalizador es un compuesto químico y
- Biocatálisis: en este caso el catalizador puede ser una enzima o un complejo celular.

Debido a que los reactantes y el/los catalizadores presentes en la reacción pueden existir en diferentes fases, es necesario realizar una clasificación de acuerdo al tipo de catálisis que se lleva a cabo en dicho sistema. De acuerdo a la bibliografía,¹ la catálisis puede ser clasificada en:

- ✓ Catálisis homogénea: en este tipo de catálisis el catalizador y los reactantes se encuentran en la misma fase, la cual generalmente es líquida o gaseosa
- ✓ Catálisis heterogénea: en este caso los reactantes y el catalizador se encuentran en diferentes fases separados por una interfase

Ambos tipos de catálisis: Químico- y Biocatálisis pueden llevarse a cabo tanto de manera homogénea como heterogénea, como se puede apreciar en la Figura I.1

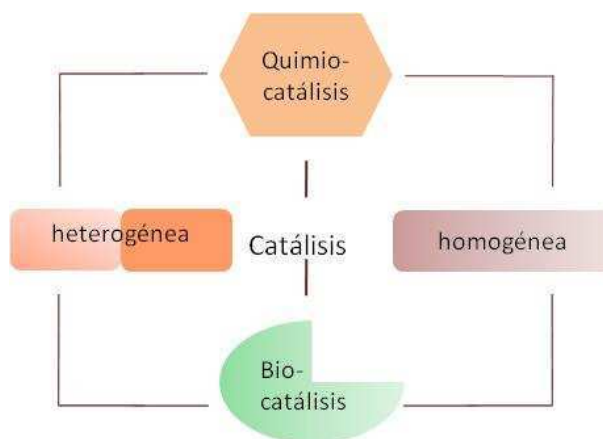


Figura I.1. Clasificación general de catálisis según el tipo de catalizador y las fases del sistema

1.1.2. Biocatálisis y Biotransformaciones

Se define Biocatálisis como la disciplina en la cual se utilizan enzimas aisladas o células enteras, que reciben el nombre de biocatalizadores, para la transformación química de compuestos orgánicos.² El o los compuestos que son transformados reciben el nombre de sustratos.

Las enzimas son proteínas producidas por organismos vivos capaces de catalizar procesos bioquímicos necesarios para todos los procesos de vida de dichos organismos. Permiten aumentar las velocidades de reacción en condiciones suaves, dentro de determinados rangos de pH y temperatura, pudiendo continuar su función *in vitro*, aún en condiciones que no son las adecuadas para su funcionamiento óptimo.

Debe aclararse que los sustratos empleados en una transformación biocatalítica no necesariamente son aquellos que son utilizados por la enzima en las reacciones metabólicas del organismo del cual proviene la misma.³

La Biocatálisis ofrece numerosas ventajas en relación con la catálisis química convencional:

- Alta selectividad en su reacción con el sustrato
- Condiciones suaves de reacción
- Aplicación en un amplio espectro de reacciones
- Bajos requerimientos energéticos
- Baja presencia o ausencia de productos secundarios
- Menor número de pasos de reacción
- Compatible con el medioambiente

Si bien las enzimas presentan numerosas ventajas con respecto a los catalizadores químicos existen desventajas asociadas a su utilización: las reacciones con compuestos que no son los sustratos naturales de la enzima usualmente son más lentas, altas concentraciones de sustratos pueden afectar la estabilidad de la enzima y los solventes orgánicos o sistemas bifásicos (medio orgánico/acuoso) pueden inactivarlas. Sin embargo estas desventajas pueden ser superadas mediante técnicas de inmovilización, ingeniería de solvente, ingeniería de proteínas, etc.

El uso de microorganismos vivos capaces de producir transformaciones sobre sustratos químicos recibe el nombre de Biotransformación. Debe aclararse que los términos Biocatálisis y Biotransformación no son equivalentes dado que en la Biotransformación no se considera el uso de enzimas aisladas.

La Biocatálisis y la Biotransformación constituyen una alternativa verde a la síntesis química tradicional. En la actualidad se está haciendo mucho hincapié en lo que se conoce como “Química verde”. Ésta se define como el diseño, desarrollo y aplicación de productos y procesos químicos para reducir o eliminar el uso de sustancias nocivas para la salud del ser humano y el medio ambiente.

1.1.3. Historia de la relación entre la Química, la Biología y la Biocatálisis

La Química surge por la necesidad imperiosa de conocer el desarrollo del ser humano y de la naturaleza. La curiosidad innata del ser humano por el conocimiento de sí mismo y su

entorno, abrió las puertas hacia la creación y evolución de la Ciencia Química para lograr la comprensión y poder responder a sus incesantes preguntas.

La Ciencia Química surge en el siglo XVII, momento en el que la alquimia resultaba ser el motor de los primeros pasos hacia lo que un siglo más tarde, daría origen a la Química como ciencia experimental de la mano de Lavoisier. En esta etapa se desarrollaron métodos de medición que permitieron un mejor conocimiento de fenómenos como por ejemplo la combustión de la materia.

Luego de haberse comprendido los principios de la combustión, surgió otro debate entre los científicos de la época: el vitalismo y la necesidad de diferenciar a la materia en orgánica e inorgánica. El vitalismo asumía que la materia orgánica únicamente podía ser producida por seres vivos. Dicha teoría fue luego refutada por el químico alemán Friedrich Wöhler, quien descubrió de manera accidental la síntesis de urea a partir de cianato de amonio. Así quedó demostrado que la materia orgánica podía ser sintetizada a partir de reacciones químicas.

Por otra parte la Biología, al igual que la Química, se perfilaba como ciencia en la cual filósofos y científicos unificaban sus pensamientos con el fin de comprender cada vez mejor a los seres vivos. De esta manera los intereses de la Química, especialmente la Química Orgánica, como los de la Biología parecían tener el mismo objetivo.

Durante el siglo XIX, además de la comprensión del ser humano y su entorno surgió un gran interés sobre diversos procesos químicos, se descubrieron extractos celulares (“fermentos”), los cuales podían llevar a cabo reacciones orgánicas tales como la fermentación alcohólica y láctica. Con las investigaciones de Pasteur, junto con las de Cohn, Koch, Beijerinck y Winogradsky se comenzaron a estudiar los extractos celulares (microorganismos) capaces de generar los procesos fermentativos, de esta manera surge una nueva disciplina dentro de la Ciencia Biológica: la Microbiología. Dicha disciplina fue de gran utilidad tanto en la caracterización microbiológica de los microorganismos como así también en el desarrollo de técnicas para su cultivo y aislamiento.

Paralelamente a la Microbiología, comenzaba a surgir otra disciplina que aportaría nuevos conocimientos relacionadas a la fermentación: la Bioquímica. En 1833 Payen y Persoz aislaron por primera vez un precipitado obtenido al agregar etanol a un extracto acuoso de malta, el precipitado recibió el nombre de diastasa, la cual posteriormente se utilizaría en la obtención de glucosa a partir de almidón.

Durante este siglo, gracias a los conocimientos adquiridos en el campo de la Microbiología y la Bioquímica, se produjo un desarrollo y avance muy importante en la Biocatálisis.

Pasteur logró identificar a los microorganismos que realizaban la fermentación alcohólica y la láctica. Esto permitió realizar mejoras en los procesos de producción de bebidas alcohólicas. Otro gran logro fue la obtención de etanol y metanol a través de procesos fermentativos.

En el siglo XX se continuaron con los avances en área de la Biocatálisis. Se aislaron numerosas proteínas con actividades enzimáticas las cuales dieron origen a alternativas industriales para la obtención de productos químicos.⁴ Durante este siglo se implementó la Biocatálisis en el desarrollo de procesos fermentativos que permitieron la obtención de metabolitos primarios y secundarios, obteniéndose como resultado compuestos con actividad antimicrobiana, muy utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades humanas.

En la actualidad, el empleo de enzimas aisladas y microorganismos en numerosos procesos hace de la Biocatálisis una herramienta muy interesante y con grandes expectativas a futuro.

1.1.4. Biocatalizadores en medios no convencionales

1.1.4.1. Actividad catalítica

Como se mencionó anteriormente, tanto las enzimas aisladas como las células enteras reciben el nombre de biocatalizadores cuando se utilizan en transformaciones químicas implementando como estrategia la Biocatálisis.

Los biocatalizadores comúnmente desarrollan su actividad catalítica en medio acuoso, es decir su máximo potencial catalítico viene dado en condiciones de pH, fuerza iónica, temperatura y medio de reacción compatibles con el crecimiento de organismos vivos. Sin embargo Sym en 1936 observó que algunas enzimas que presentaban actividad hidrolítica eran capaces de sintetizar ésteres sencillos en medio orgánico. Posteriormente Klivanov y colaboradores, evaluaron los efectos del uso de solvente orgánico en la estabilidad y

selectividad de reacciones catalizadas por enzimas aisladas sobre una variedad de sustratos.⁵⁻⁷

Esta metodología empleada permitió demostrar que las enzimas eran capaces de aceptar diversos sustratos, muy diferentes a su sustrato biológico, para llevar a cabo su transformación y además permanecían estables en un medio con una polaridad muy diferente a su medio de reacción natural. Klibanov estableció, en un trabajo posterior, una hipótesis en donde postula que, en solventes orgánicos, las enzimas se rigidizan y se hacen menos lábiles a los agentes desnaturizantes, sin embargo necesitan de una cantidad mínima de agua (capa de hidratación) para poder actuar como catalizadores. Se puede citar el ejemplo de la estructura cristalina de rayos X (en forma de “cross-linked enzyme crystal”, CLEC) de la proteína subtilisina en acetonitrilo. La estructura de dicha proteína en el solvente orgánico es esencialmente idéntica a la estructura tridimensional de la proteína en agua (Figura I.2).

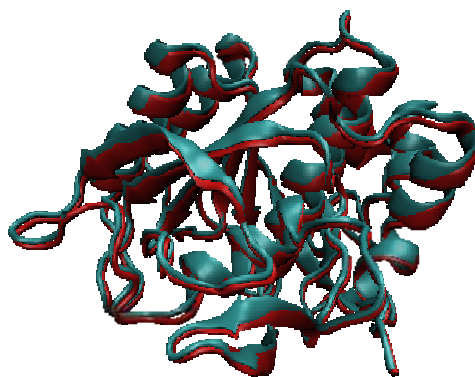


Figura I.2. Estructura cristalina de rayos X de la proteasa subtilisina Carlsberg (CLEC) en acetonitrilo anhidro (rojo) y en agua (gris). Se observa claramente una gran similitud en la estructura tridimensional. Las estructuras se generaron a través del programa VMD a partir de los archivos PDB correspondientes (1SCB la estructura visualizada en rojo y 1SCD la visualizada en gris) descritos por el grupo de Klibanov

Esta teoría luego fue confirmada por estudios de dinámica molecular llevados a cabo por el grupo de Pleiss.⁸⁻⁹

Las enzimas como catalizadores pueden emplearse de diferentes maneras en medio orgánico, es decir pueden agregarse en forma de polvo liofilizado, en forma líquida o inmovilizada en un soporte sólido. En general las enzimas inmovilizadas, efecto que también fue estudiado en su momento por Klibanov, muestran mayor actividad y estabilidad que en su forma libre. La inmovilización no solamente mejora las propiedades de las enzimas en medio orgánico sino también facilita su recuperación y posterior reutilización.

Por otra parte las células enteras son empleadas en solventes orgánicos pero en este tipo de solvente su estabilidad se encuentra más limitada, dado que presentan mayor complejidad que las enzimas aisladas. Se han desarrollado, al igual que con las enzimas aisladas, métodos de inmovilización de células con el objetivo de mejorar su estabilidad y facilitar su recuperación.¹⁰⁻¹¹

Actualmente se han utilizado de manera exitosa este tipo de catalizadores en síntesis orgánica. Estos reúnen las mismas características que los catalizadores químicos, ya que son verdaderos catalizadores:

- ✓ Su composición química no se ve modificada al final de la reacción
- ✓ Se requieren cantidades mínimas para transformar grandes cantidades de sustrato
- ✓ No afectan el estado final de equilibrio de la reacción

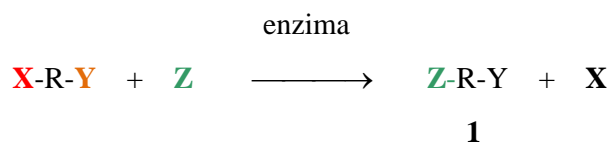
su preferencia con respecto a estos últimos está relacionada a las ventajas que estos ofrecen con respecto a los catalizadores químicos y que fueron mencionadas en la sección I.1.2.

I.1.4.2. Selectividad

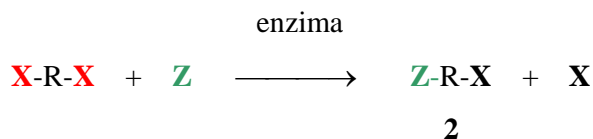
La selectividad es uno de los principales beneficios que ofrecen los biocatalizadores. En Biocatálisis el término *selectividad* se aplica a la capacidad que presenta el catalizador de transformar diferencialmente grupos funcionales iguales o distintos o con diferente disposición espacial en un sustrato dado, generando un producto mayoritario en una mezcla.

De acuerdo a las características que presente la selectividad de la reacción se conocen diferentes términos:¹²

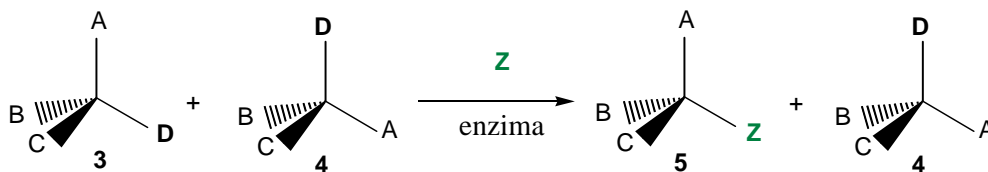
- Quimioselectividad: una enzima cataliza una reacción de manera quimioselectiva cuando, existiendo dos o más grupos funcionales que pueden reaccionar de igual manera con el reactivo, sólo reacciona uno de ellos. Por ejemplo, dado un sustrato con los grupos funcionales X e Y que pueden reaccionar con Z, en presencia de la enzima sólo se obtiene el producto **1** por reacción de Z con X.



- Regioselectividad: una enzima cataliza una reacción en forma *regioselectiva* cuando sólo reacciona uno de varios grupos funcionales iguales presentes en la molécula de sustrato. Por ejemplo en el caso de que el sustrato X-R-X reaccione con Z, en presencia de la enzima sólo reacciona uno de los grupos X con Z, obteniéndose **2**:



- Estereoselectividad: la enzima cataliza la reacción sólo de uno de los estereoisómeros de una mezcla de enantiómeros. Dada la mezcla de enantiómeros **3** y **4**, en presencia de la enzima sólo reacciona el estereoisómero **3** con Z para dar el producto **5** en tanto que **4** permanece inalterado:



Por ser proteínas, las enzimas son polímeros de aminoácidos. Estos generan un microentorno quiral con una serie de requerimientos estéricos y electrónicos que permite que solamente el sustrato con una geometría determinada, en este caso el estereoisómero **3**, penetre exclusivamente en el sitio activo de la enzima (Figura I.3.a) y luego reaccione con **Z**. Si la disposición espacial de los átomos en **4** no se ajusta a la que demanda el centro activo (Figura I.3.b) de la enzima, no es reconocido por ésta y por lo tanto no reaccionará.

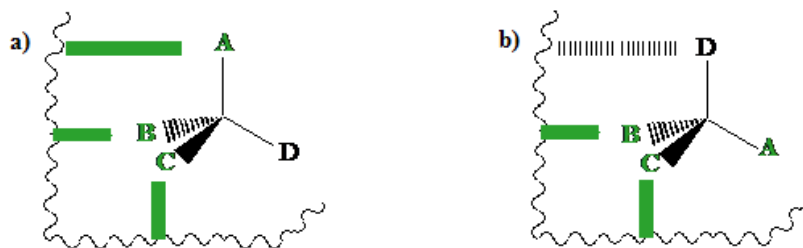


Figura I.3. Enantioselectividad de las reacciones enzimáticas

En la industria farmacéutica muchas veces se requiere la síntesis de compuestos enantioméricamente puros, dado que uno de los enantiómeros es el que presenta actividad farmacológica. Las rutas sintéticas para la obtención de compuestos de este tipo implican síntesis o resolución asimétrica. En una síntesis convencional se obtiene una mezcla de enantiómeros, mediante la implementación de las técnicas anteriormente mencionadas, la mezcla de reacción se enriquece en el enantiómero deseado. En este tipo de síntesis la forma enantiomérica del catalizador debe ser la adecuada. En el caso de los

biocatalizadores no existen formas enantioméricas de los mismos en la naturaleza, pero sí se encuentran biocatalizadores con sitios activos enantiocomplementarios, o sea sus sitios activos son imágenes especulares. Este tipo de biocatalizadores cataliza la misma reacción generando en cada caso el producto enantiomérico correspondiente.

Los biocatalizadores muestran a menudo comportamiento quimio-, regio- y estereoselectivo en las reacciones que catalizan. Si bien existen reglas que pueden describir el comportamiento del biocatalizador, como por ejemplo la regla de Prelog que describe la estereoselectividad de las deshidrogenasas en la reacción de reducción de compuestos carbonílicos, la selectividad de la reacción debe ser estudiada para cada sustrato en particular.

1.2. Enzimas aisladas

1.2.1. Hidrolasas

Las hidrolasas son un conjunto de enzimas que catalizan la ruptura de enlaces con participación del agua. De acuerdo a la clasificación “EC”, basada en el tipo de reacción que cataliza, realizada por la Comisión de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), las hidrolasas pertenecen a la clase 3, distinguiéndose distintos grupos en función del tipo de enlace que hidrolizan. Estos grupos a su vez pueden subdividirse generando números de EC de cuatro dígitos, donde 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. En la Tabla I.1 se muestra la clasificación de las hidrolasas más utilizadas en síntesis orgánica. El inconveniente que presenta esta clasificación es que todas las enzimas que catalizan la misma reacción, por ejemplo todas las lipasas están clasificadas como EC 3.1.1.3 a pesar de que hay más de cien descritas con estructuras diferentes, distintos orígenes, propiedades, etc.

Tabla I.1. Hidrolasas utilizadas en síntesis orgánica¹³

Número EC	Tipo de enlace que hidroliza	Ejemplos
3.1	Éster	
3.1.1	ésteres de ácidos carboxílicos	triacilglicerol lipasa, acetilcolina esterasa, fosfolipasa A ₁ , fosfolipasa A ₂ , gluconolactonasa, lipoproteín lipasa
3.1.3-4	mono- o diésteres fosfóricos	fosfolipasa C, fosfolipasa D
3.2	Glicosídico	
3.2.1	O-glicósidos	α amilasa, oligo-1,6-glucosidasa, lisozima, neuraminidasa, α -glucosidasa, β -galactosidasa, α -manosidasa
3.3	Éter	
3.3.2	Epóxidos	epóxido hidrolasa
3.4	Peptído	
3.4.11	Aminopetidasa	leucina aminopeptidasa
3.4.16.21	serina proteasa	subtilisina, quimiotripsina,
3.4.18.22	cisteína proteasa	Papaína
3.4.17.24	Metaloproteasa	Termolisina
3.5	Otras amidas	
3.5.1	amidias lineales	penicilina amidasa (penicilina G acilasa)
3.5.2	amidias cíclicas	Hidantoinasa
3.5.5	Nitrilos	Nitrilasa
3.8	Enlaces haluros	
3.8.1	enlace carbono-haluro	Haloalcano dehalogenasa

Existen diferentes características por las que las hidrolasas son de gran interés en Química Orgánica:

- ✓ Presentan amplia especificidad de sustrato, pudiendo inclusive actuar sobre intermediarios de síntesis
- ✓ Presentan gran quimio-, regio- y estereoselectividad
- ✓ Pueden llevar a cabo fácilmente reacciones inversas a las que catalizan en su entorno acuoso natural

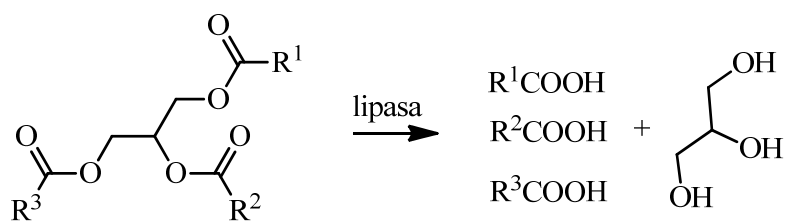
Además, es posible encontrar una amplia gama de hidrolasas comerciales, no requieren cofactores y son estables en la mayoría de los solventes orgánicos. En este medio, la mayoría de las hidrolasas son insolubles y esto permite que puedan separadas fácilmente del medio de reacción una vez terminada la misma y ser reutilizadas.

1.2.1.1. Lipasas

Dentro de la familia de las hidrolasas se encuentran las lipasas, las cuales son denominadas triacilglicerol acilhidrolasas (EC 3.1.1.3). Dado que fueron las enzimas empleadas para realizar gran parte de este trabajo de tesis doctoral, se comentarán sus características principales. En el presente trabajo se emplearon tanto enzimas comerciales, como enzimas heterólogas y obtenidas a partir de agro-residuos.

1.2.2.1. Función

La reacción natural de las lipasas es la hidrólisis de triglicéridos generando como productos mono-, diglicéridos, ácidos grasos y glicerol. En el Esquema I.1 se presentan los productos de hidrólisis total.



Esquema I.1. Hidrólisis total de un triglicérido catalizada por lipasas

Las lipasas no presentan casi actividad en medio acuoso si su sustrato natural se encuentra disuelto en estado monomérico. En cambio, cuando éste se encuentra a una concentración en el medio superior al límite de solubilidad formando una segunda fase lipofílica (dicha concentración recibe el nombre de concentración de agregación crítica, CAC), la lipasa aumenta su actividad. Esta activación normalmente se produce mediante un fenómeno de adsorción inicial sobre la fase lipídica/acuosa y la reacción se produce en la interfase. Cabe destacar que no todas las lipasas presentan este fenómeno de activación interfacial como es el caso de la de *Candida antarctica B*.¹⁴ Por lo tanto, en general las lipasas necesitan de una interfase acuosa/lipídica para llevar a cabo su actividad catalítica.

1.2.1.2. Estructura

Las lipasas pertenecen a la familia del plegamiento de las α/β hidrolasas, cuyo motivo generalmente consta de ocho láminas beta paralelas rodeadas de una secuencia específica de hélices alfa. En el centro del sitio activo presenta la tríada catalítica compuesta por los residuos serina, histidina y aspartato o glutamato.

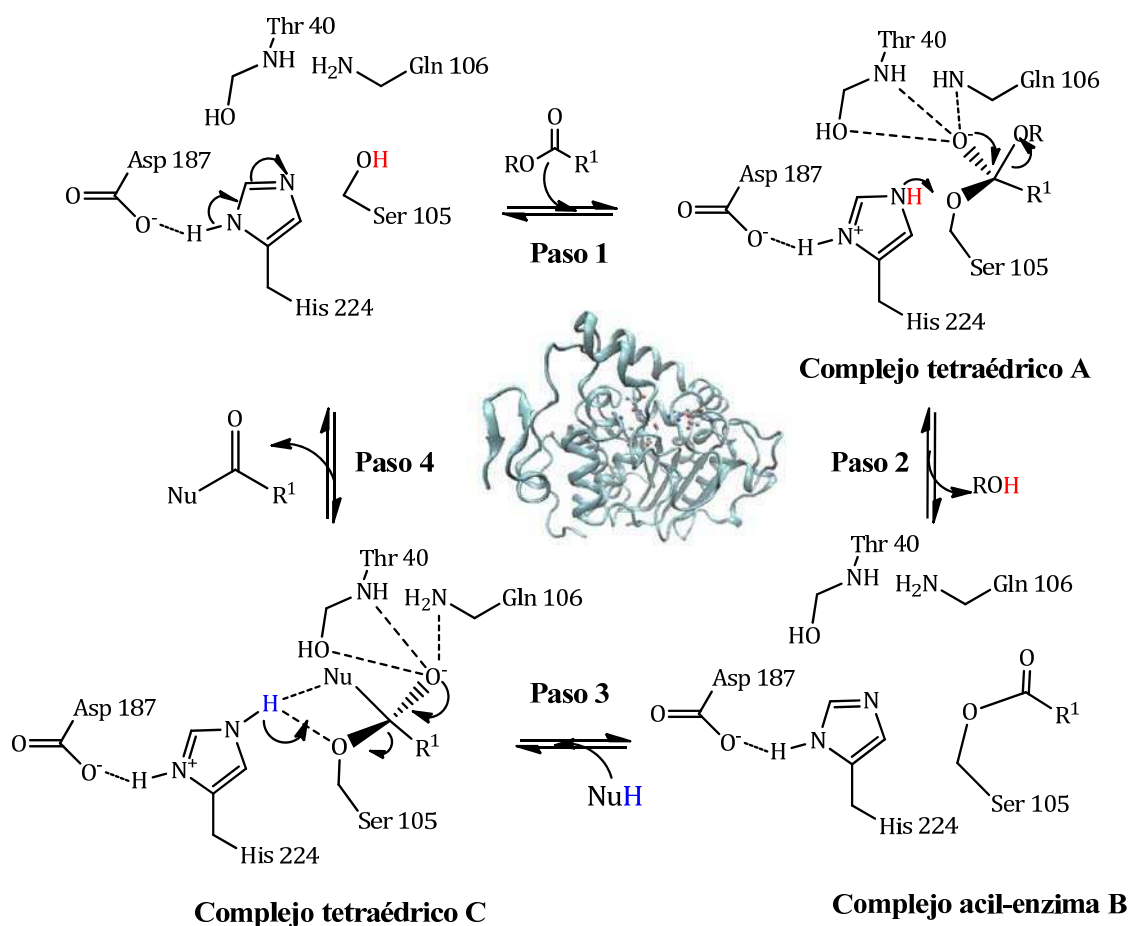
Hasta el momento todas las lipasas estudiadas presentan un alto grado de similitud estructural y funcional independientemente del organismo del que fueron aisladas aún con una baja homología de secuencia de aminoácidos.

1.2.1.3. Mecanismo de acción

Las lipasas catalizan la hidrólisis de lípidos por el mismo mecanismo que las serina proteasas.¹⁵ El sitio activo presenta un residuo de serina (Esquema I.2) que es activado por un residuo de histidina y aspartato, éstos hacen que el hidroxilo de la serina sea altamente nucleofílico. Los tres residuos serina, histidina y aspartato constituyen la tríada catalítica.

El mecanismo se puede explicar de la siguiente manera:

- Primer paso: el grupo acilo del éster es atacado por el oxígeno de la serina, que es nucleofílico gracias a los puentes de hidrógeno que forman la serina con la histidina y ésta con el aspartato. De esta manera se genera un intermediario tetraédrico (A) cuya carga negativa es estabilizada a través de puentes de hidrogeno por los residuos treonina y glutamina. Estos residuos se encuentran en lo que se conoce como el hueco oxianión
- Segundo paso: Eliminación del alcohol generándose así el complejo acil-enzima (B)
- Tercer paso: adición de un nucleófilo al complejo acil-enzima, formándose nuevamente el complejo tetraédrico (C)
- Cuarto paso: liberación del producto y regeneración del sitio activo



Esquema I.2. Mecanismo de reacción de la catálisis enzimática de las lipasas

1.2.1.4. Fuentes naturales

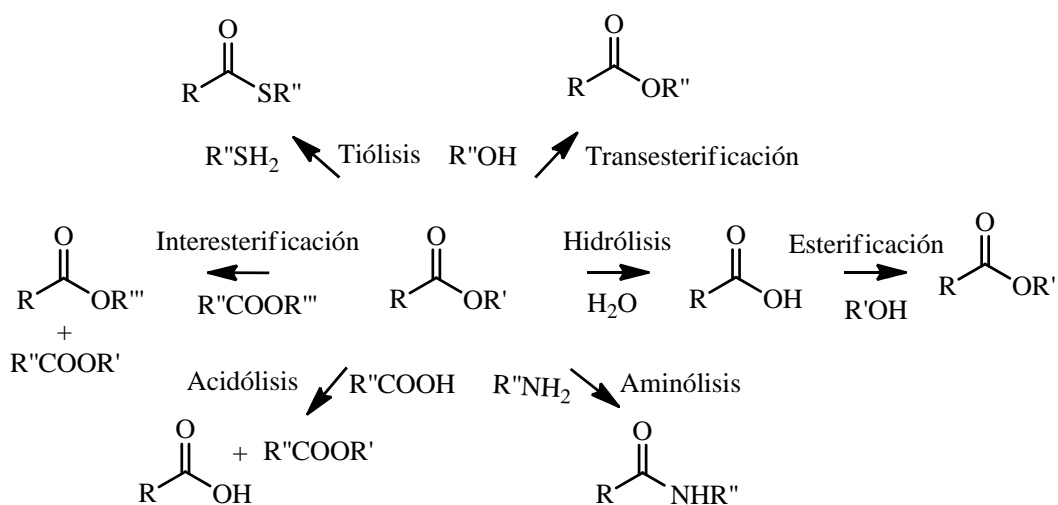
Las lipasas son enzimas muy ubicuas, pudiéndose encontrar en una gran variedad de fuentes: animal, vegetal y microbiana. Las más utilizadas en el ámbito biotecnológico son en general de origen microbiano. La mayoría de las levaduras, hongos y bacterias producen lipasas extracelulares que son secretadas al medio de cultivo lo que resulta altamente beneficioso desde el punto de vista técnico. En los últimos años, con el avance de la Ingeniería Genética se está produciendo una gran cantidad de lipasas a escala comercial utilizando levaduras y bacterias recombinantes. Un ejemplo es la lipasa de *Thermomyces*

lanuginosus la cual es utilizada en detergentes, esta enzima es producida a gran escala mediante procesos de fermentación de una cepa de *Aspergillus oryzae* en la que se ha clonado el gen que codifica para la lipasa de *T. lanuginosus*.¹⁶

La mayoría de las lipasas son producidas por los microorganismos en dos isoformas (isoenzimas) denominadas A y B, las cuales presentan diferencias estructurales poco significativas pero que pueden conducir a diferencias en cuanto a estereoselectividad. En general, las preparaciones de lipasas contienen ambas isoenzimas excepto algunas como por ejemplo la lipasa de *Candida antarctica* (CAL) que está disponible en sus dos isoformas A y B gracias a técnicas de Ingeniería Genética.³

I.2.1.5. Reacciones catalizadas por lipasas

Las lipasas son muy utilizadas en reacciones de Química Orgánica debido a su versatilidad y a la capacidad que presentan para aceptar sustratos hidrofóbicos. Algunas lipasas pueden trabajar en solventes orgánicos con una muy baja actividad de agua (*aw*), lo cual resulta muy interesante dado que de esta manera se evita la hidrólisis del agente acilante. Por otra parte se han descrito numerosas reacciones en las que estas enzimas pueden actuar como catalizadores: Esquema I.3.



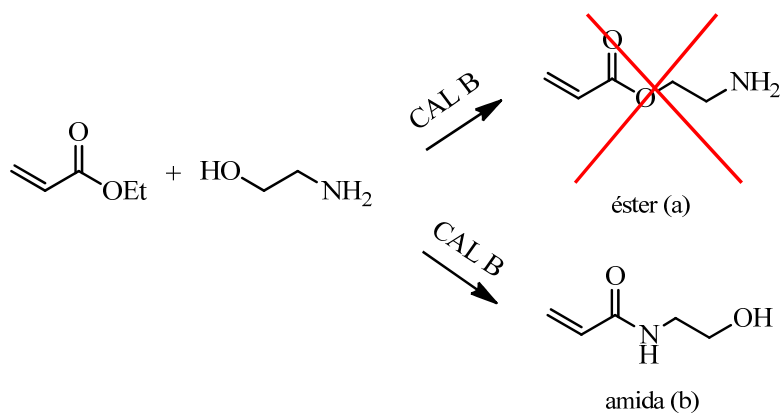
Esquema I.3. Reacciones catalizadas por lipasas

1.2.1.6. Selectividad de las lipasas

Como se comentó en la sección 1.1.4.2, las enzimas presentan quimio-, regio- y estereoselectividad y por lo tanto las lipasas se asocian a este tipo de comportamiento. En nuestro laboratorio se han utilizado una gran variedad de sustratos que sirven como ejemplo de esta característica.

1.2.1.6.1. Quimioselectividad de las lipasas

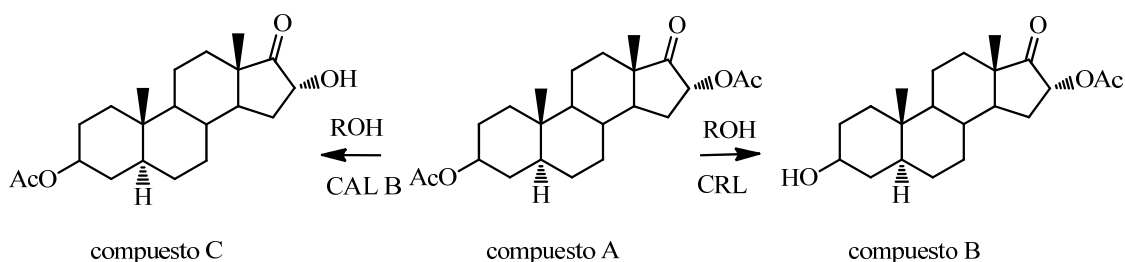
Como ejemplo del comportamiento quimioselectivo observado en las lipasas se presenta un trabajo realizado en nuestro laboratorio, utilizando como sustratos acrilato de etilo y etanolamina, cuya reacción fue catalizada por la lipasa de *Candida antarctica* B (CAL B).¹⁷ Los grupos funcionales hidroxilo y amino de la etanolamina son igualmente reactivos frente al acrilato de etilo pudiendo dar los respectivos productos a y b. Sin embargo en este caso se observó que la lipasa catalizó solamente la reacción de aminólisis para dar la amida b y no la reacción de alcoholólisis que produciría el éster a. Esquema I.5



Esquema I.5. Reacción de acrilato de etilo y etanolamina catalizada por CAL B

I.2.1.6.2. Regioselectividad de las lipasas

Para ejemplificar la propiedad de las lipasas de presentar un comportamiento regioselectivo, podemos mencionar la reacción de alcoholólisis del diacetato de 17-oxo-5 α H-androstan-3 β , 16 α -diilo (compuesto A)(Esquema I.6).¹⁸ En este caso se puede ver la diferencia que presentan dos enzimas comerciales en la reacción en relación al comportamiento regioselectivo. CAL B permite obtener el producto desacetilado en la posición 16 (compuesto B), en cambio CRL muestra regioselectividad por el grupo acetilo de la posición 3 (compuesto C).

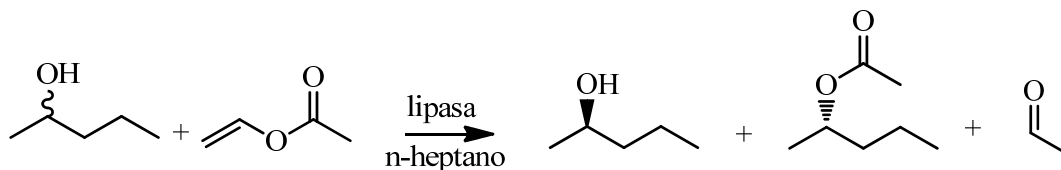


Esquema I.6. Comportamiento regioselectivo de lipasas en la alcoholólisis de diacetato 17-oxo-5 α H-androstan-3 β , 16 α -diilo

I.2.1.6.3. Estereoselectividad de las lipasas

Las lipasas se han empleado en muchos casos en resoluciones cinéticas de alcoholes mediante transesterificaciones con enol-ésteres como el acetato de vinilo o el acetato de isopropenilo. Según un estudio realizado por el grupo de Faber, pueden emplearse ésteres vinílicos como agentes acilantes para todas las lipasas excepto para las de *Candida rugosa* y *Geotrichum candidum* dado que éstas pierden su actividad al ser expuestas al acetaldehído que es liberado en la reacción de transesterificación.^{19,20}

Como ejemplo podemos mencionar la resolución estereoselectiva de (*R,S*)-2-pentanol catalizada por la lipasa (Esquema I.7)²¹



Esquema I.7. Resolución estereoselectiva de (*R,S*)-2-pentanol catalizada por lipasa

En este ejemplo se observa que la lipasa es capaz de catalizar la acetilación del enantiómero *R* y no del *S* y de esta manera resulta fácil la separación de ambos enantiómeros. Por otra parte, la reacción se ve favorecida utilizando un acetato activado (acetato de vinilo) dado que se forma también como producto un compuesto volátil (acetaldehído) desplazando así la reacción hacia la formación de productos.

El sitio activo de las lipasas, cuyo tamaño varía según el origen de las mismas,⁸ presenta dos bolsillos, uno más grande y otro más pequeño, donde se alojan los sustituyentes del nucleófilo. En función de esto Kazlauskas propuso una regla general que describe el comportamiento estereoselectivo de las lipasas (Figura I.3).²² Asumiendo que el orden de preferencia de los sustituyentes concuerda con su tamaño (cuando el sustituyente es mayor tiene mayor prioridad según las reglas de Cahn-Ingold-Prelog), la regla de Kazlauskas predice una enantioselectividad por el alcohol de configuración *R*. O sea que en una mezcla *R,S* de alcoholes sólo se acilará el hidroxilo del estereoisómero *R*.

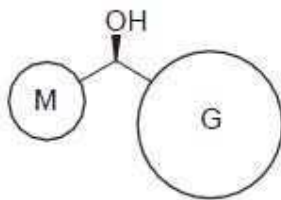


Figura I.3. En reacciones de acilación, el enantiómero mostrado reacciona más rápido (M: mediano y G: grande)

1.2.1.7. Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas

Las lipasas catalizan numerosas reacciones muchas de las cuales son de gran interés industrial. Muchas industrias como la farmacéutica, alimentaria, agroquímica, etc., han implementado en el área de desarrollo la Biocatálisis debido a las numerosas ventajas que ésta presenta. Podemos mencionar algunos ejemplos:

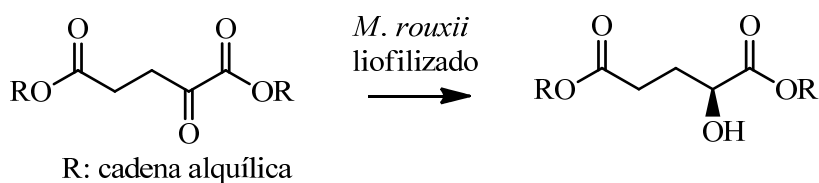
- ✓ Producción de aromas y sabores en la industria alimentaria
- ✓ Implementación en detergentes de lavado de ropa
- ✓ Producción de esteroides de gran importancia en la industria farmacéutica
- ✓ Preparación de enantiómeros puros de ácido 2-aril propiónico, como por ejemplo naproxeno, de gran utilidad farmacológica como antiinflamatorio

1.3. Células enteras

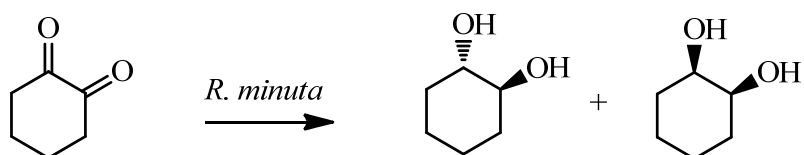
Como se mencionó en la sección I.1.4.2, la Biocatálisis utiliza no sólo enzimas aisladas sino también células enteras. El empleo de las mismas puede inclusive hasta ser más ventajoso en términos económicos que el uso de las enzimas aisladas. Esto se debe a que el crecimiento de los microorganismos no requiere un procedimiento muy complicado y por otra parte existen enzimas que para su actividad catalítica necesitan cofactores, los cuales la mayoría de las veces resultan costosos e inestables. Como desventaja, las células enteras presentan una batería enzimática que puede causar pérdidas de selectividad generando una gran variedad de productos de transformación. Se han realizado reacciones con células enteras en solventes orgánicos, medios bifásicos y emulsiones aunque, en contraste con las enzimas aisladas, en general la células enteras son menos tolerantes a medios no acuosos. Ambos sistemas presentan ventajas y desventajas por lo cual la elección de cada uno de ellos dependerá del sustrato a transformar y del tipo de transformación requerida.

En nuestro laboratorio se ha implementado con éxito el uso de células enteras como biocatalizadores sobre una variedad de sustratos. Se realizaron reducciones quimio- y estereoselectivas de 2-oxo- y 3-oxoglutaratos catalizadas por células liofilizadas de *Mucor rouxii*^{23,24} (Mangone y Rustoy) y reducciones de dicetonas vecinales catalizadas por células de *Rhodotorula minuta*.²⁵

a)



b)

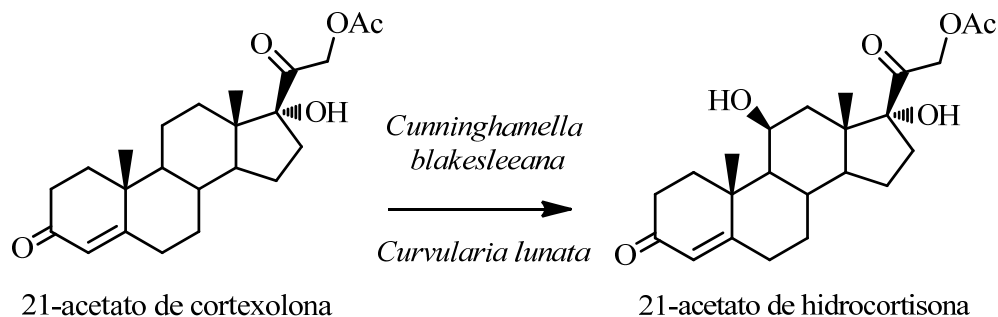


Esquema I.8. Reducción de 2-oxo-glutarato catalizada por células de *Mucor rouxii* (a), reducción de dicetonas vecinales catalizada por *Rhodotorula minuta* (b)

1.3.1. Aplicaciones biotecnológicas de células enteras

Existen variados trabajos en donde se aplican cultivos de microorganismos para llevar a cabo Biotransformaciones sobre compuestos esteroidales, dichos compuestos presentan un gran interés en la industria farmacéutica.

Un ejemplo interesante es la biotransformación llevada a cabo por diversas cepas fúngicas de 21-acetato de cortexolona a 21-acetato de hidrocortisona. Este último compuesto es muy utilizado en la industria farmacéutica debido a su acción antiinflamatoria e inmunosupresiva.^{26,27}



Esquema I.9. Reacción de biotransformación de 21-acetato de cortexolona para generar 21-acetato de hidrocortisona llevada a cabo por cepas de *C. blakesleeana* o *C. lunta*

1.4. Inmovilización de un biocatalizador

La inmovilización de un biocatalizador es muy importante dado que ayuda a superar muchos inconvenientes que estos presentan a nivel industrial. Algunas de las ventajas presentadas debido a la inmovilización son:

- Recuperación del biocatalizador del medio de reacción
- Mayor estabilidad
- Mayor Selectividad
- Reducción de la inhibición por el medio o por productos
- Aumento de la concentración del biocatalizador

Estas ventajas suelen permitir una mayor productividad lo que desencadena un beneficio a nivel económico. Sin embargo el hecho de inmovilizar el biocatalizador hace que se sume un paso más en el proceso y además muchas veces la inmovilización trae aparejada una disminución notable en la actividad catalítica.⁴

Existen varios métodos de inmovilización:

- Adsorción: la inmovilización se produce por interacciones iónicas, fuerzas de Van de Waals y puentes de hidrógeno
- Unión covalente: la inmovilización se produce a nivel de los grupos químicos del soporte, los cuales reaccionan de manera covalente con el biocatalizador
- Reticulado o entrecruzamiento: en este caso se produce la inmovilización a partir de moléculas bifuncionales que reaccionan generando uniones con el biocatalizador
- Atrapamiento: el biocatalizador queda atrapado en cavidades internas de una matriz sólida porosa generalmente por un polímero fotoentrecruzable o polímeros del tipo poliacrilamida, alginato, carragenato, etc
- Inclusión en membranas
 - ✓ Microencapsulación: el biocatalizador queda rodeado de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no del biocatalizador
 - ✓ Reactor de membranas: el biocatalizador se introduce en la membrana, la cual, como en el caso anterior, es permeable al sustrato y al producto

Considerando las ventajas y desventajas que presenta la inmovilización del biocatalizador, para cada caso en particular se deberá realizar una evaluación teniendo en cuenta los mejores resultados obtenidos en función de la relación costo/beneficio.

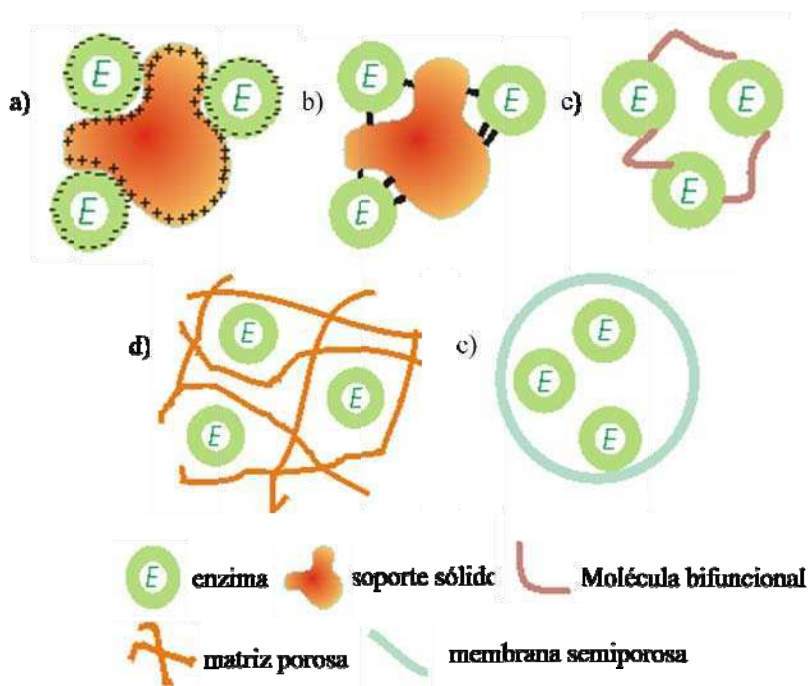


Figura 1.4. Métodos de inmovilización: adsorción (a), unión covalente (b), reticulado (c), atrapamiento (d), inclusión en membrana (e)

Conclusión

En el siglo XXI crece el interés por llevar a cabo procesos químicos más limpios y de menor impacto para el medio ambiente. Para poner en práctica esta idea, se requiere la ayuda de nuevas tecnologías y metodologías que identifiquen dónde fallan los métodos sintéticos tradicionales en relación a temas referidos al aporte negativo a los procesos ecológicos. Por esta razón se han desarrollado metodologías alternativas que pueden superar estas deficiencias.

La Biocatálisis, como seguidora de los principios enunciados por la Química verde, ofrece una alternativa interesante en relación a este tema dado que permite trabajar en condiciones suaves de reacción y compatibles con el medioambiente. Por otro parte, otorga numerosos beneficios en síntesis orgánica ya que los biocatalizadores aplicados presentan elevada

selectividad, siendo esta característica muy requerida en esta disciplina, particularmente en el campo de la Química Fina.

Bibliografía

1. Yuryev, R.; Liese, A. *ChemCatChem*, **2010**, *2*, 103-107.
2. Bommarius, A.S.; Riebel, B.R. *Biocatalysis Fundamentals and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004.
3. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 5th Ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: New York, 2004.
4. Buchholz, K.; Kasche, V.; Bornscheuer, U. T. *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.
5. Klivanov, A. M. *Trends Biochem. Sci.*, **1989**, *14*, 141-144.
6. Klivanov, A. M. *Nature*, **1995**, *374*, 596.
7. Klivanov, A. M. *Nature*, **2001**, *409*, 241-246.
8. Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. D. *Chem. Phys. Lipids*, **1998**, *93*, 67-80.
9. Tyagi, S.; Pleiss, J. *J. Biotechnol.*, **2006**, *124*, 108-116.
10. Kierstan, M.; Bucke, C. *Biotechnol. Bioeng.*, **1977**, *19*, 387-397.
11. Jahnz, U.; Wittlich, P.; Pruesse, U.; Vorlop, K. D. *Focus on Biotechnology*, **2001**, *4*, 293-307.
12. Baldessari, A. Green Chemistry Series 11, Ed. Pietro Tundo, R. Hoyos de Rossi, Duplicop, Cordoba, 2004.
13. Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. *Hydrolases in organic synthesis: region- and estereoselective biotransformation*. 2005. Wiley.
14. Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S; Jones, T. A. *Structure*, **1994**, *2*, 293-308.
15. Silverman, R. B. *The Organic Chemistry of Enzyme Catalyzed Reactions*. 2002.
16. Boel, E.; Christensen, T.; Woldike, H. Novo Nordisk AS, 1996, US-A 5536661.
17. Rustoy, E. M.; Baldessari, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2006**, *39*, 50-54.
18. Brutomesso, A. C.; Baldessari, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, *29*, 149-153.
19. Weber, H. K.; Stecher, H.; Faber, K. *Biotechnol. Lett.*, **1995**, *17*, 803-808.
20. Weber, H. K.; Zuegg, J.; Faber, K.; Pleiss, J. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **1997**, *3*, 131-138.
21. Sontakke, J. B.; Yadav, G. D. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **2011**, *50*, 12975-12983.

22. Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T. A.; Cuccia, L. A. *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 2656-2665.
23. Mangone, C. P.; N. Pereyra, E.; Argimón, S.; Moreno, S.; Baldessari, A. *Enzyme and Microbial Technology*, **2002**, *30*, 596-601.
24. Rustoy, E. M.; Cerrutti, P.; Galvagno, M.; Baldessari, A. *Biocatalysis and Biotransformation*, **2008**, *26*, 204-209.
25. Monsalve, L. N.; Cerrutti, P.; Galvagno, M. A.; Baldessari, A. *Biocatalysis and Biotransformation*, **2010**, *28*, 137-143.
26. Kollerov, V. V.; Shutov, A. A., Fokina, V. V.; Sukhodol'skaya, G. V.; Gulevskaya, S. A.; Donova, M. V. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **2010**, *46*, 198-205.
27. Manosroi, J.; Saowakhon, S.; Manosroi, A. *Enzyme Microb. Technol.*, **2007**, *41*, 322-325.

Capítulo II

Objetivos

II. OBJETIVOS

En el capítulo anterior se ha mencionado y destacado el comportamiento selectivo de los biocatalizadores. Esta característica permite plantear estrategias sintéticas con menor número de pasos y potencialmente más eficientes, si son aplicables los biocatalizadores en las reacciones a desarrollar. En este aspecto presentan ventajas en cuanto a su bajo costo y toxicidad con respecto a los catalizadores químicos convencionales.

Otra característica importante que debe mencionarse de la implementación de los biocatalizadores es que permiten trabajar en condiciones suaves de reacción, resultando muy importante a la hora de realizar transformaciones de compuestos químicamente lábiles, en donde los métodos químicos tradicionales podrían conducir a resultados no deseados.

Considerando lo mencionado anteriormente, se estableció como objetivo en este trabajo de tesis el estudio de reacciones biocatalíticas sobre distintos tipos de compuestos orgánicos a fin de:

- Crear caminos alternativos eficientes de síntesis para determinados productos
- Evaluar y verificar la selectividad que presentan los biocatalizadores sobre sustratos de interés biológico
- Investigar el potencial de los biocatalizadores en situaciones desconocidas de manera tal de ampliar su campo de aplicación

En base a los objetivos establecidos, se ha estudiado la aplicación de la Biocatálisis tanto a la Química Orgánica como a la Química Biológica dada su estrecha relación en el interés de compuestos de utilidad farmacológica y de la industria alimentaria.

El objetivo general del trabajo consistió en la aplicación de catalizadores biológicos en la transformación y síntesis de productos naturales y sus análogos.

Este objetivo fue concretado a través de los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Síntesis de ésteres de ácido 2-oxoglutarico de cadena media y larga catalizada por lipasas
- ✓ Síntesis enzimática de derivados acilados de hidrocortisona
- ✓ Reacción de acetilación de cortisona catalizada por una lipasa heteróloga de *Rhizopus oryzae* inmovilizada

- ✓ Biotransformación de una progestina sintética por microorganismos de diversos géneros fúngicos

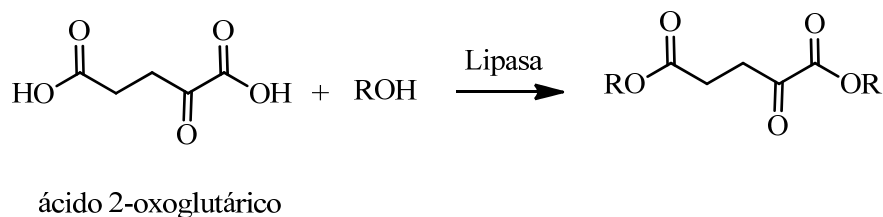
La realización de estos objetivos permitió la síntesis de compuestos análogos a las ceras y la transformación por vía enzimática de productos esteroidales naturales y sintéticos.

II.1. Síntesis de ésteres de cadena media y larga de ácido 2-oxoglutárico catalizada por lipasas

Las ceras son compuestos ampliamente distribuidos en los organismos vivos. En general todas las ceras contienen ácidos grasos esterificados con alcoholes de cadena larga.⁸

Este tipo de compuestos tiene aplicación en la industria cosmética, en productos farmacéuticos, en lubricantes y en la industria alimentaria lo que los hace muy interesantes. En nuestro laboratorio se han aplicado lipasas en reacciones de esterificación de ácido 2-oxoglutárico con alcoholes de cadena corta obteniéndose una serie de derivados dialquilados.⁶

Siguiendo con la metodología empleada, se decidió sintetizar derivados de cadena media y larga de ácido 2-oxoglutárico, con el fin de obtener compuestos con características cerosas. En este caso se utilizaron como biocatalizadores lipasas comerciales y también se evaluó el comportamiento de una lipasa extraída del látex de la planta de papaya (*Carica papaya*). El Esquema II.3. describe la reacción involucrada:



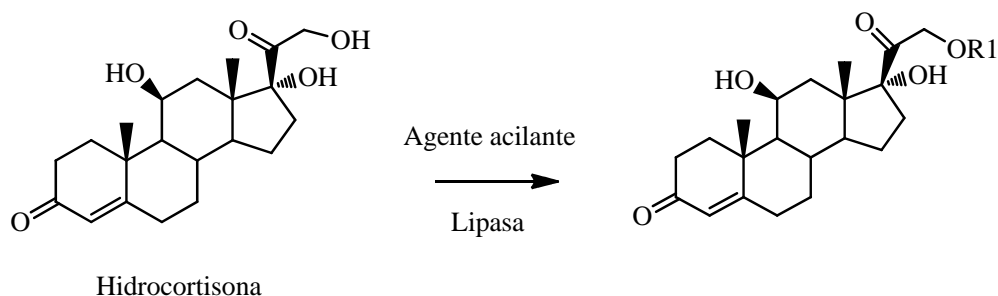
Esquema II.1. Obtención de ésteres de ácido 2-oxoglutárico

II.2. Síntesis enzimática de derivados acilados de hidrocortisona

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 con los compuestos esteroidales y tomando como base trabajos previos,²⁻⁵ también llevados a cabo en nuestro laboratorio, en esta parte del trabajo de tesis se describirá la implementación de biocatalizadores en reacciones de acilación y alcoholisis del esteroide hidrocortisona (11 β ,17 α ,21-trihidroxipregn-4-en-3,20-diona). Los derivados de hidrocortisona son muy interesantes desde el punto de vista farmacológico, dado que los mismos pueden ser utilizados en diversas enfermedades en las cuales está implicado el sistema inmune y donde se requieren tratamientos prolongados.

Se utilizaron diferentes lipasas comerciales con el objeto de ampliar el conocimiento del desempeño de las mismas en la transformación de esteroides. Esquema II.2



Esquema II.2. Obtención de derivados de hidrocortisona en posición 21 empleando lipasas

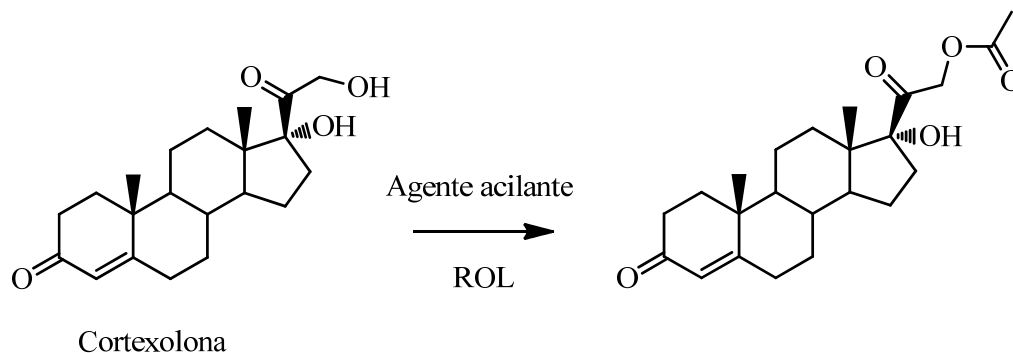
Por otra parte se decidió aplicar estrategias de síntesis química tradicional y la asistencia de radiación de microondas para la obtención de un compuesto esteroideal peracetilado. El compuesto obtenido fue luego utilizado como sustrato para reacciones de alcoholisis catalizadas por lipasas.

II.3. Reacción de acetilación de cortexolona catalizada por una lipasa heteróloga de *Rhizopus oryzae* inmovilizada

Continuando con reacciones de modificación de esteroides, en esta parte del trabajo se decidió acetilar la cortexolona en posición 21. Este esteroide al igual que la hidrocortisona, de la cual se habló anteriormente, es muy aplicado en tratamientos de enfermedades inflamatorias de la piel. A su vez el 21- acetato de cortexolona (21-Acetoxi-17 α -hidroxi-4-

pregnen-3,20-diona) puede ser utilizado como sustrato de partida para su biotransformación, por distintas cepas fúngicas, a 21- acetato de hidrocortisona.

Para la acetilación del esteroide cortexolona, se propuso emplear una lipasa heteróloga de *Rhizopus oryzae* (ROL) liofilizada e inmovilizada en diferentes soportes, con el objetivo de evaluar su actividad. Esquema II.4



Esquema II.4. Reacción de acetilación de cortexolona catalizada por la lipasa heteróloga de *Rhizopus oryzae*

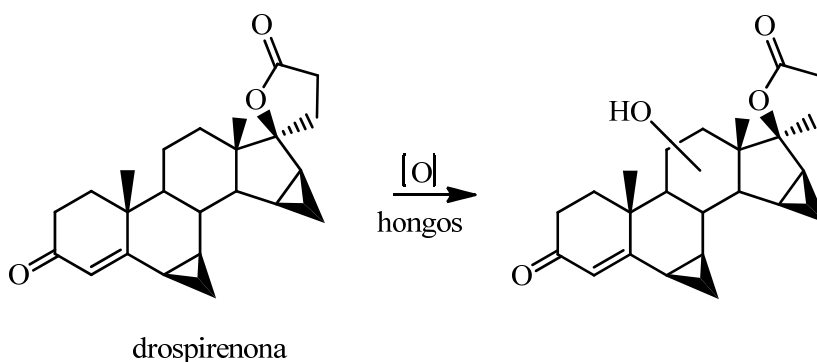
Se estudiaron los parámetros de reacción: agente acilante:sustrato, enzima:sustrato, solvente, tiempo de reacción, etc. con el fin de determinar las condiciones óptimas de la reacción enzimática. Los datos obtenidos se aplicaron en cálculos matemáticos que permitieron obtener los parámetros óptimos finales de reacción.

II.4. Biotransformación de una progestina sintética por microorganismos de diversos géneros fúngicos

En el capítulo correspondiente a la Introducción se ha mencionado el empleo de células enteras de microorganismos en la biotransformación de esteroides. En este sentido, se han empleado diversos géneros y cepas fúngicas con éxito en la obtención de compuestos de interés farmacológico.

Se proyectó estudiar el desempeño de diferentes géneros de hongos del Orden Mucorales en la biotransformación de una progestina sintética anti-androgénica análoga a la espironolactona conocida con el nombre comercial de drospirenona.

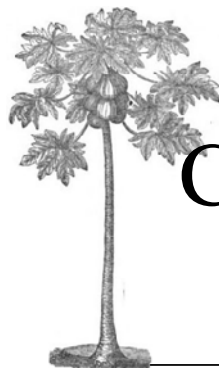
Se estudiaron los parámetros de la reacción de biotransformación. El análisis de la bibliografía publicada sobre estos hongos permitió conocer su importante actividad en reacciones de oxidación, por lo que se esperó que la biotransformación diera lugar a la obtención de productos oxigenados de la drospirenona de acuerdo al Esquema II.5.



Esquema II.5. Oxidación de una progestina sintética (drospirenona) empleando diferentes géneros fúngicos

Bibliografía

1. Brutomesso, A. C.; Baldessari, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, 29, 149-153.
2. Rustoy, E. M.; Ruiz Arias, I. E.; Baldessari, A. *Arkivoc*, **2005**, (xii), 175-180.
3. Brutomesso, A. C.; Tiscornia, A.; Baldessari, A. *Biocatal. & Biotransf.*, **2004**, 22, 215-220.
4. Baldessari, A.; Brutomesso, A. C.; Gros, E. G. *Helv. Chim. Acta*, **1996**, 79, 999-1004.
5. Baldessari, A.; Maier, M. S.; Gros, E. G. *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 4349-4352.
6. Rustoy, E.M.; Pereyra, E.; Colonna, S. M.; Baldessari, A. *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, 15, 3763-3768.



Capítulo III

2-oxoglutárico

III. SÍNTESIS DE ÉSTERES DE ÁCIDO 2-OXOGLUTÁRICO DE CADENA MEDIA Y LARGA CATALIZADA POR LIPASAS

III.1. Introducción

Las ceras son compuestos lipofílicos insolubles en agua y se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos vivos. Los componentes lipofílicos de las ceras pueden variar extensamente según la fuente de procedencia, pudiéndose encontrar: hidrocarburos, ésteres de esteroides, aldehídos alifáticos, alcoholes primarios y secundarios, dioles, cetonas, 1,3-dicetonas, ésteres de ácidos grasos, etc. En general todas las ceras contienen como componentes principales ácidos grasos esterificados con alcoholes de cadena larga.¹ Están distribuidas en las cutículas de las plantas terrestres que las protege de la desecación y actúa como barrera contra insectos y hongos, en la cutícula de insectos² y en la piel de muchos animales. Están presentes en corales³ y en bacterias degradadoras de grasas y aceites,⁴ en donde las ceras y demás componentes lipídicos se encuentran en estructuras celulares destinadas a su almacenamiento. En mamíferos, las ceras son sintetizadas en numerosos tejidos, siendo el hígado el principal órgano de síntesis.⁵

Estos compuestos tienen aplicación en la industria cosmética, en productos farmacéuticos, en lubricantes y en la industria alimentaria lo que los hace interesantes desde el punto de vista comercial.⁶

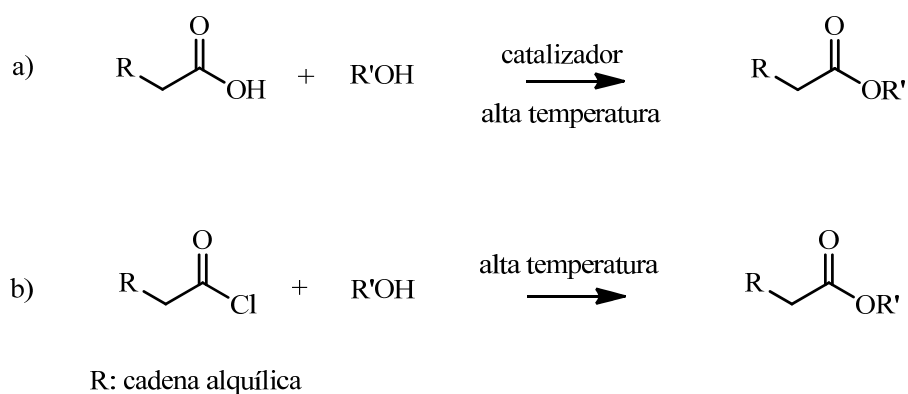
Los ésteres de ácidos de cadena corta son utilizados en la industria alimentaria ya que los mismos contribuyen con el aroma y el “flavor”.⁷ Los ésteres metílicos y etílicos de ácidos de cadena larga en cambio son compuestos oleoquímicos los cuales pueden aplicarse como combustible diesel.^{8,9}

Por otra parte, los ésteres de cadena larga, derivados de alcoholes o ácidos, ambos de longitud de cadena de doce átomos de carbono o más, comúnmente denominados ceras, presentan potencial aplicación como lubricantes¹⁰ y cosméticos.¹¹ En la industria cosmética este tipo de compuestos está presente en cremas, lápices labiales, máscara para pestañas, etc.

Algunos análogos de ceras, como por ejemplo ésteres de alcoholes grasos con carboxicarboxilatos (fórmula general: $\text{RCOO}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}$ donde R es un alcohol graso)

son metabolizados en forma parcial en el organismo. Como consecuencia, reducen el valor calórico y disminuyen los problemas asociados con los sustituyentes grasos no metabolizables.¹²

Con respecto a su síntesis, usualmente los ésteres de cera son obtenidos: a) a partir de un alcohol y un ácido graso a temperaturas superiores a 250 °C en presencia de catalizadores ácidos o metálicos, o b) por conversión de un haluro de acilo en condiciones de alta temperatura y/o presión, tal como se describe en el Esquema III.1.



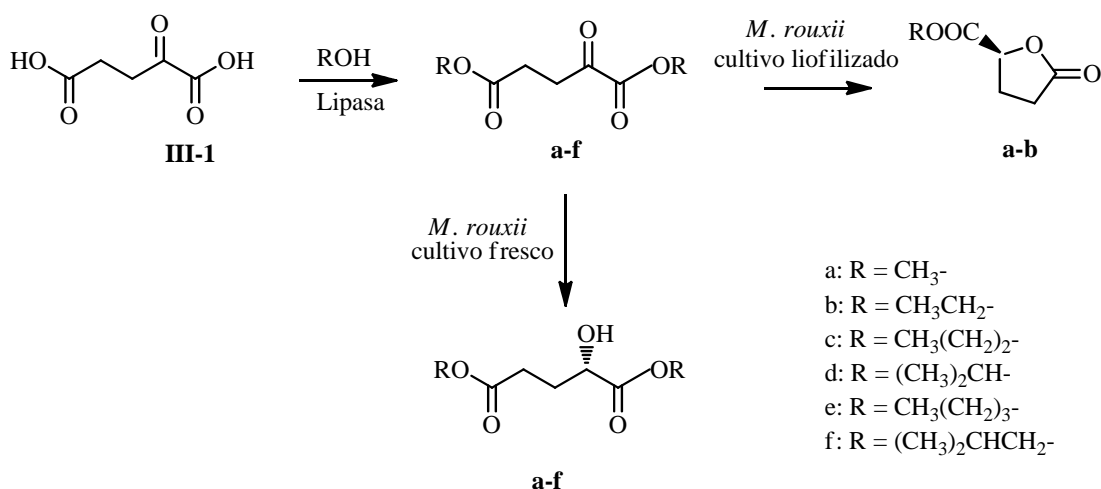
Esquema III.1. Métodos químicos de síntesis para la obtención de ésteres a partir de ácidos carboxílicos o de sus derivados

Estos procesos sintéticos presentan las siguientes desventajas:

- las altas temperaturas y los tiempos prolongados de reacción pueden provocar la degradación del éster
- la presencia de productos secundarios no deseados y
- altos costos de producción

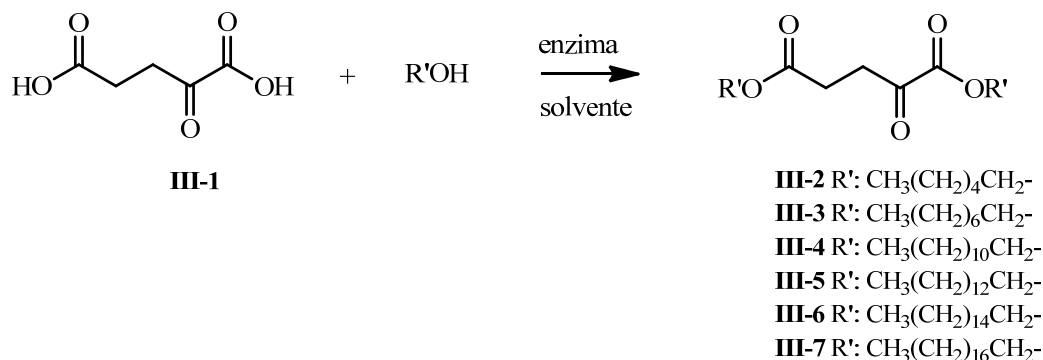
Recientemente, se ha desarrollado una estrategia sintética nueva para la producción de ésteres de ceras mediante reacciones de co-halogenación, usando *N*-bromosuccinimida (NBS) y ácidos grasos insaturados.¹³ Aunque este proceso es llevado a cabo a temperatura ambiente, la NBS no es un reactivo compatible con el cuidado del medio ambiente y el producto que se obtiene a partir de esta reacción resulta ser una mezcla de NBS y ésteres de cera que no pueden ser separados.

Por los motivos antes citados, en los últimos años se ha prestado especial atención a los métodos biotecnológicos considerando su aplicación como una posibilidad de síntesis alternativa y muy atractiva. Se tiene conocimiento de que las enzimas pueden presentar actividad catalítica en medios no acuosos,^{14,15} y que las mismas pueden actuar como catalizadores altamente eficientes en reacciones de esterificación de ácidos grasos con alcoholes grasos para la obtención de ceras.¹⁶ En nuestro laboratorio hemos aplicado lipasas en reacciones de esterificación y transesterificación de ácidos grasos y ácidos dicarboxílicos.¹⁷⁻¹⁹ Entre ellos, la esterificación del ácido 2-oxoglutarico (**III-1**) con alcoholes de cadena corta, como metanol y etanol nos permitió obtener derivados dialquilados que por biotransformación con el hongo *Mucor rouxii* produjeron γ -butirolactonas. Por otra parte, utilizando células enteras del mismo microorganismo en derivados dialquilados de mayor longitud de cadena, éstos fueron reducidos a 2-hidroxiésteres.²⁰



Esquema III.2. Esterificación del ácido 2-oxoglutarico catalizada por lipasa y posterior reducción con *Mucor rouxii*

Por lo tanto, considerando la similitud entre algunas ceras, los ésteres de los carboxicarboxilatos y los derivados de alcoholes grasos de ácidos dicarboxílicos y continuando con la búsqueda de la aplicación de los biocatalizadores en reacciones de interés industrial, en esta parte del trabajo describimos la aplicación de lipasas de diferentes orígenes en la síntesis de derivados de cadena media y larga de ácido 2-oxoglutarico (**III-1**) (Esquema III.3).



Esquema III.3. Síntesis de diésteres de ácido 2-oxoglutámico catalizada por enzimas

III.2. Esterificación de ácido 2-oxoglutámico

En la reacción de esterificación de ácido 2-oxoglutámico con alcoholes de variada longitud de cadena, se decidió estudiar el comportamiento de una variedad de lipasas comerciales de origen microbiano y también evaluar una lipasa vegetal proveniente de la planta de papaya (*Carica papaya*). Se decidió evaluar la lipasa de *Carica papaya* debido a la facilidad de obtención de esta enzima y su bajo costo de producción.

Las plantaciones de *Carica papaya* se encuentran localizadas en las zonas tropicales de México y de Centro América. El fruto, que conocemos como papaya, posee un alto valor nutritivo y además es conocido y consumido popularmente debido a sus propiedades medicinales en casos de gastritis, problemas hepáticos, etc. Esto ha contribuido a incrementar su cultivo en las zonas mencionadas.

La *Carica papaya* pertenece a la familia de las Caricáceas. De crecimiento relativamente rápido y vida corta, luego de dos o tres años alcanza una altura de varios metros. En esta situación la recolección de los frutos, los cuales a su vez resultan más pequeños, es costosa y deja de ser rentable el cultivo. Por otra parte, los árboles de papaya en esta etapa de su vida generalmente son infectados por virus y bacterias. Esto trae como consecuencia el talado de los mismos transformando a la plantación en un agro-residuo disponible anualmente.²¹

La planta de papaya produce un látex, extraído tanto del fruto verde como del tallo, enriquecido en dos tipos de enzimas: la papaína, que es una proteasa, y una mezcla de

lipasas. En el presente trabajo se utilizó esta mezcla que denominamos CPL, donde las lipasas se encuentran autoinmovilizadas en el látex extraído de la planta.

La simplicidad de obtención de CPL a partir de este agro-residuo favorece su aplicación ya que se realiza a través de un proceso económico y de fácil implementación. Además su aplicación en síntesis de compuestos orgánicos le confiere un alto valor agregado a este residuo.

III.2.1. Obtención de la lipasa de *Carica papaya* (CPL)

Para obtener la lipasa de *Carica papaya*, primeramente se realiza una purificación parcial del látex obtenido a partir del tallo y fruto de la planta, utilizando agua destilada. De esta manera se eliminan entre el 97 y el 99% de las proteínas solubles en agua, principalmente las proteasas y el agro-residuo se va enriqueciendo en la lipasa de interés. Esta lipasa se encuentra autoinmovilizada en el mismo látex libre de proteasas. En la Figura III.1 se muestra en forma esquemática el procedimiento descripto.

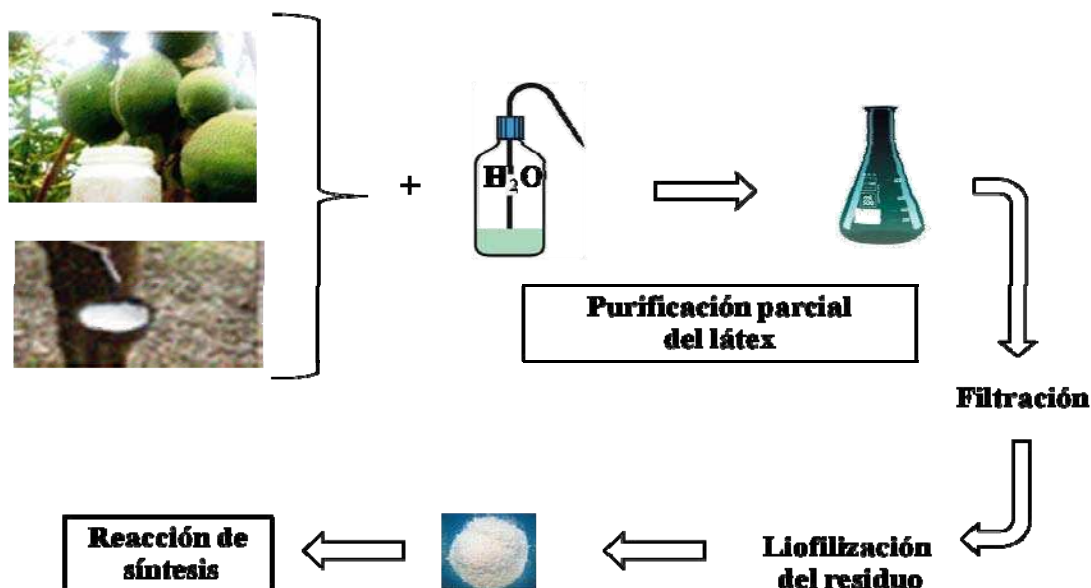


Figura III.1. Esquema de purificación del látex de *Carica papaya* para la obtención de la lipasa de *Carica papaya* (CPL) autoinmovilizada

III.2.2. Optimización de los parámetros de reacción

III.2.2.1. Fuente enzimática y solvente

Para llevar a cabo la reacción de esterificación de ácido 2-oxoglutarico con alcoholes de variada longitud de cadena, se evaluaron cuatro lipasas comerciales: lipasa de *Candida rugosa* (CRL), lipasa pancreática porcina (PPL), lipasa de *Candida antarctica* B (CAL B) y lipasa de *Rhizomucor miehei* (LIP); y la lipasa de *Carica papaya* (CPL).

Las lipasas, como se mencionó anteriormente, pueden actuar como catalizadores en reacciones donde se utilizan solventes orgánicos y dado que su eficiencia varía según el solvente de reacción, para cada síntesis en particular debe elegirse el solvente apropiado.²² Se han observado en algunos casos para la enzima CAL B muy buenos resultados en solventes polares como *t*-butanol y acetonitrilo^{23,24} y en otros casos se requirieron solventes no polares para una mayor eficiencia de la enzima. Por tal motivo se decidió evaluar al mismo tiempo, la actividad de las diferentes enzimas en diversos solventes. Se utilizaron solventes de variada polaridad, como *t*-butanol, acetona, acetonitrilo, diisopropil éter, hexano y tolueno. Inicialmente las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C usando una relación Enzima/Sustrato (E/S) de 5 en el caso de las enzimas comerciales y de 15 para el caso de la lipasa de *Carica papaya* y 1-hexadecanol como nucleófilo. La relación alcohol/ácido fue de 4 y en todos los experimentos la mezcla de reacción fue agitada a 200 rpm.

El curso de todas las reacciones fue monitoreado por medio de cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía gaseosa (CG).

Los parámetros estudiados en esta parte del trabajo indicaron que, de las lipasas evaluadas, CAL B en hexano, y CPL en diisopropil éter como solventes de reacción, presentaron los mejores resultados para la reacción de esterificación de ácido 2-oxoglutarico con 1-hexadecanol. PPL, no presentó actividad catalítica y LIP presentó menor porcentaje de conversión que CAL B y CPL.

La identidad del 2-oxoglutarato de di-hexadecilo obtenido mediante síntesis enzimática fue determinada mediante espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) a partir de los espectros protónico (¹H) y de carbono 13 (¹³C). Se asignaron las señales correspondientes y se compararon con datos reportados en bibliografía.^{13,21} En el espectro protónico pueden observarse los desplazamientos de las señales de los protones correspondientes al compuesto **III-6**. Se observa que las señales a $\delta = 4,07$ y $4,26$ ppm de

los metilenos unidos al oxígeno de cada uno de los grupos carboxílicos del diácido, correspondientes al grupo funcional del éster son coincidentes con este tipo de función lo que nos indica la presencia de un diéster. En el espectro de carbono-13 se presentaron los desplazamientos de las señales correspondientes a los diferentes grupos carbonilos que presenta el diéster a $\delta = 160,7$ y $172,1$ ppm, que coincidieron con los esperados. Los datos provenientes del espectro de masa y el análisis elemental también fueron concordantes con la estructura planteada.

III.2.2.2. Efecto de la temperatura y tiempo de reacción

Para analizar la influencia de la temperatura y tiempo de reacción se efectuó nuevamente la reacción de esterificación de ácido 2-oxoglutárico con 1-hexadecanol empleando CAL B y CPL en hexano y diisopropil éter respectivamente como solventes de reacción, y las relaciones E/S y alcohol/ácido citadas anteriormente.

Se comparó en ambos casos la reacción a 55 °C y a 30 °C. En la Figura III.2 se muestra el curso de la reacción de esterificación utilizando como biocatalizadores CAL B y CPL a las temperaturas establecidas en la obtención del compuesto 2-oxoglutarato de dihexadecilo (III-6).

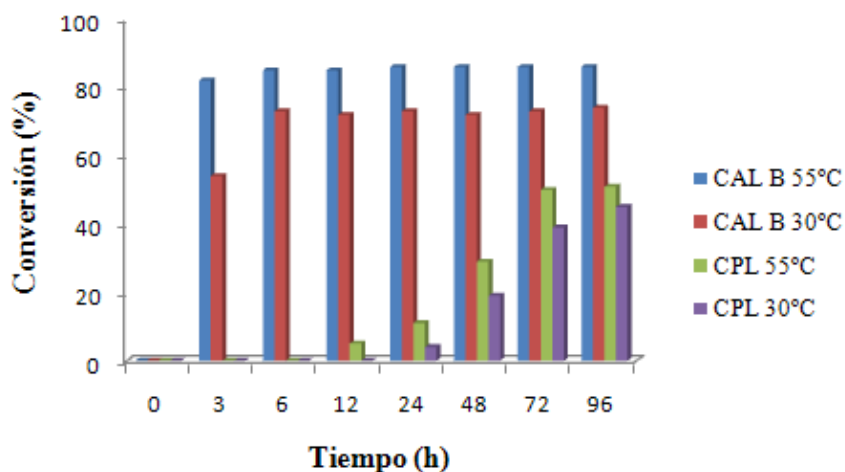


Figura III.2. Efecto de la temperatura y tiempo de reacción en la esterificación de ácido 2-oxoglutárico con el alcohol 1-hexadecanol catalizada por las lipasas CAL B y CPL. De acuerdo a los resultados presentados en la Figura III.2 podemos observar que la enzima CAL B permitió obtener el compuesto III-6, con una conversión de 86% a 55°C luego de

transcurridas 6 horas de reacción. La reacción llevada a cabo a temperaturas menores inclusive en períodos de tiempo mayores mostró una disminución de la actividad de CAL B, lo que fue evidenciado mediante un porcentaje de conversión menor. En el caso de CPL la variación de la actividad enzimática con la temperatura fue menos pronunciada. Se observó a las 72 horas de reacción y a 55 °C una conversión máxima del 50 %, mientras que a 30 °C la conversión fue del 45 % luego de transcurridas 96 horas de reacción.

III.2.2.3. Efecto de la longitud de cadena del alcohol

Una vez seleccionada la temperatura se decidió investigar el efecto de la longitud de la cadena del alcohol en la reacción de esterificación. Para ello se utilizaron como alcoholes modelo: de cadena media el 1-hexanol y de cadena larga el 1-hexadecanol. La relación E/S y alcohol/ácido fueron las mismas que se emplearon anteriormente (descriptas en la sección III.2.2.1). En la Figura III.3 se presentan los resultados de conversión para ambos alcoholes en función del tiempo, correspondientes a los biocatalizadores CAL B y CPL.

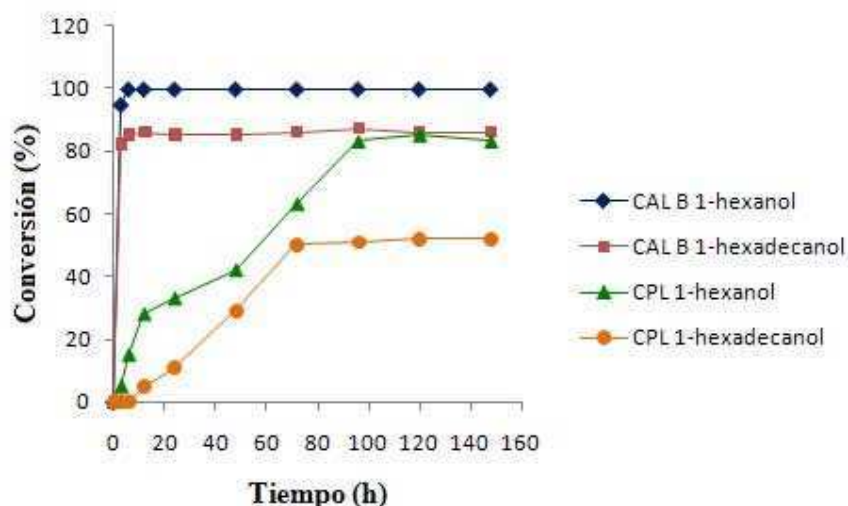


Figura III.3. Efecto de la longitud de la cadena del alcohol en la reacción de esterificación del ácido 2-oxoglutámico catalizada por lipasas

De acuerdo a los resultados obtenidos en estas condiciones se observó que la actividad de la enzima CAL B no varía notablemente con el aumento del número de átomos de carbono

del alcohol, mostrando una diferencia aproximada de 15% en la conversión con 1-hexanol y 1-hexadecanol. La lipasa de *Carica papaya* (CPL) en cambio resultó ser más eficiente (80% de conversión) en la reacción de esterificación del ácido con el alcohol de cadena media (1-hexanol) que con el de cadena larga (1-hexadecanol) que alcanzó una conversión del 50%.

III.2.2.4. Efecto de la relación alcohol/ácido (alcohol/sustrato)

Con el objeto de lograr una mejor conversión en la síntesis de ésteres de alcoholes de cadena larga catalizada por CPL se llevó a cabo un estudio sobre el efecto de la relación alcohol/sustrato.

En esta parte del trabajo se evaluó la reacción de esterificación utilizando el alcohol 1-hexadecanol en diferentes relaciones con respecto al sustrato (**III-1**) y aplicando como biocatalizadores CAL B y CPL. Las relaciones E/S implementadas y los solventes elegidos fueron los anteriormente mencionados (sección III.2.2.1). En la Tabla III.1 se presentan los resultados correspondientes a las distintas relaciones alcohol/sustrato ensayadas para la optimización de dicho parámetro.

Tabla III.1. Efecto de la relación alcohol/sustrato en la reacción de síntesis del compuesto **III-6** catalizada por CAL B y CPL

1-Hexadecanol / III-1	Conversión (%) ^a	
	CAL B ^b	CPL ^c
0.5	70	5
1.0	75	21
2.0	86	51
5.0	86	50

^a Conversión (%) del producto **III-6** determinado por CG

^b Condiciones de reacción: T: 55°C, t: 6 h, solvente: hexano, E/S: 2

^c Condiciones de reacción: T: 55°C, t: 72 h, solvente: DIPE, E/S: 15

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla III.1 puede observarse que la relación óptima para la relación alcohol/sustrato fue 2. Excesos del alcohol 1-hexadecanol no produjeron un aumento en el porcentaje de conversión.

III.2.2.5. Efecto de la relación Enzima/Sustrato (E/S)

Para completar la optimización de los parámetros de reacción, por último se decidió estudiar la relación Enzima/Sustrato para los biocatalizadores CAL B y CPL. La reacción se llevó a cabo a la temperatura, tiempo y solvente de reacción para cada uno de los catalizadores de acuerdo a lo establecido en la sección III.2.2.1, con una relación alcohol/sustrato de 2. Los resultados se muestran en la Tabla III.2.

Tabla III.2. Efecto de la relación Enzima/Sustrato en la reacción de síntesis del compuesto **III-6** catalizada por CAL B y CPL

E/S	Conversión (%) ^a	
	CAL B ^b	CPL ^c
0.25	20	n.d.
0.5	30	n.d.
1	78	5
2	86	10
5	85	20
10	86	35
15	84	50
20	85	50

^a Conversión % del producto **III-6** determinado por CG

^b Condiciones de reacción CAL B: T: 55°C, t: 6 h, solvente: hexano, 1-hexadecanol/**1**: 2

^c Condiciones de reacción CPL: T: 55°C, t: 72 h, solvente: DIPE, 1-hexadecanol / **1**: 2
n.d.: no determinado.

Los resultados presentados en la tabla muestran que la relación E/S óptima para el caso de la enzima CAL B, que permitió obtener una conversión máxima del 85%, fue 2. En el caso del biocatalizador CPL, la relación E/S para obtener la conversión máxima del 50%, fue mayor que la requerida por CAL B (15 para CPL y 2 para CAL B). Se podría concluir que CPL es menos eficiente que CAL B como catalizador de la reacción de esterificación ya que requiere mayores cantidades de enzima y se logran menores rendimientos.

Condiciones óptimas de reacción

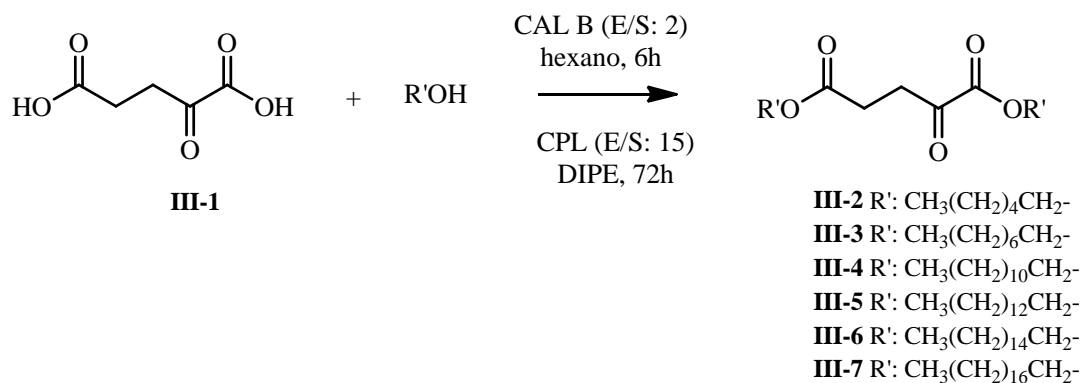
Los estudios descritos en las secciones previas permitieron determinar las condiciones óptimas de reacción para cada uno de los biocatalizadores empleados:

Enzima	CAL B	CPL
Solvente	Hexano	Diisopropil éter
Temperatura	55°C	55°C
Tiempo de reacción	6 h	72 h
Enzima/sustrato	2	15
Alcohol/sustrato	2	2

II.3. Síntesis de ésteres de ácido 2-oxoglutámico

Considerando los resultados obtenidos en la optimización de los parámetros de reacción de esterificación de ácido 2-oxoglutámico con el alcohol 1-hexadecanol en la preparación del compuesto **III-6**, se decidió sintetizar una serie de compuestos utilizando alcoholes de longitud de cadena media y larga. Los compuestos obtenidos, todos ellos novedosos, fueron purificados mediante cromatografía en columna y posteriormente identificados por métodos espectroscópicos: FTIR, RMN, EM de impacto electrónico y electrospray, y

microanálisis. En el Esquema III.4 se resumen las condiciones de reacción para los biocatalizadores CAL B y CPL.



Esquema III.4. Condiciones de reacción establecidas para CAL B y CPL

En la Tabla III.3 se presentan los alcoholes utilizados y los rendimientos obtenidos para cada uno de los compuestos sintetizados.

Tabla III.3. Síntesis de ésteres de ácido 2-oxoglutámico catalizada por CAL B y CPL

Producto	Alcohol	Rendimiento (%)	
		CAL B ^a	CPL ^b
III-2	R ¹ = CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₂ -	85	75
III-3	R ¹ = CH ₃ (CH ₂) ₆ CH ₂ -	78	65
III-4	R ¹ = CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CH ₂ -	72	53
III-5	R ¹ = CH ₃ (CH ₂) ₁₂ CH ₂ -	76	49
III-6	R ¹ = CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CH ₂ -	69	40
III-7	R ¹ = CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CO-	58	31

^a CAL B; 55°C; tiempo: 6 h; solvente: hexano; E/S: 2; alcohol/ sustrato: 2

^b CPL; 55°C; tiempo: 72 h; solvente: DIPE; E/S: 15; alcohol/sustrato: 2

Según los resultados presentados en la Tabla III.3 se observó que la actividad de ambas lipasas, CAL B y CPL, se ve afectada por la longitud de la cadena del alcohol. El rendimiento de los productos disminuye a medida que aumenta la longitud de la cadena. En el caso de CAL B estos resultados ya habían sido observados en nuestro laboratorio trabajando con terpenos, esteroides y vitaminas como sustratos en reacciones de acilación.^{17, 25-27}

Se han realizado estudios sobre las características estructurales de varias serina hidrolasas, dentro de las cuales encontramos a las lipasas y esterasas. En el sitio activo de este tipo de enzimas pueden definirse dos bolsillos, el bolsillo S donde se aloja el donador del grupo acilo, y el bolsillo A, donde se aloja el nucleófilo (alcohol en el caso de una esterificación o transesterificación). Se analizaron las estructuras de ambos sitios de unión y se encontró que la diferencia entre las esterasas y las lipasas consistía en las dimensiones del sitio de unión del acilo, siendo en las esterasas, como por ejemplo la acetilcolinesterasa, más pequeño que en las lipasas. Sin embargo la especificidad que presentan las lipasas en relación a la longitud de la cadena del grupo acilo no sólo se ve influenciada por las dimensiones del sitio activo sino también por los solventes empleados, soportes de inmovilización y otros factores estructurales.^{28,29}

Con respecto al sitio de unión del alcohol (A), en las lipasas es bastante más pequeño que en las esterasas. Esta podría ser la causa de la disminución en el rendimiento de reacción de CAL B a medida que aumenta la longitud de la cadena del alcohol usando esta enzima como biocatalizador.

En el caso de CPL, debido a que el látex extraído de *Carica papaya* constituye una mezcla de enzimas lipolíticas, no hay estudios detallados sobre la estructura del sitio activo que justifiquen este comportamiento. Sí se ha encontrado una referencia bibliográfica que indica que CPL es más activa en reacciones de esterificación utilizando alcoholes de cadena media.^{30,31}

Conclusión

Se lograron sintetizar de manera enzimática derivados de ácido 2-oxoglutámico. Esta metodología biotecnológica nos permitió preparar una serie de diésteres de cadena media

y larga por esterificación del mencionado ácido con los respectivos alcoholes. Todos los compuestos obtenidos fueron novedosos no habiendo sido reportados previamente en la literatura.

Los diésteres fueron obtenidos como únicos productos de reacción. Las condiciones suaves utilizadas como consecuencia de la aplicación de biocatalizadores impidieron la formación de productos secundarios de esterificación parcial que podrían haber provocado posteriores reacciones de descarboxilación. La obtención de los productos mediante síntesis química tradicional resulta un procedimiento complejo, con ácido *p*-toluensulfónico como catalizador en una reacción a reflujo en tolueno, lo que podría provocar la inestabilidad de los productos sintetizados.

Para llevar a cabo la síntesis y lograr las mejores condiciones de reacción se estudió la influencia de varios parámetros de la misma. Inicialmente se realizó un *screening* enzimático que permitió seleccionar los biocatalizadores CAL B y CPL, ya que ambos presentaron los resultados más satisfactorios. Los demás parámetros de reacción: solvente, temperatura, tiempo de reacción, relación alcohol/sustrato y Enzima/Sustrato fueron evaluados para lograr la optimización de la reacción de esterificación para cada uno de los biocatalizadores seleccionados.

Se observó que el rendimiento de la esterificación fue dependiente del largo de la cadena del alcohol, siendo ambos catalizadores menos eficientes para alcoholes de cadena larga.

CAL B presentó mejores rendimientos que CPL, y a su vez la reacción catalizada por esta última requirió cantidades mayores del biocatalizador.

La lipasa de *Candida antarctica* en su hospedador natural es sintetizada en sus dos isoformas, A y B. En la preparación comercial de CAL B, la isoforma B es purificada, clonada y el gen que codifica para dicha lipasa es transferido y expresado en células de *Aspergillus oryzae*. Luego, la enzima se inmoviliza sobre una resina acrílica macroporosa. En la producción de esta lipasa se implementa una tecnología de avanzada desarrollada por la empresa Novozymes, evidenciándose en el costo final del producto.

En contraste, CPL proviene de los frutos y tallos de *Carica papaya*, un agro-residuo ampliamente disponible y accesible. Ni su recolección ni su purificación requieren el uso de una tecnología sofisticada como la de CAL B, lo que la hace mucho menos costosa. Realizando una estimación de costos para la obtención de CPL podemos concluir que ésta presenta un costo 225 veces menor que CAL B (CAL B: 450 U\$D/10g, CPL: 2 U\$D/10g)

Por otra parte, el otorgarle valor agregado a este agro-residuo lo hace interesante desde el punto de vista económico. De esta manera no sólo se le da una aplicación útil al usarlo como fuente de biocatalizadores, sino que también, al retirar el material de desecho de los sectores de cultivo, se evita su acumulación y en consecuencia un desbalance ecológico que alteraría las características naturales de la región.

Bibliografía

1. Kolattukudy, P. E. *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes*; Elsevier Scientific Pub. Co. Amsterdam: New York, 1976.
2. Van Maarseveen, C.; Jetter, R. *Phytochemistry*, **2009**, *70*, 899-906.
3. Imbs, A. B.; Latyshev, N. A.; Dautova, T. N.; Latypov, Y. Y. *Mar Ecol Prog Ser*, **2010**, *409*, 65-75.
4. Manilla-Pérez, E.; Lange, A. B.; Hetzler, S.; Steinbüchel, A. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2010**, *86*, 1693-1706.
5. Mukherjee, K. D.; Weber, N.; Mangold, H. K.; Volm, M.; Richter, I. *Eur J. Biochem*, **1980**, *107*, 89-294.
6. Hamilton, R. J. *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*, The Oily Press Dundee, 1995.
7. Smitha, R. L.; Cohenb, S. M.; Doullc, J.; Ferond, V. J.; Goodmane, J. I.; Marnettf, L. J.; Portoghese, P. S.; Waddellh, W. J.; Wagneri, B. M.; Hallj, R. L.; Higleyk, N.A.; Lucas-Gavinl, C.; Adams, T. B. *Food Chem Toxicol*, **2005**, *43*, 345–363.
8. Lucena, I. L.; Saboya, R. M. A.; Oliveira, J. F. G.; Rodrigues, M. L.; Torres, A. E. B., Cavalcante Jr, C. L.; Parente Jr, E. J. S.; Silva, G. F.; Fernandes, F. A. N. *Fuel*, **2011**, *90*, 902-904.
9. Pinzi, S.; Gandría, L. M.; Arzamendi, G.; Ruiz, J. J.; Dorado, M. P. *Bioresource Technol*, **2011**, *102*, 1044-1050.
10. Campanella, A., Rustoy, E. M.; Baldessari, A.; Baltanás, M. A. *Bioresource Technol*, **2010**, *101*, 245-254.
11. Keng, P. S.; Basri, M.; Zakaria, M. R. S.; Rahman, M. B. A.; Ariff, A. B.; Rahman, R. N. Z. A. Salleh, A. B. *Ind Crops Prod*, *29*, 37-44.
12. Klemann, L. P.; Finley, J. W. 1989. Low Calorie Fat Mimetics Comprising Carboxy/carboxylate Esters. US Patent 4,830787, May 16.
13. Singh, S.; Bhadani, A.; Singh, B. *Ind Eng Chem Res*, **2007**, *46*, 2672-2676.
14. Bommarius AS, Riebel BR. 2004. *Biocatalysis, Fundamentals and Applications*. Weinheim, Wiley-VCH.
15. Carrea G, Riva S. 2008. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-aqueous Media*. Wiley-VCH, Weinheim.

16. Mukherjee, K. D.; Kiewitt, I. *J Agric Food Chem*, **1988**, *36*, 1333-1336.
17. Monsalve, L. N.; Rosselli, S.; Bruno, M.; Baldessari, A. *J Mol Catal B:Enzym*, **2009**, *57*, 40-47.
18. Rustoy, E. M.; Baldessari, A. *Eur J Org Chem*, **2005**, *21*, 4628-4632.
19. Monsalve, L. N.; Machado Rada, M. Y.; Ghini, A. A.; Baldessari, A. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 1721-1730.
20. Rustoy, E. M.; Baldessari, A. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, *15*, 3763-3768.
21. Ploetz, R. C. *Plant Dis.*, **2007**, *91*, 644-663.
22. Ploetz, R. C. 2007. Diseases of tropical perennial crops: Challenging problems in diverse environments. *Plant Dis.* 91:644-663.
23. Akoh CC, Yee LN. 1998. Lipase-catalyzed transesterification of primary terrene alcohols with vinyl esters in organic media. *J Mol Catalo: Enzymatic* 4:149-153.
24. Park DW, Haan S, Ahna IS, Lee TG, Kim HS, Kim WS. 2004. Enzymatic esterification of alfa-methylglucoside with acrylic/methacrylic acid in organic solvents. *J. Biotechnol* 107:151-160.
25. Rustoy, E. M., Ruiz Arias, I. E.; Baldessari, A. *Arkivoc*, **2005**, *12*, 175-188.
26. Bruttomesso, A. C.; Baldessari, A. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2004**, *29*, 149-153.
27. Baldessari, A., Mangone, C. P. *Biocatalysis and Biotransformation*, **2002**, *20*, 275-279.
28. Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. D. *Chem. Phys. Lipids*, **1998**, *93*, 67-80.
29. Tyagi, S.; Pleiss, J. *J. Biotechnol.*, **2006**, *124*, 108-116.
30. Domínguez de María, P.; Sinisterra, J. V.; Tsai, S. W.; Alcántara, A. R. *Biotechnol. Adv.*, **2006**, *24*, 493-499.
31. Abdelkafi, S.; Ogata, H.; Barouh, N.; Fouquet, B.; Lebrun, R.; Pina, M.; Scheirlinckx, F.; Villeneuve, P.; Carriere, F. *Biochim. Biophys. Acta*, **2009**, *1791*, 1048-1056.



Capítulo IV

Hidrocortisona

IV. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE DERIVADOS ACILADOS DE HIDROCORTISONA

IV.1. Introducción

Los glucocorticoides son una familia de drogas ampliamente utilizadas en medicina debido a sus numerosos efectos sobre los sistemas fisiológicos y su importancia radica en el hecho de que son capaces de inhibir procesos inflamatorios e inmunes que, en determinadas circunstancias, resultan perjudiciales para el organismo. Si bien este tipo de drogas presenta numerosos efectos adversos, los beneficios obtenidos mediante su implementación, hacen que éstos no sean tenidos en cuenta de manera rigurosa a la hora de ser considerados como agentes terapéuticos.

Dentro de esta gran familia encontramos a los glucocorticoides tópicos (GCT), los cuales constituyen unas de las drogas más comúnmente prescritas en dermatología.¹ Debido a sus propiedades vasoconstrictoras, son útiles en procesos antiinflamatorios, inmunosupresores y antiproliferativos,² por lo cual se los utiliza en tratamientos de psoriasis, dermatitis y, conjuntamente con otras drogas, en enfermedades autoinmunes.³ En general el tratamiento con GCT es efectivo, fácilmente administrable, tolerable por los pacientes y seguro cuando es aplicado correctamente.⁴

Uno de los sitios de acción de los glucocorticoides tópicos se encuentra en la dermis, donde las principales células son los fibroblastos. Estas células participan en la respuesta inflamatoria e inmune, y es precisamente en ellas donde se encuentran localizados los receptores de glucocorticoides. Otro sitio de acción es la epidermis, en donde las células capaces de unir este tipo de compuestos son los queratinocitos, que se encuentran altamente diferenciados.⁵ Estos últimos, a medida que van migrando hacia la superficie de la epidermis, mueren transformándose en corneocitos que, embebidos en una matriz lipídica, constituyen el estrato córneo de la piel. Este estrato tiene como función impedir la pérdida transepidérmica de agua y electrolitos constituyendo una verdadera interfase con el ambiente, conocida como

barrera cutánea (Figura IV.1).⁶ Por lo tanto para que los GCT ejerzan su acción deben atravesar esta barrera (absorción percutánea) y entrar en contacto con la dermis y epidermis.⁷

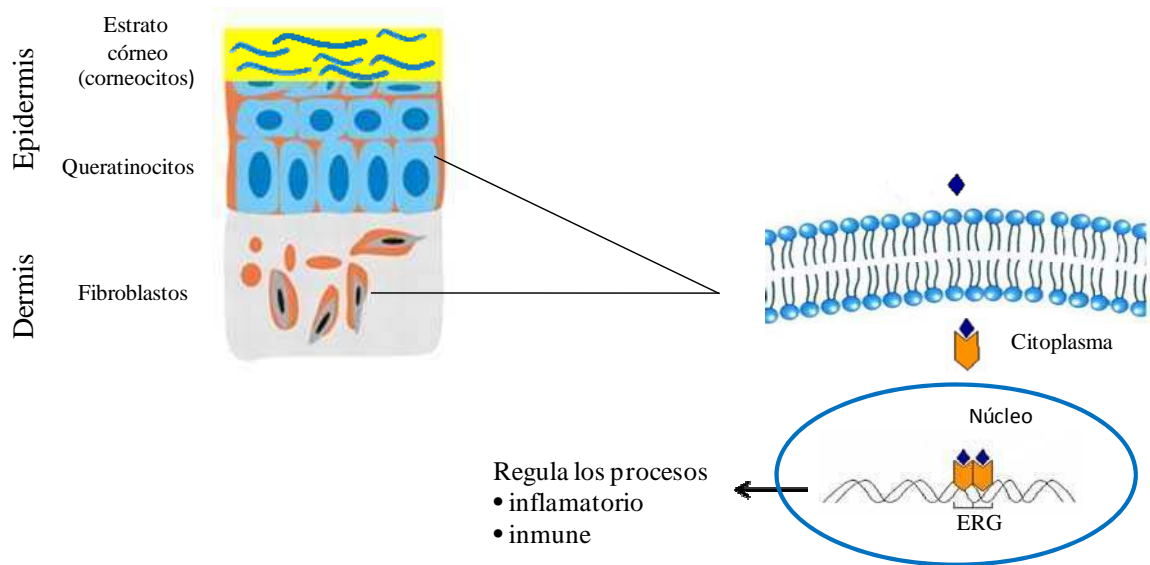


Figura IV.1. Esquema representativo de las capas de la piel, su composición celular y mecanismo de acción de glucocorticoides

Por lo explicado anteriormente el paso limitante para la acción de un GCT está determinado por la absorción percutánea. Por lo tanto la cantidad que llega al sitio de acción y por ende su biodisponibilidad, estará directamente asociada al transporte a través del estrato córneo.

La absorción percutánea de una droga de aplicación tópica presente en una determinada formulación es un proceso complejo⁸⁻⁹ y depende de varios factores como por ejemplo:¹⁰⁻¹¹

- características químicas de la molécula
- tipo de formulación
- condiciones fisiológicas de la piel

Su acción, potencia y efecto clínico involucra una serie de pasos consecutivos:

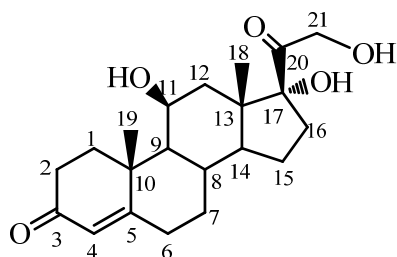
- liberación del GCT de la formulación
- tiempo de permanencia y concentración en el sitio de aplicación
- penetración en el estrato córneo
- difusión hacia la epidermis y dermis
- internalización al citoplasma

f) unión al receptor

Los pasos c-e dependen en gran medida de las características lipofílicas de la droga.

Los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores de los GCT vienen dados por una acción de regulación de la expresión génica. Los GCT ingresan al citoplasma de las células dianas por un proceso de difusión pasiva, dentro del citoplasma éstos se unen a su receptor formando un complejo que es traslocado al núcleo. Una vez dentro del mismo se unen a zonas del ADN llamadas ERG (elementos de respuesta a glucocorticoides) activando o reprimiendo ciertos genes relacionados con los procesos inflamatorio e inmune (Figura IV.1.).¹²

En los seres humanos la corteza suprarrenal sintetiza dos tipos de esteroides: glucocorticoides y mineralocorticoides. La hidrocortisona (comúnmente llamada cortisol) (**IV-1**) es el principal glucocorticoide y la aldosterona el mineralocorticoide más importante. La hidrocortisona es un pregneno con tres grupos hidroxilo en los carbonos 11, 17 y 21. De estos tres, el hidroxilo de configuración β en carbono 11 es esencial para su actividad tópica.



IV-1

A nivel hepático el hidroxilo del C-11 de la hidrocortisona es oxidado a cetona por el sistema 11- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa convirtiéndose en cortisona, la cual no presenta actividad biológica.¹³

Se han sintetizado numerosos derivados de hidrocortisona con mejores características farmacodinámicas que la hidrocortisona. Si bien **IV-1** es un glucocorticoide de baja potencia y corta duración en comparación a estos derivados sintéticos, sigue siendo la droga de preferencia en tratamientos prolongados, en áreas delicadas de la piel como la facial y en aplicaciones pediátricas.¹⁴

Dado que la eficacia del GCT depende de la absorción del mismo en el estrato córneo, la lipofilidad juega un rol importante en la acción de glucocorticoides de baja potencia, por lo cual es un factor clave a tener en cuenta.

La existencia de tres grupos hidroxilo en la molécula de hidrocortisona le confiere una polaridad elevada que ofrece resistencia a la absorción percutánea. Por lo tanto resulta interesante la obtención de derivados menos polares, es decir, más lipofílicos, que aumenten su biodisponibilidad y por ende su potencia y acción. En el presente capítulo se detalla la síntesis de ésteres de hidrocortisona de longitud de cadena variable con el objetivo de modificar sus propiedades farmacológicas.

En la Introducción se describió la importancia de las enzimas, y en particular de las lipasas, como catalizadores en reacciones de síntesis orgánica.

En el campo de los esteroides, la esterificación selectiva de esteroides polihidroxilados catalizada por lipasas, y su papel clave en la interconversión de grupos funcionales sustituyentes del esqueleto esteroide por medio de transformaciones regioselectivas, ha sido descrito.¹⁵⁻¹⁸

En nuestro laboratorio se han realizado numerosos trabajos empleando lipasas en reacciones de acilación y alcoholisis sobre una gran variedad de sustratos esteroidales.¹⁹⁻²³ En el caso de las reacciones de esterificación y transesterificación de esteroides polifuncionales, se ha observado que las lipasas pueden actuar sobre sustituyentes tanto del anillo A como del D.¹⁹⁻²¹ Se ha observado que en androstanos y pregnanos, la lipasa de *Candida rugosa* (CRL) mostró preferencia por los grupos hidroxilo o acilo del C-3, mientras que la lipasa de *Candida antarctica* B (CAL B) catalizaba las mismas reacciones sobre el anillo D (Figura IV.2).²¹

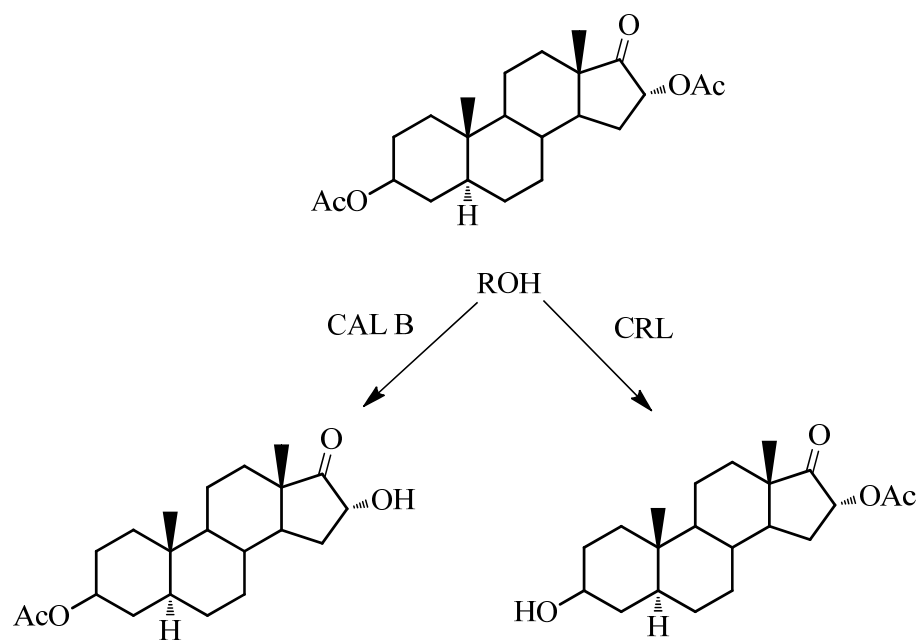


Figura IV.2. Alcohólisis de 17-oxo-5 α -androstan-3 β ,16 α -diil diacetato catalizada por las lipasas CAL B y CRL

Teniendo en cuenta estas propiedades, se han preparado series de ésteres de ácidos grasos de la dehidroepiandrosterona²², del 3,17- β -estradiol²³ y diferentes acetatos y succinatos de pregnanos hidroxilados en la posición 20.²⁴

Considerando la experiencia del laboratorio en síntesis de derivados esteroidales catalizada por lipasas y la importancia farmacológica de los ésteres derivados de hidrocortisona, decidimos aplicar la estrategia biocatalítica en la preparación de los mismos.

El trabajo se divide en dos partes:

- a) Acilación de hidrocortisona
- b) Alcohólisis de hidrocortisona peracetilada

IV.2. Acilación de hidrocortisona

IV.2.1. Optimización de las variables experimentales

IV.2.1.1. Selección de enzima y solvente

La búsqueda de las condiciones óptimas en la reacción de acilación enzimática de hidrocortisona comenzó con la evaluación de la actividad desarrollada por lipasas de diferentes orígenes. Como el comportamiento de las lipasas varía de acuerdo a la polaridad del solvente, se decidió estudiar al mismo tiempo la reacción en presencia de diferentes solventes, manteniendo fijas otras variables

Inicialmente las reacciones se llevaron a cabo a 55 °C usando una relación Enzima/Sustrato igual a 2, ácido esteárico como agente acilante en una relación de 10 con respecto al sustrato, agitando a 200 rpm durante 72 horas. En el caso de la reacción de acetilación, se llevó a cabo en las mismas condiciones excepto que se utilizó acetato de etilo como agente acilante, cumpliendo también la función de solvente en algunos experimentos.

Las lipasas involucradas fueron:

- a) lipasa de *Candida rugosa* (CRL),
- b) lipasa pancreática porcina (PPL),
- c) lipasa de *Candida antarctica* B (CAL B),
- d) lipasa de *Rhizomucor miehei* (LIP) y
- e) lipasa de *Pseudomonas sp.* (PS-C)

Se probaron cinco solventes: acetona, acetonitrilo, éter diisopropílico, tolueno y hexano.

El curso de todas las reacciones fue monitoreado por medio de cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

Los resultados obtenidos en la reacción de acetilación se muestran en la Tabla IV.1.

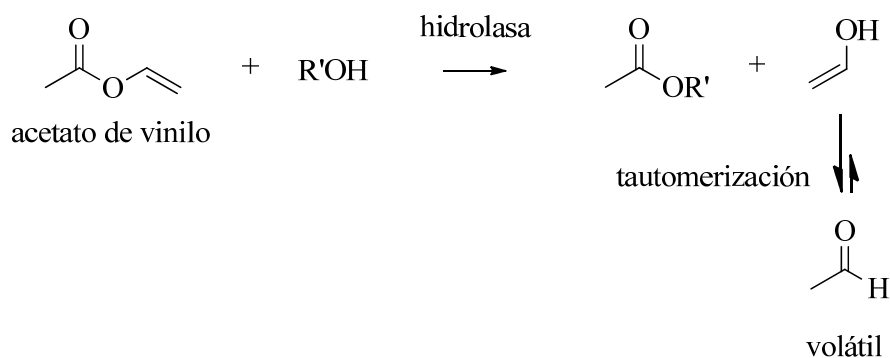
Tabla IV.1. Acetilación enzimática de hidrocortisona

Enzima	Solvente	Conversión (%)
CAL B	Acetato de etilo	100
CAL B	Acetona	10
CAL B	Acetonitrilo	10
CAL B	Éter diisopropílico	80
CRL	Acetato de etilo	-
CRL	Acetona	-
CRL	Acetonitrilo	-
CRL	Éter diisopropílico	50
PPL	Acetato de etilo	45
PPL	Acetona	-
PPL	Acetonitrilo	-
PPL	Éter diisopropílico	50
LIP	Acetato de etilo	75
LIP	Acetona	-
LIP	Acetonitrilo	-
LIP	Éter diisopropílico	60
PS-C	Acetato de etilo	-
PS-C	Acetona	-
PS-C	Acetonitrilo	-
PS-C	Éter diisopropílico	-

E/S: 2; T: 55 °C, agente acilante: acetato de etilo; Agente acilante/Sustrato: 4 excepto el caso de acetato de etilo como agente acilante y solvente.

Además de acetato de etilo, también se utilizaron como agentes acetilantes dos acetatos activados: acetato de vinilo y acetato de isopropenilo debido a su mayor eficiencia.

Se consideran a los acetatos de vinilo e isopropenilo como agentes acilantes activados debido a que el alcohol que se produce luego de la reacción de transesterificación tautomeriza al correspondiente compuesto carbonílico (acetaldehído o acetona) que siendo volátil, desplaza la reacción hacia la formación de producto.²⁵ En el Esquema IV.1 se muestra como ejemplo la transesterificación catalizada por una hidrolasa empleando el acetato de vinilo como agente acetilante activado.



Esquema IV.1. Reacción de transesterificación catalizada por una hidrolasa utilizando acetato de vinilo como agente acilante activado

Los resultados mostraron la misma conversión con acetato de etilo que con los acetatos activados pero con estos últimos requirió menor tiempo. Debido a que la reacción con acetato de etilo no requiere uso de cosolvente y considerando la menor toxicidad y costo del acetato de etilo, se eligió éste como agente acetilante.

Los resultados obtenidos en la reacción de acilación utilizando ácido esteárico se muestran en la Tabla IV.2. De acuerdo a estos resultados, observamos que el biocatalizador más eficiente para la reacción de acilación utilizando ácido esteárico como acilante fue CAL B.

Se observaron conversiones porcentuales elevadas cuando se emplearon como solvente de reacción hexano y tolueno.

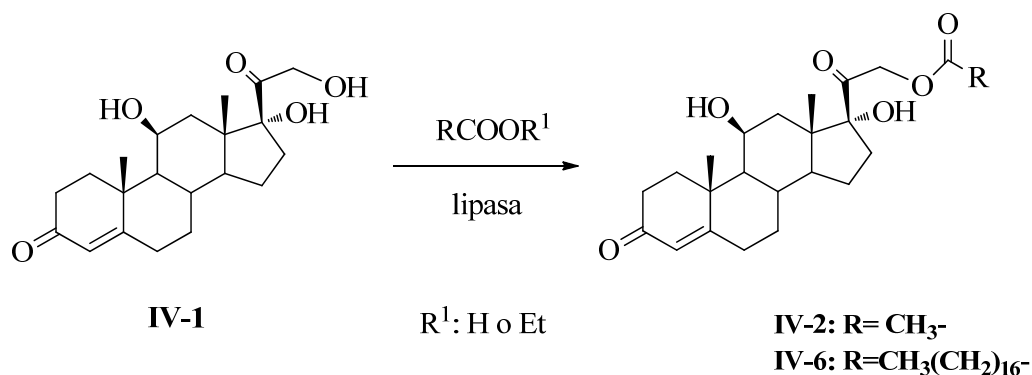
Tabla IV.2. Acilación enzimática de hidrocortisona utilizando como agente acilante ácido esteárico

Enzima	Solvente	Conversión (%)
CAL B	Acetona	40
CAL B	Acetonitrilo	45
CAL B	Tolueno	65
CAL B	Hexano	70
CRL	Acetona	40
CRL	Tolueno	40
CRL	Hexano	35
PPL	Acetona	30
PPL	Tolueno	35
PPL	Hexano	30
LIP	Acetona	30
LIP	Tolueno	50
LIP	Hexano	45
PS-C	Acetona	-
PS-C	Tolueno	-
PS-C	Hexano	-

E/S: 2; T: 55 °C; agente acilante: ácido esteárico; Agente acilante/Sustrato: 10

A través del análisis por CLAR se observó que en todos los casos, tanto en la acetilación como en la formación del estearato, se obtuvo solamente un único producto en cada caso. Los productos obtenidos en la reacción de acetilación y esterificación con ácido esteárico fueron purificados por cromatografía en columna y analizados por técnicas de RMN. En ambos casos en el espectro de RMN ¹H se observaron las señales correspondientes a la acilación del carbono 21, en el cual se ve el corrimiento del desplazamiento químico (δ) del metileno de la

posición 21. Para el acetato los datos fueron concordantes con la literatura.^{26,27} Para el caso del derivado novedoso obtenido a partir del ácido esteárico se observa un corrimiento del doblete de $\delta = 4,19$ y $4,61$ a $\delta = 4,85$ y $5,03$ ppm. De esta manera se determinó que en ambos casos la acilación ocurrió exclusivamente en el hidroxilo de carbono 21 de la hidrocortisona. Esto implica un comportamiento regioselectivo operado por la lipasa. En el Esquema IV.2 se presenta la reacción de acilación de hidrocortisona catalizada por lipasa utilizando acetato de etilo o ácido esteárico como agente acilante.



Esquema IV.2. Reacción de acilación de hidrocortisona catalizada por lipasa utilizando acetato de etilo o ácido esteárico como agente acilante

IV.2.1.2. Efecto del tiempo de reacción

A partir del análisis cromatográfico de la reacción en estudio se determinó que, para alcanzar la máxima conversión en la acilación regioselectiva en la posición 21 de la hidrocortisona, fueron suficientes 24 horas de reacción, ya que mayores tiempos no mejoraron los resultados. Este estudio se realizó utilizando tolueno como solvente, ácido esteárico como agente acilante y CAL B como biocatalizador a $55\text{ }^\circ\text{C}$.

IV.2.1.3. Influencia de la temperatura

Para evidenciar la influencia de la temperatura en la reacción de esterificación enzimática, la misma se llevó a cabo a 30 °C, 55 °C y 110 °C. En este estudio se empleó CAL B como catalizador en una relación E/S: 2, ácido esteárico como agente acilante utilizando una relación A/S: 10 y tolueno como solvente de reacción durante 24 horas. Los resultados se muestran en la Tabla IV.3, donde puede observarse el aumento del rendimiento de reacción con el incremento de la temperatura. La temperatura óptima resultó ser 110 °C.

Tabla IV.3. Efecto de la temperatura en la acilación enzimática de hidrocortisona

Producto	Temperatura (°C)	Rendimiento (%)
IV-6	30	23
IV-6	55	48
IV-6	110	67

E/S: 2; agente acilante: ácido esteárico; Agente acilante/Sustrato: 10

Es interesante mencionar que la regioselectividad enzimática no se vio afectada con el aumento de la temperatura obteniéndose a 110°C únicamente el compuesto **IV-6**.

IV.2.1.4. Efecto de la relación Enzima/Sustrato (E/S)

La relación óptima Enzima/Sustrato se ensayó utilizando cantidades variables de CAL B como catalizador, ácido esteárico como agente acilante (A/S: 10) y tolueno como solvente trabajando a 110 °C durante 24 h. Los resultados se muestran en la Figura IV.3, donde queda evidenciado que la relación E/S óptima es de 2.

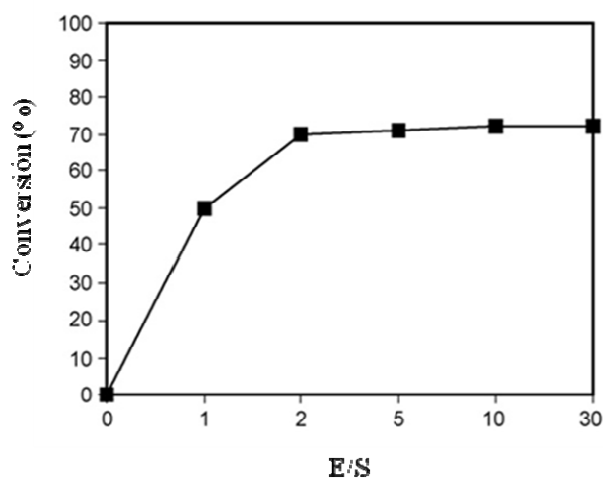


Figura IV.3. Efecto de la relación Enzima/Sustrato (E/S) en la acilación de hidrocortisona con ácido esteárico catalizada por CAL B

IV.2.1.5. Efecto de la relación Agente acilante/Sustrato (A/S)

Otro parámetro que se determinó en la reacción de esterificación de la hidrocortisona fue la relación Agente acilante/Sustrato (A/S). En la determinación de éste parámetro se utilizó como catalizador enzimático CAL B en una relación E/S: 2 y diferentes relaciones de ácido esteárico en tolueno durante 24 horas a 110 °C. Puede verse, según los resultados mostrados en la Tabla IV.4, que la relación A/S: 10 conduce a los mejores rendimientos y que mayores valores no aumentan el rendimiento de la reacción.

Tabla IV.4. Efecto de la relación agente Agente acilante/Sustrato (A/S)

A/S	Rendimiento (%)
1	17
5	31
10	67
15	69
20	68

E/S: 2; T: 110 °C; agente acilante: ácido esteárico

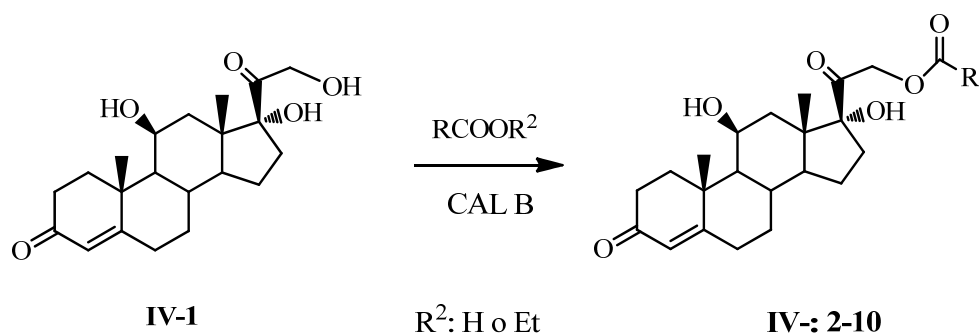
IV.2.1.5. Efecto de la naturaleza del agente acilante y procedimiento “one-pot”

En trabajos previos de acilación enzimática de esteroides y otros productos naturales llevados a cabo en nuestro laboratorio, se observó que la naturaleza del agente acilante influía sobre la eficiencia de la reacción. Los resultados obtenidos mostraron que, siendo sustrato la vitamina B₆, los ésteres etílicos de acilantes de cadena corta eran más reactivos que sus respectivos ácidos.²⁸ Trabajando con el mismo sustrato, este comportamiento se invertía en el caso de acilantes de cadena larga observándose mayor rendimiento cuando se utilizaban los ácidos libres como agentes acilantes.²⁹

Con el objeto de estudiar el comportamiento del agente acilante sobre el caso particular de la hidrocortisona se estudió la reacción usando ácido esteárico y su éster etílico. Los resultados mostraron que la regioselectividad no se modifica con la variación del agente acilante y que la reacción de transesterificación (con estearato de etilo) es más eficiente que la de esterificación (con ácido esteárico).

IV.2.1.6. Síntesis de monoésteres de hidrocortisona de longitud de cadena variable

Posteriormente se decidió estudiar la reacción de hidrocortisona con una serie de ácidos de longitud de cadena variable y sus respectivos ésteres etílicos como agentes acilantes de acuerdo al Esquema IV.3.



Esquema IV.3. Obtención de derivados acilados en posición 21 de hidrocortisona mediante catálisis enzimática (CAL B) empleando como agente acilante ácidos de longitud de cadena variable o sus ésteres etílicos correspondientes.

Los resultados se muestran en la Tabla IV.5.

Tabla IV.5. Efecto de la naturaleza del agente acilante, evaluación de diferentes agentes acilantes y procedimiento one-pot

Entrada	Producto	Agente acilantes	Rendimiento (%)		
			R ²		One-pot
			H	OEt	
1	IV-2	CH ₃ -COOR ²	-	92	-
2	IV-3	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOR ²	88	90	93
3	IV-4	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOR ²	91	90	92
4	IV-5	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOR ²	70	75	78
5	IV-6	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOR ²	61	65	71
6	IV-7	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOR ² <i>cis</i>	51	57	69
7	IV-8	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOR ² <i>trans</i>	52	62	68
8	IV-9	CH ₃ (CH ₂) ₃ (CH ₂ CH=CH) ₂ (CH ₂) ₇ COOR ² <i>cis, cis</i>	50	61	66
9	IV-10	CH ₃ (CH ₂ CH=CH) ₃ (CH ₂) ₇ COOR ² <i>cis, cis, cis</i>	30	49	59

E/S: 2; T: 55 °C; Agente acilante/Sustrato: 10

En todos los casos se obtuvo el monoéster de hidrocortisona en el hidroxilo de carbono 21 con rendimientos mayores utilizando los ésteres etílicos de los ácidos correspondientes como agentes acilantes, tal como se había observado en el caso del derivado de ácido esteárico (**IV-6** Tabla IV.5, entrada 5).

Debido a que los ésteres etílicos de los agentes acilantes pueden prepararse de manera enzimática y teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio se decidió intentar una reacción de dos pasos en una sola operación (*one-pot*).²⁴

En este caso el procedimiento *one-pot* involucra los siguientes pasos:

- 1) esterificación con etanol del agente acilante correspondiente para dar el éster etílico y
- 2) transesterificación del éster formado con el esteroide hidroxilado

En el mismo balón se colocó la hidrocortisona, el ácido carboxílico correspondiente, etanol, CAL B y tolueno como solvente. Según los resultados expuestos en la Tabla IV.5,

exceptuando el caso de acetilación en donde no se implementó esta estrategia, se vio que los mejores rendimientos fueron obtenidos utilizando este procedimiento, y que éstos eran aún mejores en el caso de agentes acilantes de cadena larga (Tabla IV.5, entrada 9). Por lo tanto se consideró que esta técnica fue la más conveniente para la preparación enzimática de derivados monoacilados de hidrocortisona en posición 21.

Cabe destacar que, tanto en la reacción de transesterificación como en la esterificación, los rendimientos dependieron del largo de la cadena del agente acilante disminuyendo a medida que aumentaba el número de carbonos de la misma.

Con respecto a los derivados insaturados, todos ellos con igual número de átomos de carbono en la cadena, también se observó una disminución en el rendimiento como consecuencia del aumento en el grado de insaturación (Tabla IV.5, entradas 6, 8 y 9). Los derivados monoinsaturados de 18 carbonos, preparados a partir de ácido oleico (configuración *Z*) (Tabla IV.5, entrada 6) y ácido eláidico (configuración *E*) (Tabla IV.5, entrada 7) dieron resultados similares mostrando que la estereoquímica de los dobles enlaces no afectó la reacción enzimática.

IV.2.1.7. Condiciones óptimas

A partir de los estudios realizados se determinaron las condiciones experimentales de reacción óptimas, las cuales fueron:

Enzima	CAL B
Solvente	Tolueno
Temperatura	110°C
Tiempo de reacción	24 h
Enzima/Sustrato	2
Agente acilante/sustrato	10
Procedimiento	<i>one-pot</i>

En estas condiciones se obtuvieron los derivados de hidrocortisona de manera regioselectiva y con los mejores rendimientos.

IV.3. Alcohólisis de hidrocortisona peracetilada

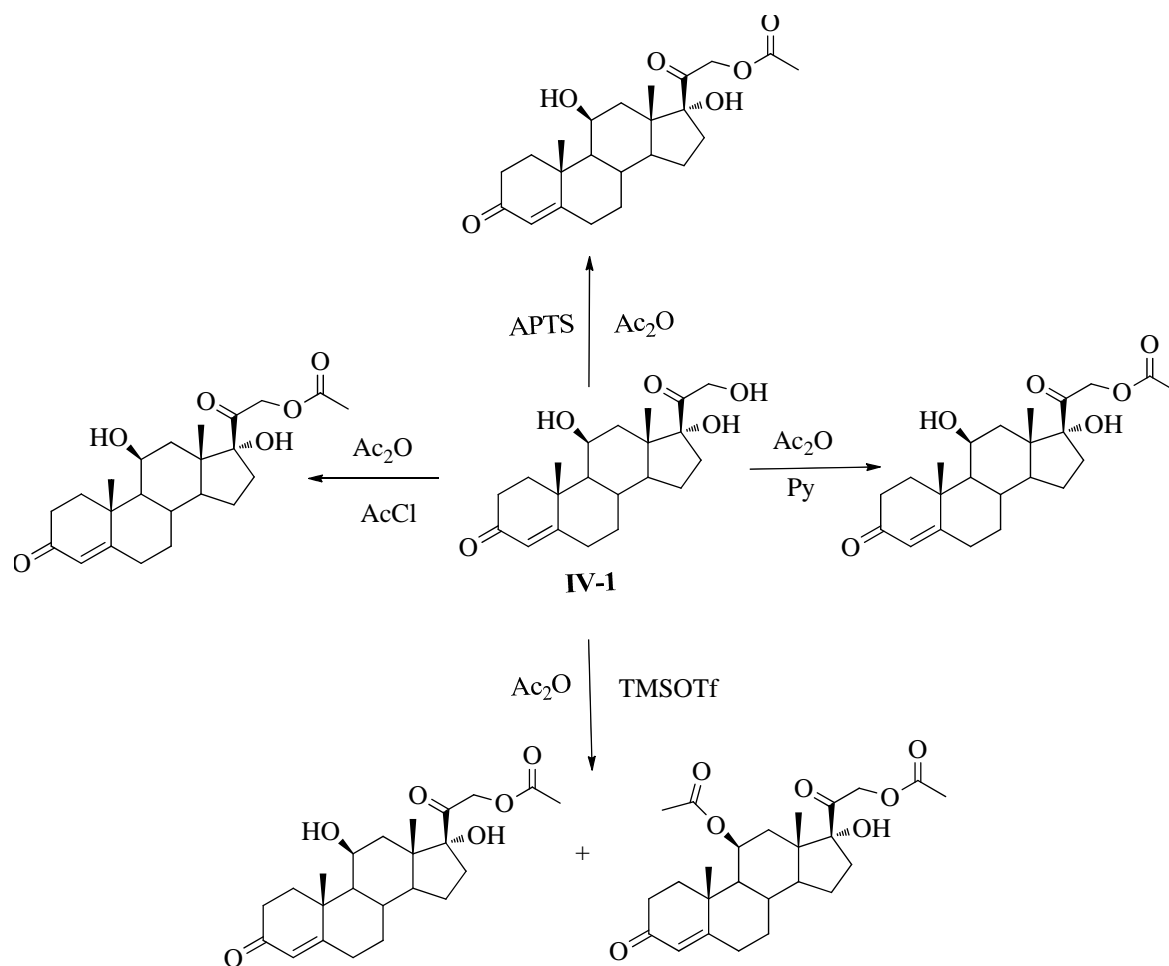
Con el objetivo de preparar derivados acetilados en otros hidroxilos del esqueleto esteroidal de la hidrocortisona se decidió utilizar otra estrategia. Ésta consiste en efectuar una alcohólisis enzimática del derivado peracetilado del esteroide en dos pasos de reacción:

- 1- peracetilación de hidrocortisona y
- 2- alcohólisis enzimática del derivado peracetilado

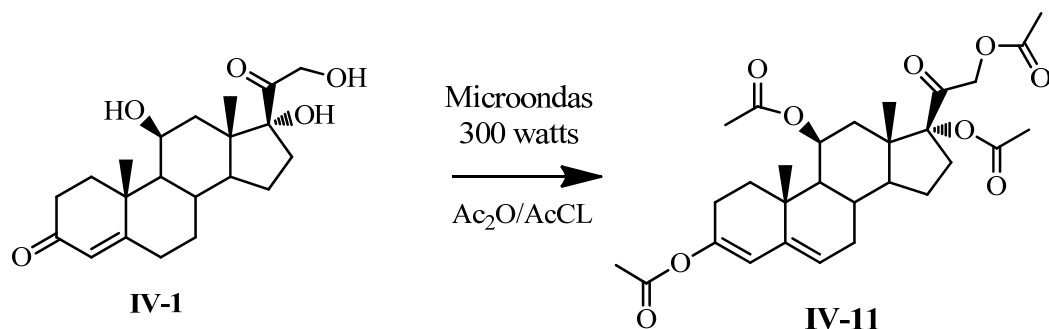
IV.3.1. Reacción de peracetilación de hidrocortisona

La reacción de peracetilación de hidrocortisona se llevó a cabo intentando varios procedimientos.

Inicialmente se utilizó anhídrido acético y varios catalizadores: piridina, ácido *p*-toluensulfónico y trimetilsilil trifluorometansulfonato de acuerdo al Esquema IV.4.



Esquema IV.4. Esquema de reacciones de acetilación de hidrocortisona catalizadas por diferentes compuestos químicos



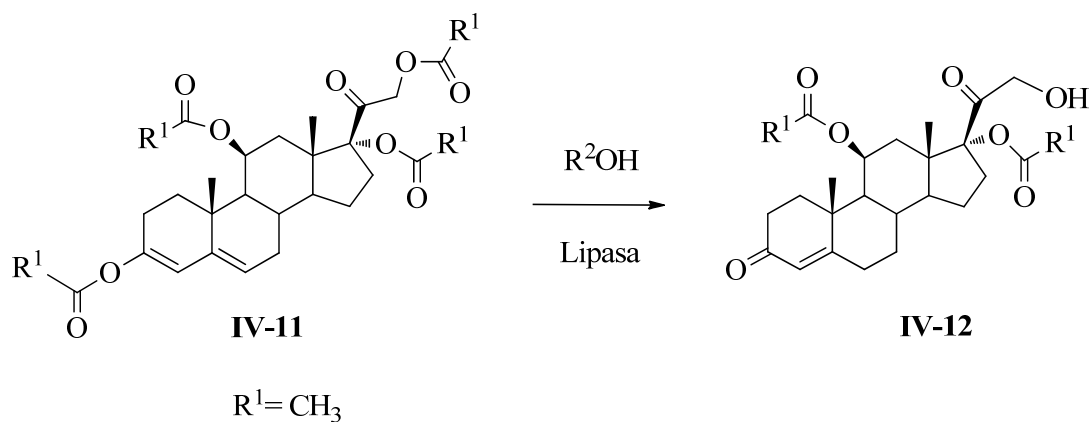
Esquema IV.5. Reacción de acetilación de hidrocortisona asistida por microondas. Obtención del compuesto peracetilado

Únicamente la combinación que nos permitió obtener el compuesto **IV-11** y con un alto rendimiento (88%) fue la mezcla de anhídrido acético:cloruro de acetilo en una relación 1.5 y utilizando un reactor monomodo de microondas a una potencia de 300 watts.

El compuesto obtenido se aisló y se purificó por cromatografía en columna. A partir de los datos espectroscópicos de RMN se confirmó la peracetilación de la hidrocortisona. En el espectro de ^1H se observó el doblete a $\delta = 4,64$ y $4,82$ ppm correspondientes al H-21 en el compuesto acetilado (**IV-11**) y la aparición de tres singuletes a $\delta = 2,16$; $2,14$ y $2,09$ ppm correspondientes a los metilos de los acetatos de las posiciones 3, 11 y 17 respectivamente. La aparición de una señal de protón vinílico del H-6 ($\delta = 5,33$ ppm) indicó la tautomerización cetoenólica del carbono 3 y por tal razón la capacidad de poder acetilarse en dicha posición. En el espectro de ^{13}C se observaron señales a $\delta = 170,2$; $169,3$; $170,0$ y $169,0$ ppm correspondientes a los carbonilos de los grupos acetatos de las posiciones 3, 11, 17 y 21 respectivamente.

IV.3.2. Reacción de alcoholisis enzimática del derivado peracetilado IV-11

En esta parte del trabajo se evaluaron las mismas enzimas que las ensayadas en la reacción de acilación. En este caso se utilizaron como nucleófilos: etanol, n-butanol y octanol, los cuales también actuaron en ciertos casos como solventes. En el caso de requerirse un solvente auxiliar se probaron: acetona, acetonitrilo y diisopropil éter (Esquema IV.6).



Esquema IV.6. Reacción de alcoholólisis del derivado peracetilado **IV-11** catalizada por lipasa

La identidad del compuesto **IV-12** se comprobó a través del estudio de sus datos espectroscópicos mediante el desplazamiento químico de las señales. En el espectro de ^1H la señal doblete correspondiente a los H-21 se convirtió en un singulete ancho a $\delta = 4,77$ ppm, indicando la desacetilación de la posición 21; las demás señales permanecieron casi sin modificaciones. En el ^{13}C la señal correspondiente al C-21 se corrió a zonas de campo correspondientes a carbonos unidos a un hidroxilo ($\delta = 66,9$ ppm) evidenciando la hidrólisis de esa posición del compuesto **IV-11**.

Únicamente la enzima CAL B y etanol actuando como nucleófilo y solvente, nos permitieron obtener de manera regioselectiva y con un alto rendimiento el derivado 3,11 β ,17 α -triacetoxi-21-hidroxipregna-3,5-dien-20-ona (**IV-12**); los resultados obtenidos para los distintos alcoholes se muestran en la Tabla IV.6.

Tabla IV.6. Alcohólisis regioselectiva del derivado peracetilado **IV-11** catalizada por CAL B

Alcohol	Rendimiento (%)
Etanol ^a	83
<i>n</i> -Butanol	11
Octanol	-

^a:Solvente y nucleófilo; solvente: hexano; Alcohol/Sustrato: 10, E/S: 2; T: 55 °C

De acuerdo a los resultados de la Tabla IV.6 se puede observar que el aumento de la longitud de la cadena alquílica del nucleófilo genera una disminución muy marcada en el rendimiento de reacción. Por lo tanto, el etanol es el nucleófilo más eficiente y actúa también como solvente. Como ventajas adicionales presenta baja toxicidad y alta volatilidad que permite eliminar su exceso fácilmente por evaporación.

IV.3.3. Condiciones óptimas de la reacción de alcohólisis enzimática

Las condiciones óptimas para la reacción de alcohólisis son:

Enzima	CAL B
Solvente	Etanol
Nucleófilo	Etanol
Temperatura	55°C
Tiempo de reacción	24 h
Enzima/Sustrato	2

De acuerdo a los resultados obtenidos la reacción de alcohólisis enzimática mostró ser regioselectiva dado que sólo el acetilo de la posición 21 fue eliminado. Si bien este tipo de reacción puede ser llevada a cabo utilizando estrategias de química orgánica tradicional, la aplicación de biocatalizadores en este caso ofrece entre otras ventajas el uso de reactivos

económicos y poco tóxicos para el medio ambiente como el etanol y la reutilización del biocatalizador. Después de 10 ciclos de reacción, la actividad de la enzima no se vio afectada notablemente.

Conclusión

En la transformación de glucocorticoides, los procedimientos biocatalíticos muestran numerosas ventajas en comparación con los métodos químicos tradicionales. En general, los métodos químicos de esterificación emplean agentes acilantes más tóxicos y menos compatibles con el medio ambiente, mientras que aquellos que emplean enzimas como catalizadores permiten la utilización de reactivos menos nocivos y con muy bajo impacto ambiental. En la primera parte de este capítulo se usaron ácidos carboxílicos y sus respectivos ésteres como agentes acilantes y lipasas como catalizadores en reacciones de esterificación y transesterificación. Éstas permitieron obtener de manera regioselectiva nueve derivados acilados en posición 21 de hidrocortisona, de los cuales ocho resultaron novedosos.

En la segunda parte se describe cómo, mediante la aplicación de síntesis química tradicional, se logró obtener un derivado peracetilado no reportado previamente en bibliografía. La alcoholisis enzimática regioselectiva del mismo generó un novedoso derivado triacetilado.

Con respecto a la reacción de acilación:

- De las enzimas ensayadas, CAL B catalizó la reacción de manera regioselectiva obteniéndose los rendimientos más altos.
- El estudio de agentes acilantes de longitud de cadena corta, media y larga, con distinto grado de insaturación y diferente estereoquímica permite concluir que los rendimientos de reacción dependen de la longitud de la misma y del número de insaturaciones, no así de la estereoquímica del doble enlace.
- Con respecto a la naturaleza del agente acilante, se utilizaron ácidos carboxílicos y sus correspondientes ésteres etílicos, resultando estos últimos más efectivos.

- Los ésteres etílicos de los ácidos carboxílicos como agentes acilantes también fueron preparados enzimáticamente en presencia del esteroide a través de la metodología *one pot*. Ésta estrategia permitió obtener mejores rendimientos de reacción y por lo tanto consiste en una metodología conveniente.
- La lipasa CAL B soportó altas temperaturas al utilizar tolueno a reflujo como solvente. La enzima luego de la reacción no se inactivó y pudo volver a utilizarse en 9 reacciones posteriores sin pérdidas significativas en el rendimiento.

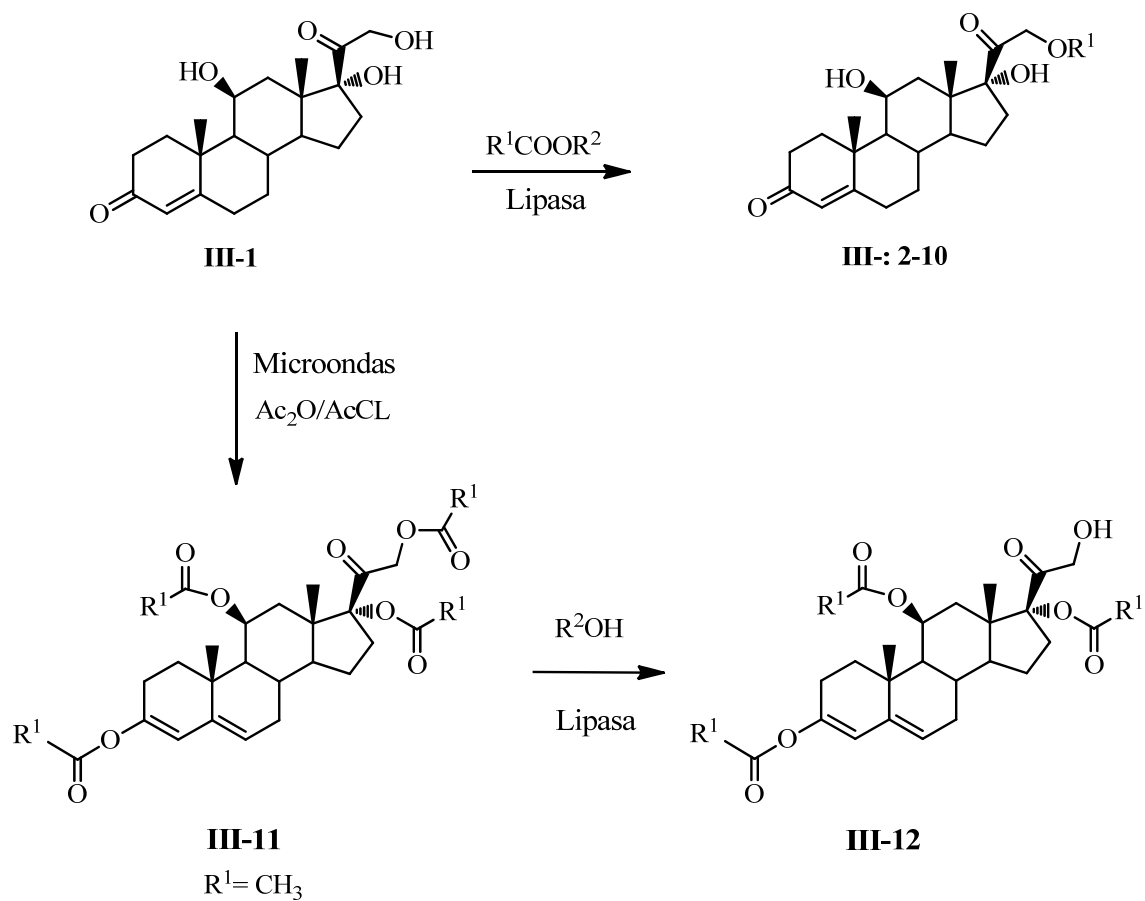
Con respecto a la reacción de peracetilación química:

- Dado que los métodos tradicionales de acetilación no fueron efectivos en la síntesis del derivado peracetilado de hidrocortisona, se requirió de la mezcla de anhídrido acético y cloruro de acetilo y la asistencia de microondas para su obtención.

Con respecto a la reacción de alcoholísis:

- El uso de CAL B y de etanol como nucleófilo y solvente permitió obtener con alto rendimiento y de manera regioselectiva el derivado monohidroxilado en posición 21.

En el Esquema IV.7 se resume el trabajo de síntesis llevado a cabo en el presente capítulo.



Esquema IV.7. Esquema de síntesis quimioenzimático de derivados de hidrocortisona

Bibliografía

1. Hughes, J.; Rustin, M. *Clin Dermatol*, **1997**, *15*, 715–21.
2. Munk, A. Glucorticoid biology—a historical perspective. In: Goulding NJ, Flower RJ, editors. Basel: Birkhauser Verlag; 2001. p. 17–34.
3. Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11th ed. New York: The Mc-Graw Hill Companies, Inc; 2006.
4. Wiedersberg, S.; Leopold, C. S.; Guy, R. H. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2008**, *68*, 453–66.
5. Ponc, M., Kempenaar, J. A.; De Kloet, E. R. *J. Invest. Dermatol.*, **1981**, *76*, 211–214.
6. Anderson, R. L.; Cassidy, J. M. *J. Invest. Dermatol.*, **1973**, *61*, 30–32.
7. Scheuplein, R. J., Blank, I. H. *Physiol. Rev.*, **1971**, *51*, 702–747.
8. Higuchi, T. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **1960**, *11*, 85–97.
9. Williams, R. L.; Riviere, J. E., *I. Theory, J. Pharm. Sci.*, **1995**, *84*, 599–608.
10. Cross, S. E.; Magnusson, B. M., Winckle, G.; Anissimov, Y. G., Roberts, M. S. *J. Invest. Dermatol.*, **2003**, *120*, 759–764.
11. Caron, D.; Queille-Roussel, C.; Shah, V. P.; Schaefer, H. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **1990**, *23*, 458–462.
12. Oakley, R. H.; Cidlowski, J. A. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **1993**, *3*, 63–88.
13. Kasuya, Y.; Ishimaru, H.; Shibasaki, H.; Furuta, T. *Steroids*, **1998**, *63*, 122–9.
14. Brazzini, B.; Pimpinelli, N. *Am J Clin Dermatol*, **2002**, *3*, 47–58.
15. Ferrero, M.; Gotor, V. In: *Stereoselective Biocatalysis*; Patel, R. M. Ed.; Marcel Dekker: New York, **2000**; pp 579-631.
16. Cruz Silva, M. M.; Riva, S.; Sá e Melo, M. L. *Tetrahedron*, **2005**, *64*, 3065-3073.
17. Secundo, F.; Carrea, G., De Amici, M.; Joppolo di Ventimiglia, S.; Dordick, J. S. *Biotechnol. Bioeng.*, **2003**, *81*, 391-396.
18. Cruz Silva, M. M.; Riva, S; Sá e Melo, M. L. *Tetrahedron Asymmetry*, **2004**, *15*, 1173-1179.
19. Baldessari, A.; Maier, M. S.; Gros, E. G.; *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 4349-4352.
20. Baldessari, A.; Bruttomeso, A. C.; Gros, E. G. *Helv. Chim. Acta*, **1996**, *79*, 999-1004.
21. Bruttomeso, A. C.; Baldessari, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, *29*, 149-153.
22. Bruttomeso, A. C.; Tiscornia, A.; Baldessari, A., *Biocatal. & Biotransf.*, **2004**, *22*, 215-220.

23. Rustoy, E. M.; Ruiz Arias, I. E.; Baldessari, A. *Arkivoc*, **2005**, (xii), 175-180.
24. Monsalve, L. N.; Machado Rada, M. Y.; Ghini, A. A.; Baldessari, A. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 1721-1730.
25. Carrera, G.; Riva, S. *Angew. Chem. Int. Ed*, **2000**, *39*, 2226-2254.
26. Kirk, D. N.; Toms, H. C.; Douglas, C.; White, K. A. *J Chem Soc Perkin Trans II*, **1990**, *9*, 1567-1594.
27. Hickey, J. P.; Butler, I. S.; Pouskouleli, G. *J Magn Reson*, **1969**, *38*, 501-506.
28. Baldessari, A.; Mangone, C. P.; Gros, E. G. *Helvetica Chimica Acta*, 1998, *81*, 2407-2413.
29. Baldessari, A.; Mangone, C.P. *Biocatalysis and Biotransformation*, **2002**, *20*, 275-279.



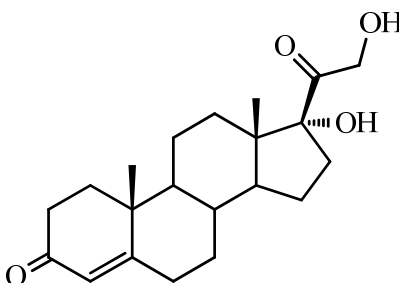
Capítulo V

Cortexolona

V. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE UNA LIPASA HETERÓLOGA EN SISTEMAS ESTEROIDALES: ACETILACIÓN DE CORTEXOLONA

V.1. Introducción

Como se mencionó anteriormente, los corticosteroides son los fármacos más frecuentemente empleados en el tratamiento de patologías inflamatorias y proliferativas de la piel.¹ Dentro de esta familia de drogas se encuentran la cortexolona (**V-1**) y el propionato de cortexolona, ambas presentan una alta actividad antiandrogénica, lo que las hace muy utilizadas en tratamientos dérmicos como el acné vulgaris.²



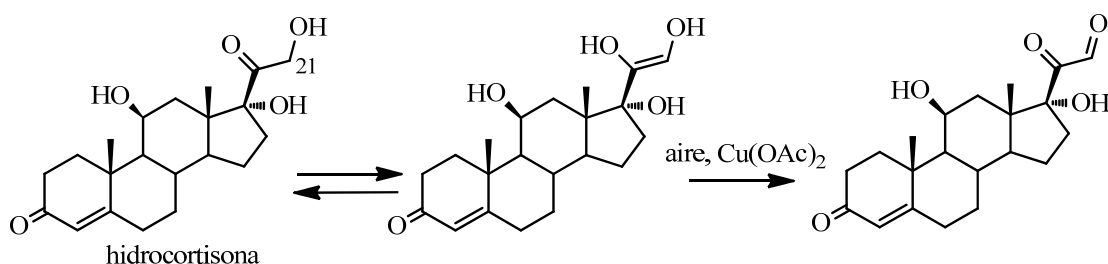
cortexolona (**V-1**)

Por otra parte, la cortexolona presenta potencial aplicación en tratamientos oncológicos, dado que puede formar parte de un conjugado con arabinosilcitosina (citarabina). Esta droga se utiliza en tratamientos neoplásicos hematológicos. La conjugación de este compuesto con cortexolona le permite aumentar su lipofilicidad y estabilidad, incrementando de esta manera su vida media.³

Si bien la cortexolona y su propionato presentan numerosos efectos benéficos cabe destacar que en aplicaciones tópicas pueden causar dermatitis alérgica de contacto.⁴ Este efecto se produce debido a la formación de intermediarios reactivos que son generados durante procesos metabólicos en la piel, modificando las cadenas laterales de los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas, generándose de esta manera proteínas diferentes que son reconocidas como extrañas por el sistema inmune.⁵ Trabajando con

hidrocortisona (Esquema V.1.), Wilkinson y Jones plantearon un mecanismo por el cual los corticoides pueden ser oxidados a 21-dehidro-derivados, formándose ceto-aldehídos capaces de reaccionar con el grupo amino de las argininas y provocando la modificación de las proteínas.⁶

El hidroxilo de la posición 21 de los corticosteroides es altamente reactivo en reacciones de oxidación. Estos compuestos en solución metanólica, expuestos al aire y utilizando como catalizador acetato cúprico, son fácilmente oxidados a glioxales,⁷ como se puede apreciar en el Esquema V.1.



Esquema.V.1. Reacción de oxidación de hidrocortisona catalizada por acetato cúprico (Cu(OAc)₂)

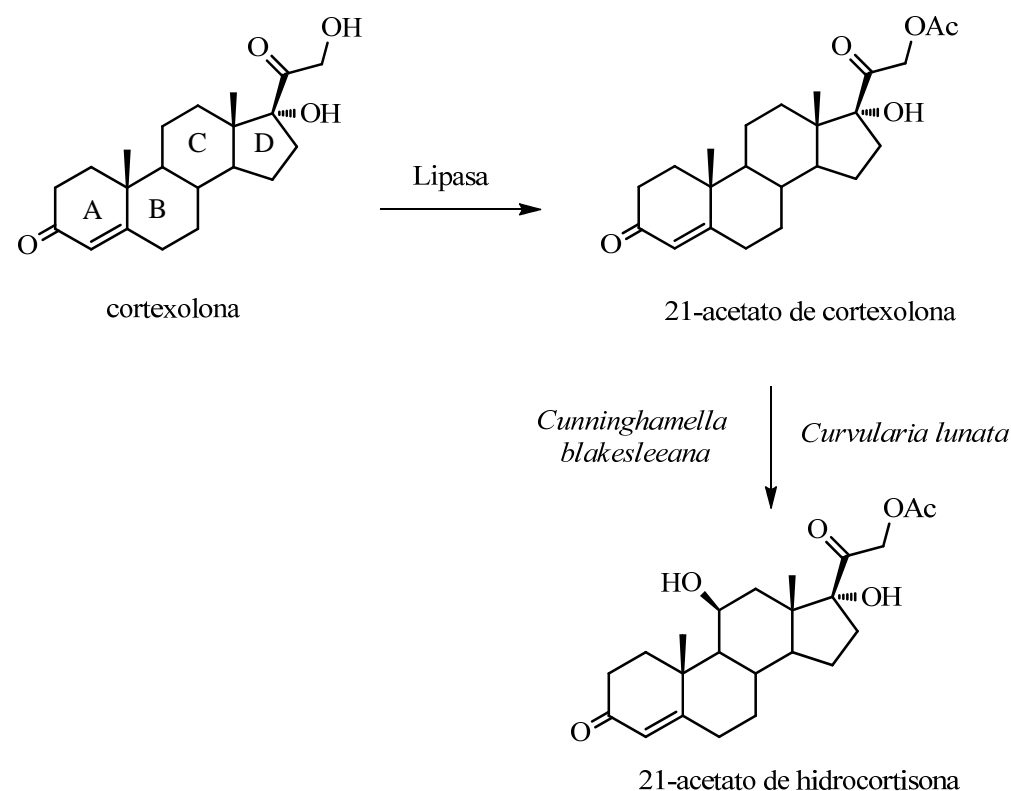
Por esta razón, en la preparación de derivados acilados de corticoides debe evitarse este tipo de reacciones no deseadas y la preparación de 21 derivados en condiciones suaves, que eviten las reacciones de oxidación, resulta interesante desde el punto de vista sintético.

Con el objetivo de obtener el derivado acetilado en la posición 21 de cortexolona decidimos aplicar Biocatálisis como estrategia de síntesis.

La elección de este sustrato y esta metodología se basa en las siguientes razones:

- El producto de reacción es interesante desde el punto de vista farmacéutico
- La estructura rígida del sustrato esteroide presenta un buen ejemplo para estudiar el comportamiento de una enzima no comercial

- el 21-acetato de cortexolona es un sustrato capaz de ser biotransformado a 21-acetato de hidrocortisona. De acuerdo el Esquema V.2 se puede observar que, partiendo de cortexolona, a través de la aplicación sucesiva de dos pasos biocatalíticos se obtienen dos productos farmacológicamente activos: 21-acetato de cortexolona y 21-acetato de hidrocortisona.



Esquema V.2. Biotransformación de 21-acetato de cortexolona a 21-acetato de hidrocortisona

Existe una extensa bibliografía en relación a ensayos de biotransformación utilizando como sustratos compuestos esteroidales. Teniendo en cuenta trabajos relacionados con nuestro esteroide de interés, se ha evaluado una serie de hongos filamentosos correspondientes a cepas patrones y aislamientos de suelo. De las cepas ensayadas, *Curvularia lunata*⁸ y *Cunninghamella blakesleeana*⁹ fueron capaces de introducir un hidroxilo en la posición 11 del anillo C del esteroide de manera regio- y

enantioselectiva. Con las cepas ensayadas se obtuvieron altos rendimientos de 21-acetato de hidrocortisona cuando el sustrato inicial fue 21-acetato de cortexolona.

Cabe destacar que la eficiencia y la regioselectividad del proceso de biotransformación están fuertemente influenciadas por la estructura y sustituciones que presente la molécula del esteroide.

Con respecto a la síntesis de 21-acetato de cortexolona, existe sólo una referencia bibliográfica que describe su obtención mediante síntesis química tradicional a partir de pregnenolona en 6 pasos. El 21 monoéster puro es útil en aplicaciones farmacológicas y ensayos biológicos.¹⁰

Como ya se ha mencionado, las lipasas son muy utilizadas como biocatalizadores en la producción, aún a nivel industrial, de productos biológicamente activos.

En bibliografía existe sólo un antecedente del uso de lipasas en la modificación de cortexolona informado por el grupo de Ferraboschi. En una reacción catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* (CRL) obtuvo 17-propionato de cortexolona utilizado en formulaciones de aplicación tópica.¹¹

Considerando el interés generado por la acción de las lipasas, la búsqueda continua de nuevas fuentes de lipasas y el rango de compuestos capaces de ser sustratos de estas enzimas es una actividad incesante en el ámbito de la Biocatálisis.

Para su aplicación completa estos nuevos biocatalizadores deben ser bien caracterizados y su producción llevada a escala industrial. En este sentido la producción de proteínas recombinantes resulta una estrategia muy útil para incrementar los niveles de productividad y facilitar su purificación.

Teniendo en cuenta estas consideraciones decidimos investigar la actividad de una lipasa no comercial proveniente del hongo *Rhizopus oryzae*, en su forma recombinante expresada en la levadura *Pichia pastoris*.

V.2. Obtención de la lipasa heteróloga de *Rhizopus oryzae*

Rhizopus es un género de mohos que incluye una serie de especies de hongos filamentosos hallados en el suelo que suelen degradar frutos y vegetales. Dentro de estos hongos filamentosos se encuentra *Rhizopus oryzae* del cual se ha aislado una lipasa extracelular conocida como ROL (abreviatura de *Rhizopus oryzae* lipase).

Las distintas especies del género *Rhizopus* son productoras de lipasas, actualmente se conocen 30 lipasas diferentes biosintetizadas por éstas, todas ellas utilizadas en la modificación de lípidos.

El gen que codifica para la lipasa extracelular de *Rhizopus oryzae* fue clonado y caracterizado y la expresión de la lipasa heteróloga de *R. oryzae* (ROL) fue realizada primeramente en células de *Escherichia coli*.¹² El inconveniente que presentó este sistema de expresión fue que la proteína sintetizada formaba cuerpos de inclusión que dificultaban notablemente la purificación de la lipasa. Se probó otro sistema de expresión utilizando como hospedador *S. cerevisiae* pero no se obtuvieron niveles de expresión satisfactorios.

Pichia pastoris, al igual que los microorganismos mencionados anteriormente, es muy utilizada como sistema de expresión. Es una levadura metiltrófica facultativa ya que utiliza metanol como fuente de carbono y energía. Las levaduras metiltróficas son muy importantes desde el punto de vista biotecnológico debido a que son excelentes células hospedadoras de proteínas heterólogas. Esta levadura presenta ciertas características que la hacen el hospedador eucariota de elección de expresión proteica frente a otros sistemas de expresión. Una de las características, que sin dudas es la principal, es la presencia de un promotor fuerte (alto nivel de transcripción) y altamente regulable: promotor de la alcohol oxidasa (*PAOXI*). Otra característica que cabe resaltar es que *P. pastoris* es un microorganismo preferentemente respiratorio, de esta manera se evita la producción de productos fermentativos tóxicos para las células lo que facilita su cultivo a elevadas densidades celulares. Esta propiedad es muy importante dado que la expresión de proteínas heterólogas está asociada al crecimiento celular.

En 1998 Minning y col. utilizaron *Pichia pastoris* y metanol como única fuente de carbono para la expresión de ROL. Obtuvieron altos niveles de expresión de la lipasa recombinante (60 mg de enzima activa por litro de cultivo) con propiedades similares a la ROL nativa. La ROL recombinante fue caracterizada y su actividad específica resultó 40 veces superior a la presentada por la ROL comercial.¹³

Considerando la metodología citada anteriormente, el grupo dirigido por el Dr. Francisco Valero llevó a cabo estudios de expresión de ROL utilizando como sistema de expresión cepas mutantes de *P. pastoris*.¹⁴ Evaluaron el efecto que presentaba la mezcla de sustratos sorbitol:metanol como fuente de carbono en el crecimiento de estos

microorganismos en biorreactores. De esta manera lograron optimizar las condiciones del bioproceso y aumentaron 1,35 veces la expresión de la lipasa heteróloga.

La lipasa de *Rhizopus oryzae* en su forma nativa o recombinante, inmovilizada en diversos soportes ha sido utilizada como biocatalizador en variados procesos sintéticos. Considerando sus características de regioselectividad, generó resultados satisfactorios en síntesis de variados productos: sustitutos de leche humana,¹⁵ triglicéridos de bajo contenido calórico,¹⁶ compuestos que contribuyen al flavor,^{17,18} resoluciones enzimáticas¹⁹ y en producción de biodiesel.²⁰

V.3. Inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae*

V.3.1. Ingeniería Conformacional aplicada a lipasas

En ciertas oportunidades las lipasas presentan baja selectividad por el sustrato a reaccionar con respecto a su sustrato natural, son poco estables en las condiciones de trabajo y son difíciles de recuperar y reutilizar. Para subsanar estos inconvenientes se han diseñado y desarrollado metodologías precisas. La Ingeniería Conformacional, a través de diferentes protocolos de inmovilización, ha brindado un aporte muy interesante permitiendo modular el comportamiento de diferentes lipasas que sufren grandes cambios conformacionales durante la catálisis.^{21,22} Los diferentes protocolos para la inmovilización de lipasas permiten controlar:

- la orientación de la enzima en el soporte,
- la variación de rigidez de las lipasas inmovilizadas y
- los micro-ambientes que rodean a las enzimas inmovilizadas.

Por lo tanto, la inmovilización permite generar varios biocatalizadores con propiedades catalíticas diferentes a partir de una misma lipasa.^{23,24}

Teniendo en cuenta estas consideraciones se decidió estudiar la reacción de acetilación del corticoide cortexolona catalizada por la lipasa recombinante de *Rhizopus oryzae* (ROL):

- ✓ en su forma nativa (ROL0)

- ✓ inmovilizada en diferentes soportes (ROL1, ROL2 y ROL3)

La lipasa heteróloga de *Rhizopus oryzae* en su forma libre (ROL0) fue provista por el grupo de investigación dirigido por el Dr. Francisco Valero, del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Barcelona.

V.3.2. Inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae* en diferentes soportes

A primera vista se podría pensar que las lipasas no difieren de las esterasas, si se considera solamente su función hidrolítica en ésteres. Sin embargo las lipasas en su sitio activo presentan, a diferencia de las esterasas, una cubierta o tapa formada por una hélice α anfifílica o un lazo.^{25,26} Esta tapa se encuentra protegiendo el sitio activo de la lipasa impidiendo la entrada del sustrato.

Se ha propuesto que las lipasas en su forma inactiva, se encuentran en una conformación con la tapa cerrada. En presencia de una interfase hidrofóbica, estas enzimas se adsorben a la misma, dejando el sitio activo al descubierto y con capacidad para aceptar al sustrato (conformación abierta o forma activa) (Figura V.1).

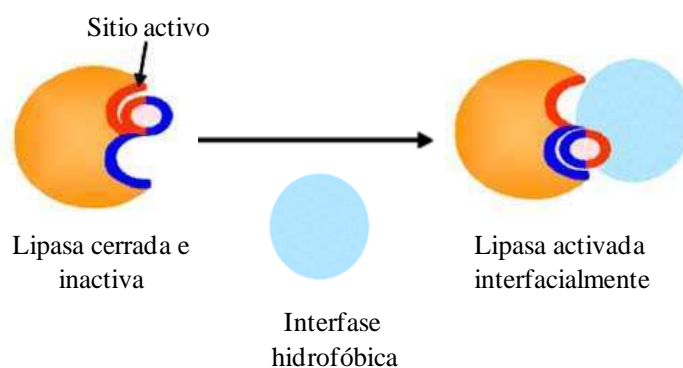


Figura V.1. Activación de la lipasa por una interfase hidrofóbica.

Esta activación mediante una interfase hidrofóbica es necesaria para que las lipasas presenten actividad biológica.

En medio acuoso, las lipasas se encuentran en equilibrio entre la conformación cerrada y la abierta lo que les permite tener cierto grado de actividad aún en ausencia de la interfase hidrofóbica. Aún así, la conformación abierta es más desfavorable energéticamente (Figura V.2).^{27,28}

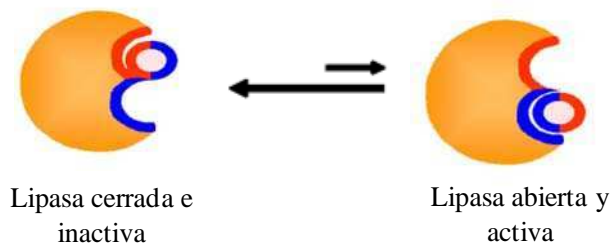


Figura V.2. Equilibrio establecido entre las dos conformaciones de la lipasa (conformación inactiva y activa)

Pero en medios no convencionales, por ejemplo en presencia de solventes orgánicos, las lipasas pueden sufrir cambios conformacionales que, alterando fácilmente el sitio activo, provocan la pérdida de su actividad catalítica. Como hemos comentado anteriormente en este trabajo de tesis, la inmovilización es una estrategia apropiada en la resolución de problemas de cambios conformacionales de las enzimas cuando las mismas son expuestas a medios no acuosos. Debido a que el sitio activo es alterable fácilmente, en la inmovilización se busca implicar zonas de la proteína alejadas del mismo.

Las diferentes técnicas de inmovilización permiten favorecer la conformación abierta de la enzima, por lo tanto la inmovilización no sólo evitaría desórdenes conformacionales sino también permitiría fijar la enzima al soporte en su conformación abierta y de esta manera fijar la forma activa de la enzima.²⁹⁻³⁵

La inmovilización de ROL fue llevada a cabo en el Departamento de Biocatálisis de la Universidad Autónoma de Madrid, a través de diferentes metodologías, que se describen en las secciones siguientes.

V.3.2.1. Adsorción hidrofóbica

La tendencia de las lipasas a adsorberse a superficies hidrofóbicas (activación interfacial) se ha implementado en el desarrollo de protocolos de inmovilización de las mismas. Esta metodología consiste en la adsorción interfacial de las lipasas sobre soportes hidrofóbicos, como por ejemplo Octadecyl Sepabeads®, en condiciones de baja fuerza iónica. En estas condiciones las lipasas confunden la superficie del soporte con las superficies hidrofóbicas de las gotas de su sustrato natural y de esta manera se adsorben fuertemente al soporte en su conformación abierta. En este tipo de técnica los tres procesos sucesivos: inmovilización, hiperactivación interfacial y purificación ocurren en un único paso (Figura V.3). Ésta fue la metodología utilizada para preparar la lipasa inmovilizada que denominamos ROL1.

V.3.2.2. Adsorción hidrofóbica más adsorción iónica

Actualmente se están utilizando nuevos soportes que presentan la característica de ser intercambiadores aniónicos. Estos soportes son obtenidos mediante reacciones químicas de grupos reactivos presentes en los mismos (aldehídos o epóxidos) con grupos amino no ionizados de un polímero policatiónico como por ejemplo polietilenimina.³⁶⁻³⁸ Estos polímeros policatiónicos forman uniones más fuertes con el soporte que las que se establecen con los soportes aniónicos convencionales (DEAE), ya que el número de grupos cargados se encuentra incrementado en el soporte policatiónico. Además estos grupos provienen de un polímero flexible, lo que provoca una fuerte adsorción muy poco distorsionante: el polímero se adapta a la proteína en lugar de forzar a la proteína a adaptarse al polímero.

Las lipasas quedan inmovilizadas sobre este soporte, no sólo mediante interacciones hidrofóbicas, sino también a través de zonas con mayor densidad de cargas negativas sobre la superficie de la proteína, por lo tanto las condiciones de pH deben ser las adecuadas para lograr que la adsorción sea eficaz (Figura V.3). Este procedimiento fue usado en la preparación de ROL2.

V.3.2.3. Inmovilización covalente multipuntual

La inmovilización irreversible de enzimas por formación de enlaces covalentes con el soporte es muy útil a la hora de emplear catalizadores estables.³⁹ Si el proceso además permite la formación de numerosos enlaces entre cada molécula de enzima y el soporte al que está unida (multi-interacción), la probabilidad de que la proteína se distorsione es baja. La inmovilización por enlace covalente puede conseguirse mediante el empleo de soportes activados que, en su superficie, presenten una monocapa de grupos aldehídos sencillos moderadamente alejados del soporte y expuestos al medio. De esta manera los grupos amino de la enzima podrán reaccionar con ellos.

La inmovilización mediante unión covalente multipuntual da lugar a una mayor estabilización de la enzima que si fuese a través de un único enlace (Figura V.3.).

La inmovilización multipuntual fue usada en la obtención de ROL3.

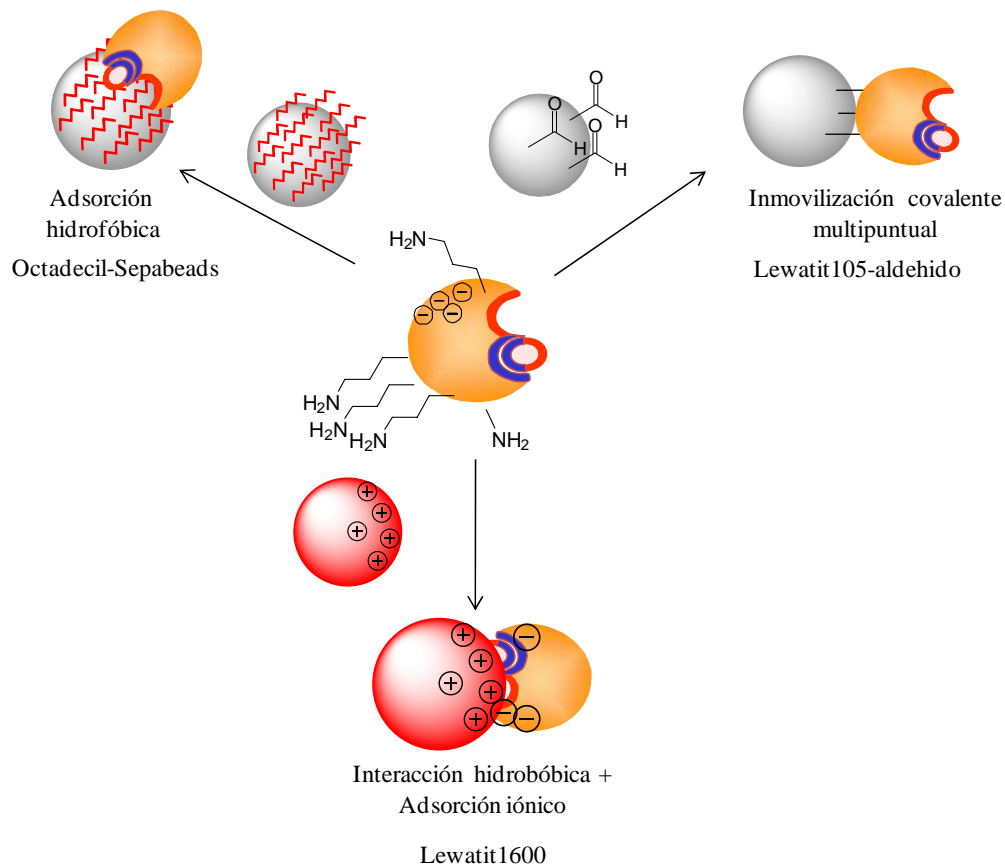
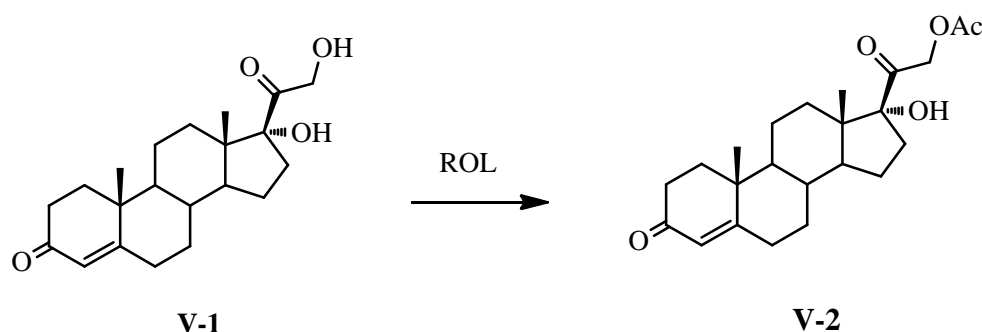


Figura V.3. Diferentes técnicas de inmovilización de la enzima: Adsorción hidrofóbica, Adsorción hidrofóbica + interacción iónica e Inmovilización covalente multipuntual.

V.4. Reacción de acetilación de cortexolona catalizada por la lipasa de *Rhizopus oryzae*

La reacción de acetilación de cortexolona catalizada por lipasa de *Rhizopus oryzae* permitió obtener de manera regioselectiva un único producto de reacción: 21-acetato de cortexolona (V.2.) (Esquema V.3).



Esquema V.3. Acetilación de cortexolona catalizada por ROL

El producto fue purificado por cromatografía en columna e identificado por técnicas de resonancia magnética nuclear y comparación de su punto de fusión con los datos de bibliografía.¹⁰

En el espectro de RMN ¹H se observaron las señales correspondientes a la acetilación del carbono 21, en el cual se observa el corrimiento hacia campos más bajos, del metileno de la posición 21 de $\delta = 4,28$ y $4,56$ a $\delta = 4,82$ y $5,09$, y de la señal del metilo 19 de $\delta = 1,18$ a $1,20$ ppm, en relación al sustrato cortexolona. Por otra parte aparece una nueva señal a $\delta = 2,18$ ppm correspondiente al metilo del grupo acetilo del producto.

En el espectro de ¹³C se observaron dos señales diagnósticas a $\delta = 171$ y $20,7$ ppm correspondientes al carbono carbonílico de éster y al carbono del metilo del acetato.

V.4.1. Optimización de los parámetros de reacción. Estudio experimental

Una vez identificado el producto se realizaron los estudios de optimización de la reacción enzimática.

Inicialmente se estudiaron los siguientes parámetros operacionales: naturaleza del agente acilante, solvente de reacción, soporte de inmovilización de ROL, temperatura, tiempo, y las relaciones Enzima/Sustrato y Agente acilante/Sustrato. La optimización de estos dos últimos parámetros de reacción fue ajustada finalmente mediante un diseño matemático.

Como primer paso en este estudio se evaluó la actividad de la lipasa de *Rhizopus oryzae* en su forma libre (ROL0) e inmovilizada en los diferentes soportes descritos anteriormente (ROL1, ROL2 y ROL3) en la reacción de acetilación de cortexolona.

Inicialmente todas las enzimas mostraron baja actividad catalítica. En el caso de las enzimas inmovilizadas, debido a su apariencia se supuso que podría deberse a la presencia de un alto contenido de agua y fueron secadas en estufa de vacío a 30 °C durante 24 horas. Los porcentajes correspondientes al contenido de agua para la lipasa inmovilizada en los diversos soportes fueron: 56% (ROL1), 46% (ROL2) y 70% (ROL3). ROL0 no fue sometida a este tratamiento ya que no presentaba signos de humedad.

V.4.1.1. Elección del soporte de inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae*, solvente de reacción y agente acilante

En la reacción de acetilación las enzimas ROL0, ROL1, ROL2 y ROL3 fueron evaluadas con diferentes agentes acilantes: acetato de etilo, acetato de vinilo y acetato de isopropenilo. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando como agente acilante el acetato de isopropenilo. Al mismo tiempo se ensayaron diferentes solventes de reacción de variada polaridad: acetonitrilo, diisopropil éter y hexano. Previamente a la selección del solvente se establecieron las condiciones de concentración de sustrato de 1 mg/ml de cortexolona teniendo en cuenta la solubilidad de la misma y se empleó una relación Enzima/Sustrato y Agente acilante/Sustrato de 30 y 25 respectivamente. Las

reacciones fueron monitoreadas por CCD y por CLAR. En ausencia de enzima no se observó ningún producto de reacción. En la Tabla V.1 se muestran los resultados de los parámetros evaluados.

Tabla V.1. Efecto del solvente de reacción y del soporte de inmovilización de la ROL en la reacción de acetilación de cortexolona.

Enzima	Agente acilante	Solvente	Conversión (%)
ROL0	Acetato de etilo	Acetato de etilo	-
ROL0	Acetato de vinilo	Hexano	-
ROL0	Acetato de vinilo	DIPE	0.1
ROL0	Acetato de vinilo	Acetonitrilo	-
ROL0	Acetato de isopropenilo	Hexano	-
ROL0	Acetato de isopropenilo	DIPE	0.3
ROL0	Acetato de isopropenilo	Acetonitrilo	-
ROL1	Acetato de etilo	Acetato de etilo	-
ROL1	Acetato de vinilo	Hexano	-
ROL1	Acetato de vinilo	DIPE	1.3
ROL1	Acetato de vinilo	Acetonitrilo	-
ROL1	Acetato de isopropenilo	Hexano	-
ROL1	Acetato de isopropenilo	DIPE	4.9
ROL1	Acetato de isopropenilo	Acetonitrilo	-
ROL2	Acetato de etilo	Acetato de etilo	-
ROL2	Acetato de vinilo	Hexano	-
ROL2	Acetato de vinilo	DIPE	15.6
ROL2	Acetato de vinilo	Acetonitrilo	-
ROL2	Acetato de isopropenilo	Hexano	23.6
ROL2	Acetato de isopropenilo	DIPE	52.1
ROL2	Acetato de isopropenilo	Acetonitrilo	-
ROL3	Acetato de etilo	Acetato de etilo	-
ROL3	Acetato de vinilo	Hexano	-
ROL3	Acetato de vinilo	DIPE	1.1
ROL3	Acetato de vinilo	Acetonitrilo	-
ROL3	Acetato de isopropenilo	Hexano	-
ROL3	Acetato de isopropenilo	DIPE	5.0
ROL3	Acetato de isopropenilo	Acetonitrilo	-

Condiciones de reacción: concentración de sustrato: 1 mg/ml. T: 55°C. Agitación: 200 rpm. t: 48 h

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla V.1 se observa que ROL2, lipasa inmovilizada en Lewatit® 1600, mostró los mejores resultados con respecto a los demás soportes de inmovilización. Si bien ROL1 y ROL3 presentaron menores conversiones que ROL2, ambas enzimas fueron más efectivas que ROL0, lo que estaría indicando que la estrategia de inmovilización le otorga cierta estabilidad conformacional a la enzima cuando la misma es expuesta a solventes orgánicos. Esta gran diferencia de reactividad de la enzima inmovilizada con respecto a la enzima libre se podría explicar considerando que, en el solvente orgánico la enzima libre puede encontrarse constituyendo agregados tanto en la forma conformacional cerrada e inactiva como en la abierta y activa. En cambio en la enzima inmovilizada las moléculas se encuentran distribuidas en el soporte de manera homogénea y como moléculas monoméricas activas.

En cuanto a la diferencia de actividad que presentan las enzimas inmovilizadas entre sí, está directamente relacionada a los diferentes métodos de inmovilización. La inmovilización en Lewatit 1600 (ROL2) es a través de interacciones hidrofóbicas sumadas a interacciones de carga que, permitiendo una estabilización de la enzima en el solvente de reacción, logran una actividad mayor de la misma. En cambio, si bien la inmovilización en el caso de ROL1 (inmovilización hidrofóbica) y ROL3 (inmovilización covalente) muestran una mayor estabilidad con respecto a la forma libre, en comparación a ROL2 la estructura enzimática fijada al soporte pareciera no ser lo suficientemente estable como para mantener de manera constante la conformación abierta activa de la enzima.

Con respecto al solvente de reacción, entre los solventes estudiados el diisopropil éter (DIPE) fue el más eficiente en la transesterificación del esteroide (Tabla V.1). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento en la síntesis enzimática de 21-acetato de cortexolona, se continuó el estudio de optimización considerando a ROL2 como catalizador de la misma y empleando DIPE como solvente de reacción.

V.4.1.2. Efecto de la temperatura

Inicialmente se trabajó a una temperatura alta debido a la experiencia adquirida en el laboratorio en la acilación de esteroides.⁴⁰ Sin embargo se decidió evaluar la reacción catalizada por ROL2 a menor temperatura, con el fin de averiguar si era posible obtener buenos resultados en condiciones más suaves de reacción. En general las temperaturas en el rango de 30-35°C resultan ser adecuadas para la actividad catalítica de las lipasas, por tal motivo estudiamos la reacción a una temperatura de 30°C. Se emplearon las mismas condiciones de reacción antes mencionadas. Los resultados presentados en la Tabla V.2, muestran que temperaturas menores disminuyen la actividad catalítica de ROL2

Tabla V.2. Efecto de la temperatura en la acetilación enzimática de cortexolona

Enzima	Solvente	Temperatura (°C)	E/S	A/S	Conversion (%)
ROL2	DIPE	30	30	25	20.2
ROL2	DIPE	55	30	25	51.2

Condiciones de reacción: concentración de sustrato: 1 mg/ml. Agitación: 200 rpm. T: 48 h

En base a los resultados obtenidos se seleccionó como temperatura de reacción óptima 55°C.

V.4.1.3. Efecto del tiempo de reacción

Para determinar el tiempo óptimo de reacción, se evaluó el porcentaje de conversión a diferentes tiempos por CLAR. Los resultados de la Figura V.4 correspondientes a los cromatogramas de CLAR a diferentes tiempos, comprueban la obtención de un solo producto de reacción y el crecimiento de la señal correspondiente al producto que resulta ser máximo a las 48 horas. En este caso la concentración de sustrato y la relación Enzima/ Sustrato fueron las mismas que las ensayadas anteriormente.

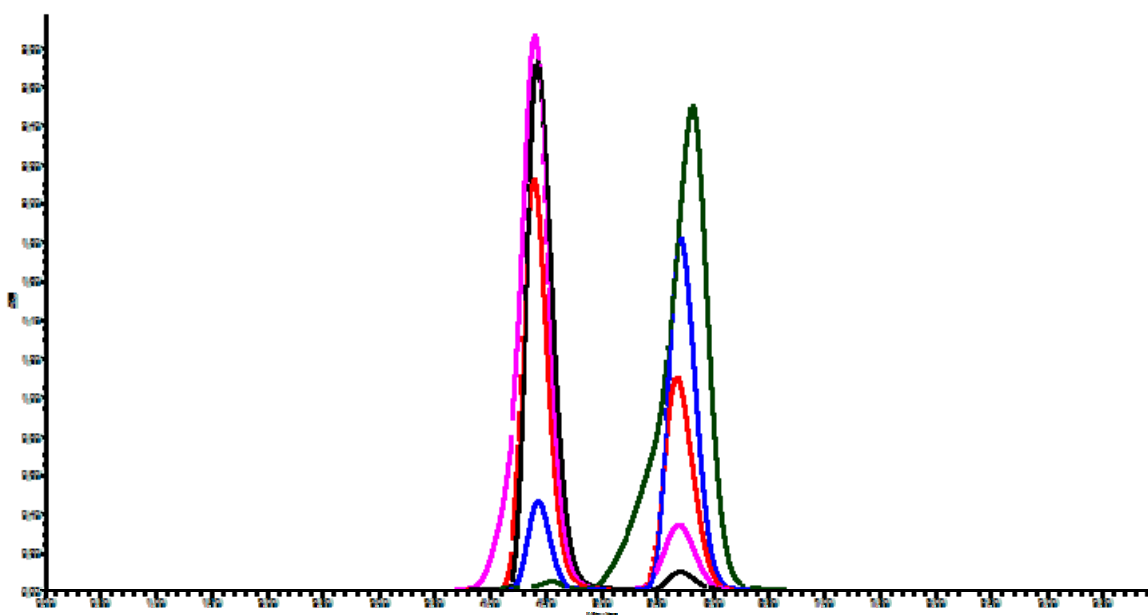


Figura V.4. Cromatograma correspondiente a la reacción de acetilación de cortexolona a diferentes tiempos: 1.5 h (línea negra), 3 h (línea fucsia), 8 h (línea roja), 24 h (línea azul), 48 h (línea verde).

V.4.1.4. Efecto de las relaciones: Agente acilante/Sustrato y Enzima/Sustrato

En una primera instancia se evaluó la relación Agente acilante/Sustrato y Enzima/Sustrato considerando como criterio de elección la máxima conversión de producto. Para ello se utilizó como solvente de reacción DIPE y ROL 2 como biocatalizador a 55 °C y a 200 rpm. Se ensayó la reacción fijando la relación Enzima/Sustrato (E/S): 30 para evaluar diferentes relaciones de Agente acilante/Sustrato. De esta manera logramos una aproximación de la relación óptima para dicho parámetro como se muestra en la Figura V.5.

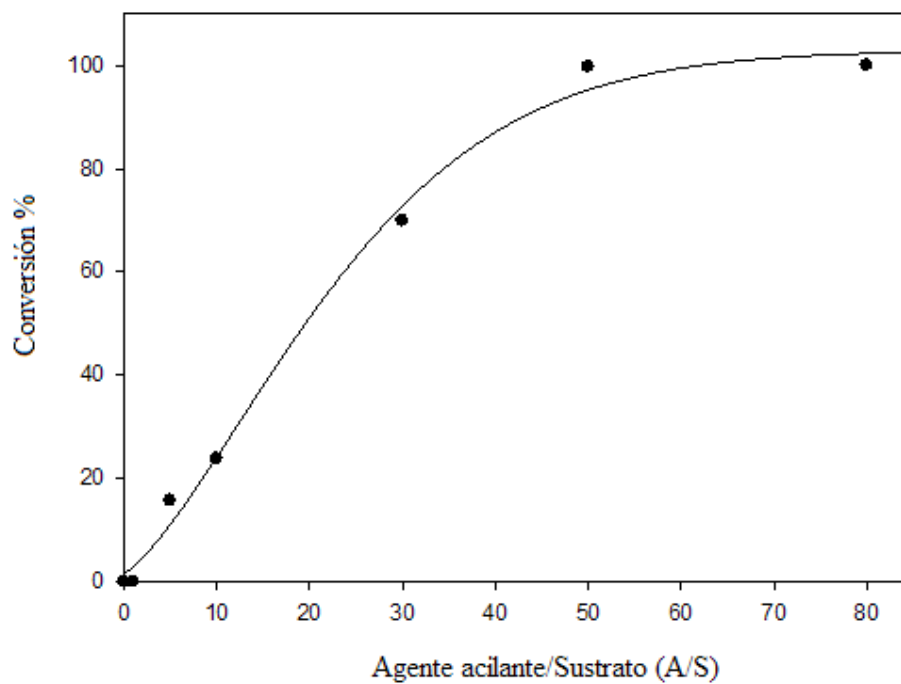


Figura.V.5. Efecto de la relación Agente acilante/Sustrato en la reacción de acetilación de cortexolona.

Los resultados obtenidos muestran que la conversión aumenta con el aumento de la relación Agente Acilante/Sustrato hasta un valor máximo igual a 50, por encima del cual no se observan variaciones en la conversión.

El mismo criterio se aplicó para evaluar la conversión a diferentes relaciones Enzima/Sustrato. En este caso se utilizaron las mismas condiciones de reacción antes mencionadas siendo la relación A/S elegida: 50 como se puede observar en el Figura V.6.

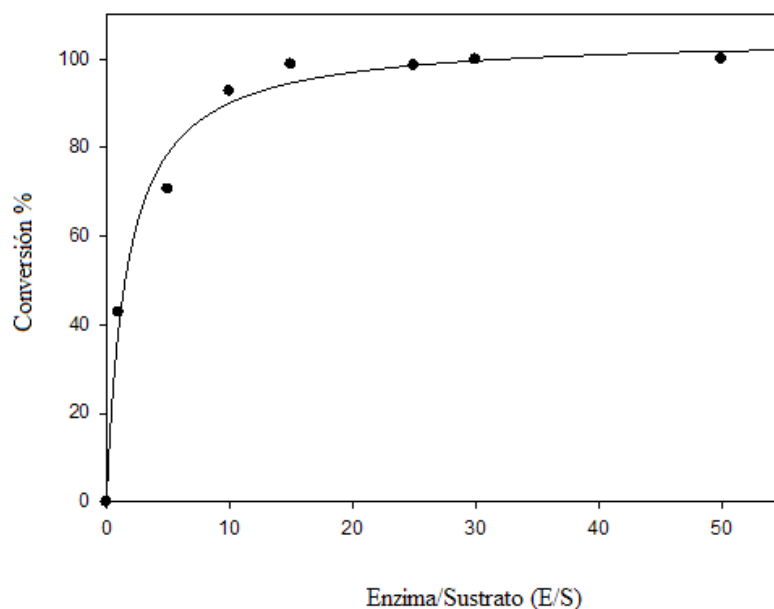


Figura V.6. Efecto de la relación Enzima/Sustrato en la reacción de acetilación de cortexolona.

De los resultados observados en la Figura V.6 se puede concluir, al igual que en el caso de la relación Agente acilante/Sustrato, que la conversión aumenta con el aumento de la relación Enzima/Sustrato siendo máxima a un valor de 15. Relaciones mayores no presentan modificaciones en los valores de conversión.

V.4.1.5. Optimización parcial de los parámetros de reacción

De manera preliminar, se consideraron como óptimos los siguientes valores:

Enzima	ROL2
Solvente	Diisopropil éter
Temperatura	55°C
Tiempo de reacción	48 h
Enzima/Sustrato	15
Agente acilante/Sustrato	50

V.4.2. Optimización de los parámetros de reacción. Modelo matemático

V.4.2.1. Diseño Experimental

Con el fin de lograr un ajuste fino de las condiciones óptimas de reacción se utilizaron los resultados obtenidos en la Sección V.4.1 como datos en un modelo matemático donde se interrelacionaron determinados parámetros. En esta parte del trabajo se utilizó un diseño experimental central compuesto rotatable (DCCR), aplicando como herramienta una superficie de respuesta. En este caso la eficiencia de ROL2 se expresa como Rendimiento específico y se define de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento específico (RE)} = \frac{\text{mmoles de Producto}}{\text{mmoles de Acilante} \times \text{gramo de Enzima}}$$

Los valores de los parámetros de reacción obtenidos a partir de los ensayos previos se emplearon para determinar los rangos de las variables de la superficie de respuesta. La superficie de respuesta permitió obtener los parámetros: A/S y E/S óptimos con el objetivo de lograr el máximo Rendimiento específico.

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de aplicaciones matemáticas utilizadas para abordar problemas en los que la respuesta de interés está influenciada por varios parámetros de carácter cuantitativo. El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y posteriormente, determinar el modelo matemático que mejor se ajuste a los datos experimentales obtenidos. El objetivo final que plantea esta metodología es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta.

En este caso, como se mencionó anteriormente, la variable respuesta que decidimos optimizar fue el Rendimiento específico y esta variable se puede representar como un modelo matemático, en general a través de una ecuación polinomial. El éxito en una investigación de superficie de respuesta depende de que la respuesta se pueda ajustar a un polinomio de primer o segundo orden.

En el modelo de segundo orden sus parámetros se estiman mediante el método de cuadrados mínimos. Una vez calculados los estimadores se sustituyen en la ecuación y se obtiene el modelo ajustado en la zona vecina del valor óptimo de la respuesta. Luego de verificar que el modelo tiene suficiencia de ajuste y que los coeficientes son significativos, se procede a localizar las coordenadas del “punto estacionario” y se realiza un análisis más detallado del sistema de respuesta.

El punto estacionario puede ser:

- Un punto de respuesta máxima
- Un punto de respuesta mínima
- Un punto silla

Una vez encontrado el punto estacionario mediante cálculos matemáticos, es necesario caracterizar la superficie de respuesta, es decir determinar si se trata de un punto de respuesta máximo, mínimo o silla. Como alternativa se expresa la forma de la superficie de respuesta usando un nuevo conjunto de variables cuyos ejes representan los ejes principales de la superficie de respuesta, los cuales se interceptan en el punto estacionario dando por resultado el modelo ajustado (ecuación matemática), donde se presentan variables independientes y constantes. Si los valores de las constantes son positivos, el punto de respuesta es mínimo, si son todos negativos el punto de respuesta es máximo, si presentan diferentes signos corresponde a un punto de respuesta silla.

El ajuste y análisis de una superficie de respuesta se facilitan si se elige adecuadamente el diseño experimental. Un diseño experimental para ajustar un modelo de segundo orden debe tener al menos tres niveles de cada factor que están codificados como +1, 0, y -1 y se desea que el modelo sea rotatable. El modelo se convierte en rotatable mediante la elección de α , el cual es función del número de puntos del diseño. Se dice que un diseño es rotatable cuando la varianza de la respuesta predicha en algún punto sólo es función de la distancia del punto al centro y no es una función de la dirección.

La rotabilidad es una propiedad importante, ya que la finalidad de la Metodología de la Superficie de Respuesta es la optimización y se desconoce la localización del óptimo, por lo tanto es necesario utilizar un diseño que proporcione estimaciones precisas en todas direcciones. Dentro de los diseños rotatables de segundo orden se encuentra el diseño central compuesto.

En este trabajo se estudió la variación de la relación E/S y A/S con el objetivo de obtener el máximo Rendimiento específico en la síntesis de 21-acetato de cortexolona catalizada por ROL2 mediante el diseño experimental de Box-Hunter⁴¹ y la metodología de Superficie de Respuesta.

El diseño experimental central compuesto rotatable que se llevó a cabo estuvo constituido por 12 experimentos, basados en dos variables de 5 niveles cada una. Para realizar el experimento se fijó el valor de α en 1,41 y se emplearon 4 puntos centrales. Los resultados analizados previamente, empleando ROL2 como catalizador, E/S y A/S fueron utilizados para seleccionar los rangos de relación: 5-50 y 30-70 respectivamente. Los valores de ambas variables fueron codificados en un rango de -1,41 a 1,41. En la Figura V.7 se representa el esquema del diseño experimental seleccionado y la Tabla V.3 muestra los resultados obtenidos en los doce experimentos.

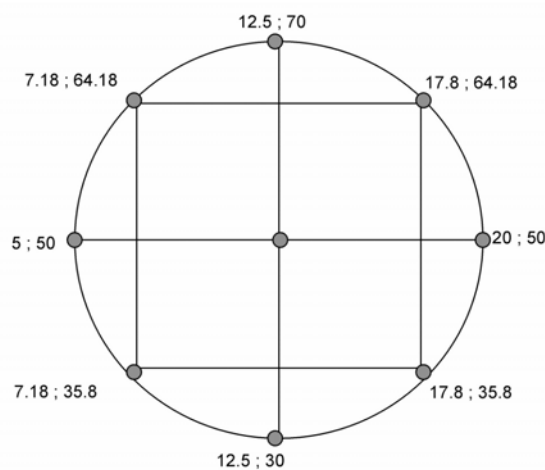


Figura. V.7. Diagrama del diseño central compuesto rotatable utilizando la nomenclatura (E/S):(A/S)

Tabla V.3. Resultados correspondientes a las relaciones E/S y A/S establecidas por el diseño experimental central compuesto rotable.

E/S	A/S	RE
5	50	1.56
7.18	35.8	1.34
12.5	30	0.92
17.8	35.8	0.72
20	50	0.51
17.8	64.18	0.33
12.5	70	0.46
7.18	64.18	0.84
12.5	50	0.81
12.5	50	0.81
12.5	50	0.81
12.5	50	0.81

Condiciones de reacción: Concentración de sustrato: 1 mg/mL. Solvente: DIPE. Agente acilante: acetato de isopropenilo. T: 55°C. Agitación: 200 rpm. t: 48 h

Los resultados del diseño fueron adaptados a un modelo empírico matemático, el cual fue expresado a través de la siguiente ecuación:

$$RE = a + b \cdot (E/S) + c \cdot (A/S) + d \cdot (E/S)^2 + e \cdot (A/S)^2 + f \cdot (E/S) \cdot (A/S) \quad (\text{Ecuación 1})$$

V.4.2.2. Resultados de los experimentos correspondientes al DCCR

Las reacciones correspondientes al diseño experimental fueron realizadas en las mismas condiciones descritas anteriormente. El biocatalizador (ROL2) se secó en estufa de vacío durante 24 horas a 30 °C. Las reacciones se efectuaron a 55 °C y 200 rpm, empleando como solvente de reacción diisopropil éter, y acetato de isopropenilo como agente acilante. El análisis se llevó a cabo luego de transcurridas 48 horas de reacción. Considerando el diagrama presentado en la Figura V.7, las reacciones en las condiciones periféricas fueron realizadas por triplicado y la reacción central por septuplicado. Se empleó el programa Sigma Plot para realizar los análisis estadísticos y

obtener la Superficie de Respuesta. El rendimiento específico promedio para cada una de las condiciones se presenta en la Tabla V.4.

Los coeficientes y su respectivo valor de p fueron calculados y se muestran en la Tabla V.4.

Tabla V.4. Resultados de los Coeficientes correspondientes a la ecuación 1 y sus valores p

Coeficiente	Valor	valor p
a	0.8091	<0.0001
b	-0.3275	<0.0001
c	-0.1923	0.0003
d	0.0990	0.0134
e	-0.0738	0.0414
f	0.0272*	0.4781

*Factor no significativo ($p>0.05$)

Los datos obtenidos permitieron determinar los coeficientes de la Ecuación 1 y expresarla de la siguiente manera:

$$RE = 0.8091 - 0.3275 \cdot (E/S) - 0.1923 \cdot (A/S) + 0.099 \cdot (E/S)^2 - 0.0738 \cdot (A/S)^2$$

Considerando la ecuación 1 se observa que el término (E/S) fue el que presentó mayor significancia en el RE que es la variable a tener en cuenta en este caso en particular. Por otra parte el término que tiene en cuenta la interacción (E/S)·(A/S) no presentó un efecto significativo en la variable a analizar por lo que no fue considerado. Si bien los valores de los coeficientes para los parámetros (E/S) y (A/S) fueron comparables, el efecto de E/S en el RE es mayor en relación al de A/S.

El paso siguiente consistió en la construcción de la Superficie de Respuesta empírica.

A partir del diseño experimental se graficó la superficie de respuesta para el Rendimiento específico teniendo en cuenta las variables E/S y A/S. La superficie obtenida se muestra en la Figura V.8.

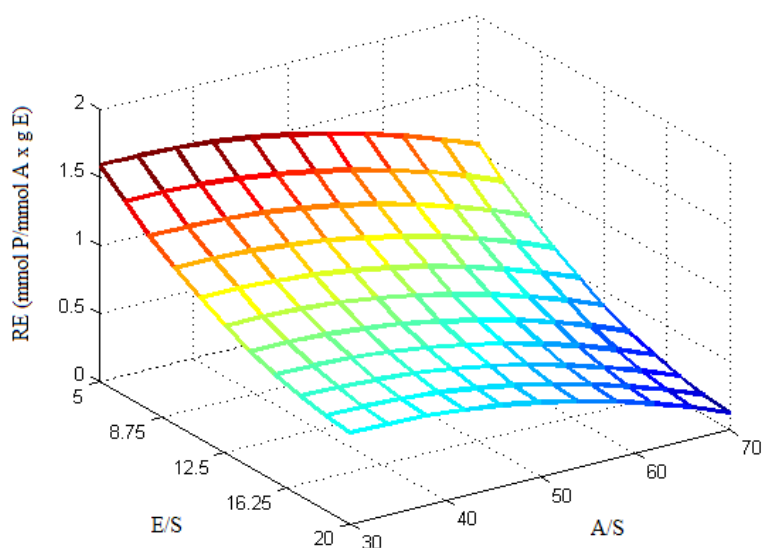


Figura V.8. Superficie de respuesta del RE en función de las relaciones E/S y A/S

Los valores óptimos para las variables (E/S) y (A/S) que corresponden al RE máximo, que alcanzó el valor de 1.59 mmol P/ mmol A·g E, fueron de 5 y 31.6 respectivamente. Los valores de estos parámetros analizados en forma conjunta fueron menores que los correspondientes a los analizados de manera individual.

Esto sugiere que si bien la relación A/S es bastante alta, la reducción de la cantidad del biocatalizador en términos de costos de producción, justifica razonablemente la relación utilizada para obtener el máximo rendimiento específico.

El análisis teórico-matemático de esta sección fue llevada a cabo por el Dr. Francisco Valero del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Barcelona.

V.5. Reutilización de la enzima

Una ventaja adicional que ofrece la inmovilización radica en la facilidad de recuperación de los biocatalizadores. Las enzimas inmovilizadas, al ser insolubles en el medio de reacción, pueden ser filtradas una vez concluida la misma. Por otra parte también es usual la reutilización de los biocatalizadores, que en algunos casos puede realizarse varias veces.

Con el objetivo de evaluar la reutilización de ROL2, se estudió su comportamiento durante varios ciclos de la reacción de acetilación. Previamente al comienzo de cada ciclo la enzima fue lavada sucesivas veces con el solvente de reacción.

Cada ciclo corresponde a la reacción de acetilación de cortexolona llevada a cabo en las condiciones óptimas: concentración de sustrato: 1 mg/ml, solvente de reacción: DIPE, temperatura: 55°C, E/S: 5, A/S: 31.6, agitación: 200 rpm, tiempo de reacción: 48 h.

Los resultados se presentan en la Figura V.9.

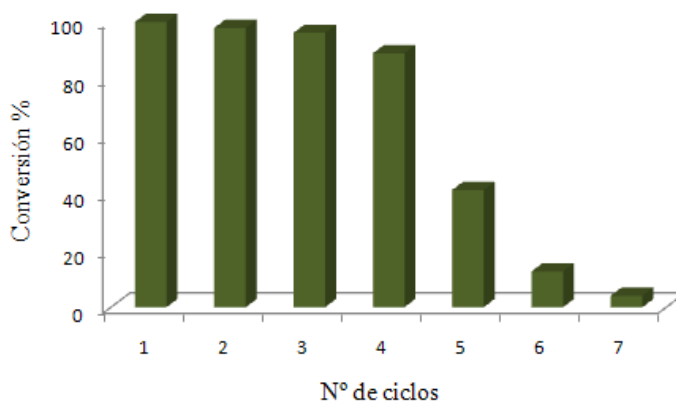


Figura V.9. Evaluación de la actividad enzimática en función del número de ciclos de reacción (tiempo de duración de cada ciclo: 48h)

La Figura V.9 indica que la enzima puede ser utilizada sucesivamente hasta un total de 4 veces, o sea 4 ciclos de reacción. Se comprobó que no hubo pérdidas significativas en la actividad enzimática de ROL2 durante este periodo, disminuyendo su actividad considerablemente en el quinto ciclo.

Conclusión

En esta parte del trabajo se evaluó la actividad catalítica de la lipasa del hongo *Rhizopus oryzae*, en la reacción de acetilación del corticosteroide cortexolona, en su forma libre e inmovilizada sobre diferentes soportes mediante distintas técnicas de inmovilización.

La reacción catalizada por la lipasa de *Rhizopus oryzae* inmovilizada fue regioselectiva y eficiente en la acetilación de la cortexolona, dando como único producto el 21-acetato

de cortexolona con excelente rendimiento. Esta enzima no había sido utilizada previamente en la modificación de esteroides. Este trabajo permitió ampliar el espectro de sustratos posibles para dicha enzima, siendo los esteroides sustratos muy interesantes para estudios de este tipo. Por un lado contienen un esqueleto rígido que les confiere una estereoquímica particular y además presentan variados grupos funcionales que permiten analizar la quimio- y regioselectividad de las reacciones enzimáticas. Además es bien conocida su relevancia en productos de la industria farmacéutica.

La enzima en su forma libre no resultó un buen catalizador de la reacción de acetilación. Esto podría deberse a una falta de estabilidad en el medio de reacción o a un desplazamiento del equilibrio de la enzima hacia su conformación cerrada inactiva. Los resultados obtenidos demostraron que la inmovilización de ROL permitió incrementar su actividad y estabilidad. Por lo tanto la técnica de inmovilización mostró ser una estrategia conveniente y acertada como solución a los cambios conformacionales de la enzima.

De las técnicas de inmovilización estudiadas, la adsorción en Lewatit 1600 dio lugar a ROL2 que otorgó los mejores rendimientos específicos. En este tipo de adsorción participan no sólo interacciones del tipo hidrofóbicas sino también interacciones de carga, lo que incrementa la estabilidad y favorece la fijación de la conformación activa de la enzima. Las demás técnicas de inmovilización utilizadas fueron menos efectivas y por consiguiente la actividad catalítica del biocatalizador inmovilizado fue menor.

Luego de la realización de múltiples experimentos, se logró la optimización de los parámetros de reacción: soporte del biocatalizador, temperatura, solvente de reacción, naturaleza del agente acetilante, relaciones Enzima/Sustrato y Agente acilante/Sustrato y tiempo.

Se evaluaron distintos agentes acetilantes como acetato de etilo, acetato de vinilo y acetato de isopropenilo, obteniéndose los mejores resultados con acetato de isopropenilo. Los parámetros: relación Enzima/Sustrato y Agente acilante/Sustrato fueron optimizados parcialmente y los datos obtenidos se utilizaron para establecer los rangos de evaluación que permitieron la optimización final y el rendimiento específico máximo de producto.

La optimización de las relaciones Enzima/Sustrato y Agente acilante/Sustrato se logró mediante la utilización del diseño experimental central compuesto rotatable (DCCR).

La aplicación de este diseño en el estudio de las variables E/S y A/S generó una superficie de respuesta donde se observó que la variable E/S presenta mayor influencia que la A/S en el RE. Sin embargo los valores obtenidos teniendo en cuenta ambas variables lograron la correcta optimización conjunta de ambos parámetros.

La metodología matemática utilizada permitió lograr la correcta optimización de los parámetros de la reacción biocatalítica que dio como resultado la respuesta máxima en el rendimiento específico. Quedó evidenciado de esta manera que el modelo matemático seleccionado es una herramienta útil en la optimización de parámetros en reacciones biocatalíticas.

Finalmente, ROL 2 pudo ser reutilizada y mostró muy buena actividad durante cuatro ciclos de reacción.

Bibliografía

1. Isaksson, M. *Dermatol. Ther.* **2004**, *17*, 314-320.
2. Trifu, V.; Tiplica, G. S.; Naumescu, E.; Zalupca, L.; Moro, L.; Celasco, G. *Br. J. Dermatol.*, **2011**, *165*, 177-183.
3. Novotny, L.; Rauko, P. *Neoplasma*, **2009**, *56*, 177-186.
4. Leipottevin, J. P.; Drieghes, J.; Goossens, A. *Arch. Dermatol.*, **1995**, *131*, 31-37.
5. D. W. Roberts, J. P. Leipottevin in *Allergic contact dermatitis: the molecular basis* (Eds.: J. P. Leipottevin, D. A. Basketter, A. Goossens, A. T. Karlberg), Springer, Berlin, 1998, 81-111.
7. Wilkinson, S. M.; Jones, M. F. *Br. J. Dermatol.*, **1996**, *135*, 225-230.
8. Oh, S. W.; Monder, C. *J. Org. Chem.*, **1976**, *41*, 2477-2480.
9. Kollerov, V. V.; Shutov, A. A., Fokina, V. V.; Sukhodol'skaya, G. V.; Gulevskaya, S. A.; Donova, M. V. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **2010**, *46*, 198-205.
10. Manosroi, J.; Saowakhon, S.; Manosroi, A. *Enzyme Microb. Technol.*, **2007**, *41*, 322-35.
11. Sokolova, L. V.; Klimova, L. I.; Kaminka, E. M.; Yaroslavtseva, Z. A.; Suvorov, N. *N. Pharm. Chem. J.*, **1969**, *3*, 709-712.
12. Ferraboschi, P.; De Mieri, M.; Ragonesi, L. *Tetrahedron Lett*, **2008**, *49*, 4610-4612.
13. Beer, H. D.; Wohlfahrt, G.; Schmid, R. D.; McCarthy, E. G. *Biochemical Journal*, **1996**, *319*, 351-359.
14. Guillén, M.; Benaiges, M. D.; Valero, F. *Biochem. Eng. J.*, **2011**, *54*, 117-123.
15. Arnau, C.; Ramón, R.; Casas, C.; Valero, F. *Enzyme Microb. Technol.*, **2010**, *46*, 494-500.
16. Esteban, L.; Jiménez, M. J.; Hita, E.; González, P. A.; Martín, L.; Robles, A. *Biochem. Eng. J.*, **2011**, *54*, 62-69.
17. Nunes, P. A.; Pires-Cabral, P.; Guillén, M.; Valero, F.; Luna, D.; Ferreira-Dias, S. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2011**, *88*, 473-480.
18. Macedo, G. A.; Pastore, G. M.; Rodrigues, M. I. *Process Biochem.*, **2004**, *39*, 687-692.
19. Ben Salah, R.; Ghamghui, H.; Miled, N.; Mejdoub, H.; Gargouri, Y. *J. Biosci. Bioeng.*, **2007**, *4*, 368-372.

20. Palomo, J. M. ; Segura, R. L. ; Fernandez-Lorente, G. ; Guisán, J. M. ; Fernandez-Lafuente, R. *Tetrahedron Asymmetry*, **2004**, *15*, 1157-1161.
21. Ban, K.; Kaieda, M.; Matsumoto, T.; Kondo, A.; Fukuda, H. *Biochem. Eng. J.*, **2001**, *8*, 39-43.
22. Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernández-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernández-Lafuente, R. *Enzyme Microb. Technol.*, **2007**, *40*, 1451-1463.
23. Palomo, J. M.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, J. M. *Tetrahedron Asymmetry*, **2002**, *13*, 1337-1345.
24. Palomo, J. M. *Curr. Bioact. Compd.*, **2008**, *4*, 126-138.
25. Palomo, J. M. *Curr. Org. Synth.*, **2009**, *6*, 1-14.
26. Lotti, M.; Alberghina, L. Engineering of / with lipases. Malcata, F. X. Springer Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996, 115-124.
27. Hui, D. Y.; Howles, P. N. *J of Lipid Reserch*, **2002**, *43*, 2017-2030.
28. Mingarro, Y.; Abad, C.; Braco, L. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1995, *92*, 3308-3312.
29. Malcata, F.X.; Reyes, H.R.; García, H.S.; Hill, C.G. Jr.; Amundson, C.H. *Enzyme Microb. Technol.*, **1992**, *14*, 426-446.
30. Ghosh, D.; Wawrzak, Z.; Pletnev, V. Z.; Li, N.; Kaiser, R.; Pangborn, W.; Jornvall, H.; Erman, M.; Duax, W. L. *Structure*, **1995**, *3*, 279-288.
31. Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A. *Structure*, **1994**, *2*, 293-308.
32. Uppenberg, J.; Ohrner, N.; Norin, M.; Hult, K.; Kleywegt, G. J.; Patkar, S.; Waagen, V.; Anthonsen, T.; Jones, T. A. *Biochemistry*, **1995**, *34*, 16838-16851.
33. Pernas, M. A.; López, C.; Rúa, M. L.; Hermoso, J. *FEBS. Lett*, **2001**, *501*, 87-91.
34. Palomo, J. M.; Fuentes, M.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Guisan, J. M.; Fernández-Lafuente, R. *Biomacromolecules*, **2003**, *4*, 1-6.
35. Fernández-Lorente, G.; Palomo, J. M.; Fuentes, M.; Mateo, C.; Guisan, J.M.; Fernández-Lafuente, R. *Biotechnol. Bieng.*, **2003**, *82*, 232-237.
36. Palomo, Jose M.; Peña, M.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Pisabarro, A.G.; Fernández-Lafuente, R.; Ramirez. L.; Guisan, J. M. *Biomacromolecules*, **2003**, *4*, 204-210.
37. Torres, R.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Palomo, J. M.; Ortiz, C.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, J. M.; Tam, A.; Daminati, M. *Biotechnol. Prog.*, **2002**, *18*, 1221-1226.

38. Pessela, B. C. C.; Fernández-Lafuente, R.; Fuentes, M.; Vián, A.; García, J. L.; Carrascosa, A.V.; Mateo, C.; Guisán, J. M. *Enzyme Microb. Technol.*, **2003**, *32*, 369-374.
39. Mateo, C.; Abian, O; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. *Biotechnol. Bioeng.*, **2000**, *68*, 98-105.
40. Leckband, D.; Langer, R. *Biotechnol Bioeng.*, **1990**, *37*, 227-237.
41. Quintana, P. G.; baldessari, A. *Steroids*, **2009**, *74*, 1007-10014.
42. Box, G.; Hunter, W.G.; Hunter, J.S., *Statistics for experimenters*, John Wiley & sons Inc, New York, 1978, 208-434



Capítulo VI

Drospirenona

VI. APLICACIÓN DE HONGOS MUCORALES EN LA BIOTRANSFORMACIÓN DE PROGESTINAS SINTÉTICAS: DROSPIRENONA

VI.I. Introducción

Las progestinas sintéticas (progestágenos) son utilizadas conjuntamente con otros compuestos esteroidales, como por ejemplo el etinilestradiol (estrógeno), en formulaciones farmacéuticas con actividad anticonceptiva.¹⁻³ Si bien el uso de anticonceptivos orales tiene como objetivo principal impedir la ovulación por parte del ovario, a menudo, estas formulaciones son consumidas por mujeres de diferentes edades por variados motivos y situaciones.^{4,5} Esta combinación de drogas actúa a nivel de hipotálamo e hipófisis, y administradas en forma conjunta producen cambios hormonales que impiden que se lleve a cabo el ciclo ovárico de manera normal.

La menstruación es una etapa del ciclo ovárico normal de mujeres en edad fértil. Debido a que la menstruación es la manifestación más evidente del ciclo ovárico, podemos hablar de ciclo menstrual de manera indistinta.

La regulación del ciclo ovárico depende exclusivamente del hipotálamo, la hipófisis y el ovario a través de diferentes hormonas que son secretadas por éstas glándulas.

El hipotálamo se encuentra formando parte del sistema nervioso central y secreta la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Esta hormona actúa a nivel hipofisario provocando su estimulación y secreción hormonal.

La hipófisis es una glándula endócrina situada en la base del cerebro, y es la encargada de secretar las hormonas gonadotróficas:

- ✓ FSH (hormona folículo estimulante)
- ✓ LH (hormona luteinizante)

Ambas hormonas ejercen su acción a nivel ovárico.

Los ovarios se encargan de producir los óvulos y de secretar las hormonas sexuales femeninas: estrógenos y progesteronas.

El ciclo ovárico puede dividirse en tres fases (Figura VI.1):^{6,7}

- Fase folicular (preovulatoria): esta fase comienza el primer día de ocurrida la menstruación y se extiende hasta el día anterior al aumento de LH. En la primera mitad de esta fase el bajo nivel estrogénico estimula la GnRH la cual a su vez provoca la liberación de FSH por parte de la hipófisis. La secreción de esta hormona estimula el crecimiento de un grupo de 3 a 30 folículos que han sido reclutados durante los últimos días del ciclo precedente. Estos folículos producen cantidades cada vez mayores de estrógenos que, por retroalimentación negativa, van a disminuir la producción y liberación de FSH. A medida que los niveles de FSH van decayendo los niveles estrogénicos van aumentando y uno de los folículos del grupo se selecciona para ovular y los demás sufren atresia. Los niveles de LH aumentan lentamente a partir del primer o segundo día de aumento de la FSH. En esta etapa la secreción de estrógeno y progesterona por parte de los ovarios se mantiene constante y en bajos niveles.

- Fase ovulatoria: en esta fase los estrógenos alcanzan un nivel críticamente alto en el cual la retroalimentación sobre el hipotálamo y sobre la hipófisis deja de ser negativa transformándose en positiva. Se produce un aumento masivo y repentino de la LH que culminará con la ovulación del folículo seleccionado. Simultáneamente se produce un incremento menor de la secreción de FSH. Al aumentar los niveles de LH, los niveles de estradiol bajan, mientras que la concentración de progesterona continúa en aumento. El aumento de la secreción de LH dura aproximadamente entre 36 y 48 horas y ocurre de manera múltiple y pulsada. La secreción de LH, que da lugar a la madurez del folículo, es necesaria para la ovulación, la cual ocurre de 16 a 32 horas luego de la secreción de LH.

- Fase lútea (posovulatoria): en esta fase las células del folículo que rodeaban al óvulo en el ovario antes de su ovulación, se reorganizan conformando el cuerpo lúteo (cuerpo amarillo). La duración de esta fase es constante y dura en promedio 14 días en ausencia de embarazo, finalizando con el primer día de la

menstruación. Está relacionada con la duración de la fase funcional del cuerpo lúteo, el cual secreta progesterona y estradiol durante 14 días, degenerándose si no se produce la fertilización.

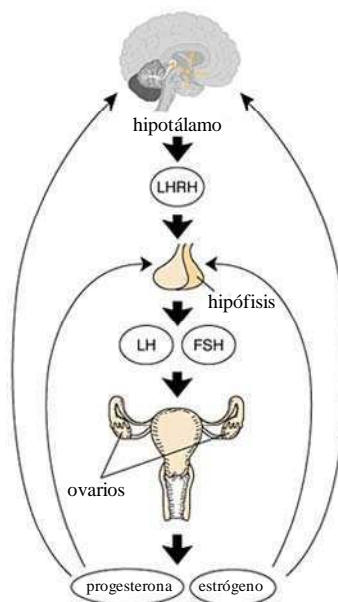


Figura VI.1. Regulación hormonal del ciclo ovárico

El ciclo endometrial ocurre en paralelo al ciclo ovárico y su inicio comienza luego de la pérdida mensual del epitelio durante la menstruación. Luego de la menstruación permanece una fina capa de células epiteliales que se encuentra localizada en las zonas profundas de las glándulas y criptas del endometrio. Al igual que el ciclo ovárico el ciclo del endometrio consta de tres fases: fase proliferativa (estrogénica), fase secretora (progestacional) y la fase menstrual.

Los anticonceptivos orales combinados inhiben la ovulación mediante el bloqueo de la producción y liberación de FSH y LH. El componente estrogénico afecta la adecuada liberación de FSH, evitándose el reclutamiento y crecimiento de los folículos. Por otra parte el estrógeno y el progestágeno presentes en el anticonceptivo bloquean la secreción de LH afectando la fase de ovulación. Por lo tanto al no producirse la fase ovulatoria tampoco se genera la fase lútea.

Los anticonceptivos orales no sólo se utilizan con el fin de evitar la ovulación, y por lo tanto la fecundación, sino que además presentan aplicaciones terapéuticas. Son utilizados en algia pelviana secundaria a endometriosis, síndrome premenstrual, dismenorrea esencial, procesos inflamatorios pelvianos crónicos, etc.⁸⁻¹¹

Las progestinas o progestágenos constituyen las formulaciones combinadas de la mayoría de los anticonceptivos orales. Las progestinas son una familia de compuestos químicos con múltiples funciones. Son capaces de unirse a diferentes receptores y presentar actividad como progestágenos, estrógenos, andrógenos, mineralocorticoides y glucocorticoides. Las progestinas se diferencian entre sí según su estructura química y sus derivados. Existen 4 tipos de progestinas activas oralmente (dos ejemplos de ellas se presentan entre paréntesis), las cuales son derivados de:²

- 17 α -progesterona
- 19-nortestosterona (noretindrona)
- 19-norprogesterona
- espironolactona (drospirenona)

Las progestinas sintéticas son compuestos capaces de inducir transformaciones secretorias del endometrio cuando éste se encuentra en la etapa proliferativa. Por tal motivo la actividad y potencia de las mismas son evaluadas de acuerdo a sus efectos endometriales. Estos efectos pueden ser determinados directamente mediante observaciones histológicas o cuantificaciones químicas o de manera indirecta por evaluación del sangrado menstrual.¹²⁻¹⁵

Los anticonceptivos orales presentan efectos benéficos y adversos. Dentro de las ventajas ofrecidas por este tipo de drogas podemos mencionar: menor pérdida de sangre durante los días menstruales, disminución del dolor en caso de dismenorrea y endometriosis y efecto protector que ofrecen frente a diferentes tipos de enfermedades tumorales que afectan a ovario y endometrio. Las desventajas frecuentemente observadas son: aumento de la presión sanguínea y cambios en el metabolismo de lípidos y carbohidratos con el consecuente aumento del peso corporal.^{16,17} Otros efectos secundarios observados con menor frecuencia incluyen la tendencia a la formación de tromboembolismo venoso y afecciones cardíacas.^{18,19} Algunos efectos producidos por

los progestágenos se han relacionado con la potencia de las progestinas sintéticas utilizadas.²⁰

Tanto los fluidos corporales como la presión sanguínea se encuentran regulados a través del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA). La renina es una hormona con función enzimática secretada por el riñón. Esta enzima convierte angiotensinógeno, secretado a nivel hepático, en angiotensina-I la cual es convertida en angiotensina-II por acción de la enzima convertidora de la angiotensina. La angiotensina-II estimula la glándula suprarrenal provocando la secreción de aldosterona. La aldosterona actúa a nivel renal reteniendo sodio y eliminando potasio, de esta manera se ve incrementada la presión sanguínea.^{21,22} La espironolactona (Figura.VI.2) es una droga sintética y actúa como antagonista de la aldosterona, a diferencia de los progestágenos que actúan estimulando el sistema RAA. Por ello, la espironolactona es de gran aplicación en trastornos de hipertensión.

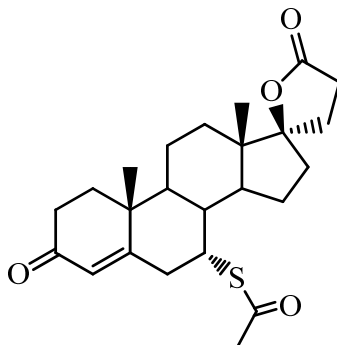
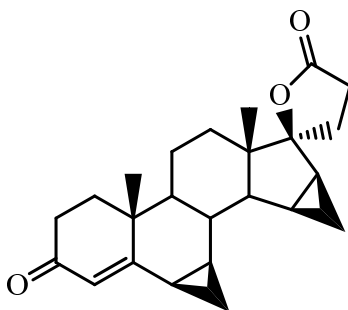


Figura VI.2. Estructura química de espironolactona

Tomando como base la espironolactona se han diseñado nuevas drogas que no presentan efectos sobre el sistema RAA. Shering A.G. desarrolló una droga que contiene una estructura análoga a la espironolactona que denominó drospirenona (VI-1) (Figura VI.3), con propiedades comparables a la progesterona y con la ventaja de presentar menores efectos adversos.²³ Por lo tanto modificaciones químicas de la estructura de la espironolactona condujeron a un compuesto con diferente actividad y menos efectos colaterales.



VI-1

Figura VI.3. Estructura química de drospirenona

Esta droga está siendo muy utilizada actualmente en la terapia anticonceptiva oral combinada y reemplazando a las progestinas previamente aplicadas.

Los compuestos esteroidales son sustratos de gran interés tanto en el ámbito de Biocatálisis como en Biotransformaciones. La mayoría de estos compuestos son de uso medicinal, ya que son capaces de regular y modificar numerosos procesos fisiológicos. Gran parte de estas drogas se han modificado químicamente con el objetivo de mejorar sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. De esta manera se ha logrado aumentar la potencia de esteroides utilizados como moduladores del sistema inmune.²⁴ Las modificaciones más generales que producen cambios en sus propiedades farmacológicas suelen ser la incorporación de grupos halógenos e hidroxilos a su estructura. La incorporación de uno o varios grupos hidroxidrilos en diferentes posiciones de la estructura esteroideal de muchos de estos compuestos es producida por una variada gama de microorganismos. Existen numerosos trabajos en la bibliografía donde se evalúan procesos de Biotransformación de compuestos esteroidales de interés farmacéutico. En estos trabajos se puede observar que los esteroides pueden ser hidroxilados por hongos mediante la acción del complejo enzimático citocromo P450.²⁵ Las posiciones del esqueleto del esteroide que suelen ser comúnmente accesibles a la hidroxilación microbiana son las posiciones 11, 15 y 16. Cabe destacar que las posiciones preferenciales de modificación de estos compuestos no sólo dependen del microorganismo a ensayar sino también de la estructura química y disposición espacial de los sustratos a modificar. Muchos de estos cambios estructurales han generado

compuestos con un incremento en su actividad antiinflamatoria o le han otorgado cierta actividad a drogas que previamente no presentaban ninguna en particular.

A través de procesos de Biotransformación muchos sustratos esteroidales fueron modificados de manera regio- y estereoselectiva por reacciones llevadas a cabo por microorganismos fúngicos. Podemos citar como ejemplos varios esteroides: androstenediona, 16,17 α -epoxiprogesterona, testosterona, metil testosterona, cortexolona, etc.²⁶⁻³¹

En nuestro grupo de investigación se han aplicado procedimientos de Biotransformación como herramienta importante en la reducción enantioselectiva de una serie de sustratos: dicetonas vecinales y ésteres alquílicos de α - y β -ceto diácidos, aplicando microorganismos fúngicos para llevar a cabo la transformación.³²⁻³⁴

Gran parte de este trabajo de tesis estuvo focalizado en modificaciones estructurales de compuestos esteroidales mediante la aplicación de lipasas. Con similar interés y teniendo en cuenta la extensa bibliografía en estudios de Biotransformaciones de esteroides, la cual se mantiene continuamente actualizada, se decidió abordar esta metodología en la modificación de drospirenona.

Los hongos son microorganismos muy utilizados en ensayos de Biotransformación debido a la gran biodiversidad existente, la variada maquinaria metabólica que presentan y la facilidad de crecimiento y manipulación de los cultivos.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, en este capítulo se describen los ensayos realizados y los resultados obtenidos de la aplicación de la estrategia de Biotransformación sobre la progestina sintética drospirenona utilizando microorganismos fúngicos de diferentes géneros y especies.

VI.2. Cepas fúngicas pertenecientes al Orden Mucorales

El Orden Mucorales pertenece a la Clase Zygomycetes (Phylum Zygomycota, Reino Fungi), la cual se caracteriza principalmente por la producción de esporas de pared gruesa llamadas zigosporas. Como no todas las especies ubicadas en esta clase producen zigosporas, otras características morfológicas, biológicas y ecológicas también definen

esta clase. Habitualmente presentan micelio cenocítico (o sea sin septos, excepto entre la estructuras reproductivas y el resto del micelio), reproducción asexual usualmente por esporangiosporas y ausencia de células flageladas y centriolos.³⁵

Los Mucorales poseen un micelio bien desarrollado, las hifas son grandes, anchas y ramificadas. La mayoría de los géneros del orden son saprobios y pueden encontrarse en sustratos como estiércol y sustancias animales y vegetales en descomposición. En el ciclo de vida de especies del Orden Mucorales puede haber reproducción asexual, sexual, o ambas tal como se muestra en la Figura VI.4 con el ciclo de vida de *Rhizopus stolonifer*.³⁵

- Reproducción asexual: las esporas son producidas en esporangios grandes o esporangiolas pequeñas. Estas esporas son capaces de germinar y desarrollar un nuevo micelio. Algunas especies además de producir dichas esporangiosporas, se reproducen asexualmente también por la producción de clamidosporas y artrosporas que resultan característicos de determinados taxa.
- Reproducción sexual: se lleva a cabo por la unión de dos gametangios multinucleados, provenientes de un mismo talo o de dos talos compatibles, que se fusionan. Luego de la cariogamia, se produce una pared gruesa alrededor del protoplasto formando la zigospora. Las especies en este orden pueden ser homotáticas o heterotáticas. Los hongos homotáticos pueden completar su ciclo reproductivo con un talo proveniente de una espora uninucleada, sin la necesidad de introducir un segundo tipo nuclear (son autofértiles). Por otro lado, los heterotáticos son autoestériles, en un núcleo simple no llevan todos los requerimientos genéticos para el desarrollo sexual y necesitan el cruzamiento con otro talo compatible, de diferente tipo de apareamiento, para producir las zigosporas. Los Mucorales heterotáticos tienen dos grupos o tipos de apareamiento (“mating types”), los cuales se diferencian en su constitución genética por el factor de compatibilidad. Debido a que no pueden distinguirse morfológicamente dos cepas compatibles, o sea de dos “mating types”, se las denomina + y –.³⁵⁻³⁶

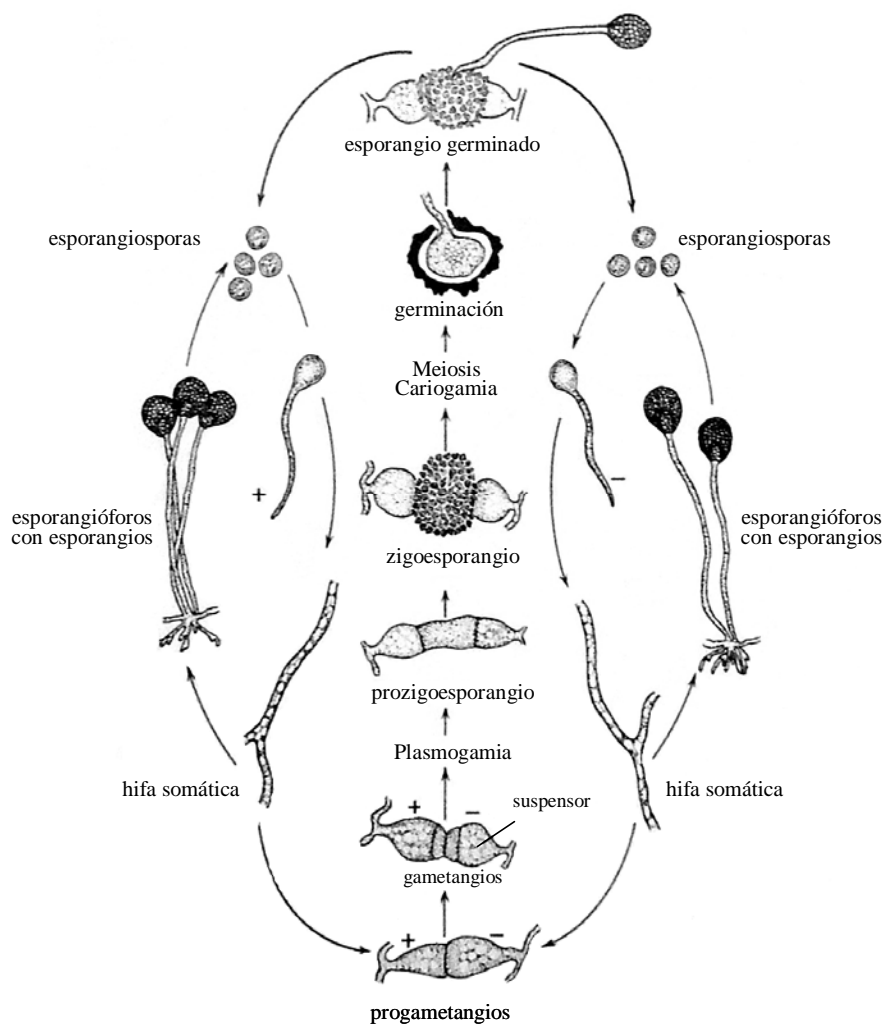


Figura VI.4. Ciclo de vida del mucoral *Rhizopus stolonifer*

En el presente capítulo se presentan los resultados provenientes de la evaluación de cepas fúngicas de diferentes géneros y especies: *Absidia coerulea*, *A. corymbifera* + (BAFC 1080), *A. corymbifera* – (BAFC 1072), *Mucor plumbeus* (BAFC 2314) y *Rhizopus oryzae* pertenecientes a la Familia Mucoraceae, y *Syncephalastrum racemosum* de la Familia Syncephalastraceae.

VI.3. Metodologías evaluadas en la modificación de drospirenona y resultados preliminares

De acuerdo a datos bibliográficos y los trabajos previos realizados en el laboratorio, las modificaciones de compuestos químicos utilizando microorganismos pueden llevarse a cabo de diferentes maneras.

Las diferentes cepas ensayadas fueron cultivadas en tubos de Agar Extracto de Malta para obtener cultivos bien esporulados. A partir de dichos tubos se prepararon las suspensiones de esporas (medio malta peptona) para utilizar en los distintos ensayos.

Una de las metodologías implementadas en el proceso de Biotransformación (denominada en el presente trabajo como Metodología A) consiste en adicionar el sustrato directamente al medio de cultivo o previamente disuelto en un pequeño volumen de solvente orgánico.

Otra metodología utilizada para realizar Biotransformaciones de sustratos implica que los microorganismos se encuentren en fase estacionaria, a partir de la cual la tasa de crecimiento disminuye (que describiremos como Metodología B). En esa etapa de crecimiento que es mínimo y la biomasa alcanza su valor máximo, los microorganismos son filtrados y posteriormente resuspendidos en diversos solventes orgánicos (BP1) o en solución reguladora (BP2). Los microorganismos y su maquinaria enzimática al igual que el sustrato a modificar estarán presentes en el medio de reacción. Por otra parte el filtrado correspondiente al medio de cultivo (BF), también puede ser evaluado ya que podría contener enzimas extracelulares. En este caso el medio de cultivo proveniente del filtrado del micelio y sustrato se encuentran en el mismo sistema de reacción.

En este trabajo se estudiaron ambas metodologías presentadas en la Figura VI.5.

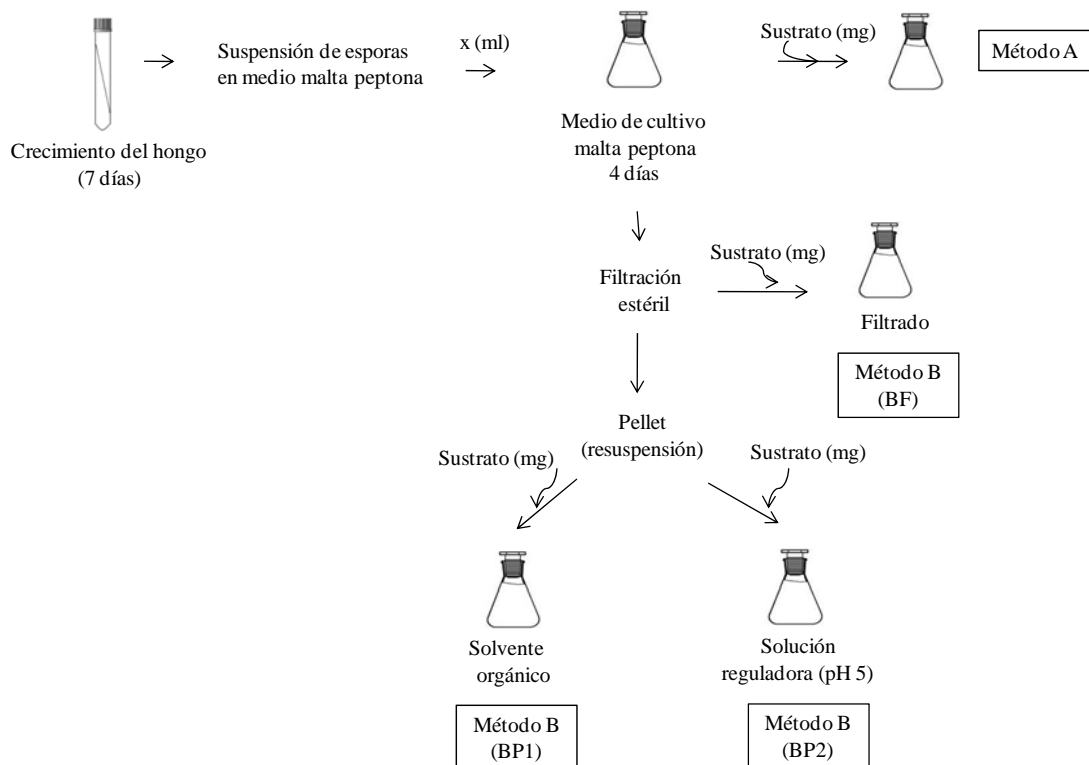


Figura VI.5. Esquema de las metodologías empleadas en la Biotransformación de drospirenona

En la metodología A, el sustrato se agregó al medio de cultivo en estado sólido o disuelto en solventes orgánicos como metanol o acetato de etilo.

En la metodología BP1 las células fueron resuspendidas en una solución reguladora de acetato de sodio/ácido acético pH 5 siendo éste un valor adecuado para el crecimiento normal de estos microorganismos. En BP2, los solventes orgánicos ensayados fueron: dioxano, hexano y tolueno.

Las reacciones fueron monitoreadas por medio de cromatografía en capa delgada (CCD) y por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). En la tabla VI.1 se resumen las diferentes cepas ensayadas, las condiciones metodológicas estudiadas y los resultados obtenidos en cada una de ellas.

Tabla VI.1. Metodologías de Biotransformación de drospirenona

Entrada	Cepa	Solvente	Metodología	Biotransformación
1	<i>A. coerulea</i>	Dioxano	BP1	-
2	<i>A. coerulea</i>	Hexano	BP1	-
3	<i>A. coerulea</i>	Tolueno	BP1	-
4	<i>A. coerulea</i>	-	BP2	+
5	<i>A. coerulea</i>	-	A	++
6	<i>A. corymbifera</i> -	Dioxano	BP1	-
7	<i>A. corymbifera</i> -	Hexano	BP1	-
8	<i>A. corymbifera</i> -	Tolueno	BP1	-
9	<i>A. corymbifera</i> -	-	BP2	+
10	<i>A. corymbifera</i> -	-	A	++
11	<i>A. corymbifera</i> -	-	BF	-
12	<i>A. corymbifera</i> +	-	A	-
13	<i>A. corymbifera</i> +/-	-	A	++
14	<i>M. plumbeus</i>	Dioxano	BP1	-
15	<i>M. plumbeus</i>	Hexano	BP1	-
16	<i>M. plumbeus</i>	Tolueno	BP1	-
17	<i>M. plumbeus</i>	-	BP2	-
18	<i>M. plumbeus</i>	-	A	-
19	<i>R. oryzae</i>	Dioxano	BP1	-
20	<i>R. oryzae</i>	Hexano	BP1	-
21	<i>R. oryzae</i>	Tolueno	BP1	-
22	<i>R. oryzae</i>	-	BP2	-
23	<i>R. oryzae</i>	-	A	-
24	<i>S. racemosun</i>	Dioxano	BP1	-
25	<i>S. racemosun</i>	Hexano	BP1	-
26	<i>S. racemosun</i>	Tolueno	BP1	-
27	<i>S. racemosun</i>	-	BP2	+
28	<i>S. racemosun</i>	-	A	++

T: 30 °C; 170 rpm; pH: 5; tamaño de inóculo 10⁵

Utilizando la Metodología A, es decir adicionando el sustrato directamente al medio de cultivo, se obtuvieron diferentes productos de Biotransformación. El micelio en el medio de cultivo líquido inoculado luego de 5 días de crecimiento puede presentar una estructura macroscópica esférica organizada (pellets esféricos) o una estructura difusa.

Se observó que cuando se generaban las estructuras esféricas se obtenían resultados satisfactorios. En la Figura VI.6 (derecha) se presenta el cultivo obtenido con las estructuras óptimas para la Biotransformación. El cultivo con micelio desorganizado, incompatible con el bioproceso, se observa en la Figura VI.6 (izquierda).

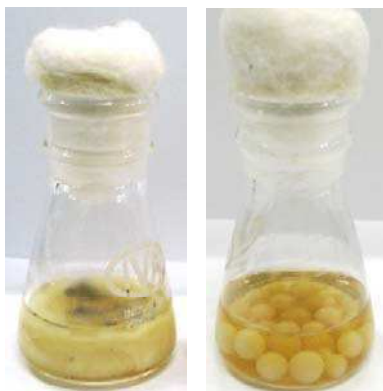


Figura VI.6. Cultivo de *A. corymbifera* – en su morfología de pellets esféricos (derecha) y en su forma desorganizada (izquierda)

La aplicación de la metodología BP1, en la cual las células fueron resuspendidas en solventes orgánicos (por ejemplo: entradas 1, 2 y 3) no resultó apropiada para llevar a cabo el proceso de Biotransformación. La ausencia de productos de transformación puede deberse a una pérdida de la homeostasis celular a causa de la utilización de solventes orgánicos.

La filtración del micelio y posterior resuspensión del mismo en una solución reguladora de acetato pH 5 (BP2) generó los mismos productos de transformación que los obtenidos en el medio de cultivo inoculado (A), sin embargo las conversiones obtenidas fueron menores, posiblemente debido a una cierta inactivación de la maquinaria metabólica del microorganismo.

En el caso del medio filtrado libre de micelio (BF) no se obtuvieron productos de reacción. Estos resultados guardan relación con el sistema enzimático asociado al proceso de Biotransformación, el citocromo P450, que se encuentra compartimentalizado a nivel mitocondrial y no tiene actividad enzimática extracelular.

La observación de los datos presentados en la Tabla VI.1 indica que los géneros *Absidia* y *Syncephalastrum* permitieron la modificación estructural de drospirenona. Existe

datos bibliográficos que informan que ambos géneros, por acción de enzimas hidroxilasas (citocromo P450), producen cambios oxidativos en diversos tipos de compuestos incluyendo los compuestos esteroidales.

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos con las diferentes metodologías de Biotransformación, se continuó el trabajo optimizando los diferentes parámetros del bioproceso para el caso de *Absidia corymbifera* -.

VI.4. Análisis de los productos obtenidos

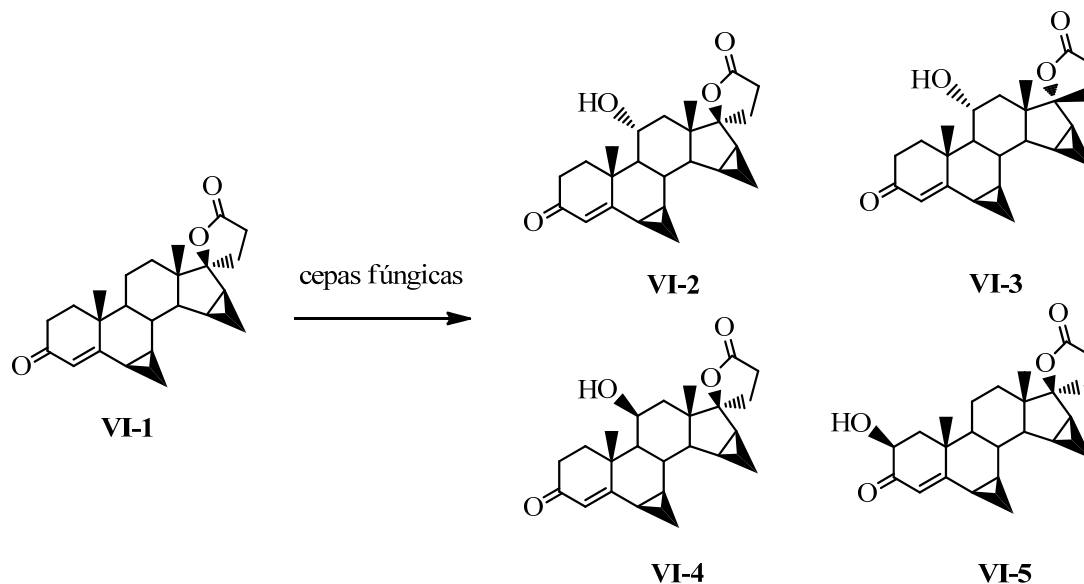
Las células enteras son los biocatalizadores preferenciales en caso de necesitarse la presencia de cofactores para la catálisis (dado que éstos son aportados por las células), cuando la reacción requiere varios pasos, o en procesos fermentativos. Sin embargo, a pesar de estas ventajas, es necesario aclarar que tanto el aislamiento como purificación de los productos obtenidos por la aplicación de Biotransformación resulta una tarea sumamente complicada debido a la cantidad de componentes presentes en el medio de cultivo. Otra desventaja que presenta ésta metodología es que se utilizan concentraciones bajas de sustrato y no es aplicable a sustratos que participen en el metabolismo respiratorio o fermentativo del microorganismo a ensayar.

Los productos obtenidos en el presente trabajo fueron aislados y purificados por cromatografía en columna y placa preparativa tal como se describe en la parte experimental. Una vez finalizada la Biotransformación el micelio fue filtrado y lavado con diclorometano. Por otra parte se realizaron extracciones del filtrado del micelio también con diclorometano. Las fases orgánicas se evaporaron y ese extracto fue purificado por técnicas cromatográficas.

El análisis del extracto confirmó la presencia de cuatro productos que ya se habían detectado durante el curso de la biotransformación.

La identidad de los productos fue determinada por técnicas espectroscópicas: Espectroscopía de RMN, a través de espectros mono- y bidimensionales y por Espectrometría de masa de alta resolución. Mediante los espectros monodimensionales de ^1H y ^{13}C , bidimensionales HSQC y HMBC y HRESI-MS se determinaron los productos de oxidación de drospirenona obtenidos mediante Biotransformación. La

estereoselectividad fue determinada a través del espectro NOESY. Los productos obtenidos por Biotransformación se presentan en el Esquema VI.7.



Esquema VI.7. Productos obtenidos por Biotransformación de drospirenona con *Absidia corymbifera* -.

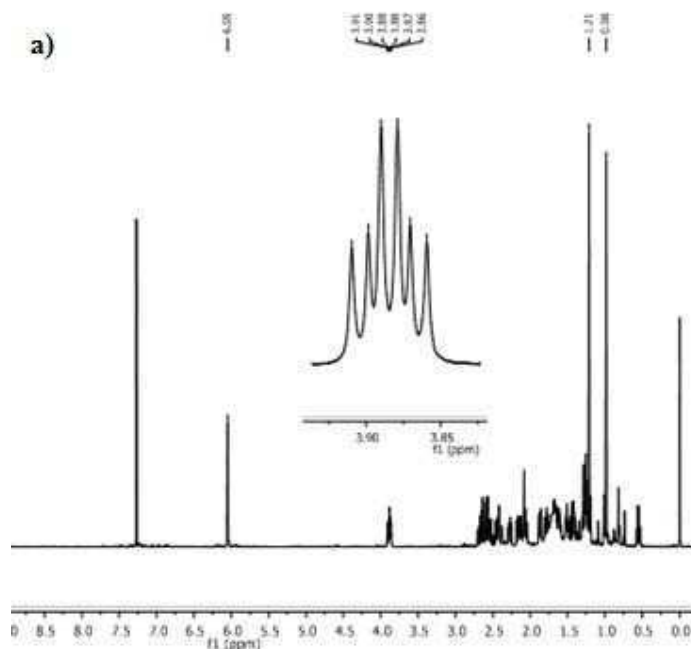
El espectro de masa de cada uno de los compuestos aislados fue idéntico, indicando que todos ellos correspondían a compuestos monohidroxilados.

El compuesto **VI-2** fue obtenido como un sólido blanco. El punto de fusión obtenido (238-239 °C fue concordante con el reportado por los autores (238,8 °C).³⁷

Su peso molecular fue determinado por espectrometría de masa de alta resolución (EMAR-ESI), observándose un ion de $m/z = 383,22086$ correspondiente al ión $[M+H]$ y $m/z = 405,20437$ correspondiente al ión $[M+Na]$, indicando la presencia de un grupo oxígeno adicional con respecto a la drospirenona **VI-1**. Este compuesto ya ha sido reportado como producto de Biotransformación utilizando *Colletotrichum phomoides* (Phylum Ascomycota, Reino Fungi), habiendo determinado su peso molecular por análisis elemental.³⁷

El espectro protónico del compuesto **VI-2** muestra la aparición de una señal multiplete a $\delta = 3,89$ ppm correspondiente al H-11, consistente con la hidroxilación en dicha posición y cambios en los desplazamientos químicos de los protones 9, 12 y 19, con respecto a la drospirenona, de $\delta = 1,13$ a $1,27$ ppm, $\delta = 1,46$ y $1,42$ a $1,86$ y $1,44$ ppm y de $\delta = 1,10$ a $1,21$ ppm respectivamente. En el espectro de ^{13}C se observa la aparición de una señal,

correspondiente al C-11, a $\delta= 67,6$ del producto y desaparición de la señal $\delta= 20,8$ presente en el sustrato. En el espectro bidimensional COSY se observan las señales de correlación del H-11 con los H-9 ($\delta= 1,29$ ppm) y H-12 ($\delta= 1,87$ y $1,43$ ppm). Las señales de los H-9 y 12 fueron determinadas a partir del espectro protónico y sus señales de carbono a partir de espectros bidimensionales de correlación protón-carbono HSQC y HMBC, donde pueden observarse las señales de correlación H-C a un enlace y H-C a más de un enlace respectivamente. La señal de H-9 ($\delta= 1,27$) mostró correlación con los C-8 ($\delta= 34,2$ ppm), 11 ($\delta= 67,6$ ppm) y 19 ($\delta= 18,5$ ppm) y la de H-12 ($\delta= 1,86$ y $1,44$ ppm) con los C-11 ($\delta= 67,6$ ppm), 14 ($\delta= 51,8$ ppm) y 19 ($\delta= 18,5$ ppm). La orientación β del H-11 fue determinada por las señales de correlación en el espectro NOESY, donde podemos observar el efecto nuclear Overhauser entre el H-11 ($\delta= 3,89$ ppm) y los protones de los metilos 18 ($\delta= 0,98$ ppm) y 19 ($\delta= 1,21$ ppm). En la Figura VI.8 se muestran los espectros de ^1H , ^{13}C y NOESY donde se encuentran señaladas señales diagnósticas del compuesto **VI-2**.



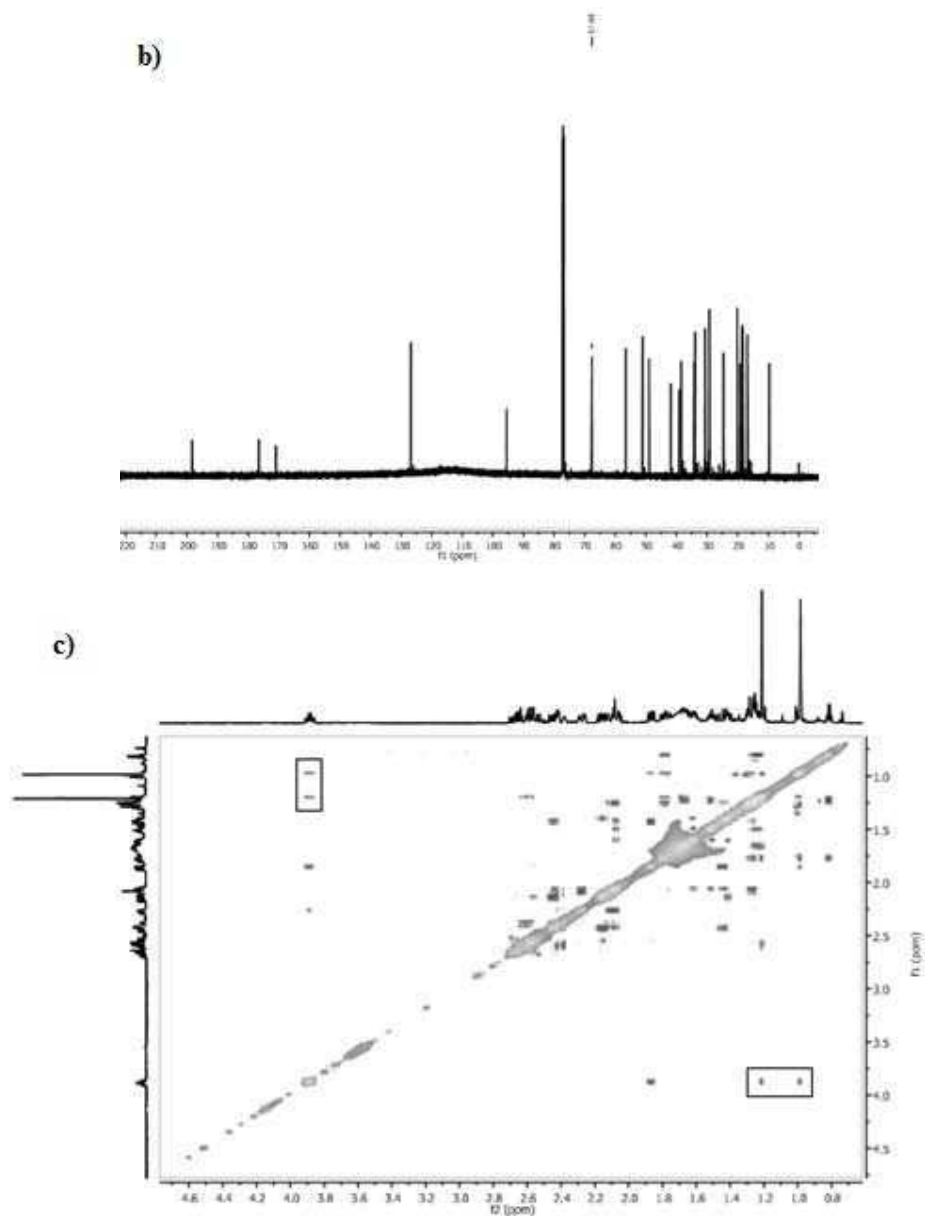


Figura VI.8. Espectro ^1H (a), ^{13}C (b) y NOESY (c) del compuesto VI-2. En el espectro d) se encuentran recuadradas las señales de correlación H-11 y H-18 y 19.

Los otros tres productos obtenidos por Biotransformación de drospirenona fueron analizados de igual manera que el producto **VI-2**. Estos compuestos no se encuentran descritos en literatura.

El compuesto **VI-3** fue aislado como un sólido blanco de punto de fusión 224-225 °C. Se observó al igual que en el caso anterior, en el espectro protónico, la aparición de una

señal multiplete correspondiente al H-11 a $\delta=3.82$ y corrimientos de los desplazamientos químicos de las señales de los H-15, 15' y 16 de $\delta=1.60$ a 1.67 ppm, 1.33 y 0.54 a 0.97 y 0.56 ppm y 1.37 a 1.52 respectivamente con respecto a drospirenona. En el espectro de ^{13}C se observó al igual que en el caso anterior la aparición de una señal a $\delta= 67,7$ ppm correspondiente al C-11 del producto y desaparición de la señal del C-11 de drospirenona. Las correlaciones en COSY, HSQC y HMBC fueron determinadas y concordantes con la estructura planteada. El espectro NOESY mostró correlaciones entre el H-11 y los H-18 y 19 y el H-20 con el H-18 lo que indicó la epimerización del carbono 17.

El compuesto **VI-4** fue aislado como un sólido blanco de punto de fusión $170-171$ °C y presentó una señal multiplete al igual que en los casos anteriores en el espectro protónico a $\delta=3,73$ ppm correspondiente al H-11. En el espectro de ^{13}C se observó la aparición de una señal a $\delta= 67,7$ ppm correspondiente al C-11. Las señales de los espectros mono- y bidimensionales presentan concordancia con la estructura planteada. Las señales de correlación existentes en el espectro NOESY del H-11 y los H-1 y H-12 y la pérdida de señales de NOE del H-11 con los H-18 y 19, nos indican la orientación α del H-11.

El espectro protónico del producto **VI-5**, aislado como un sólido blanco de punto de fusión $185-187$ °C, muestra diferencias con respecto a los anteriores. Presenta un doblete a $\delta= 4,38$ ppm correspondiente al H-2 y un corrimiento en la señal del H-19 de $\delta= 1,10$ ppm a $1,35$ ppm con respecto a drospirenona (Figura VI.9). El espectro de ^{13}C presenta una señal a $\delta= 68,5$ ppm perteneciente al C-2. Las señales observadas en los espectros mono- y bidimensionales son concordantes con la estructura planteada.

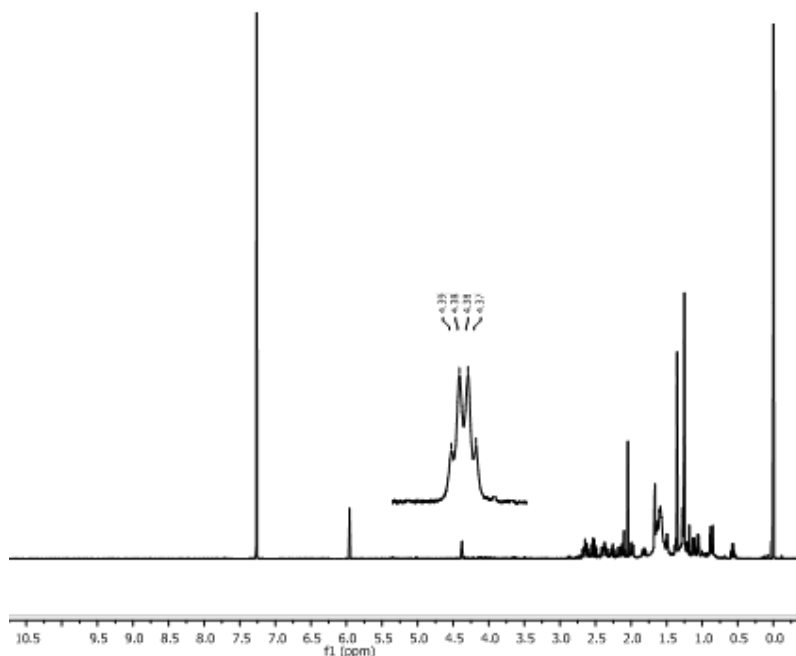


Figura VI.9. Espectro ^1H correspondiente al producto de biotransformación **VI-5**

VI.5. Estudio de los parámetros de Biotransformación de drospirenona

Fueron evaluados diferentes parámetros tales como: tamaño del inóculo (concentración de esporas), tiempo de reacción, concentración de sustrato, agregado de sustrato directo o previamente disuelto, temperatura de reacción, pH y agitación. En la evaluación de los mismos se utilizó la cepa *A. corymbifera* –, ya que la misma fue la que presentó la mayor variedad de productos de Biotransformación.

VI.5.1. Efecto del tamaño del inóculo (concentración de esporas)

Con el objetivo de evaluar el tamaño del inóculo óptimo para el proceso de Biotransformación se llevaron a cabo experimentos con diferentes concentraciones de esporas. Inicialmente se preparó una suspensión madre de esporas en medio de cultivo y se determinó su concentración realizando un recuento en cámara de Neubauer.

Considerando el valor obtenido se adicionó a cada ensayo un determinado volumen de la suspensión madre con el fin de obtener las concentraciones: 10^4 , 10^5 y 10^6 esporas/ml. Las concentraciones fueron elegidas de acuerdo a ensayos previos de crecimiento en donde se había observado que concentraciones menores a 10^4 generaban un crecimiento débil. Macroscópicamente el cultivo presentaba pequeños núcleos de crecimiento, carentes de estructuras homogéneas e incapaces de producir la Biotransformación.

Los ensayos fueron realizados por triplicado, a una concentración de sustrato de 0,5 mg/ml, 30 °C y 170 rpm. Luego de 5 días de reacción el cultivo fue filtrado y los productos presentes en la fase acuosa fueron extraídos con diclorometano. Los resultados de porcentaje de conversión fueron determinados mediante CLAR y los valores obtenidos para cada compuesto se muestran en la Figura VI.10.

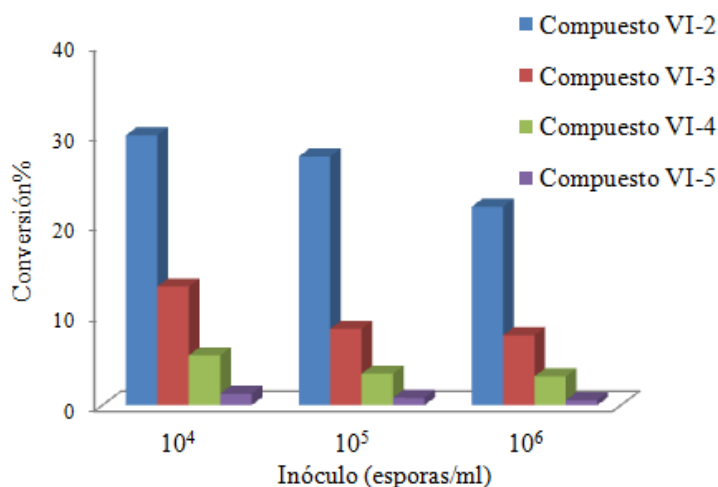


Figura VI.10. Efecto del tamaño de inóculo en la Biotransformación de drospirenona.

A partir de los resultados presentados en la Figura VI.10 podemos observar que al aumentar el tamaño del inóculo disminuye el porcentaje de conversión para cada uno de los productos obtenidos.

A mayor tamaño del inóculo, el efecto macroscópico observado resultó en un aumento del número de pellets y una disminución del tamaño de los mismos, generándose un

agregado entre dichas estructuras. Estos cambios en la morfología pueden haber generado una disminución en la difusión del sustrato hacia el interior de la masa micelial decreciendo la actividad específica del microorganismo.

VI.5.2. Tiempo de reacción

La determinación del tiempo de reacción óptimo se realizó empleando un tamaño de inóculo de 10^4 esporas/ml. Los ensayos se realizaron por triplicado y en las mismas condiciones de concentración de sustrato, temperatura y agitación que la sección anterior. Luego de los tiempos establecidos (Figura VI.11), las reacciones fueron analizadas de igual manera que en la sección VI.5.1.

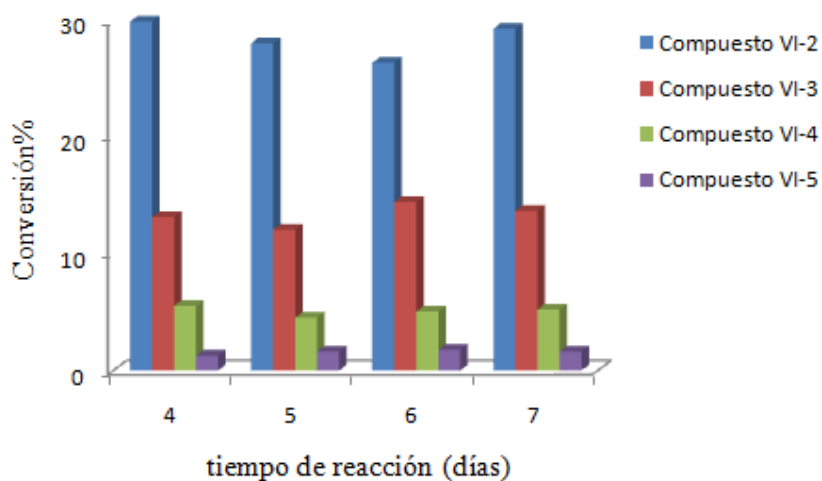


Figura VI.11. Efecto del tiempo de reacción en la Biotransformación de drospirenona

De acuerdo a los resultados presentados en la Figura VI.11 observamos que tiempos mayores a 4 días no producen cambios significativos en el porcentaje de conversión de los productos de Biotransformación. No se muestran datos correspondientes a tiempos

menores de reacción debido a que en el seguimiento por CCD se observaban bajas conversiones y gran parte del sustrato sólido en el medio de cultivo.

VI.5.3. Velocidad de agitación

Se evaluaron diferentes velocidades de agitación con el objetivo de obtener la velocidad adecuada a la cual la conversión fuese máxima. Para ello se utilizaron las condiciones de tamaño del inóculo y tiempo de reacción óptimos establecidos previamente. Los demás parámetros de reacción, metodología de extracción y análisis de productos se llevaron a cabo de la misma manera que en la sección VI.5.1. Los cultivos fueron agitados a 0 (cultivos en reposo), 90 y 170 rpm. Los resultados obtenidos para cada una de las condiciones se presentan en la Figura VI.12.

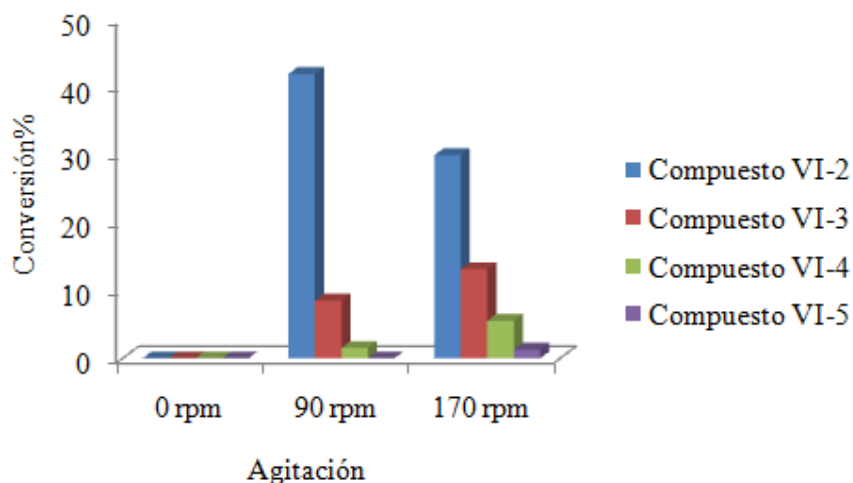


Figura VI.12. Efecto de la agitación en la Biotransformación de drospirenona

De acuerdo a los resultados presentados en la Figura VI.12, puede observarse que el cultivo de microorganismos debe ser agitado para que el proceso de biotransformación se lleve a cabo. En el caso del cultivo en reposo se observó a nivel macroscópico un crecimiento difuso y débil, que era visualizado como una turbidez del medio de cultivo, sin llegar a formar los pellets esféricos que presentó cuando el mismo fue agitado. Por

otra parte, para que se lleve a cabo la catálisis enzimática debe existir la difusión del sustrato hacia el sitio de activo enzimático, no estando favorecido en este caso dado que el sistema se mantiene estático.

Se puede observar que si se aumenta la agitación de 90 a 170 rpm el porcentaje de conversión correspondiente al producto mayoritario (**VI-2**) disminuye y el proceso de biotransformación se vuelve menos regioselectivo.

VI.5.4. Efectos del pH del medio de cultivo

Con el objetivo de evaluar la influencia del pH del medio de cultivo en el proceso de biotransformación de drospirenona se realizaron determinaciones a diferentes valores del mismo. El pH del medio de cultivo fue ajustado a los valores de 5, 7 y 10 previo a su inoculación. Luego el medio fue inoculado de manera tal de obtener una concentración final de 10^4 esporas/ml. La concentración de sustrato empleada en el ensayo fue de 0,5 mg/ml, a 30 °C y a 170 rpm. Las reacciones fueron realizadas por triplicado y luego de transcurridos 4 días de reacción, en los casos en los que correspondía, fueron filtradas y extraídas con diclorometano. Los resultados se presentan en la Tabla VI.2.

Tabla VI.2. Efectos de la variación de pH en la Biotransformación de drospirenona

pH	Conversión (%)			
	VI-2	VI-3	VI-4	VI-5
5	31,9±0,5	13,7±1,1	5,7±0,5	1,3±0,1
7	27,8±4,0	6,5±0,1	4,1±0,1	0,9±0,1
10 ^a	-	-	-	-

^a: No hubo crecimiento.

Los resultados de la Tabla VI.2 indican que tanto a pH ácido como neutro las conversiones son similares excepto para el compuesto **VI-3** donde se evidencia que la epimerización se ve altamente favorecida a pH levemente ácido. Con el objetivo de

verificar que la reacción de epimerización era llevada a cabo por el microorganismo encargado de biotransformar a la drospirenona, decidimos realizar como control la incorporación del sustrato en el medio de cultivo de pH 5 sin inocular. El ensayo fue llevado a cabo en las mismas condiciones de concentración de sustrato, temperatura, tiempo de reacción y agitación que las establecidas en la evaluación de la influencia de pH. El análisis del control no mostró la presencia de ningún producto de modificación de drospirenona, por lo que se puede concluir que la epimerización fue llevada a cabo por el microorganismo y no como consecuencia de la acidez del medio de cultivo.

VI.5.5. Efecto de la temperatura

La temperatura fue otro de los parámetros optimizados en la biotransformación de drospirenona. Existen datos bibliográficos que establecen que la temperatura óptima de crecimiento informada para *A. corymbifera* varía entre 35-37 °C,³⁸ sin embargo se decidió investigar la biotransformación de drospirenona a diferentes temperaturas con el fin de evaluar su influencia no sólo sobre el crecimiento del microorganismo sino también sobre la actividad del complejo enzimático implicado en la transformación. Se seleccionaron las temperaturas de 25, 30 y 35 °C y los resultados se presentan en la Tabla VI.3.

Tabla VI.3. Efecto de la temperatura en la Biotransformación de drospirenona

Temperatura (°C)	Conversión (%)			
	VI-2	VI-3	VI-4	VI-5
25	33,6±1,3	10,0±1,1	2,1±0,3	-
30	31,9±0,5	13,6±1,1	5,7±0,5	1,3±0,1
35 ^a	-	-	-	-

^a No hubo crecimiento

De acuerdo a los resultados de la Tabla VI.3 podemos observar que al aumentar la temperatura de 25 a 30°C la biotransformación es menos regioselectiva y se ve levemente favorecida la reacción de epimerización del compuesto esteroidal. No se observó crecimiento a 35°C a pesar de que los datos bibliográficos informan esta temperatura como una de las temperaturas óptimas de crecimiento.

VI.5.6. Efecto del agregado de disolvente

Dado que el sustrato a ensayar presenta baja solubilidad en medios acuosos se decidió evaluar el proceso de Biotransformación a partir del agregado del sustrato previamente disuelto en solvente orgánico. Se determinó la solubilidad de drospirenona en acetato de etilo y metanol, dando un resultado de 35 mg/ml y 50 mg/ml respectivamente. Se realizaron los ensayos en las condiciones descritas anteriormente. En la Tabla VI.4 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla VI.4. Efectos del agregado de solvente orgánico en la Biotransformación de drospirenona.

Solvente	Conversión (%)			
	VI-2	VI-3	VI-4	VI-5
Acetato de etilo	28,3±3,2	8,5±2,1	1,5±0,8	1,1±0,4
Metanol	4,1±1,2	1,9±0,5	0,7±0,1	-

Concentración de drospirenona: 0,5 mg/ml

De acuerdo a los resultados de la tabla podemos observar que el agregado de sustrato disuelto en metanol provoca una disminución importante en las conversiones. Si bien la proporción de solvente en el medio de cultivo es muy pequeña (0,3 ml de acetato de etilo y 0,2 ml de metanol), evidentemente provoca un efecto importante, probablemente tóxico, sobre la actividad de los microorganismos. Este efecto no es observado cuando se utiliza acetato de etilo como disolvente. Sin embargo los resultados de conversión

obtenidos son menores que aquellos observados agregando la drospirenona en estado sólido.

VI.5.7. Concentración de sustrato

Se evaluó la concentración óptima de drospirenona en el proceso de biotransformación de la misma. Las concentraciones finales ensayadas fueron: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5 mg/ml. Los parámetros de tamaño del inóculo y tiempo de reacción fueron los establecidos anteriormente como óptimos. En cuanto a la velocidad de agitación se seleccionó la correspondiente a 170 rpm dado que a esa velocidad se obtenían todos los productos de reacción. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura VI.13.

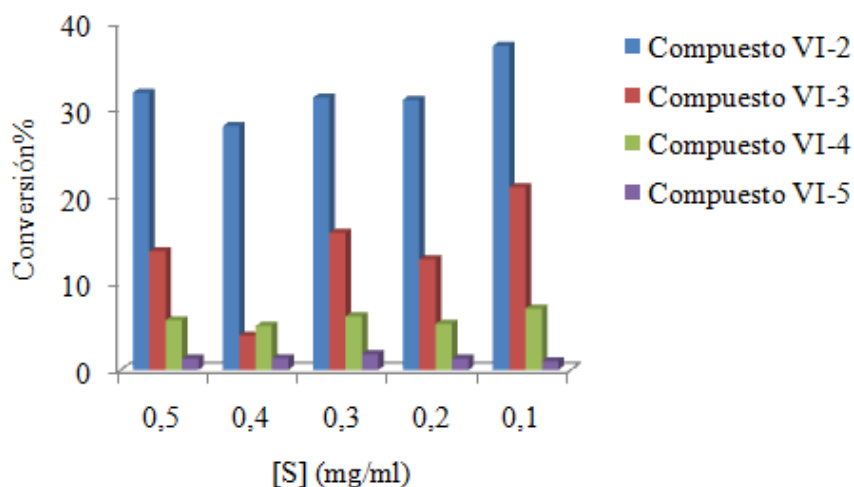


Figura VI.13. Efecto de la concentración de sustrato en el proceso de Biotransformación

Podemos observar a partir de la Figura VI.13 que la concentración de drospirenona que presenta la máxima conversión corresponde a 0,1 mg/ml. Concentraciones mayores disminuyen, aunque no de manera notoria, el porcentaje de conversión.

VI.6. Rendimiento de Biotransformación: cepas fúngicas efectivas

Una vez evaluados los parámetros del proceso de Biotransformación, se investigó el comportamiento de las distintas cepas de Mucorales que habían resultado ser efectivas en dicho proceso (Tabla VI.1). Se seleccionaron las condiciones en las cuales se obtenían todos los productos de biotransformación: 10^4 esporas/ml como tamaño del inóculo, 0,1 mg/ml de concentración de sustrato, 30 °C, una velocidad de agitación de 170 rpm y pH 5. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados para cada una de las cepas ensayadas se muestran en la Tabla VI.5.

Tabla VI.5. Productos de Biotransformación obtenidos a partir de cepas fúngicas del Orden Mucorales

Cepa	Conversión (%)			
	VI-2	VI-3	VI-4	VI-5
<i>A. corymbifera</i> -	31,9±0,5	13,7±1	5,7±0,5	1,3±0,1
<i>A. corymbifera</i> +/-	20,4±0,5	15,5±0,6	3,8±0,6	4,6±0,1
<i>A. coerulea</i>	22,2±6,6	15,6±2,8	3,2±0,7	2,9±0,1
<i>S. racemosun</i>	47,6±2,1	-	1,9±0,1	1,8±0,1

Teniendo en cuenta los resultados de la Tabla VI.5 podemos observar que el género *Absidia* permite obtener un número mayor de productos de Biotransformación. Las especies ensayadas generaron productos de hidroxilación en las posiciones 11 y 2 siendo en todos los casos la posición 11 preferencial para la reacción de oxidación. Se puede observar también que las distintas especies son capaces de producir la epimerización en el carbono 17 (producto **VI-3**).

S. racemosun también generó productos de transformación de drospirenona, obteniéndose con este género conversiones mayores para el caso del producto mayoritario (**VI-2**). Este

hongo no fue capaz de llevar a cabo la reacción de epimerización en el carbono 17, por lo cual mostró un comportamiento altamente regioselectivo.

Conclusión

En esta parte del trabajo se logró llevar a cabo la Biotransformación de la progestina sintética drospirenona empleando células enteras de diversas cepas fúngicas como biocatalizadores.

Primeramente se investigaron las estrategias metodológicas apropiadas para realizar el proceso de Biotransformación. La estrategia de agregado del sustrato al microorganismo en crecimiento en un medio de cultivo líquido fue la que permitió obtener los productos de reacción con mayores conversiones.

Una vez seleccionada la estrategia de Biotransformación se optimizaron los diferentes parámetros del proceso: tamaño del inóculo, tiempo de reacción, temperatura, pH, velocidad de agitación y concentración del sustrato.

Los productos obtenidos fueron completamente identificados por métodos espectroscópicos siendo en todos los casos productos monohidroxilados. De los cuatro productos obtenidos, tres de ellos resultaron novedosos. Sus estructuras fueron determinadas por resonancia magnética nuclear protónica y de carbono trece, mono- y bidimensional.

Entre los géneros estudiados pertenecientes al Orden Mucorales, solamente *Absidia* y *Syncephalastrum* fueron capaces de producir la Biotransformación de drospirenona. Las cepas de ambos géneros dieron productos monohidroxilados preferentemente en la posición 11 (VI-2). La cepa del género *Syncephalastrum* mostró mayor conversión para este compuesto monohidroxilado, en relación a las cepas del género *Absidia*.

Por otra parte, la Biotransformación no sólo fue regioselectiva sino también en ambos casos estereoselectiva dado que la hidroxilación fue mayoritariamente en configuración α . Como máximo se obtuvo cerca de 6% del producto en configuración β . Este es un resultado interesante, ya que difiere del comportamiento estereoquímico de muchas especies del género *Absidia* con sustratos esteroidales, que generan productos de

hidroxilación con configuración β . La estructura de la drospirenona conteniendo un anillo lactónico y dos anillos de ciclopropano en configuración β podría también ser causa de esta estereoselectividad.

Si bien las cepas de los géneros mencionados dieron como producto mayoritario el derivado α -monohidroxiado en posición 11 y como productos minoritarios monohidroxiados 11- β y 2- β , las cepas del género *Absidia* resultaron ser las únicas que actuaron como biocatalizadoras en la reacción de epimerización en el carbono 17 (**VI-3**).

La cepa *A. corymbifera* – presentó mayores porcentajes de conversión para los productos **VI-2** y **VI-4**, mientras que *A. coerulea* y *A. corymbifera*+/- resultaron ser más eficientes en la producción de **VI-3** y **VI-5**.

Bibliografía

1. Endrikat, J.; Gerlinger, C.; Richard, S.; Rosenbaum, P.; Düsterberg, B. *Contraception*, **2011**, *84*, 549-557.
2. Schindler, A. E.; Campagnol; C.; Druckmann, R.; Huber, J.; Pasqualini, J.; Schwepf, K. W.; Thijssen, J. H. H. *Maturitas*, **2008**, *61*, 171-180.
3. Sitruk-Ware; R. *Maturitas*, **2008**, *61*, 151-157.
4. Lumachi; F.; Basso, S. M. M. *Current Medicinal Chemistry*, **2010**, *17*, 2530-2538.
5. Foidart, J. M.; Desreux, J.; Pintiaux, A.; Gompel, A. *Climacteric*, **2007**, *10*, 54-61.
6. Genazzani, A. R.; Lucchesi, A.; Stomati, M. *Eur J Contracept Reprod Health Care*, **1997**, *2*, 63-69.
7. Speroff, L.; FritzClinical, M. *Gynecologic endocrinology and infertility* (7th ed) Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore (Md) (2005).
8. Vercellini, P.; Somigliana, E.; Viganò, P.; Abbiati, A.; Barbara, G.; Crosignani, P.G. *Drugs*, **2009**, *69*, 649-675.
9. de Tommaso, M. *Current Pain and Headache Reports*, **2011**, *15*, 400-406.
10. Baker, L. J.; O'Brien, P. M. S. *Maturitas*, **2012**, *72*, 121-125.
11. Bayoglu Tekin, Y.; Dilbaz, B.; Altinbas, S. K.; Dilbaz, S. *Fertility and Sterility*, **2011**, *95*, 492-496.
12. Goldstuck, N. *Middle East Fertility Society Journal*, **2011**, *16*, 248-253.
13. Swyer, G. I. M. *J Roy Soc Med*, **1984**, *77*, 406-409.
14. Goldstuck, N. D. *J Soc Obstet Gynecol Can*, **1997**, *19*, 181-185.
15. Goldzieher, J. W. *J. Reprod Med*, **1986**, *31*, 5335-5375.
16. Dubey, R. K.; Oparil, S.; Imthurn, B.; Jackson, E. K. *Cardiovascular Research*, **2002**, *53*, 688-708.
17. Lindén Hirschberg, A. *Maturitas*, **2012**, *71*, 248-256.
18. Canonico, M.; Plu-Bureau, G.; Scarabin, P. Y. *Maturitas*, **2011**, *70*, 354-360.
19. Olié, V.; Canonico, M.; Scarabin, P. Y. *Thrombosis Research*, **2011**, *127* (SUPPL. 3), 26-29.
20. Goldstuck, N. *Middle East Fertility Society Journal*, **2011**, *16*, 248-253.

21. Ahmed, A. H.; Gordon, R. D.; Taylor, P. J.; Ward, G.; Pimenta, E.; Stowasser, M. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **2011**, *96*, 1797-1804.
22. Sarna, M. A.; Hollenberg, N. K.; Seely, E. W.; Ahmed, S. B. *Journal of Human Hypertension*, **2009**, *23*, 407-414.
23. Sitruk-Ware, R.; Nath, A. *Contraception*, **2010**, *82*, 410-417.
24. Ashton, M. J.; Lawrence, C.; Karlsson, J. A.; Stuttle, K. A. J.; Newton, C. G.; Vacher, B. Y. J.; Webber, S.; Withnall, M. J. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1996**, *39*, 4888-4896.
25. Petrič, Š, Hakkib, T., Bernhardt, R; Žigon, D.; Črešnar, B. *Journal of Biotechnology*, **2010**, *150*, 428-437.
26. Angelova, B.; Fernandes, P.; Cruz, A.; Pinheiro, H. M.; Mutafov, S.; Cabral, J. M. S. *Enzyme and Microbial Technology*, **2005**, *37*, 718-722.
27. Kun, C.; Wang-Yu, T.; Dong-Zhi, W.; Wei, J. *Enzyme and Microbial Technology*, **2007**, *41*, 71-79.
28. Huszcza, E.; Dmochowska-Gladysz, J; *J. Basic Microbiol.*, **2003**, *43*, 113-120.
29. Torshabi, M; Badiie; M.; Faramarzi, M. A.; Rastegar, H.; Forootanfar, H.; Mohit, E. *Chemistry of Natural Compounds*, **2011**, *47*, 59-63.
30. Manosroi, J.; Saowakhon, S.; Manosroi, A. *Enzyme and Microbial Technology*, **2007**, *41*, 322-325.
31. Koshimuraa, M.; Utsukiharab, T.; Haraa, A.; Mizobuchia, S.; Horiuchic, C. A.; Kuniyoshia, M. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2010**, *67*, 72-77.
32. Monsalve, L. N.; Cerrutti, P.; Galvagno, M. A.; Baldessari, A. *Biocatalysis and Biotransformation*, **2010**, *28*, 137-143.
33. Rustoy, E.; Cerrutti, P.; Galvagno, M.; Baldessari, A. *Biocatalysis and Biotransformation*, **2008**, *26*, 204-209.
34. Mangone, C. P.; N. Pereyra, E.; Argimón, S.; Moreno, S.; Baldessari, A. *Enzyme and Microbial Technology*, **2002**, *30*, 596-601.
35. Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M. (1996). *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons Eds. 869 pp.
36. Moore-Landecker E. (1996). *Fundamentals of the Fungi*. Prentice Hall Eds. 574 pp.

37. Nickisch, K.; Bittler, D.; Casals-Stenzel, J.; Laurent, H.; Nickolson, R.; Nishino, Y.; Petzoldt, K.; Wiechert, R. *J. Med. Chem.*, **1985**, 28, 546-550.
38. Pitt, J. I., Hocking, A. (1997). *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic & Professional, Cambridge.

Capítulo VII

Parte experimental

VII. PARTE EXPERIMENTAL

VII.1. Generalidades

VII.1.1. Solventes y reactivos

Los solventes utilizados en este trabajo de tesis en cromatografía (columna y capa delgada) y extracción fueron purificados por destilación fraccionada (excepto el tolueno que fue utilizado directamente). Los solventes empleados en las reacciones son de grado analítico y fueron utilizados sin ningún tratamiento adicional.

Todos los reactivos empleados se utilizaron sin tratamiento previo.

VII.1.2. Biocatalizadores

1- Lipasas

Se emplearon lipasas de diferentes orígenes:

A- Comercial

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

Lipasa de *Candida antarctica*, fracción B, inmovilizada sobre una resina acrílica macroporosa. Es producida por el organismo huésped *Aspergillus oryzae*, luego de haberle transferido 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 pH 7,7.

Actividad: 1170U/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 trioleina a 40 °C (unidad de transesterificación en lote, BIU*).

Actividad: 25 BIU/g (masa de sólido)

*BIU es el acrónimo de Batch Interesterification Units.

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

Lipasa de *Pseudomonas* inmovilizada sobre partículas de 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- Proveniente del agro-residuo de *Carica papaya**

- Lipasa de *Carica papaya* (CPL)

El látex de *Carica papaya* es extraído con agua destilada para eliminar el 99 % de las proteasas. Las lipasas presentes en el látex se encuentran autoinmovilizadas en el mismo

Actividad determinada por la velocidad con la que cataliza la liberación de ácido graso a partir de tributirina.

Actividad: 1500 U/g (masa de sólido)

C- Heteróloga

- Lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL)

C-1. Producción de lipasa heteróloga de *Rhizopus oryzae*

La producción de la lipasa heteróloga de *Rhizopus oryzae* fue llevada a cabo por el grupo del Dr. Francisco Valero, en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Para la obtención de ROL se utilizó como hospedador una cepa mutante de *Pichia pastoris* (Mut^s). *Pichia pastoris* contiene dos genes (AOX1 y AOX2) que codifican para la enzima alcohol oxidasa. La mutante Mut^s resulta de la delección del gen *AOX1*, utilizando el metanol de manera lenta. La cepa fue transformada por electroporación, el vector con el que el hospedador fue transformado contiene una copia del gen que codifica para la ROL. Se inocularon con el microorganismo erlenmeyes conteniendo un litro de medio de cultivo, antes de su incorporación al birreactor. Luego de 30 minutos de ser incubados a 30 °C y a 200 rpm, el cultivo fue centrifugado a 4000 x g y las células fueron resuspendidas en 30 ml de agua estéril y se utilizaron para inocular 5 litros del biorreactor. Las condiciones de temperatura y agitación del biorreactor fueron 30 °C y 1000 rpm y a pH controlado de 5.5. Inicialmente el cultivo del biorreactor comenzó con una concentración de glicerol de

40 g/litro, luego en una segunda fase (fase de transición) cuando la concentración de glicerol disminuyó, se adicionaron en forma separada 10 g/litro de sorbitol y 5 g/litro de metanol. Una vez que los sustratos fueron consumidos se comenzó con la fase de inducción con el agregado de sorbitol en una relación exponencial pre-programada con el objetivo de mantener una relación de crecimiento en un valor constante. El valor de la concentración de metanol (valor de ajuste o *set point*) fue mantenido mediante un algoritmo de control predictivo acoplado a un controlador de realimentación PI, ambas

técnicas son las utilizadas actualmente para controlar los procesos. De ésta manera se logró optimizar la producción de ROL. Por último el cultivo fue centrifugado y microfiltrado para remover la biomasa. El sobrenadante fue concentrado por ultrafiltración, dializado y liofilizado.¹

Actividad: 593UA/mg de proteína

*C-2. Inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae* en diferentes soportes*

Se prepararon derivados inmovilizados de ROL purificada (la cantidad de enzima fue determinada mediante el ensayo de Bradford).² En todos los casos el porcentaje (%) de enzima inmovilizada fue determinado utilizando nuevamente la técnica de Bradford.

La actividad enzimática fue determinada a partir de la absorbancia a 348 nm ($\epsilon_{376} = 5.150 \text{ m}^{-1}\text{cm}^{-1}$) del *p*-nitrofenol (*p*-NP) generado por hidrólisis enzimática del compuesto *p*-NPB (*p*-nitrofenol butirato). La reacción de hidrólisis se llevo a cabo por el agregado de 2,5 ml de una solución de *p*-NPB (0,4 mM) en solución reguladora de fosfato de sodio (25 mM) pH 7 a 0,05-0,2 ml de una solución de lipasa a 25 °C. El blanco de reacción fue realizado a partir de la solución de lipasa.

*C.2.1. Inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae* en Octadecyl Sepabeads® (ROLI)*

Para llevar a cabo la inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae* en el soporte octadecil sepabeads, 2 g del soporte fueron colocados en 20 ml de fosfato de sodio (25mM pH 7) conteniendo 25 mg de lipasa. La mezcla fue agitada a 250 rpm durante 3 horas, a una temperatura de 25 °C. Luego de transcurrido el tiempo necesario para la adsorción, la solución fue filtrada y el soporte fue lavado sucesivas veces con agua destilada.

El porcentaje de inmovilización, que en este caso fue del 80%, y la actividad enzimática: 948 UA/ g (masa de soporte).

C.2.2. Inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae* en Lewatit® 1600 (ROL2)

Se colocó la misma cantidad de soporte, lewatit 1600, que en el caso anterior y se siguió el mismo procedimiento. En este caso el porcentaje de inmovilización fue ligeramente superior: 86 % y la actividad enzimática: 1240 UA/g (masa de soporte).

C.3.3. Inmovilización covalente multipuntual de la lipasa de *Rhizopus oryzae* en Lewatit® CNP 105 (ROL3)

La resina comercial Lewatit® CNP 105 conteniendo los grupos aldehídos fue previamente activada de acuerdo a la metodología presentada en la literatura.³ 2 g del soporte fueron agregados a 20 ml de una solución reguladora de bicarbonato de sodio (100 mM pH 10,1) conteniendo 25 mg de lipasa. La mezcla fue agitada a 250 rpm durante 24 horas a 25 °C. Una vez culminado el proceso de inmovilización, se determinó la actividad enzimática y se agregaron 25 mg NaBH₄, transcurridos 30 minutos la solución fue filtrada y se realizaron lavados del soporte con cantidades de agua destilada. El porcentaje de inmovilización calculado fue del 55 % y la actividad enzimática: 897 UA/g (masa de soporte).

2- Células enteras

- *Absidia corymbifera* + (BAFC 1080)
- *Absidia corymbifera* - (BAFC 1072)
- *Absidia corymbifera* +/-
- *Absidia coerulea*
- *Rhizopus oryzae*
- *Mucor plumbeus* (BAFC 2314)

Las cepas denominadas BAFC corresponden a las depositadas en el Cepario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Las cepas y medios de cultivo necesarios para el estudio fueron otorgados por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Departamento de Química Orgánica. El laboratorio

mencionado facilitó el lugar y el uso del equipamiento adecuado para llevar a cabo la manipulación de los microorganismos y todos los ensayos correspondientes a las reacciones de Biotransformación, dado que el mismo se encuentra habilitado para dicha labor. La purificación, análisis y caracterización de los compuestos obtenidos fueron realizadas en el laboratorio de Biocatálisis del Departamento de Química Orgánica.

Las cepas fueron crecidas en tubos inclinados conteniendo agar extracto de maltas, incubadas durante 7 días a 25 °C con el objetivo de obtener cultivos bien esporulados. Posteriormente a los tubos conteniendo cultivos se les agregó 10 ml de medio líquido malta peptona, se los agitó y de sobrenadante se tomó una alícuota para realizar el recuento de esporas utilizando la cámara de Neubauer. Con la suspensión madre así obtenida y de título conocido se llevaron a cabo los ensayos de Biotransformación.

Metodología A: en esta metodología un volumen determinado de la suspensión madre (dependiendo del inóculo final deseado) fue adicionado a 20 ml de medio de cultivo líquido malta peptona. Luego del tiempo establecido se le agregó directamente el sustrato (drospirenoana) en forma directa o previamente disuelto en acetato de etilo o metanol.

Metodología B: en esta metodología un volumen determinado de la suspensión madre fue colocado a 20 ml de medio de cultivo líquido malta peptona. Luego del tiempo establecido los microorganismos fueron filtrados y resuspendidos en 20 ml de solvente orgánico: dioxano, hexano, tolueno (Metodología BP1) o en 20 ml se una solución reguladora acetato de sodio/ácido acético pH 5 (Metodología BP2). Luego de la resuspensión de los microorganismos se agregó directamente una cantidad determinada de drsopirenona.

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 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 realizaron 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 indicó donde fue necesario.

Todas las demás reacciones se llevaron a cabo en balones con agitación magnética. En los casos donde 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 realizaron 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)

Filtraciones

Las filtraciones se realizaron con embudados fritados y aplicando vacío en el caso de las separaciones enzimáticas.

Las filtraciones de los microorganismos utilizados en los ensayos de Biotransformación se realizaron (en los casos en los que se requirió) con embudos y gasas estériles.

VII.1.5. Parte analítica

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

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 espaciados 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 y NOESY) 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 del tetrametilsilano, empleado como referencia interna (0,00 ppm). La multiplicidad de las señales de RMN ^1H se expresa en cada caso como singulete (s), singulete ancho (sa), doblete (d), doble doblete (dd), doble doble doblete (ddd), doble triplete (dt), triplete (t), cuarteto (c) 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, Shimadzu QP-5000 y Thermo Scientific EM/DSQ II a 70 eV. Los espectros de masa de alta resolución se llevaron a cabo en el Espectrómetro Bruker microTOF-Q II.

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 nm, vapores de yodo, molibdato de amonio (50 g/l):sulfato cérico (1 g/l) en sulfúrico acuoso 10 % v/v. En este último caso se empleó una pistola de aire caliente para calentar la placa en la última parte del revelado.

Las cromatografías gas-líquida (CGL) se llevaron a cabo en un cromatógrafo Thermo Finnigan Focus GC asociado a la estación de trabajo Chrom Card con detectos de ionización de llama (FID) y nitrógeno como gas portador.

Se trabajó con una columna capilar HP-17 de 10 metros de longitud y 0,53 mm diámetro interno y temperatura máxima de operación de 300 °C. La fase estacionaria de la columna está compuesta por fenil metil siloxano entrecruzado 50 %.

VII.2 Síntesis de ésteres de ácido 2-oxoglutarico de cadena media y larga catalizada por lipasas

VII.2.1. Procedimiento general para la preparación de diésteres de ácido 2-oxoglutarico

(III-1)

El ácido 2-oxoglutarico (1 mmol) fue agregados a 10 ml de hexano conteniendo 0,3 t de CAL B (lipasa de *Candida antarctica*) o 10 ml de éter diisopropílico conteniendo 1,5 g de CPL (lipasa de *Carica papaya*) conteniendo el alcohol indicado en cada caso (2 mmol). La mezcla fue agitada en un agitador orbital a 55 °C y 200 rpm por un período de 6 y 72 horas para CAL B y CPL respectivamente. Una vez finalizada la reacción la enzima fue separada del medio por filtración y el solvente evaporado a presión reducida. El producto de reacción fue purificado por cromatografía en columna de silicagel (hexano:AcOEt 9:1). La caracterización del producto, una vez aislado, fue realizada por FT-IR, punto de fusión, análisis elemental de carbono e hidrógeno, RMN ¹H y ¹³C de 500 MHz, RMN de correlación COSY, HSQC y HMBC.

2-oxoglutarato de dihexilo (III-2)

Compuesto oleoso (267 mg, 85 % rendimiento CAL B; 238 mg, 75 % rendimiento CPL). IR (film, cm⁻¹): 2958, 2931, 2861 y 1733. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃), δ 0,89 (t, J= 6,6 Hz, 6H, CH₃); 1,45-1,26 (m, 12H, -(CH₂)₃(CH₂)₂OOC(CH₂)₂COCOO(CH₂)₂(CH₂)₃-); 1,62 (m,

2H, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 1,73 (m, 2H, $-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOOCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2-$); 2,67 (t, $J= 6,6$ Hz, 2H, $-\text{OOC}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{COCOO}-$); 3,16 (t, $J= 6,6$ Hz, 2H, $-\text{OOCCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{COCOO}-$); 4,07 (t, $J= 6,8$ Hz, 2H, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 4,26 (t, $J= 6,8$ Hz, 2H, $-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}\underline{\text{C}}\text{H}_2-$). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 14,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3-$); 22,5; 25,3; 25,5; 28,3; 28,5; 31,4; 31,3

$(-\underline{\text{C}}\text{H}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}(\text{CH}_2)_2(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_3-$); 27,6 ($-\text{OOC}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{COCOO}-$); 34,2 ($-\text{OOCCH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{COCOO}-$); 65,1 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 66,7 ($-\text{COCOO}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2-$); 160,6 ($-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\underline{\text{C}}\text{OCOO}-$); 172,0 ($-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{CO}\underline{\text{C}}\text{OO}-$); 192,4 ($-\text{OCCH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{OCOO}-$). EM-IE: m/z (intensidad relativa): 315 [M] $^+$ (24), 185(17), 101(100), 85(23), 43(39). Análisis elemental calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_5$: C 64,94%; H 9,62%. Encontrado C 65,01%; H 9,86%

2-oxoglutarato de di-odecilo (**III-3**)

Compuesto oleoso (289 mg, 78 % rendimiento CAL B; 241 mg, 65 % rendimiento CPL). IR (film, cm^{-1}): 2956, 2928, 2857 y 1732. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ 0,88 (t, $J= 7,0$ Hz, 6H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 1,41-1,27 (m, 12H, $(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}(\text{CH}_2)_2(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_3-$); 1,61 (m, 2H, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 1,73 (m, 2H, $-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOOCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2-$); 2,67 (t, $J= 6,6$ Hz, 2H, $-\text{OOC}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{COCOO}-$); 3,16 (t, $J= 6,6$ Hz, 2H, $-\text{OOCCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{COCOO}-$); 4,07 (t, $J= 6,8$ Hz, 2H, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 4,26 (t, $J= 6,8$ Hz, 2H, $-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}\underline{\text{C}}\text{H}_2-$). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 14,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3-$); 22,6; 25,7; 25,9; 29,1; 31,7 ($-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}(\text{CH}_2)_2(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_3-$); 27,7 ($-\text{OOC}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{COCOO}-$); 34,3 ($-\text{OOCCH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{COCOO}-$); 65,1 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 66,6 ($-\text{COCOO}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2-$); 160,6 ($-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\underline{\text{C}}\text{OCOO}-$); 172,0 ($-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{CO}\underline{\text{C}}\text{OO}-$); 192,6 ($-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{OCOOCH}_2-$). EM-IE: m/z (intensidad relativa): 371 [M] $^+$ (34), 259(9), 213(26), 147 (13), 113 (23), 101(100), 71(65), 57(49), 43(30). Análisis elemental calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_5$: C 68,07%; H 10,34%. Encontrado C 68,41%; H 10,35%

2-oxoglutarato de di-dodecilo (III-4)

Sólido blanco, Pf: 35-37 °C (348 mg, 72 % rendimiento CAL B; 256 mg, 53 % rendimiento CPL). IR (film, cm^{-1}): 2954, 2922, 2852 y 1730. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ 0,88 (t, $J= 7,0$ Hz, 6H, $\underline{\text{CH}}_3$); 1,40-1,23 (m, 12H, $-(\underline{\text{CH}}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}(\text{CH}_2)_2(\underline{\text{CH}}_2)_3-$); 1,61 (m, 2H, $-\underline{\text{CH}}_2\text{CH}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 1,73 (m, 2H, $-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOOCH}_2\underline{\text{CH}}_2-$); 2,67 (t, $J= 6,6$ Hz, 2H, $-\text{OOC}\underline{\text{CH}}_2\text{CH}_2\text{COCOO}-$); 3,16 (t, $J= 6,6$ Hz, 2H, $-\text{OOCCH}_2\underline{\text{CH}}_2\text{COCOO}-$); 4,07 (t, $J= 6,8$ Hz, 2H, $-\underline{\text{CH}}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 4,26 (t, $J= 6,8$ Hz, 2H, $-\text{COOCH}_2-$). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 14,1 ($\underline{\text{CH}}_3$); 22,7; 25,7; 25,8; 28,3; 28,5; 29,2; 29,3; 29,4; 29,5; 29,6; 31,9 ($(\underline{\text{CH}}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}(\text{CH}_2)_2(\underline{\text{CH}}_2)_3-$); 27,6 ($-\text{OOC}\underline{\text{CH}}_2\text{CH}_2\text{COCOO}-$); 34,2 ($-\text{OOCCH}_2-\underline{\text{CH}}_2\text{COCOO}-$); 65,1 ($-\underline{\text{CH}}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 66,6 ($-\text{COCOO}\underline{\text{CH}}_2\text{CH}_2-$); 160,6 ($-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 172,1 ($-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{CO}\underline{\text{CO}}-$); 192,7 ($-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{CO}\underline{\text{CO}}\text{OCH}_2-$). EM-IE: m/z (intensidad relativa): 483 $[\text{M}]^+$ (32), 269(28), 169(52), 101(100), 85(58), 57(99), 43(60). Análisis elemental calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{54}\text{O}_5$: C 72,15%; H 11,28%. Encontrado C 72,51%; H 11,68%

2-oxoglutarato de di-tetradecilo (III-5)

Sólido blanco, Pf: 39-41 °C (409 mg, 76 % rendimiento CAL B; 264 mg, 49 % rendimiento CPL). IR (film, cm^{-1}): 2954, 2920, 2851 y 1729. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ 0,88 (t, $J= 7,0$ Hz, 6H, $\underline{\text{CH}}_3$); 1,39-1,26 (m, 12H, $-(\underline{\text{CH}}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}(\text{CH}_2)_2(\underline{\text{CH}}_2)_3-$); 1,61 (m, 2H, $-\underline{\text{CH}}_2\text{CH}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 1,72 (m, 2H, $-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOOCH}_2\underline{\text{CH}}_2-$); 2,67 (t, $J= 6,6$ Hz, 2H, $-\text{OOC}\underline{\text{CH}}_2\text{CH}_2\text{COCOO}-$); 3,16 (t, $J= 6,6$ Hz, 2H, $-\text{OOCCH}_2\underline{\text{CH}}_2\text{COCOO}-$); 4,07 (t, $J= 6,8$ Hz, 2H, $-\underline{\text{CH}}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 4,26 (t, $J= 6,8$ Hz, 2H, $-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{CO}\underline{\text{CO}}\text{OCH}_2-$). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 14,1 ($\underline{\text{CH}}_3$); 22,7; 25,8; 25,9; 28,3; 28,6; 29,2; 29,3; 29,4; 29,5; 29,6; 29,7; 31,9 ($(\underline{\text{CH}}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}(\text{CH}_2)_2(\underline{\text{CH}}_2)_3-$); 27,6 ($-\text{OOC}\underline{\text{CH}}_2\text{CH}_2\text{COCOO}-$); 34,3 ($-\text{OOCCH}_2-\underline{\text{CH}}_2\text{COCOO}-$); 65,1 ($-\underline{\text{CH}}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 66,7 ($-\text{COCOO}\underline{\text{CH}}_2\text{CH}_2-$);

); 160,6 $(-(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-)$; 172,1 $(-(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-)$; 192,7 $(-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{COCOOCH}_2-)$. EM-IE: m/z (intensidad relativa): 539 $[\text{M}]^+$ (17), 343(5), 197(23), 101(62), 85(58), 71(96), 57(100), 43(97). Análisis elemental calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{62}\text{O}_5$: C 73,56%; H 11,60%. Encontrado C 73,71%; H 11,73%.

2-oxoglutarato de di-hexadecilo (III-6)

Sólido blanco, Pf: 56-58 °C (410 mg, 69 % rendimiento CAL B; 238 mg, 40 % rendimiento CPL). IR (film, cm^{-1}): 2956, 2919, 2850 y 1732. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ 0,89 (t, J= 7,0 Hz, 6H, CH_3); 1,38-1,26 (m, 12H, $(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_3-$); 1,61 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 1,73 (m, 2H, $-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOOCH}_2\text{CH}_2-$); 2,67 (t, J= 6,6 Hz, 2H, $-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{COCOO}-$); 3,15 (t, J= 6,6 Hz, 2H, $-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{COCOO}-$); 4,07 (t, J= 6,8 Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 4,26 (t, J= 6,8 Hz, 2H, $-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOOCH}_2-$). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 14,1 (CH_3); 22,7; 25,8; 25,9; 29,2; 29,3; 29,4; 29,5; 29,6; 29,7; 31,9 ($(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_3-$); 27,7 ($-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{COCOO}-$); 34,3 ($-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{COCOO}-$); 65,1 ($-\text{CH}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 66,7 ($-\text{COCOOCH}_2\text{CH}_2-$); 160,7 $(-(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-)$; 172,1 $(-(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-)$; 192,7 $(-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{COCOOCH}_2-)$. EM-IE: m/z (intensidad relativa): 595 $[\text{M}]^+$ (65), 371(9), 325(14), 225(30), 101(66), 85(48), 71(56), 57(100), 43(82). Análisis elemental calculado para $\text{C}_{37}\text{H}_{70}\text{O}_5$: C 74,69%; H 11,86%. Encontrado C 74,71%; H 11,03%.

2-oxoglutarato de di-octadecilo (III-7)

Sólido blanco, Pf: 67-69 °C (377 mg, 58 % rendimiento CAL B; 202 mg, 31 % rendimiento CPL). IR (film, cm^{-1}): 2956, 2920, 2850 y 1729. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ 0,88 (t, J= 7,0 Hz, 6H, CH_3); 1,37-1,26 (m, 12H, $(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_3-$); 1,61 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 1,73 (m, 2H, $-\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOOCH}_2\text{CH}_2-$); 2,67 (t, J= 6,6 Hz, 2H, $-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{COCOO}-$); 3,16 (t, J= 6,6 Hz, 2H, $-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{COCOO}-$); 4,07 (t, J= 6,8 Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_2\text{COCOO}-$); 4,26 (t, J=

6,8 Hz, 2H, -OOC(CH₂)₂COCOOCH₂-). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 14,1 (CH₃-); 22,7; 27,7; 28,3; 28,5; 29,2; 29,4; 29,5; 29,6; 31,9 ((CH₂)₃(CH₂)₂OOC(CH₂)₂COCOO(CH₂)₂(CH₂)₃-); 27,7 (-OOCCH₂CH₂COCOO-); 34,2 (-OOCCH₂-CH₂COCOO-); 65,2 (-CH₂ OOC(CH₂)₂COCOO-); 66,7 (-COCOOCH₂CH₂-); 160,9 (-(CH₂)₂COCOO-); 172,1 (-(CH₂)₂COCOO-); 192,7 (-OOCCH₂CH₂COCOOCH₂-). EM-IE: m/z (intensidad relativa): 650 [M]⁺ (2), 353(13), 253(36), 101(66), 71(86), 57(100), 43(76). Análisis elemental calculado para C₄₁H₇₈O₅: C 75,64%; H 12,08%. Encontrado C 75,71%; H 12,13%.

VII.3 Síntesis enzimática de derivados acilados de hidrocortisona

VII.3.1. Procedimiento general para la preparación enzimática de de ácido 21-acil derivados de hidrocortisona (IV-1)

VII.3.1.1. Acilación utilizando como agente acilante ácido carboxílico o su éster etílico

El sustrato (0,4 mmol) fue agregado a 30 ml de tolueno (en el caso de la preparación del compuesto acetilado se utilizó como solvente y acilante acetato de etilo) conteniendo el ácido carboxílico correspondiente (4 mmol) o su éster de etílico. Se adicionó 300 mg de CAL B y la suspensión fue sometida a reflujo (110 °C) con agitación magnética. En el caso de la acetilación utilizando acetato de etilo, la reacción fue colocada en un agitador orbital a 55 °C. Luego de transcurridas 24 horas la reacción la enzima fue separada del medio por filtración y el solvente evaporado a presión reducida. El producto de reacción fue purificado por cromatografía en columna de silicagel (hexano:AcOEt 6:4). La caracterización del producto, una vez aislado, fue realizada por FT-IR, punto de fusión, análisis elemental de carbono e hidrógeno, RMN ¹H y ¹³C de 500 MHz, RMN de correlación COSY, HSQC y HMBC.

VII.3.1.2. Acilación de hidrocortisona utilizando la metodología one pot

El sustrato (0,4 mmol) fue agregado a 50 ml de tolueno conteniendo el ácido carboxílico correspondiente (4 mmol) y 0,25 ml de etanol (4 mmol). Se adicionó 360 mg de CAL B

y la suspensión fue sometida a reflujo (110 °C) con agitación magnética. El procedimiento se continuó como se describe en la sección VII.3.1.1.

21-Acetato de 11β,17α-dihidroxi pregn-4-en-3,20-diona (IV-2)

Sólido blanco (160 mg, 92%), Pf: 221-223 °C. $[\alpha]_D^{25}$: +169° (c= 2,00, CHCl₃). Datos de punto de fusión y rotación específica reportado en literatura: p.f.: 217-218 °C, $[\alpha]_D^{25}$ +138° (acetona)⁴ Datos de RMN ¹H y ¹³C coincidentes con los reportados en literatura.^{5,6}

21-Hexanoato de 11β,17α-dihidroxi pregn-4-en-3,20-diona (IV-3)

Sólido blanco (168 mg, 88 % rendimiento, agente acilante: ácido hexanoico; 172 mg, 90 % rendimiento, agente acilante: hexanoato de etilo; 178 mg, 93 %, *one pot*), Pf: 124-125 °C. $[\alpha]_D^{25}$: +99,4° (c= 2,88, CHCl₃). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃), δ 1,85 (1H, m, H-1α); 2,21 (1H, m, H-2β); 2,34 (1H, dt, J= 17,0; 4,5 Hz, H-2α); 2,50 (1H, m, H-2β); 5,70 (1H, d, J=1,2 Hz, H-4); 2,25 (1H, m, H-6α); 2,51 (1H, m, H-6β); 1,11 (1H, m, H-7α); 2,03 (1H, m, H-7β); 2,07 (1H, m, H-8); 1,00 (1H, dd, J=11,0; 3,2 Hz, H-9); 4,48 (1H, dd, J=6,2; 3,2 Hz, H-11α); 2,06 (1H, m, H-12α); 1,75 (1H, dd, J= 14,0; 2,6 Hz, H-12β); 1,72 (1H, m, H-14); 1,48 (1H, m, H-15α); 1,80 (1H, m, H-15β); 1,48 (1H, m, H-16α); 2,74 (1H, m, H-16β); 0,94 (3H, s, H-18); 1,43 (3H, s, H-19); 4,88 (1H, d, J=17,5 Hz, H-21); 5,04 (1H, d, J=17,5 Hz, H-21), 2,43 (1H, dt, J=7,6; 1,6 Hz, H-23); 1,65 (1H, m, H-24); 1,33 (4H, m, H-25,26); 0,90 (3H, dt, J=7,0 Hz, H-27). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 34,9 (C-1); 33,9 (C-2); 200,0 (C-3); 122,2 (C-4); 172,9 (C-5); 32,1 (C-6); 32,8 (C-7); 31,4 (C-8); 56,0 (C-9); 39,4 (C-10); 68,2 (C-11); 39,7 (C-12); 47,7 (C-13); 52,0 (C-14); 23,6 (C-15); 34,6 (C-16); 89,0 (C-17); 17,0 (C-18); 20,9 (C-19); 205,4 (C-20); 67,9 (C-21); 172,9 (C-22); 33,9 (C-23); 25,0 (C-24); 31,2 (C-25); 22,3 (C-26); 13,9 (C-27). EM-IE: m/z (intensidad relativa): 460 [M]⁺ (1), 344(2), 285(6), 43(100). Análisis elemental calculado para C₂₇H₄₀O₆: C 70,41%; H 8,75%. Encontrado C 70,25%; H 8,65%.

21-Octanoato de 11β,17α-dihidroxipregn-4-en-3,20-diona (IV-4)

Sólido blanco (177 mg, 91 % rendimiento, agente acilante: ácido octanoico; 176 mg, 90 % rendimiento, agente acilante: octanoato de etilo; 179 mg, 92 %, *one pot*), Pf: 104-105 °C. $[\alpha]_D^{25}$: +109,3° (c= 1,00, CHCl₃). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃), δ 1,88 (1H, m, H-1α); 2,21 (1H, m, H-2β); 2,33 (1H, dt, J= 17,0; 4,5 Hz, H-2α); 2,51 (1H, m, H-2β); 5,68 (1H, d, J=1,2 Hz, H-4); 2,25 (1H, m, H-6α); 2,50 (1H, m, H-6β); 1,14 (1H, m, H-7α); 2,04 (1H, m, H-7β); 2,08 (1H, m, H-8); 1,04 (1H, dd, J=11,0; 3,2 Hz, H-9); 4,47 (1H, dd, J=6,0; 3,2 Hz, H-11α); 2,06 (1H, m, H-12α); 1,76 (1H, dd, J= 14,0; 2,6 Hz, H-12β); 1,73 (1H, m, H-14); 1,48 (1H, m, H-15α); 1,84 (1H, m, H-15β); 1,48 (1H, m, H-16α); 2,75 (1H, m, H-16β); 0,95 (3H, s, H-18); 1,44 (3H, s, H-19); 4,88 (1H, d, J=17,5 Hz, H-21); 5,03 (1H, d, J=17,5 Hz, H-21), 2,43 (1H, dt, J=7,5; 1,6 Hz, H-23); 1,67 (1H, m, H-24); 1,32 (8H, m, H-25-28); 0,89 (3H, t, J=7,0 Hz, H-29). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 34,9 (C-1); 33,9 (C-2); 199,8 (C-3); 122,2 (C-4); 173,8 (C-5); 32,0 (C-6); 32,9 (C-7); 31,5 (C-8); 56,2 (C-9); 39,4 (C-10); 68,2 (C-11); 39,9 (C-12); 47,7 (C-13); 52,1 (C-14); 23,8 (C-15); 34,8 (C-16); 89,8 (C-17); 17,1 (C-18); 21,0 (C-19); 205,1 (C20); 67,9 (C-21); 172,3 (C-22); 34,0 (C-23); 25,0 (C-24); 31,5 (C-25); 29,1 (C-26); 29,0 (C-27); 22,7 (C-28); 14,2 (C-29). EM-IE: m/z (intensidad relativa): 488 [M]⁺ (12), 344(30), 185(11), 143(23), 127(72), 57(100). Análisis elemental calculado para C₂₉H₄₄O₆: C 71,28%; H 9,08%. Encontrado C 71,05%; H 9,05%.

21-Decanoato de 11β,17α-dihidroxipregn-4-en-3,20-diona (IV-5)

Sólido blanco (149 mg, 70 % rendimiento, agente acilante: ácido decanoico; 160 mg, 75 % rendimiento, agente acilante: decanoato de etilo; 166 mg, 78 %, *one pot*), Pf:117-118 °C. $[\alpha]_D^{25}$: +69,5° (c= 1,00, CHCl₃). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃), δ 1,89 (1H, m, H-1α); 2,22 (1H, m, H-2β); 2,33 (1H, dt, J= 17,0; 4,5 Hz, H-2α); 2,50 (1H, m, H-2β); 5,71 (1H, d, J=1,2 Hz, H-4); 2,22 (1H, m, H-6α); 2,53 (1H, m, H-6β); 1,14 (1H, m, H-7α); 2,03 (1H, m, H-7β); 2,08 (1H, m, H-8); 1,04 (1H, dd, J=11,0; 3,2 Hz, H-9); 4,50 (1H, dd, J=6,2; 3,2 Hz, H-11α); 2,06 (1H, m, H-12α); 1,76 (1H, dd, J= 14,0; 2,6 Hz, H-12β); 1,73 (1H, m, H-14); 1,48 (1H, m, H-15α); 1,84 (1H, m, H-15β); 1,48 (1H, m, H-16α);

2,75 (1H, m, H-16 β); 0,99 (3H, s, H-18); 1,47 (3H, s, H-19); 4,88 (1H, d, J=17,5 Hz, H-21); 5,04 (1H, d, J=17,5 Hz, H-21), 2,45 (1H, dt, J=7,5; 1,6 Hz, H-23); 1,68 (1H, m, H-24); 1,31 (12H, m, H-25-30); 0,90 (3H, t, J= 7,0 Hz, H-31). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 34,9 (C-1); 34,0 (C-2); 199,7 (C-3); 122,5 (C-4); 173,8 (C-5); 32,0 (C-6); 32,9 (C-7); 31,6 (C-8); 56,1 (C-9); 39,4 (C-10); 68,4 (C-11); 39,9 (C-12); 47,8 (C-13); 52,2 (C-14); 23,8 (C-15); 34,8 (C-16); 89,9 (C-17); 17,3 (C-18); 21,1 (C-19); 205,0 (C-20); 67,8 (C-21); 172,2 (C-22); 34,0 (C-23); 25,0 (C-24); 32,2 (C-25); 32,0 (C-26); 29,5 (C-27); 29,4 (C-28); 29,2 (C-29); 22,8 (C-30); 14,3 (C-31). EM-IE: m/z (intensidad relativa): 516 $[\text{M}]^+$ (4), 344(16), 285(38), 155(46), 43(100). Análisis elemental calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_6$: C 72,06%; H 9,36%. Encontrado C 72,00%; H 9,25%.

21-Octadecanoato de 11 β ,17 α -dihidroxipregn-4-en-3,20-diona (IV-6)

Sólido blanco (159 mg, 61 % rendimiento, agente acilante: ácido octadecanoico; 169 mg, 65 % rendimiento, agente acilante: octadecanoato de etilo; 185 mg, 71 %, *one pot*), Pf:73-75 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +46,5° (c= 0,62, CHCl_3). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ 1,87 (1H, m, H-1 α); 2,22 (1H, m, H-2 β); 2,34 (1H, dt, J= 17,0; 4,5 Hz, H-2 α); 2,51 (1H, m, H-2 β); 5,69 (1H, d, J=1,2 Hz, H-4); 2,23 (1H, m, H-6 α); 2,52 (1H, m, H-6 β); 1,14 (1H, m, H-7 α); 2,05 (1H, m, H-7 β); 2,09 (1H, m, H-8); 1,04 (1H, dd, J=11,0; 3,2 Hz, H-9); 4,48 (1H, dd, J=6,2; 3,2 Hz, H-11 α); 2,06 (1H, m, H-12 α); 1,75 (1H, dd, J= 14,0; 2,6 Hz, H-12 β); 1,70 (1H, m, H-14); 1,47 (1H, m, H-15 α); 1,83 (1H, m, H-15 β); 1,47 (1H, m, H-16 α); 2,78 (1H, m, H-16 β); 0,97 (3H, s, H-18); 1,47 (3H, s, H-19); 4,85 (1H, d, J=17,5 Hz, H-21); 5,03 (1H, d, J=17,5 Hz, H-21), 2,46 (1H, dt, J=7,5; 1,6 Hz, H-23); 1,64 (1H, m, H-24); 1,28 (28H, m, H-25-38); 0,90 (3H, t, J= 7,0 Hz, H-39). RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 35,1 (C-1); 34,1 (C-2); 199,8 (C-3); 122,5 (C-4); 174,0 (C-5); 32,1 (C-6); 32,9 (C-7); 31,6 (C-8); 56,2 (C-9); 39,4 (C-10); 68,4 (C-11); 39,9 (C-12); 47,8 (C-13); 52,2 (C-14); 23,8 (C-15); 34,8 (C-16); 89,9 (C-17); 17,3 (C-18); 21,1 (C-19); 205,0 (C-20); 67,8 (C-21); 172,3 (C-22); 33,9 (C-23); 25,0 (C-24); 32,1 (C-25); 29,8 (C-26-33); 29,7 (C-34); 29,6 (C-35); 29,5 (C-36); 29,4 (C-37); 22,8 (C-38); 14,3 (C-39). EM-IE: m/z (intensidad relativa): 344(3), 285 (2), 267(2), 240(5), 43(100). Análisis

elemental calculado para $C_{39}H_{64}O_6$: C 74,48%; H 10,26%. Encontrado C 74,72%; H 10,35%.

21-cis-9-Octadecanoato de 11 β ,17 α -dihidroxipregn-4-en-3,20-diona (IV-7)

Sólido blanco (132 mg, 51 % rendimiento, agente acilante: ácido *cis*-9-octadecanoico; 148 mg, 57 % rendimiento, agente acilante: *cis*-9-octadecanoato de etilo; 179 mg, 69 %, *one pot*), Pf: 82-84 °C. $[\alpha]_D^{25}$: +107,3° (c= 2,23, $CHCl_3$). RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$), δ 1,86 (1H, m, H-1 α); 2,23 (1H, m, H-2 β); 2,35 (1H, dt, J= 17,0; 4,5 Hz, H-2 α); 2,50 (1H, m, H-2 β); 5,69 (1H, d, J=1,2 Hz, H-4); 2,22 (1H, m, H-6 α); 2,51 (1H, m, H-6 β); 1,11 (1H, m, H-7 α); 2,01 (1H, m, H-7 β); 2,09 (1H, m, H-8); 1,00 (1H, dd, J=11,0; 3,2 Hz, H-9); 4,47 (1H, dd, J=6,2; 3,2 Hz, H-11 α); 2,06 (1H, m, H-12 α); 1,75 (1H, dd, J= 14,0; 2,6 Hz, H-12 β); 1,71 (1H, m, H-14); 1,47 (1H, m, H-15 α); 1,81 (1H, m, H-15 β); 1,47 (1H, m, H-16 α); 2,75 (1H, m, H-16 β); 0,96 (3H, s, H-18); 1,45 (3H, s, H-19); 4,89 (1H, d, J=17,5 Hz, H-21); 5,03 (1H, d, J=17,5 Hz, H-21), 2,44 (1H, dt, J=7,5; 1,6 Hz, H-23); 1,67 (1H, m, H-24); 1,32 (20H, m, H-25-28, H-33-38); 2,00 (4H, m, H-29, 32); 5,35 (2H, m, H-30,31); 0,89 (3H, t, J= 7,0 Hz, H-39). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 35,1 (C-1); 33,9 (C-2); 200,0 (C-3); 122,4 (C-4); 173,9 (C-5); 32,2 (C-6); 32,9 (C-7); 31,5 (C-8); 56,2 (C-9); 39,4 (C-10); 68,3 (C-11); 39,8 (C-12); 47,6 (C-13); 52,1 (C-14); 23,8 (C-15); 34,7 (C-16); 89,8 (C-17); 17,1 (C-18); 21,1 (C-19); 205,2 (C20); 67,9 (C-21); 172,7 (C-22); 34,0 (C-23); 25,0 (C-24); 32,0 (C-25); 29,9 (C-26); 29,8 (C-27,28); 27,3 (C-29); 130,1 (C-30); 129,9 (C-31); 27,3 (C-32); 29,6 (C-33); 29,4 (C-34); 29,3 (C-35); 29,2 (C-36); 29,1 (C-37); 22,8 (C-38); 14,2 (C-39). EM-IE: m/z (intensidad relativa): 626 $[M]^+$ (1), 265 (4), 237(1), 121(17), 41(100). Análisis elemental calculado para $C_{39}H_{62}O_6$: C 74,72%; H 9,97%. Encontrado C 74,85%; H 10,05%.

21-trans-9-Octadecanoato de 11 β ,17 α -dihidroxipregn-4-en-3,20-diona (IV-8)

Sólido blanco (135 mg, 52 % rendimiento, agente acilante: ácido *trans*-9-octadecanoico; 161 mg, 62 % rendimiento, agente acilante: *trans*-9-octadecanoato de etilo; 177 mg, 68 %, *one pot*), Pf: 75-78 °C. $[\alpha]_D^{25}$: +97,2° (c= 0,71, $CHCl_3$). RMN 1H (500 MHz,

CDCl₃), δ 1,86 (1H, m, H-1α); 2,21 (1H, m, H-2β); 2,35 (1H, dt, J= 17,0; 4,5 Hz, H-2α); 2,51 (1H, m, H-2β); 5,68 (1H, d, J=1,2 Hz, H-4); 2,23 (1H, m, H-6α); 2,51 (1H, m, H-6β); 1,12 (1H, m, H-7α); 2,06 (1H, m, H-7β); 2,09 (1H, m, H-8); 1,01 (1H, dd, J=11,0; 3,2 Hz, H-9); 4,47 (1H, dd, J=6,2; 3,2 Hz, H-11α); 2,06 (1H, m, H-12α); 1,75 (1H, dd, J= 14,0; 2,6 Hz, H-12β); 1,70 (1H, m, H-14); 1,47 (1H, m, H-15α); 1,83 (1H, m, H-15β); 1,47 (1H, m, H-16α); 2,76 (1H, m, H-16β); 0,96 (3H, s, H-18); 1,44 (3H, s, H-19); 4,86 (1H, d, J=17,5 Hz, H-21); 5,02 (1H, d, J=17,5 Hz, H-21), 2,44 (1H, dt, J=7,5; 1,6 Hz, H-23); 1,65 (1H, m, H-24); 1,29 (20H, m, H-25-28, H-33-38); 1,96 (4H, m, H-29, 32); 5,38 (2H, m, H-30,31); 0,88 (3H, t, J= 7,0 Hz, H-39). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 35,1 (C-1); 33,9 (C-2); 199,9 (C-3); 122,4 (C-4); 173,9 (C-5); 32,2 (C-6); 32,9 (C-7); 31,5 (C-8); 56,2 (C-9); 39,4 (C-10); 68,4 (C-11); 39,8 (C-12); 47,7 (C-13); 52,2 (C-14); 23,8 (C-15); 34,8 (C-16); 89,8 (C-17); 17,2 (C-18); 21,1 (C-19); 205,1 (C-20); 67,9 (C-21); 172,5 (C-22); 34,0 (C-23); 25,0 (C-24); 32,0 (C-25); 29,8 (C-26); 29,7 (C-27); 29,6 (C-28, 33); 32,7 (C-29); 130,6 (C-30); 130,3 (C-31); 32,7 (C-32); 29,4 (C-34); 29,3 (C-35); 29,2 (C-36); 29,1 (C-37); 21,2 (C-38); 14,2 (C-39). EM-IE: m/z (intensidad relativa): 626 [M]⁺ (1), 265 (4), 237(1), 121(17), 41(100). Análisis elemental calculado para C₃₉H₆₂O₆: C 74,72%; H 9,97%. Encontrado C 74,85%; H 10,05%.

21-cis,cis-9,12-Octadecandienoato de 11β,17α-dihidroxi pregn-4-en-3,20-diona (IV-9)

Sólido blanco (129 mg, 50 % rendimiento, agente acilante: ácido, *cis,cis*-9,12-octadecadienoico; 157 mg, 61 % rendimiento, agente acilante: *trans*-9-octadecadienoato de etilo; 170 mg, 66 %, *one pot*), Pf: 68-70 °C. [α]_D²⁵: +93,3° (c= 2,00, CHCl₃). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃), δ 1,86 (1H, m, H-1α); 2,20 (1H, m, H-2β); 2,35 (1H, dt, J= 17,0; 4,5 Hz, H-2α); 2,50 (1H, m, H-2β); 5,68 (1H, d, J=1,2 Hz, H-4); 2,23 (1H, m, H-6α); 2,51 (1H, m, H-6β); 1,12 (1H, m, H-7α); 2,06 (1H, m, H-7β); 2,09 (1H, m, H-8); 1,01 (1H, dd, J=11,0; 3,2 Hz, H-9); 4,47 (1H, dd, J=6,2; 3,2 Hz, H-11α); 2,05 (1H, m, H-12α); 1,75 (1H, dd, J= 14,0; 2,6 Hz, H-12β); 1,70 (1H, m, H-14); 1,47 (1H, m, H-15α); 1,84 (1H, m, H-15β); 1,47 (1H, m, H-16α); 2,77 (1H, m, H-16β); 0,96 (3H, s, H-18); 1,44 (3H, s, H-19); 4,85 (1H, d, J=17,5 Hz, H-21); 5,02 (1H, d, J=17,5 Hz, H-21), 2,43

(1H, dt, J=7,5; 1,6 Hz, H-23); 1,66 (1H, m, H-24); 1,32 (8H, m, H-25-28); 1,96 (4H, m, H-29, 32); 5,38 (2H, m, H-30,31); 1,29 (12H, m, C33-38); 0,89 (3H, t, J= 7,0 Hz, H-39). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 35,2 (C-1); 33,9 (C-2); 199,9 (C-3); 122,6 (C-4); 173,9 (C-5); 32,2 (C-6); 32,9 (C-7); 31,6 (C-8); 56,2 (C-9); 39,4 (C-10); 68,4 (C-11); 39,9 (C-12); 47,7 (C-13); 52,1 (C-14); 23,8 (C-15); 34,8 (C-16); 89,9 (C-17); 17,2 (C-18); 21,1 (C-19); 205,1 (C20); 67,8 (C-21); 172,5 (C-22); 34,0 (C-23); 25,0 (C-24); 31,7 (C-25); 29,7 (C-26); 29,5 (C-27); 29,3 (C-28); 27,3 (C-29); 130,4 (C-30); 130,2 (C-31); 25,8 (C-32); 128,2 (C-33); 128,1 (C-34); 27,3 (C-35); 29,2 (C-36); 29,1 (C-37); 22,7 (C-38); 14,2 (C-39). EM-IE: m/z (intensidad relativa): 624 [M]⁺ (12), 344 (14), 329(34), 301(10), 67(100). Análisis elemental calculado para C₃₉H₆₀O₆: C 74,96%; H 9,68%. Encontrado C 75,05%; H 9,86%.

21-cis,cis,cis-9,12,15-Octadecantrienoato de 11β,17α-dihidroxi pregn-4-en-3,20-diona (IV-10)

Sólido blanco (74 mg, 30 % rendimiento, agente acilante: ácido *trans*-9-octadecantrienoico; 121 mg, 49 % rendimiento, agente acilante: *trans*-9-octadecantrienoato de etilo; 146 mg, 59 %, *one pot*), Pf: 55-58 °C. [α]_D²⁵: +27,9° (c= 1,02, CHCl₃). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃), δ 1,87 (1H, m, H-1α); 2,21 (1H, m, H-2β); 2,36 (1H, dt, J= 17,0; 4,5 Hz, H-2α); 2,50 (1H, m, H-2β); 5,68 (1H, s, H-4); 2,23 (1H, m, H-6α); 2,51 (1H, m, H-6β); 1,12 (1H, m, H-7α); 2,06 (1H, m, H-7β); 2,08 (1H, m, H-8); 1,01 (1H, dd, J=11,0; 3,2 Hz, H-9); 4,47 (1H, dd, J=6,2; 3,2 Hz, H-11α); 2,05 (1H, m, H-12α); 1,75 (1H, dd, J= 14,0; 2,6 Hz, H-12β); 1,70 (1H, m, H-14); 1,47 (1H, m, H-15α); 1,84 (1H, m, H-15β); 1,47 (1H, m, H-16α); 2,80 (1H, m, H-16β); 0,96 (3H, s, H-18); 1,44 (3H, s, H-19); 4,85 (1H, d, J=17,5 Hz, H-21); 5,02 (1H, d, J=17,5 Hz, H-21), 2,43 (1H, dt, J=7,5; 1,6 Hz, H-23); 1,66 (1H, m, H-24); 1,32 (8H, m, H-25-28); 2,07 (4H, m, H-29, 38); 5,35 (6H, m, H-30, 31, 33, 34, 36, 37); 2,83 (4H, m, C32, 35); 0,89 (3H, t, J= 7,0 Hz, H-39). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 35,1 (C-1); 33,9 (C-2); 199,9 (C-3); 122,4 (C-4); 173,9 (C-5); 32,1 (C-6); 32,7 (C-7); 31,5 (C-8); 56,1 (C-9); 39,3 (C-10); 68,3 (C-11); 39,7 (C-12); 47,6 (C-13); 52,0 (C-14); 23,6 (C-15); 34,7 (C-16); 89,7 (C-17); 17,1 (C-18); 21,1 (C-19); 204,6 (C20); 67,7 (C-21); 172,5 (C-22); 33,8 (C-23); 24,8 (C-24); 31,7 (C-25); 29,7 (C-26); 29,3 (C-27); 29,1 (C-28); 27,3 (C-

29); 127,7 (C-30, 31); 25,6 (C-32, 35); 128,3 (C-33, 34); 130,1 (C-36); 132,0 (C-37); 22,7 (C-38); 14,2 (C-39). EM-IE: m/z (intensidad relativa): 344(4), 285(3), 55(63), 43(100). Análisis elemental calculado para $C_{39}H_{58}O_6$: C 75,20%; H 9,39%. Encontrado C 75,26%; H 9,48%.

VII.3.2. Preparación de $3\beta,11\beta,17\alpha,21$ -tetraacetoxipregna-3,5-dien-20-ona (**IV-11**)

Una solución conteniendo 180 mg de hidrocortisona (0,5 mmol) en 3 ml de anhídrido acético (32 mmol) y 1,5 ml de cloruro de acetilo (21 mmol) fue llevada a 150 °C mediante irradiación con microondas (300 watts) durante 45 minutos. La reacción fue tratada con metal y el solvente evaporado a presión reducida. El producto de reacción fue purificado por cromatografía en columna de silicagel (hexano:AcOEt 6:4).

Sólido blanco (182 mg, 88 % rendimiento), Pf: 211-213 °C. RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$), δ 1,48 (1H, m, H-1 α); 1,85 (1H, m, H-2 β); 2,18 (1H, 2 α); 2,44 (1H, m, H-2 β); 2,16 (3H, s, H-3 (CH_3)); 5,67 (1H, d, J=2,0 Hz, H-4); 5,33 (1H, t, J=3,5 Hz, H-6); 2,41 (1H, m, H-7 α); 2,18 (1H, m, H-7 β); 1,88 (1H, m, H-8); 1,37 (1H, dd, J=12,0; 3,2 Hz, H-9); 5,56 (1H, dd, J=6,5; 3,4 Hz, H-11 α); 2,14 (3H, s, H-11 (CH_3)); 2,11 (1H, m, H-12 α); 1,97 (1H, m, H-12 β); 1,77 (1H, m, H-14); 1,47 (1H, m, H-15 α); 1,86 (1H, m, H-15 β); 1,88 (1H, m, H-16 α); 2,88 (1H, m, H-16 β); 2,09 (3H, s, CH_3 (H-17)); 0,87 (3H, s, H-18); 1,07 (3H, s, H-19); 4,64 (1H, d, J=16,5 Hz, H-21); 4,82 (1H, d, J=16,5 Hz, H-21), 2,03 (3H, s, H-23 (CH_3)). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 33,2 (C-1); 31,2 (C-2); 122,4 (C-3, 170,2 (CO), 20,5 (CH_3)); 116,1 (C-4); 147,3 (C-5); 122,4 (C-6); 31,6 (C-7); 28,6 (C-8); 50,2 (C-9); 34,7 (C-10); 69,7 (C-11, 169,3 (CO), 21,1 (CH_3)); 35,8 (C-12); 46,8 (C-13); 53,2 (C-14); 23,8 (C-15); 30,9 (C-16); 94,6 (C-17, 170,0 (CO), 20,9 (CH_3)); 15,6 (C-18); 21,1 (C-19); 198,8 (C-20); 66,9 (C-21); 170,1 (C-22); 20,9 (C-23). Análisis elemental calculado para $C_{29}H_{38}O_9$: C 66,64%; H 7,22%. Encontrado C 66,15%; H 7,06%.

VII.3.2. Alcohólisis enzimática de 3 β ,11 β ,17 α ,21-tetraacetoxipregna-3,5-dien-20-ona (IV-12)

Una solución conteniendo 136 mg de compuesto **V-11** (0,3 mmol) en 3 ml de anhídrido acético (0,3 mmol) y 15 ml de alcohol y 680 mg de CAL B fue colocada en un agitador orbital a 55 °C y 200 rpm. Luego de 24 horas de reacción la enzima fue filtrada y el solvente evaporado. El producto fue purificado por cromatografía en columna de silicagel (hexano:AcOEt 7:3).

Sólido blanco (94 mg, 75 % rendimiento), Pf: 55-57 °C. $[\alpha]_D^{25}$: -15,6° (c= 1,02, CHCl₃)
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃), δ 1,50 (1H, m, H-1 α); 1,86 (1H, m, H-2 β); 2,16 (1H, 2 α); 2,45 (1H, m, H-2 β); 2,14 (3H, s, H-3 (CH₃)); 5,69 (1H, d, J=2,0 Hz, H-4); 5,35 (1H, t, J=3,5 Hz, H-6); 2,42(1H, m, H-7 α); 2,21 (1H, m, H-7 β); 1,90 (1H, m, H-8); 1,35 (1H, dd, J=12,0; 3,2 Hz, H-9); 5,54 (1H, dd, J=6,5; 3,4 Hz, H-11 α); 2,08 (3H, s, H-11 (CH₃)); 2,14 (1H, m, H-12 α); 2,02 (1H, m, H-12 β); 1,80 (1H, m, H-14); 1,48 (1H, m, H-15 α); 1,86 (1H, m, H-15 β); 1,90 (1H, m, H-16 α); 2,87 (1H, m, H-16 β); 2,01 (3H, s, CH₃ (H-17)); 0,80 (3H, s, H-18); 1,06 (3H, s, H-19); 4,27 (2H, s, H-21). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 33,2 (C-1); 31,5 (C-2); 122,4 (C-3, 170,6 (CO), 21,0 (CH₃)); 116,0 (C-4); 147,1 (C-5); 122,8 (C-6); 31,3 (C-7); 28,6 (C-8); 50,0 (C-9); 35,0 (C-10); 69,4 (C-11, 169,0 (CO), 21,2 (CH₃)); 35,8 (C-12); 46,7 (C-13); 53,1 (C-14); 23,7 (C-15); 30,8 (C-16); 90,1 (C-17, 169,0 (CO), 21,0 (CH₃)); 15,7 (C-18); 21,3 (C-19); 199,0 (C20); 66,9 (C-21); 170,1. EM-IE: m/z (intensidad relativa): 488 [M]⁺ (0,5), 294 (2), 384(3), 370(1), 311(9), 59(4), 43(100). Análisis elemental calculado para C₂₇H₃₆O₈: C 66,38%; H 7,43%. Encontrado C 66,00%; H 7,16%.

VII.4. Estudio de la actividad de una lipasa heteróloga en sistemas esteroidales: acetilación de cortexolona

VII.4.1. Síntesis de 21-Acetato de 17 α -hidroxipregn-4-en-3,20-diona (21-acetato de cortexolona) (V-2)

A 100 ml de éter diisopropílico conteniendo 100 mg de cortexolona (0,29 mmol) se agregaron 500 mg de ROL1. La mezcla de reacción fue colocada en un agitador orbital a 55 °C, 200 rpm durante 48 horas. Finalizada la reacción la enzima fue filtrada, y lavada con éter diisopropílico y el solvente fue evaporado a presión reducida. El producto de reacción fue purificado por cromatografía en columna de silicagel (hexano:AcOEt 1:1).

Sólido blanco (100 mg, 91%), Pf: 235-238 °C. Datos de punto de fusión y rotación específica reportado en literatura: p.f.: 235-238 °C.⁷ RMN ¹H (200,1MHz, CDCl₃): δ 5,74 (1H, s, H-4); 0,72 (3H, s, H-18); 1,19 (3H, s, H-19), 2,17 (3H, s, H-23); 4,86 (1H, d, J= 18 Hz, H-21); 5,09 (1H, d, J= 18 Hz, H-21). RMN ¹³C (50,2 MHz, CDCl₃): δ 199,7 (C-3); 123,9 (C-4); 171,0 (C-5); 14,5 (C-18); 17,4 (C-19); 205,3 (C-20); 68,0 (C-21); 171,2 (C-22); 20,6 (C-23).

VII.5. Biotransformación de drospirenona empleando cepas fúngicas del Orden Mucorales

VII.5.1 Procedimiento general para la preparación del inóculo

Las cepas se sembraron en tubos inclinados de Agar Extracto de Malta (MEA) y se incubaron 7 días a 25 °C para lograr cultivos esporulados. Luego del tiempo establecido se añadió al tubo de cultivo 10 ml de medio líquido malta peptona. Luego de homogeneizar las suspensiones durante 30 segundos en vórtex se realizaron los recuentos de esporas mediante una cámara de Neubauer. Con los datos de recuento se realizaron las diluciones respectivas con el objetivo de obtener los inóculos ensayados (10⁴, 10⁵ y 10⁶ esporas/ml).

VII.5.2. Análisis de los productos de biotransformación de drospirenona

Se inocularon erlenmeyers 25 ml conteniendo 20 ml de medio líquido malta peptona, con 0,1 ml de una suspensión inicial de esporas (2 x 10⁶ esporas/ml) de diferentes cepas fúngicas: *Absidia corymbifera* -, *Absidia corymbifera* +/-, *Absidia coerulea*, *Syncephalastrum racemosum*. Luego de 4 días de incubación a 30 °C y a una velocidad

de agitación de 170 rpm el sustrato (xx mmoles) fue agregado. Los cultivos se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura y agitación. Las reacciones fueron monitoreadas por CCD. Luego de 4 días de reacción, la fase acuosa fue filtrada y extraída con diclorometano (3x10 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se evaporó el solvente. Las reacciones fueron luego resuspendidas en un volumen de 5 ml de acetonitrilo para su análisis por CLAR. Para estimar las conversiones correspondientes a los productos de biotransformación obtenidos con las diferentes cepas ensayadas, las fracciones fueron analizadas por CLAR empleando una columna C-18. Condiciones: fase móvil acetonitrilo:agua (55:45), flujo 0,3 ml/min, temperatura de la columna 30 °C y longitud de onda del detector UV 254 nm.

Tiempo de retención en minutos (C-18): **VI-2**: 8,70 , **VI-3**: 9,37, **VI-4**: 10,26 y **VI-5**:11,16.

VII.3. Aislamiento de los productos de Biotransformación

Se agregó un volumen de 0,5 ml de una suspensión de esporas de *Absidia corymbifera* – (concentración 10^4 esporas/ml) a un erlenmeyer de 250 ml conteniendo 200 ml de medio líquido malta peptona. La suspensión se incubó a 30 °C a 170 rpm durante 4 días. Posteriormente se agregó el sustrato (0,3 mmol) y se cultivó durante un período de tiempo de 4 días. Transcurrido el tiempo de reacción, el cultivo fue filtrado y extraído con diclorometano (3x200 ml). Las fases orgánicas fueron combinadas y secadas con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó el solvente. Los productos de reacción fueron separados por cromatografía en columna (desde hexano:AcOEt 7:3 hasta hexano:AcOEt 2:8). Los productos **VI-4** y **VI-5** se purificaron nuevamente mediante cromatografía en capa delgada preparativa utilizando como solvente de elución tolueno:AcOEt 6:4.

6 β ,7 β ,15 β ,16 β -Dimetilen-11 α -hidroxi-3-oxo-17 α -pregn-4-en-21,17-carbolactona(VI-2)

Sólido blanco, Pf: 239-240 °C. $[\alpha]_D^{25}$: -88,5 ($c=0,01$; CHCl₃). IR (film, cm⁻¹): 3423, 1767, 1652, 1593. RMN ¹H (500 MHz; CDCl₃): δ 2,28 (1H, ddd, J= 2,3; 4,9 ; 13,5 Hz)

(H-1 β); 2,11 (1H, m) (H-1 α); 2,60 (1H, m) (H-2 β); 2,41 (1H, m) (H-2 α), 6,05 (1H, s) (H-4); 1,51 (1H, m) (H-6 α), 1,25 (1H, m) (H-6' β); 0,81 (1H, c, J= 4,9 Hz) (H-6' α); 1,66 (1H, m) (H-7); 1,78 (1H, m) (H-8); 1,27 (1H, m) (H-9); 3,89 (1H, m) (H-11); 1,86 (1H, dd, J=11; 5,5 Hz) (H-12 β); 1,44 (1H, m) (H-12 α); 2,08 (1H,m) (H-14); 1,61 (1H, m) (H-15); 1,29 (1H, m) (H15' β); 0,55 (1H, dd, J=8; 15 Hz) (H-15' α); 1,41 (1H, m) (H-16); 0,98 (3H, s) (H-18); 1,21 (3H, s) (H-19); 2,15 (1H, m) (H-20 β); 2,44 (1H, m) (H-20 α); 2,57(1H, m) (H-21 β); 2,66 (1H, m) (H-21 α). RMN ^{13}C (50,32 MHz; CDCl_3): 38,4 (C-1); 34,2 (C-2); 198,3 (C-3); 126,8 (C-4); 171,0 (C-5); 20,1 (C-6); 19,2 (C-6'); 18,3 (C-7); 34,2 (C-8); 56,5 (C-9); 39,1 (C-10); 67,6 (C-11); 48,9 (C-12); 41,8 (C-13); 51,0 (C-14); 16,8 (C-15); 9,6 (C-15'); 24,6 (C-16); 95,5 (C-17); 20,1 (C-18); 18,5 (C-19); 30,6 (C-20); 29,2 (C-21); 176,5 (C-22). EM AR-ESI: $[\text{M}+\text{H}^+]= 383,22086$; $[\text{M}+\text{Na}^+]= 405,20437$.

6 β ,7 β ,15 β ,16 β -Dimetilen-11 α -hidroxi-3-oxo-17 β -pregn-4-en-21,17-carbolactona(VI-3)

Sólido blanco, Pf: 225 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: -42,4(c=0,01; CHCl_3). IR (film, cm^{-1}): 3424, 1767, 1653, 1593. RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3): δ 2,35 (1H, m) (H-1 β); 2,10 (1H, m) (H-1 α); 2,58 (1H, m) (H-2 β); 2,43 (1H, m) (H-2 α), 6,05 (1H, s) (H-4); 1,57 (1H, m) (H-6 α), 1,24 (1H, m) (H-6' β); 0,79 (1H, c, J= 4,9 Hz) (H-6' α); 1,68 (1H, m) (H-7); 1,74 (1H, m) (H-8); 1,26 (1H, m) (H-9); 3,82 (1H, m) (H-11); 1,73 (1H, m) (H-12 β); 1,66 (1H, m) (H-12 α); 2,45 (1H,m) (H-14); 1,67 (1H, m) (H-15); 0,97 (1H, m) (H15' β); 0,56 (1H, dd, J=8,2; 15,2 Hz) (H-15' α); 1,52 (1H, m) (H-16); 0,84 (3H, s) (H-18); 1,20 (3H, s) (H-19); 2,29 (1H, m) (H-20 β); 2,20 (1H, m) (H-20 α); 2,59(1H, m) (H-21 β); 2,73 (1H, m) (H-21 α). RMN ^{13}C (50,32 MHz; CDCl_3): δ 38,5 (C-1); 34,2 (C-2); 198,3 (C-3); 126,8 (C-4); 171,0 (C-5); 20,5 (C-6); 19,2 (C-6'); 18,3 (C-7); 33,8 (C-8); 57,4 (C-9); 39,0 (C-10); 67,7 (C-11); 46,5 (C-12); 42,3 (C-13); 52,4 (C-14); 17,3 (C-15); 9,5 (C-15'); 24,2 (C-16); 96,9 (C-17); 20,3 (C-18); 18,6 (C-19); 27,0 (C-20); 29,4 (C-21); 176,4 (C-22). EM AR-ESI: $[\text{M}+\text{H}^+]= 383,221$; $[\text{M}+\text{Na}^+]= 405,20363$.

6 β ,7 β ,15 β ,16 β -Dimetilen-11 β -hidroxi-3-oxo-17 α -pregn-4-en-21,17-carbolactona(VI-4)

Sólido blanco, Pf: 170-171 °C. $[\alpha]_D^{25}$: -56,2 ($c=0,001$; CHCl_3). IR (film, cm^{-1}): 3420, 1760, 1656, 1595. RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3): δ 2,32 (1H, m) (H-1 β); 2,08 (1H, m) (H-1 α); 2,59 (1H, m) (H-2 β); 2,41 (1H, m) (H-2 α), 6,05 (1H, s) (H-4); 1,55 (1H, m) (H-6 α), 1,24 (1H, m) (H-6' β); 0,79 (1H, c, $J=4,9$ Hz) (H-6' α); 1,68 (1H, m) (H-7); 1,74 (1H, m) (H-8); 1,25 (1H, m) (H-9); 3,82 (1H, m) (H-11); 1,75 (1H, m) (H-12 β); 1,67 (1H, m) (H-12 α); 2,45 (1H, m) (H-14); 1,67 (1H, m) (H-15); 1,29 (1H, m) (H15' β); 0,56 (1H, dd, $J=8,2; 15,2$ Hz) (H-15' α); 1,51 (1H, m) (H-16); 0,84 (3H, s) (H-18); 1,20 (3H, s) (H-19); 2,15 (1H, m) (H-20 β); 2,21 (1H, m) (H-20 α); 2,29 (1H, m) (H-21 β); 2,74 (1H, m) (H-21 α). RMN ^{13}C (50,32 MHz; CDCl_3): δ 38,4 (C-1); 34,3 (C-2); 198,3 (C-3); 126,9 (C-4); 171,0 (C-5); 20,5 (C-6); 19,2 (C-6'); 18,3 (C-7); 33,8 (C-8); 57,3 (C-9); 39,0 (C-10); 67,8 (C-11); 46,6 (C-12); 42,6 (C-13); 52,5 (C-14); 17,3 (C-15); 9,6 (C-15'); 24,4 (C-16); 96,9 (C-17); 20,3 (C-18); 18,6 (C-19); 27,0 (C-20); 29,4 (C-21); 176,4 (C-22). EM AR-ESI: $[\text{M}+\text{H}^+]=383,22133$; $[\text{M}+\text{Na}^+]=405,20515$.

6 β ,7 β ,15 β ,16 β -Dimetilen-2 β -hidroxi-3-oxo-17 α -pregn-4-en-21,17-carbolactona(VI-4)

Sólido blanco, Pf: 185-187 °C. $[\alpha]_D^{25}$: -83,0 ($c=0,001$; CHCl_3). IR (film, cm^{-1}): 3422, 1765, 1656, 1590. RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3): δ 2,64 (1H, m) (H-1 β); 2,40 (1H, m) (H-1 α); 4,38 (1H, dd, $J=$ H-2 α), 5,96 (1H, s) (H-4); 1,59 (1H, m) (H-6 α), 1,20 (1H, m) (H-6' β); 1,06 (1H, c, $J=4,9$ Hz) (H-6' α); 1,64 (1H, m) (H-7); 2,26 (1H, m) (H-8); 1,13 (1H, m) (H-9); 1,82 (1H, m) (H-11 α); 2,17 (1H, m) (H-11 β); 1,68 (2H, m) (H-12); 1,98 (1H, m) (H-14); 1,64 (1H, m) (H-15); 1,49 (1H, m) (H15' β); 0,57 (1H, dd, $J=8,2; 15,2$ Hz) (H-15' α); 1,36 (1H, m) (H-16); 1,25 (3H, s) (H-18); 1,35 (3H, s) (H-19); 2,37 (1H, m) (H-20 β); 2,11 (1H, m) (H-20 α); 2,65 (1H, m) (H-21 β); 2,53 (1H, m) (H-21 α). RMN ^{13}C (50,32 MHz; CDCl_3): δ 33,8 (C-1); 68,5 (C-2); 198,1 (C-3); 124,1 (C-4); 172,5 (C-5); 19,6 (C-6); 17,8 (C-6'); 16,3 (C-7); 30,4 (C-8); 56,7 (C-9); 36,7 (C-10); 36,5 (C-11); 45,9 (C-12); 41,9 (C-13); 52,7 (C-14); 16,9 (C-15); 10,5 (C-15'); 24,3 (C-16); 96,2 (C-17); 21,8 (C-18); 21,5 (C-19); 30,9 (C-20); 29,3 (C-21); 176,5 (C-22). EM AR-ESI: $[\text{M}+\text{H}^+]=383,22118$; $[\text{M}+\text{Na}^+]=405,205$.

Bibliografía

1. Ferrer, P.; Alarcón, M.; Ramón, R.; Benaiges, M. D.; Valero, F. *Biochem. Eng. J.* **2009**, *43*, 271–277.
2. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
3. Mateo, C.; Abian, O.; Bernedo, M.; Cuenca, E.; Fuentes, M.; Fernandez-Lorente, G.; Palomo, J. M.; Grazu, V.; Pessela, B. C. C.; Giacomini, C.; Irazoqui, G.; Villarino, A.; Ovsejevi, K.; Batista-Viera, F.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisán, R. J. M. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *37*, 456–462.
4. Antonucci, R.; Bernstein, S.; Heller, M.; Lenhard, R.; Littell, R.; Williams, J. H. *J Org Chem*, **1953**, *18*, 70-72.
5. Kirk, D. N.; Toms, H. C.; Douglas, C.; White, K. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1990**, *9*, 1567-1594.
6. Hickey, J. P.; Butler, I. S.; Pouskouleli, G. *J. Magn. Reson.*, **1969**, *38*, 501-506.
7. Sokolova, L. V.; Klimova, L. I.; Kaminka, E. M.; Yaroslavtseva, Z. A.; Suvorov, N. N. *Pharm. Chem. J.* **1969**, *3*, 709–712.

Capítulo VIII

Conclusiones finales

VIII. CONCLUSIONES FINALES

En el presente trabajo de tesis doctoral se utilizaron procedimientos de Biocatálisis y Biotransformación en la síntesis y modificación de compuestos orgánicos. Se emplearon como sustratos compuestos esteroideos naturales y de origen sintético y un α -ceto ácido.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo utilizando diferentes tipos de catalizadores biológicos, evidencian la gran utilidad que presentan estas estrategias en el área de síntesis orgánica.

El trabajo consta de varias partes, comenzando con el *Capítulo I*, donde se presenta una introducción y una breve descripción de los trabajos relevantes en los que se aplicaron biocatalizadores y células enteras en la transformación de compuestos orgánicos. En esta introducción se hace un recorrido sobre la historia de las Ciencias Química, Biológica y Bioquímica, su interrelación y aporte esencial a las bases científicas de la Biocatálisis y la Biotransformación y de qué manera estas disciplinas se han ido desarrollando. Hoy en día su progreso muestra un panorama interesante hacia nuevas aplicaciones, provocando cambios alentadores relacionados a procesos comprometidos a los cuidados ambientales.

En el *Capítulo II* se detallan los objetivos específicos de este trabajo de tesis doctoral. Los objetivos planteados estuvieron pensados y analizados en base a la experiencia del Laboratorio de Biocatálisis y a conocimientos incorporados a través de resultados de investigaciones efectuadas en el marco de dos estancias realizadas en centros de investigación en México y España.

Luego de los objetivos planteados, el trabajo continúa con cuatro capítulos correspondientes al trabajo experimental desarrollado. En todos ellos se presenta una breve introducción del tema específico, un detalle de los resultados obtenidos y una discusión de los mismos.

Comenzando con el **Capítulo III**, en éste se describe la aplicación de lipasas en la obtención de ésteres de ácido 2-oxoglutarico de cadena media y larga. En la reacción de esterificación catalizada por enzimas se evaluaron lipasas comerciales y una lipasa no disponible en el mercado. La lipasa no comercial ensayada fue obtenida de la resina de la planta de *Carica papaya* que constituye un agro-residuo comúnmente encontrado en distintas zonas geográficas de México. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta parte se puede concluir lo siguiente:

- La aplicación de lipasas permitió la síntesis eficiente y obtención como único producto de ésteres de ácido 2-oxoglutarico de cadena media y larga (6 compuestos novedosos). La síntesis química tradicional de estos compuestos requiere de condiciones de reacción extremas que pueden alterar su estabilidad. Por lo cual la implementación de biocatalizadores resulta una herramienta alternativa interesante para la síntesis de estos derivados.
- Los rendimientos obtenidos por ambas enzimas fueron influenciados por el largo de la cadena del alcohol utilizado en la síntesis de los ésteres, siendo mayores en el caso de alcoholes de cadena media.
- CAL B y CPL resultaron ser los biocatalizadores más eficientes en la preparación de los derivados. Si bien CAL B presentó mejores rendimientos que CPL, cabe destacar que esta última enzima proviene de un agro-residuo y es utilizada directamente sin ningún tratamiento de purificación. La implementación y utilidad de la enzima de la papaya no sólo presenta beneficios a nivel económico sino también en relación a los residuos ambientales.

En el **Capítulo IV** se estudio la aplicación de lipasas en la reacción de acilación del esteroide hidrocortisona, obteniéndose una serie de monoésteres de variada longitud de cadena (9 compuestos de los cuales 8 son novedosos). Por otra parte se realizó una peracetilación química y posterior reacción de alcoholisis catalizada por el mismo tipo de enzimas con el objetivo de evaluar su actividad en reacciones inversas a las de acilación.

En el caso de la reacción de acilación las lipasas mostraron varias características:

- Regioselectividad: se obtuvo únicamente derivados acilados en posición 21 del esteroide.

- Los rendimientos de la reacción dependieron de la naturaleza del agente acilante, de la longitud de la cadena carbonada y del número de insaturaciones en la misma.
- CAL B mostró ser el biocatalizador más eficiente y permitió llevar a cabo la metodología “one pot” en la preparación de los mismos.

En el caso de la acetilación química, se logró peracetilar el compuesto mediante la utilización de energía de microondas. En la reacción de alcoholisis ensayada sobre el compuesto peracetilado obtenido, únicamente CAL B resultó ser efectiva y otorgó el producto con alto rendimiento cuando se empleó etanol como nucleófilo.

El *Capítulo V* describe la aplicación de una lipasa heteróloga del hongo *Rhizopus oryzae* (ROL) en la acetilación del esteroide cortexolona. La proteína heteróloga fue expresada en el hospedador *Pichia pastoris*, el cual presenta la ventaja de poseer un promotor fuerte e inducible por metanol para la expresión de dicha proteína. La ROL fue evaluada en su forma nativa e inmovilizada en diferentes soportes (Octadecyl Sepabeads, Lewatit 105-aldehído y Lewatit 1600) utilizando distintas técnicas de inmovilización con el objetivo de obtener la mayor actividad de la misma.

Con el biocatalizador libre e inmovilizado en los diversos soportes, se optimizaron los diferentes parámetros de reacción: temperatura, solvente de reacción, naturaleza del agente acilante y tiempo de reacción. Se realizó la determinación de la relación Enzima/Sustrato (E/S) y Agente acilante/Sustrato (A/S) como una primera aproximación de optimización. Con los datos generados en esta primera parte se estableció un rango de evaluación de dichos parámetros y se los empleó para el diseño de un modelo matemático (modelo experimental central compuesto rotatable) para lograr la optimización final de los mismos.

Los resultados obtenidos nos permitieron concluir:

- ROL presentó regioselectividad, obteniéndose como único producto el derivado acetilado en posición 21.
- Únicamente la lipasa inmovilizada en Lewatit 1600 permitió obtener altos rendimientos en el producto de reacción.
- A partir de la optimización inicial de los parámetros E/S y A/S se estableció un rango de valores que permitió su adaptación a un modelo matemático. Éste

diseño matemático permitió, utilizando como herramienta una superficie de respuesta, la optimización final y de manera conjunta de ambos parámetros.

En el **Capítulo VI** se estudia el empleo de cepas de diversos géneros fúngicos, todos ellos del Orden Mucorales en la biotransformación de una progestina sintética: la drospirenona.

Las cepas ensayadas fueron: *Absidia coerulea*, *A. corymbifera* +, *A. corymbifera* – , *Mucor plumbeus*, *Rhizopus oryzae* y *Syncephalastrum racemosum*.

Primeramente se evaluó la metodología de Biotransformación adecuada en la transformación del esteroide probando las siguientes:

- Metodología A: adición del sustrato directamente al medio de cultivo en crecimiento o previamente disuelto en un pequeño volumen de solvente orgánico.
- Metodología B: filtración de los microorganismos y resuspensión en diversos solventes orgánicos o en solución reguladora pH 5.

Los mejores resultados se obtuvieron mediante el empleo de células en crecimiento en medio de cultivo líquido a las cuales se les adicionó directamente el sustrato a transformar (Metodología A). Se optimizaron los parámetros: tamaño de inóculo de microorganismo, temperatura, tiempo de reacción, velocidad de agitación, pH, concentración y disolución del sustrato. Los resultados obtenidos permitieron concluir:

- Las cepas de los géneros *Absidia* y *Syncephalastrum* fueron capaces de llevar a cabo la Biotransformación de drospirenona en forma eficiente.
- En todos los casos los productos obtenidos fueron monohidroxilados.
- Ambos géneros generaron como producto mayoritario un derivado α -monohidroxilado en posición 11 y como productos minoritarios los compuestos 11-y 2- β monohidroxilados.
- Únicamente las cepas del género *Absidia* fueron capaces de generar como segundo producto mayoritario el compuesto epimerizado en posición 17 del derivado 11- α -monohidroxilado.

El **Capítulo VII** corresponde a la parte experimental donde se detallan los reactivos, solventes, técnicas y metodologías utilizadas en el presente trabajo que fueron utilizadas

para la obtención, identificación y caracterización de cada uno de los productos sintetizados.

El presente trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

Lipase-catalyzed regioselective preparation of fatty acid esters of hydrocortisone

Paula G. Quintana, Alicia Baldessari

Steroids, **2009**, 74. 1007–1014.

Lipase-catalyzed synthesis of medium- and long-chain diesters of 2-oxoglutaric acid

Paula G. Quintana, Georgina Sandoval, Alicia Baldessari

Biocatalysis and Biotransformation, **2011**, 29, 1–6.

Immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase as an efficient catalyst in the acetylation of cortexolone

Paula G. Quintana, Marina Guillén, Marzia Marciello, Francisco Valero, Jose M. Palomo, Alicia Baldessari

Eur. J. Org. Chem., DOI: 10.1002/ejoc.201200178. Publicado online: 14 JUN **2012**.