

## Tesis de Posgrado

# Biocatálisis en medio orgánico: Lipasas en la preparación de amidas y derivados de vitamina B6. Células enteras en la reducción de compuestos carbonílicos

Mangone, Constanza Pía

2003

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Mangone, Constanza Pía. (2003). Biocatálisis en medio orgánico: Lipasas en la preparación de amidas y derivados de vitamina B6. Células enteras en la reducción de compuestos carbonílicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3702\\_Mangone.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3702_Mangone.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Mangone, Constanza Pía. "Biocatálisis en medio orgánico: Lipasas en la preparación de amidas y derivados de vitamina B6. Células enteras en la reducción de compuestos carbonílicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3702\\_Mangone.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3702_Mangone.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

---

**Biocatálisis en medio orgánico: Lipasas en la  
preparación de amidas y derivados de vitamina B<sub>6</sub>.  
Células enteras en la reducción de compuestos  
carbonílicos**

---

**Constanza Pía Mangone**

Directora de Tesis

**Dra. Alicia Baldessari**

**Nº 3702** \*r

Lugar de trabajo

**Departamento de Química Orgánica**

Tesis presentada para optar por el título  
de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

**Diciembre de 2003**



**A mi madre, por el orgullo que hubiera sentido.**

**Y a mis dos amores, Juan Manuel y Cristián.**



***Biocatalysis in organic media: Lipase-catalyzed preparation of amides and vitamin B<sub>6</sub> derivatives. Whole-cell reduction of carbonyl compounds***

Constanza P. Mangone, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Diciembre de 2003

**Keywords:** lipases; vitamin B<sub>6</sub>; organic media; fatty acids; surfactants; substituted amides; one-pot synthesis; whole-cells; *Mucor rouxii*; yeast; mycelial; spores; ketoesters.

**Abstract:** A series of acyloxy derivatives of pyridoxine (1), one of the three members of vitamin B<sub>6</sub> group, has been prepared by lipase-catalyzed esterification and transesterification reactions of 1 with carboxylic acids or ethyl carboxylates in organic media. Lipases showed a remarkable regioselective behavior: acylation of pyridoxine only occurred at C(5) of the pyridine ring. Moreover, acetylated derivatives of 1 were selectively deacetylated by enzymatic catalysis. This enzymatic approach allowed the preparation of novel fatty acids derivatives of 1. The surfactant activity, composition and clean enzymatic methodology applied to the preparation of these products make them useful as ingredients in cosmetic and pharmaceutical formulations or food additives.

Continuing the work with lipases, an enzyme-catalyzed procedure is described for the one-pot conversion of carboxylic acid into substituted amides via *in-situ* formation of the ethyl ester and subsequent aminolysis. This methodology proved to be general and can be applied to open chain, cyclic, hydroxy-, dicarboxylic-, various chain length, and unsaturated acids. Moreover, the enzyme showed a regioselective behavior in relation to primary and secondary amino groups.

Finally, the efficient enantioselective reduction of a number of ketoesters by mycelial and yeast-like forms of the dimorphic fungus *Mucor rouxii* in a whole-cell process is presented. Mycelial cells, grown in aerobiosis, were efficient in water, whereas the yeast-like cells, grown in an anaerobic medium, were both efficient in water and in organic solvents. The fungal spores, which are the physiologically resistant form of the fungus, also catalyzed the reductive process efficiently and in a stereoselective way. The freeze-dried yeast-like cells, rehydrated in a small volume of water, maintained the same efficiency and selectivity of the reaction in organic solvents as the fresh biomass up to at least 4 months.



***Biocatálisis en medio orgánico: Lipasas en la preparación de amidas y derivados de vitamina B<sub>6</sub>. Células enteras en la reducción de compuestos carbonílicos***

Constanza P. Mangone, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Diciembre de 2003

**Palabras clave:** lipasas; vitamina B<sub>6</sub>; medio orgánico; ácidos grasos; surfactantes; amidas sustituidas; células enteras; *Mucor rouxii*; levadura; micelio; esporas; cetoésteres.

**Resumen:** Una serie de aciloxi derivados de piridoxina (1), uno de los tres miembros del grupo de la vitamina B<sub>6</sub>, fueron preparados mediante reacciones de esterificación y transesterificación catalizadas por lipasas en medio orgánico. En las condiciones de trabajo, las lipasas mostraron un comportamiento altamente regioselectivo catalizando la acilación de piridoxina únicamente en la posición 5 del anillo piridínico. La misma clase de selectividad fue observada en la alcoholisis de derivados acetilados de 1 al emplear la lipasa de *Candida antarctica* (CAL). La metodología enzimática permitió la síntesis de once nuevos derivados de 1, diez de ellos preparados a partir de ácidos grasos. Teniendo en cuenta la actividad tensioactiva, su composición y lo poco contaminante que resulta el método enzimático para su preparación, estos compuestos podrían ser útiles como ingredientes en formulaciones cosméticas o farmacéuticas o bien como aditivos alimentarios.

Continuando el trabajo con lipasas, se describe un procedimiento enzimático muy eficiente para la preparación de carboxamidas N-sustituidas a partir de sus correspondientes ácidos carboxílicos. El procedimiento consiste en un solo paso e involucra la formación *in-situ* del éster etílico y la subsecuente aminólisis del mismo. La metodología resultó aplicable a una gran variedad de ácidos carboxílicos: de estructura lineal, cíclicos, saturados e insaturados, dicarboxílicos, con otros grupos funcionales presentes (hidroxiácidos), etc. Además, la enzima mostró un comportamiento selectivo frente a aminas con más de un grupo funcional presente.

Finalmente, se presenta la reducción enantioselectiva de cetoésteres catalizadas por células enteras. Como biocatalizador se empleó al hongo *Mucor rouxii*, un microorganismo





dimórfico que puede desarrollarse como micelio o como levadura dependiendo de las condiciones de aireación del medio de cultivo. La morfología micelio catalizó el proceso de manera eficiente únicamente en agua, mientras que las levaduras, resultaron activas tanto en agua como en solventes orgánicos. Las esporas, producidas por el hongo como mecanismo de defensa y de preservación, también resultaron catalizadores eficientes y estereoselectivos del proceso reductivo. Asimismo, las técnicas de secado del microorganismo (liofilización y secado por corriente de aire caliente) resultaron muy convenientes para la conservación de la biomasa de *Mucor rouxii*. Las células de levadura liofilizada, rehidratadas en un pequeño volumen de agua, mantuvieron la misma eficiencia y selectividad en las reducciones en medio orgánico que los cultivos frescos durante al menos 4 meses.



# INDICE

## ***Introducción***

### **CAPITULO I**

1. Biocatalizadores en síntesis orgánica.....	1
2. Características de los biocatalizadores.....	3
3. Catalizadores en medio orgánico.....	4
4. Enzimas aisladas <i>versus</i> células enteras	
4.a. Enzimas aisladas como catalizadores: LIPASAS.....	15
4.b. Catálisis con células enteras: OXIDORREDUCTASAS .....	30

### **CAPITULO II**

<i>Objetivos</i> .....	42
------------------------	----

## ***Resultados y discusión***

### **CAPITULO III**

1. Acetilación de piridoxina catalizada por lipasas.....	47
2. Alcohólisis de acetato de 4,5-bis(acetoximetil)-2-metilpiridin-3-ilo.....	52
3. Alcohólisis de diacetato de 5-hidroxi-6-metilpiridina-3,4-dimetilo catalizada por lipasas.....	59
4. Reacciones de acetilación catalizadas por lipasas de sustratos químicamente relacionados con piridoxina.....	65
5. Reacciones de acilación de piridoxina catalizadas por lipasas.....	70
6. Resumen y conclusiones del capítulo.....	85

### **CAPITULO IV**

1. Reacciones de aminólisis catalizadas por lipasas.....	89
1.a. Optimización de las condiciones de reacción.....	93
1.b. Aplicación del procedimiento enzimático en distintos ácidos carboxílicos y aminas.....	96

2. Síntesis quimioenzimática de amidas componentes de agentes terapéuticos.....	107
3. Resumen y conclusiones del capítulo.....	109

## **CAPITULO V**

1. Reducción de acetoacetato de isopropilo catalizada por cepas industriales de levadura de panaderia ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ).....	112
2. Reducción de compuestos carbonílicos polifuncionales catalizada por el hongo <i>Mucor rouxii</i> .....	114
2.a. Características de <i>Mucor rouxii</i> .....	115
2.b. Reducciones catalizadas por cultivos frescos de <i>Mucor rouxii</i> .....	117
2.c. Distintas estrategias de conservación del catalizador.....	124
2.d. Reducción de compuestos carbonílicos catalizada por <i>Mucor rouxii</i> liofilizado.....	129
2.e. Estudio del comportamiento de levadura liofilizada de <i>Mucor rouxii</i> en la hidrogenación de oximas y dobles enlaces carbono-carbono.....	133
3. Resumen y conclusiones del capítulo.....	133

## ***Parte experimental***

### **CAPITULO VI**

1. Generalidades.....	136
2. Biotransformaciones catalizadas por enzimas aisladas	
2.a. Preparación de derivados de piridoxina.....	142
2.b. Preparación de amidas a partir de ácidos carboxílicos.....	155
3. Biotransformaciones catalizadas por células enteras.....	165

<b><i>Resumen</i></b> .....	176
-----------------------------	-----

## ABREVIATURAS

CAL	lipasa de <i>Candida antarctica</i>
CG/EM	cromatografía gaseosa / espectrometría de masa
CGL	cromatografía gas-líquido
CMC	concentración micelar crítica
CRL	lipasa de <i>Candida rugosa</i>
CVL	lipasa de <i>Chromobacterium viscosum</i>
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
E/S	relación enzima/sustrato
ee	exceso enantiomérico
EM	espectrometría de masa
HLB	balance hidrofílico-lipofílico
HLL	lipasa de <i>Humicola lanuginosa</i>
LIP	Lipozyme <sup>R</sup> (lipasa de <i>Mucor miehei</i> )
LPL	Lipasa de lipoproteína
NAD(H)	nicotinamida adenina dinucleótido
PCL	lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>
PFL	lipasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
PPL	lipasa pancreática porcina
PSL	lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp.
RML	lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>
RMN	resonancia magnética nuclear
THF	tetrahidrofurano



# *Capítulo I*

*Introducción*





## 1. BIOCATALIZADORES EN SÍNTESIS ORGÁNICA

Durante la última década, el empleo de biocatalizadores en síntesis orgánica se ha convertido en una interesante alternativa a los métodos químicos convencionales.<sup>1</sup> La creciente demanda de compuestos con funcionalidades específicas y enantioméricamente puros por parte de las industrias farmacéutica, alimentaria, de agroquímicos, etc, convierte a estos catalizadores en útiles herramientas por su capacidad para realizar transformaciones de materiales tanto naturales como sintéticos con un alto grado de quimio-, regio- y enantioselectividad.

Una importante ventaja que presentan los procesos catalíticos es que requieren condiciones de reacción relativamente suaves tales como temperatura ambiente y presión atmosférica; esta característica reduce los requerimientos de energía y minimiza los problemas de isomerización, racemización, epimerización y reordenamiento que a menudo afectan a las reacciones químicas efectuadas a través de procesos sintéticos convencionales. Además, el bajo impacto en el medio ambiente derivado de las condiciones de reacción menos peligrosas, menos contaminantes y de menor consumo de energía (especialmente cuando se emplean metales pesados como catalizadores) permite incluir a la biocatálisis dentro del concepto de “green chemistry” traducido como química sustentable o química verde.

Todas estas razones han convertido a la biocatálisis en un popular blanco para la investigación tanto en el ámbito académico como en el industrial y han sido descritas en la literatura un gran número de enzimas con potencial para su explotación práctica. Por ejemplo, la base de datos BioCatalysis, basada en 8.000 artículos y patentes, describe 18.500 biotransformaciones llevadas a cabo con enzimas, microorganismos y anticuerpos catalíticos.<sup>2</sup> El desarrollo de esta disciplina ha alcanzado un grado tal que hoy en día casi todas las reacciones orgánicas poseen un equivalente biocatalítico. En la Tabla 1.1 se resumen las principales reacciones orgánicas que se pueden llevar a cabo mediante catalizadores biológicos.

**Tabla 1.1.** Equivalente biocatalítico de las principales reacciones orgánicas

<b>Reacción</b>	<b>Catalizador biológico</b>
Hidrólisis y formación de ésteres	Esterasas, lipasas
Hidrólisis y formación de amidas	Amidasas (proteasas, acilasas), lipasas
Oxidorreducción de alcoholes y cetonas	Deshidrogenasas
Hidroxilación y epoxidación	Oxigenasas
Peroxidación y halohidratación	Peroxidasas
Condensación aldólica	Aldolasas, transcetolasas
Diels-Alder	Anticuerpos catalíticos
Baeyer Villiger	Monooxigenasas
Glicosidación	Glicosidasas, glicosiltransferasas
Hidrólisis y formación de fosfatos	Fosforilasas, fosfatasas, quinasas
Formación de ésteres de sulfato	Sulfotransferasas
Síntesis de aminoácidos	Transaminasas
Reacciones de isomerización, adición, eliminación	Isomerasas, liasas, hidratasas

Como puede observarse en los ejemplos citados en la Tabla 1.1, los catalizadores biológicos más usados son las enzimas, sin embargo para el caso de la reacción de Diels-Alder, pueden usarse otras entidades biológicas como los son los anticuerpos catalíticos.<sup>3</sup>

Los primeros trabajos sobre biocatálisis se centraban en el uso de enzimas fácilmente accesibles, como las esterasas, las proteasas y las lipasas. Estas enzimas se siguen empleando en la actualidad para la síntesis asimétrica de fármacos, agroquímicos, vitaminas y fragancias. Los desarrollos más recientes en el tema se orientan a la búsqueda de nuevos y más versátiles biocatalizadores, capaces de catalizar reacciones difíciles de llevar a cabo por métodos químicos o bien a la modificación de los biocatalizadores existentes por técnicas de biología molecular que incluyen la mutagénesis dirigida y evolución directa. La Tabla 1.2 muestra un panorama de las actividades a las que se orienta actualmente la investigación en síntesis enzimática.

**Tabla 1.2.** Actividades de investigación actualmente desarrolladas en síntesis enzimática

- 
- |  |   |
|--|---|
| • Desarrollo de nuevas reacciones enzimáticas usando sustratos fijos.            | • Uso de DNA recombinante para la producción de enzimas a gran escala.                          |
| • Uso de solventes orgánicos y co-solventes; sistemas mono-y bifásicos           | • Mutagénesis y evolución directa para cambiar las propiedades de las enzimas.                  |
| • Técnicas para disminuir la inhibición de sustratos y productos.                | • Exploración de nuevas enzimas y enzimas de nuevas especies para su potencial uso en síntesis. |
| • Regeneración de cofactores: NAD(P), COA, ATP, etc.                             | • Síntesis de fármacos y compuestos químicos de alto valor agregado a gran escala.              |
| • Modificación de la actividad enzimática. Producción de enzimas semisintéticas. | • Sistemas compuestos por muchas enzimas para síntesis <i>in vivo</i> y <i>in vitro</i> .       |
| • Inmovilización y estabilización de enzimas.                                    |   |
| • Anticuerpos catalíticos.   |   |
- 

La biotecnología química ha entrado en una era de desarrollo constante. Los numerosos avances en biología molecular, enzimología, química e ingeniería han contribuido a abrir un potencial ilimitado para las reacciones biocatalíticas y su aplicación en procesos industriales.

## 2. CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOCATALIZADORES

Los biocatalizadores más usados hasta el momento son las enzimas, las cuales pueden emplearse en forma purificada: aisladas o formando parte de un complejo enzimático, o bien como una preparación de células enteras. La fuente del catalizador puede ser de origen animal, vegetal o bien microbiana.

La gran utilidad de las enzimas se debe a que son capaces de catalizar *in vitro* reacciones que involucran no sólo al sustrato natural sino a sustratos no naturales. Como catalizadores, son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones en más de  $10^{12}$  veces y operar bajo condiciones suaves de reacción. Presentan un comportamiento altamente selectivo y en consecuencia resultan excelentes reactivos para llevar a cabo transformaciones sin la

necesidad de recurrir a grupos protectores. Esto permite disminuir la cantidad de pasos en una ruta sintética lo que implica muchas veces no sólo economía de tiempo sino mejora en los rendimientos globales de la síntesis.

Además las enzimas son compuestos quirales y en consecuencia muestran una elevada enantiodiferenciación.

Las principales desventajas que limitan el amplio uso de las enzimas en síntesis son su alta inestabilidad (a la temperatura, el pH, etc.), la dificultad que implica el aislamiento, su baja productividad y su estrecha especificidad de sustrato. Sin embargo, los avances en los procedimientos de purificación y el uso de enzimas inmovilizadas o modificadas genéticamente han ido disminuyendo la incidencia de esas limitaciones.

Otra desventaja importante, causada por la limitada solubilidad en agua de muchos sustratos orgánicos, es que la concentración de reactivos es mucho más baja en un proceso biocatalítico que en un proceso químico. Esto conlleva a la necesidad de emplear volúmenes de reacción muy grandes complicando la recuperación del producto.

### **3. CATALIZADORES EN MEDIO ORGÁNICO**

Tradicionalmente, se pensaba en las enzimas como catalizadores que funcionaban sólo en sistemas acuosos, sin embargo Klibanov y *col.* demostraron mediante sus trabajos publicados entre 1984 y 1986<sup>4</sup> que algunas de ellas podían variar su selectividad y aumentar su estabilidad térmica en solventes no acuosos.

A primera vista, la sustitución del medio acuoso resulta incompatible de acuerdo a la idea convencional de que las enzimas pueden desnaturalizarse en solventes orgánicos. Sin embargo, esta concepción surge de examinar a las enzimas en mezclas de solvente orgánico y agua, no en solventes orgánicos puros. La ausencia de agua, que actúa como lubricante natural,<sup>5</sup> vuelve a las enzimas más rígidas, en consecuencia en solventes orgánicos puros, si bien la molécula de proteína es propensa a desnaturalizarse, la insuficiente flexibilidad conformacional impide que esto suceda.<sup>6</sup> De acuerdo con esto, se ha encontrado que muchas enzimas en forma cristalina retienen esencialmente su estructura nativa aún en solventes orgánicos.<sup>7</sup>

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

- 1) Permite la catálisis de reacciones que son poco favorables en medios acuosos (por ejemplo, la inversión de las reacciones de hidrólisis a favor de la síntesis)
- 2) Pueden ser suprimidas reacciones secundarias inducidas por el agua, como la hidrólisis de anhídridos
- 3) Permite la disolución de sustratos hidrofóbicos
- 4) Facilita la recuperación de algunos productos
- 5) El biocatalizador es insoluble en el medio de reacción, en consecuencia puede ser fácilmente recuperado
- 6) Las enzimas presentan mayor estabilidad térmica en solventes orgánicos anhidros que en medio acuoso

### **3.a. Actividad enzimática en solventes orgánicos**

La ausencia de agua permite que una enzima dada catalice nuevas reacciones enzimáticas. Por ejemplo, en agua, numerosas lipasas, esterasas y proteasas catalizan la hidrólisis de ésteres y amidas, mientras que en solventes orgánicos anhidros esto no ocurre. Al agregar distintos nucleófilos como alcoholes, aminas o tioles, es posible lograr reacciones de transesterificación, aminólisis y tiotransesterificación respectivamente. Es más, la síntesis de ésteres a partir de un ácido y un alcohol (inversa de la hidrólisis) se vuelve termodinámicamente favorable.<sup>8</sup>

En general, la actividad catalítica que presentan las enzimas en solventes orgánicos puros es bastante menor a la que presentan en agua.<sup>9</sup> Sin embargo, la actividad en solventes orgánicos puede ser mejorada modificando los parámetros de los cuales depende como: naturaleza del solvente, actividad de agua, difusión de sustratos y productos, control de pH, forma de la enzima, etc.

Los solventes hidrofóbicos son generalmente más efectivos en estas reacciones que los hidrofílicos debido a que éstos últimos pueden remover la monocapa de agua que recubre la superficie del biocatalizador que es esencial para su actividad catalítica.<sup>10</sup>

Como las enzimas son insolubles en la mayoría de los solventes orgánicos, las suspensiones de enzima deben ser agitadas vigorosamente para minimizar los problemas concernientes a la transferencia de masa de los sustratos.

Uno de los parámetros que más afecta la actividad enzimática en solución acuosa es el pH. A pesar de que esta variable no tiene sentido en solventes orgánicos, se ha encontrado que las enzimas en tales medios presentan “memoria” en el pH: su actividad catalítica corresponde a la del pH de la última solución acuosa a la que estuvo expuesta la enzima.<sup>8,11</sup> Este fenómeno se debe a que los grupos ionogénicos de la proteína retienen el último estado de ionización que tenían antes de deshidratarse y ser reemplazados por el solvente orgánico. En consecuencia la actividad enzimática en ese medio puede ser mejorada, a veces cien veces, si la enzima se liofiliza a partir de soluciones acuosas que tienen el pH óptimo para la catálisis.<sup>8,11,12</sup>

Como se mencionó antes, el solvente orgánico no produce la desnaturalización de las enzimas debido a que el ambiente anhidro posiblemente congela a la molécula en su conformación original. Esto es válido para las enzimas que fueron cristalizadas o bien liofilizadas. Sin embargo, el proceso de liofilización puede ser causa de desnaturalización.<sup>13</sup> En otras palabras, irónicamente no es el contacto con el solvente orgánico sino su previa deshidratación la que cambia la estructura de la enzima, lo que resulta en una disminución de la actividad catalítica. Este efecto puede ser minimizado liofilizando las enzimas en presencia de agentes que protegen su estructura, tales como azúcares y polietilenglicol,<sup>14</sup> algunas sales inorgánicas<sup>15</sup> y éteres corona.<sup>16</sup> Estos métodos pueden aumentar la actividad de las enzimas liofilizadas hasta 4 órdenes de magnitud.<sup>9</sup> Alternativamente, pueden usarse enzimas cristalizadas que son más resistentes a la desnaturalización producida en el paso de deshidratación.<sup>12,17</sup>

Otra importante causa de la disminución de la actividad puede deberse a la reducida flexibilidad estructural que poseen las enzimas en solventes orgánicos. En medios acuosos en cambio, las enzimas poseen la movilidad conformacional necesaria para que la catálisis sea óptima.<sup>18</sup> En contraste, los solventes orgánicos carecen de la habilidad que tiene el agua para formar uniones hidrógeno y además poseen menores constantes dieléctricas, lo que conduce a fuertes interacciones electrostáticas dentro de la proteína, haciendo a la enzima mucho más rígida. Es posible aumentar la actividad en varios órdenes de magnitud por

adición de pequeñas cantidades de agua a la suspensión de la enzima en solvente anhidro<sup>19</sup> o elevando la actividad de agua de alguna otra forma.<sup>20</sup>

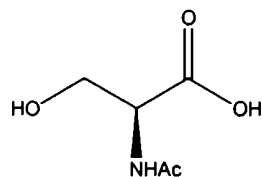
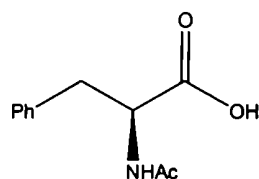
Otros pocos factores menos importantes pueden contribuir a la menor actividad enzimática observada en solventes orgánicos.<sup>9,21</sup> Nuevamente, el estudio profundo de estos inconvenientes permite aplicar estrategias para obtener enzimas más eficientes en medio orgánico, con actividades comparables a las que presentan en agua.<sup>22</sup>

### **3.b. Dependencia del solvente en la selectividad de las enzimas**

La selectividad es la característica más importante de la catálisis enzimática. Se considera como una propiedad intrínseca de cada enzima: para variar la selectividad, es necesario modificar la molécula de enzima, por ejemplo mediante técnicas de mutagénesis dirigida. Esta afirmación es válida si la enzima actúa en agua, es decir cuando el medio de reacción es fijo, pero no es cierta si el proceso enzimático se lleva a cabo en solventes orgánicos. Existen varios casos en la literatura en donde la selectividad ha cambiado notoriamente al variar el solvente.<sup>23</sup> A continuación se discutirán algunos de los ejemplos más representativos de este fenómeno.

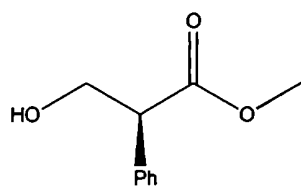
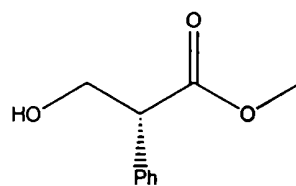
La selectividad se manifiesta en la habilidad de una enzima para discriminar entre dos sustratos distintos aunque estructuralmente similares. Esto a veces se basa en diferencias en la hidrofobicidad de ambos. Por ejemplo, la principal fuerza impulsora en la unión enzima-sustrato de muchas proteasas, tales como la  $\alpha$ -quimotripsina y subtilisina, se debe a las interacciones hidrofóbicas entre la cadena lateral del aminoácido sustrato y el sitio activo de la enzima.<sup>24</sup> En consecuencia, un sustrato hidrofóbico es más reactivo que uno hidrofílico simplemente porque esa fuerza impulsora es mayor. Sin embargo, esta situación debería cambiar notablemente cuando se usa un solvente orgánico en vez de agua, ya que en el primero, por definición, no hay interacciones hidrofóbicas. Klibanov *y col.* han encontrado en estudios realizados sobre  $\alpha$ -quimotripsina, que mientras en agua un sustrato hidrofóbico como el éster etílico de N-acetil-L-fenilalanina es 50.000 veces más reactivo que otro hidrofílico como el éster etílico de N-acetil-L-serina, en octano el sustrato derivado de fenilalanina es 3 veces menos reactivo que el de serina.<sup>25</sup>



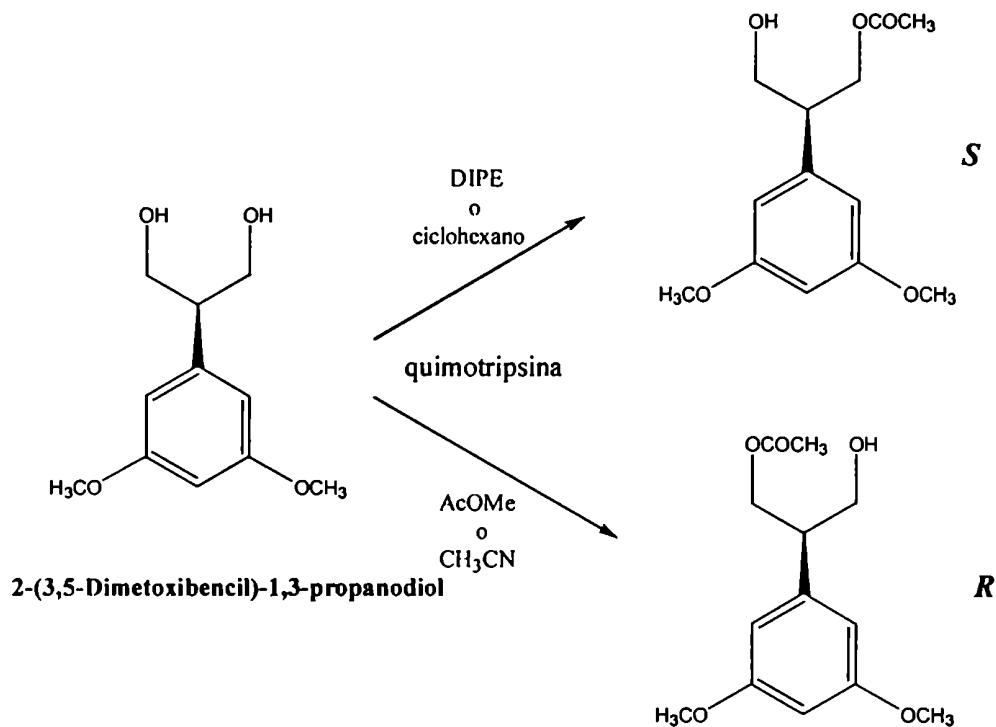
**N-acetil-L-serina****N-acetil-L-fenilalanina**

Mas aun, la reactividad de la subtilisina frente al mismo derivado de fenilalanina es 8 veces mayor en cloruro de metileno que el de serina y los resultados se invierten cuando se usa otro solvente orgánico como *t*-butilamina.<sup>26</sup> Similares dependencias de la selectividad con el solvente se han observado en otros sustratos para estas dos enzimas<sup>27</sup> y para otra peroxidasa no relacionada.<sup>28</sup>

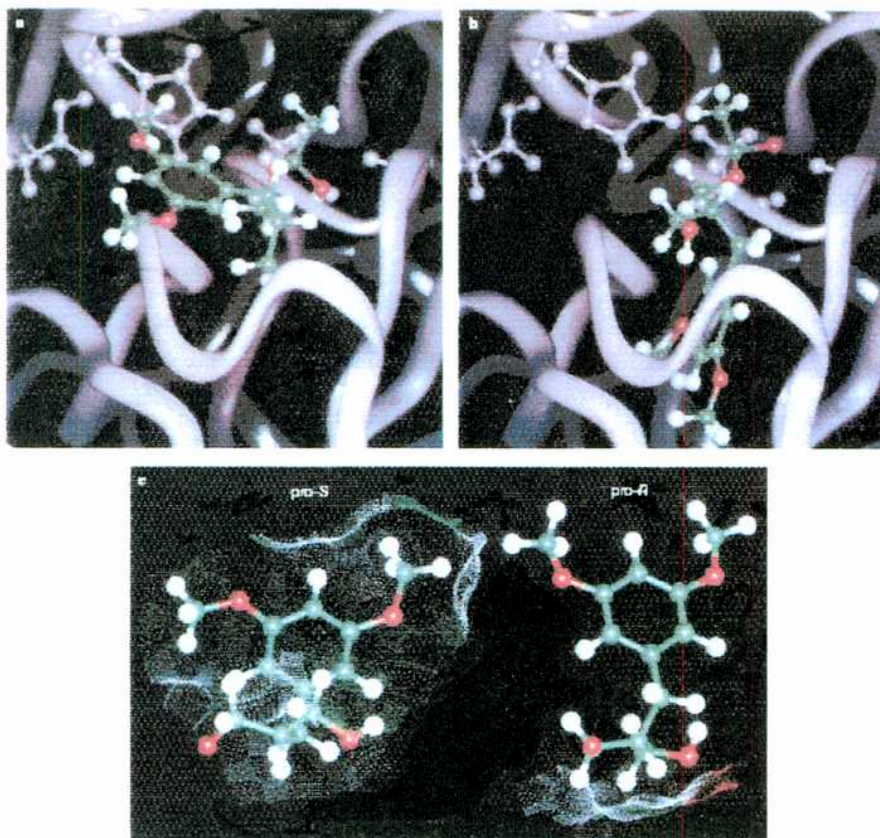
Desde el punto de vista sintético, el tipo de selectividad enzimática más importante es la estereoselectividad, particularmente la de enantiómeros y de compuestos proquirales.<sup>1,29,30</sup> Desafortunadamente, las enzimas presentan una baja estereoselectividad en las transformaciones no naturales, siendo necesario recurrir a laboriosas técnicas de “screening” que implican un excesivo consumo de tiempo.<sup>29</sup> El descubrimiento de que la enantioselectividad puede ser influida y a veces revertida por el solvente, convierte a esta metodología en una excelente alternativa al screening enzimático.<sup>23</sup> Por ejemplo, se ha encontrado que la selectividad de la  $\alpha$ -quimotripsina en la transesterificación con propanol de un compuesto de importante uso medicinal, 3-hidroxi-2-fenilpropionato de metilo, puede extenderse en un rango de 20 veces al cambiar de un solvente orgánico a otro; de hecho, mientras la enzima en algunos solventes prefiere como sustrato el enantiómero *S*, en otros es más reactiva con el *R*.<sup>31</sup>

**S****R****3-Hidroxi-2-fenilpropionato de metilo**

Asimismo, el producto preponderante en la acetilación del sustrato proquiral, 2-(3,5-dimetoxibencil)-1,3-propanodiol catalizada por quimotripsina en diisopropil éter o ciclohexano es el monoéster *S*, mientras que en acetato de metilo o acetonitrilo se forma predominantemente el enantiómero *R*.<sup>32</sup>



No sólo estos notables resultados parecen ser de alguna forma generales,<sup>23,33</sup> sino que pueden ser explicados racional y casi cuantitativamente. Por ejemplo, la variación (e inversión) en la selectividad de la quimotripsina inducida por el solvente puede ser racionalizada teniendo en cuenta la energética de la solvatación del sustrato en los estados de transición pro-*S* y pro-*R* (Figura 1.1). En el estado de transición pro-*R*, una pequeña parte de la molécula de sustrato está en contacto con el solvente, mientras que en el caso pro-*S*, debido a las restricciones estéricas impuestas por el sitio activo de la enzima, se encuentra prácticamente solvatada. Esto conduce a que los dos caminos posibles presenten una dependencia de solvente totalmente distinta, lo que determina la selectividad proquiral.<sup>32</sup>



**Figura 1.1.** Modelado de las estructuras de los estados de transición correspondientes a la acetilación enzimática de 2-(3,5-dimetoxibencil)-1,3-propanodiol con  $\gamma$ -quimotripsina<sup>32</sup>: **a, b**, modelos moleculares de los estados de transición pro-S y pro-R respectivamente y **c**, superficie accesible por el solvente. La cadena principal de la quimotripsina en las regiones cercanas al sitio activo se muestra como un diagrama de cintas (en **a** y **b**); el sustrato se representa con modelos de esferas y palillos (las esferas verdes, rojas y blancas corresponden a carbono, oxígeno e hidrógeno respectivamente). En **c**, el área punteada marca la zona accesible por el solvente. Las simulaciones de dinámica y modelado molecular se realizaron usando los programas Biosym's Insight II y Discover.<sup>32</sup> Notar que el estado de transición pro-R, a diferencia del pro-S, adopta una conformación en la cual el grupo dimetoxifenilo del sustrato está enterrada en el bolsillo de unión de la enzima.

Otros dos tipos de selectividad enzimática, regio- y quimioselectividad, pueden ser controlados por el solvente. La regioselectividad se refiere a la preferencia de la enzima por uno de varios grupos funcionales idénticos presentes en la molécula de sustrato. Ha sido demostrado en la lipasa de *Pseudomonas cepacia* que tal preferencia por uno de los dos grupos ésteres en una molécula aromática<sup>34</sup> o los grupos hidroxilos de un esteroide<sup>35</sup> es fuertemente afectada (incluso revertida) por el solvente. La quimioselectividad está

determinada por la preferencia de una enzima a favor de uno entre varios grupos funcionales distintos en la molécula de sustrato. Se ha encontrado para muchas lipasas y proteasas que el grado de preferencia para la acilación de grupos hidroxilo frente a grupos amino en un sustrato dado depende marcadamente del solvente.<sup>36</sup>

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

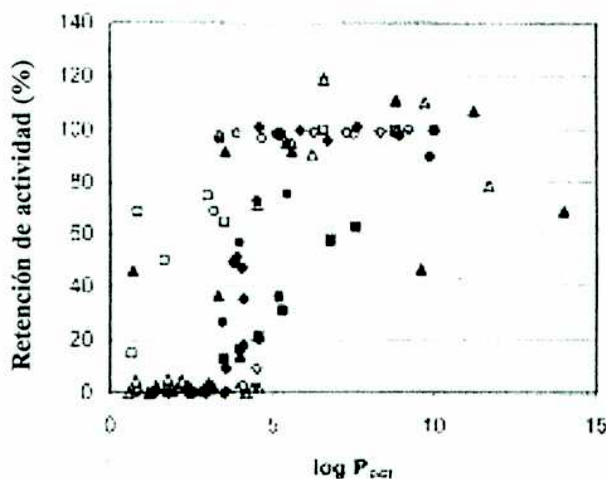
### **3.c. Biocatálisis con células enteras en solventes orgánicos**

A pesar de que la mayoría de los trabajos sobre biotransformaciones en medio orgánico se han hecho con enzimas, el uso de células enteras como biocatalizadores en sistemas bifásicos está adquiriendo gran importancia y se está convirtiendo en un prometedor campo de estudio especialmente para ciertas bioconversiones como oxidaciones y reducciones, que requieren adición y/o regeneración de cofactores, o bien fermentaciones, en donde se requieren caminos metabólicos multienzimáticos. Las ventajas de emplear un medio de reacción bifásico residen no sólo en la factibilidad de emplear sustratos de escasa solubilidad en agua, sino en que mantiene una baja concentración en la fase acuosa de compuestos tóxicos o inhibidores, permite la recuperación del producto *in situ* (lo que reduce la inhibición por producto final y favorece el rendimiento por desplazamiento del equilibrio termodinámico) y facilita las condiciones para la recuperación tanto del catalizador como del producto.<sup>37</sup>

Recientemente, el descubrimiento de cepas de bacterias tolerantes al medio orgánico<sup>38</sup> han ampliado las expectativas puestas en este campo, generando la posibilidad de comprender los mecanismos de tolerancia y toxicidad de los microorganismos en solventes orgánicos. La elección adecuada del solvente es esencial para lograr todas estas ventajas. Existe en la literatura una cantidad apreciable de trabajos que tratan este tema.<sup>37,39</sup>

Dos de los criterios más importantes para la elección del solvente son la productividad y la biocompatibilidad, además son deseables otras características tales como la estabilidad química y térmica, la baja tendencia a formar emulsiones en agua, la biodegradabilidad, la naturaleza inocua y un bajo costo en el mercado.<sup>40</sup>

A diferencia de los otros atributos deseables para un solvente, el requerimiento de biocompatibilidad es un criterio particularmente restrictivo. Se han realizado muchos intentos por asociar la toxicidad de los solventes con alguna de sus propiedades fisicoquímicas. Todos los parámetros usados para clasificar a los solventes en términos de su biocompatibilidad están relacionados con la polaridad del solvente: parámetro de solubilidad de Hildebrandt ( $\delta$ ), constante dieléctrica ( $\epsilon$ ), momento dipolar ( $\mu$ ), polarizabilidad ( $\alpha$ ) y logaritmo del coeficiente de partición en octanol /agua ( $\log P$ ). Estrictamente hablando,  $\log P$  se refiere a hidrofobicidad que no es exactamente lo mismo que polaridad, sin embargo, de todas estas magnitudes es la que mejor correlaciona con la bioactividad según los estudios realizados por Laane y col.<sup>37</sup> Este parámetro se usa actualmente en medicina y farmacología como parte de los estudios de actividad de las drogas<sup>40</sup> y puede ser determinado experimentalmente o calculado mediante la aproximación de Rekker.<sup>41</sup> Al representar gráficamente la retención de la actividad *versus*  $\log P$  se obtienen curvas sigmoideas (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Relación empírica entre la actividad retenida por las células expuestas a un solvente orgánico y el valor de  $\log P$  del solvente.

Al examinar el gráfico, se puede observar que los solventes cuyo  $\log P$  es inferior al punto de inflexión resultan demasiado tóxicos, mientras que los de mayor  $\log P$  pueden considerarse biocompatibles. El punto de inflexión depende del microorganismo en estudio y se cree que se debe a las diferentes características de sus membranas celulares. Muchos

investigadores han encontrado correlaciones entre la biocompatibilidad frente a solventes orgánicos y el log P que difieren en el rango de transición entre tóxico y no tóxico.<sup>42,43</sup> Por ejemplo, Laane y col.<sup>37</sup> concluyeron que los solventes con log P menores que 2 son demasiado polares como para retener la actividad catalítica, y que la actividad biológica es variable en solventes con log P entre 2-4, siendo mayor en medios no polares donde este parámetro es mayor que 4.

Los mecanismos que intervienen en la toxicidad causada por los solventes orgánicos no se conocen en detalle. Lo que se sabe hasta el momento, es que el solvente se incorpora entre los lípidos de membrana causando la interrupción de las funciones esenciales de la membrana, la inactivación o desnaturalización de las enzimas unidas a la membrana, el deterioro de los mecanismos de transporte y, en altas concentraciones, la lisis de las células.<sup>44</sup> Este mecanismo de toxicidad celular por solvente orgánico difiere notablemente del que afecta a las enzimas, el cual está principalmente asociado con el hecho de que el solvente interfiere con la capa de agua esencial que rodea la enzima.

#### **4. ENZIMAS AISLADAS *VERSUS* CÉLULAS ENTERAS**

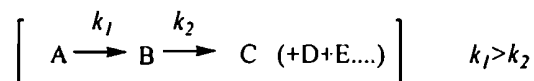
Como se mencionó anteriormente, la enzima a emplearse como biocatalizador puede encontrarse en forma aislada o purificada o bien dentro células enteras. Para decidir que sistema conviene utilizar es necesario considerar las ventajas y desventajas que presentan.

Una de las principales desventajas de usar células enteras como catalizador reside en la necesidad de manejar técnicas comunes de microbiología. Salvo los casos en donde se requieren levaduras comunes, como levadura de panadería o de cerveza, si se posee poca o ninguna experiencia en la manipulación y crecimiento de microorganismos, al menos al principio, es preciso buscar la ayuda de un microbiólogo.

Otra desventaja importante se debe a que las reacciones con células enteras requieren el uso de grandes volúmenes de agua. En consecuencia, si el producto final es soluble en agua, puede resultar complicado extraerlo de la solución; asimismo, se debe tener cuidado en el lavado de las células para que los productos lipofílicos no queden absorbidos en ellas.

Como los microorganismos son capaces de catalizar un gran número de biotransformaciones, puede suceder que la transformación requerida ( $A \rightarrow B$ ) se vea opacada por

un segundo camino metabólico ( $A \rightarrow C$ ) o bien que el producto formado pueda convertirse rápidamente en otro compuesto:



Las desventajas antes mencionadas, se contrarrestan con ciertas ventajas que ofrece esta técnica: el uso de microorganismos es una opción mucho más económica y todas las entidades necesarias para la transformación (enzimas, cofactores, iones metálicos, etc.) están presentes dentro de la célula.

Si consideramos el uso de enzimas aisladas, un factor importante es el costo de las mismas. Más de 3000 enzimas han sido identificadas y aproximadamente un 15% de ellas son comerciales. El costo de las enzimas disponibles en el mercado varía considerablemente y depende en gran medida si la enzima se usa con fines comerciales. Por ejemplo las lipasas son relativamente económicas porque se emplean para efectuar procesos de transesterificación en la industria alimenticia. Otro factor limitante del costo se relaciona con la dificultad que implica el aislamiento de la enzima de su fuente natural.

La ventaja más importante de usar enzimas puras está dada porque la enzima elegida cataliza una única reacción, de esta forma raramente se observan reacciones secundarias. Además las reacciones pueden llevarse a cabo con pequeñas cantidades de agua/solvente, puede haber un control sencillo de las condiciones de pH y temperatura y los cosolventes orgánicos a menudo son bien tolerados. El “work up” de una reacción catalizada por enzimas rara vez resulta problemático, pero de serlo puede mejorarse adhiriendo la enzima a un soporte sólido. Si bien las células enteras también pueden ser inmovilizadas o atrapadas, las técnicas involucradas no son simples y requieren conocimientos prácticos.

Además de las diferencias mencionadas existen otras características importantes para tener en cuenta a la hora de elegir el biocatalizador. En la Tabla 1.3 se resumen algunas de estas características.

**Tabla 1.3.** Ventajas y desventajas ligadas al uso de enzimas aisladas y células enteras.

sistema	ventajas	desventajas
Células enteras	Más económico, los cofactores están presentes.	<p>Requiere equipos de fermentación y experiencia en microbiología.</p> <p>El “work up” puede resultar más tedioso ya que es necesario, por ejemplo, remover las células usadas y extraer los productos de un gran volumen de agua.</p> <p>Pueden interferir reacciones secundarias.</p> <p>El sustrato, el producto y/o el cosolvente orgánico pueden afectar el transporte del material hacia adentro a hacia fuera de la célula.</p>
Enzimas aisladas	<p>Equipamiento simple.</p> <p>Proceso más sencillo de monitorear y controlar.</p> <p>“Work up” simple.</p> <p>Específico para reacciones selectivas.</p> <p>Mayor tolerancia de cosolventes.</p>	<p>Más costoso.</p> <p>Puede ser necesario agregar cofactores; para procesos que no sean en pequeña escala, los cofactores deben ser regenerados.</p>

#### 4.a. Enzimas aisladas como catalizadores: LIPASAS

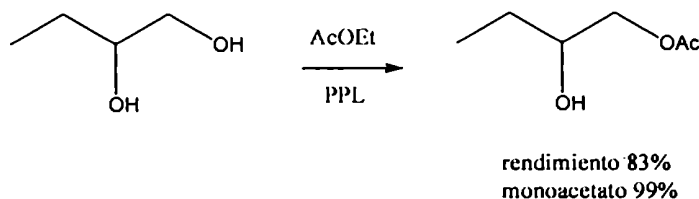
Los biocatalizadores más usados en síntesis orgánica son las enzimas hidrolíticas. Dentro de esta clasificación se encuentran las enzimas capaces de catalizar la hidrólisis y la formación de uniones éster y amida, como las amidasas, las proteasas, las esterasas y las lipasas. De estos cuatro grupos de enzimas, las lipasas merecen especial atención debido a su extendido uso en biotransformaciones aplicadas a síntesis orgánica. La bibliografía existente referida a este tema muestra que la tercera parte de todas estas reacciones se lleva a cabo utilizando lipasas.<sup>45</sup>

Estas enzimas son consideradas uno de los biocatalizadores más versátiles y esto se debe a las interesantes propiedades que presentan:

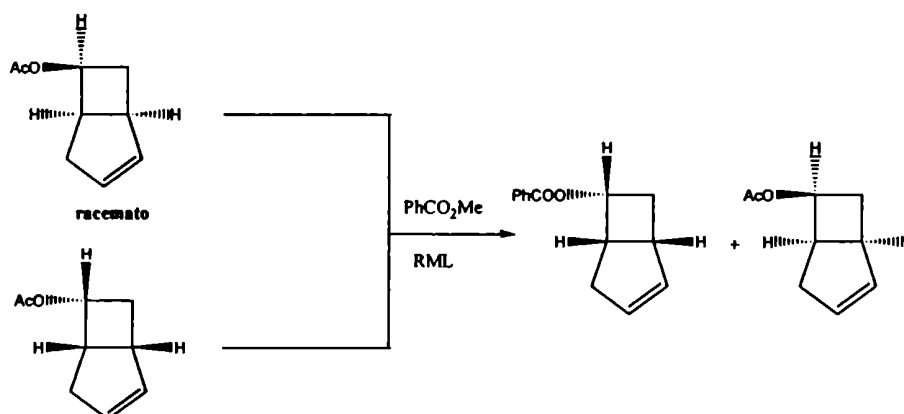


1. Debido a que la enzima posee un amplio dominio para la unión de los grupos acilo y a las características estructurales de estos grupos, las lipasas son capaces de acomodar una gran variedad de sustratos sintéticos sin dejar de manifestar comportamiento regio- y estereoselectivo.
2. Las lipasas actúan en una interface agua/lípido que posee una elevada energía interfacial. Para resistir los efectos desnaturalizantes de esta interfase, las lipasas han desarrollado estructuras estables poco comunes que les permiten mantener su actividad aún bajo el efecto de solventes orgánicos.
3. La energía libre para la hidrólisis de los lípidos es cercana a los 0 KJ mol<sup>-1</sup>,<sup>46</sup> en consecuencia el equilibrio termodinámico dependerá en gran medida de la concentración de los reactivos y la hidrólisis de ésteres catalizada por lipasas en agua puede revertirse en un medio no acuoso hacia la síntesis de ésteres o bien hacia reacciones de interesterificación.
4. La acil lipasa formada en el primer paso de la reacción enzimática puede ser considerada formalmente como un agente acilante. La amplia especificidad de sustrato que presenta esta clase de enzimas permite la acilación de otros nucleófilos distintos a los grupos hidroxilo, tales como hidroperóxidos, amina y tioles.

Como resultado de esta única combinación de propiedades, los químicos han empleado las lipasas para una gran cantidad de reacciones.<sup>47</sup> En una reciente monografía en la cual se resumen las publicaciones sobre biotransformaciones en síntesis orgánica, casi la tercera parte de todas las reacciones se lleva a cabo con lipasas.<sup>1,48</sup> Cuando se emplean como sustratos compuestos polifuncionales, isómeros, racematos o proestereogénicos, las lipasas exhiben un comportamiento regio y/o estereoselectivo. Así, la lipasa pancreática porcina (PPL), diseñada naturalmente para adherirse a una gota de aceite en presencia de sales biliares e hidrolizar triglicéridos, presenta un comportamiento regioselectivo en la acetilación del 1,2-butanodiol.<sup>49</sup>



Un ejemplo de comportamiento estereoselectivo por parte de las lipasas lo constituye la siguiente transesterificación enantioselectiva catalizada por lipasa de *Rhizomucor miehei*.<sup>50</sup>



La única gran desventaja de la selectividad de las lipasas es su especificidad restringida en cuanto al grupo acilo del éster: la mayoría de las lipasas aceptan como sustratos ésteres alifáticos de cadena lineal mucho mejor que voluminosos grupos aromáticos.

#### 4.a.1. Fuentes

Las lipasas son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza y se han encontrado en organismos de distintos orígenes como microbios<sup>51</sup>, plantas<sup>52</sup> y animales<sup>52,53</sup>. Se obtienen por extracción de tejidos tanto animales como vegetales o bien de cultivos de microorganismos<sup>52</sup>. Las lipasas comerciales derivan principalmente de microorganismos y gracias a los avances en técnicas de ingeniería genética, se ha manufacturado un creciente número de lipasas a partir de recombinantes de bacterias y levaduras.

La aplicación de lipasas en síntesis orgánica se encuentra limitada por el uso de cocktails de enzimas, que presentan otras variedades enzimáticas además de las lipasas. Cualquier resultado obtenido con una lipasa comercial debe ser examinado en vista de potenciales efectos enmascarantes de otras enzimas no relacionadas o bien de aditivos contenidos en la muestra. Afortunadamente, pueden conseguirse en el mercado muchas lipasas puras obtenidas mediante tecnología recombinante. En la Tabla 1.4 se resumen las principales lipasas empleadas en síntesis orgánica disponibles comercialmente.

**Tabla 1.4. Ejemplos de lipasas comerciales usadas en síntesis orgánica**

Origen	Lipasa	código	Nombre comercial
Mamíferos	Lipasa pancreática porcina	PPL	
Hongos	Lipasa de <i>Candida rugosa</i> <sup>a</sup>	CRL	Lipase OF Amano lipase AY
	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> B	CAL B	SP-435 (Novozym) Chirazyme L-2, C3 (Roche)
	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> A	CAL A	Chirazyme L-2 (Roche)
	Lipasa de <i>Humicola lanuginosa</i>	HLL	Amano lipase R-10
	Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> <sup>b</sup>	RML	Amano MAP-10 Lipozyme <sup>R</sup>
Bacterias	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> <sup>c</sup>	PCL	Amano, P.PS, PS30, LP80, SAM-I
	Lipasa de <i>Chromobacterium viscosum</i>	CVL	Amano lipase LP
	Lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp.	PSL	Amano AK, K-10 SAM-II

<sup>a</sup> Antes llamada *Candida cylindracea* (CCL)

<sup>b</sup> Comúnmente denominada lipasa de *Mucor miehei* (MML)

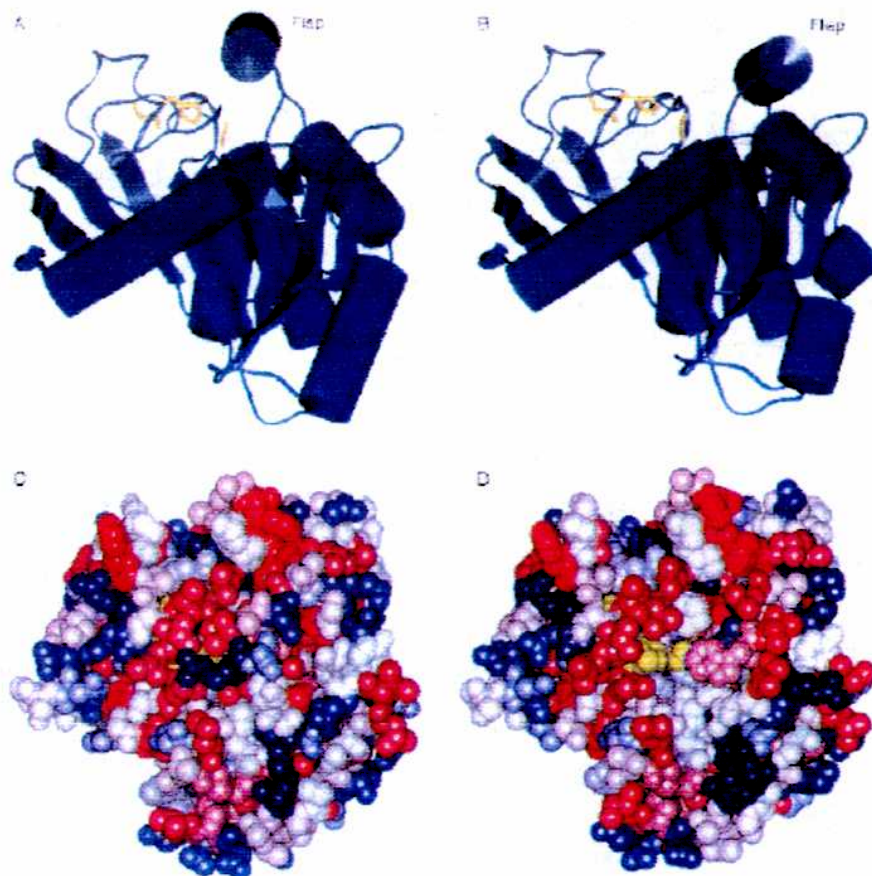
<sup>c</sup> Al principio se la denominó lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (PFL). En 1995 fue reclasificada como lipasa de *Burkholderia cepacia* (BCL)

#### 4.a.2. Estructura y mecanismo

Las lipasas fueron definidas en términos cinéticos en el año 1958 por Sarda y Desnuelle, quienes explicaron detalladamente el fenómeno de activación interfacial de estas enzimas.<sup>54</sup> Su modelo es consistente con el hecho de que la actividad de las lipasas es baja al emplear sustratos monoméricos, en cambio con sustratos que tienen la posibilidad de formar agregados, como emulsiones o soluciones micelares, la actividad se ve fuertemente incrementada. Como la mayoría de las esterasas no presentan esta propiedad pues actúan sobre ésteres carboxílicos solubles en agua, por un largo intervalo de tiempo las lipasas fueron consideradas dentro de una categoría especial de esterasas las cuales presentan una gran eficiencia para hidrolizar moléculas que forman agregados en agua.

Estas observaciones pudieron explicarse recién en el año 1990, cuando la estructura de dos lipasas fue determinada por cristalografía de rayos X. Estas estructuras revelaron un mecanismo único, distinto al de cualquier enzima conocida: Estos modelos

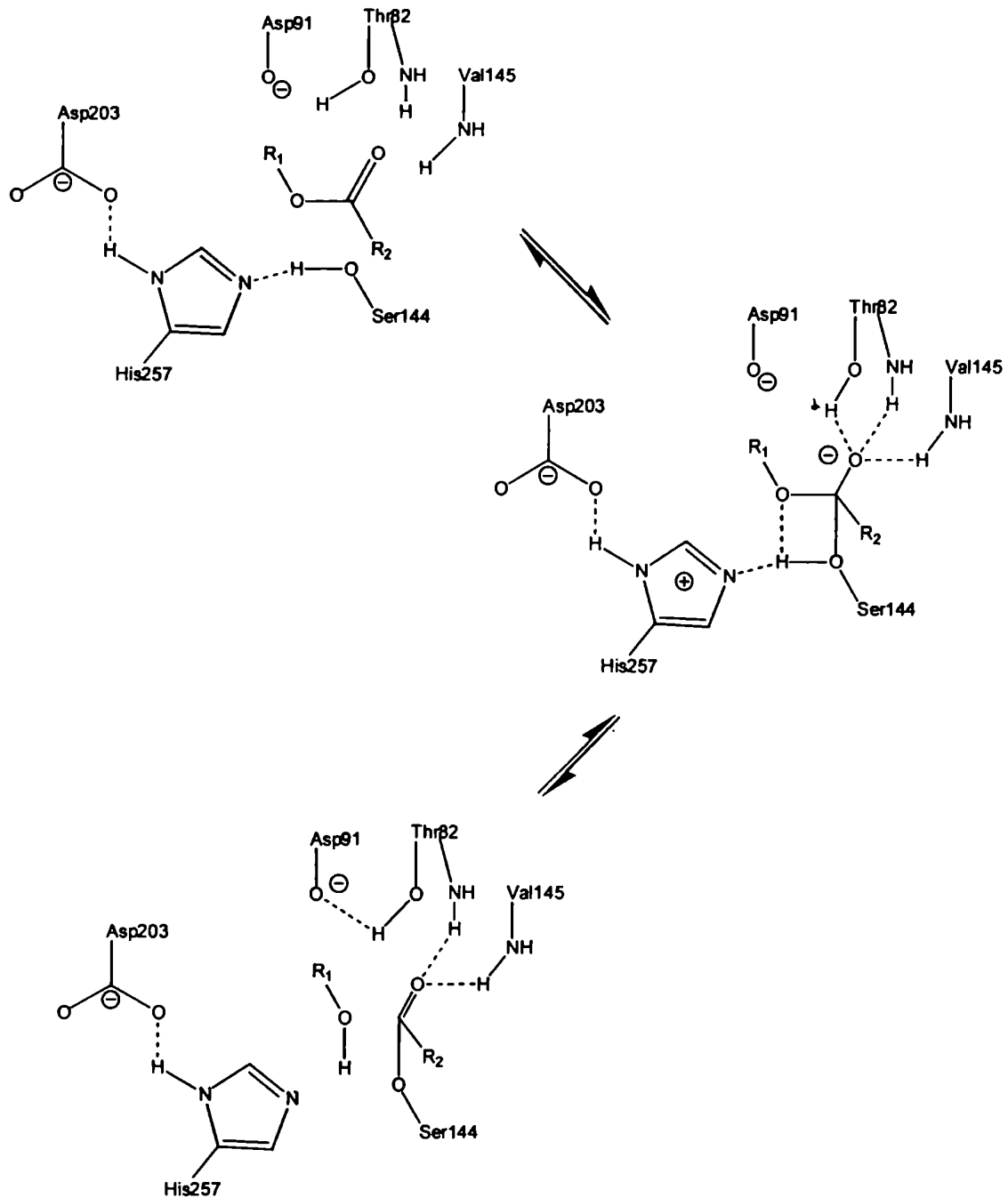
tridimensionales sugieren que la activación interfacial puede deberse a la presencia de un segmento peptídico ambifílico que actúa como una tapa protegiendo al sitio activo de la enzima en solución.<sup>55</sup> Asimismo, las estructuras de rayos X realizadas a lipasas cocrystalizadas con análogos de sustratos sugieren que al ocurrir el contacto con la interfase lípido/agua, esta especie de tapa sufre un reordenamiento conformacional dejando al sitio activo accesible para el sustrato (Figura 1.3).<sup>56</sup>



**Figura 1.3.** Estructura de la lipasa de *Mucor miehei* en sus formas cerrada (A,C) y abierta (B,D). A y B (arriba): la tríada catalítica (en amarillo) y los elementos de la estructura secundaria que muestran el pliegue  $\alpha/\beta$  (regiones con lámina  $\beta$  y regiones de  $\alpha$ -hélice) común a todas las lipasas. C y D (abajo): modelo coloreado de acuerdo a su polaridad decreciente (azul oscuro-celeste-blanco-rosa-rojo). A medida que se abre la tapa, la tríada catalítica (amarillo) se vuelve accesible (D), y la región de unión con la interfase aumenta significativamente su polaridad.

El Proyecto Europeo Lipasa, llevado a cabo entre 1990 y 1994 por 24 laboratorios en 8 naciones, permitió obtener una gran cantidad de información estructural y datos bioquímicos de lipasas extremadamente puras. Estas determinaciones demostraron que no todas las lipasas presentan el fenómeno de activación interfacial.<sup>57</sup> Las lipasas de *Pseudomonas glumae*<sup>58</sup> y *Candida antarctica* (tipo B),<sup>59</sup> cuyas estructuras terciarias son conocidas, ambas poseen una tapa anfipática que cubre el sitio activo pero no muestran activación interfacial. Dentro de las lipasas pancreáticas de estructura terciaria conocida, la lipasa pancreática humana contiene una tapa con 23 residuos de aminoácido y presenta activación interfacial, en la lipasa de *Myocastor coypus* en cambio no existe evidencia de este tipo de activación a pesar de que posee una tapa de similar tamaño. La lipasa de *Cavia porcellus*, una enzima que no ha mostrado activación interfacial, se caracteriza por poseer una pequeña tapa compuesta por apenas 5 residuos de aminoácidos.<sup>60</sup> Sin embargo, ni el fenómeno de activación interfacial, ni la presencia de un dominio tipo tapa constituyen criterios apropiados para clasificar una esterasa dentro de una subfamilia de lipasas. Para clasificar una esterasa como una lipasa, el criterio más conveniente sigue siendo la evidencia experimental, es decir su capacidad de hidrolizar o no acilgliceroles de cadena larga.<sup>61</sup>

Las 12 lipasas cuyas estructuras han sido dilucidadas hasta el momento son miembros de la familia de proteínas  $\alpha/\beta$  las cuales poseen una arquitectura similar compuesta por una secuencia específica de  $\alpha$  hélices y laminas  $\beta$ .<sup>55,58,59,62</sup> Estas enzimas hidrolizan las uniones éster mediante un mecanismo que involucra una “tríada catalítica”, compuesta por un residuo de serina que actúa como nucleófilo y se encuentra activado por un enlace de hidrógeno con un residuo de histidina que a su vez se une a otro residuo de aspartato o glutamato. Este residuo con capacidad nucleofílica ataca a la molécula portadora de acilo formando un intermediario O-acilado el cual se denomina acil-enzima (Esquema 1.1).



### COMPLEJO ACIL ENZIMA

**Esquema 1.1.** Mecanismo de catálisis de las lipasas basado en la “tríada catalítica” de serina (nucleófilo), histidina y aspartato o glutamato (conectados a través de enlaces de hidrógeno). El intermediario tetraédrico se encuentra estabilizado por un hueco oxoaniónico. La numeración de los aminoácidos presentada en este ejemplo corresponde a la lipasa de *Rhizopus oryzae*.

Este mecanismo es esencialmente el mismo que el de las proteasas de serina, es por ello que desde el punto de vista mecanístico se define a las lipasas como serina-hidrolasas.

Como se indicó antes, la única característica estructural que tienen en común la mayoría de las lipasas es la presencia de una especie de tapa compuesta por una secuencia ambifílica de péptidos dispuestos en  $\alpha$  hélice, la cual se encuentra en su conformación cerrada (en ausencia de interfase o solvente orgánico) no permitiendo el acceso del sustrato a la tríada catalítica. Luego de que esta tapa se abre, se expone una gran superficie hidrofóbica a la cual puede unirse el sustrato hidrofóbico. Este mecanismo es consistente con las estructuras obtenidas por rayos X de complejos de lipasas con inhibidores hidrofóbicos tales como alquil fosfonatos, cicloalquil fosfonatos y alquil sulfonatos. En estas estructuras se observó que la tapa se encuentra abierta, lo que sugiere que los fosfonatos son buenos mínimos del estado de transición para la acilación y los sulfonatos para la deacilación de ésteres de triacil glicerol.<sup>63</sup>

Resumiendo, todas las lipasas estudiadas exhiben un cierto grado de similitud tanto estructural como funcional, sin tener en cuenta el organismo a partir del cual fueron aisladas y aun si las homologías en la secuencia de aminoácidos son bajas. Las características de las lipasas se resumen en la Tabla 1.5.

A pesar de todas estas similitudes, sutiles variaciones en la arquitectura del sitio de unión con el sustrato, pueden llegar a tener grandes implicancias en las propiedades catalíticas, en la temperatura y en la estabilidad de una lipasa en un determinado solvente. Todas estas diferencias resultan de vital importancia al momento de seleccionar una lipasa individual para un determinada aplicación.

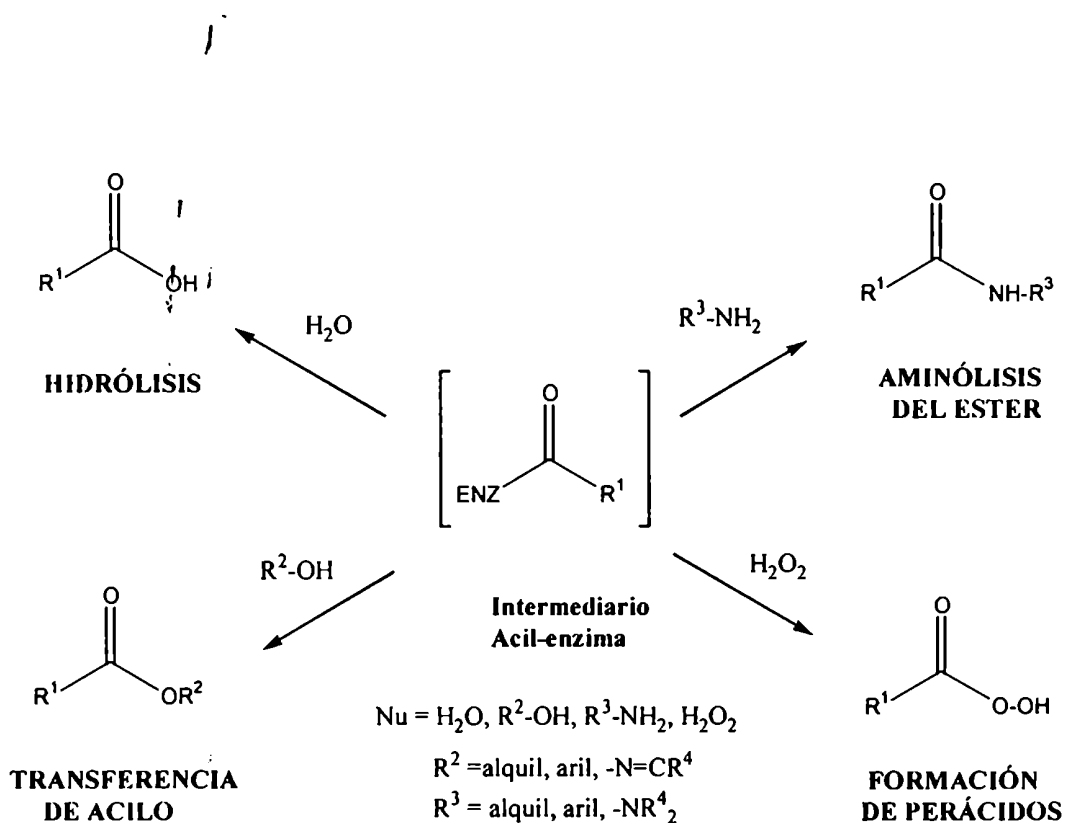
**Tabla 1.5.** Características importantes de las lipasas.

Característica	Detalles	Observaciones
Mecanismo basado en la "tríada catalítica" compuesta por el nucleófilo serina, histidina y aspartato/ glutamato.	Encontrado en más de 30 lipasas, incluyendo las que se aislaron de microorganismos psicrófilos y termófilos: la única excepción es el reemplazo de aspartato por glutamato. Al sustituir la serina por cisteína mediante mutagénesis dirigida se produce una considerable reducción en la actividad.	Hidrolasas relacionadas muestran una mayor variabilidad en el mecanismo catalítico. En el caso de las proteasas, el enlace amida puede ser hidrolizado a través del ataque nucleofílico de un hidroxilo (serina, treonina) o de grupos tioles (cisteína) o bien a través del ataque electrofílico de un grupo carboxilo (aspartato/glutamato) o un ion metálico ( $Zn^{2+}$ ).
Secuencia común de serina en el residuo activo	La secuencia común para más de 30 lipasas clonadas es un "codo nucleofílico" al final de una lámina $\sigma$ compuesto por Gly/Ala-X-Ser-X-Gly-	Otras hidrolasas muestran mayor variabilidad.
Lipasas que presentan una estructura tipo tapa en su sitio activo.	Una tapa compuesta por un "loop" de péptido ambifílico cubre el sitio activo de la enzima cuando ésta se encuentra en una conformación inactiva.	No se observa estructura tipo tapa ni en esterasas ni en proteasas. Algunas lipasas tampoco presentan tapa o bien la que poseen es muy pequeña.
Todas las lipasas ( $\alpha/\beta$ lámina $\beta$ y regiones de $\alpha$ -hélice)	La estructura se compone de un "core" de cadenas $\beta$ predominantemente paralelas rodeadas por $\alpha$ hélices. El residuo activo de serina se encuentra en una vuelta tipo horquilla entre la cadena $\beta$ y la $\alpha$ hélice.	Muchas otras hidrolasas (esterasas, acetilcolina esterasas, proteasas de serina, carboxipeptidasa, deshidrogenasas) y aún haloperoxidasas muestran una estructura similar.



### 4.a.3. Lipasas como agentes acilantes

El mecanismo de catálisis de las lipasas (Esquema 1) conduce a la acilación del residuo de serina en la tríada catalítica para formar la acil-enzima. En el siguiente paso la acil-enzima es atacada por un nucleófilo para dar el derivado acilado y la enzima regenerada. Dado que las lipasas son enzimas hidrolíticas el nucleófilo que interviene habitualmente es el agua, sin embargo cuando la concentración de agua es baja otros nucleófilos pueden competir por el intermediario, produciendo distintas transformaciones de importante utilidad sintética, como por ejemplo:



## A. Acilación de alcoholes

### A.1. Esterificación selectiva de grupos hidroxilos

Existen en la literatura gran cantidad de ejemplos acerca de la selectividad que presentan las lipasas en la acilación de compuestos que contienen varios grupos hidroxilos. En la Figura 1.4 se indica la posición preferida para la acilación regioselectiva de cloramfenicol y sobrerol con PPL.<sup>1</sup>

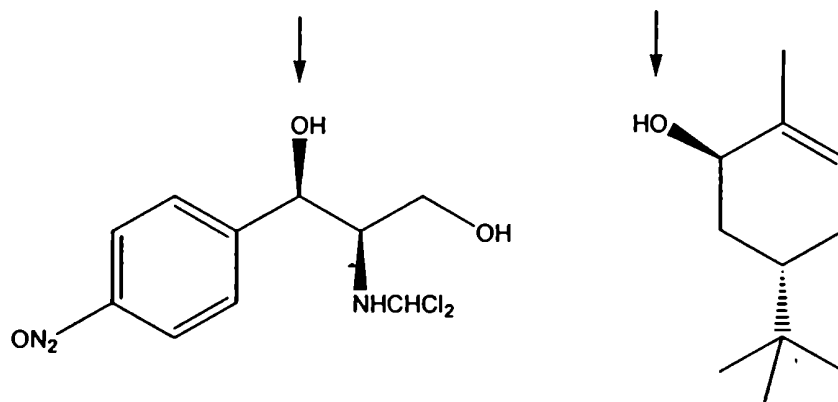
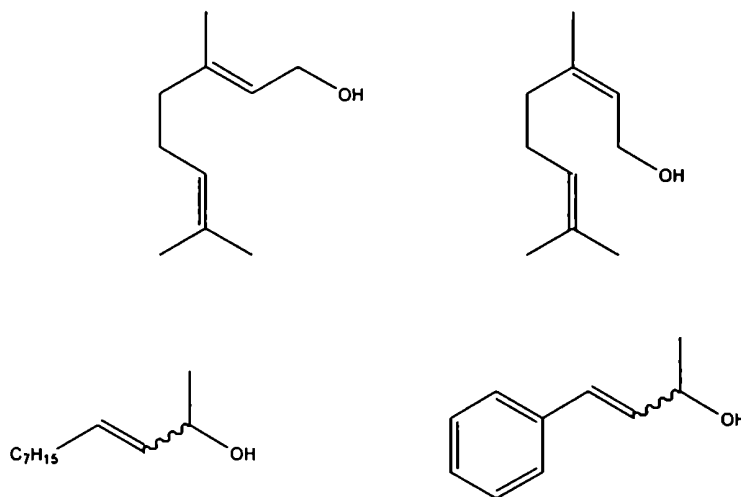


Figura 1.4. Acilación regioselectiva de cloramfenicol y sobrerol.

### A.2. Resolución de estereoisómeros

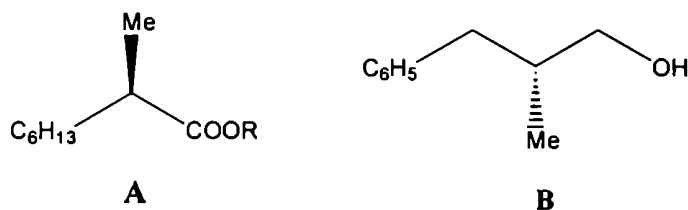
Mediante la acilación catalizada por lipasas (PPL, PSL) se han logrado resolver mezclas de estereoisómeros *E/Z* de alcoholes alílicos, en donde el isómero preferido por la enzima fue siempre el *E*. Como ejemplo, se puede citar la separación de una mezcla de (*E*)-geraniol y (*Z*)-nerol mediante la acilación con butirato de trifluoroetilo y anhídrido hexanoico en éter etílico en presencia de PPL.<sup>64</sup> El isómero *E* fue acilado a mayor velocidad, obteniéndose una relación de productos acilados 4:1 en favor del isómero *E* (Figura 1.5). Los isómeros *E* de alcoholes alílicos secundarios tales como 3-undecen-2-ol o 4-fenil-3-buten-2-ol reaccionaron 20 a 40 veces más rápido que los isómeros *Z* bajo las mismas condiciones de reacción. El enantiómero *S* del isómero *E* no participó en la reacción debido a la alta enantioselectividad de esta transesterificación enzimática ( $E > 100$ ).



**Figura 1.5.** Alcoholes empleados para las transesterificaciones enzimáticas.

### A.3. Resolución de alcoholes y ácidos racémicos

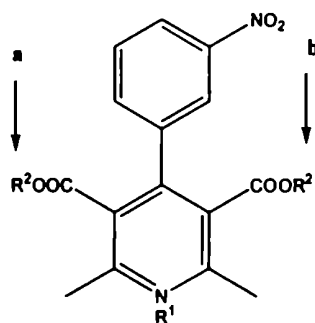
Muchas publicaciones de catálisis con lipasas se refieren a este tipo de reacciones. En la Figura 1.6 se indican dos ejemplos en los cuales los enantiómeros **A** y **B** se obtuvieron con buenos rendimientos y alta enantioselectividad.



**Figura 1.6.** Sustancias enantiopuras **A** (ROH = 1-eicosanol, 1-dodecanol; CRL, 42% de conversión,  $ee = 97\%^{65}$ ) y **B** (PFL, 45% de conversión,  $ee = 97\%^{66}$ ) obtenidos por resolución de compuestos racémicos.

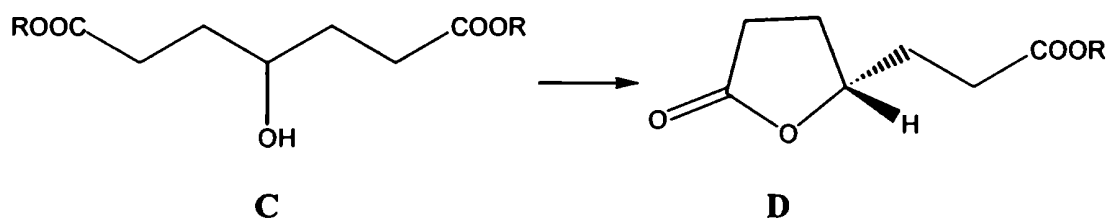
### A.4. Asimetrización de alcoholes y ácidos proestereogénicos

Las lipasas han mostrado ser muy buenos catalizadores para ambas reacciones. Un ejemplo de asimetrización (formación de compuestos enantioméricamente puros) se muestra en la Figura 1.7.



**Figura 1.7.** Asimetrización del diéster proestereogénico 1,4-dihidro-4-(3-nitrofenil)-2,6-dimetilpiridindicarboxilato ( $R^2 = \text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ ): a)  $R^1 = \text{CH}_2\text{OCH}_3$ , lipasa AK, 63% de monoéster (S),  $ee = 95\%$ ; b)  $R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$ , Candida OF-360, 24% de monoéster (R),  $ee = 73\%$ .<sup>67</sup>

La asimetrización de diésteres con lipasas también ha sido empleada para la síntesis de lactonas quirales (Esquema 1.2).<sup>68</sup>



**Esquema 1.2.** Asimetrización del diéster C para la formación de la  $\gamma$ -lactona D (R = Et, PPL, hexano: 100% de conversión,  $ee > 98\%$ ; R = Et, PFL, hexano: 100% de conversión,  $ee = 32\%$ ; R = Bn, PPL, hexano: 100% de conversión,  $ee > 95\%$ ).

## B. Acilación de otros nucleófilos

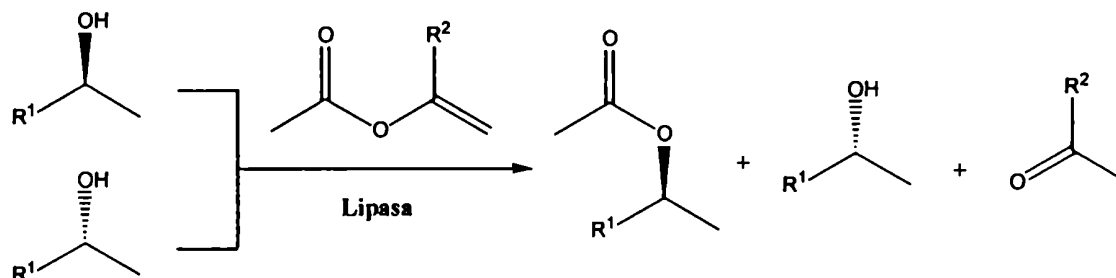
Como se señaló anteriormente las lipasas no sólo son capaces de formar uniones éster sino también de acilar un amplio rango de nucleófilos tales como peróxidos y aminas. En la Tabla 1.6 se resumen algunos ejemplos.

**Tabla 1.6.** Aceptores de acilo accesibles para la catálisis con lipasas

Donor de acilo	Aceptor de acilo	Producto	Condiciones	Rend. (%)	ee (%)	Ref.
<i>amina como aceptor</i>						
	<i>n</i> -butilamina fenilamina alilamina		CRL hexano o CCl <sub>4</sub>	52-62	80-95	69
	2-aminobutano racémico		CAL	45	90	70
	1,10-diaminohexano 1,12-diaminododecano		CRL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	35-40		71
<i>amoníaco como aceptor</i>						
	NH <sub>3</sub>		CAL 0,5-2,5 M NH <sub>3</sub> <i>i</i> BuOH, 40°C	85-95		72
	NH <sub>3</sub>		CAL <i>i</i> BuOH	39	91	73
<i>hidracina como aceptor</i>						
	hidrazidas sustituidas		PCL, R=CHO a) THF o <i>i</i> Pr <sub>2</sub> O, RT, 3d b) 60°C, 4d	69-80		72
<i>derivados de aminoácidos como aceptores</i>						
			PPL Tolueno, 45°C, 3d	83		69
<i>peróxido de hidrógeno y perácidos como aceptores</i>						
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		CAL ác. heptanoico, 4°C	74		
acetato de vinilo			LPL ciclohexano	62	100	75

### C. Características del agente acilante

Como la acilación catalizada por lipasas involucra un proceso de equilibrio, es necesario tomar medidas para forzar la reacción hacia la dirección deseada. Para ello, el agua liberada durante la esterificación puede ser eliminada con vacío o bien absorbida con tamices moleculares. Otra opción consiste en agregar un exceso de donador de acilo, por ejemplo, usando acetato de etilo como agente acilante y como solvente. Alternativamente, pueden emplearse con éxito buenos grupos salientes como acetato de trifluoro- o tricloroetilo, anhídridos cíclicos o bien ésteres de oximas. También puede llevarse la reacción de transesterificación a total irreversibilidad empleando agentes que pueden inducir la formación de producto exclusivamente en la dirección deseada. Este método, simultáneamente introducido por Jeso y col.<sup>76</sup> y Wong y col.<sup>77</sup> involucra el uso de enolésteres (usualmente ésteres de vinilo o de isopropenilo). El alcohol primario tautomeriza para dar un compuesto carbonílico, que no puede participar en la reacción inversa (Esquema 1.3).

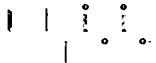
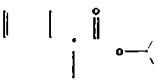



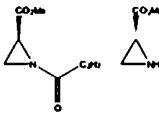

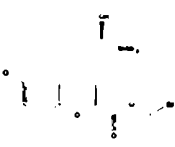
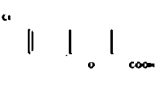
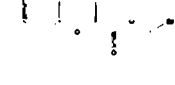
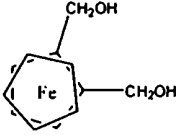
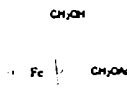



Esquema 1.3. Acilación irreversible con enolésteres

### D. Acilación con otros grupos acilo

Además de los agentes acilantes naturales (ácidos grasos lineales), las lipasas son capaces de generar el residuo de acil serina con otros agentes acilantes más voluminosos, catalizando así reacciones de acilación con otros donores de acilo menos comunes. A pesar de que los agentes acilantes voluminosos reaccionan a velocidades más bajas, diferentes lipasas muestran diferente enantiopreferencia frente a ellos dependiendo de la configuración de sus respectivos sitios de unión con el sustrato (Tabla 1.7).

**Tabla 1.7.** Acilaciones catalizadas por lipasas con donores de acilo poco comunes.

Donor de acilo	Aceptor de acilo	Producto	Condiciones	Rend. (%)	ee (%)	Ref.
<i>carbonatos</i>						
	<i>n</i> -propanol		HLL	55	90	78
<i>oxazolidinas</i>						
	metanol		a: PSL b: PCL	52 61	75 90	79
<i>amidas</i>						
	agua		CRL	60	90	80
<i>donores de acilo en estructuras con heteroátomos poco comunes</i>						
	$\text{Me}_3\text{SiCH}_2\text{OH}$		PPL, buffer	40	83	81
	$\text{Me}_3\text{SiCH}_2\text{OH}$		CRL, 19 hs	52	96 (ácido)	82
acetato de vinilo			PCL	80	100	83
acetato de vinilo				47	100	84

#### 4.b. Catálisis con células enteras: OXIDORREDUCTASAS

Las oxidorreductasas, junto con las hidrolasas son los sistemas enzimáticos más usados en biotransformaciones. Estos catalizadores de procesos redox pueden dividirse en tres grupos: 1) las deshidrogenasas, que catalizan la oxidación de alcoholes y la reducción de grupos carbonílicos y dobles enlaces; 2) las oxigenasas, que emplean oxígeno como cosustrato y catalizan la funcionalización de enlaces C-H y dobles enlaces no activados (reacciones de

hidroxilación y epoxidación); y 3) las oxidasas, que ocupan un papel menos importante en biotransformaciones.

La mayoría de las oxidorreductasas conocidas emplean nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) o su correspondiente 2'-fosfato (NADP) como cofactores para donar o recibir hidrógeno (Figura 1.8).

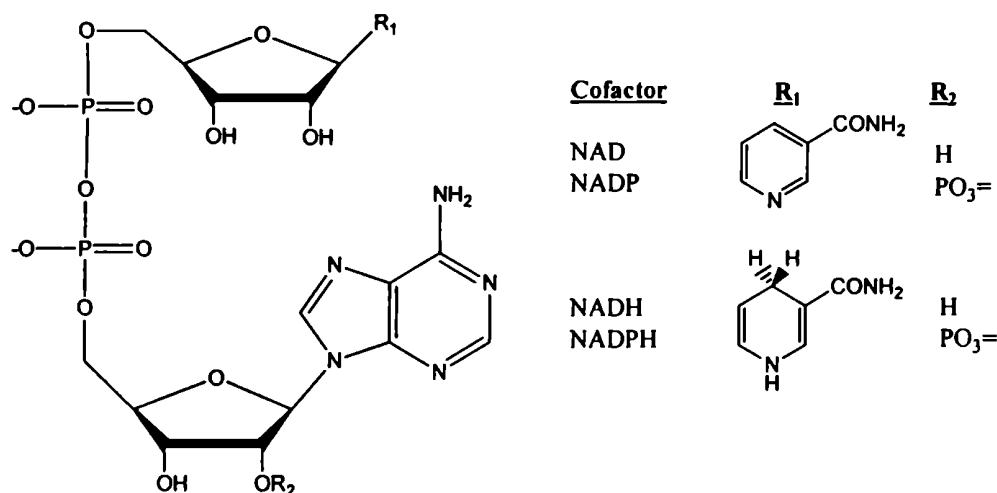
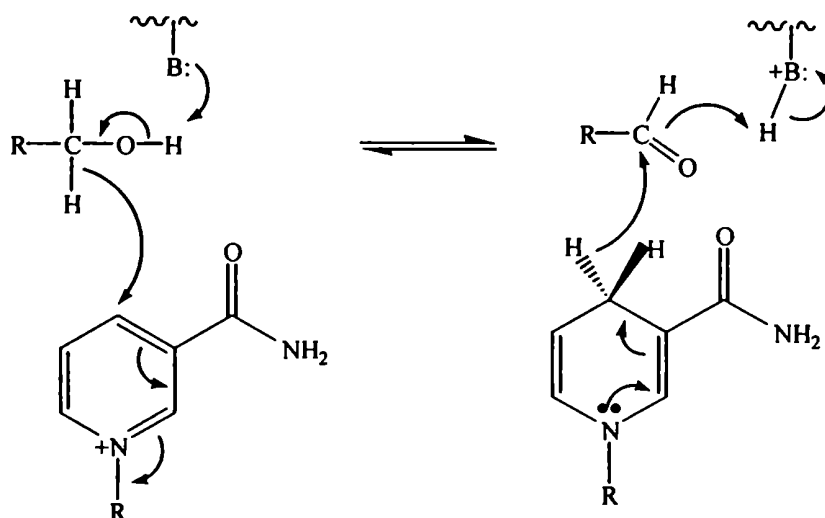


Figura 1.8. Estructuras correspondientes a los cofactores NAD(H) y NADP(H)

Si bien la parte de la molécula que contiene el nucleótido es muy importante para la unión con el sitio activo de la enzima, la química de estas coenzimas se encuentra en el anillo nicotínico que es donde se produce la transferencia de hidruro (Esquema 1.4).



Esquema 1.4. Mecanismo de catálisis de alcohol deshidrogenasas dependientes de piridin nucleótidos.



Estos cofactores son difíciles de obtener y si bien son comerciales, su costo es elevado, en consecuencia, el empleo de los mismos en relación estequiométrica no es factible excepto cuando la reacción se hace en pequeña escala. Por este motivo, al utilizar estas enzimas en forma aislada es necesario que el cofactor sea regenerado en una forma eficiente para mantener la actividad catalítica. Muchas veces este procedimiento puede resultar complicado y resulta más conveniente recurrir al uso de células enteras en donde todas las entidades necesarias para la biotransformación se encuentran dentro del compartimiento celular.

En general, las reducciones son más sencillas de llevar a cabo que las oxidaciones y además son más útiles desde el punto de vista sintético por su capacidad para generar centros quirales. Debido a que un solo microorganismo contiene varias oxidorreductasas diferentes, es capaz de mediar la reducción de compuestos carbonílicos para producir alcoholes quirales con una excelente pureza óptica. Por este motivo, esta metodología se ha convertido en una herramienta invaluable para la introducción de centros quirales claves en la síntesis total de moléculas de importante actividad biológica.<sup>85</sup>

#### 4.b.1. Estereoselectividad de las oxidorreductasas

La estereoselectividad que presentan las oxidorreductasas se debe a su capacidad para discriminar entre las caras enantiotópicas, *Si* y *Re*, de un sustrato proquiral como puede ser un compuesto carbonílico (Figura 1.9).

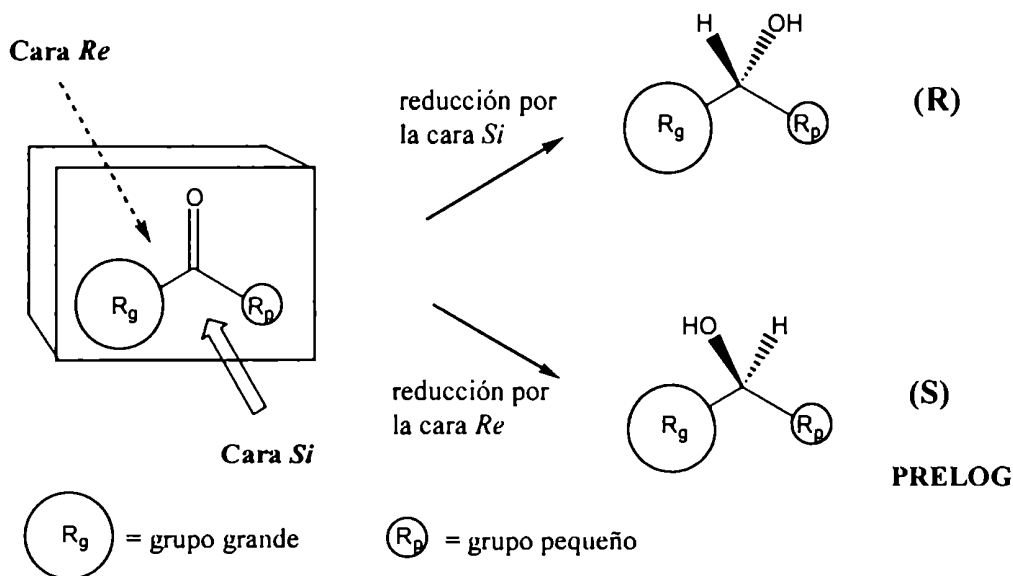


Figura 1.9

Si la enzima se compleja con la cara *Re* se obtendrá uno sólo de los enantiómeros, mientras que al complejarse con la cara *Si* el producto será el alcohol de configuración opuesta. Si la enzima no es capaz de discriminar entre ambas caras, el alcohol resultante se obtendrá como racemato. Sólo se logrará una alta enantioselectividad cuando la enzima sea capaz de discriminar entre las dos caras enantiotópicas. La enantioselectividad se expresa generalmente mediante el exceso enantiomérico (ee), que se puede definir mediante la siguiente ecuación:

$$ee = ([R]-[S])/([R]+[S])$$

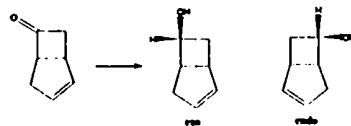
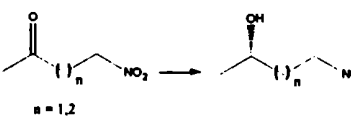
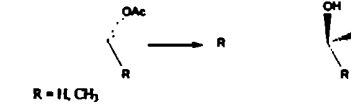
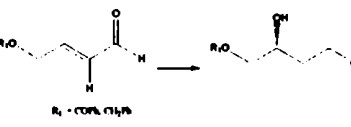
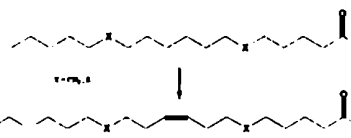
donde [R] y [S] se refieren a la concentración de los enantiómeros.

En la práctica, la mayoría de las deshidrogenasas catalizan la transferencia de hidruro por la cara *Re* del sustrato carbonílico. Este comportamiento se conoce como regla de Prelog<sup>86</sup>, y fue inicialmente postulada para la reducción de decalonas por *Curvularia lunata*. Esta regla ha sido ampliamente usada para predecir la estereoquímica de alcoholes obtenidos mediante reducciones con microorganismos.

Una de las mayores complicaciones de usar células intactas para la reducción de compuestos carbonílicos es que el proceso a menudo es parcialmente enantioselectivo. Esto puede ser interpretado de dos formas: 1) el aldehído o la cetona puede ser reducida por una sola oxidorreductasa la cual interactúa con ambas caras del compuesto carbonílico para formar dos estados de transición diastereoméricos, uno de los cuales se encuentra más favorecido que el otro; 2) Dos o más oxidorreductasas presentes en la célula pueden generar alcoholes de configuración opuesta a diferentes velocidades. Es posible distinguir entre estas dos posibilidades estudiando la reducción a diferentes concentraciones de sustrato. En el caso 1), la enantioselectividad es independiente de la concentración de sustrato, mientras que en el caso 2) no lo es.<sup>87</sup> En general, se ha observado que la mayoría de las reducciones parcialmente enantioselectivas catalizadas por células enteras emanan de la acción combinada de diferentes enzimas de quiralidad opuesta.<sup>88</sup>

Hasta el momento se han desarrollado varias estrategias para mejorar la baja enantioselectividad en las reducciones catalizadas por microorganismos. Los métodos para controlar la estereoquímica en la reducción sin variar el microorganismo incluyen: modificación del sustrato,<sup>89</sup> adición de una sal inorgánica,<sup>90</sup> adición de un inhibidor para una enzima específica,<sup>91</sup> tratamiento térmico,<sup>92</sup> uso de solventes orgánicos,<sup>93</sup> etc.



Reacción	Ejemplo	Referencia
Resolución cinética de cetonas cíclicas racémicas		104
Reducción de nitrocompuestos		105
Hidrólisis de ésteres		106
Adición de agua al doble enlace de un aldehído $\alpha,\beta$ insaturado		107
Deshidrogenación de ácidos grasos no naturales		108

Además de su eficiencia catalítica, este microorganismo presenta una serie de ventajas adicionales que lo convierten en un excelente reactivo para propósitos sintéticos:

- Es económico y de amplia disponibilidad ya que es producido a gran escala para la industria panadera.
- fácil de manejar: es de crecimiento sencillo con lo cual no es necesario recurrir a la ayuda de microbiólogos.
- inocuo para el hombre: es un microorganismo no patógeno que posee categoría GRAS (Generally Regarded as Safe).
- acepta una amplia variedad de sustratos.

Algunas de las desventajas que presentan las reducciones mediadas por levaduras de panadería son la baja productividad, los bajos rendimientos, la gran sensibilidad a las elevadas concentraciones de sustrato y/o producto y ocasionalmente la baja pureza enantiomérica de los productos.

Una de las estrategias empleadas para mejorar la estereoselectividad en reacciones mediadas por levaduras consiste en el uso de solventes orgánicos. Los primeros trabajos publicados sobre este tema mostraron cambios relativamente moderados en la selectividad al emplear solventes tales como benceno o éter de petróleo.<sup>93,109</sup> Como se discutió

previamente, el uso de solventes orgánicos es conveniente ya que incrementa la solubilidad de los sustratos y evita reacciones secundarias producidas por el agua. Además, la selectividad de las enzimas de la levadura puede cambiar dependiendo del solvente.<sup>110</sup> *Rotthaus y col*<sup>111</sup> demostraron que las reducciones de cetoésteres catalizadas por levadura de panadería pueden llevarse a cabo convenientemente en solventes orgánicos, en especial con tolueno o hexano, y que la estereoquímica de los productos puede ser controlada de acuerdo al solvente usado.

### Referencias bibliográficas:

- 
1. a) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry* 4th edn (Springer, Berlin, 2000). b) Santaniello, E., Ferraboschi, P., Grisenti, P. y Manzocchi, A., *Chem.Rev.*, **1992**, 92,1071.
  - c) Wong, C.H y Whitesides, G.M., *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon, Trowbridge, **1994**. d) Theil, F., *Chem.Rev.*, **1995**, 95, 2203.
  2. Jones, J.B. y Holland H., *Biocatalysis*, Synopsis Scientific System, Leeds, **1997**.
  3. Trenblay, M.R., Dickerson, T.J. y Janda, K.D., *Adv.synth.catal.*, **2001**, 343:6-7, 577.
  4. a) Zaks, A. y Klivanov, A.M., *Science*, **1984**, 224, 1249. b)Kirchner, G., Scollar, M.P. y Klivanov, A.M., *J.Am.Chem.Soc.*, **1985**, 107, 7072. c) Zaks, A. y Klivanov, A.M., *Prod.Natl.Acad.Sci.USA*, **1985**, 82, 3192. d) Klivanov, A.M., *Chemtech*, **1986**, 16, 354.
  5. a) Kuntz, I.D. y Kauzmann, W., *Adv.Protein.Chem.*, **1974**, 28, 239. b) Rupley, J.A. y Careri, G., *Adv.Protein.Chem.*, **1991**, 41, 37.
  6. Griebenow,K. y Klivanov, A.M..*J.Am.Chem.Soc.*, **1996**, 47, 11695.
  - 7.a) Fitzpatrick, P.A., Steinmetz, A.C.U., Ringe, D. y Klivanov, A.M., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **1993**, 90, 8653. b)Yennawar, N.H., Yennawar, H.P. y Farber, G.K., *Biochemistry*, **1994**, 33, 7326.c) Schmitke, J.L., Stern, L.J. y Klivanov, A.M., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **1997**, 94, 8653. d) Zhu, G. y col., *Biocim.Biophys.Acta*, **1998**, 1429, 142. e) Gao, X.G. y col., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **1999**, 96,10062.
  8. Zaks, A. y Klivanov, A.M., *Prod.Natl.Acad.Sci.USA*, **1985**, 82, 3192.
  9. Klivanov, A. M., *Trends Biotechnol.*, **1997**, 15, 97.
  10. Zaks, A. y Klivanov, A.M., *J.Biol.Chem.*, **1988**, 82, 3192.
  11. Zaks, A. y Klivanov, A. M., *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 3194.
  12. Xu, K. y Klivanov, A. M , *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 9815.
  13. a) Griebenow, K. y Klivanov, A. M., *Biotechnol.Bioeng.*, **1997**, 53, 351.b) Griebenow, K. y Klivanov, A. M., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **1995**, 92, 10969.
  14. a) Dabulis, K. y Klivanov, A. M., *Biotechnol. Bioeng.*, **1993**, 41, 566. b) Dai, L. y Klivanov, A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 9475.
  15. Khmelnitsky, Y. L., Welch, S. H., Clark, D. S. y Dordick, J. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 2647.

- 
16. Broos, J., Sakodinskaya, I. K., Engbersen, J. F. J., Verboom, W. y Reinhoudt, D. N., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 255.
  17. a) Schmitke, J. L., Wescott, C. R. y Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 3360. b) Margolin, A. L., *Trends Biotechnol.*, **1996**, 14, 223.
  18. a) Kuntz, I. D. y Kauzmann, W., *Adv. Protein Chem.*, **1974**, 28, 239. b) Rupley, J. A. y Careri, G., *Adv. Protein Chem.*, **1991**, 41, 37.
  19. a) Zaks, A. y Klibanov, A. M., *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 8017. b) Xu, Z.-F. y col., *Biotechnol. Bioeng.*, **1994**, 43, 515.
  20. Bell, G., Halling, P. J., Moore, B. D., Partridge, J. y Rees, D. G., *Trends Biotechnol.*, **1995**, 13, 468.
  21. Schmitke, J. L., Wescott, C. R. y Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 3360.
  22. a) Paradkar, V. M. y Dordick, J. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 5009. b) Zaks, A. y Klibanov, A. M., *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 8017.
  23. a) Wescott, C. R. y Klibanov, A. M., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1994**, 1206, 1. b) Carrea, G., Ottolina, G. y Riva, S., *Trends Biotechnol.*, **1995**, 13, 63.
  24. Fersht, A. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. Freeman, New York, **1999**.
  25. Zaks, A. y Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 2767.
  26. Wescott, C. R. y Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 1629.
  27. Gaertner, H. y Puigserver, A., *Eur. J. Biochem.*, **1989**, 181, 207.
  28. Ryu, K. y Dordick, J. S., *Biochemistry*, **1992**, 31, 2588.
  29. Roberts, S. M., Turner, N. J., Willetts, A. J. y Turner, M. K. *Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Microorganisms* (Cambridge Univ. Press, New York, 1995).
  30. Zaks, A. y Dodds, D. R., *Drug Disc. Today*, **1997**, 2, 513.
  31. Wescott, C. R., Noritomi, H. y Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 10365.
  32. Ke, T., Wescott, C. R. y Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 3366.
  33. a) Wu, S.-H., Chu, F.-Y. y Wang, K.-T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1991**, 1, 339. b) Ueji, S. y col., *Biotechnol. Lett.*, **1992**, 14, 163. c) Tawaki, S. y Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 1882.
  34. Rubio, E., Fernandes-Mayorales, A. y Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 695.
  35. Baldessari, A., Bruttomesso, A.C. y Gros, E.G., *Helvetica Chimica Acta.*, **1996**, 79, 999.
  36. a) Tawaki, S. y Klibanov, A. M., *Biocatalysis*, **1993**, 8, 3. b) Ebert, C., Gardossi, L., Linda, P., Vesnaver, R. y Bosco, M., *Tetrahedron*, **1996**, 52, 4867.
  37. Laane, C., Boeren, S., Vos, K. y Veeger, C., *Biotechnol. Bioeng.*, **1987**, 30, 81.
  38. a) Inoue, A. y Horikoshi, K., *Nature* **1989**, 338, 264. b) Lee, J. Y., Choi, Y. B. y Kim, H. S., *Biotechnol. Prog.*, **1993**, 9, 46. c) Wubbolts, M. G., Reuvekamp, P., and Witholt, B., *Enzyme Microb. Technol.*, **1994**, 16, 608.
  39. a) Carrea, G., *Trends Biotechnol.*, **1984**, 2, 102. <sup>39</sup> Brink, L. E. S. y Tramper, J., *Biotechnol. Bioeng.*, **1985**, 27, 1258. b) Bruce, L. J. y Daugulis, A. J., *Biotechnol. Prog.*, **1991**, 7, 116. c) Cabral, J. M. S.

- Extractive removal of product by biocatalysis. In: Extractive Bioconversions.* Mattiasson, O. and Holst, O., Eds., Marcel Dekker Inc., New York, 1991. d) Van Sonsbeek, H. M., Beefink, H. H. y Tramper, J., *Enzyme Microb. Technol.*, 1993, 15, 722. e) Salter, G. J. y Kell, D. B. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 1995, 15, 139. f) Brink, L. E. S., Tramper, J., Luyben, A. M. y Van't Riet, K., *Enzyme Microb. Technol.*, 1988, 10, 736.
40. Bruce, L. J. y Daugulis, A. J., *Biotechnol. Prog.*, 1991, 7, 116.
41. Rekker, R. F. y Mannhold, R. *Calculation of Drug Lipophilicity. The Hydrophobic Fragmental Constant Approach.* Rekker, R. F. y Mannhold, R., Eds., VCH, Mannheim, 1992.
42. Inoue, A. y Horikoshi, K., *Nature* 1989, 338, 264.
43. a) Vermue, M., Sikkema, J., Verheul, A., Bakker, R. y Tramper, J., *Biotechnol. Bioeng.* 1993, 42, 747. b) Bassetti, L. y Tramper, J., *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, 16, 642.
- c) Cruden, D. L., Wolfram, J. H., Rogers, R. D. y Gibson, D. T., *Appl. Environ. Microb.*, 1992, 58, 2723.
44. a) Vermue, M., Sikkema, J., Verheul, A., Bakker, R. y Tramper, J., *Biotechnol. Bioeng.* 1993, 42, 747. b) Inoue, A. y Horikoshi, K., *J. Ferm. Bioeng.*, 1991, 3, 194. c) Sikkema, J., Weber, F. J., Heipieper, H. J. y de Bont, J. A., *Biocatalysis*, 1994, 10, 113.
45. a) Sheldon, R.A, *Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds*, Marcel Dekker, New York, 1993. b) Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Heidelberg, 1995. c) Drauz, K. y Waldmann, H., *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH, Weinheim, 1995. d) Gutman, A. L. y Shapira, M., *Synthetic Applications of Enzymatic Reactions in Organic Solvents, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, Vol.52 (Ed.:A. Fiechter), Springer, Heidelberg, 1995. e) R.Kazlauskas y Bornscheuer, U.T., *Biotechnology*, Vol.8a (Eds.: H.J.Rehm, G.Reed, A.Pühler, P.J.W.Stadler, D.R. Kelly), VCH, Weinheim, 1998, pag. 37-191. f) Koskinen, A.M.P. y Klibanov, A.M., *Enzymatic Reactions in Organic Media*, Blackie, London, 1996. g) Saha, B.C. y Demirjian, D.C. editores, *Applied Biocatalysis in Specialty Chemicals and Pharmaceuticals*, ACS Symposium series, 776, 2000.
46. a) Kaufmann, H.P. y Keller, M.C., *Fette Seifen*, 1937, 44, 105-107. b) Kaufmann, H.P. y Keller, M.C., *Fette Seifen*, 1937, 44, 42-47.
47. a) Whitesides, G.M. y Wong, C.H., *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, 1985, 24, 617. b) Theil, F., *Chem.Rev.*, 1995, 95, 2203. c) Dordick, J. S., *Biotechnol. Prog.*, 1992, 8, 259. d) Gupta, M. N., *Eur. J. Biochem.*, 1992, 203, 25. e) Santaniello, E., Ferraboschi, P. y Grisenti, P., *Enzyme Microb. Technol.*, 1993, 15, 367. g) Mori, K., *Synlett*, 1995, 1097. h) Wong, C. H. y Fang, J. M., *Synlett*, 1994, 393. i) Margolin, A. L., *Enzyme Microb. Technol.*, 1993, 15, 266. j) Froessl, C., Lorenz, M. y Boland, W., *Synthesis*, 1991, 1049.
48. Faber, K., *Pure Appl. Chem.*, 1997, 69, 1613.
49. Schar, H. P., Busquets, X. F., Ghisalba, O. y Tombo, G. M. R., *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27, 5707.
50. Mac Farlane, E. L. A., Roberts, S. N. y Turner, N. J., *J. Chem. Soc. Chem.Comm.*, 1990, 569.
51. a) Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M. y Misset, O., *FEMS Microbiol. Rev.*, 1994, 15, 29. b) Gilbert, E. J., *Enzyme Microb. Technol.*, 1993, 15, 634. c) Wohlfahrt, S. y Jaeger, K. E., *BioEngineering*, 1993, 9, 39.

- 
52. Wooley, P. y Petersen, S. B., *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application*, Cambridge University Press, Cambridge, 1994.
53. Carriere, F., Bezzine, S. y Verger, R., *J. Mol. Catal. B*, 1997, 3 (special issue devoted to "Microbial Lipases in the Biocatalysis").
54. Sarda, L. y Desnuelle, P., *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, 30, 513.
55. a) Winkler, F.K., D'Arcy, A. y Hunziker, W., *Nature*, 1990, 343, 771. b) Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L. y Menge, U., *Nature*, 1990, 343, 767.
56. Brzozowski, A.M., Derewenda, U., Derewenda, Z.S., Dodson, G.G., Lawson, D.M., Turkenburg, J.P. Bjorkling, F., Høge-Jensen, B., Patkar, S.A. y Thim, L., *Nature*, 1991, 351, 491.
57. Nieuwenhuis, B., *The CEC Bridge Lipase Project*. Eds.: L. Alberghina, R.D. Schmid, R. Verger, VCH, Weinheim, 1990.
58. Noble, M. E. M., Cleasby, A., Johnson, L. N., Frenken, L. G. J. y Egmond, M. R., *FEBS Lett.*, 1993, 331, 123.
59. J. Uppenberg, M.T. Patkar, S. Hansen, A. Jones, *Structure*, 1994, 2, 293.
60. Hjorth, A., Carriere, Cudrey, F. C., Woldike, H., Boel, E., Lawson, D. M., Ferrato, F., Cambillau, C., Dodson, G. G., Thim, L. y Verger, R., *Biochemistry*, 1993, 32, 4702.
61. Verger, R., *Trends Biotechnol.*, 1997, 15, 32.
62. a) Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B. y Cygler, M., *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 12843. b) Schrag, J. D. y Cygler, M., *J. Mol. Biol.*, 1993, 230, 575. c) Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Dodson, G. G., Yamaguchi, S., Haas, M. J. y Derewenda, Z. S., *Nat. Struct. Biol.*, 1994, 1, 36. d) Martinez, C., de Geuss, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G. y Cambilleau, C., *Nature*, 1992, 356, 615. e) Schrag, J. D., Li, Y., Cygler, M., Lang, D., Burgdorf, T., Hecht, H. J., Schmid, R. D., Strickland, L. C., Larson, S. B., Day, J. y Mc Pherson, A., *Structure*, 1997, 5, 187. f) Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S., Harel, M., Remington, S. J. y Silman, I., *Protein Eng.*, 1992, 5, 197.
63. a) Derewenda, U. y Derewenda, Z. S., *Biochem. Cell. Biol.*, 1991, 69, 842. b) Derewenda, Z. S. y Sharp, A. M., *TIBS*, 1993, 18, 20.
64. Morgan, B., Oehlschlager, A. C. y Stokes, T. M., *J. Org. Chem.*, 1992, 57, 3231.
65. Edlund, H., Berglund, P., Jensen, M., Hedenstroem, E. y Hoegberg, H.-E., *Acta Chim. Scand.*, 1996, 50, 666.
66. Margolin, A. L., *Tetrahedron Lett.*, 1990, 31, 6797.
67. Salazar, L. y Sih, C. J., *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, 6, 2917.
68. a) Enzelberger, M. M., Bornscheuer, U. T., Gattfield, I. y Schmid, R. D., *J. Biotechnol.*, 1997, 56, 129. b) Gutman, A. L. y Bravdo, T., *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 4263.
69. Puertas, S., Brieva, R., Rebolledo, F. y Gotor, V., *Tetrahedron*, 1993, 49, 4007.
70. Brieva, R., Rebolledo, F. y Gotor, V., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1990, 1386.



- 
71. Gutman, A. L., Meyer, E., Yue, X. y Abell, C., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 3943.
  72. de Zoete, M. C., van Rantwijk, F. y Sheldon, R. A. (Delft University of Technology), WO-A 9 507 359 A1, **1995** [Chem. Abstr. 1995, 122, 313055].
  73. de Zoete, M. C., Kock-van Dalen, A. C., van Rantwijk, F. y Sheldon, R. A., *Biocatalysis*, **1994**, 10, 307.
  74. de Zoete, M. C., van Rantwijk, F., Maat, L. y Sheldon, R. A., *Recl. Trav.Chim. Pays-Bas*, **1993**, 112, 462.
  75. Baba, N., Mimura, M., Hiratake, J., Uchida, K. y Oda, J., *Agric. Biol.Chem.*, **1988**, 52, 2685.
  76. Castaing-Degueil, M., de Jeso, B., Drouillard, S. y Maillard, B., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 953.
  77. Wang, Y. F., Lalonde, J. J., Momongan, M., Bergbreiter, D. E. y Wong, C. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 7200.
  78. Guibe-Jampel, E. y Bassir, M., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 421.
  79. Crich, J. Z., Brieva, R., Marquart, P., Gu, R. L., Flemming, S. y Sih, C. J., *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 3252.
  80. Bucciarelli, M., Forni, A., Moretti, I., Prati, F. y Torre, G., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, 4, 903.
  81. Chong, J. M. y Mar, K. M., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 5683.
  82. Kurita, S., Ueji, S., Yamada, T., Kuwata, S. y Miyazawa, T., *Biotechnol.Lett.*, **1992**, 14, 941.
  83. Nicolosi, G., Morrone, R., Patti, A. y Piatelli, M., *Tetrahedron:Asymmetry*, **1992**, 3, 753.
  84. Nakamura, K., Ishihara, K., Ohno, A., Uemura, M., Nishimura, H. y Hayashi, Y., *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 3603.
  85. Csuk, R. y Glanzer, B.I., *Chem.Rev.*, **1991**, 91,49.
  86. Prelog, V. *Pure Appl.Chem.*, **1968**, 9,119.
  87. Chen, C.S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G. y Sih, C.J., *J.Am.Chem.Soc.*, **1982**, 104, 7294.
  88. Sih, C.J. y Chen, C.S., *Angew. Chem.Int.Ed.Engl.*, **1984**, 23, 570.
  89. a) Zhou, B., Gopalan, A.S., VanMiddlesworth, F., Shich, W.R. y Sih, C.J., *J.Am.Chem.Soc.*, **1983**, 105, 5925. b) Nakamura, K., Ushio, K., Oka, S. y Ohno, A. *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 3979.
  90. Nakamura, K., Kawai, Y., Oka, S. y Ohno, A. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 2245.
  91. a) Nakamura, K., Kawai, Y., Miyai, T. y Ohno, A. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 3631. b) Nakamura, K., Kawai, Y., Nakajima, N. y Ohno, A. *J.Org.Chem.*, **1991**, 56, 4778.
  92. a) Nakamura, K., Kawai, Y. y Ohno, A. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 2927. c) Kawai, Y., Kondo, S., Tsujimoto, M., Nakamura, K., y Ohno, A. *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, **1994**, 67, 2244.
  93. a) Nakamura, K., Inoue, K., Ushio, K., Oka, S. y Ohno, A. *J.Org.Chem.*, **1988**, 53, 2589. b) Nakamura, K., Miyai, T., Inoue, K., Kawasaki, S., Oka, S. y Ohno, A. *Biocatalysis.*, **1990**, 3, 17. c) Nakamura, K., Kondo, S., Kawai, Y. y Ohno, A. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 7075. d) Nakamura, K., Kondo, S., Kawai, Y. y Ohno, A. *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, **1993**, 66, 2738.
  94. a) Neubauer, O. y Fromherz, K.Z., *Physiol.Chem.*, **1910**, 70, 326. b) Neuberg, C. Y Hirsch, J., *Biochem. Z.*, **1921**, 115, 282.
  95. Simon, H., Bader, J., Gunther, H., Neumann, S. y Thanos, J., *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, **1985**, 24, 539.
  96. a) Csuk, R. Y Glanzer, B. *Chem.Rev.* **1991**, 91, 49. b) Servi, S. *Sintesis*, **1990**, 1. c) D'Arrigo, P., Pedrocchi-Fantoni, G. y Servi, *Adv.Appl.Microbiol.*, **1997**, 44, 81.

- 
97. Heidlas, J., Engel, K.H. y Tressl, R., *Eur.J.Biochem.*, **1988**, 172, 633.
98. a) Levene, P.A. y Walti, A. *Organic Synthesis Coll. II*, **1943**, 545. b) Manzocchi, A., Fiecchi, A. y Santaniello, E. *J.Org.Chem.*, **1988**, 53, 4405.
99. Crumbie, R.L., Deol, B.S., Nemorin, J.E. y Ridley, D.D., *Aus.J.Chem.*, **1978**, 31, 1965.
100. Chenevert, R. y Thiboutot, S., *Can.J.Chem.*, **1986**, 64, 1599.
101. Fuganti, C., Graselli, P., Servi, S., y Hogberg, H.E., *J.Chem.Soc.Perkin Trans. 7*, **1988**, 3061.
102. Dondoni, A., Fantin, G., Fagognolo, M., Mastellari, A., Medici, A., Nefrini, E. y Pedrini, P., *Gazz.Chim.Ital.*, **1988**, 118, 211.
103. Gillois, J., Buisson, D., Azerad, R. y Jaouen, G., *J.Chem.Soc.Chem.Común.*, **1988**, 1224.
104. Butt, S. y Roberts, S.M., *Chem.Br.*, **1987**, 127.
105. Nakamura, K., Inoue, K., Shibahara, J., Oka, S. y Ohno, A. *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 4769.
106. Glaenger, B.I., Faber, K., y Griengl, H., *Tetrahedron*, **1987**, 43, 5791.
107. Fronza, G., Fuganti, C., Graselli, P., Poli, G. y Servi, S., *J.Org.Chem.*, **1988**, 53, 6153.
108. Buist, P.H. y Dallmann, H.G., *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 285.
109. Haag, T., Arslan, T. Y Seebach, D., *Chimia*, **1989**, 43, 351.
110. North, M., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 1699.
111. Rotthaus, O., Kruger, D., Demuth, M. y Schaffner, K., *Tetrahedron*, **1997**, 53, 935.



# *Capítulo II*

## *Objetivos*



## OBJETIVOS

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

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

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

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

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

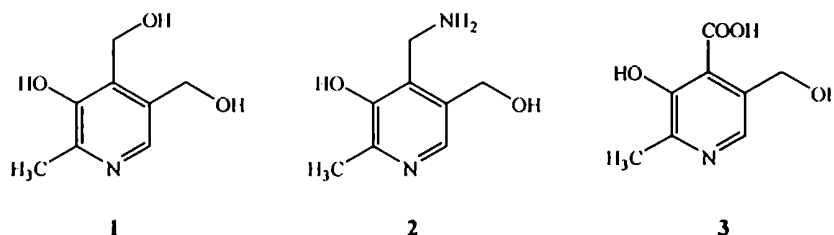
Dentro de este objetivo general, el trabajo se dividió en tres partes:

- 1) *Estudio de las reacciones de acilación y de alcoholisis de derivados de vitamina B<sub>6</sub> catalizadas por enzimas.*
- 2) *Preparación de amidas a partir de ácidos carboxílicos catalizada por enzimas.*
- 3) *Reducción quimio- y estereoselectiva de compuestos carbonílicos polifuncionales catalizada por células enteras.*

### ***1. Estudio de las reacciones de acilación y de alcoholisis de derivados de vitamina B<sub>6</sub> catalizadas por enzimas***

En primer lugar, se intentó investigar la transesterificación catalizada por lipasas en piridinas sustituidas de las cuales la vitamina B<sub>6</sub> y sus derivados resultan un ejemplo interesante. Estas piridinas polihidroxiadas actúan como cofactores esenciales de un número importante de enzimas involucradas en el metabolismo de aminoácidos<sup>1</sup>. En los últimos años, el piridoxina (1) y otros compuestos relacionados están siendo utilizados como antioxidantes en preparaciones cosméticas<sup>2</sup>, alimentos<sup>3</sup>, etc., donde actúan como atrapantes de radicales libres.<sup>4</sup> Resulta interesante la obtención de derivados menos polares, como ser los ésteres, que pueden ser hidrolizados fácilmente en el organismo y que al tener mayor afinidad por los lípidos aumentan la penetración a través de la piel. Además desde el punto de vista sintético, la acilación proveería moléculas selectivamente protegidas que facilitarían la transformación de piridoxina en piridoxamina (2).<sup>5</sup>

Como primera aproximación se utilizaron sustratos de la familia de la vitamina B<sub>6</sub> es decir derivados del 3-piridinmetanol como piridoxina (1), piridoxamina (2), ácido piridóxico (3).



Estos compuestos contienen varios grupos posibles de ser modificados, lo que permitió estudiar su comportamiento frente a diferentes reacciones catalizadas por enzimas con el objeto de obtener productos en forma regio- y quimioselectiva. La esterificación selectiva en una posición específica de la molécula de piridoxina es complicada debido a los tres grupos hidroxilo presentes. Los intentos por acilar 1 bajo condiciones controladas y obtener así derivados monoacilados, siempre resultan en mezclas de ésteres en donde el compuesto deseado es difícil de aislar. Los ejemplos descritos en literatura se refieren a métodos químicos que requieren varios pasos de protección y desprotección<sup>6</sup> y que en muchos casos involucran como intermediarios cetales cíclicos de 6 o 7 miembros.<sup>7</sup>

De acuerdo a esto, en esta etapa los objetivos se centraron en el estudio de la acilación de 1, para lo cual se intentó analizar la influencia de distintos parámetros involucrados en las reacciones como por ejemplo:

-Tipo de enzima utilizada para la biocatálisis: lipasa, proteasa, etc; en estado nativo o inmovilizada.

-Solvente: en el caso de las reacciones catalizadas por enzimas es notable la influencia de la polaridad del solvente sobre la velocidad y el rendimiento de las reacciones.

-Reactivo: relación entre la enzima y el agente acilante, tipo de agente acilante.

-Temperatura, modo de agitación, relación enzima-sustrato, etc.

Finalmente, de acuerdo a la experiencia adquirida con 1, se procedió a analizar los parámetros mencionados empleando los sustratos 2 y 3, lo que involucra variaciones en los reactivos, condiciones de reacción, etc.

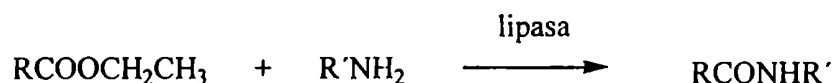
## ***2. Preparación de amidas a partir de ácidos carboxílicos catalizada por enzimas***

Como segunda parte, se proyectó estudiar las reacciones para la obtención de amidas sustituidas a partir de ácidos carboxílicos en un solo paso. Nuestro grupo de trabajo había empezado a desarrollar los primeros estudios sobre este tema y como resultado se presentó una patente de invención<sup>8</sup>.

La metodología consiste en efectuar dos reacciones consecutivas, en un mismo recipiente y mediante un mecanismo que involucra la acción catalítica de la misma enzima. Así, la lipasa, en un primer paso, produce la biotransformación del ácido carboxílico en el correspondiente éster etílico:



Al producirse el agregado de la amina, la misma enzima cataliza la aminólisis del éster:



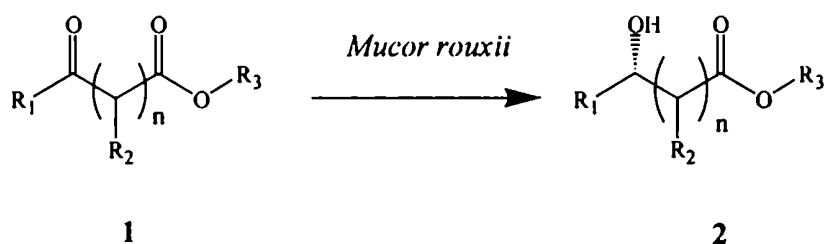


Para proseguir con este estudio se puso como meta analizar la reacción en mayor profundidad, estudiando aspectos tales como la naturaleza de la amina y del ácido empleados como sustratos, la influencia de la longitud de la cadena hidrocarbonada del ácido, la regio y quimio-selectividad de la reacción, etc.

### **3. Reducción quimio- y estereoselectiva de compuestos carbonílicos polifuncionales catalizada por células enteras**

Para concluir con el desarrollo experimental de este trabajo de tesis se propuso extender el empleo de biocatalizadores a otro tipo de reacciones que permitan generar asimetría en la molécula. En este nuevo enfoque se proyectó llevar a cabo reducciones quimio- y estereoselectivas de grupos carbonilo de  $\alpha$  y  $\beta$ -cetoésteres y compuestos relacionados utilizando como fuente biotecnológica directamente las células enteras provenientes de organismos bacterianos, levaduras, hongos, etc.

En primer lugar se intentó estudiar el comportamiento del hongo *Mucor rouxii* en la reducción de compuestos carbonílicos polifuncionales.



Sustrato	n	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>1a</b>	1	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
<b>1b</b>	1	CH <sub>3</sub>	H	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH
<b>1c</b>	1	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
<b>1d</b>	1	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
<b>1e</b>	1	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	H	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
<b>1f</b>	0	PhCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
<b>1g</b>	0	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
<b>1h</b>	0	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OCOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>		(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH

Se comenzó el estudio con  $\beta$ -cetoésteres sencillos (**1a** y **1b**) con el objeto de determinar las condiciones óptimas de reacción. Se propuso analizar la influencia de los distintos parámetros involucrados en la reacción, como por ejemplo:

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

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

-Estadio de crecimiento de las células empleadas: Se emplearon cultivos en diferentes fases de crecimiento del microorganismo.

-Empleo de agentes inhibidores.

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

-Evaluación de la estabilidad del microorganismo frente a condiciones de secado por liofilización y otras técnicas de uso corriente.

### Referencias bibliográficas:

1. a) Martell, A.E., *Acc.Chem.Res.*, **1989**, 22, 115. b) Pagani, R., Leoncini, R., Terzuoli, L., Pizzichini, M. y Marinello, E., *Biochimica et Biophysica Acta*, **1994**, 1204, 250. c) Breslow, R., *Acc.Chem.Res.*, **1995**, 28, 146.
2. Prasad, R., Lakshmi, A. V. y Bamji, M. S., *Biochem. Med.*, **1983**, 30, 333.
3. Baker, E. M., Canham, J. E., Nunes, W. T., Sauberlich, H. E. yMc Dowell, M. E. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1964**, 15, 59.
4. Zheng, S., Newton, G.L., Ward, J.F. y Fahey, R.C., *Radiat. Res.*, **1992**, 130, 183.
5. Yang, D., Shis, Y. y Liu, H., *J.Org.Chem.*, **1991**, 56, 2940.
6. Brown, L., Johnston, G.A., Suckling, C.J. y Halling, P.J., *J.Chem.Soc.PerkinTrans.I*, **1993**, 2777.
7. Korytnyky W. y Wiedeman, W., *J.Chem.Soc.*, **1962**, 2531.
8. Baldessari, A. y Gros E.G., Boletín Marcas y Patentes, Ministerio de Economía y Obras y Servicios Públicos, INPI, **1668**, 132 (11-3-98).



# *Capítulo III*

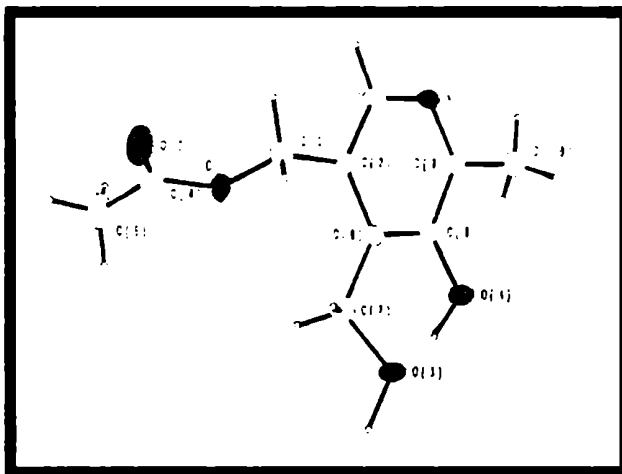
*Resultados y discusión*



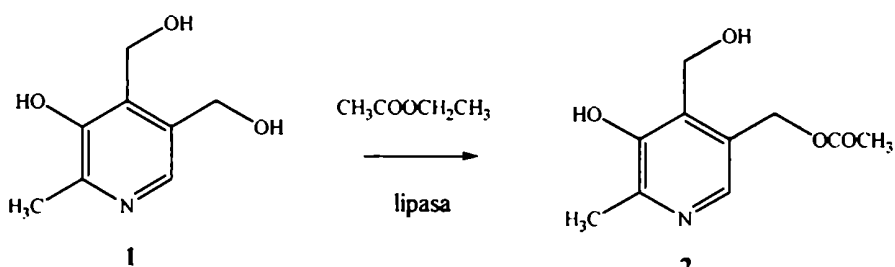
## 1. ACETILACIÓN DE PIRIDOXINA CATALIZADA POR LIPASAS

Dado que la molécula de piridoxina (1) contiene tres grupos hidroxilo, los primeros estudios en este tema se centraron en analizar la capacidad de las lipasas para acetilar selectivamente alguno de estos grupos. Para ello se comenzó estudiando la reacción de transesterificación de piridoxina con acetato de etilo en presencia de lipasas de distinto origen.

Inicialmente, se emplearon condiciones estándar de reacción optimizadas para transesterificaciones catalizadas por lipasas en otros sistemas.<sup>1</sup> Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C, empleando una relación enzima/sustrato de 2.0 y cuatro lipasas diferentes: lipasa de *Candida antarctica* (CAL), lipasa de *Mucor miehei* (LIP), lipasa de *Candida rugosa* (CRL) y lipasa pancreática porcina (PPL). Luego de tres horas, se realizó el análisis de las reacciones por cromatografía en capa delgada y se observó el mismo resultado para las cuatro enzimas ensayadas: la aparición de una segunda mancha de mayor R<sub>f</sub> que el compuesto de partida. Se procedió a realizar la identificación del producto para lo cual se decidió aislarlo de la reacción en donde se observó mayor conversión, es decir la catalizada por CAL. Para ello se continuó la reacción hasta lograr el mayor grado de conversión posible y mediante cromatografía en columna se obtuvo un sólido blanco con un 70% de rendimiento. Al intentar caracterizar este producto por técnicas espectroscópicas usuales, tales como espectrometría de masa y RMN <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C, solamente se pudo concluir que se había producido la monoacetilación del compuesto. La presencia de tres hidroxilos en el compuesto de partida, no permitió precisar de esta manera la ubicación del grupo acetilo, para lo cual se recurrió a técnicas de cristalografía de rayos X. Luego de obtenerse el monocristal por recristalización en etanol se realizaron las determinaciones correspondientes que permitieron confeccionar el siguiente diagrama ORTEP (Figura 2.1) e identificar al compuesto como *acetato de [5-Hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo* (2):

**Figura 2.1**

La identidad de los productos obtenidos en las reacciones catalizada por las otras lipasas (LIP, CRL y PPL) se confirmó mediante el análisis de los crudos de reacción obtenidos por filtración de la enzima y evaporación del solvente. Dada la baja solubilidad del compuesto de partida en acetato de etilo, el tratamiento mencionado permitió obtener el producto de reacción en un estado de pureza adecuado para su interpretación mediante espectroscopía de RMN protónico. A partir de la comparación de estos espectros con el espectro de RMN protónico del compuesto **2** se pudo concluir que el producto obtenido en los cuatro casos era el mismo:



lipasa:

Lipasa de *Candida antarctica* (CAL)

Lipasa de *Candida rugosa* (CRL)

Lipasa de *Mucor miehei* (LIP)

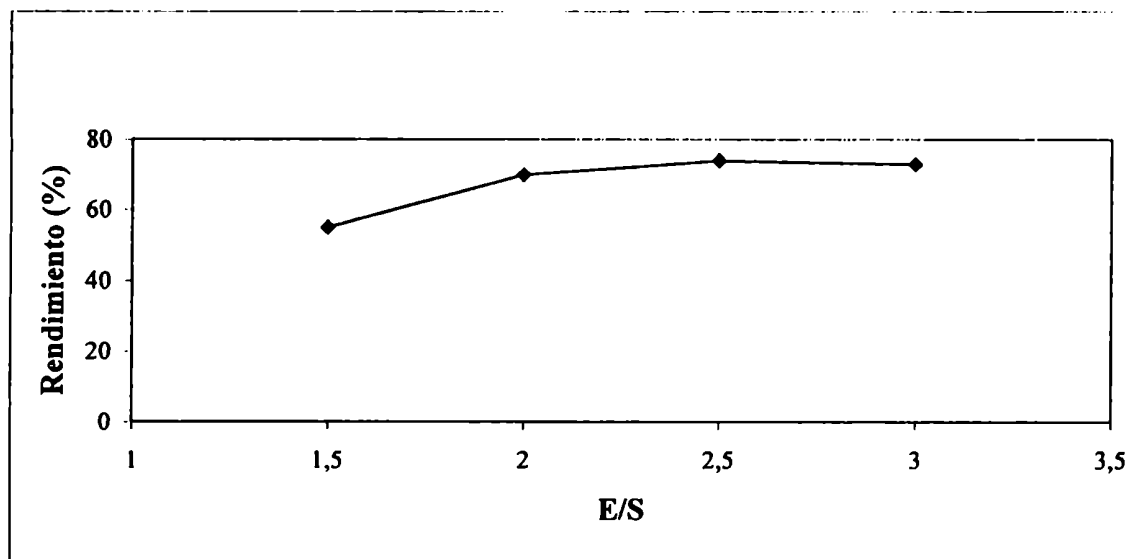
Lipasa de pancreática porcina (PPL)

**Esquema 2.1**

En vista de la selectividad lograda en la transesterificación de piridoxina con acetato de etilo catalizada por lipasas, se continuaron los estudios con la finalidad de optimizar el rendimiento de la reacción. Para ello se analizó la influencia de los siguientes parámetros experimentales sobre la mencionada transformación:

- 1) Relación enzima/sustrato
- 2) Temperatura
- 3) Tipo de lipasa
- 4) Efecto del solvente de reacción
- 5) Naturaleza del agente acilante

Se comenzó estudiando el efecto de la relación enzima/sustrato (E/S) para lo cual se decidió usar como modelo la transesterificación con acetato de etilo catalizada por CAL. Las reacciones se llevaron a cabo empleando cuatro relaciones E/S diferentes a 30°C durante 24 hs, tiempo suficiente para alcanzar la máxima conversión posible. A partir de los datos obtenidos se confeccionó el siguiente gráfico (Figura 2.2):



**Figura 2.2.** Efecto de la relación enzima/sustrato (E/S) sobre la transesterificación de piridoxina con acetato de etilo catalizada por CAL.



En la Figura 2.2 puede observarse la influencia de este parámetro sobre el rendimiento de la reacción, alcanzándose el máximo rendimiento posible para valores superiores a 2.5.

Para analizar la influencia de la temperatura se repitieron las reacciones catalizadas por las cuatro enzimas antes ensayadas a 55°C empleando una relación de E/S de 2,5. En la Tabla 2.1 se comparan los rendimientos obtenidos en las reacciones a 30°C y 55°C. Los tiempos de reacción informados corresponden a los de mayor rendimiento en producto. En ausencia de lipasa no se observó reacción a ninguna de las dos temperaturas ensayadas.

**Tabla 2.1.** Reacción de piridoxina con acetato de etilo catalizada por lipasas a 30°C y 55°C

<b>Enzima</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (hs)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
PPL	30	144	54
PPL	55	24	45
LIP	30	96	48
LIP	55	15	42
CRL	30	96	30
CRL	55	72	22
CAL	30	3	74
CAL	55	0,5	60

Los resultados de la Tabla 2.1 muestran que el aumento de la temperatura produjo una notable disminución en los tiempos de reacción para las cuatro enzimas ensayadas. Sin embargo, el rendimiento de la reacción se vio afectado en forma desfavorable debido a la pérdida de selectividad, que fue evidenciada por la aparición de productos secundarios en el análisis por cromatografía en capa delgada.

La eficiencia del catalizador se puede analizar a partir de los datos obtenidos a 30°C. A esta temperatura se obtuvo un único producto de reacción y debido a la naturaleza reversible de la misma fue posible recuperar cantidades variables del material de partida. A partir de esto

se puede concluir que la regioselectividad fue notable para las cuatro lipasas ensayadas, siendo CAL la mejor opción ya que dio lugar a un mayor rendimiento en producto.

Otro parámetro analizado fue la variación del medio de reacción. Nuevamente se usó como modelo la reacción catalizada por CAL, la cual se desarrolló a 30°C. Los resultados se resumen en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2.** Influencia del solvente de reacción en la transesterificación de piridoxina con acetato de etilo catalizada por CAL

<b>Solvente</b>	<b>log P</b>	<b>Tiempo (hs)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
acetato de etilo	0,68	3	74
acetonitrilo	-0,33	3	64
acetona	-0,23	3	72
hexano	3,50	168	10
tolueno	2,73	24	0
cloruro de metileno	1,40	168	15

Debido a la naturaleza altamente hidroxilada de la piridoxina, es soluble únicamente en solventes de polaridad alta. Esta característica podría justificar los resultados detallados en la Tabla 2.2. Con solventes de polaridad baja como el hexano y el cloruro de metileno, el rendimiento fue muy bajo debido a la baja concentración de sustrato en el medio de reacción. Con tolueno, la pérdida de actividad se atribuyó a la desnaturalización de la enzima, manifestada por aglutinación y cambio de color. Solventes de polaridad más elevada como acetona y acetonitrilo mostraron rendimientos comparables a los obtenidos con acetato de etilo.

Por último se intentó optimizar el rendimiento de la transesterificación de piridoxina variando el agente acilante. Para esto se recurrió a ésteres activados como acetato de vinilo e isopropenilo, los cuales son considerados agentes acilantes irreversibles (ver página 28).

Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C con CAL como catalizador empleando exceso de agente acilante (solvente de reacción). Los resultados se presentan en la Tabla 2.3.

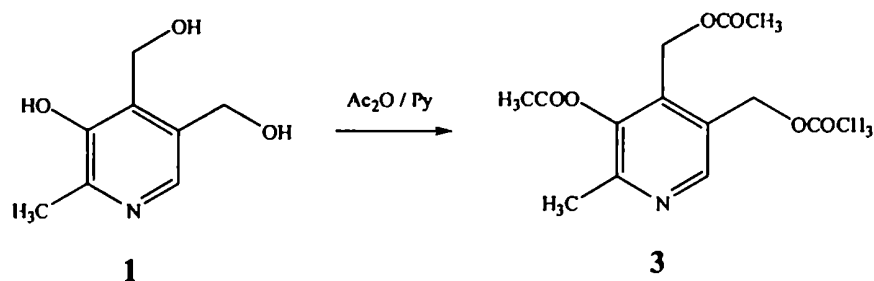
**Tabla 2.3.** Estudio de la naturaleza del agente acilante en la transesterificación de piridoxina catalizada por CAL

<b>Agente acilante</b>	<b>Tiempo (hs)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
acetato de etilo	3	74
acetato de vinilo	3	72
acetato de isopropenilo	3	71

Como puede apreciarse en la Tabla 2.3, los rendimientos obtenidos con ésteres activados resultaron comparables a los valores obtenidos con acetato de etilo.

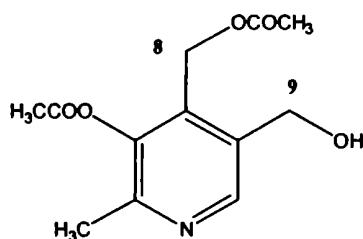
## **2. ALCOHOLISIS DE ACETATO DE 4,5-BIS(ACETOXIMETIL)-2-METILPIRIDIN-3-ILO**

El paso siguiente consistió en averiguar si las lipasas eran capaces de desacetilar en la misma posición de acetilación. Para ello se estudió el comportamiento del acetato de 4,5-bis(acetoximetil)-2-metilpiridin-3-ilo (**3**) en reacciones de alcoholisis catalizadas por lipasas. Dado que el compuesto **3** no era comercial, fue necesario prepararlo químicamente, para lo cual se emplearon estrategias convencionales de peracetilación (Esquema 2.2). Así se trató al clorhidrato de piridoxina con anhídrido acético en piridina durante una noche bajo agitación magnética. Luego de eliminar el exceso de agente acilante, se obtuvo un aceite incoloro, el cual fue caracterizado espectroscópicamente e identificado como el derivado triacetilado de piridoxina (**3**):



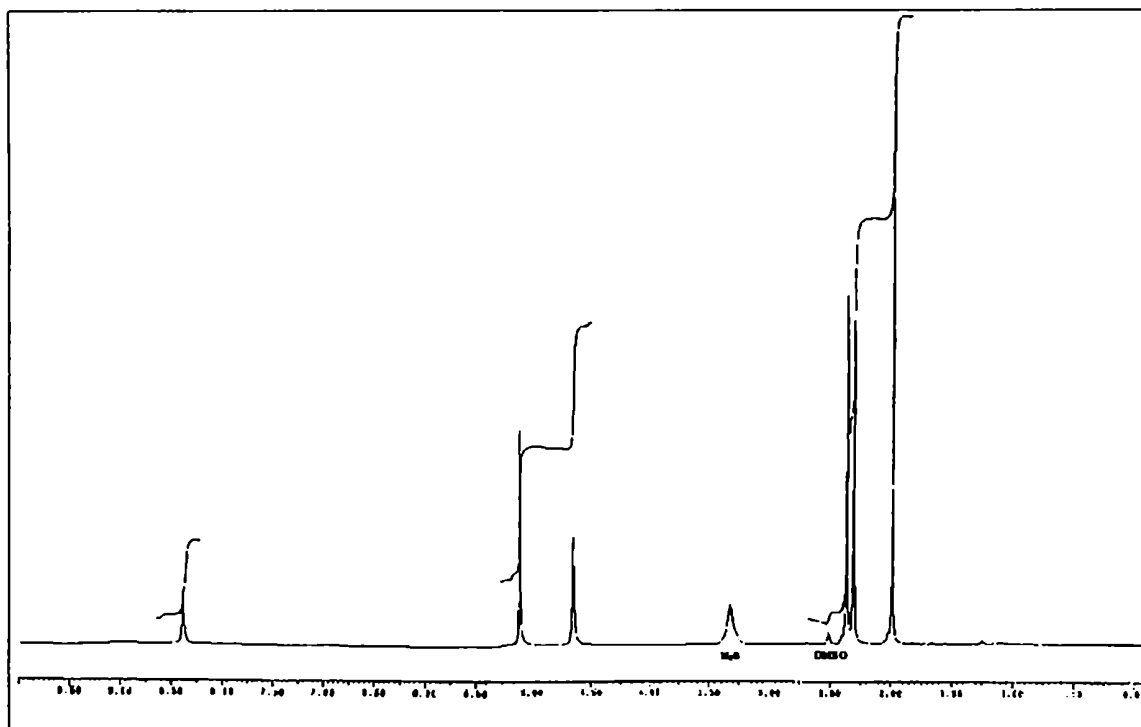
Esquema 2.2

Los estudios sobre las reacciones de alcoholisis de **3** comenzaron empleando n-octanol como nucleófilo, acetonitrilo como solvente y CAL como catalizador. La mezcla de reacción se agitó a 30°C durante 24 hs. Transcurrido este tiempo, el análisis por cromatografía en placa delgada reveló la desaparición del producto de partida casi por completo junto con la aparición de una nueva mancha de menor Rf. Luego de filtrar la enzima y evaporar el solvente de reacción, fue necesario una evaporación más exhaustiva para eliminar el exceso de nucleófilo (n-octanol) que se logró mediante alto vacío logrado con una bomba de aceite. El crudo de reacción así obtenido se purificó por cromatografía en columna para dar un sólido blanco de P.F.: 88-89° C (**4**). Dado que este valor presenta una buena concordancia con el publicado para acetato de 4-acetoximetil-5-hidroximetil-2-metilpiridin-3-ilo (<sup>2</sup> P.F.:90-92°C) se procedió a confirmar su identidad mediante técnicas espectroscópicas.

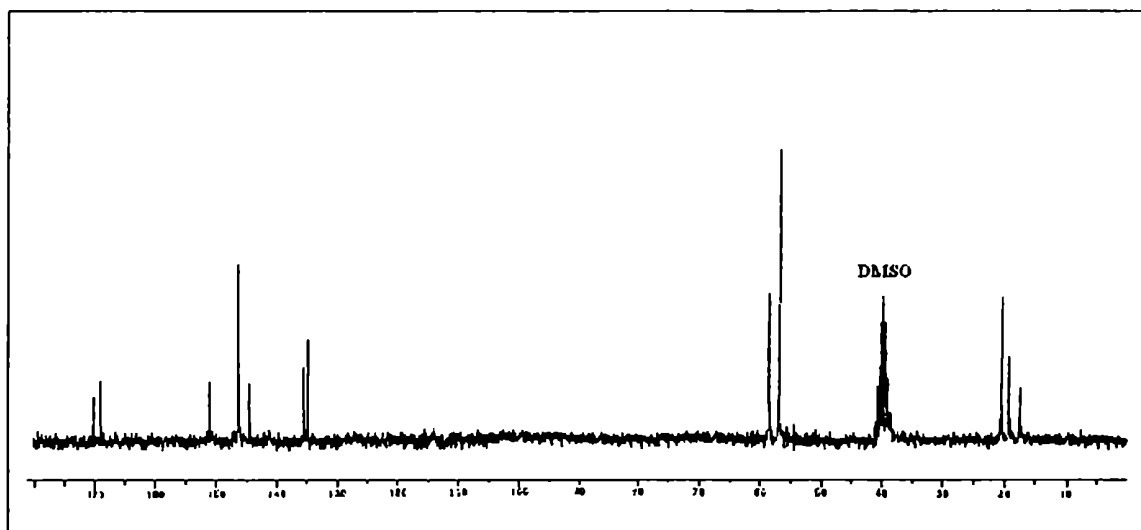
*Acetato de 4-acetoximetil-5-hidroximetil-2-metilpiridin-3-ilo (4)*

El análisis por EM reveló la existencia del ion molecular  $M^+$  a  $m/z$  253 indicando la presencia de dos grupos acetilo en la molécula. La ubicación de los dos grupos acetato se determinó mediante RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C por comparación con los espectros de piridoxina (**1**) y acetato de [5-hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (**2**).

En las Figuras 2.3 y 2.4 se presentan respectivamente los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  correspondientes al compuesto 4.



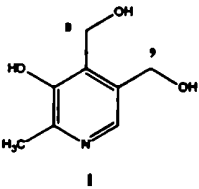
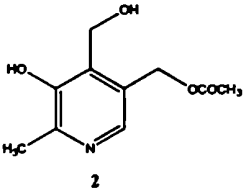
**Figura 2.3.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{DMSO-d}^6$  del compuesto 4.



**Figura 2.4.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN en  $\text{DMSO-d}^6$  del compuesto 4.

El análisis comparativo se basó en la observación de los valores de  $\delta$  correspondientes a las señales de los grupos  $\text{CH}_2$ . Los desplazamientos químicos de estas señales para los compuestos 1 y 2 se muestran en la Tabla 2.4:

**Tabla 2.4.** Desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  en  $\text{DMSO-d}_6$  de los grupos  $\text{CH}_2$  en los compuestos 1 y 2

	H-8	H-9	C-8	C-9
 <p>1</p>	4,76 <sup>a</sup>	4,49 <sup>a</sup>	56,5 <sup>a</sup>	58,8 <sup>a</sup>
 <p>2</p>	4,71	5,10	56,3	61,5

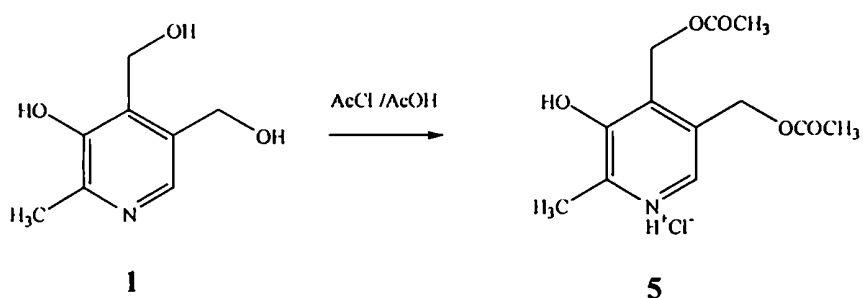
<sup>a</sup> Las señales se asignaron tomando como referencia la caracterización estructural realizada por Kayser y col. mediante experimentos de RMN bidimensional ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC).<sup>3</sup>

En la Tabla 2.4 puede observarse que la presencia del grupo acetato se manifiesta, tanto en  $^1\text{H}$  como en  $^{13}\text{C}$ , por un aumento en el valor de  $\delta$  de la señal del metileno adyacente al hidroxilo acetilado. El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 4 (Figura 2.3) presenta dos señales a 5,03 y 4,62 ppm que corresponden a los metilenos 8 y 9, sin embargo no es posible asignarlas inequívocamente. La señal a 4,62 ppm indica la presencia de un hidroxilo libre que podría corresponder en principio, tanto al unido al metileno 8 como al 9 pues la diferencia con los valores de hidroxilos no acetilados como en el caso de piridoxina es de 0,14 y 0,13 ppm respectivamente.

Haciendo el mismo análisis en  $^{13}\text{C}$ , en la Tabla 2.4 se observa que la señal del carbono adyacente al hidroxilo acetilado se corre apreciablemente en el caso de C-9, pasando de 58,8 ppm en 1 a 61,5 en 2. Dado que en el espectro de 4 (Figura 2.4) no se observa ninguna

señal cercana a 61 ppm y si existe una a 58,5 ppm se puede concluir que el hidroxilo unido a C-9 no se encuentra acetilado. En consecuencia, teniendo en cuenta que el espectro de masa del compuesto indicó dos acetatos presentes en la molécula la única estructura posible para este compuesto es la planteada, es decir *acetato 4-acetoximetil-5-hidroximetil-2-metilpiridin-3-ilo* (4).

Para confirmar estas conclusiones se preparó químicamente el derivado diacetilado de piridoxina en las posiciones 8 y 9: diacetato de 5-hidroxi-6-metilpiridina-3,4-dimetilo (5) mediante un procedimiento publicado en literatura en el año 1965 (Esquema 2.3).<sup>4</sup>

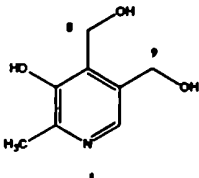
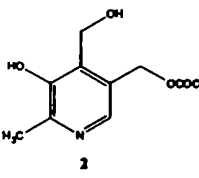
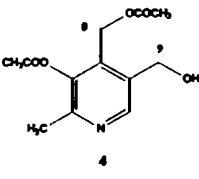
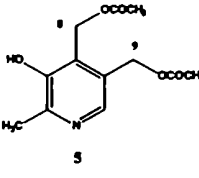


**Esquema 2.3**

La acetilación procede en forma quimioselectiva debido a que la acidez del medio de reacción asegura que el fenol se poco eficaz como nucleófilo.

Luego de liberar el clorhidrato de 5 se realizaron los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C a la base libre. Los desplazamientos químicos de las señales de los grupos CH<sub>2</sub> 8 y 9 se presentan en la Tabla 2.5. Con fines comparativos se reiteran las señales de los grupos metilenos en los compuestos 1, 2 y 4.

**Tabla 2.5.** Desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  en  $\text{DMSO-d}_6$  de los grupos  $\text{CH}_2$  en los compuestos 1, 2, 4 y 5

	H-8	H-9	C-8	C-9
 <p>1</p>	4,76	4,49	56,5	58,8
 <p>2</p>	4,71	5,10	56,3	61,5
 <p>4</p>	5,03	4,62	56,9	58,5
 <p>5</p>	5,13	5,10	57,1	61,5

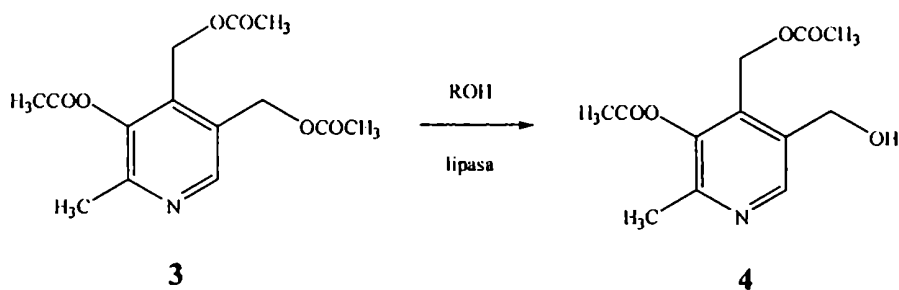
\*La asignación de las señales se realizó mediante técnicas de RMN bidimensional (Hetcosy).

En la Tabla 2.5 puede comprobarse que si el hidroxilo unido a 8 se encuentra acetilado, el corrimiento de la señal en  $^{13}\text{C}$  hacia valores de  $\delta$  mayores es pequeño (de 56,3-56,5 a 56,9-57,1).

Resumiendo, la excelente concordancia entre los valores de C-8 para los compuestos 4 y 5, así como la ausencia de una señal cercana a 61 ppm en el espectro de 4 permiten confirmar la identidad propuesta para producto obtenido en la alcoholisis de 3 catalizada por CAL.



Una vez identificado el producto obtenido en la alcoholisis de **3**, se procedió a optimizar algunos de los parámetros de la reacción (Esquema 2.4):



**Esquema 2.4**

En primera instancia se decidió investigar la incidencia en la reacción al variar la naturaleza del nucleófilo. Debido al elevado punto de ebullición del n-octanol, su remoción del medio de reacción representa un inconveniente práctico. En consecuencia se ensayó la reacción de alcoholisis de **3** catalizada por CAL con nucleófilos más volátiles tales como n-butanol y etanol. En la Tabla 2.6 se exponen los resultados obtenidos al llevar a cabo las reacciones a 30°C durante 24 hs.

**Tabla 2.6.** Alcoholisis de acetato de 4,5-bis(acetoximetil)-2-metilpiridin-3-ilo catalizada por CAL

Nucleófilo	Solvente	Rendimiento (%)
etanol	etanol	80
etanol	acetonitrilo	78
1-butanol	acetonitrilo	79
1-octanol	acetonitrilo	80

Las pruebas realizadas con distintos nucleófilos resumidas en la Tabla 2.6 mostraron comportamientos similares luego de transcurridas 24 hs de reacción. A los tiempos estudiados, la naturaleza del nucleófilo no produce cambios en la regioselectividad de la reacción alcanzándose valores de rendimiento comparables.

Resulta interesante destacar el buen rendimiento obtenido cuando se emplea etanol exclusivamente. Este solvente no es considerado apropiado para llevar a cabo reacciones biocatalizadas ya que, por a su alta hidrofiliidad ( $\log P = -0,31$ ), es capaz de remover la monocapa de agua que recubre la superficie de la enzima esencial para su actividad catalítica.<sup>5</sup> Sin embargo, estas consideraciones se basan en ejemplos en donde se usa la enzima en forma nativa. El hecho de que la enzima usada en estas experiencias se encuentre inmovilizada podría explicar su mayor estabilidad en este solvente.

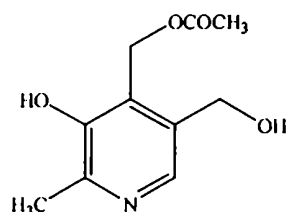
Es importante destacar la importancia del tiempo de análisis. A pesar de quedar un pequeño porcentaje de sustrato sin reaccionar, las reacciones no se prolongaron más de 24 hs debido a que superados estos tiempos comenzaron a detectarse cantidades apreciables de productos secundarios.

Finalmente se estudió el comportamiento de otras lipasas como biocatalizadores en la alcoholisis de **3** en etanol. Se repitieron las reacciones con tres lipasas diferentes, tales como LIP, PPL y CRL, pero los rendimientos obtenidos fueron prácticamente nulos.

### **3. ALCOHOLISIS DE DIACETATO DE 5-HIDROXI-6-METILPIRIDIN-3,4-DIMETILO CATALIZADA POR LIPASAS**

En virtud de los resultados obtenidos en la alcoholisis catalizada por CAL del derivado triacetilado de piridoxina, se decidió averiguar si el comportamiento regioselectivo de la enzima sobre el hidroxilo 9 se conservaba al emplear otro sustrato de estructura similar, tal como el derivado diacetilado de piridoxina, diacetato de 5-hidroxi-6-metilpiridina-3,4-dimetilo (**5**), preparado químicamente según se indicó anteriormente. Para ello se estudió la reacción a 30 °C empleando etanol como nucleófilo y como solvente. El análisis por cromatografía en capa delgada luego de transcurridas 24 hs reveló la desaparición parcial del compuesto de partida y la aparición de una nueva mancha cuyo  $R_f$  difería de todos los derivados hasta el momento preparados. Para proceder a su caracterización se aisló el compuesto mediante cromatografía en columna obteniéndose un sólido blanco **6** de punto de fusión (104-105) °C.

El análisis por EM reveló la existencia del ion molecular  $M^+$  a  $m/z$  211 indicando la presencia de un solo grupo acetilo en la molécula. Si se considera que la molécula de partida posee dos acetilos en las posiciones 8 y 9, se pueden plantear como productos de alcoholisis únicamente dos isómeros monoacetilados: acetato de [5-hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (**2**) y acetato de [3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-4-il]metilo. Debido a que el compuesto **6** presenta un punto de fusión considerablemente diferente a **2** y además difiere en el comportamiento en cromatografía en capa delgada, es posible conjeturar que la identidad de **6** corresponde a *acetato de [3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-4-il]metilo*.



*Acetato de [3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-4-il]metilo (6)*

Para confirmar esta suposición se realizaron los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  del compuesto **6** (Figuras 2.5 y 2.6) y se analizaron los  $\delta$  obtenidos para los núcleos 8 y 9. Los resultados se presentan en la Tabla 2.7 donde se los compara con las respectivas señales de los compuestos **1** y **2**.

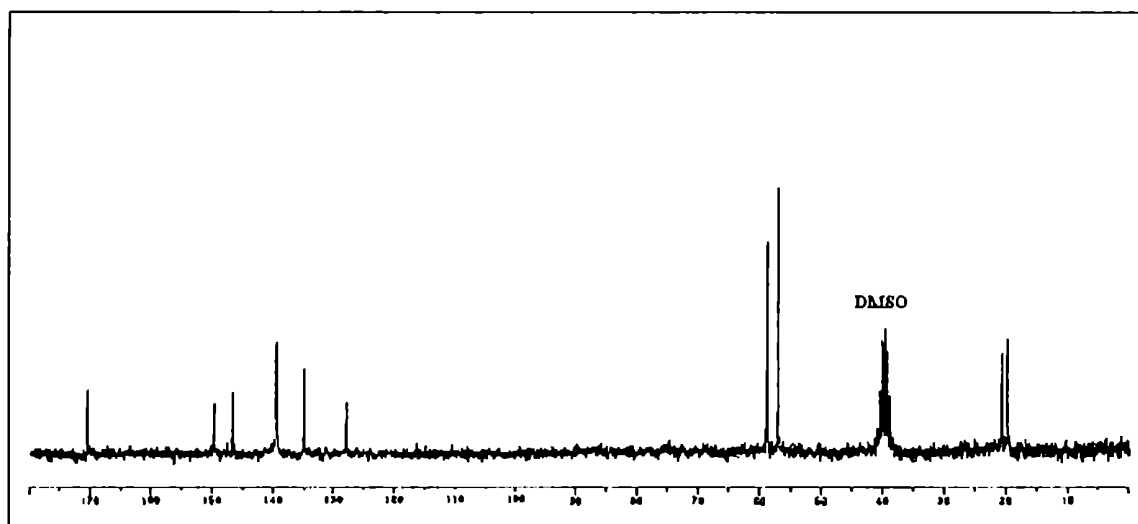


Figura 2.5. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN en  $\text{DMSO-d}^6$  del compuesto **6**.

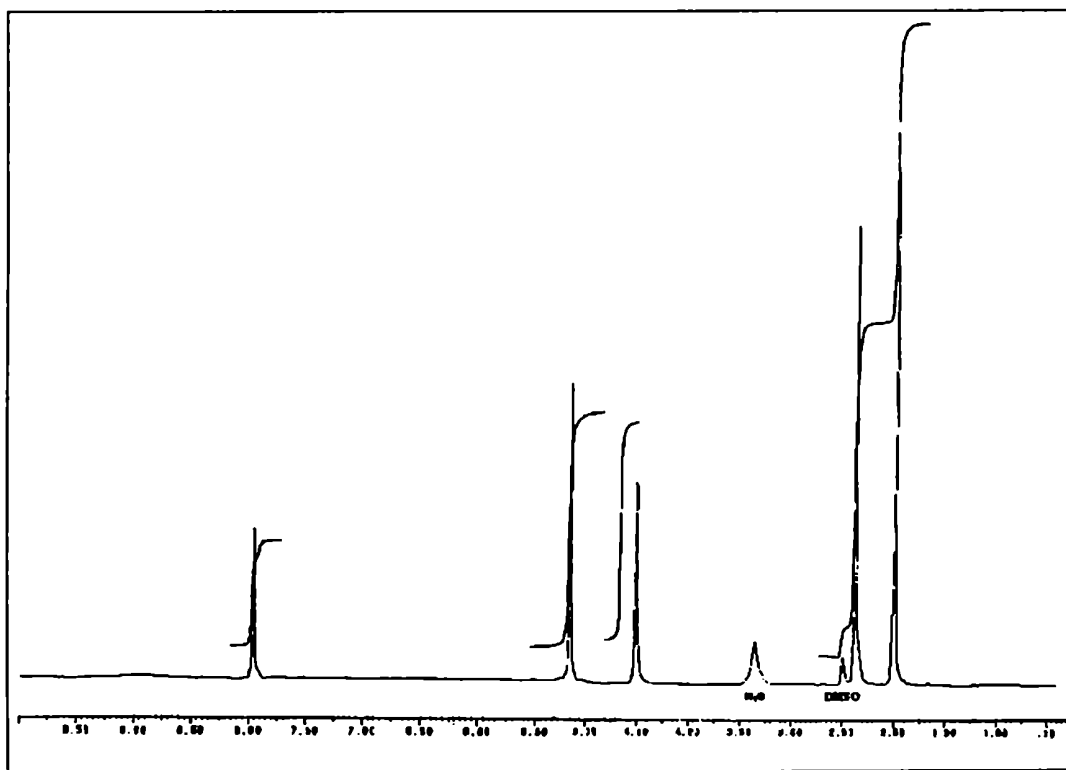


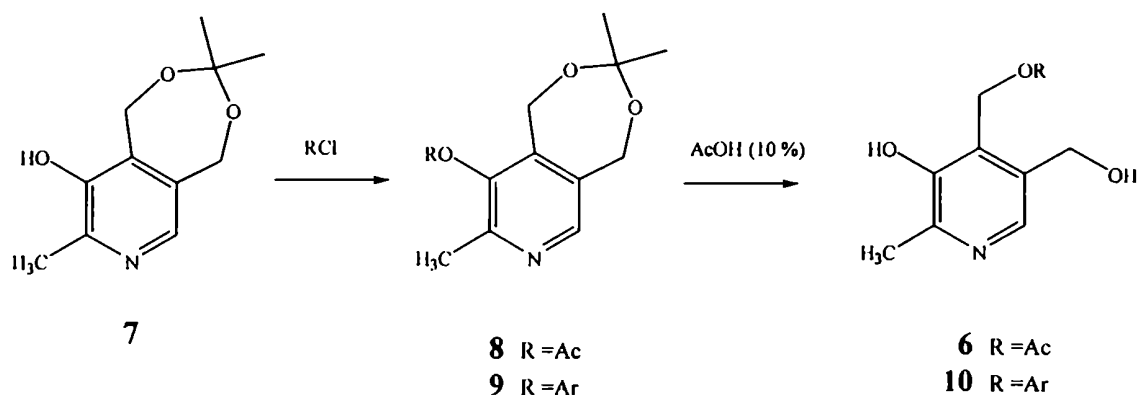
Figura 2.6. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{DMSO-d}^6$  del compuesto 6.

Tabla 2.7. Desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  en  $\text{DMSO-d}^6$  de los grupos  $\text{CH}_2$  en los compuestos 1, 2 y 6

	H-8	H-9	C-8	C-9
<p>1</p>	4,76	4,49	56,5	58,8
<p>2</p>	4,71	5,10	56,3	61,5
<p>6</p>	5,15	4,51	57,1	58,9

Al examinar el espectro protónico de **6** se observan solamente dos señales en la región en donde resuenan los hidrógenos 8 y 9, a 4,51 y 5,15 ppm. Efectuando un análisis similar al realizado hasta el momento con los demás derivados de piridoxina, se puede afirmar que la primera corresponde al metileno con el hidroxilo libre mientras que la segunda corresponde al grupo funcional acetilado. Comparando entonces, el valor de  $\delta$  del metileno libre (4,51 ppm) con los valores de los metilenos libres de **1** (H-8: 4,76 ppm y H-9 4,49 ppm) y de **2** (H-8: 4,71 ppm) se puede concluir que en **6** el hidroxilo no acetilado corresponde al que está unido al carbono 9. La misma conclusión se desprende al analizar los espectros de  $^{13}\text{C}$ . En este caso, el hecho de no observarse ninguna señal cercana a los 61 ppm (que corresponde al C-9 cuando su hidroxilo está acetilado) afirma que el grupo acetilo debe hallarse en el otro metileno, es decir en la posición 8. En consecuencia la estructura planteada en un principio para **6** es correcta y corresponde a *acetato de [3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-4-il]metilo (6)*.

En el año 1967, *Korytnyk y Paul* informaron la obtención del compuesto **6** junto con el benzoato de [3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-4-il]metilo partir de  $\alpha^4, \alpha^5$ -isopropilidenpiridoxina (Esquema 2.5).<sup>6</sup>



**Esquema 2.5**

Este método ideado originalmente para la síntesis de 3-*O* ésteres, involucra en un primer paso la esterificación del hidroxilo fenólico de **7** con el cloruro de acilo correspondiente. En un segundo paso, se produce la hidrólisis del grupo isopropilideno para dar los derivados 8-*O*-monoacilados **6** y **10**. El hecho de que los productos obtenidos presenten el grupo acilo en el hidroxilo del carbono 8 en lugar del hidroxilo fenólico (posición 3) es justificado por *Korytnyk y Paul* mediante el postulado de que el grupo acilo migra espontáneamente una vez producida la hidrólisis.

Al comparar el punto de fusión de **6** informado por *Korytnyk y Paul* con el obtenido en nuestras experiencias se observó una fuerte discrepancia. El valor determinado en nuestro laboratorio para el 4-acetoximetil derivado fue de 104-105 °C mientras que *Korytnyk y Paul* informaron un punto de fusión de 155-157 °C. Este valor presenta una notable similitud con el punto de fusión obtenido para el 5-acetoximetil derivado **2** preparado en nuestro laboratorio (152-153 °C). También se observaron importantes diferencias en la asignación de las señales en RMN de <sup>1</sup>H de los metilenos correspondientes a los carbonos 8 y 9. La Tabla 2.8 se muestran los valores de desplazamiento químico para los mencionados protones en los compuestos **1**, **2**, **5** y **6**, junto con los valores informados por *Korytnyk y Paul* para su compuesto **6**.

**Tabla 2.8.** Desplazamientos químicos de los grupos CH<sub>2</sub> en <sup>1</sup>H-RMN correspondientes a los compuestos **1**, **2**, **5** y **6**<sup>a</sup>

Compuesto	CH <sub>2</sub> (8)	CH <sub>2</sub> (8) <sup>b</sup>	CH <sub>2</sub> (9)	CH <sub>2</sub> (9) <sup>b</sup>
<b>1</b>	4,76	-	4,49	
<b>2</b>	4,70		5,11	
<b>6</b>	5,15	5,15	4,51	4,78
<b>5</b>	5,13	-	5,10	-

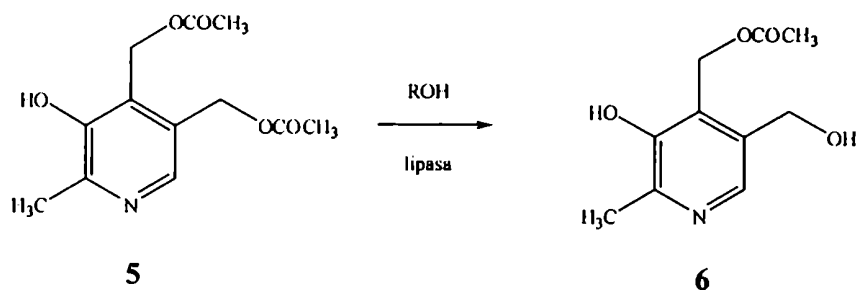
<sup>a</sup>Desplazamientos químicos (δ) en ppm, solvente DMSO-d<sub>6</sub>. <sup>b</sup>Valores informados en <sup>6</sup>

De acuerdo a nuestros datos, los protones de los CH<sub>2</sub>(8) y CH<sub>2</sub>(9) de piridoxina (**1**) resuenan a 4,76 y 4,49 ppm respectivamente. El derivado diacetilado **5** muestra en su

espectro de RMN protónico las correspondientes señales a 5,13 y 5,10 ppm respectivamente, mientras que el espectro de **2** estas señales aparecen a 4,70 y 5,11 ppm. *Korytnyk y Paul* informan absorciones a 5,15 y 4,78 ppm respectivamente para las mencionadas señales, indicando que en su producto, el grupo acetilo debe estar localizado en el C-9 en lugar de en el C-8.

Si además, se tiene en cuenta que *Korytnyk y Paul* realizaron la asignación de la estructura para el derivado  $\alpha^4$ -O acetilado solamente comparando la posición de los grupos metileno con la correspondiente a otros ésteres de estructura semejante ( $\alpha^4$ -O ésteres), se puede concluir que el acetato de [3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-4-il]metilo descrito por *Korytnyk y Paul* es en realidad, acetato de [5-Hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (**2**).

Una vez identificado el producto de alcoholisis con etanol se intentó mejorar el rendimiento de la misma empleando otros nucleófilos, tales como n-butanol y n-octanol. A continuación se detalla el esquema de la reacción estudiada (Esquema 2.6) cuyos resultados se muestran en la Tabla 2.9:



**Esquema 2.6**

Las reacciones se desarrollaron a 30 °C durante 24 hs y con CAL como catalizador. Los productos se purificaron por cromatografía en columna.

Nuevamente el tiempo de análisis fue determinante en la regioselectividad de la alcoholisis. Al intentar superar las 24 hs de reacción para lograr un aumento en el grado de conversión comenzaron a observarse por cromatografía en capa delgada cantidades apreciables de productos secundarios.

**Tabla 2.9.** Alcoholisis de diacetato de 3-hidroxi-6-metilpiridina-3,4-dimetilo catalizada por CAL.

Nucleófilo	Solvente	Rendimiento (%)
etanol	etanol	69
1-butanol	acetonitrilo	68
1-octanol	acetonitrilo	69

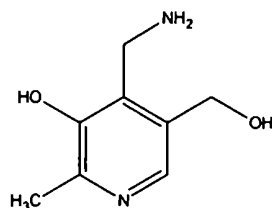
Es importante resaltar que igual a lo observado en la alcoholisis de **3** (Esquema 2.4, Tabla 2.6), el empleo de etanol como nucleófilo y solvente conduce a excelentes resultados, a pesar de no ser considerado un solvente adecuado para este tipo de reacciones.

Finalmente, se estudió la reacción empleando otros tipos de lipasas como LIP, PPL y CRL, pero en ninguno de los casos se observó actividad luego de transcurridos 15 días de reacción.

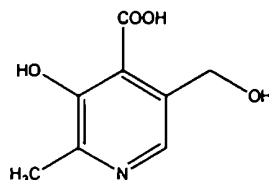
#### **4. REACCIONES DE ACETILACION CATALIZADAS POR LIPASAS DE SUSTRATOS QUIMICAMENTE RELACIONADOS CON PIRIDOXINA**

En virtud de la excelente regioselectividad obtenida con piridoxina y sus derivados en transesterificaciones catalizadas por lipasas, se decidió estudiar el comportamiento de estas enzimas sobre sustratos químicamente relacionados, tales como piridoxamina (**11**) y ácido 4-piridóxico (**12**).





11



12

La piridoxamina (11) a diferencia de la piridoxina (1) posee un grupo amino unido al carbono 8 y corresponde a una de las varias formas del complejo vitamínico B<sub>6</sub>. Los vitámeros que integran este grupo se caracterizan por ser interconvertibles dentro del organismo, siendo la forma metabólicamente activa el fosfato de piridoxal.

Como puede apreciarse en la Figura 2.7, la molécula de 11 presenta diferentes grupos funcionales susceptibles a reaccionar con acetato de etilo mediante un mecanismo catalizado por lipasas.

El ácido 4-piridóxico (12), posee un grupo carboxilo unido a la posición 4 del anillo piridinico, si bien no pertenece al grupo B<sub>6</sub>, se haya altamente relacionado pues es la forma en que principalmente se excreta la vitamina.

Este grupo carboxilo presente en la molécula brinda una segunda posibilidad para la catálisis mediada por lipasas. Además de la potencial catálisis que pueden llegar a realizar estas enzimas en la transesterificación de 12 con acetato de etilo, es posible también estudiar su comportamiento en la esterificación de este sustrato con etanol.

#### **4.a. Estudio de la reacción de piridoxamina con acetato de etilo catalizada por lipasas**

Dado que la molécula de piridoxamina (11) contiene dos grupos hidroxilo y un grupo amino, se estudió la reacción de piridoxamina con acetato de etilo en presencia de diferentes lipasas (CAL, LIP, PPL y CRL) para analizar la capacidad de estas enzimas para acetilar quimioselectivamente alguno de estos grupos.

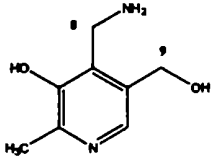
Debido a que disponía del compuesto 11 en forma de diclorhidrato, los primeros ensayos se realizaron sin desprotonar los grupos amino pero en todos los casos se recuperó el compuesto de partida luego de transcurridos 14 días.

En vista de esto, fue necesario liberar el clorhidrato para lo cual se alcalinizó una solución acuosa del compuesto con hidróxido de amonio hasta observarse la precipitación de la base libre.

Con la base libre como sustrato se repitieron las reacciones empleando las cuatro enzimas antes mencionadas. El análisis por cromatografía en capa delgada luego de transcurridas 24 horas reveló para el caso de las reacciones catalizadas por CAL y LIP, la desaparición parcial del compuesto de partida junto con la aparición de una mancha de mayor Rf. Ambos productos fueron purificados por cromatografía en columna para su posterior caracterización. Con PPL y CRL, en cambio, se obtuvieron resultados menos favorables, sin observarse evidencia de que ocurriera reacción alguna.

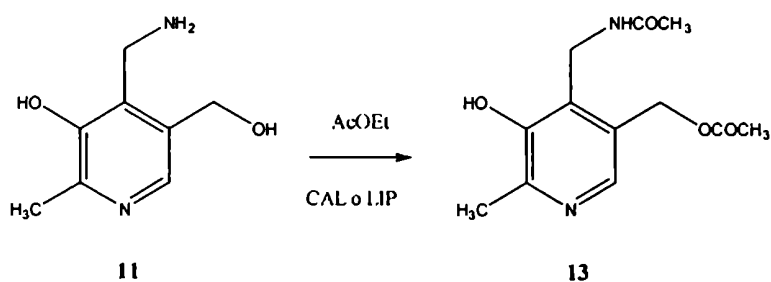
Los productos obtenidos en las reacciones con CAL y LIP fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas. Los espectros obtenidos para ambos compuestos fueron idénticos, indicando que las reacciones catalizadas por CAL y LIP dan origen al mismo producto 13. En los espectros de masa, el ion molecular indicó la introducción de dos grupos acetilos en la molécula. Consistente con ello, en los espectros de RMN protónico se observaron las señales correspondientes a los hidrógenos de los dos grupos metilos de los acetatos a 2,03 y 2,08 ppm. La ubicación de los grupos acetato fue dilucidada a partir de la comparación de los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de 13 y de piridoxamina, en donde fueron de fundamental utilidad las señales de los metilenos de 8 y 9 y la de los hidrógenos unidos a nitrógeno. Estos valores se detallan en la Tabla 2.10:

**Tabla 2.10.** Desplazamientos químicos de RMN de <sup>1</sup>H en DMSO-d<sup>6</sup> relevantes para la identificación de 13

	H-8	H-9	H-N
 <p>11</p>	4,17 (s)	4,79 (sa)	8,55 (sa)
13	4,45 (d)	5,15 (s)	7,15 (t)

En la Tabla 2.10 se puede apreciar que las señales de 8 y 9 en 13 se hallan corridas hacia valores de  $\delta$  mayores con respecto a las de piridoxamina. Esto indicaría que los heteroátomos unidos en estas posiciones se deben encontrar acetilados. Además, la acetilación en el nitrógeno se hace evidente por la multiplicidad que presenta la señal del metileno adyacente, que aparece como un doblete a 4,45 ppm indicando el acoplamiento con el NH de la amida. Asimismo, la señal del H unido directamente a N, que en piridoxamina aparecía como un singulete ancho, en 13 se presenta como triplete, consistente con el hecho de que el H forma parte de un grupo amida y al no intercambiarse manifiesta multiplicidad.

A partir de esta evidencia experimental se caracterizó al compuesto obtenido en la transesterificación de piridoxamina (11) con acetato de etilo catalizada por CAL y LIP como *N-[5-acetoximetil-3-hidroxi-2-metilpiridin-6-metilpiridin-4-il]metil acetamida* (13):



**Esquema 2.7**

Los rendimientos obtenidos con ambas enzimas fueron muy bajos ya que apenas superaron el 15%. Las causas se debieron principalmente a la alta inestabilidad de la piridoxamina y sus derivados, evidenciado por la aparición de color amarillo que se intensificaba al incrementar el tiempo de reacción. A pesar de tomarse algunos recaudos para evitar la descomposición, realizando la reacción protegida de la luz y la humedad y empleando tiempos cortos de reacción, no fue posible mejorar la situación, sobre todo en los pasos de purificación.

Para concluir, se puede resaltar que el comportamiento de las lipasas frente a este sustrato fue notablemente diferente al compararlo con piridoxina. Además de que solamente dos de

las cuatro lipasas resultaron activas, no presentaron ningún tipo de selectividad ya que se obtuvieron productos acetilados tanto en el nitrógeno como en el oxígeno.

#### **4.b. Esterificación de ácido 4-piridóxico con etanol**

La primera estrategia que se probó para modificar el ácido 4-piridoxico mediante un proceso biocatalítico implicó una reacción de esterificación. Para lo cual se ensayó la reacción de ácido 4-piridóxico con etanol variando alternativamente el tipo de enzima, la temperatura y el solvente de reacción. Se repitieron las reacciones a 30°C y 55°C, con etanol como agente acilante y solvente, usando distintas enzimas como catalizadores: CAL, LIP, PPL y CRL. Las reacciones se siguieron durante 15 días, sin observarse, en ninguno de los casos, formación de producto.

Dado que la solubilidad del sustrato es un factor importante en la reactividad, se buscó un solvente orgánico en el cual el sustrato presentara una mayor solubilidad. Se estimó esta propiedad con distintos solventes orgánicos tales como, acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano y piridina. Sólo en el último caso se notó un aumento de la misma con respecto a etanol. Sin embargo, tampoco se obtuvieron resultados positivos al cambiar el solvente por piridina, en el cual luego de 24 hs de reacción, la enzima mostró signos de desnaturalización.

Dado que las esterificaciones dan como producto secundario agua y ésta aumenta la actividad hidrolítica de la enzima, se probó la reacción agregando tamices moleculares de 4Å, 4-8 mesh, previamente activados. Los resultados fueron los mismos que en la reacción sin tamices moleculares.

#### **4.c. Transesterificación de ácido piridóxico con acetato de etilo**

Debido a los resultados poco favorables obtenidos al intentar la esterificación de ácido 4-piridóxico con etanol, se intentó la acetilación a través de una transesterificación con acetato de etilo. A pesar de que la reacción, biocatalizada por CAL, se probó a dos temperaturas, 30°C y 55°C, y con dos solventes diferentes, acetato de etilo y piridina, no se



obtenidos se resumen en las Tablas 2.11 y 2.12, donde los tiempos de reacción presentados son aquellos que dieron lugar al máximo rendimiento en producto.

**Tabla 2.11.** Acilación de piridoxina catalizada por CAL (Esquema 2.8)

Agente acilante	T (°C)	Solvente	t (hs)	Producto	Rendimiento (%)
14 a	30	Acetonitrilo	24	15	55
14 a	55	Acetonitrilo	3	15	40
14 a	30	Acetona	24	15	69
14 b	30	Acetonitrilo	48	16	53
14 b	55	Acetonitrilo	5	16	40
14 b	30	Acetona	48	16	64
14 b	30	Hexano	48	16	0
14 b	30	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	48	16	0
14 b	30	Tolueno	48	16	0 <sup>a</sup>
14 c	30	Acetona	72	17	57
14 d	30	Acetona	72	18	53

<sup>a</sup>La enzima sufrió pérdida de actividad por desnaturalización, la que se manifestó por aglutinación y cambio de color.

**Tabla 2.12.** Acilación de piridoxina catalizada por CRL, LIP y PPL (Esquema 2.8)

Agente acilante	Enzima	Solvente	t (hs)	Producto	Rendimiento (%)
14 a	CRL	Acetonitrilo	48	15	28
14 a	LIP	Acetonitrilo	24	15	45
14 a	PPL	Acetonitrilo	24	15	42
14 b	CRL	Acetonitrilo	48	16	26
14 b	LIP	Acetonitrilo	24	16	43
14 b	PPL	Acetonitrilo	24	16	39

Analizando de modo general los resultados obtenidos con agentes acilantes de mayor longitud de cadena puede apreciarse que la acilación de piridoxina catalizada por lipasas sigue el mismo comportamiento que la reacción con acetato de etilo. Transcurre regioselectivamente con las cuatro lipasas ensayadas, siendo CAL la mejor opción, ya que dio lugar a los mejores rendimientos en tiempos de reacción más cortos. En cuanto al medio de reacción, los mejores rendimientos se lograron con solventes de polaridad moderada como acetona y acetonitrilo, obteniéndose los mejores resultados al emplear acetona. Si bien el aumento de la temperatura disminuyó notablemente los tiempos de reacción, se obtuvo una disminución en los rendimientos debido a la pérdida de selectividad por parte de las lipasas evidenciada por la aparición de cantidades apreciables de productos secundarios. La eficiencia de las enzimas en las reacciones de acilación con los diferentes ésteres de ácidos grasos fue variable. Al compararse los resultados obtenidos con los distintos homólogos saturados, puede deducirse que al aumentar la longitud de la cadena del agente acilante la reacción se ve menos favorecida, quedando mayor cantidad de sustrato sin reaccionar. También se vio afectado el tiempo de la reacción, requiriéndose períodos más prolongados para los derivados de ácidos grasos de cadena más larga.

Las acilaciones se llevaron a cabo empleando una relación agente acilante/sustrato de 2,5. Este valor fue ajustado a partir de una serie de ensayos en los cuales se determinó el rendimiento de las reacciones de acilación de piridoxina con estearato de etilo en idénticas condiciones experimentales (temperatura, velocidad de agitación, biocatalizador, relación enzima/sustrato, tiempo de reacción, solvente) para tres relaciones sustrato/acilante (Tabla 2.13). Todas las reacciones se llevaron a cabo a 30°C empleando acetona como solvente y CAL como catalizador.

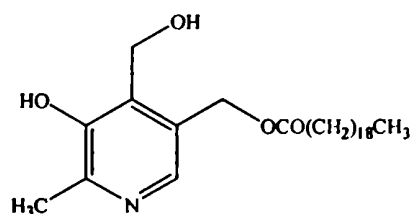
**Tabla 2.13.** Estudio de la relación sustrato/ agente acilante en la reacción de piridoxina con estearato de etilo catalizada por CAL.

Relación sustrato/acilante	Rendimiento (%)
1:1	23
1:2,5	53
1:5	52

Como alternativa para la preparación enzimática de derivados acilados de piridoxina se probó la reacción empleando como agentes acilantes directamente los ácidos grasos libres que son más económicos que los respectivos ésteres etílicos. Para ello se estudió la esterificación de piridoxina catalizada por lipasas con ácido mirístico, ácido esteárico y ácido eicosanoico empleando acetona como solvente. Los resultados se presentan en la Tabla 2.14.

**Tabla 2.14.** Esterificación de piridoxina con ácido esteárico catalizada por lipasas

Agente acilante	Enzima	t (hs)	Producto	Rendimiento (%)
Ácido esteárico	CAL	72	18	69
Ácido esteárico	LIP	120	18	59
Ácido esteárico	PPL	120	18	56
Ácido esteárico	CRL	120	18	42
Ácido mirístico	CAL	72	17	72
Ácido eicosanoico	CAL	96	19	64



19

Al examinar los datos de la Tabla 2.14 se puede notar que los rendimientos logrados tanto con ácido mirístico como esteárico superaron a los obtenidos con los respectivos ésteres etílicos. Generalmente, en una reacción de esterificación catalizada por lipasas los rendimientos obtenidos son menores a los logrados en las transesterificaciones debido a que la reacción se detiene antes de alcanzar la conversión deseada por interrupción del proceso



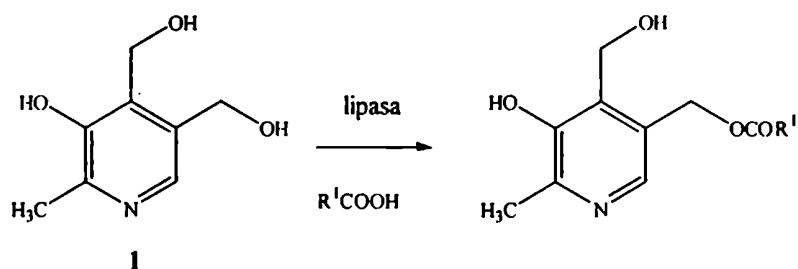
catalítico.<sup>7</sup> El agua formada durante la esterificación se acumula en la superficie hidrofílica de la enzima formando una segunda capa acuosa que conduce finalmente a una interfase que separa a la enzima del sustrato. Esto sucede debido a que los solventes habitualmente adecuados para llevar a cabo la esterificación son de naturaleza lipofílica ( $\log P > 4$ ) y en consecuencia no son capaces de acomodar el agua producida durante el transcurso de la reacción. Sin embargo, en los ejemplos aquí citados se empleó acetona como solvente; su completa miscibilidad con el agua impide que ésta se acumule en la superficie de la enzima, sin dificultar la interacción con el sustrato.

Teniendo en cuenta que la esterificación genera agua, se intentó desplazar el equilibrio de la reacción agregando tamices moleculares de 4 Å. Para esto se repitió la acilación con ácido esteárico, acetona y CAL a 30°C en presencia de tamices moleculares. Sin embargo, no se logró mejorar el rendimiento ya que se obtuvo un 67% de producto transcurridos 3 días de reacción.

#### **5.b. Obtención de derivados monoacilados de piridoxina a partir de ácidos grasos insaturados**

Con la finalidad de preparar derivados de ácidos grasos esenciales, se decidió estudiar la influencia del grado de insaturación del agente acilante en la reacción de acilación de piridoxina catalizada por lipasas. Teniendo en cuenta los antecedentes en la preparación de derivados de ácidos grasos saturados, se prefirió emplear como agentes acilantes directamente los respectivos ácidos grasos insaturados. Las reacciones se desarrollaron a 30°C durante 96 hs, con acetona como solvente y CAL como catalizador. Las condiciones experimentales se eligieron de acuerdo a las óptimas halladas para el homólogo saturado.

Igual a lo observado en todas las reacciones de acilación, la lipasa de *Candida antarctica* (CAL) presentó la misma regioselectividad con todos los ácidos grasos insaturados probados formando derivados monoacilados en el sustituyente unido a la posición 5 del anillo piridínico (Esquema 2.9).



- 20** R = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO- *cis*  
**21** R = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO- *trans*  
**22** R = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>CH=CH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO- *cis,cis*  
**23** R = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>CH=CH)<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO- *cis,cis,cis*  
**24** R = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>CH=CH)<sub>4</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CO- *cis,cis,cis,cis*

### Esquema 2.9

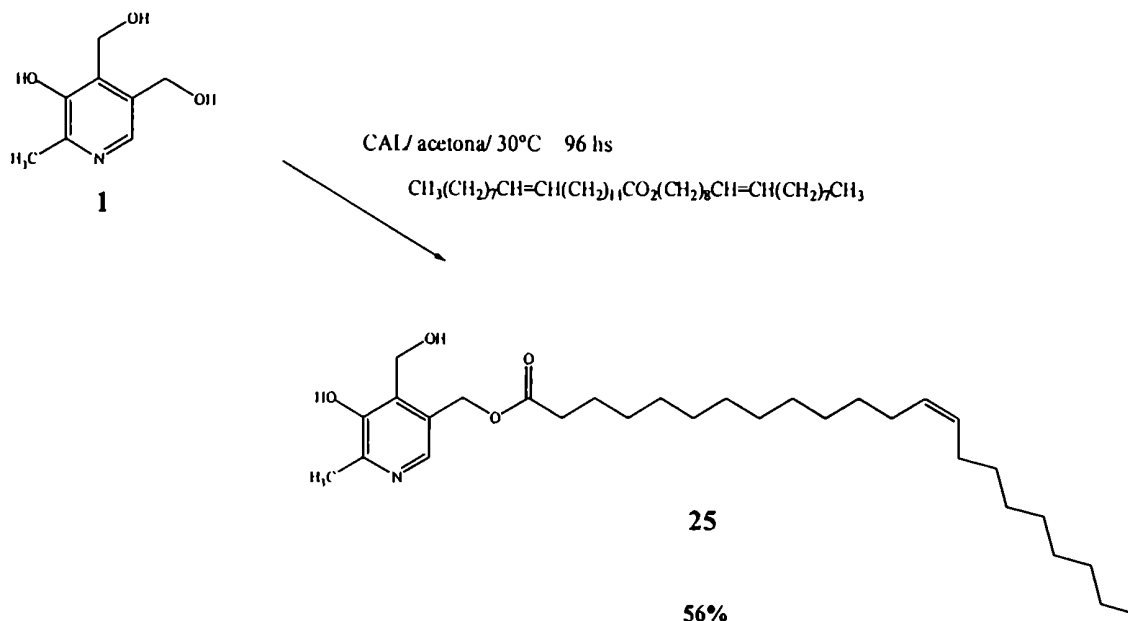
Los rendimientos obtenidos se resumen en la Tabla 2.15. Los tiempos de reacción presentados son aquellos que dieron lugar al máximo rendimiento en producto.

**Tabla 2.15.** Reacción de piridoxina catalizada por lipasas con ácidos grasos insaturados.

Producto	Agente acilante	Tiempo (hs)	Rendimiento (%)
<b>20</b>	ácido oleico	72	60
<b>21</b>	ácido eláidico	72	51
<b>22</b>	ácido linoleico	72	61
<b>23</b>	ácido linolénico	72	61
<b>24</b>	ácido araquidónico	96	59

En todos los casos se obtuvieron rendimientos similares al homólogo saturado. En consecuencia, podemos sugerir que el grado de insaturación no afecta la actividad de la enzima. Sin embargo, se observó una marcada dependencia en el rendimiento de la esterificación según el isómero geométrico usado como acilante, siendo mayor para el isómero *cis* (derivado del ácido oleico, **20**) que para el isómero *trans* (derivado del ácido eláidico, **21**).

Finalizando con la serie de derivados de ácidos grasos insaturados, se preparó *cis*-13-docosenoato de [5-hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (**25**) a partir de erucato de oleilo (Esquema 2.10):



**Esquema 2.10**

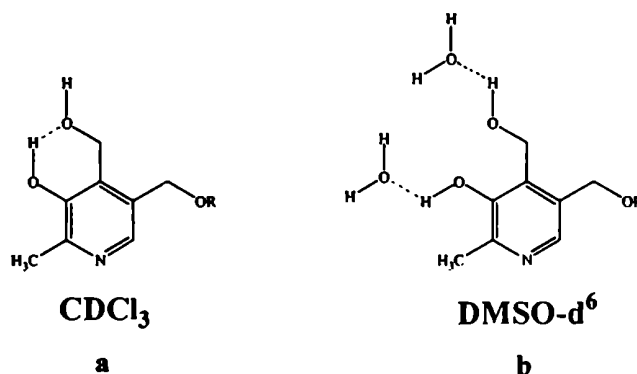
El grupo oleilo presente en el agente acilante, no modificó la regioselectividad, ni produjo cambios en las condiciones de reacción, ni en el rendimiento de la acilación enzimática. Esto muestra la capacidad de la lipasa para manifestar su actividad catalítica aún con un agente acilante cuyo residuo alcohólico está formado por una cadena alquílica insaturada de considerable longitud.

### 5.c. Dilucidación estructural de los derivados monoacilados de piridoxina

Como se explicó en la sección 2.1 para la dilucidación estructural del producto obtenido en la acetilación de piridoxina catalizada por lipasas fue necesario recurrir a técnicas de rayos X debido a que las herramientas espectroscópicas comúnmente usadas (RMN monodimensional de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$ ) no permitían precisar cual de los dos hidroxilos, químicamente similares, se encontraban acetilados. Una vez caracterizado el producto **2**, fue posible por RMN monodimensional identificar los restantes derivados de piridoxina (compuestos **3** a **6**).

Sin embargo, la dilucidación estructural de los derivados de piridoxina con ácidos grasos (15 a 24) no fue tan sencilla. Debido a la baja solubilidad en DMSO-d<sup>6</sup> de los derivados, para la determinación de los espectros de <sup>1</sup>H-RMN fue necesario utilizar un solvente de menor polaridad como el CDCl<sub>3</sub>. Esto trajo como consecuencia que al realizar los espectros en este solvente se observara un corrimiento pronunciado de las señales correspondientes a los metilenos 8 y 9. Mientras que en el espectro del derivado monoacetilado de piridoxina 2 realizado en DMSO-d<sup>6</sup> estas señales aparecen en 4,7 y 5,11 ppm respectivamente, en el espectro del mismo compuesto en CDCl<sub>3</sub> los mencionados hidrógenos resuenan a 5,03 y 5,04 ppm.

Estas diferencias podrían atribuirse a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre el hidroxilo unido al carbono 3 y el unido al carbono 8 (Figura 2.7 a.), que produciría la desprotección de los hidrógenos de 8 acercándolos a los valores del metileno adyacente al grupo acetilo.<sup>8</sup>



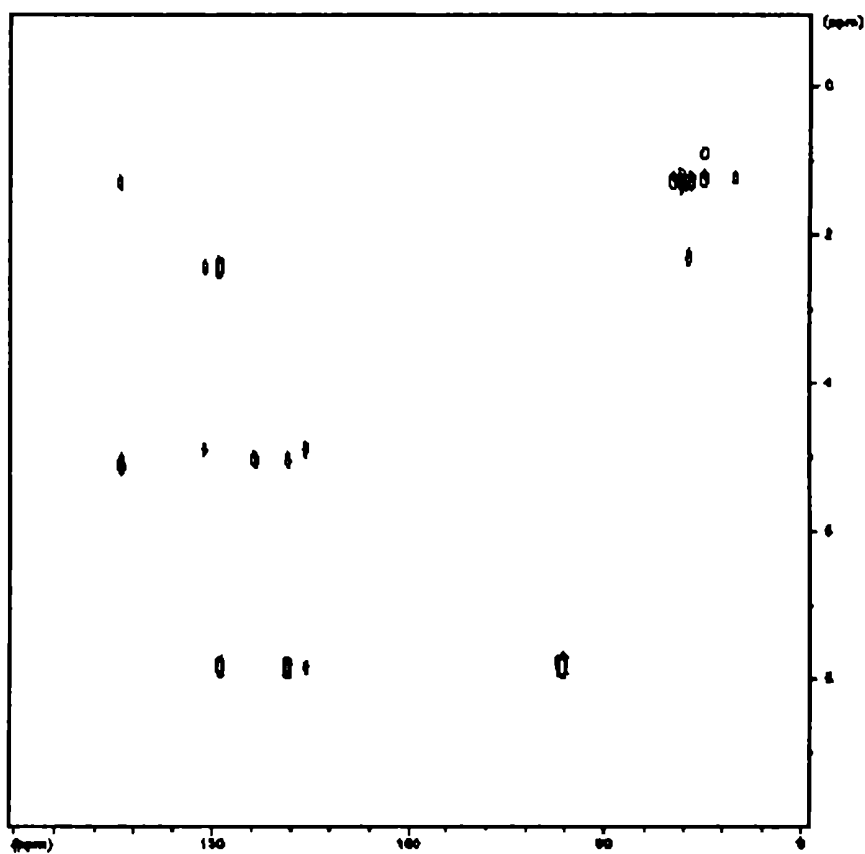
**Figura 2.7**

Esta asociación intramolecular se observa en CDCl<sub>3</sub> debido a que el derivado de piridoxina no es capaz de formar puente de hidrógeno con el solvente. El DMSO-d<sup>6</sup> posee una constante dieléctrica alta (49D) y no forma puentes de hidrógeno en estado puro, sin embargo su alta higroscopicidad hace que la pequeña cantidad de agua presente en el solvente sea la responsable de las interacciones por puente de hidrógeno con el soluto, primando las interacciones intermoleculares frente a las intramoleculares (Figura 2.7 b).

Esta hipótesis es consistente con lo observado en los espectros en CDCl<sub>3</sub> y en DMSO-d<sup>6</sup> del compuesto 6, en donde la acetilación en 8 impide la formación del puente de hidrógeno intramolecular. Ambos espectros presentaron una diferencia similar entre las señales de los metilenos de aproximadamente 0,6 ppm.

Teniendo en cuenta que las señales de los metilenos 8 y 9 de **15** a **25** resuenan en 4,98-4,99 y 5,01-5,03 ppm respectivamente puede afirmarse que se trata de los derivados acilados en la posición 9.

Para comprobar esta afirmación se recurrió a técnicas de RMN bidimensional que permiten ver correlaciones entre los núcleos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  a larga distancia (COLOC). De esta forma se realizó el espectro COLOC al producto de acilación obtenido con ácido mirístico (**17**) (Figuras 2.8 y 2.9). El análisis de las señales obtenidas para **17** resultó compatible con las correlaciones esperadas para el derivado acilado en la posición 9.



**Figura 2.8.** Espectro COLOC correspondiente al producto **17**.

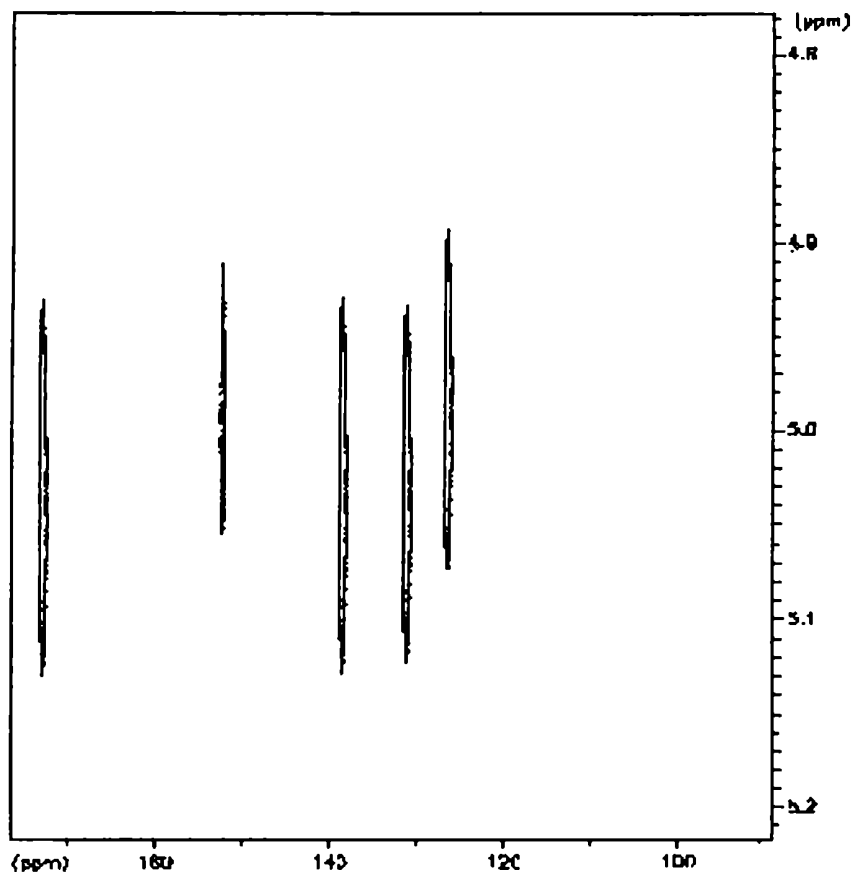
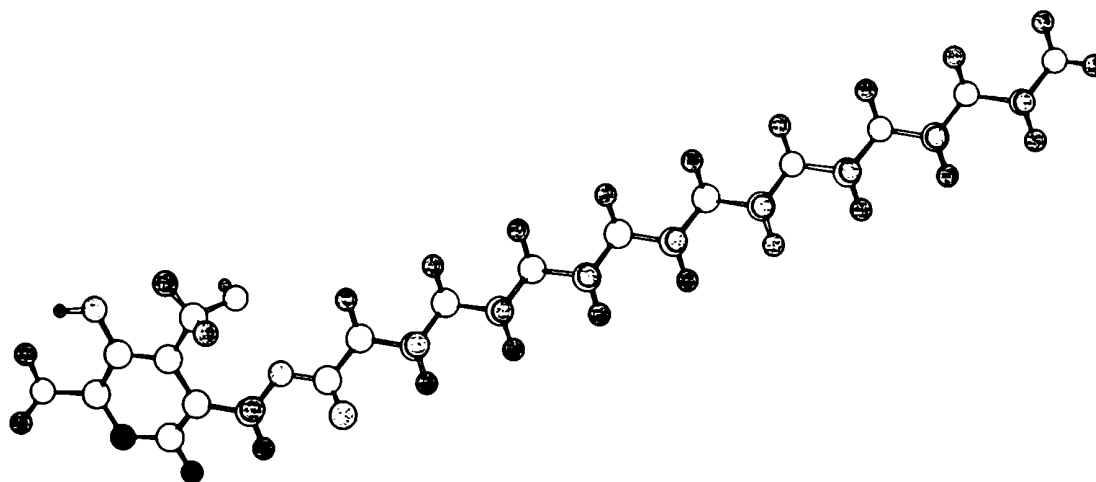


Figura 2.9. Ampliación del espectro COLOC de 17.

### 5.c. Actividad superficial de derivados de ácidos grasos de piridoxina

Los monoésteres de piridoxina derivados de ácidos grasos saturados e insaturados preparados mediante catálisis por lipasas presentan una estructura anfipática en donde la piridoxina representa la porción hidrofílica de la molécula y el grupo acilo con su larga cadena hidrocarbonada, el extremo lipofílico (Figura 2.10). Estas moléculas reúnen las características necesarias como para manifestar actividad superficial lo que nos conduce a pensar en su aplicación como agentes tensioactivos.



**Figura 2.10.** Derivado monoacilado de piridoxina con ácido esteárico (18).

Además, los grupos acilo de estos compuestos se hidrolizan fácilmente *in vivo* produciendo dos moléculas presentes en los organismos superiores: vitamina B<sub>6</sub> y ácidos grasos. Dado que estos compuestos no sólo resultan inocuos para el hombre, sino que se transforman en sustancias esenciales para el cuerpo (vitaminas y ácidos grasos insaturados<sup>9</sup>) podrían presentar una interesante aplicación como ingredientes en formulaciones cosméticas tales como shampoos para pieles sensibles y cremas post-solares.<sup>10</sup>

La capacidad que tiene un compuesto para exhibir actividad superficial depende del balance entre las porciones hidrofílica (polar) y lipofílica (no polar). Para la clasificación de agentes tensioactivos, *Griffin*<sup>11</sup> definió un parámetro al que denominó Balance hidrofílico-lipofílico (HLB), que indica la polaridad de las moléculas en un rango arbitrario de 1 a 40 dentro del cual los emulsionantes más conocidos poseen valores de 1 a 20.

Los valores de HLB se calculan mediante métodos semiempíricos y son útiles para predecir qué tipo de propiedades tensioactivas puede proveer una estructura molecular dada. El método del HLB se basa en el concepto de que algunas moléculas tienen grupos hidrofílicos, otras lipofílicos y algunas ambos. El porcentaje en peso de cada tipo de grupo presente en la molécula o en una mezcla permite predecir que comportamiento exhibirá la estructura molecular. Los surfactantes que poseen una porción lipofílica predominante tienen valores de HLB bajos mientras que aquellos donde la parte hidrofílica es más importante se corresponden con valores de HLB más altos.

En la Tabla 2.16 se resumen una serie de valores de HLB promedio obtenidos por cálculo, por experiencia y por prueba de algunos tensioactivos usuales.

**Tabla 2.16.** Valores de HLB de algunos tensioactivos comunes

<b>Agente tensioactivo</b>	<b>HLB</b>
<b>Triestearato de sorbitano</b>	2,1
<b>Monoestearato de glicerilo</b>	3,8
<b>Monooleato de sorbitano</b>	4,3
<b>Monolaurato de glicerilo</b>	5,2
<b>Dioleato PEG 400</b>	8,2
<b>Dioleato PEG 600</b>	10,6
<b>Monoestearato PEG 400</b>	11,7
<b>Oleato de trietilamina</b>	12,7
<b>Nonil-fenol POE 10</b>	13,3
<b>Oleato de sodio</b>	18,0
<b>Oleato de potasio</b>	20,0
<b>Laurilsulfato de sodio</b>	40,0

PEG = poli(etilenglicol) POE = polioxietileno

El valor de HLB es una guía bastante útil para seleccionar un emulsificante para una aplicación dada. En la Tabla 2.17 se describen las funciones que pueden desempeñar los tensioactivos según el rango de HLB que presentan.

**Tabla 2.17.** Aplicaciones de los agentes tensioactivos según su HLB

<b>Función</b>	<b>Rango de HLB</b>
<b>Antiespumantes</b>	1-3
<b>Emulsificantes, agua/aceite</b>	3-6
<b>Agente humectante</b>	7-9
<b>Emulsificantes, aceite/ agua</b>	8-18
<b>Agentes humectantes</b>	13-15
<b>Solubilizantes</b>	15-20
<b>Detergentes</b>	8-40



Los emulsificantes con valores de HLB bajos, típicamente cercanos a 4, son adecuados para estabilizar emulsiones de agua en aceite, es decir aquellos en donde la fase dispersa es agua y la continua es el aceite. Los tensioactivos que tienen HLB entre 7-9 principalmente tienen acción como agentes humectantes; los tensioactivos de HLB entre 8 y 18 son buenos emulsionantes para sistemas de fase dispersa aceite y fase continua agua. En el rango entre 13 y 15, nuevamente, cumplen la función principal de agentes humectantes pero para otro tipo de superficies. Entre 15 y 18, el efecto preponderante es la disolución, es decir la formación de microemulsiones donde la fase dispersa está constituida por partículas tan pequeñas que no llegan a ser visibles y la emulsión es ópticamente transparente.

Finalmente existe un rango entre 8 y 40 en donde los tensioactivos son aptos para su uso como detergentes o agentes de limpieza.

Asimismo, es posible lograr un valor de HLB determinado mediante la mezcla de surfactantes lipofílicos e hidrofílicos. Dado que el HLB es una propiedad aditiva, el valor de la mezcla resultante se calcula mediante la suma ponderada de los HLB individuales.

Por ejemplo: Una mezcla 30% Span 80 (HLB=4,3) y 70% Tween 80 (HLB=15) tiene un HLB resultante de:

$$\text{HLB}=(0,3 * 4,3) + (0,7 * 15)=11,8.$$

Se calcularon los valores de HLB correspondientes a los derivados de piridoxina preparados enzimáticamente a partir de ácidos grasos (compuestos 17 a 25) usando el programa de cálculo Physical Properties! Pro™. Los valores obtenidos para los mencionados compuestos se muestran la Tabla 2.18; todos ellos se corresponden con emulsionantes aceite en agua.<sup>12</sup>

Tabla 2.18. Valores de HLB de los derivados de ácidos grasos de piridoxina

Compuesto	HLB
Miristato de piridoxina (17)	9,49
Estearato de piridoxina (18)	8,27
Araquidato de piridoxina (19)	7,77
Oleato de piridoxina (20)	8,31
Elaidato de piridoxina (21)	8,31
Linoleato de piridoxina (22)	8,34
Linolenato de piridoxina (23)	8,39
Araquidonato de piridoxina (24)	8,43
Erucato de piridoxina (25)	7,35

En virtud de los resultados obtenidos mediante cálculos de predicción del HLB, se decidió realizar algún método para determinar experimentalmente la capacidad surfactante de los compuestos preparados.

Uno de los métodos más usados se basa en la determinación de la concentración micelar crítica (CMC). Los tensioactivos se agrupan formando agregados organizados, o micelas, en donde las cadenas hidrofóbicas, para aislarse del medio acuoso, se orientan hacia el interior de la micela, mientras que los grupos hidrofílicos quedan en contacto con el medio acuoso (Figura 2.11).

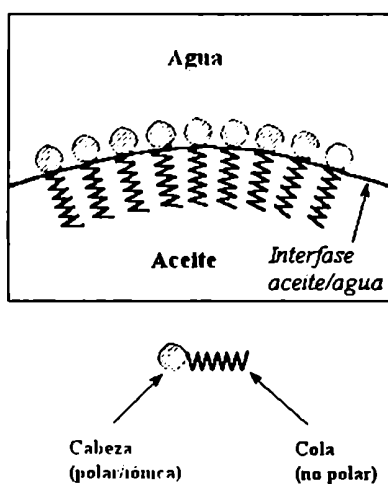
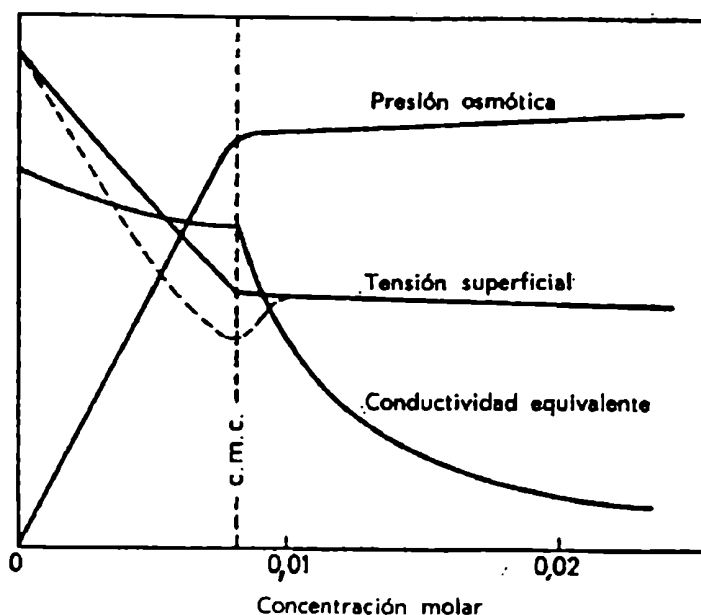


Figura 2.11

La concentración por encima de la cual empieza a apreciarse la existencia de micelas se llama concentración micelar crítica (CMC). Las disoluciones de sustancias con actividad superficial alta presentan propiedades físicas especiales. En disoluciones diluidas actúan como electrolitos normales, pero a concentraciones bastante definidas tienen lugar cambios bruscos de sus propiedades físicas tales como la turbidez, presión osmótica, conductividad eléctrica y tensión superficial. En el punto de la concentración micelar crítica la solución cambia radicalmente sus propiedades tensioactivas. Así, midiendo alguna de estas propiedades para distintas concentraciones de tensioactivo es posible determinar gráficamente la CMC (Figura 2.12).



**Figura 2.12.** Propiedades físicas de disoluciones de sulfato de dodecilo sódico

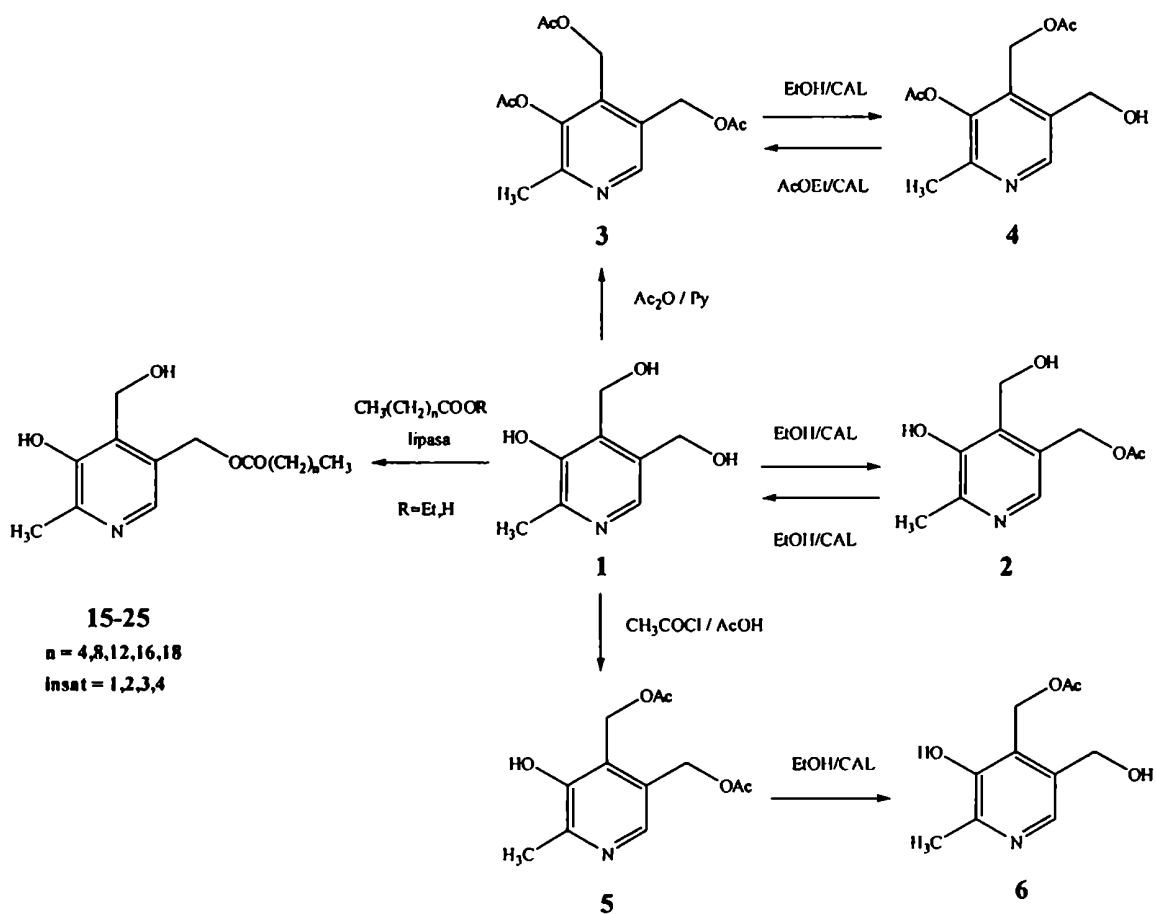
Cuanto menor afinidad tenga el tensioactivo con el agua, a menor concentración va a tender a agruparse y aislarse del medio acuoso. Por otro lado, a mayor concentración se puede llegar con el tensioactivo en forma de moléculas libres, si el tensioactivo es muy afín al agua.

Dado que este método se aplica a soluciones acuosas de tensioactivo, la determinación de la concentración micelar crítica por esta vía, requiere que el compuesto presente una solubilidad en agua de al menos  $10^{-3}$  M. Teniendo en cuenta esto se intentó preparar soluciones de la mencionada concentración con los compuestos 17 a 25. En ninguno de los casos se obtuvieron sistemas homogéneos.

Para aumentar la solubilidad en agua de los derivados 17 y 18 se prepararon los clorhidratos correspondientes burbujeando HCl gaseoso sobre soluciones de las bases libres en acetato de etilo:metanol (compuestos 26 y 27). Sin embargo, no se lograron valores de solubilidad compatibles con los necesarios para realizar las determinaciones. A pesar de tratarse de especies iónicas la porción lipofílica de la molécula predomina lo que explicaría su baja afinidad por el agua.

## 6. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

Trabajando en medio orgánico, se utilizaron lipasas de distintas fuentes como biocatalizadores en reacciones de acilación y de alcoholisis, obteniéndose en forma regioespecífica, derivados mono- y diacilados de piridoxina con altos rendimientos y bajo condiciones suaves de reacción.<sup>13</sup> El Esquema 2.11 ilustra el camino quimioenzimático desarrollado.

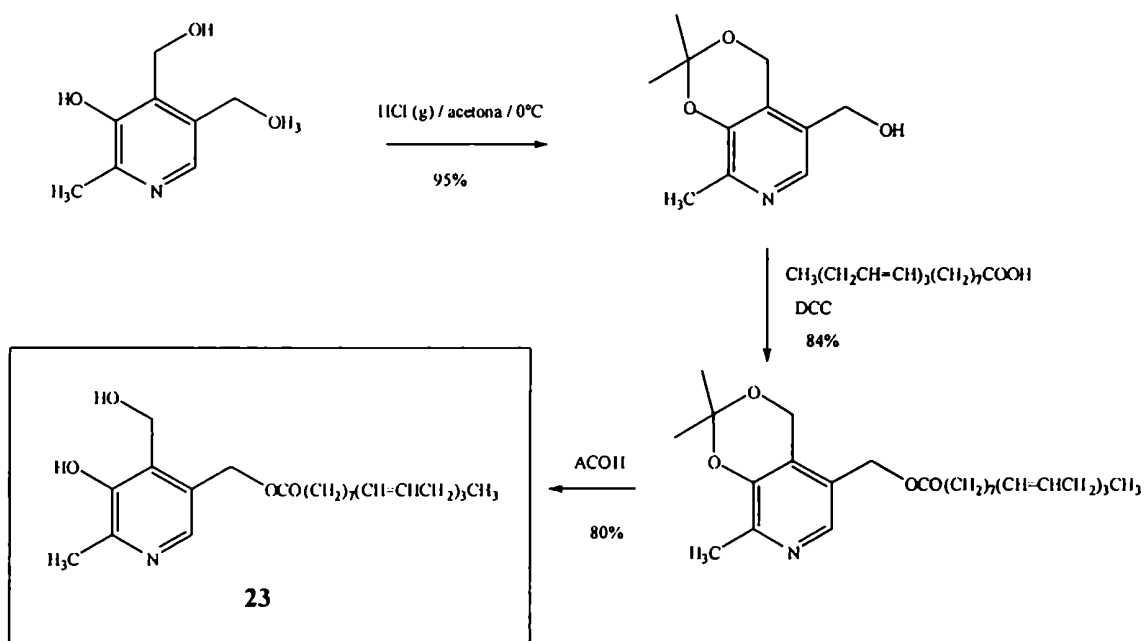


Esquema 2.11

Tanto en las reacciones de acilación como en las de alcoholisis la posición preferencial en donde actuaron las enzimas fue sobre el sustituyente presente en la posición 5 del anillo piridínico de la piridoxina, sin afectarse este comportamiento por la presencia de sustituyentes en los otros grupos hidroxilos.

Al realizar una exhaustiva búsqueda bibliográfica se encontró que los derivados acetilados **3** a **6** habían sido descritos con anterioridad.<sup>2,4,6,14</sup> Sin embargo las publicaciones halladas datan de hace muchos años y en consecuencia no poseen una descripción espectroscópica completa. En este trabajo se completó la caracterización espectroscópica. Los experimentos de RMN bidimensional (HETCOSY y COLOC) permitieron la asignación inequívoca de todas las señales.

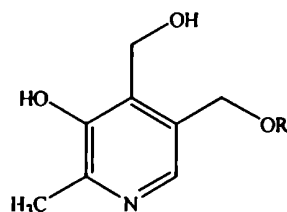
Asimismo se observó que la mayoría de los derivados de piridoxina monoacilados en la agrupación de la posición 5 preparados en este trabajo, no habían sido descritos hasta el momento. El único encontrado fue 5-(9,12,15-octadecatrienoil)oxi-3-hidroxi-4-hidroximetil-2-metilpiridina (**23**) y su preparación involucra tres pasos de síntesis con un rendimiento global del 46% (Esquema 2.12).<sup>15</sup>



**Esquema 2.12**

El método enzimático no sólo requiere de condiciones de reacción más suaves y menos contaminantes sino que disminuye considerablemente el número de pasos y brinda un rendimiento que supera en 15 puntos al obtenido mediante la ruta sintética convencional.

Otros análogos acilados encontrados en literatura fueron 5-(6,9,12-octadecatrienoil)oxi-3-hidroxi-4-hidroximetil-2-metilpiridina (26) y 5-hexadecanoiloxi-3-hidroxi-4-hidroximetil-2-metilpiridina (27), su síntesis también requiere de varios pasos.<sup>6, 16</sup>



- 26 R = CO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>(CH=CHCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>  
 27 R = CO(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CH<sub>3</sub>

Como conclusión final se puede decir que el método enzimático simplifica notablemente la preparación de los compuestos mencionados, no requiriéndose el uso de grupos protectores debido a la regioselectividad evidenciada por los biocatalizadores. De esta forma disminuye la longitud del camino sintético previamente descrito para algunos derivados de ácidos grasos y de piridoxina, lo que permite su preparación con rendimientos superiores. Además, se requieren condiciones suaves de reacción lo que permite disminuir el gasto de energía y en consecuencia el daño que pueda ser ocasionado al ecosistema.

### Referencias bibliográficas:

1. Baldessari, A., Iglesias, L.E. y Gros, E.G. *Biotechnol.Lett.*, **1994**, 16, 479.
2. Testa, E. y Fava, F. *Chimia*, **1957**, 11, 307.
3. a) Kayser, F., Biesemans, M., Gielen, M. Y Willem, R., *Main Group Met.Chem.*, **1994**, 17, 559. b) Kayser, F., Biesemans, M., Gielen, M. Y Willem, R., *Magn.Reson.Chem.*, **1994**, 32:6, 358.
4. Societé Belge de l'Azote et des Produits Chimiques du Marly, Belg. 640,827, Junio 5, **1964**. CA 63:587h.
5. a) Klivanov, A.M., *Chemtech.*, **1986**, 16, 354. b) Zaks, A. y Klivanov, A.M., *J.Biol.Chem.*, **1988**, 82, 3192.
6. Korytnyk, W. y Paul, W. *J.Org.Chem.* **1967**, 32, 3791.

- 
7. Faber, K. y Riva, S., *Synthesis*. **1992**, 895.
  8. Barone, V., *Tesis de Lic. en Ciencias Físicas*, Dpto. de Física, F.C.E y N, UBA, **1999**.
  9. Simopoulos, A.P., *Lipids*. **1999**, 34, S297.
  10. Baldessari, A. y Mangone, C.P. Conicet, Argentina, Patente en trámite: INPI, AR 00 01 04147, Agosto 11, **2000**.
  11. a) Griffin, W.C., *J.Soc.Cosmet.Chem.* **1949**, 1, 311. b) Griffin, W.C. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. **1954**, 5, 259.
  12. Becher, P. *Emulsions: Theory and Practice*. **1966** (Marcel Dekker, New York).
  13. a) Baldessari, A., Mangone, C.P. y Gros, E.G., *Helv. Chim. Acta* **1998**, 81, 2407. b) Baldessari, A. y Mangone, C.P. *Biocatalysis and Biotransformation*, **2002**, 20 (4), 275.
  14. a) Korytnyk, W., Kris, E.J. y Singh, R.P. *J.Org.Chem.* **1964**, 29, 574. b) Harris, S.A. *J.Am.Chem.Soc.* **1940**, 62, 3203.
  15. Wakabayashi Toshio y col. Terrumo Corp., Japón. JP59199674, Diciembre 11, **1984**, CA 102:131925.
  16. a) Taketami Sakuragi y Kummerow, F.A. *J.Am.Chem.Soc.* **1956**, 78, 839. b) Brown, L., Jhonston, G.A., Suckling, C.J., Halling, P.J. y Valivety, R.H. *J.Chem.Soc.Perkin.Trans. I* **1993**, 2777. c) Azar, R.F. y Grinda, J.R., Francia. FR 2633926, EP 356270, Diciembre 1, **1990**, CA 113:211857.

# *Capítulo IV*

*Resultados y discusión*





## 1. REACCIONES DE AMINOLISIS CATALIZADAS POR LIPASAS

Los resultados hasta aquí presentados mostraron el comportamiento de las lipasas en reacciones de transesterificación.<sup>1</sup> Como se discutió en la introducción las lipasas pueden actuar como catalizadores en otro tipo de reacciones. Una vez formado el complejo acilenzima, distintos nucleófilos pueden reaccionar con la misma dando lugar a reacciones de hidrólisis, aminólisis, formación de epóxidos, etc. (Figura 3.1)

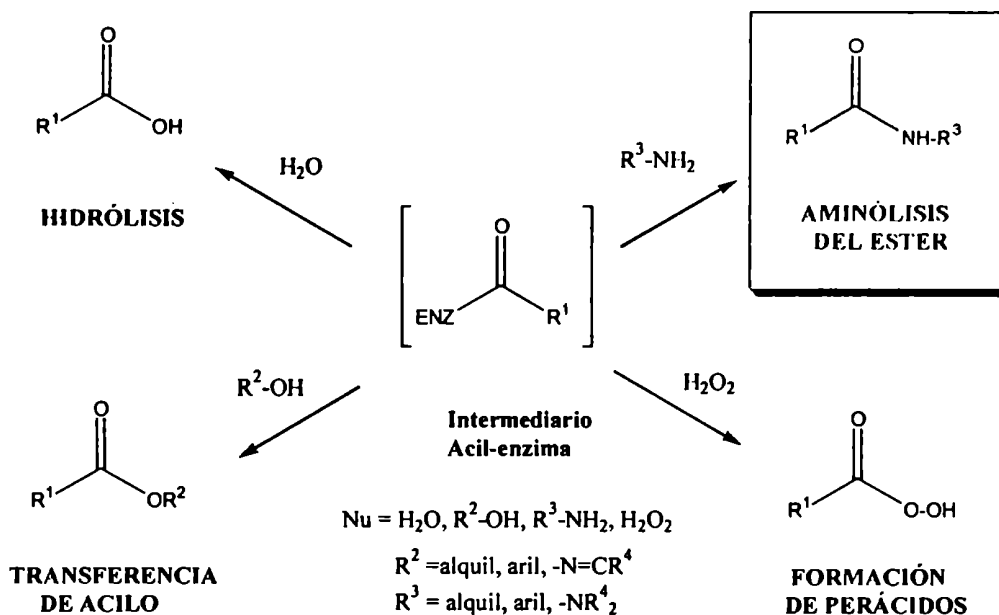


Figura 3.1

En este capítulo, en particular, se discutirá la capacidad de las lipasas para actuar como catalizadores en la formación de enlaces amida.

La aplicación de lipasas para catalizar reacciones de amidación constituye una interesante alternativa a los métodos convencionales que usan proteasas debido a la capacidad de estas enzimas para actuar en solventes orgánicos en donde la actividad amidasa es prácticamente nula. Esta metodología ha sido aplicada a la síntesis de D- y L- aminoácidos protegidos<sup>2</sup>, a la preparación de derivados de aminoazúcares<sup>3</sup>, en aminólisis de ésteres para la resolución tanto de ácidos carboxílicos como aminas quirales<sup>4</sup>, etc. Las reacciones de aminólisis catalizadas por lipasas, en donde el nucleófilo es directamente amoníaco (Figura 3.1,

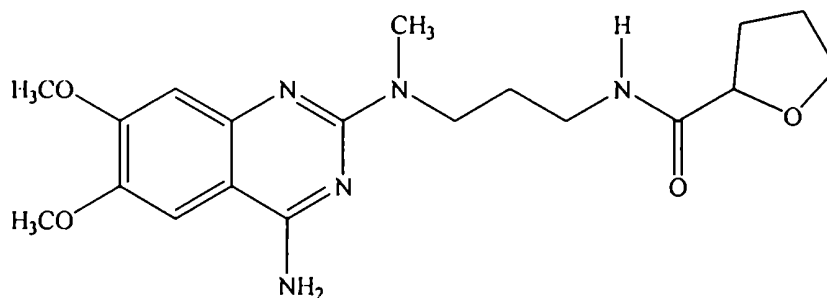
$R^3=H$ ), han sido llevadas a cabo con éxito a partir de ésteres<sup>4,5,6</sup> y aminoésteres<sup>6</sup> y en la preparación de amidas a partir de ácidos carboxílicos.<sup>7,8</sup>

Teniendo en cuenta lo conveniente que resultaría la preparación de amidas sustituidas partiendo directamente de ácidos carboxílicos, se consideró la posibilidad de desarrollar un procedimiento enzimático que combinara en un solo paso, la esterificación del ácido seguida de la aminólisis del éster formado, en el mismo medio de reacción y mediante un mecanismo catalizado por lipasas (Esquema 3.1).



**Esquema 3.1**

Este tema ya había comenzado a desarrollarse en nuestro grupo de trabajo aplicándose con éxito a la síntesis de un intermediario de alfuzosin<sup>9</sup>.



**ALFUZOSIN**

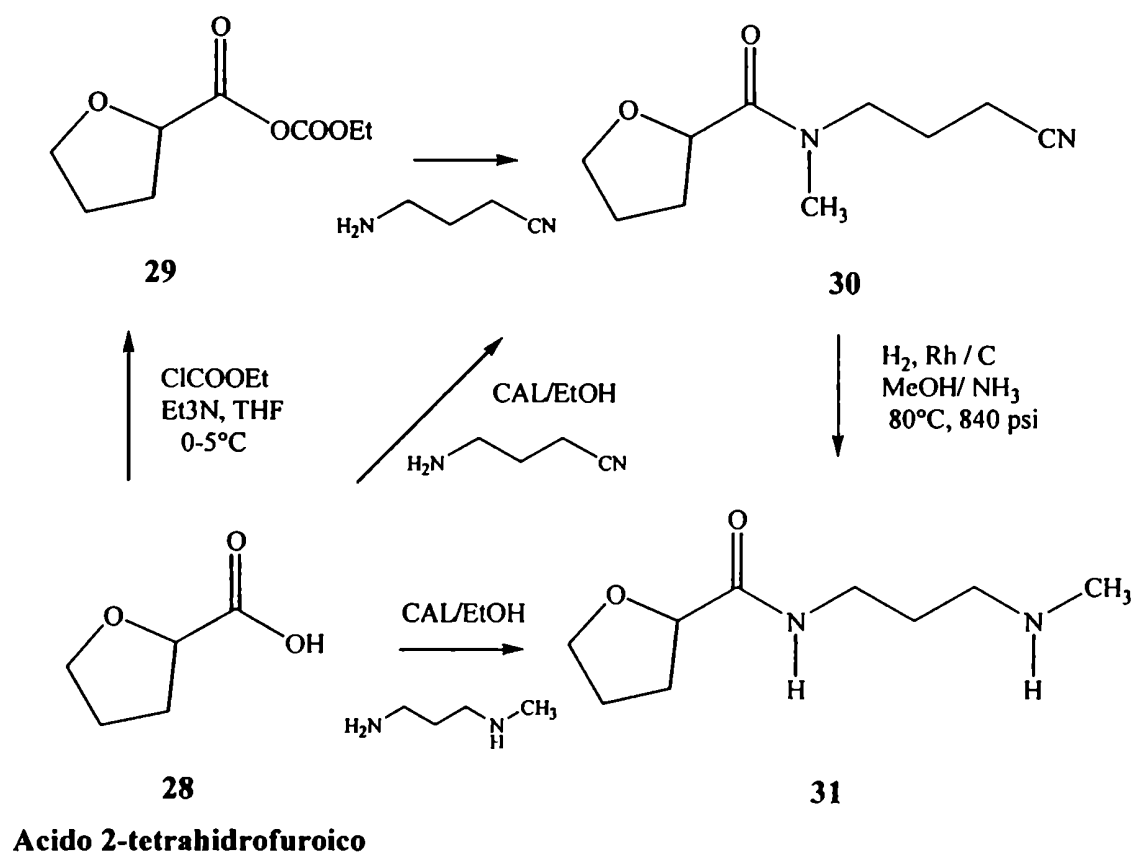
**Figura 3.2**

Alfuzosin es un derivado de quinazolina que actúa en forma competitiva y selectiva como un potente antagonista de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos que intervienen en la contracción de la próstata, la cápsula prostática, la uretra proximal y el músculo base de la vejiga, reduciendo los síntomas asociados a la hipertrofia prostática benigna.<sup>10</sup> La hipertrofia

prostática benigna es considerada uno de los principales riesgos para la salud en la sociedad moderna. La frecuencia de esta enfermedad aumenta de un 8% en la cuarta década de vida a aproximadamente 90-100% en la novena década.<sup>11</sup>

Han sido descritas en literatura varias rutas para la síntesis química de alfuzosin que involucran como principal intermediario la tetrahidro-*N*-[3-(metilamino)-propil]-2-furancarboxamida **31** (Esquema 3.2).<sup>12</sup>

La preparación del mencionado intermediario se logra por tratamiento de derivados de ácido con aminonitrilos para dar nitrilamidas de tipo **30**, que por reducción dan origen a compuestos del tipo **31** según se indica en el Esquema 3.2:



La síntesis involucra como primer paso la activación del ácido carboxílico mediante la formación del anhídrido mixto **29** que se prepara por tratamiento del ácido carboxílico **28** con cloroformiato de etilo y trietilamina a baja temperatura y bajo atmósfera de nitrógeno. En un segundo paso, se obtiene por destilación al vacío el compuesto **30**, producto de la

reacción de **29** con 3-(metilamino)-propanonitrilo. La nitrilamina es hidrogenada en una solución de amoníaco en etanol a 80° C y 840 Psi empleando Rh/C como catalizador para dar **31** a través de un reordenamiento que involucra la migración del grupo metilo de un nitrógeno al otro.

En el procedimiento desarrollado en nuestro laboratorio, el compuesto **31** se obtiene por adición de *N*-metil-1,3-propanodiamina al medio de reacción en donde previamente se formó el éster etílico del ácido tetrahydrofuroico mediante la reacción catalizada por lipasa del ácido **28** con etanol.

Todo el procedimiento se lleva a cabo en un solo paso sin aislar el éster etílico del ácido tetrahydrofuroico, el cual se obtiene con un rendimiento cuantitativo mediante catálisis enzimática. Igual a lo observado en las alcoholisis de los derivados de piridoxina descritas en el capítulo II, el empleo de etanol como solvente y reactivo no alteró la eficiencia del catalizador a pesar de ser considerado inapropiado para llevar a cabo reacciones enzimáticas en medio orgánico.

Considerando la ruta sintética informada en literatura se realizaron ensayos preliminares empleando la mencionada metodología en la reacción del ácido tetrahydrofuroico con 3-(metilamino)-propanonitrilo. El producto **30** se obtuvo con un rendimiento del 81%, sin embargo para la obtención del intermediario **31** es necesario un paso adicional de síntesis (Esquema 3.2).

La catálisis enzimática permite desarrollar la reacción a temperaturas moderadas (30° C), como la enzima es insoluble en el medio de reacción, puede ser removida fácilmente por filtración al final del proceso. Esto no sólo facilita el “work-up” de la reacción sino que permite su sencilla recuperación si se desea realizar el reciclaje de la enzima ya que CAL conserva el 80% de la actividad luego de 8 ciclos de reacción.

También se realizaron reacciones en escala preparativa empleando 20 g de CAL. A pesar de que el rendimiento de **31** disminuyó de 72% a 69%, el resultado sirvió para confirmar la factibilidad de emplear la metodología para la producción del intermediario **31** a gran escala.

La metodología para la preparación de **31** desarrollada por nuestro grupo de trabajo presenta como ventaja adicional su bajo impacto en el medio ambiente. Los biocatalizadores son completamente biodegradables y el procedimiento requiere

condiciones de reacción que van de suaves a moderadas a diferencia de los reactivos altamente tóxicos y sensibles al agua requeridos en la ruta química convencional como por ejemplo el cloroformiato de etilo (Esquema 3.2). Por otra parte, el rendimiento global del producto **31** a partir de ácido tetrahydrofuroico para el procedimiento enzimático (72%) es notablemente superior al obtenido mediante síntesis química (41%).

### 1.a. Optimización de las condiciones de reacción

En virtud del éxito obtenido en la síntesis del intermediario de alfuzosin se decidió continuar estudiando la metodología enzimática para la obtención de amidas sustituidas empezando con la optimización de los parámetros de reacción.

Empleando como sistema modelo ácido hexanoico y n-propilamina se comenzó analizando la influencia del tipo de enzima. Para ello se probó el procedimiento con 4 lipasas comerciales (PPL, LIP, CRL y CAL) y 4 proteasas (papaina, quimotripsina, proteasa bacteriana y proteasa fúngica). Los resultados se resumen en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Esterificación y aminólisis de ácido hexanoico catalizada por enzimas en un solo paso.<sup>a</sup>

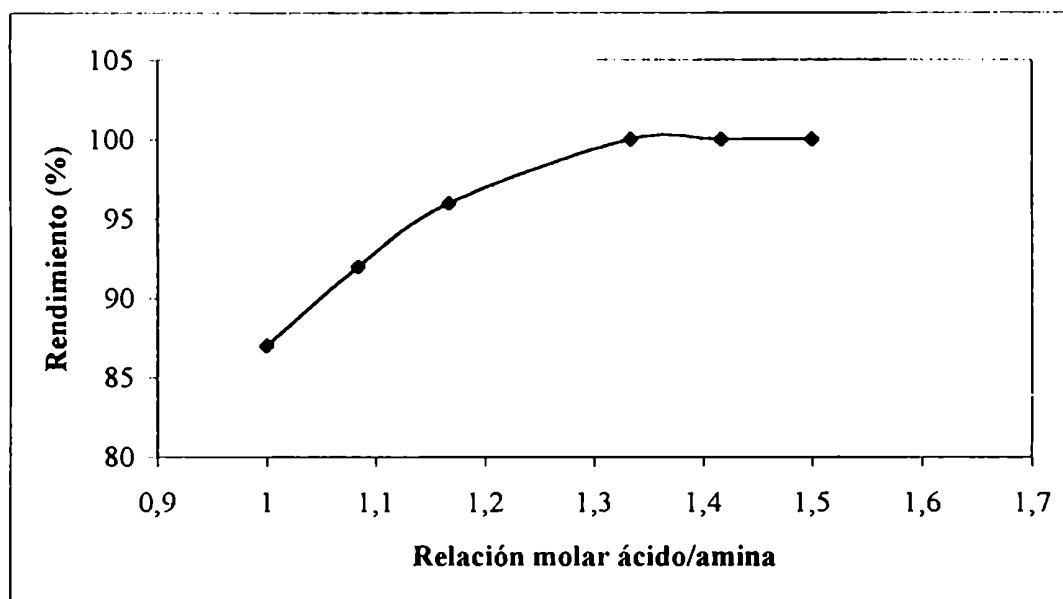
Enzima	% Conversión <sup>b</sup>	
	Ester	Amida
Ninguna	n.d.	n.d.
Lipasa pancreática porcina (PPL)	96	68
Lipozyme (LIP)	97	64
Lipasa de <i>Candida rugosa</i> (CRL)	98	78
Lipase de <i>Candida antarctica</i> (CAL)	100	100
Quimotripsina <sup>c</sup>		2
Papaina <sup>c</sup>		n.d.
Proteasa bacteriana <sup>c</sup>		n.d.
Proteasa fúngica <sup>c</sup>		n.d.

<sup>a</sup> Las reacciones se llevaron a cabo bajo condiciones estándar, tiempo: conversión éster: 3h; amida: 3d. <sup>b</sup> Determinado por CG y CG/ EM; n.d.: no se detecta producto. <sup>c</sup> Reacción del ácido con la amina.

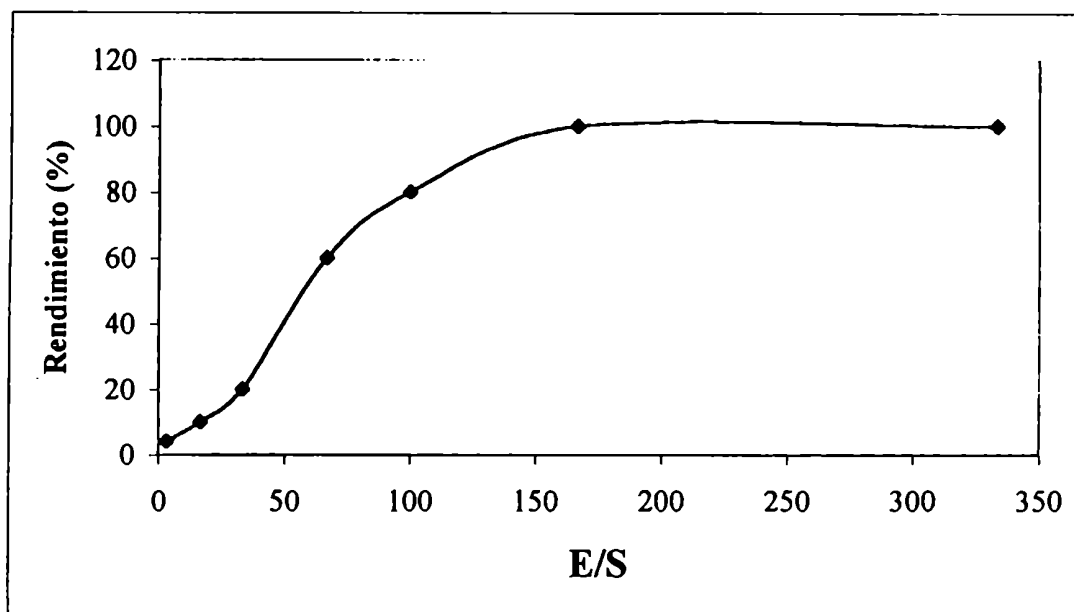
Como puede observarse en la Tabla 3.1 ninguna de las proteasas mostró actividad mientras que para las lipasas este parámetro fue variable, siendo CAL la más activa.

La esterificación de ácido caproico catalizada por CAL fue ensayada empleando distintos solventes tales como, etanol absoluto, isopropanol y *n*-butanol. En todos los casos se los usó en exceso, es decir como solvente y como agente esterificante. Los tres alcoholes dieron origen a los respectivos ésteres con rendimiento cuantitativo luego de 3 hs de reacción. Adicionalmente se probó la reacción con etanol comercial 96%, sin embargo el rendimiento obtenido para el éster no fue cuantitativo y el rendimiento en el paso de aminólisis disminuyó en un 23%.

Otros parámetros analizados fueron la influencia de las relaciones ácido/amina y enzima/sustrato en el rendimiento de la reacción (Figuras 3.3 y 3.4).



**Figura 3.3.** Influencia de la relación ácido/amina en la esterificación y aminólisis de ácido caproico catalizada por CAL.



**Figura 3.4.** Influencia de la relación enzima/sustrato en la esterificación y aminólisis de ácido caproico catalizada por CAL.

Luego de repetirse la reacción empleando una concentración fija de ácido caproico (0,6 M) y variando la cantidad de n-propilamina agregada entre 3 y 4,5 mmoles, se observó un máximo en el rendimiento cuando la relación molar ácido/amina alcanzó el valor de 1,3 (Figura 3.3)

Asimismo, las experiencias realizadas para la determinación de la relación enzima/sustrato óptima se hicieron variando la cantidad de CAL en el sistema de reacción de 10 a 1000 mg con una concentración de ácido de 0,6 M y una relación molar ácido/amina de 1,3 (Figura 3.4). El rendimiento en las reacciones de aminólisis alcanzó el 20 % al emplear 100 mg de CAL y 3 mmoles de ácido, llegando a su valor máximo con 500 mg de enzima (100%).

Al llevar a cabo experimentos para analizar la capacidad de reciclaje de la enzima, se observó una disminución en el rendimiento de apenas el 10% luego de usar la enzima recuperada para 8 reacciones consecutivas con sustrato, etanol y amina frescos.

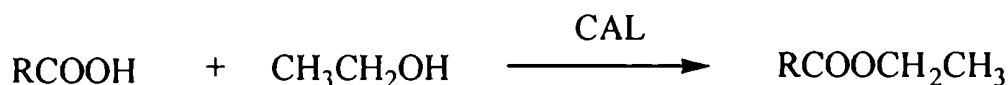


**1.b. Aplicación del procedimiento enzimático en distintos ácidos carboxílicos y aminas**

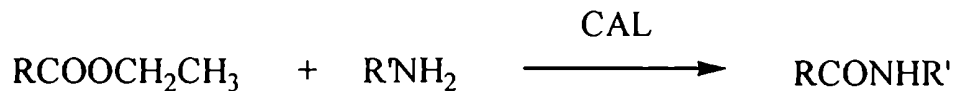
Posteriormente, se estudió la aplicación del procedimiento enzimático en distintos ácidos carboxílicos y aminas. Se analizaron aspectos tales como la naturaleza de la amina y del ácido empleados como sustratos, la influencia de la longitud de la cadena hidrocarbonada del ácido, regio y quimio-selectividad de la reacción, etc.

Teniendo en cuenta las condiciones de reacción optimizadas en el ítem 1.1, se decidió llevar a cabo todas las reacciones empleando CAL como biocatalizador, etanol como solvente y agente esterificante, concentración de ácido 0,6 M, relación molar ácido/amina 1,3 y relación enzima/sustrato de 167 (500 g de enzima por 3 mmoles de ácido).

Conforme a esto, se trató el ácido carboxílico con etanol en presencia de lipasa la cual cataliza en una primera etapa la reacción de esterificación:



Una vez lograda la conversión completa al correspondiente éster etílico, evidenciada mediante cromatografía gaseosa, se realizó el agregado de la amina al medio de reacción, produciéndose en el mismo recipiente, sin aislar el producto de esterificación, la aminólisis del éster mediada por la misma enzima que catalizó la etapa anterior:



### 1.b.1. Reacción de ácidos carboxílicos saturados e insaturados con n-propilamina

Se comenzó estudiando la influencia en la reacción al aumentar la longitud del ácido empleado. Se empleó como material de partida una serie homóloga de ácidos carboxílicos de longitud variable entre 3 y 18 átomos de carbono. La aminólisis de los respectivos ésteres etílicos se realizó empleando una amina sencilla como es la n-propilamina. Tanto la esterificación como la aminólisis se llevaron a cabo a 30°C. Los resultados se resumen en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2.** Síntesis de amidas a partir de ácidos carboxílicos saturados e insaturados<sup>1</sup>

R	RCOOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>			RCONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>		
	Producto	t (hs)	%	Producto	t (días)	%
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	32	2	100	33	2	93
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	34	3	100	35	3	100
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -	36	3	100	37	7	98
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -	38	3	100	39	8	85
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> -	40	3	100	41	8	87
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> - <i>cis</i>	42	3	100	43	8	89
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> - <i>trans</i>	44	3	100	45	8	86

<sup>1</sup>Los tiempos de reacción presentados son aquellos que dieron lugar a la máxima conversión.

Como puede apreciarse en la Tabla 3.2 la formación del éster no se vio afectada por la longitud de la cadena del ácido ya que los distintos ácidos carboxílicos probados dieron los respectivos ésteres con rendimientos cuantitativos en sólo tres horas de reacción (compuestos 32, 34, 36, 38, 40, 42 y 44). En la aminólisis, en cambio, al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada del ácido, fue necesario un mayor tiempo de reacción para alcanzar el rendimiento máximo (compuestos 33, 35, 37, 39, 41, 43 y 45).

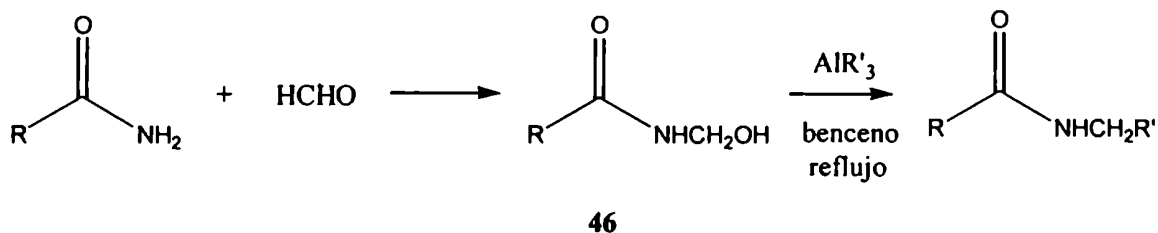
Con la finalidad de disminuir los tiempos de reacción, particularmente en el paso de aminólisis, se decidió aumentar la temperatura de reacción de 30°C a 40°C (Temperatura de ebullición n-propilamina = 48°C). En la Tabla 3.3 pueden observarse los grados de conversión alcanzados al modificarse esta variable experimental. Como era de esperarse, el incremento de la temperatura disminuyó los tiempos de reacción tanto en el paso de esterificación como en el de aminólisis, sin embargo, se produjo una pequeña caída en el rendimiento de la amida.

**Tabla 3.3. Síntesis de amidas a 40°C<sup>1</sup>**

R	RCOOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>			RCONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>		
	Producto	t (hs)	%	Producto	t (días)	%
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -	36	1	100	37	4	90
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -	38	1	100	39	4	79
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> -	40	1	100	41	4	75

<sup>1</sup>Los tiempos de reacción presentados son aquellos que dieron lugar a la máxima conversión.

Resulta interesante destacar los resultados obtenidos al emplear ácidos carboxílicos insaturados. La metodología enzimática resultó muy útil para la síntesis de N-propiloleamida (43) y N-propilelaidamida (45), permitiendo la preparación de estos compuestos con elevados rendimientos bajo condiciones de reacción suaves. Debido a que este tipo de compuestos presentan propiedades como repelentes de insectos, se han realizado muchos esfuerzos para prepararlos a través de métodos químicos convencionales. Sin embargo, todas las alternativas propuestas presentan una serie de desventajas que no posee la metodología enzimática: requieren condiciones de reacción drásticas, como presión y temperatura muy elevadas<sup>13</sup>, reactivos sensibles al aire<sup>14</sup>, o bien la síntesis involucra varios pasos en donde la mono-N-alkilación de amidas se logra a través de la reducción de derivados de metiloles (46) con reactivos de trialquilaluminio (Esquema 3.3).<sup>15</sup>



Esquema 3.3

### 1.b.2. Reacción de ácidos carboxílicos polifuncionales con n-propilamina

Continuando con los estudios sobre la aplicabilidad del procedimiento enzimático se ensayó la reacción de formación de amidas empleando ácidos carboxílicos polifuncionales de diferente naturaleza tales como aminoácidos, ácidos policarboxílicos e hidroxiácidos. Comenzando con el grupo de los aminoácidos, se estudió el comportamiento en la mencionada reacción de diferentes análogos naturales y no naturales los cuales se muestran en la Figura 3.5.

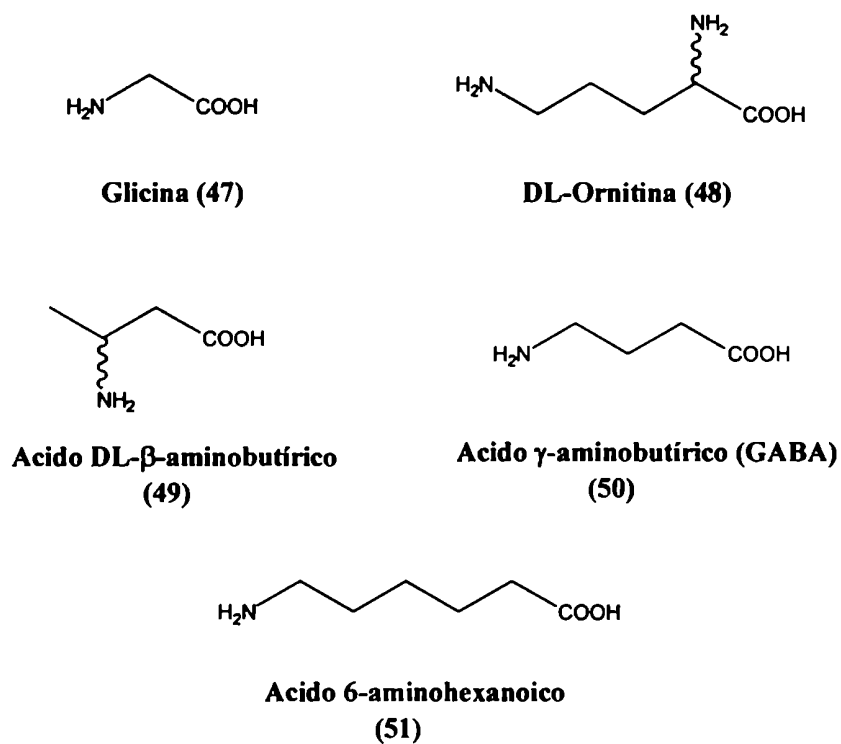
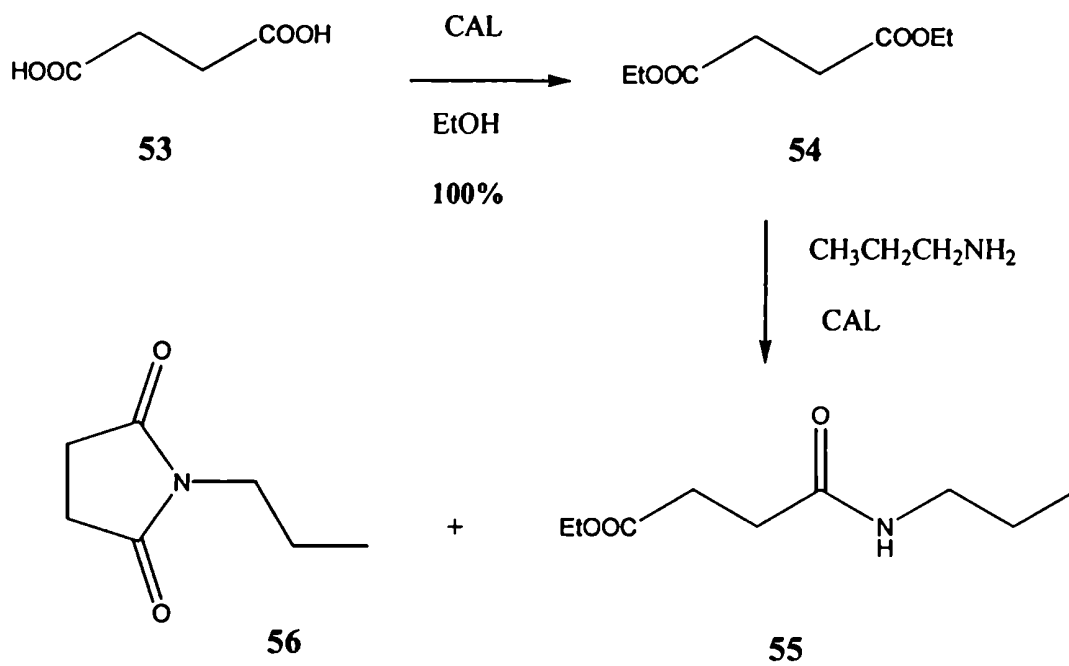


Figura 3.5

A pesar de que se probaron distintos aminoácidos en donde el grupo amino se encuentra en distintas posiciones relativas respecto del grupo carboxílico ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  aminoácidos), el procedimiento enzimático no resultó útil para preparar sus correspondientes amidas. Con excepción del 6-aminohexanoico que dio el éster etílico **52** con un rendimiento muy bajo, no se logró la esterificación enzimática con ninguno de los demás aminoácidos probados. Esto pudo deberse a la escasa solubilidad de los sustratos en el medio de reacción o bien a la naturaleza iónica de los mismos que les impide interactuar adecuadamente con el sitio activo de CAL.

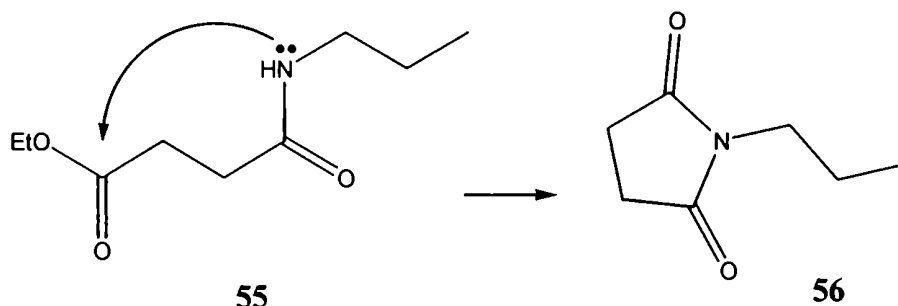
Debido a que los aminoácidos son solubles en agua y en solventes de polaridad alta, el medio de reacción no resultó una variable posible de modificar. En cambio si fue factible modificar el catalizador enzimático. Para ello se probó la metodología empleando proteasas de distintas fuentes (proteasa bacteriana, proteasa fúngica, polvo acetónico de *Bromelia laciniosa*) como catalizadores en la reacción de glicina (**47**) con n-propilamina en etanol. Sin embargo, los resultados fueron similares a los obtenidos con la lipasa, luego de 7 días de mantener al sustrato en agitación con etanol no se logró su esterificación ni tampoco la formación de la amida transcurridos 15 días a partir del agregado de la amina.

Para estudiar la aplicación de la metodología en ácidos policarboxílicos, se empleó como modelo el ácido succínico (**53**). A partir del mismo se obtuvo, luego de 24 hs, el diéster **54** con un rendimiento del 100%. Sin embargo la aminólisis con n-propilamina dio lugar a diferentes productos mayoritarios dependiendo del tiempo de reacción (Esquema 3.4).



Esquema 3.4

Luego de transcurridos 2 días a partir del agregado de n-propilamina, el análisis por CGL indicó desaparición completa del diéster 54 y la formación de dos productos de reacción en relación 7:3. Los compuestos se purificaron por cromatografía en columna de sílica gel y se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas. El análisis por EM del producto mayoritario reveló la presencia del ión molecular  $M^+$  a  $m/z$  187 indicando la incorporación de un solo nitrógeno a la molécula. A partir de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se logró determinar la estructura del compuesto identificado como el amidoéster 55. Asimismo, el espectro de masa realizado al producto minoritario también indicó un ion molecular impar pero de menor valor. Teniendo en cuenta la capacidad nucleofílica que puede presentar el nitrógeno de la amida, la relación  $m/z$  obtenida para  $M^+$  (141) resultó compatible con el producto de heterociclación del amidoéster 55.



Esta suposición se confirmó mediante el análisis por RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) a partir del cual se identificó al producto secundario obtenido en la aminólisis del succinato de etilo (**54**) como *N*-propilsuccinimida (**56**). Estos resultados concuerdan con los resultados previamente informados por *Gotor y col.*<sup>16</sup>

Al prolongarse los tiempos de reacción, el seguimiento de la reacción por cromatografía gaseosa indicó una importante variación en la relación de los dos productos antes mencionados. Así, transcurridos 6 días contados a partir del agregado de amina, el producto de ciclación, la *N*-propilsuccinimida **56**, se convirtió en el componente mayoritario de la mezcla de reacción, alcanzando valores de conversión del 57%. (Tabla 3.4)

**Tabla 3.4.** Reacción de ácido succínico con *n*-propilamina

Tiempo (días)	Diéster <b>54</b>	Amidoéster <b>55</b>	<i>N</i> -propil succinimida ( <b>56</b> )
	Conversión (%)	Conversión (%)	Conversión (%)
1 <sup>a</sup>	100		
2 <sup>b</sup>	10	73	17
6 <sup>b</sup>	7	36	57

<sup>a</sup> Esterificación con etanol. <sup>b</sup> Tiempo a partir del agregado de *n*-propilamina

Al intentar el procedimiento con ácidos más funcionalizados, como L-tartárico y cítrico (Figura 3.6, Tabla 3.5), no fue posible obtener los correspondientes ésteres etílicos. Igualmente a lo ocurrido en el caso de los aminoácidos, la baja solubilidad de los sustratos en el medio de reacción o bien la estructura química de los mismos que les impide interactuar con el sitio activo de la enzima, podrían ser causales de la ineficacia del proceso catalítico.

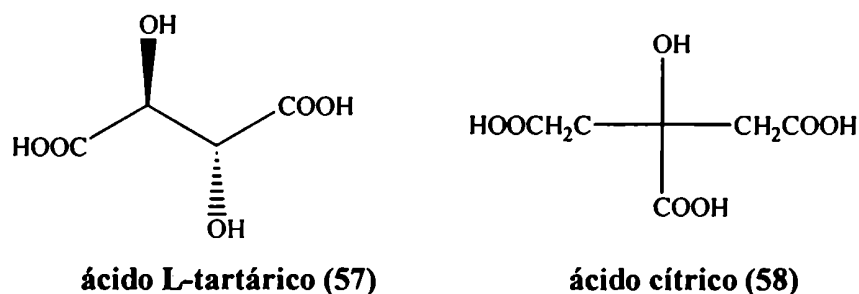


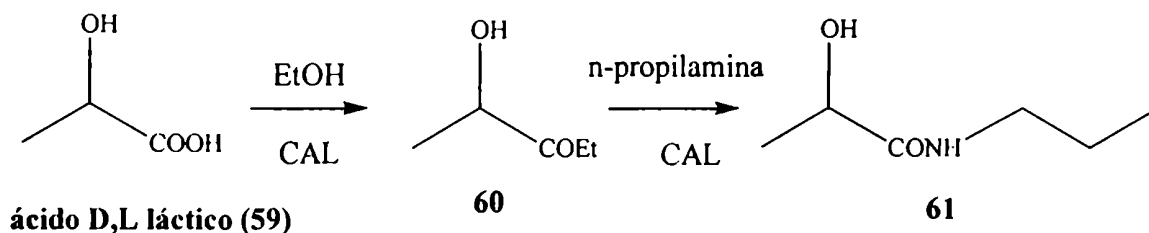
Figura 3.6

Tabla 3.5. Aplicación del procedimiento enzimático en hidroxiaácidos y ácidos policarboxílicos.

sustrato	RCOOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>		RCONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	
	Tiempo (días)	Conversión (%)	Tiempo (días)	Conversión (%)
Ácido L-tartárico (57)	7	0	15	0
Acido cítrico (58)	7	0	15	0
Acido D,L láctico (59)	1	100	4	100

Contrariamente, el ácido D,L láctico, un hidroxiaácido, se comportó como un excelente sustrato tanto en la reacción de esterificación como en la aminólisis con n-propilamina del éster etílico formado *in-situ* dando origen a la hidroxiamida 59 con un rendimiento cuantitativo (Esquema 3.5, Tabla 3.5).

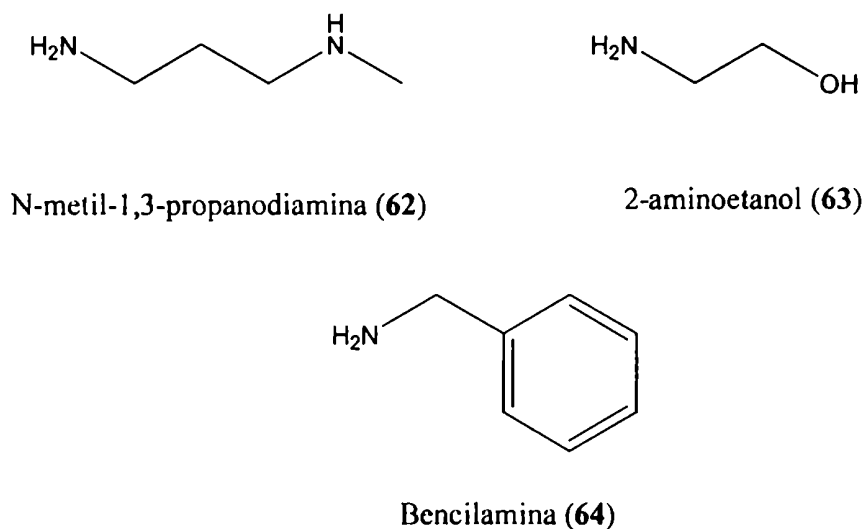




Esquema 3.5

### 1.b.3. Reacción de ácido caproico con diferentes aminas

La naturaleza de la amina utilizada en la reacción de aminólisis fue otro aspecto que se consideró interesante estudiar. En particular en aquellos casos en donde podía encontrarse regio o quimio-selectividad. De acuerdo con esta idea y empleando ácido caproico como sustrato modelo se analizó la reacción de aminólisis catalizada por CAL con las aminas cuya estructura se muestra a continuación:



Al realizar el paso de aminólisis con la amina 62 el análisis por CG/EM reveló la desaparición completa del caproato de etilo y la aparición de un nuevo pico con un ion molecular  $M^+$  a  $m/z$  186. Este resultado sugiere dos estructuras posibles para el producto de reacción ya que la amina 62 posee dos centros nucleofílicos (Figura 3.7).

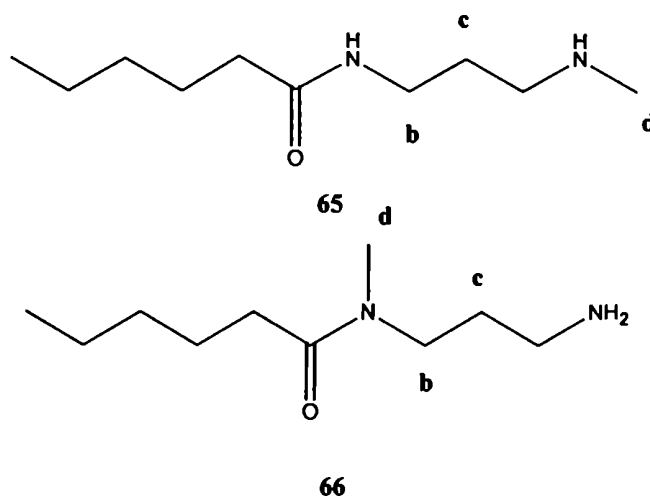


Figura 3.7

La identidad del producto se determinó por espectroscopía de RMN luego de realizar su purificación por cromatografía en columna. En la Figura 3.8 se muestra el espectro de RMN de H<sup>1</sup> obtenido.

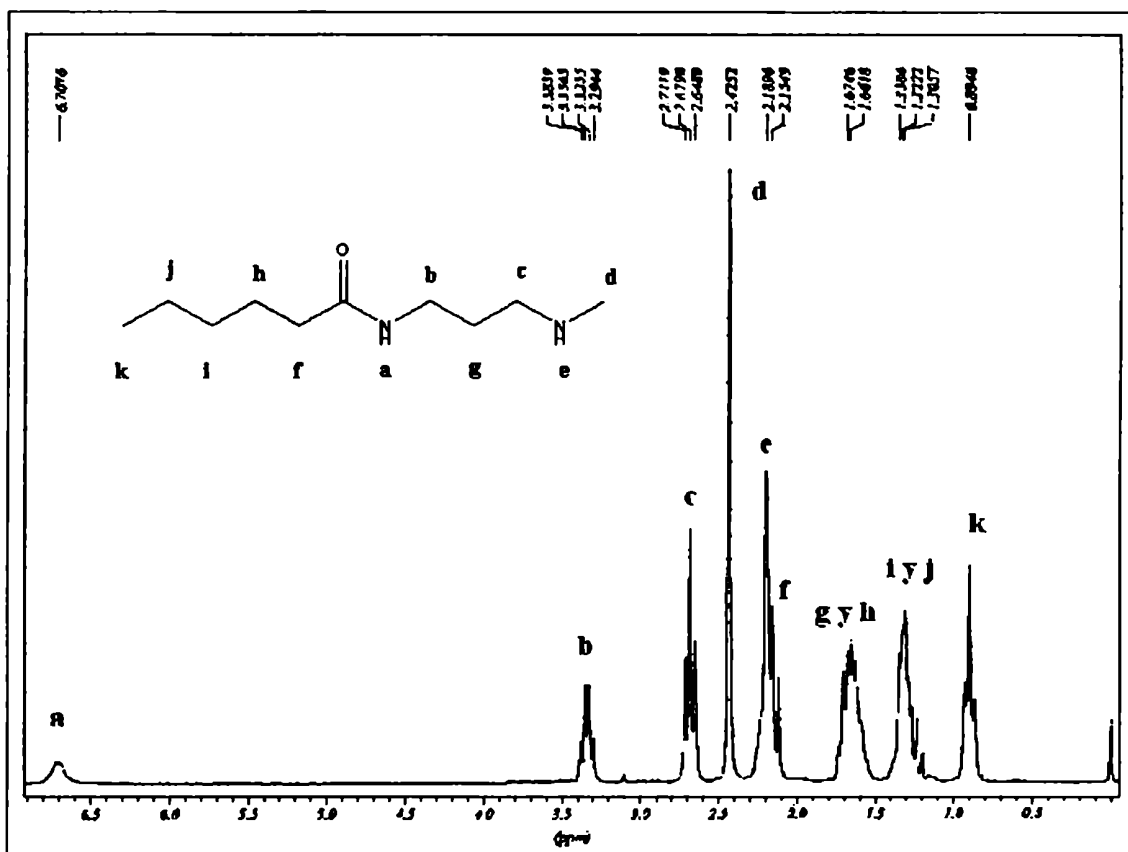


Figura 3.8

Si se examina el espectro puede apreciarse una señal que resuena a 3,34 ppm que corresponde a los hidrógenos del carbono adyacente al nitrógeno de la amida ( $H_b$ , Figura 3.7). Si se tratara de la estructura **66** esta señal debería verse como un triplete ya que surge del acoplamiento con los hidrógenos del metileno adyacente ( $H_c$ , Figura 3.7). Sin embargo, la señal indicada aparece como un cuarteto, hecho que es consistente con la estructura **65**, en donde la multiplicidad es mayor a causa del desdoblamiento adicional producido por el H del grupo amida. Por otra parte, la señal del metilo **d** (Figura 3.7) que resuena a 2,42 ppm coincide con los valores esperados para el metilo de una amina, confirmando nuevamente la estructura **65**. En el compuesto **66**, el metilo **c** se halla unido al nitrógeno de una amida en consecuencia debería aparecer a valores de  $\delta$  mayores (2,9 ppm).

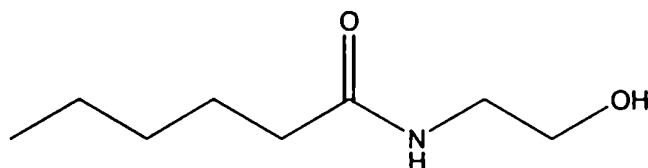
Teniendo en cuenta estos resultados puede afirmarse que CAL actuó de manera altamente regioselectiva en la reacción de aminólisis con N-metil-1,3-propanodiamina, produciendo la conversión completa a la amida **65** luego de 3 días de reacción (Tabla 3.6).

Asimismo, al ensayarse la aminólisis con 2-aminoetanol y bencilamina se lograron rendimientos cuantitativos luego de 3 días de reacción. En la Tabla 3.6 se muestran los porcentajes de conversión obtenidos.

**Tabla 3.6.** Síntesis de amidas a partir de ácido caproico.

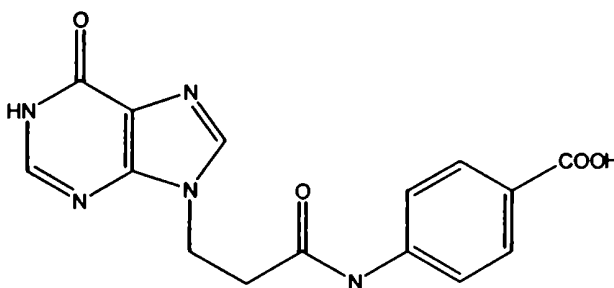
<b>R'</b>	<b>CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></b>		<b>CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CONHR'</b>		
	<b>t (hs)</b>	<b>%</b>	<b>Producto</b>	<b>t (días)</b>	<b>%</b>
CH <sub>3</sub> NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	3	100	<b>65</b>	3	100
HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	3	100	<b>67</b>	3	100
PhCH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	3	100	<b>68</b>	3	100

Es notable destacar la alta quimioselectividad presentada por CAL al utilizarse 2-aminoetanol como sustrato ya que condujo a la formación de la amida **67** exclusivamente.

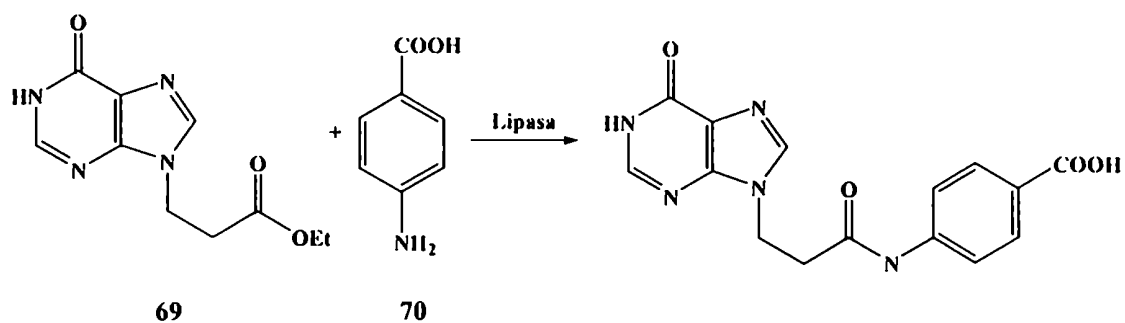
**67**

## 2. SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE AMIDAS COMPONENTES DE AGENTES TERAPÉUTICOS.

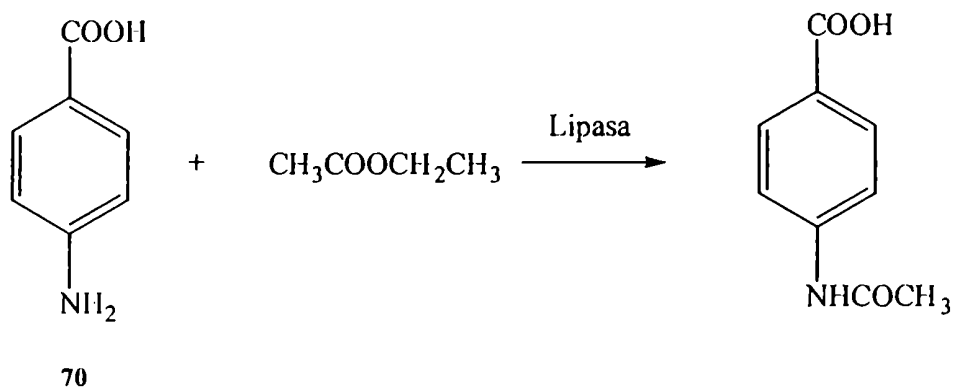
Con la finalidad de aplicar la metodología enzimática para la obtención de productos de interés farmacológico, se intentó desarrollar un procedimiento combinando la biocatálisis y la síntesis química convencional para la preparación del principio activo denominado AIT-082 (ácido 4-[3-(6-oxo-1,6-dihidro-9*H*-purin-9-il) propionamido] benzoico) que ha mostrado ser eficiente como agente terapéutico contra el difundido mal de Alzheimer.<sup>17</sup>

**AIT-082**

Conforme con este objetivo se analizó la posibilidad de preparar este compuesto a partir del éster **69** mediante la aminólisis enzimática con ácido p-aminobenzoico según se detalla en el Esquema 3.6:

**Esquema 3.6**

Antes de proceder a la preparación química del éster **69**, se decidió realizar ensayos preliminares para evaluar la capacidad de las enzimas de aceptar al grupo amino presente en el ácido p-aminobenzoico (**70**). Estas pruebas consistieron en estudiar la capacidad de **70** para realizar la aminólisis de acetato de etilo al emplear distintos catalizadores y medios de reacción (Esquema 3.7).

**Esquema 3.7**

En la Tabla 3.7 se muestran las distintas condiciones ensayadas.

**Tabla 3.7.** Reacción de ácido p-aminobenzoico con acetato de etilo

<b>Enzima</b>	<b>Solvente</b>	<b>Tiempo (días)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
CAL	etanol	15	n/r
CAL	DMF	15	n/r
CAL	THF	15	n/r
PSL-C	etanol	15	n/r

Los resultados de estos ensayos previos a la síntesis de AIT-082 mostraron que las enzimas ensayadas no son capaces de aceptar al ácido p-aminobenzoico como sustrato en la aminólisis del acetato de etilo. Esto lleva a suponer que tampoco serán capaces de aceptar ésteres más complejos como el requerido para la síntesis de la molécula blanco. Este comportamiento concuerda con lo observado hasta el momento al emplear lipasas como biocatalizadores, las cuales no pueden reconocer sustratos en donde el grupo funcional a transformar está unido directamente a un grupo benceno.

### 3. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL CAPITULO

En este capítulo se ha presentado un procedimiento enzimático muy eficiente para la preparación de carboxamidas N-sustituidas a partir de sus correspondientes ácidos carboxílicos.<sup>18</sup> La metodología propuesta consiste en efectuar dos reacciones consecutivas, en un mismo recipiente y mediante un mecanismo que involucra la acción catalítica de la misma enzima. Así, la lipasa en un primer paso cataliza la esterificación del ácido con etanol que a su vez cumple la doble función de reactivo de esterificación y de solvente de reacción. En una segunda etapa, la misma lipasa cataliza la aminólisis del éster etílico formado en el paso anterior.

El procedimiento tradicional para la obtención de amidas a partir de ácidos carboxílicos mediante síntesis química involucra condiciones drásticas de reacción, reactivos sensibles al aire o bien varios pasos de síntesis. La alternativa enzimática propuesta, en cambio,

permite obtener en un solo paso amidas a partir de ácidos carboxílicos bajo condiciones suaves de reacción.

La metodología enzimática resultó aplicable a una gran variedad de ácidos carboxílicos: de estructura lineal, cíclicos, saturados e insaturados, dicarboxílicos, con otros grupos funcionales presentes (hidroxiácidos), etc. Contrariamente, al emplear como sustratos aminoácidos y ácidos altamente funcionalizados (ácido cítrico, ácido tartárico) no se lograron obtener las correspondientes amidas.

El comportamiento selectivo de CAL pudo evaluarse a partir de la reacción de ácido caproico con diferentes aminas: con N-metil-1,3-propanodiamina se observó una marcada regioselectividad en la reacción ya que se obtuvo como único producto la amida secundaria. En el caso de la aminólisis con 2-aminoetanol la reacción resultó quimioselectiva ya que condujo a la formación de la amida exclusivamente.

La metodología presenta una interesante aplicación para la obtención de productos de interés farmacológico, empleándose con éxito en la preparación de tetrahidro-N-[3-metilamino-propil]-2-furancarboxamida, un intermediario clave en la síntesis de alfuzosin<sup>9</sup>.

#### **Referencias bibliográficas:**

- 
1. a) Baldessari, A., Mangone, C.P. y Gros, E.G., *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 2407. b) Baldessari, A. y Mangone, C.P. *Biocatalysis and Biotransformation*, **2002**, *20* (4), 275.
  2. a) So, J.E., Kang, S.H. y Kim, B.G: *Enzyme Microb. Technol.*. **1998**, *23*, 211. b) Margolin, A.L., Tai, D.F. y Klibanov, A.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7885.
  3. T. Maugard, M. Remaury-Simeon, D. Petre y P. Monsan, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 7587.
  4. Gotor, V. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **1999**, *7*, 2189.
  5. de Zoete, M.C., Kock-van Dalen, A. C., van Rantwijk, F. y Sheldon, R. A. *J. Chem. Commun.*, **1993**, 1831.
  6. de Zoete, M.C., Kock-van Dalen, A. C., van Rantwijk, F. y Sheldon, R. A. *Biocatalysis*, **1994**, *10*, 307.
  7. de Zoete, M.C., Kock-van Dalen, A. C., van Rantwijk, F. y Sheldon, R. A., *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, **1996**, *2*, 19.
  8. Hacking, M.A.P. J. , Wegman, M. A., Rops, J. , van Rantwijk , F. y Sheldon, R. A., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **1998**, *5*, 155.
  9. Baldessari, A. y Gros E.G., Boletín Marcas y Patentes, Ministerio de Economía y Obras y Servicios Públicos, INPI, **1668**, 132 (11-3-98).

- 
10. a) Cavero, I. y Hicks, P.E. *Brit. J. of Pharmacol.* **1985**, 86,612. b) Jardin, A., Bensadoun, H., Delauche-Cavallie, M.C.y Attali, P., *Lancet*, **1991**, 337,1457.
  11. Berry, S. J., Coffey, D. S., Walsh, P.C. y Ewing, L.L., *J. Urol.*, **1984**, 132, 474.
  12. a) Manoury, P. M., Binet, J. L., Dumas, A.P., Lefèbvre-Borg, F.y Cavero, I., *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 19.  
b) Manoury, P. M., (Synthelabo S.A.) US 4,315,007, 09 Feb 1982.
  13. Roe, E. T., Scanlan, J.T. y Swern, D., *J. Chem. Soc.*, **1949**, 2215.
  14. Benn, M. y Vohra, K. N., *Can. J. Chem.*, **1976**, 54, 136.
  15. Basha, A. y Weinreb, S. M., *Tetrahedron Lett.*, **1977**,17, 1465.
  16. Puertas, S., Rebolledo, F. y Gotor, V. , *Tetrahedron*, **1995**, 51, 1495.
  17. *Drugs of the Future*, **1997**, 22, 945.
  18. Baldessari, A. y Mangone, C.P., *J. Mol.Catal. B: Enzymatic*, **2001**, 11, 335.





# *Capítulo V*

*Resultados y discusión*



## REDUCCION DE COMPUESTOS CARBONILICOS POLIFUNCIONALES CATALIZADA POR CELULAS ENTERAS

Hasta el momento se describieron biotransformaciones catalizadas por enzimas aisladas. Sin embargo, si se desea recurrir a la biocatálisis para llevar a cabo una reacción de oxidoreducción es necesario, agregar cofactores al medio de reacción además de la enzima. Estos cofactores son difíciles de obtener y si bien son comerciales, su costo es elevado, razón por la cual es necesario regenerarlos. Como se describió en la introducción, una estrategia para facilitar el procedimiento consiste en emplear como catalizadores directamente células enteras de microorganismos. En la literatura pueden encontrarse una gran cantidad de ejemplos de biotransformaciones mediadas por levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*), quedando bien documentada su eficiencia como catalizadores redox en una gran variedad de reducciones estereoselectivas.<sup>1</sup> Asimismo, este catalizador puede usarse convenientemente en solventes orgánicos incrementando la solubilidad de los sustratos en el medio de reacción y evitando reacciones colaterales producidas por el agua.<sup>2</sup> Así, en la última etapa del desarrollo de esta investigación se estudió la reducción de compuestos carbonílicos en solventes orgánicos empleando como fuente de enzimas células enteras de microorganismos.

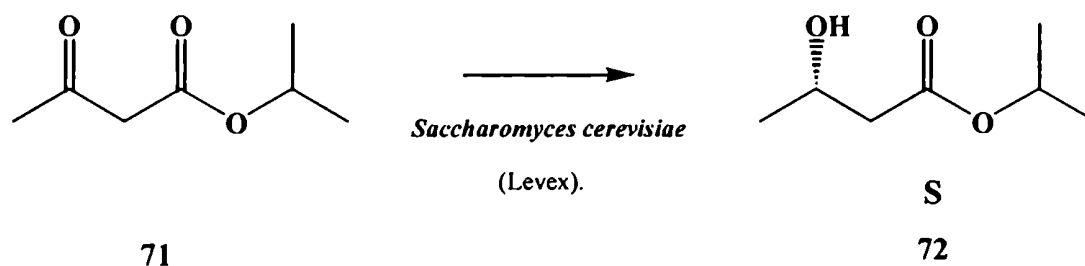
### 1. REDUCCIÓN DE ACETOACETATO DE ISOPROPILO CATALIZADA POR CEPAS INDUSTRIALES DE LEVADURA DE PANADERIA (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*)

Con el objetivo de poner a punto la metodología de trabajo en las reacciones catalizadas por células enteras, se comenzó estudiando la reducción de acetoacetato de isopropilo catalizada por cepas industriales de levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) en distintas condiciones experimentales. Si bien se han descrito en la literatura ejemplos de reducciones catalizadas por *Saccharomyces cerevisiae* con sustratos similares,<sup>2,3</sup> en todos ellos se emplea el microorganismo comercializado para uso en laboratorio. Para estas reacciones, en cambio, se usaron cepas industriales del microorganismo comercializadas

para el consumo humano (Levex®), las cuales pueden presentar diferente actividad y eficiencia para reducir sustratos de la misma especie.

Las reducciones se ensayaron en solventes orgánicos de baja polaridad (tolueno y hexano) y en medio acuoso. En este último caso se realizó una prueba adicional agregando glucosa al medio de reacción. El curso de las reacciones se estudió analizando los productos obtenidos luego de 12 y 24 hs de reacción.

En todos los casos el análisis por CGL confirmó la completa desaparición del compuesto de partida ( $t_R = 3,2$  min) junto con la aparición de un nuevo pico a  $t_R = 3,8$  min identificado mediante RMN y espectrometría de masa como el hidroxíéster **72** (Esquema 4.1).



**Esquema 4.1**

Al compararse las conversiones alcanzadas en los ensayos en medio orgánico con las obtenidas en las reacciones en medio acuoso no se observaron diferencias significativas ya que en todos los casos la conversión fue completa (Tabla 4.1). Sin embargo, al analizar un aspecto de mayor importancia práctica en las reducciones como es la enantioselectividad, las reacciones en solventes orgánicos resultaron más efectivas, superando los valores de exceso enantiomérico (ee) obtenidos al realizar la reacción en medio acuoso en aproximadamente casi 4 puntos (Tabla 4.1). El agregado de glucosa no mostró ninguna diferencia ya que se obtuvieron valores de conversión y ee similares para ambos casos.

Los solventes orgánicos ensayados no produjeron cambios en la estereoselectividad del catalizador ya que en todos los casos se obtuvo el alcohol de configuración *S*.

**Tabla 4.1.** Reducción de acetoacetato de isopropilo (71) catalizada por *Saccharomyces cerevisiae* (Levex®)

Solvente	Relación sustrato-biomasa (mmol/g)	tiempo de reacción (hs)	Conversión (%)	ee (%)
agua	0,5	12	100	93 (S)
agua	0,5	24	100	92 (S)
agua (glucosa)	0,5	12	100	90 (S)
agua (glucosa)	0,5	24	100	92 (S)
hexano	0,1	12	100	96 (S)
hexano	0,1	24	100	96 (S)
tolueno	0,1	12	100	96 (S)
tolueno	0,1	24	100	96 (S)

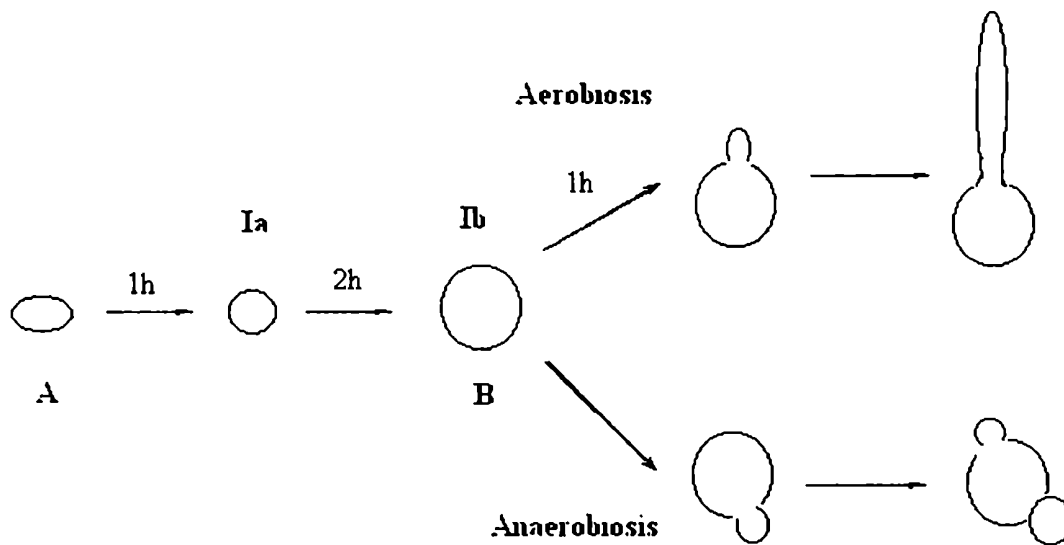
## 2. REDUCCIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍlicos POLIFUNCIONALES CATALIZADA POR EL HONGO *MUCOR ROUXII*

Con el objeto de extender el estudio de este tipo de metodología a otros microorganismos, se continuaron los estudios analizando la capacidad del hongo *Mucor rouxii* para actuar como catalizador en la reducción de compuestos carbonílicos polifuncionales tanto en medio acuoso como en medio orgánico.

En la literatura pueden encontrarse varios trabajos en donde se describe la actividad oxidorreductásica de diferentes especies de *Mucor*: una dihidroxiacetona reductasa en *Mucor Javanicus*<sup>4</sup>; una glutamato deshidrogenasa NAD-dependiente aislada de *Mucor racemosus*<sup>5</sup>; una carbonil reductasa NADPH-dependiente purificada de *Mucor ambiguus* con gran especificidad por policetonas conjugadas<sup>6</sup>; y una alcohol deshidrogenasa NAD-dependiente recientemente descubierta en *Mucor rouxii*, la cual se cree interviene en la reducción de acetaldehído a etanol.<sup>7</sup> Sin embargo, en los mencionados ejemplos se realiza la caracterización bioquímica de sus enzimas sin mencionarse nada acerca de su comportamiento biotecnológico.

## 2.a. Características de *Mucor rouxii*

Una de las características que distingue al *Mucor rouxii* de otras especies mucorales es el dimorfismo. Esta especie es capaz de adoptar uno de dos mecanismos alternativos de crecimiento dependiendo de las condiciones ambientales y desarrollarse bajo la morfología de micelio o bien de levadura. Ambas morfologías se desarrollan a partir de uno de los tres tipos de esporas que estos organismos son capaces de producir, la esporangioespora. La esporangioespora, ya sea que se desarrolle como levadura gemante o como hifa, pasa primero por un periodo común de crecimiento (I) en el que se pueden distinguir dos etapas (Figura 4.1).<sup>8</sup>

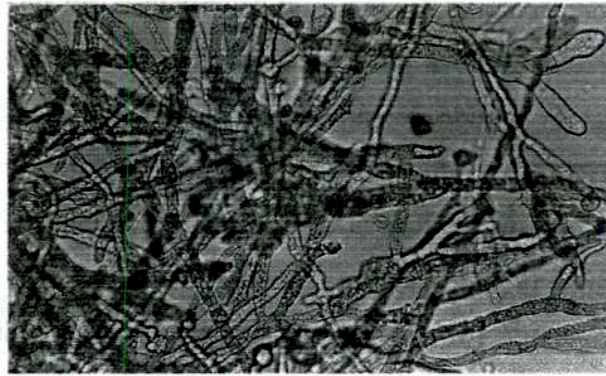


**Figura 4.1.** Etapas de germinación de una esporangioespora, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

En la primera etapa (Ia) se produce un cambio morfológico donde la espora adquiere forma esférica a partir de una elipsoidal. En la segunda etapa (Ib) se produce un crecimiento isodiamétrico que da origen a una célula esférica de mayor tamaño (B) la cual puede desarrollarse en la morfología de micelio o bien como levadura.

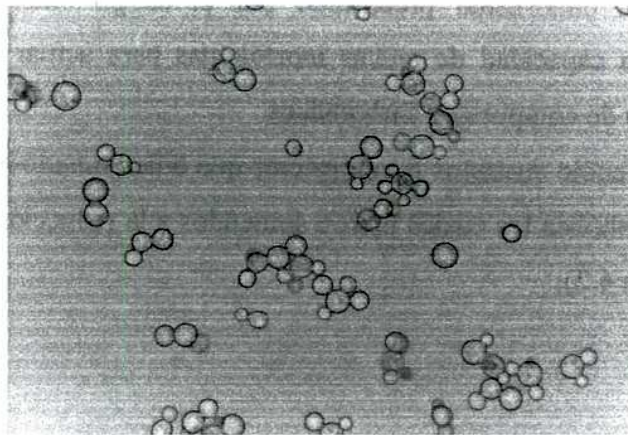
En el crecimiento miceliano una hifa típica emerge inicialmente de la célula esférica (célula madre) formando una proyección corta llamada tubo germinativo. Del tubo germinativo se

desarrolla una estructura tubular multinucleada, conocida como hifa cenocítica, que crece por un proceso de extensión apical. Este proceso ha sido caracterizado como un balance dinámico entre la síntesis y la degradación de pared en el extremo que se elonga.<sup>9</sup> La punta en el crecimiento de la hifa es el único lugar donde se da la síntesis de nueva pared celular. A medida que la hifa crece, comienzan a observarse a lo largo de ésta, ramificaciones que ocurren a intervalos frecuentes pero impredecibles (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** *Mucor rouxii* en morfología micelio.

Las levaduras, en cambio, son células esféricas multinucleadas, que crecen y se propagan por la producción de múltiples gemas. Estas parecen iniciarse localizándose al azar a lo largo de la superficie de la célula madre y a veces alcanzan hasta un número de 12 o más (Figura 4.3).<sup>10</sup>



**Figura 4.3.** *Mucor rouxii* en morfología levadura.



Existen dos factores principales que influyen en la morfogénesis del género *Mucor*:

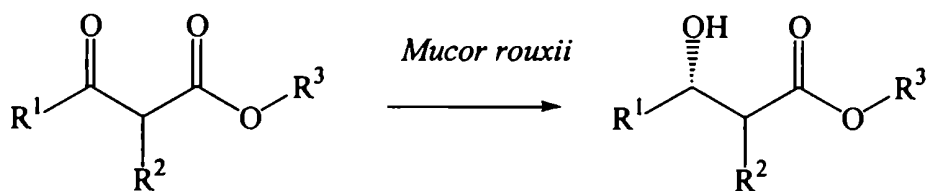
- 1) Siempre se requiere de una hexosa fermentable para el crecimiento en forma de levadura.<sup>11</sup>
- 2) La anaerobiosis generalmente acompaña al crecimiento levaduriforme, mientras que una atmósfera aeróbica usualmente induce un crecimiento en forma de micelio.

*Mucor rouxii* no puede crecer como levadura en anaerobiosis sin una hexosa fermentable, y esta morfología parece desarrollarse a partir del complejo balance entre la concentración de hexosa y la presión parcial de dióxido de carbono ( $p\text{CO}_2$ ) presentes en el cultivo.<sup>12</sup> A una baja concentración de hexosa (0,1% de glucosa) y en una atmósfera de nitrógeno, se necesita una alta  $p\text{CO}_2$  (mayor a 0,3 atm) para inducir el crecimiento levaduriforme, mientras que con una concentración alta de hexosa (8% de glucosa) este tipo de crecimiento puede ocurrir aún bajo atmósfera 100% de nitrógeno.<sup>12</sup> En este mismo sistema, la introducción de oxígeno en una atmósfera de dióxido de carbono provoca el desarrollo de las hifas en una incidencia inversamente proporcional a la  $p\text{CO}_2$ .

### **2.b. Reducciones catalizadas por cultivos frescos de *Mucor rouxii***

Teniendo en cuenta el dimorfismo presentado por el hongo *Mucor rouxii* se consideró interesante investigar la capacidad de ambas morfologías para actuar como catalizadores en reacciones de reducción de compuestos carbonílicos.

Para ello se emplearon como sustratos  $\beta$ -cetoésteres que difieren tanto en la cadena carboxílica como en la porción alcohólica los cuales fueron sometidos a la reducción por células enteras de *Mucor rouxii* (Esquema 4.2).



Sustrato	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Producto
71	CH <sub>3</sub>	H	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	72
73	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	74
75	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	76
77	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	78
79	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	H	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	80

#### Esquema 4.2

La reacción se ensayó tanto en medio acuoso como en medio orgánico empleando el hongo en la forma de micelio y de levadura. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.2 y 4.3.

**Tabla 4.2.** Reducción de β-cetoésteres catalizada por micelio de *Mucor rouxii*

Sustrato	Solvente	Relación biomasa-sustrato (g/mmol)	tiempo (hs)	Conversión (%)	ee (%)
71	agua	9	17	100	62 ( <i>S</i> )
73	agua	12	17	100	60 ( <i>S</i> )
75	agua	8	24	100	67 ( <i>S</i> )
77	agua	7	24	90 <sup>a</sup>	99 <sup>b</sup>
73	hexano	25	36	6	
73	tolueno	25	36	10	
73	tolueno-agua	25	36	4	
73	acetato de etilo	25	36	0	
73	acetato de etilo-agua	25	36	0,7	-

<sup>a</sup> Relación de diastereoisómeros (2*R*,3*S*):(2*S*,3*S*) 2:1. <sup>b</sup> Corresponde al isómero (2*R*,3*S*)

**Tabla 4.3.** Reducción de acetoacetato de isopropilo (71) catalizada por levadura de *Mucor rouxii*

Solvente	Relación biomasa-sustrato (g/mmol)	tiempo (hs)	Conversión (%)	ee (%)
agua	8	24	100	54 (S)
hexano	17	24	100	97 (S)
hexano-agua	17	24	100	81 (S)
tolueno	17	24	63	72 (S)
tolueno-agua	17	24	76	62 (S)
dioxano	17	36	0	
dioxano-agua	17	36	0	
acetato de etilo	17	36	0,3	
acetato de etilo-agua	17	36	0,9	

En los ejemplos estudiados de  $\beta$ -cetoésteres se observó la reducción quimioselectiva del grupo carbonílico a alcohol permaneciendo inalterada la función éster. Este comportamiento fue observado al trabajar en medio acuoso empleando como biocatalizador *Mucor rouxii* en sus dos morfologías, micelio (Tabla 4.2) y levadura (Tabla 4.3).

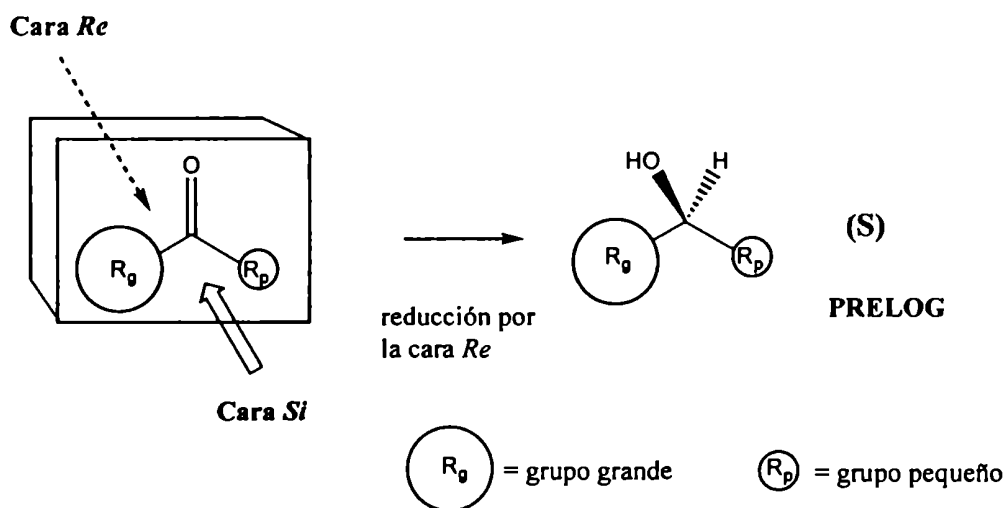
En la Tabla 4.2 puede apreciarse que las oxidorreductasas de la forma micelio no mostraron actividad ni en solventes orgánicos puros, como hexano, tolueno o acetato de etilo, ni en mezclas de agua con estos solventes. En medio acuoso, los sustratos ensayados fueron transformados completamente a los respectivos hidroxieésteres pero con una moderada estereoselectividad. Por otro lado, las células de *Mucor rouxii* desarrolladas como levaduras mostraron una alta actividad oxidorreductásica tanto en medio orgánico como en sistemas bifásicos (Tabla 4.3).

Los resultados obtenidos en varios medios de reacción para la reducción de acetoacetato de isopropilo (71) con la morfología levadura se describen en la Tabla 4.3. Los mejores resultados se obtuvieron en solventes orgánicos de baja polaridad como hexano puro, en donde la conversión al hidroxieéster alcanzó el 100% con una muy alta enantioselectividad

en favor del estereoisómero *S*. Al aumentar la polaridad del solvente se observó una marcada disminución en el grado de conversión. En presencia de solventes de mayor polaridad como dioxano y acetato de etilo solo se recuperó el material de partida.

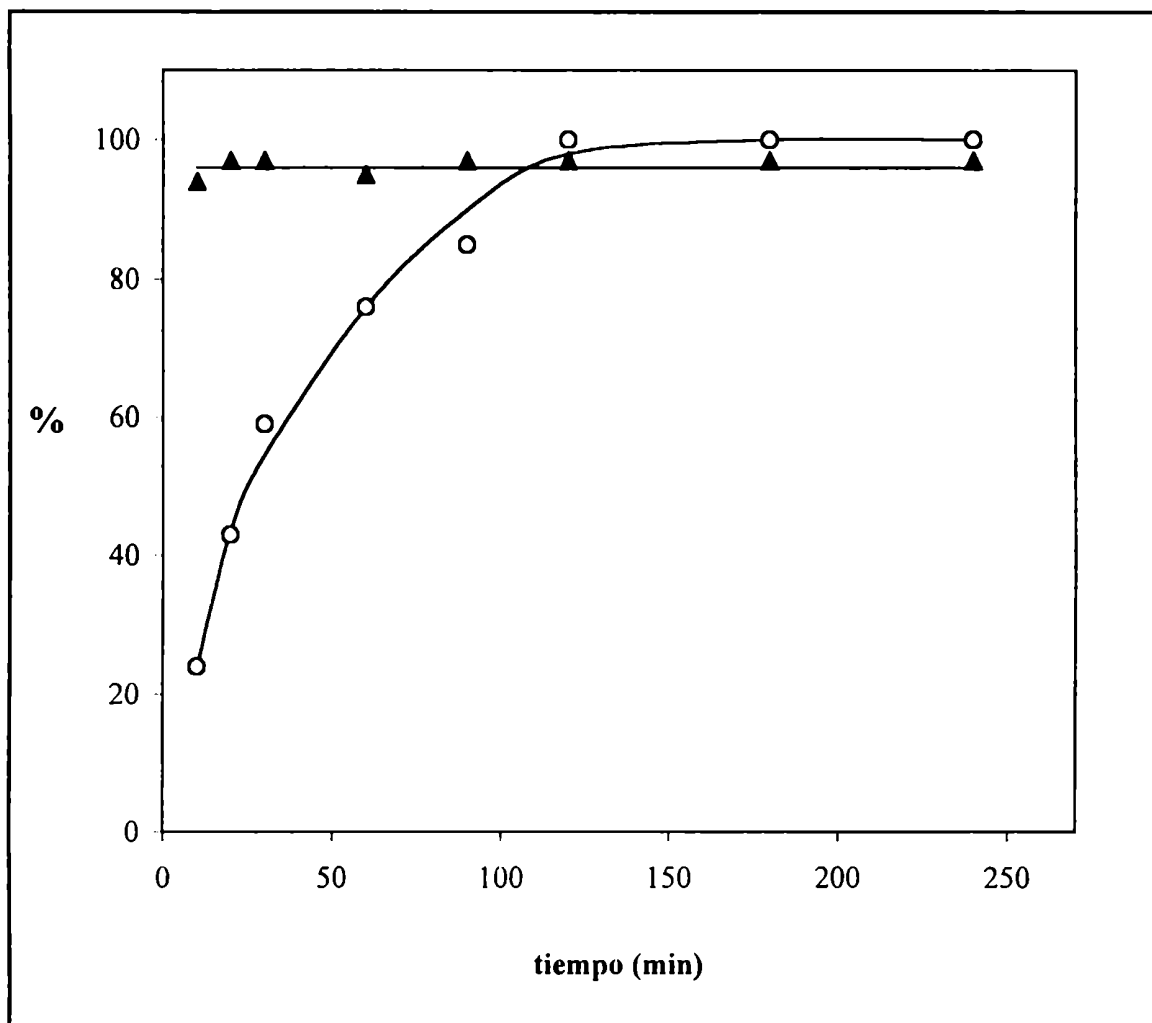
El empleo de medios de reacción mixtos agua: solvente orgánico sólo fue efectivo en mezclas de hexano:agua o bien tolueno:agua. A pesar de que la conversión fue similar a la obtenida en medios orgánicos puros y en algunos casos hasta mejor, la estereoselectividad sufrió un pequeño descenso (Tabla 4.3).

En todos los casos, el producto sintetizado preferencialmente por el microorganismo fue el alcohol *S*. Es decir que las reductasas de *Mucor rouxii*, así como las reductasas de *Saccharomyces cerevisiae*<sup>13</sup> y la mayoría de las deshidrogenasas se comportan de acuerdo con regla de Prelog<sup>14</sup> catalizando la transferencia de hidruro por la cara *Re* del sustrato carbonílico (Figura 4.4).



**Figura 4.4**

Teniendo en cuenta que el hexano resultó el mejor medio de reacción para los distintos sustratos ensayados con levaduras de *Mucor rouxii*, se continuaron los estudios optimizando el tiempo de reacción en la biotransformación de acetoacetato de isopropilo (71) bajo estas condiciones. Sobre este sistema modelo se analizó la evolución del grado de conversión y de la enantioselectividad de la reacción tomando alícuotas a distintos tiempos. (Figura 4.5).

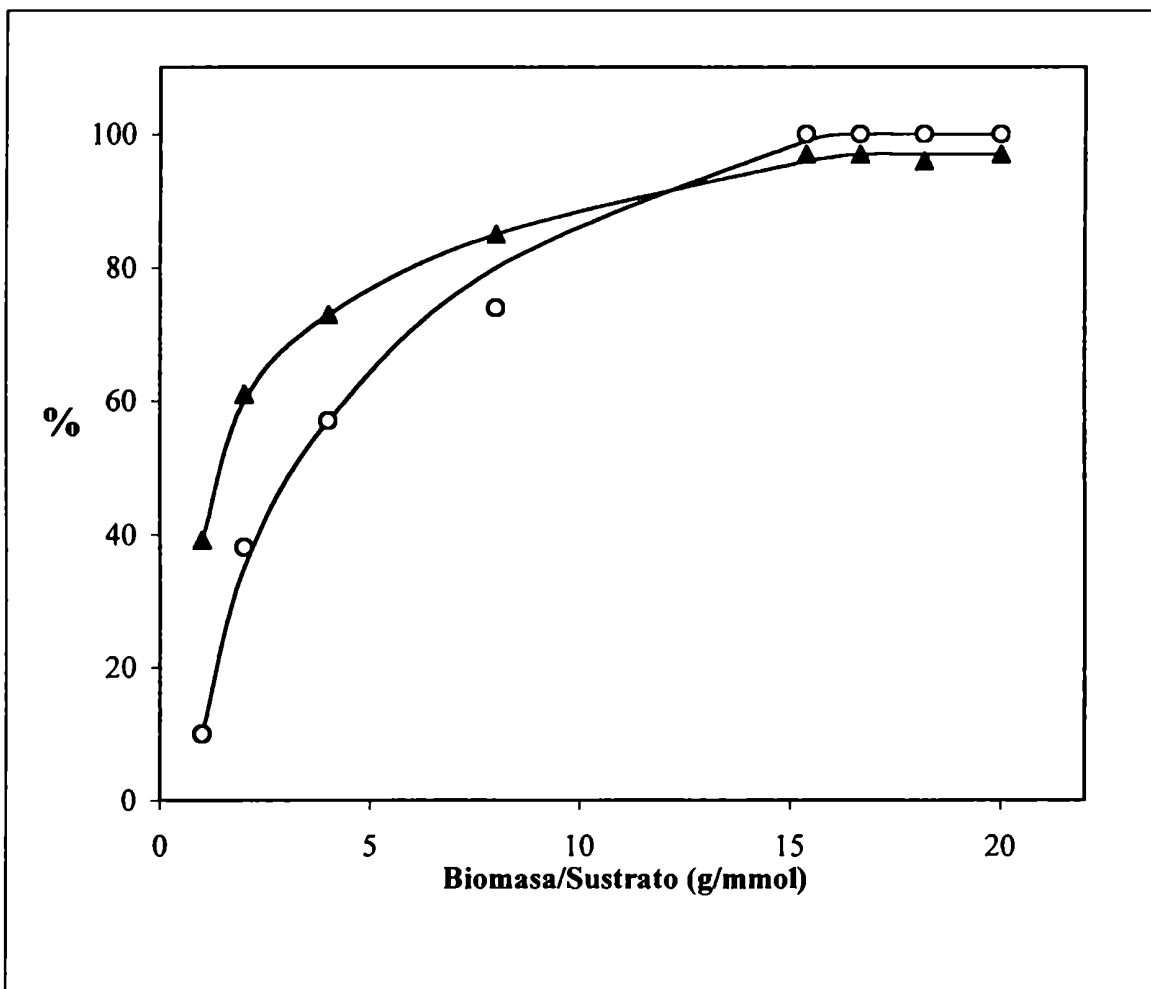


**Figura 4.5.** Evolución de la conversión y la enantioselectividad en la reducción de acetato de isopropilo en hexano catalizada por levadura de *Mucor rouxii* (relación sustrato/biomasa 17 g/mmol). (▲) % de exceso enantiomérico; (○) % de conversión.

Como puede observarse en la Figura 4.5, la conversión alcanza su máximo valor luego de 2 hs de reacción. La enantioselectividad de la reacción resultó independiente del grado de conversión, obteniéndose valores de exceso enantiomérico de 94-97% en todo el rango de tiempo estudiado.

Otra variable que se consideró interesante analizar en las reducciones catalizadas por levaduras de *Mucor rouxii* fue la influencia de la relación biomasa-sustrato. Para ello se usó nuevamente como modelo la reducción de acetato de isopropilo en hexano. Empleando

una cantidad fija de cultivo fresco de levadura (2 g) en 5 ml de solvente se repitió la reacción variando la cantidad de sustrato entre 0,1 y 2 mmoles. Los valores de conversión y enantioselectividad obtenidos luego de 24 hs de reacción para las 8 experiencias realizadas se representan en la Figura 4.6.



**Figura 4.6.** Influencia de la relación biomasa-sustrato en la reducción de acetoacetato de isopropilo en hexano con levadura de *Mucor rouxii*. (▲) % de exceso enantiomérico; (○) % de conversión.

Tanto la conversión como la enantioselectividad se incrementaron al aumentar la relación biomasa-sustrato, alcanzando valores máximos a partir de 15 g de biomasa/mmol de sustrato.

Es importante resaltar la implicancia de estos resultados. La baja enantioselectividad observada a altas concentraciones de sustrato no se debe a una sola oxidorreductasa con capacidad para interactuar con ambas caras del sustrato carbonílico. Como se discutió en la introducción (página 33), la fuerte dependencia de la enantioselectividad respecto de la concentración de sustrato indica que dos o más oxidorreductasas deben estar presentes en las células de *Mucor rouxii*, las cuales son capaces de generar alcoholes de configuración opuesta a diferentes velocidades.

Los estudios se continuaron analizando la capacidad de la levadura fresca de *Mucor rouxii* para actuar como catalizador en la reducción de otros  $\beta$ -cetoésteres. Empleando una suspensión de células obtenida de cultivos anaeróbicos de 18-20 hs y hexano como solvente de reacción se estudió la biotransformación de los sustratos **71**, **73**, **75**, **77** y **79** luego de 24 hs de incubación. La conversión alcanzada así como los porcentajes de exceso enantiomérico se resumen en la Tabla 4.4.

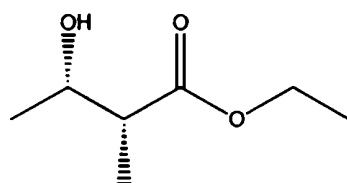
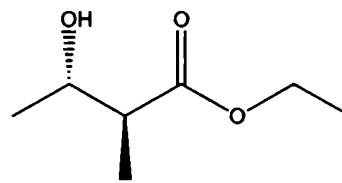
**Tabla 4.4.** Reducción de  $\beta$ -cetoésteres catalizada por levadura de *Mucor rouxii*

Sustrato	Relación biomasa-sustrato (g/mmol)	tiempo (hs)	Conversión (%)	ee (%)	Producto
<b>71</b>	17	24	100	97 (S)	<b>72</b>
<b>73</b>	17	24	100	95 (S)	<b>74</b>
<b>75</b>	17	24	100	94 (S)	<b>76</b>
<b>77</b>	15	24	65 <sup>a</sup>	99 <sup>b</sup>	<b>78</b>
<b>79</b>	17	40	20	92 (S)	<b>80</b>

<sup>a</sup> Relación de diastereoisómeros (2*R*,3*S*):(2*S*,3*S*) 8:1. <sup>b</sup> Corresponde al isómero (2*R*,3*S*)

Si se observan los resultados obtenidos para los sustratos **71**, **73** y **75** puede inferirse que la porción alcoxi- del sustrato no afecta ni el grado de conversión de los sustratos ni la pureza enantiomérica de los productos. En cambio, con sustratos que difieren en la porción carboxílica, las levaduras mostraron un comportamiento diferente.

Un grupo metilo en el carbono 2 como presenta el compuesto **77** no parece afectar la conversión alcanzada. La reacción mostró una elevada enantioselectividad lográndose una pureza enantiomérica del 99% y una moderada diastereoselectividad con una relación 8:1 a favor del isómero *syn* (*2R,3S*). Esto fue probado mediante el análisis por cromatografía gaseosa comparando los tiempos de retención de **78** con los de los hidroxiésteres preparados a partir de levadura de panadería comercial (Sigma) y la mezcla de los cuatro diastereoisómeros obtenidos mediante la reducción con  $\text{NaBH}_4$  según se explica en la parte experimental.

**2R,3S**isómero *syn***2S,3S**isómero *anti*

La actividad reductásica de las levaduras mostró ser sensible a la presencia de grupos voluminosos en el sustituyente  $R_1$ . Así en la reducción del sustrato **79** que posee un isopropilo en  $R_1$  la conversión alcanzó apenas el 20%.

### 2.c. Distintas estrategias de conservación del catalizador

Con la finalidad de evitar la limitación práctica que implica el uso de cultivo fresco para cada reacción, se probaron distintas opciones para la conservación de levadura de *Mucor rouxii* y se ensayó la actividad empleando como sistema modelo la reducción de acetoacetato de isopropilo. Las alternativas analizadas fueron las siguientes:



2.c.1. Uso directo de las esporas del microorganismo

2.c.2. Estudio de la estabilidad del microorganismo frente a diferentes técnicas de secado:

Liofilizado en ausencia y presencia de trehalosa y secado por corriente de aire caliente

### 2.c.1. Empleo de esporas de *Mucor rouxii*

Teniendo en cuenta que los cultivos frescos de levadura *Mucor rouxii* se obtienen a partir de las esporangioesporas del microorganismo, el uso directo de estas formas celulares evitaría un paso en el proceso de preparación del biocatalizador. Dado que el microorganismo produce las esporas como medio de resistencia y preservación, las mismas pueden ser conservadas en la heladera por un lapso de 1 a 2 meses.

Por este motivo se estudió la reducción biocatalítica usando esporas de *Mucor rouxii*. La Tabla 4.5 muestra los resultados obtenidos al emplear 0,2 mmoles de acetoacetato de isopropilo (71) y distintos solventes luego de 24 hs de reacción.

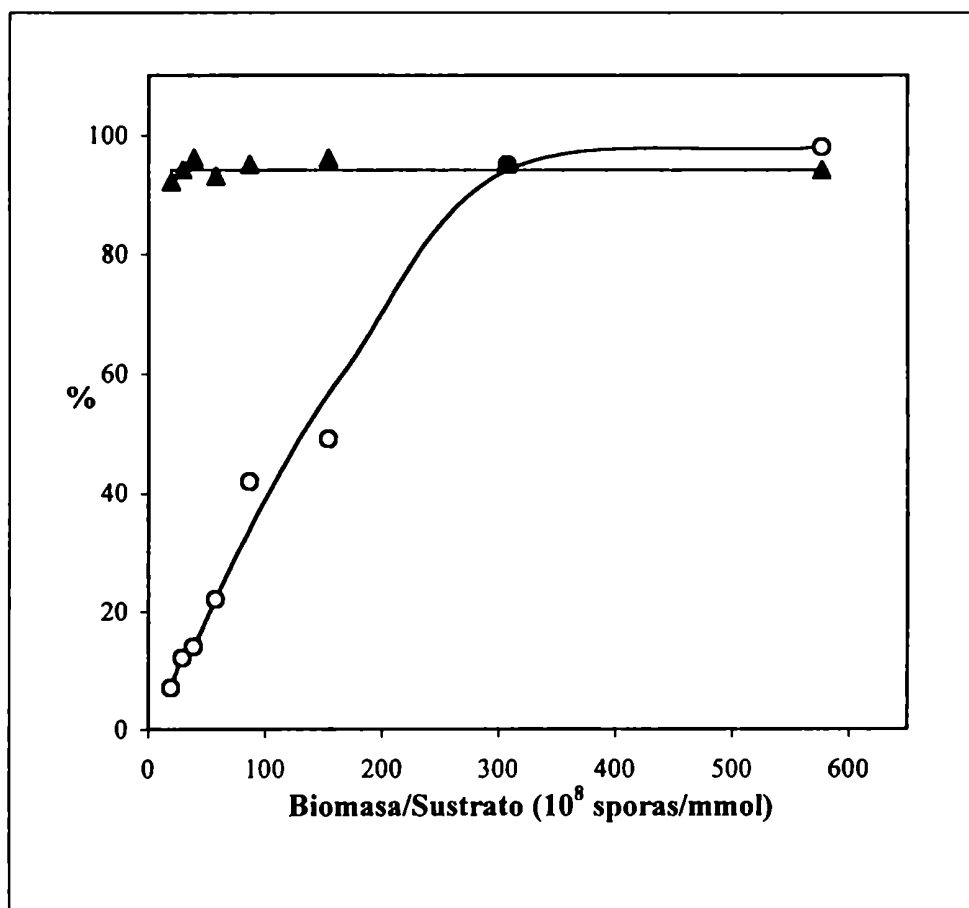
**Tabla 4.5.** Reducción de acetoacetato de isopropilo catalizada por esporas de *Mucor rouxii*

Solvente	Relación biomasa-sustrato (x10 <sup>8</sup> esporas /mmol)	Conversión (%)	ee (%)
agua	150	100	70 (S)
hexano	350	97	90 (S)
tolueno	350	24	72 (S)
acetato de etilo	350	0	
dioxano	350	0	-

Igual a lo observado anteriormente al emplear como catalizador las morfologías micelio y levadura del hongo, el hexano resultó el mejor solvente para llevar a cabo las reducciones, en donde se obtuvieron los valores más altos de conversión y la mayor enantioselectividad.

Coincidiendo con el comportamiento de las otras morfologías del hongo, las esporas no mostraron actividad en solventes más polares como dioxano y acetato de etilo.

Un parámetro que se consideró importante analizar en las reducciones catalizadas por esporas fue la influencia de la relación biomasa-sustrato en el curso de la reacción. Empleando acetoacetato de isopropilo (71) como sustrato y hexano como solvente se realizaron 8 ensayos fijando la concentración de sustrato en 0,2 mmoles/5 ml y aumentando el número de esporas entre  $2 \times 10^8$  y  $120 \times 10^8$ . La Figura 4.7 muestra los valores de conversión y exceso enantiomérico en función de la cantidad de biomasa, expresada en número de esporas.



**Figura 4.7.** Influencia de la relación biomasa-sustrato en la reducción de acetoacetato de isopropilo con esporas de *Mucor rouxii*. (▲) % de exceso enantiomérico; (○) % de conversión. Tiempo de reacción 24 hs.

Como puede observarse en la Figura 4.6, existe una marcada dependencia entre la conversión y la cantidad de biomasa empleada, siendo  $350 \times 10^8$  esporas/mmol de sustrato la relación óptima para alcanzar la conversión completa. La enantioselectividad fue excelente para todos los ensayos obteniéndose porcentajes de exceso enantiomérico en un rango del 92 al 96% .

Considerando los resultados, la principal desventaja de emplear como catalizador esta forma del hongo reside en el elevado número de esporas requerido para lograr la conversión completa del sustrato. Este número que según se demostró, debe ser mayor o igual a  $350 \times 10^8$  esporas/mmol de sustrato, supera en varios órdenes a la cantidad de esporas que se requieren para generar la masa de cultivo fresco de levadura necesaria para transformar la misma cantidad de sustrato ( $7 \times 10^5$  esporas/mmol de sustrato).

### **2.c.2. Estudio de la estabilidad del microorganismo frente a diferentes técnicas de secado**

Como alternativa al uso de esporas, se ensayaron distintos métodos de secado para levadura de *Mucor rouxii* y se estudió el efecto en la actividad reductásica al almacenar la biomasa por varios meses.

Para ello se recurrió a técnicas empleadas habitualmente para el secado de microorganismos como son la liofilización y la eliminación de agua por corriente de aire caliente.

Como variante se probó la liofilización en presencia de trehalosa, que actúa estabilizando enzimas de restricción durante el proceso de liofilizado y protege al microorganismo durante el posterior almacenamiento.<sup>15</sup> Crowe y col.<sup>16</sup> proponen que los azúcares formarían uniones con los grupos superficiales de las proteínas, sustituyendo al agua durante el secado. Sólo algunos disacáridos (sacarosa, maltosa y trehalosa) cumplirían con los requerimientos estéricos para reemplazar al agua de la superficie de las proteínas y estabilizar a la estructura nativa en sistemas secos. Otros autores postularon que la protección se debe a la tendencia de los azúcares a formar una estructura vítrea en la cual las reacciones degradativas estarían cinéticamente impedidas. La alta viscosidad

característica del estado vítreo es un factor importante que controla la movilidad y la estabilidad de muchos biomateriales deshidratados.

La actividad de la biomasa deshidratada se determinó empleando acetoacetato de isopropilo (71) y hexano como solvente, adicionalmente, en la mayoría de las experiencias se agregaron 2 ml de agua estéril. La cantidad de biocatalizador utilizada fue la equivalente en peso seco a la de cultivo fresco, la cual se estimó teniendo en cuenta la pérdida de peso en el proceso de secado. Las reacciones se llevaron a cabo a 28 °C durante 24 hs. En la Tabla 4.6 se muestran los grados de conversión y de pureza óptica obtenidos con biomasa deshidratada así como el efecto en la actividad en función del tiempo de almacenamiento.

**Tabla 4.6.** Reducción de acetoacetato de isopropilo catalizada por levadura de *Mucor rouxii* secada por distintas técnicas

Método de secado	Solvente	Tiempo de almacenamiento (días)	Conversión (%)	ee (%)
Liofilizado	hexano	2	0	
	hexano-agua	2	100	96 (S)
	hexano-agua	60	99	94 (S)
	hexano-agua	120	98	95 (S)
Liofilizado	hexano-agua	6	100	96 (S)
Con trehalosa	hexano-agua	20	100	95 (S)
	hexano-agua	50	97	96 (S)
	hexano-agua	120	96	97 (S)
Secado por corriente de	hexano-agua	6	100	95 (S)
	hexano-agua	20	100	96 (S)
Aire caliente	hexano-agua	50	83	94 (S)
	hexano-agua	120	34	96 (S)

Al suspender la biomasa liofilizada en hexano puro no se observó actividad oxidoreductásica, recuperándose únicamente el compuesto de partida. Por el contrario, al rehidratar la biomasa previo al agregado de solvente orgánico la actividad se recupera por completo, alcanzándose valores de conversión del 100% y una altísima enantioselectividad. La preservación de la actividad al emplear esta técnica de secado fue excelente permitiendo almacenar la biomasa por más de 120 días sin pérdida de actividad ni de selectividad.

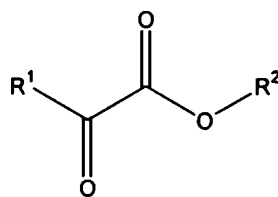
Los experimentos realizados en presencia de trehalosa no permitieron establecer los beneficios de su uso como agente estabilizante en el proceso de secado debido a que, durante el período estudiado, la actividad enzimática en las células liofilizadas en ausencia de la misma se mantuvo constante y en sus valores máximos.

En cuanto al proceso de secado con aire caliente la estabilidad de la biomasa fue menor que en el caso del liofilizado, observándose una considerable disminución de la conversión cercana al 60% luego de almacenarla por 120 días.

La eficiencia y selectividad obtenida al reconstituir células deshidratadas fue idéntica a la obtenida con cultivos frescos. En todos los casos se logró la reducción completa, quimio- y enantioselectiva del grupo carbonílico del  $\beta$ -cetoéster **71**.

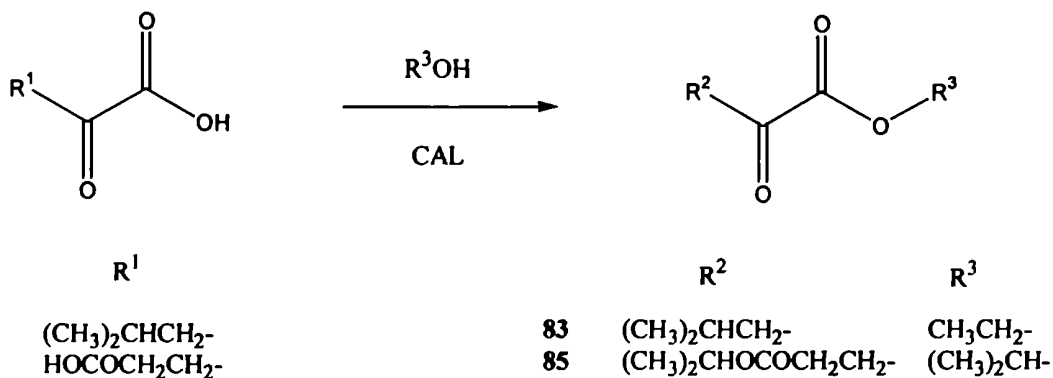
#### **2.d. Reducción de compuestos carbonílicos catalizada por *Mucor rouxii* liofilizado**

La marcada estereoselectividad obtenida en las reducciones del grupo carbonílico de  $\beta$ -cetoésteres al emplear *Mucor rouxii* como catalizador nos alentó a proseguir con estos estudios extendiendo su uso a otros sustratos, cuyos alcoholes resultan interesantes compuestos de partida o bien intermediarios para la síntesis asimétrica de una gran variedad de productos. Asimismo, los excelentes resultados obtenidos con los cultivos deshidratados demostraron que el uso del catalizador liofilizado es una buena alternativa para llevar a cabo biotransformaciones tanto en medio acuoso como en medio orgánico. Teniendo en cuenta esto, se consideró interesante estudiar la estereoselectividad en la reducción de los  $\alpha$ -cetoésteres cuyas fórmulas se detallan a continuación empleando como catalizador el microorganismo liofilizado:


 $R^1$ 
 $R^2$ 

<b>81</b>	PhCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -
<b>83</b>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -
<b>85</b>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHOCOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-

Debido a que los ésteres **83** y **85** no eran comerciales fue necesario prepararlos a partir de los ácidos libres correspondientes. Esto se hizo mediante catálisis enzimática empleando lipasa de *Candida antarctica* (CAL) y el correspondiente alcohol como solvente y agente esterificante:



En ambos casos la esterificación enzimática dio lugar a rendimientos cuantitativos.

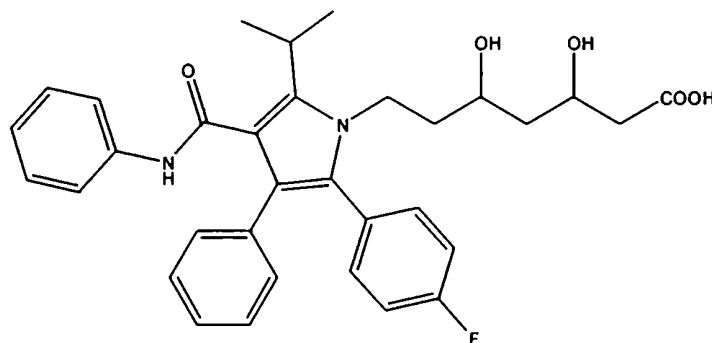
Una vez preparados los sustratos, se ensayaron las reducciones con levadura liofilizada. Las reacciones se llevaron a cabo durante 24 hs empleando hexano como solvente y activando el catalizador mediante el agregado de agua al medio de reacción. Los resultados se resumen en la Tabla 4.7.

**Tabla 4.7.** Reducción de  $\alpha$ -cetoésteres con levadura liofilizada de *Mucor rouxii*

Sustrato	Conversión (%)	ee (%)	Producto
<b>81</b>	100	91 (S)	<b>82</b>
<b>83</b>	100	95 (S)	<b>84</b>
<b>85</b>	100	96 (S)	<b>86</b>

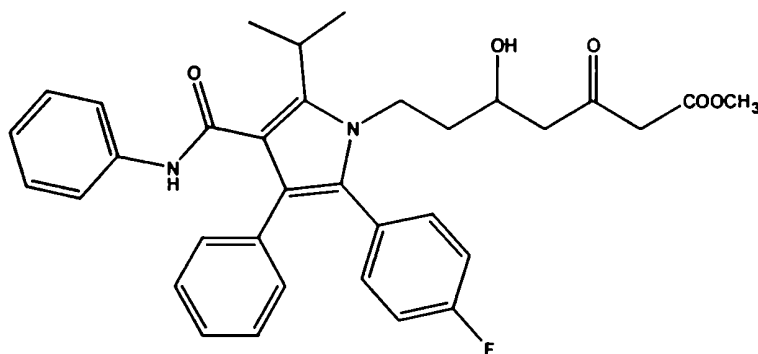
Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento similar al observado en las reducciones de  $\beta$ -cetoésteres, la biocatálisis fue altamente quimio- y enantioselectiva y la configuración del centro quiral formado fue *S* en todos los casos.

Con la finalidad aplicar la tecnología desarrollada para la preparación de moléculas de interés farmacológico, se estudió capacidad enantioselectiva de *Mucor rouxii* para generar uno de los centros quirales de Atorvastatin (**87**).

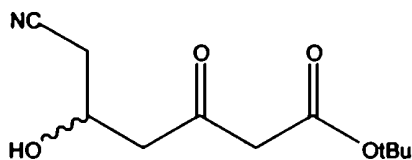
**Atorvastatin (87)**

Atorvastatin es un conocido agente empleado para reducir el contenido de colesterol y otras sustancias lipídicas en sangre. Actúa inhibiendo la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) requerida para la biosíntesis de colesterol.

Como primera aproximación se estudió el comportamiento de levadura liofilizada de *Mucor rouxii* con el precursor **88**. Sin embargo, a pesar de probarse distintos solventes (tolueno, acetato de etilo, hexano y THF) no se logró la transformación del sustrato.

**88**

Considerando que la falta de reconocimiento del sustrato **88** por parte las enzimas de *Mucor rouxii* podría deberse a la complejidad estructural que presenta la molécula, se intentó la reacción con un precursor más sencillo (**89**).

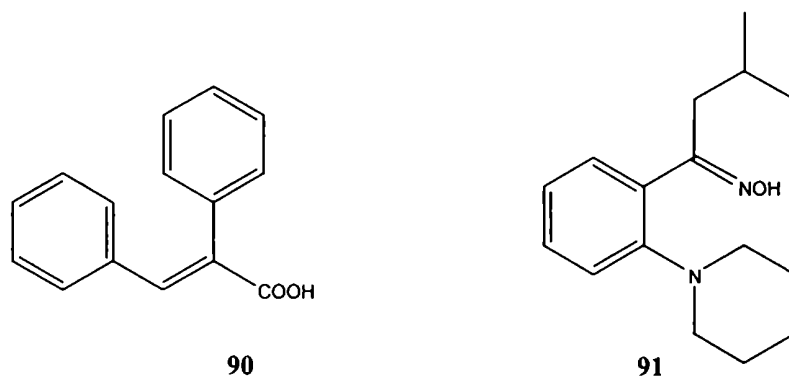
**89**

El tratamiento del sustrato **89** con *Mucor rouxii* tampoco condujo a resultados favorables. En los seis solventes ensayados (tolueno, hexano, cloruro de metileno, acetato de etilo, acetonitrilo y THF) se recuperó únicamente el producto de partida, sin evidenciarse formación de producto alguno. Lo mismo sucedió al emplear levadura de panadería como catalizador, a pesar de que se probaron distintas condiciones de reacción (solvente, inmovilización del catalizador, etc.) no se observó ninguna transformación.



## 2.e. Estudio del comportamiento de levadura liofilizada de *Mucor rouxii* en la hidrogenación de oximas y dobles enlaces carbono-carbono

Finalmente se decidió analizar la capacidad de *Mucor rouxii* para catalizar otro tipo de reacciones que involucran la transferencia de hidruro como la hidrogenación de dobles enlaces carbono-carbono y la reducción de oximas para la obtención de aminas quirales. Con este objetivo, se estudió el comportamiento de levadura liofilizada en la hidrogenación de los sustratos **90** y **91** empleando distintos solventes tales como agua, tolueno, hexano y acetato de etilo.



Los resultados obtenidos indicaron que *Mucor rouxii* no es un catalizador eficiente para este tipo de reducciones ya que luego de 40 hs de reacción se recuperaron los sustratos de partida en forma inalterada. Las reacciones se repitieron con levadura de panadería sin lograrse mejores resultados.

## 3. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

De acuerdo a la evidencia presentada *Mucor rouxii* resultó un excelente biocatalizador para la reducción quimio- y enantioselectiva de  $\alpha$  y  $\beta$ -cetoésteres. En los ejemplos estudiados se observó la reducción quimioselectiva del grupo carbonílico a alcohol

permaneciendo inalterada la función éster. Este comportamiento fue observado al emplear como biocatalizador *Mucor rouxii* en sus dos morfologías, micelio y levadura. Al emplear micelio de *Mucor rouxii*, la reducción se obtuvo con buenos rendimientos únicamente en medio acuoso, mientras que con levaduras de *Mucor rouxii* se observó también una excelente actividad reductásica en solventes orgánicos de baja polaridad como tolueno y hexano.

La reducción catalizada por el mencionado microorganismo mostró ser altamente estereoselectiva al emplearse solventes orgánicos, especialmente con hexano en donde los excesos enantioméricos superaron el 93%. En medio acuoso, tanto para el micelio como para la levadura, la estereoselectividad fue moderada. En todos los casos, el producto sintetizado preferentemente por el microorganismo fue el alcohol *S*. La estereoselectividad de las reductasas de *Mucor rouxii* fue similar a la obtenida con levadura de panadería tanto en las experiencias realizadas en nuestro laboratorio con cepas industriales (Levex®) como en las informadas en la literatura.<sup>17</sup>

La optimización de los parámetros de reacción realizada empleando como sustrato modelo acetoacetato de isopropilo indicó que son suficientes 2 hs de reacción para alcanzar la conversión completa del sustrato. Otro parámetro optimizado para el mismo sistema fue la cantidad de biomasa necesaria para alcanzar conversiones y enantioselectividades máximas, encontrándose una relación biomasa-sustrato óptima de 15 g de biomasa/mmol de sustrato.

El empleo directo de las esporas como fuente de enzimas resultó satisfactorio, sin embargo la cantidad de biomasa necesaria para alcanzar la conversión completa de 0,2 mmoles de sustrato fue muy elevada ( $350 \times 10^8$  esporas/mmol) si se tiene en cuenta que para generar la cantidad requerida de levadura fresca (4 g) se necesitan aproximadamente  $7 \times 10^5$  esporas. Dado que el uso de esporas evitaría la limitación práctica que implica el tener que usar cultivos frescos para generar biomasa para cada reacción, a la hora de decidir que forma del catalizador usar deberá evaluarse la disponibilidad de las mismas. En cuanto al medio de reacción, en concordancia con los resultados obtenidos al emplear cultivos frescos de levaduras, hexano resultó ser el solvente más conveniente para llevar a cabo las biotransformaciones con esta forma del catalizador.

La eficiencia y la selectividad obtenida con la levadura deshidratada fue idéntica a la obtenida con cultivos frescos. En cuanto a la técnica de secado, resultó más conveniente la liofilización frente al secado por corriente de aire caliente, permitiendo el almacenamiento de la biomasa de *Mucor rouxii* por períodos de tiempo más largos sin observarse pérdida apreciable de actividad enzimática.

Los excelentes resultados obtenidos con los cultivos deshidratados demuestran que este procedimiento es una alternativa más simple y eficiente para llevar a cabo biotransformaciones catalizadas por células enteras tanto en medio acuoso como en medio orgánico.

### Referencias bibliográficas:

- 
1. a) Csuk, R. y Glanzer, B., *Chem.Rev.*, **1991**, 91, 49. b) Servi, S., *Synthesis*, **1990**, 1. c) D'Arrigo, P., Pedrocchi-Fantoni, G. y Servi, S., *Adv.Appl.Microbiol.*, **1997**, 44, 81.
  2. Rotthaus, O., Kruger, D., Demuth, M. y Schaffner, K., *Tetrahedron*, **1997**, 53, 935.
  3. North, M., *Tetrahedron Letters*, **1996**, 37, 1699.
  4. Hochuli, E., Taylor, K. E. y Dutler, H., *Eur. J. Biochem.*, **1977**, 75, 433.
  5. Peters, J. y Sypherd, P.S. *J. Bacteriol.*, **1979**, 137, 1134.
  6. Shimizu, S., Hattori, S., Hata, H. y Yamada, H., *Eur.J.Biochem.*, **1988**, 174, 37.
  7. Zazueta-Sandoval, R. y Gutiérrez-Corona, J. F., *Arch. Microbiol.*, **1999**, 172, 280.
  8. Cano, C. y Ruiz-Herrera, J., *Exp.Mycol.* **1968**, 12, 47.
  9. a) Bartnicki-García, S. y Lippman, E., *Science*, **1969**, 165, 302. b) Bartnicki-García, S. y Lippman, E., *J.Gen.Microbiol.*, **1972**, 73, 487. c) Bartnicki-García, S. y Lippman, E., *Exp.Mycol.*, **1977**, 1, 230.
  10. a) Bartnicki-García, S., *Bacteriol.Rev.*, **1963**, 27, 293. b) Sypherd, P.S., Borgia, P.T. y Paznokas, J.L., *Adv.Microb.Physiol.*, **1978**, 18, 67.
  11. Orłowski, M., *Microbiol.Rev.*, **1991**, 55, 314.
  12. a) Bartnicki-García, S. y Nickerson, W.J., *J.Bacteriol.*, **1962**, 84, 820. b) Bartnicki-García, S. y Nickerson, W.J., *J.Bacteriol.*, **1962**, 84, 841.
  13. R Nakamura, K., Inoue, K., Ushio, L., Oka, S. y Ohno, A., *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 2589..
  14. Prelog, V., *Pure Appl.Chem.*, **1968**, 9, 119.
  15. Roser, B., *Trends in Food Sci. Technol.*, **1991**, 2, 166.
  16. Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M. y Anchordoguy, T.J., *Cryobiology*, **1990**, 27, 219.
  17. R Nakamura, K., Inoue, K., Ushio, L., Oka, S. y Ohno, A., *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 2589..

# *Capítulo VI*

*Parte Experimental*



## 1. GENERALIDADES

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

Los poderes rotatorios se midieron en un Polarímetro Perkin-Elmer 343 empleando una lámpara de sodio ( $\lambda = 589 \text{ nm}$ ), en microceldas de 1 dm de longitud y a temperatura ambiente, utilizando el solvente y la concentración de muestra indicada para cada caso.

Las técnicas de liofilizado se realizaron con un liofilizador Labconco Lyph Lock 4.5.

El cloruro de hidrógeno gaseoso se generó por agregado gota a gota de 1,2 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado sobre una solución formada por 2,5 g de NaCl en 3,75 ml de ácido clorhídrico concentrado.

La estructura de rayos X fue determinada por el Dr. J.A.Caram de INIFTA (CONICET), Universidad Nacional de La Plata, el Dr. O.E.Piro del Departamento de Física y el Dr. E.E. Castellano del Instituto de Física de San Carlos, Universidad de San Pablo, Brasil, en un difractómetro Enraf-Nonius CAD-4 con radiación  $\text{Mo K}_\alpha$  monocromática de grafito, las estructuras se resolvieron mediante los métodos SDP<sup>1</sup>, SHELX-86<sup>2</sup>, SHELX-93<sup>3</sup>. Los monocristales para la determinación de las estructuras por rayos X se obtuvieron por evaporación lenta a temperatura ambiente de una solución saturada del analito en el solvente que se indica.

Los valores de HLB se calcularon mediante el programa PHYSICAL PROPERTIES! PRO™ revision 2.4<sup>4</sup>

### **Biocatalizadores**

#### **a) Lipasas**

Las lipasas utilizadas fueron en todos los casos de origen comercial y las especificaciones de cada *batch* se detallan a continuación:

Lipasa de *Candida antarctica* (CAL) (Novozym 435, Novo Nordisk)

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

La actividad se expresa en PLU (unidades de propil laurato); la determinación de actividad se basa en un ensayo de esterificación entre 1-propanol y ácido láurico realizado a 60°C durante 15 minutos.<sup>5</sup>

PLU/g sólido: 7400

Lipasa pancreática porcina (PPL) (Tipo II, Sigma) Contiene amilasa y proteasa.

Actividad determinada incubando aceite de oliva a pH 7,7 durante 30 minutos (una unidad hidroliza un microequivalente de ácido graso a partir de un triglicérido en una hora a 37°C):

Unidades/mg de sólido: 46; 53; 43

Unidades/mg de proteína: 220; 190; 135

Lipasa de *Candida rugosa* (CRL) (Tipo VII, Sigma) Contiene lactosa.

Actividad determinada incubando aceite de oliva durante 30 minutos (una unidad hidroliza un microequivalente de ácido graso a partir de un triglicérido en una hora pH 7,2 y a 37°C):

Unidades/mg de sólido: 110; 905; 860

Unidades/mg de proteína: 7770; 4570; 2425

Lipozyme<sup>R</sup> IM 20 (LIP) (Lipasa de *Mucor miehei*, Novo Nordisk)

La enzima se encuentra inmovilizada sobre una resina aniónica y deriva de una cepa seleccionada del hongo. Usualmente, puede emplearse en un rango de temperaturas de 40 a 70°C

La actividad se expresa en BIU (Batch Interesterification Units). 1 BIU corresponde a un mol de ácido palmítico incorporado en trioleína por minuto y bajo condiciones estandar.<sup>6</sup>

BIU/g sólido: 25

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

Lipasa inmovilizada sobre partículas de cerámica.

Actividad (una unidad produce un micromol de glicerol por minuto a pH 7,0 y a 50°C, en presencia de seroalbúmina bovina):

Unidades/mg de sólido: 30

***b) Proteasas***Papaina (Biobras)

Unidades/mg de sólido: 2648

Quimotripsina (Biobras)

Unidades/mg de sólido: 1311

Proteasa fúngica (Solvay Enzimas)

31000 HU/g

Proteasa bacteriana (Solvay Enzimas)

200 NU/g

***c) Células enteras***

Se emplearon células enteras de los microorganismos que se detallan a continuación:

*Saccharomyces cerevisiae*: (Baker's yeast, Tipo I, Sigma)

Secada para evitar la inactivación de las enzimas. Se produce autólisis en solución de buffer a 37°C.

*Saccharomyces cerevisiae*: (LEVEX®)

Corresponde a cepas industriales de levadura de panadería manufacturada para el consumo humano.

*Mucor rouxii*: Cepa NRRL 1894.

La obtención de esporas y los cultivos de este microorganismo fueron realizados en el Departamento de Química Biológica de La Universidad de Buenos Aires por el grupo de investigación integrado por la Dra. Elba Pereyra y la Dra Silvia Moreno de Colonna.

A continuación se describe la metodología empleada para la obtención de biomasa de este microorganismo así como los distintos tratamientos a los cuales fue sometida para lograr su conservación:

**1) Preparación de esporas:** Para la obtención de las esporas se cultivó el hongo en medio agar 6% tomate (1:1) en botellas de Roux. Se sembraron en cada botella 1000 esporas y se incubaron a 28-30 °C durante 4-6 días, en oscuridad. Para efectuar la cosecha se agregó a cada botella 20 ml de agua destilada estéril, lavando la superficie del cultivo para desprender las esporas de los esporangios. Se



filtró la suspensión obtenida por una malla de nylon. El filtrado fue centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos, descartando el sobrenadante, la operación se repitió hasta que el sobrenadante quedó límpido. Se concentró la suspensión en agua destilada estéril hasta una concentración aproximada de  $10^9$  esporas/ml. Las esporas se mantuvieron a 4°C en tubos estériles.

Todos los ensayos se realizaron con esporas recién cosechadas .

**2) Preparación de cultivo fresco:** Los cultivos para la obtención de biomasa se realizaron en medio rico YPG<sup>7</sup> a partir de las esporas del microorganismo, las cuales fueron inoculadas a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/ml para los cultivos aerobios y  $2 \times 10^6$  esporas/ml para los anaerobios. Las células se incubaron en un agitador rotatorio a 120 rpm y 28°C durante diferentes tiempos según se indica en cada caso. Los cultivos anaeróbicos se realizaron en erlenmeyer sellado y bajo flujo constante de CO<sub>2</sub> al 100%. La biomasa así obtenida fue filtrada y lavada con agua estéril. Una vez removido el exceso de agua se realizaron las incubaciones con los sustratos para medir la actividad oxidorreductásica.

### **3) Técnicas de secado:**

*Liofilización directa:* La biomasa proveniente de un cultivo anaeróbico (levaduras), filtrada y pesada, se sumergió en nitrógeno líquido y se distribuyó en balones previamente enfriados a -20 °C , liofilizándose durante 1-2 horas.

*Liofilización con trehalosa:* La biomasa proveniente de un cultivo anaeróbico (levaduras), filtrada y pesada se resuspendió en una solución de trehalosa 20% peso en volumen, se fraccionó en balones y se congeló a -20°C, liofilizándose durante 3-4 horas.

*Secado con corriente de aire caliente:* La biomasa proveniente de un cultivo anaeróbico (levaduras), filtrada y pesada se disgregó con espátula, se colocó en una red de nylon de aproximadamente 50 µm de poro y se le aplicó una corriente de aire caliente. Durante las primeras 4 hs de secado se empleó un flujo de aire a 38°C. La operación se continuó durante 12 hs más a 20 °C.

El material deshidratado se pesó y se conservó en desecador a 4 °C.

Todas reacciones biocatalizadas se llevaron a cabo en un incubador rotatorio digital tipo orbital INNOVA™ 4000 (New Brunswick) equipado con control de temperatura y de velocidad y en un agitador rotatorio ubicado en un cuarto termostatzado a 28-30°C.

Las centrifugaciones se efectuaron empleando una centrífuga analítica Adams y una microcentrífuga COSTAR® para tubos eppendorf a 10000 rpm.

### **Métodos espectroscópicos**

Los espectros de absorción infrarroja (IR) se determinaron con un espectrofotómetro Nicolet Magna-IR 550 (FT/IR) en película o pastilla de bromuro de potasio.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-<sup>1</sup>H) se realizaron a 200,1 MHz en un espectrómetro Bruker AC-200. Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN-<sup>13</sup>C) se obtuvieron a 50,2 MHz en un espectrómetro Bruker AC-200. Las muestras se analizaron en tubos de 5 mm de diámetro y los solventes empleados se indican para cada caso.

En algunos casos, la asignación de las señales de <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H, se realizó utilizando una combinación de técnicas mono y bidimensionales, como ser experimentos de correlación heteronuclear (HETCOSY y COLOC).

Los desplazamientos químicos se expresan en todos los casos en la escala  $\delta$ , en partes por millón (ppm) respecto de la resonancia del tetrametilsilano, empleado como referencia interna (0,00 ppm). Las señales se indican en cada caso como singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (q), doble doblete (dd), multiplete (m) o singulete ancho ( $s_a$ ). Los desplazamientos químicos para RMN-<sup>13</sup>C se expresan en ppm utilizando como referencia el pico correspondiente al solvente deuterado.

Los espectros de masa (EM) por introducción directa se determinaron en los espectrómetros de masa TRIO-2 VG Masslab y SHIMADZU QP-5000 y fueron obtenidos por ionización por impacto electrónico a 70 eV. Para los espectros de masa de alta resolución (EMAR) se empleó un espectrómetro VG-ZAB BEQ.

### **Métodos cromatográficos**

Las cromatografías analíticas en capa delgada se realizaron con placas de aluminio de sílicagel de 0.2 mm de espesor (Sílicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck).

Los agentes de revelado utilizados fueron: luz Ultravioleta a 254 nm y a 365 nm; vapores de yodo; ácido sulfúrico 5 % en etanol; molibdato de amonio (50g/l):sulfato cérico (1g/l) en ácido sulfúrico

acuoso 10% v/v y pulverizado con solución de ninhidrina 0,01 % en etanol. En los tres últimos casos se culminó el revelado por calentamiento de la placa con pistola de aire caliente.

Las cromatografías en columna se llevaron a cabo empleando como adsorbente sílicagel (Sílicagel 60, malla 230-400, Merck).

Las cromatografías gas-líquido (CGL) fueron realizadas en cromatógrafos Hewlett Packard 5840A y 5890, ambos equipados con detectores de ionización de llama (FID) y registradores Hewlett Packard. En todos los casos se empleó nitrógeno como gas portador.

Las cromatografías gas-líquido acopladas a espectrometría de masa (CG-EM) se efectuaron en un sistema compuesto por un cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard 5890 acoplado a un espectrómetro de masa VG-TRIO-2/2000 y en un equipo SHIMADZU compuesto por un cromatógrafo GC-17A acoplado a un espectrómetro de masa QP-5050A.

En la Tabla 1.1 se detallan las características de las columnas usadas.

**Tabla 1.1.** Características de las columnas para cromatografía gas-líquido empleadas en el presente trabajo.

<b>Denominación de la columna</b>	<b>Longitud y diámetro interno</b>	<b>Características de la fase estacionaria</b>	<b>Temperatura máx. de operación</b>
CARBOWAX 20M	25m ; 0,2mm	Polietilenglicol -film de 0,2 $\mu$ m de espesor	220°C
CHIRALDEX G-TA	40m ; 0,32mm	Gamma Trifluoroacetil ciclodextrinas	180°C

Para evitar el deterioro de la fase estacionaria en la columna de fase quiral fue necesario asegurarse que las muestras a inyectar tuvieran un mínimo contenido acuoso. La fase orgánica proveniente de una extracción acuosa con cloruro de metileno contiene una cantidad de agua mayor a 100 ppm, suficiente para producir la hidrólisis de los grupos trifluoroacetilos de la fase estacionaria. Para ello se secaron las muestras a presión reducida y para luego disolverlas en cloruro de metileno anhidro.

## Solventes

Los solventes para cromatografía (en columna y en capa delgada), extracción y para recristalización fueron purificados por destilación fraccionada. En los casos restantes, se emplearon solventes de pureza grado analítico.

Las mezclas de solventes están expresadas en relaciones de volúmenes (v/v).

Los extractos de solventes orgánicos fueron secados sobre sulfato de sodio anhidro y evaporados a presión reducida, a temperaturas menores a 45°.

Preparación de tetrahidrofurano anhidro: El producto comercial se pasó a través de una columna de alúmina básica y se dejó 24 horas sobre lentejas de hidróxido de sodio. Luego se filtró, se reflujo sobre cintas de sodio metálico en presencia de hidroquinona hasta observar coloración azul-violácea y se destiló en el momento de utilizar.

Preparación de cloruro de metileno anhidro: El solvente se reflujo con pentóxido de fósforo durante 30 minutos, luego se destiló y se conservó hasta su uso en botellas color caramelo con tamices moleculares de 4 Å y bajo atmósfera de nitrógeno.

## Purificación de reactivos

Los reactivos que se listan a continuación fueron purificados por destilación fraccionada a presión atmosférica: n-butanol, n-octanol, acetoacetato de etilo y acetato de isopropenilo, este último se destiló en presencia de hidroquinona.

## 2. BIOTRANSFORMACIONES CATALIZADAS POR ENZIMAS AISLADAS

### 2.a. Preparación de derivados de piridoxina

#### Procedimiento general para las reacciones enzimáticas de acilación y alcoholisis

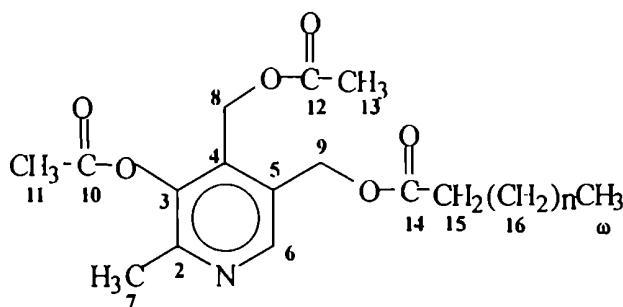
El sustrato se disolvió en el solvente en la relación indicada para cada caso. A la solución obtenida se le agregó secuencialmente el agente acilante, el nucleófilo y la enzima, la cual se empleó sin ningún tratamiento previo. La cantidad de agente acilante o nucleófilo y de biocatalizador, así como la temperatura de reacción se indican en cada caso. La suspensión se agitó a 200 rpm y el transcurso de

la reacción se siguió por cromatografía en capa delgada empleando acetato de etilo como solvente de desarrollo. Todos los ensayos se compararon contra sus respectivos blancos sin enzima.

Alcanzado el grado de conversión máximo, la enzima se filtró y se lavó con pequeñas cantidades de solvente. Para el derivado acetilado de piridoxina, se empleó metanol como solvente de lavado, mientras que para los derivados de ácidos grasos se utilizó una mezcla de cloruro de metileno: metanol (2:1). El filtrado se evaporó a presión reducida y la mezcla resultante se purificó por cromatografía en columna.

La identidad de los productos aislados se determinó por FT/IR, EM y RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C. Para los compuestos nuevos se realizaron los respectivos espectros de masa de alta resolución.

La señales de resonancia magnética nuclear se asignaron empleando la numeración que se detalla en el siguiente esquema:



### 2.a.1. Reacciones de acilación

#### **Acetato de [5-Hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (2)**

A una solución de piridoxina (200 mg; 1,2 mmoles) en acetato de etilo (10 ml, 102 mmol), se le agregaron 500 mg de CAL. La suspensión se agitó a 30°C durante 3 hs. Por cromatografía en columna empleando acetato de etilo se aislaron 209 mg de **2** (74%).

Rf (acetato de etilo): 0,4

P.F.: (152-153)°C.

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3437, 2924, 2360, 1740, 1384, 1248, 1035.

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 7,91 (*s*, 1H, H-6), 5,11 (*s*, 2H, H-9), 4,70 (*s*, 2H, H-8), 2,36 (*s*, 3H, H-7), 2,03 (*s*, 3H, H-15).

RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm) = 170,3 (C-14), 149,7 (C-3), 147,5 (C-2), 140,4 (C-6), 132,4 (C-4), 128,0 (C-5), 61,5 (C-9), 56,3 (C-8), 20,8 (C-15), 19,6 (C-7).

EM (IE, *m/z*, %) 211 (15,  $\text{M}^+$ ), 193 (22,  $[\text{M}-18]^+$ ), 151 (89), 123 (49), 106 (57), 94 (36), 43 (100).

EMAR (IE, *m/z*, %): 211,0843 ( $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_3^+$ ; calculado 211,0845).

RAYOS X. Datos cristalográficos y parámetros: cristales incoloros recristalizados de etanol: P.F.: (152-152,5) $^\circ\text{C}$ ,  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ ,  $M = 211,21$ , triclínico, grupo espacial P-1; constante de celda  $a = 7,579$  (1) Å,  $b = 7,998$  (1) Å,  $c = 9,6628$  (8) Å;  $\alpha = 71,620$  (8) $^\circ$ ,  $\beta = 82,831$  (9) $^\circ$ ,  $\gamma = 70,03$  (1) $^\circ$ ;  $V = 522,1$  (1) Å $^3$ ,  $D_c$  ( $Z=2$ ) = 1,343  $\text{Mg/m}^3$ ; dimensiones del cristal 0,25 mm, reflexiones medidas: 1984, reflexiones únicas; 1833 [ $R(\text{int}) = 0,0140$ ], reflexiones observadas ( $I > 2\sigma(I)$ ): 1128,  $R1 = 0,051$ ,  $wR2 = 0,122$ .

#### **Hexanoato de [5-Hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (15)**

A una solución de piridoxina (200 mg, 1,2 mmoles) en acetona (10 ml), se le agregaron 0,5 ml de hexanoato de etilo (3 mmoles) y 500 mg de CAL. La suspensión se agitó a 30 $^\circ\text{C}$  durante 24 hs. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con acetato de etilo:hexano (1:3) condujo a la obtención de 249 mg de 15 (69%).

$R_f$  (acetato de etilo): 0,7

P.F.: (78-79) $^\circ\text{C}$ .

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3450, 3197, 2952, 2874, 2646, 1747, 1391, 1255, 1163, 1042.

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 7,88 (*s*, 1H, H-6), 5,03 (*s*, 2H, H-9), 4,99 (*s*, 2H, H-8), 2,44 (*s*, 3H, H-7), 2,28 (*t*, 2H,  $J=7,8$  Hz, H-15), 1,27 (*m*, 6H, H-16 to H-21), 0,87 (*t*, 3H,  $J=6,9$  Hz, H-22).

RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) = 173,6 (C-14), 151,6 (C-3), 148,0 (C-2), 139,2 (C-6), 130,8 (C-4), 126,2 (C-5), 61,2 (C-9), 59,6 (C-8), 40,0 (C-15), 31,0 (C-16), 24,4 (C-17), 22,0 (C-18), 18,0 (C-7), 13,6 (C-19).

EM (IE, *m/z*, %): 267 (3,  $\text{M}^+$ ), 151 (60), 123 (28), 106 (37), 94 (22), 71 (41), 60 (27), 43 (100).

EMAR (IE, *m/z*, %): 267,1476 ( $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_4^+$ ; calculado 267,1471).

***Decanoato de [5-Hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (16)***

A una solución de piridoxina (200 mg, 1,2 mmoles) en acetona (10 ml), se le agregaron 0,7 ml de decanoato de etilo (3mmoles) y 500 mg de CAL. La suspensión se agitó a 30°C durante 48 hs. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con acetato de etilo:hexano (1:3) condujo a la obtención de 287 mg de **16** (64%).

Rf (acetato de etilo): 0,7

P.F.: (79-80)°C

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3430, 3166, 2924, 2852, 2717, 1733, 1384, 1255, 1163, 1048.

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 7,88 (*s*, 1H, H-6), 5,03 (*s*, 2H, H-9), 4,99 (*s*, 2H, H-8), 2,44 (*s*, 3H, H-7), 2,28 (*t*, 2H,  $J=7,8$  Hz, H-15), 1,25 (*m*, 14H, H-16 a H-29), 0,87 (*t*, 3H,  $J=6,9$  Hz, H-30).

RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) = 173,4 (C-14), 151,5 (C-3), 147,6 (C-2), 138,7 (C-6), 131,2 (C-4), 126,4 (C-5), 61,0 (C-9), 59,0 (C-8), 33,7 (C-15), 31,4 (C-16), 28,9 (C-17), 28,8 (C-18), 28,6 (C-19), 24,5 (C-20), 24,4 (C-21), 22,2 (C-22), 17,5 (C-7), 13,4 (C-23).

EM (IE,  $m/z$ , %) : 323 (1,  $M^+$ ), 151 (77), 123 (50), 106 (43), 94 (21), 71 (30), 55 (43), 43 (100).

EMAR (IE,  $m/z$ , %) : 323,2097 ( $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NO}_4^+$  ; calculado 323,2097).

***Tetradecanoato de [5-Hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (17)***

A una solución de piridoxina (200 mg, 1,2 mmoles) en acetona (10 ml), se le agregaron 0,9 ml de tetradecanoato de etilo (3mmoles) y 500 mg de CAL. La suspensión se agitó a 30°C durante 72 hs. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con acetato de etilo:hexano (1:3) condujo a la obtención de 255 mg de **17** (57%).

Rf (acetato de etilo): 0,7

P.F.: (93-94)°C.

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3435, 3183, 2924, 2859, 2695, 1747, 1427, 1241, 1170, 1042 .

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 7,88 (*s*, 1H, H-6), 5,03 (*s*, 2H, H-9), 4,99 (*s*, 2H, H-8), 2,44 (*s*, 3H, H-7), 2,28 (*t*, 2H,  $J=7,8$  Hz, H-15), 1,25 (*m*, 22H, H-16 a H-37), 0,87 (*t*, 3H,  $J=6,9$  Hz, H-38).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>:CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) = 173,6 (C-14), 151,6 (C-3), 148,0 (C-2), 139,2 (C-6), 130,9 (C-4), 126,3 (C-5), 61,2 (C-9), 59,6 (C-8), 33,9 (C-15), 31,7 (C-16), 29,4, 29,2, 29,1, 29,0, 28,9 (C-17 a C-24), 24,7 (C-22), 22,5 (C-23), 17,9 (C-7), 13,8 (C-24).

EM (IE, m/z, %) : 379 (1, M<sup>+</sup>), 151 (100), 123 (55), 106 (29), 94 (13), 71 (15), 57 (41), 43 (92).

EMAR (IE, m/z, %) : 379,2725 (C<sub>22</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup> ; calculado 379,2723).

***Clorhidrato de Tetradecanoato de [5-Hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (26)***

A una solución del compuesto 17 (200 mg, 0,5 mmoles) en acetato de etilo:metanol (30 ml, 20:1) se burbujeó cloruro de hidrógeno. A los pocos minutos se observó la aparición de un sólido blanco continuándose el burbujeo hasta cristalización completa. Por filtración se obtuvieron 191 mg de 26 (87 %).

P.F.: (123-124)°C.

RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) = 8,12 (*s*, 1H, H-6), 5,19 (*s*, 2H, H-9), 5,10 (*s*, 2H, H-8), 4,25 (*s*, 1H, NH), 2,68 (*s*, 3H, H-7), 2,38 (*t*, 2H, J=7,8 Hz, H-15), 1,26 (*m*, 22H, H-16 a H-37), 0,88 (*t*, 3H, J=6,9 Hz, H-38).

***Octadecanoato de [5-Hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (18)***

A una solución de piridoxina (200 mg, 1,2 mmoles) en acetona (10 ml), se le agregaron 850 mg de ácido octadecanoico (3mmoles) y 500 mg de CAL. La suspensión se agitó a 30°C durante 72 hs. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con acetato de etilo:hexano (1:3) condujo a la obtención de 355 mg de 18 (69%).

Rf (acetato de etilo): 0,7

P.F.: (96-97) °C.

IR (film, CHCl<sub>3</sub>): 3444, 3045, 2924, 2859, 2703, 1733, 1483, 1241, 1177, 1049.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 7,91 (*s*, 1H, H-6), 5,02 (*s*, 2H, H-9), 4,99 (*s*, 2H, H-8), 2,45 (*s*, 3H, H-7), 2,28 (*t*, 2H, J=7,8 Hz, H-11), 1,59 (*m*, 2H, H-12), 1,25 (*m*, 30H, H-13 a H-26), 0,88 (*t*, 3H, J=6,9 Hz, H-27).



RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>:CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) = 173,53 (C-10), 151,46 (C-3), 147,92(C-2), 139,07 (C-6), 130,96 (C-4), 126,32 (C-5), 61,12 (C-9), 59,40 (C-8), 33,91 (C-11), 31,65 (C-12), 29,40, 29,18, 29,06, 28,95, 28,85 (C-13 a C-23), 24,74 (C-24), 24,61 (C- 25), 22,39 (C-26), 17,79 (C-7), 13,71 (C-27).

EM (IE,m/z,%): 435 [M<sup>+</sup>] (1), 151 (100), 123 (36), 106 (15), 85 (15), 73 (49), 57 (75), 43 (96).

EMAR (IE,m/z,%): 435,3334 (C<sub>26</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calculado 435,3349).

***Clorhidrato de Octadecanoato de [5-Hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (27)***

A una solución del compuesto **18** (200mg, 0,5 mmoles) en acetato de etilo:metanol (30 ml, 20:1) se burbujeó cloruro de hidrógeno. A los pocos minutos se observó la aparición de un sólido blanco continuándose el burbujeo hasta cristalización completa. Por filtración se obtuvieron 191 mg de **27** (79 %).

P.F.: (126-128)°C.

RMN- <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) = 8,10 (s, 1H, H-6), 5,19 (s, 2H, H-9), 5,11 (s, 2H, H-8), 4,25 (s, 1H, NH), 2,70 (s, 3H, H-7), 2,39 (t, 2H, J=7,8 Hz, H-11), 1,63 (m, 2H, H-12), 1,26 (m, 30H, H-13 a H-26), 0,88 (t, 3H, J=6,9 Hz, H-27).

***Eicosanoato de [5-Hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (19)***

A una solución de piridoxina (200 mg, 1,2 mmoles) en acetona (10 ml), se le agregaron 1g de ácido eicosanoico (3,2 mmoles) y 500 mg de CAL. La suspensión se agitó a 30°C durante 96 hs. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con acetato de etilo:hexano (1:3) condujo a la obtención de 350 mg de **19** (64%).

Rf (acetato de etilo): 0,7

P.F.: (99-100)°C.

IR (film, CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3443, 2923, 2855, 1711, 1462, 1307, 1105, 1044.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>:CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) = 7,89 (s, 1H, H-6), 5,06 (s, 2H, H-9), 4,95 (s, 2H, H-8), 2,46 (s, 3H, H-7), 2,34 (t, 2H, J=7,8 Hz, H-11), 1,62 (m, 2H, H-12), 1,30 (m, 34H, H-13 a H-28), 0,90 (t, 3H, J=6,9 Hz, H-29).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>:CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) = 173,97 (C-10), 151,92 (C-3), 148,31 (C-2), 139,47 (C-6), 131,36 (C-4), 126,73 (C-5), 61,53 (C-9), 59,78 (C-8), 34,31 (C-11), 32,05 (C-12), 29,81, 29,73, 29,60, 29,49, 29,35, 29,24 (C-13 a C-26), 25,01 (C-27), 22,80 (C-28), 18,20 (C-7), 14,12 (C-29).

EM (IE, m/z,%): 463 [M<sup>+</sup>](1), 151 (100), 123 (20), 106 (12), 83 (13), 73 (12), 57 (54), 43 (100).

EMAR (IE, m/z,%): 463,3661 (C<sub>28</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calculado 463,3662).

***Cis-9-octadecenoato de [5-Hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (20)***

A una solución de piridoxina (200 mg, 1,2 mmoles) en acetona (10 ml), se le agregaron 1,1 ml de ácido *cis*-9-octadecenoico (3 mmoles) y 500 mg de CAL. La suspensión se agitó a 30°C durante 96 hs. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con acetato de etilo:hexano (1:3) condujo a la obtención de 308 mg de **20** (60%).

Rf (acetato de etilo): 0,7

P.F.: (37-38) °C.

IR (film, CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3451, 3016, 2931, 2859, 2710, 1740, 1462, 1248, 1163, 1049.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 7,89 (s, 1H, H-6), 5,33 (m, 2H, H-18 y H-19), 5,03 (s, 2H, H-9), 4,99 (s, 2H, H-8), 2,44 (s, 3H, H-7), 2,28 (t, 2H, J=7,8 Hz, H-11), 2,00 (m, 4H, H-17 y H-20), 1,59 (m, 2H, H-12), 1,27 (m, 20H, H-13 to H-16 y H-21 a H-26), 0,88 (t, 3H, J=6,9 Hz, H-27).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>:CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) = 173,29 (C-10), 152,14 (C-3), 148,28 (C-2), 139,25 (C-6), 130,90 (C-4), 130,06, 129,69 (C-22 y C-23), 126,40 (C-5), 61,23 (C-9), 60,29 (C-8), 34,15 (C-11), 31,91 (C-12), 29,78, 29,70, 29,54, 29,32, 29,16, 27,25, 27,17 (C-13 a C-24), 24,88 (C-25), 22,69 (C-26), 18,19 (C-7), 14,12 (C-27).

EM (IE, m/z,%): 433 [M<sup>+</sup>](1), 151 (83), 123 (48), 106 (23), 83 (18), 69 (31), 57 (40), 55 (79), 43 (90), 41 (100).

EMAR (IE, m/z,%): 433,3213 (C<sub>26</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calculado 433,3192).

***Trans-9-octadecenoato de [5-Hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (21)***

A una solución de piridoxina (200 mg, 1,2 mmoles) en acetona (10 ml), se le agregaron 850 mg de ácido *trans-9-octadecenoico* (3 mmoles) y 500 mg de CAL. La suspensión se agitó a 30°C durante 96 hs. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con acetato de etilo:hexano (1:3) condujo a la obtención de 261 mg de **21** (51%).

Rf (acetato de etilo): 0,7

P.F.: (47-48)°C.

IR (film, CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3437, 3038, 2916, 2852, 2703, 1740, 1469, 1248, 1177, 1035.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 7,88 (s, 1H, H-6), 5,37 (m, 2H, H-18 y H-19), 5,03 (s, 2H, H-9), 4,98 (s, 2H, H-8), 2,44 (s, 3H, H-7), 2,28 (t, 2H, J=7,8 Hz, H-11), 1,96 (m, 4H, H-17 y H-20), 1,58 (m, 2H, H-12), 1,27 (m, 20H, H-13 a H-16 y H-21 a H-26), 0,87 (t, 3H, J=6,9 Hz, H-27).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>:CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) = 173,21 (C-10), 152,19 (C-3), 148,09 (C-2), 138,87 (C-6), 130,98 (C-4), 130,41, 130,03 (C-18 y C-19), 126,34 (C-5), 61,09 (C-9), 60,12 (C-8), 34,01 (C-11), 32,50, 31,80, 29,56, 29,45, 29,37, 29,21, 29,08, 28,83 (C-12 a C-24), 24,76 (C-25), 22,58 (C-26), 18,00 (C-7), 13,98 (C-27).

EM (IE, m/z, %) : 433 [M<sup>+</sup>](1), 151 (52), 123 (33), 83 (19), 69 (29), 55 (62), 43 (63), 41 (100).

EMAR (IE, m/z, %) : 433,3197 (C<sub>26</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calculado 433,3192).

***Cis,cis-9,12-octadecadienoato de [5-Hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (22)***

A una solución de piridoxina (200 mg, 1,2 mmoles) en acetona (10 ml), se le agregaron 1,1 ml de ácido *cis,cis-9,12-octadecadienoico* (3 mmoles) y 500 mg de CAL. La suspensión se agitó a 30°C durante 96 hs. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con acetato de etilo:hexano (1:3) condujo a la obtención de 311 mg de un aceite viscoso **22** (61%).

Rf (acetato de etilo): 0,7

IR (film, CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3448, 3024, 2938, 2857, 2704, 1741, 1394, 1226, 1160, 1039.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 7,86 (s, 1H, H-6), 5,35 (m, 4H, H-18, H-19, H-21 y H-22), 5,02 (s, 2H, H-9), 4,98 (s, 2H, H-8), 2,76 (m, 2H, H-20), 2,43 (s, 3H, H-7), 2,28 (t, 2H, J=7,8 Hz, H-11),

2,04 (m, 4H, H-17 y H-23), 1,60 (m, 2H, H-12), 1,29 (m, 14H, H-13 a H-16 y H-24 a H-26), 0,89 (t, 3H, J=6,9 Hz, H-27).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>:CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) = 173,22 (C-10), 152,14 (C-3), 148,08 (C-2), 138,90 (C-6), 131,03 (C-4), 130,12, 129,86, 128,02, 127,81 (C-18, C-19, C-21 y C-22), 126,35 (C-5), 61,11 (C-9), 60,08 (C-8), 34,01 (C-11), 31,42 (C-12), 29,48, 29,23, 28,99, 27,09, 25,55 (C-13 a C-17, C-20, C-23 and C-24), 24,75 (C-25), 22,46 (C-26), 18,00 (C-7), 13,95 (C-27).

EM (IE, m/z, %) : 431 [M<sup>+</sup>](1), 151 (19), 123 (19), 106 (10), 81 (42), 67 (66), 55 (49), 43 (32), 41 (100).

EMAR (IE, m/z, %) : 431,3025 (C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calculado 431,3036).

***Cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoato de [5-Hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo***  
**(23)**

A una solución de piridoxina (200 mg, 1,2 mmoles) en acetona (10 ml), se le agregaron 1,1 ml de ácido *cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico* (3 mmoles) y 500 mg de CAL. La suspensión se agitó a 30°C durante 96hs. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con acetato de etilo:hexano (1:3) condujo a la obtención de 310 mg de un aceite viscoso **23** (61%).

R<sub>f</sub> (acetato de etilo): 0,7

IR (film, CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3447, 3009, 2938, 2852, 2695, 1747, 1469, 1227, 1163, 1042 .

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 7,84 (s, 1H, H-6), 5,32 (m, 6H, H-18, H-19, H-21, H-22, H-24 y H-25), 5,01 (s, 2H, H-9), 4,98 (s, 2H, H-8), 2,80 (m, 4H, H-20 y H-23), 2,43 (s, 3H, H-7), 2,28 (t, 2H, J=7,8 Hz, H-11), 2,07 (m, 4H, H-17 y H-26), 1,59 (m, 2H, H-12), 1,28 (m, 8H, H-13 a H-16), 0,97 (t, 3H, J=6,9 Hz, H-27).

RMN-<sup>13</sup> (CDCl<sub>3</sub>:CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) = 173,13 (C-10), 152,22 (C-3), 148,07 (C-2), 138,85 (C-6), 131,04 (C-4), 126,37 (C-5), 131,84, 130,09, 128,21, 128,13, 127,69, 127,05 (C-18, C-19, C-21, C-22, C-24 y C-25), 61,10 (C-9), 60,16 (C-8), 34,01 (C-11), 29,46, 29,00, 27,11, 25,47, 25,55, 24,77, 20,46 (C-12 a C-17, C-20, C-23 y C-26), 18,01 (C-7), 14,18 (C-27).

EM (IE, m/z, %) : 429 [M<sup>+</sup>](3), 123 (20), 93 (21), 79 (56), 67 (60), 55 (61), 43 (38), 41 (100).

EMAR (IE, m/z, %) : 429,2882 (C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calculado 429,2879).

***Cis,cis,cis,cis-5,8,11,14-eicosatetraenoato de [5-Hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (24)***

A una solución de piridoxina (200 mg, 1,2 mmoles) en acetona (10 ml), se le agregaron 1,2 ml de ácido *cis,cis,cis,cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico* (3 mmoles) y 500 mg de CAL. La suspensión se agitó a 30°C durante 96hs. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con acetato de etilo:hexano (1:3) condujo a la obtención de 318 mg de un aceite viscoso **24** (59%).

Rf (acetato de etilo): 0,7

IR (film, CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3445, 3010, 2930, 2855, 2687, 1751, 1415, 1226, 1152, 1024 .

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 7,95 (s, 1H, H-6), 5,37 (m, 6H, H-14, H-15, H-17, H-18, H-20, H-21, H-23 and H-24), 5,02 (s, 4H, H-8 y H-9), 2,80 (m, 6H, H-16, H-19 y H-22), 2,47 (s, 3H, H-7), 2,31 (t, 2H, J=7,8 Hz, H-11), 2,07 (m, 4H, H-21 y H-30), 1,72 (m, 2H, H-12), 1,30 (m, 8H, H-17 a H-20), 0,88 (t, 3H, J=6,9 Hz, H-31).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>:CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) = 173,00 (C-10), 152,03 (C-3), 148,20 (C-2), 139,12 (C-6), 131,44 (C-4), 126,29 (C-5), 154,62, 130,93, 129,04, 128,58, 128,26, 127,96, 127,75, 127,45 (C-14 a C-16, C-18, C-20 a C-24), 61,21 (C-9), 60,18 (C-8), 33,45 (C-11), 31,45, 29,24, 27,17, 26,44, 25,55, 22,51 (C-12, C-13, C-16, C-19, C-22, C-25 a C-28), 18,09 (C-7), 13,99 (C-29).

EM (IE, m/z, %) : 455 [M<sup>+</sup>](1), 123 (22), 91 (22), 81 (23), 79 (46), 67 (43), 55 (65), 43 (80), 41 (100), EMAR (IE, m/z, %) : 455,3028 (C<sub>28</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calculado 455,3036).

***Cis-13-docosenoato de [5-Hidroxi-4-(hidroximetil)-6-metilpiridin-3-il]metilo (25)***

A una solución de piridoxina (200 mg, 1,2 mmoles) en acetona (10 ml), se le agregaron 2,1 ml de *cis-13-docosenoato de cis-9-octadecilo* (3 mmoles) y 500 mg de CAL. La suspensión se agitó a 30°C durante 96 hs. La purificación del producto crudo por cromatografía en columna y elución con acetato de etilo:hexano (1:3) condujo a la obtención de 323 mg de **25** (56%).

Rf (acetato de etilo:): 0,7

P.F.: (60-61)°C.

IR (film, CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3437, 2924, 2859, 1726, 1469, 1248, 1162, 1035.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 7,90 (s, 1H, H-6), 5,34 (m, 2H, H-23 y H-24), 5,03 (s, 2H, H-9), 4,99 (s, 2H, H-8), 2,45 (s, 3H, H-7), 2,28 (t, 2H, J=7,8 Hz, H-11), 2,01 (m, 4H, H-22 y H-25), 1,58 (m, 2H, H-12), 1,25 (m, 20H, H-13 a H-21 y H-26 a H-30), 0,88 (t, 3H, J=6,9 Hz, H-31).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 173,30 (C-10), 151,73 (C-3), 148,45 (C-2), 139,67 (C-6), 130,42 (C-4), 129,88, 129,83 (C-23 y C-24), 126,19 (C-5), 61,21 (C-9), 60,29 (C-8), 34,12 (C-11), 31,88 (C-12), 29,75, 29,56, 29,48, 29,43, 29,29, 29,21, 29,11, 27,19, 27,17 (C-13 a C-22 y C-25 a C-28), 24,88 (C-29), 22,64 (C-30), 18,32 (C-7), 14,04 (C-31),.

EM (IE, m/z, %) : 489 [M<sup>+</sup>](2), 151 (100), 123 (53), 106 (16), 83 (21), 69 (33), 55 (65), 43 (43), 41 (47).

EMAR (IE, m/z, %) : 489,3816 (C<sub>26</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calculado 489,3818).

### ***N-[5-acetoximetil-3-hidroxi-2-metilpiridin-6-metilpiridin-4-il]metil acetamida (13)***

A una solución de piridoxamina (200 mg; 1,2 mmoles) en acetato de etilo (10 ml, 102 mmol), se le agregaron 500 mg de CAL. La suspensión se agitó a 30°C durante 24 hs. Por cromatografía en columna, empleando acetato de etilo como eluyente, se aislaron 45 mg de **13** (15%).

Rf (acetato de etilo:metanol 4:1): 0,6

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 8,03 (s, 1H, H-6), 7,15 (t, 1H, NH), 5,15 (s, 2H, H-9), 4,43 (d, 2H, H-8), 2,49 (s, 3H, H-7), 2,08 (s, 3H, H-15), 2,03 (s, 3H, H-13).

## ***2.a.2. Reacciones de alcoholisis***

### ***2.a.2.a. Preparación de sustratos***

#### ***Acetato de 4,5-bis(acetoximetil)-2-metilpiridin-3-ilo (3)***

A una solución de clorhidrato de piridoxina (450 mg, 2,2 mmoles) en 1,5 ml de piridina seca se agregaron 5 ml de anhídrido acético (53 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura

ambiente durante una noche. Transcurrido este tiempo, se removió el exceso de reactivo volcando la mezcla de reacción sobre agua-hielo. Se observó la formación de una fase aceitosa la cual se separó y se disolvió en 30 ml de acetato de etilo. El extracto orgánico se lavó primero con una solución 1N de NaOH (5x20 ml), luego con agua (2x20 ml) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Por evaporación del solvente se obtuvieron 370 mg de **3** (57%).

Rf (acetato de etilo): 0,7

IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2970, 2942, 1763, 1602, 1370, 1225, 1041.

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 8,37 (s, 1H, H-6), 5,19 (s, 2H, H-8), 5,07 (s, 2H, H-9), 2,34 (s, 3H, H-7), 2,31 (s, 3H, H-11), 2,01 (s, 3H, H-15), 1,96 (s, 3H, H-13).

RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 170,1 (C-12), 170,0 (C-14), 168,3 (C-10), 153,0 (C-3), 147,7 (C-6), 144,5 (C-2), 135,4 (C-4), 129,3 (C-5), 61,0 (C-9), 56,7 (C-8), 20,6 (C-13), 20,3 (C-15 y C-11), 19,4 (C-7).

EM (IE, m/z, %): 295 (2,  $\text{M}^+$ ), 253 (35), 235 (26), 193 (66), 151 (100), 123 (62), 106 (51), 94 (19), 43 (79).

#### ***Diacetato de 5-hidroxi-6-metilpiridin-3,4-dimetilo (5)***

Este compuesto fue preparado de acuerdo a la referencia.<sup>8</sup>

Se disolvieron 1,5 g de clorhidrato de piridoxina (7,3 mmoles) en 3 ml de ácido acético glacial. A la pasta formada se le agregaron 1,3 g de cloruro de acetilo (16,6 mmoles), calentándose la mezcla a 48-50°C durante 2 hs. Transcurrido ese tiempo se elevó la temperatura lentamente hasta 70°C durante 30 minutos y finalmente se redujo a 20°C mientras se purgaba la mezcla de reacción con una corriente de nitrógeno para eliminar restos de cloruro de acetilo y ácido clorhídrico. Luego se agregaron 2 ml de acetato de etilo y una vez comenzada la cristalización, 2 ml de hexano. La mezcla se mantuvo bajo agitación durante una noche a 20°C aproximadamente, se filtró, se lavó con hexano y se secó a 60-80°C para dar 2,05 g de clorhidrato de 4,5-bis(acetoximetil)-3-hidroxi-2-metilpiridina (97 %). Para obtener la base libre, se disolvió el compuesto en una mínima cantidad de agua y se agregó una solución acuosa de hidróxido de amonio (1M) hasta que un sólido blanco comenzó a precipitar (pH=6,05). El sólido obtenido se filtró y se lavó con agua para dar 1,2 g del compuesto **5** (70%).

Rf (acetato de etilo): 0,5

P.F.: (97-98)°C (lit.<sup>9</sup> (99-100)°C).

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3458, 2945, 2375, 1755, 1740, 1384, 1234, 1042, 1027.

RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) = 7,99 (s, 1H, H-6), 5,13 (s, 2H, H-8), 5,10 (s, 2H, H-9), 2,40 (s, 3H, H-7), 2,01 (s, 6H, H-13 y H-15).

RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) = 170,4 (C-12), 170,2 (C-14), 150,0 (C-3), 148,3 (C-2), 141,0 (C-6), 129,3 (C-4), 128,8 (C-5), 61,5 (C-9), 57,1 (C-8), 20,7 (C-15 y C-13), 20,0 (C-7).

EM (IE, m/z, %): 253 (18, M<sup>+</sup>), 193 (44, [M-AcOH]<sup>+</sup>), 151 (76), 123 (61), 106 (62), 94 (32), 43 (100).

### *2.a.2.b. Preparación de compuestos mediante alcoholisis catalizada por lipasas*

#### *Acetato de 4-(acetoximetil)-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-3-ilo (4)*

A una solución de acetato de 4,5-bis(acetoximetil)-2-metilpiridin-3-ilo **3** (200 mg, 0,68 mmol) en etanol absoluto (10 ml), se le agregaron 800 mg de CAL. La suspensión se agitó a 30° durante 24 horas.

Luego de purificar el producto por cromatografía en columna (solvente de desarrollo: acetato de etilo) se obtuvieron 136 mg de **4** (80%).

Rf (acetato de etilo): 0,5

P.F.: (88-89)°C (lit.<sup>10</sup> (90- 92)°C).

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3450, 3197, 2919, 1773, 1736, 1240, 1205, 1035.

RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) = 8,37 (s, 1H, H-6), 5,08 (s, 2H, H-8), 4,62 (s, 2H, H-9), 2,35 (s, 3H, H-7), 2,29 (s, 3H, H-11), 1,97 (s, 3H, H-13).

RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) = 170,0 (C-12), 168,8 (C-10), 150,8 (C-3), 146,0 (C-6), 144,3 (C-2), 135,3 (C-4), 134,6 (C-5), 58,5 (C-9), 56,8 (C-8), 20,4 (C-13), 19,2 (C-11), 17,4 (C-47).

EM (IE, m/z, %): 253 (2, M<sup>+</sup>), 211 (4), 193 (30), 151 (54), 123 (15), 94 (46), 43 (100).



***Acetato de [3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-4-il]metilo (6)***

A una solución de diacetato de 5-hidroxi-6-metilpiridin-3,4-dimetilo 5 (200 mg, 0,79 mmol) en etanol absoluto (10 ml), se le agregaron 800 mg de CAL. La suspensión se agitó a 30° durante 24 horas. Luego de purificar el producto por cromatografía en columna (solvente de desarrollo: acetato de etilo) se obtuvieron 119 mg de 6 (69%).

Rf (Acetato de etilo): 0,2

P.F.: (104-105)°C (lit.<sup>11</sup> (155-157) °C).

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3309, 2930, 2517, 2097, 1747, 1526, 1377, 1241, 1035.

RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) = 7,97 (s, 1H, H-6), 5,15 (s, 2H, H-8), 4,51 (s, 2H, H-9), 2,38 (s, 3H, H-7), 2,00 (s, 3H, H-13).

RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) = 170,6 (C-12), 149,8 (C-3), 146,7 (C-2), 139,6 (C-6), 134,9 (C-4), 127,9 (C-5), 58,9 (C-9), 57,1 (C-8), 20,8 (C-13), 19,9 (C-7).

EM (IE, m/z, %): 211 (12, M<sup>+</sup>), 193 (13, [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 151 (89), 123 (30), 106 (49), 94 (48), 43 (100).

**2.b. Preparación de amidas a partir de ácidos carboxílicos****Procedimiento general para las reacciones de esterificación y aminólisis catalizadas por lipasa**

A una solución del ácido carboxílico (3 mmoles) en etanol absoluto (5 ml, 85 mmol) se agregaron 500 mg de lipasa de *Candida antarctica* (CAL). La suspensión resultante se agitó a 200 rpm y 30°C de temperatura. El curso de la reacción, determinado por cromatografía en capa delgada o CGL, se continuó hasta lograr la mayor conversión posible de ácido en el éster correspondiente. La identidad del éster formado se determinó por RMN-<sup>1</sup>H tomando una alícuota de 0,1 ml y llevándola a sequedad en el rotavapor. Posteriormente se realizó el agregado de la amina (4 mmol) y se mantuvo la mezcla en agitación bajo las mismas condiciones antes indicadas. Las reacciones se siguieron tomando alícuotas a diferentes tiempos, las cuales fueron analizadas por CGL (Carbowax 20M). Las reacciones se detuvieron a los tiempos adecuados filtrando la enzima y evaporando el solvente. La identidad de los productos de reacción se determinó por CG/EM, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C.

**Propanoato de etilo (32)**

220  $\mu$ l de ácido propiónico (3 mmoles) en 5 ml de etanol absoluto reaccionaron en presencia de 500 mg de CAL en 2 hs. Conversión (CGL,  $t_R = 2,1$  min, condiciones de corrida: 4' a 80°C, 15°/min hasta 200°C): 100%.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 4,12 (q, 2H, -CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2,30 (q, 2H, -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-), 1,27 (t, 3H, -CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,14 (t, 3H, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-)).

**N-Propilpropanamida (33)**

Luego del agregado de 330  $\mu$ l de n-propilamina (4 mmoles), la reacción se continuó durante 2 días obteniéndose 310 mg de **33** (90%).

CGL (4' a 80°C, 15°/min hasta 200°C):  $t_R = 8,5$  min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 6,00 (s<sub>a</sub>, 1H, NH), 3,24 (q, 2H, -CONH-CH<sub>2</sub>-), 2,20 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-CONH-), 1,48 (m, 2H, -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,16 (m, 2H, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CONH-), 0,93 (t, 3H, -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 174,29 (-CONH-), 39,29 (-CONH-CH<sub>2</sub>-), 31,79 (-CH<sub>2</sub>CONH-), 29,66 (-CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 13,79 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CONH-) y 11,00 (-CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

EM (IE, m/z, %) : 115 [M<sup>+</sup>](13), 86 (11), 57 (37), 43 (32), 41 (37), 30 (100).

**Hexanoato de etilo (34)**

380  $\mu$ l de ácido hexanoico (3 mmoles) en 5 ml de etanol absoluto reaccionaron en presencia de 500 mg de CAL en 3 hs. Conversión (CGL,  $t_R = 2,6$  min, condiciones de corrida: 4' a 80°C, 15°/min hasta 200°C): 100%

R<sub>f</sub> (hexano:acetato de etilo 9:1) = 0,6

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 4,12 (q, 2H, -CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2,28 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-), 1,61 (m, 2H,

-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), 1,27 (m, 4H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-), 1,25 (t, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,90 (t, 3H, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-).

### *N-Propilhexanamida (35)*

Luego del agregado de 330 μl de n-propilamina (4 mmoles), la reacción se continuó durante 3 días obteniéndose 460 g de **35** (98%).

CGL (4' a 80°C, 15°/min hasta 200°C): t<sub>R</sub> = 11,1 min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 5,45 (s, 1H, NH), 3,21 (q, 2H, -CONH-CH<sub>2</sub>-), 2,22 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-CONH-), 1,58 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH- y -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,31 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-), 0,95 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-), 0,89 (t, 3H, -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 174,60 (-CONH-), 45,23 (-CONH-CH<sub>2</sub>-),

34,10 (-CH<sub>2</sub>CONH-), 31,63, 26,22, 24,98, 22,26 (4 CH<sub>2</sub>), 13,94 y 11,00 (2 CH<sub>3</sub>).

EM (IE, m/z, %) : 157 [M<sup>+</sup>](1), 101 (46), 99 (17), 86 (26), 71 (17), 43 (100), 41 (37), 30 (75).

### *Decanoato de etilo (36)*

580 μl de ácido decanoico (3 mmoles) en 5 ml de etanol absoluto reaccionaron en presencia de 500 mg de CAL en 3 hs. Conversión (CGL, t<sub>R</sub> = 7,3 min, condiciones de corrida: 5' a 80°C, 15°/min hasta 200°C): 100%

R<sub>f</sub> (hexano:aceto de etilo 9:1) = 0,6

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 4,13 (q, 2H, -CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2,27 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-), 1,60 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), 1,27 (m, 12H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-), 1,24 (t, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,91 (t, 3H, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-).

### *N-Propildecanamida (37)*

Luego del agregado de 330 μl de n-propilamina (4 mmoles), la reacción se continuó durante 7 días obteniéndose 610 g de **37** (95%).

CGL (5' a 80°C, 15°/min hasta 200°C):  $t_R = 13,3$  min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 5,76 (s<sub>a</sub>, 1H, NH), 3,20 (q, 2H, -CONH-CH<sub>2</sub>-), 2,16 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-CONH-), 1,57 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH- y -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,31 (m, 12H, (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-), 0,92 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-), 0,88 (t, 3H, -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 174,65 (-CONH-), 45,28 (-CONH-CH<sub>2</sub>-), 34,21 (-CH<sub>2</sub>CONH-), 32,53, 30,12, 30,01, 29,72, 29,29, 26,23, 24,48, 23,16 (8 CH<sub>2</sub>), 13,8 y 11,09 (2 CH<sub>3</sub>).

EM (IE, m/z, %) : 213 [M<sup>+</sup>](1), 114 (12), 101(47), 86 (13), 42 (48), 40 (33), 31 (100).

### ***Tetradecanoato de etilo (38)***

685 mg de ácido mirístico (3 mmoles) en 5 ml de etanol absoluto reaccionaron en presencia de 500 mg de CAL en 3 hs. Conversión (CGL,  $t_R = 11,5$  min, condiciones de corrida: 5' a 80°C, 15°/min hasta 200°C): 100%.

R<sub>f</sub> (hexano:aceto de etilo 9:1) = 0,6

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 4,12 (q, 2H, -CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2,28 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-), 1,61 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-), 1,26 (m, 20H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-), 1,24 (t, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,92 (t, 3H, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-).

### ***N-Propiltetradecanamida (39)***

Luego del agregado de 330 μl de n-propilamina (4 mmoles), la reacción se continuó durante 8 días. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 19:1) obteniéndose 680 mg de 39 (84%)

CGL (4' a 80°C, 15°/min hasta 200°C):  $t_R = 17,5$  min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 5,47 (s<sub>a</sub>, 1H, NH), 3,21 (q, 2H, -CONH-CH<sub>2</sub>-), 2,15 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-CONH-), 1,59 (m, 2H, -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,55 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-), 1,25 (m, 20H, (CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-), 0,95 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-), 0,88 (t, 3H, -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 174,11 (-CONH-), 45,21 (-CONH-CH<sub>2</sub>-),

33,94 (-CH<sub>2</sub>CONH-), 31,96, 29,73, 29,53, 29,38, 29,31, 25,61, 24,45, 22,72 (12 CH<sub>2</sub>), 14,08 y 11,07 (2 CH<sub>3</sub>).

EM (IE, m/z, %) : 269 [M<sup>+</sup>](1), 114 (21), 101(100), 86 (22), 55 (21), 43 (69), 41 (36), 30 (33).

#### ***Octadecanoato de etilo (40)***

850 mg de ácido esteárico (3 mmoles) en 5 ml de etanol absoluto reaccionaron en presencia de 500 mg de CAL en 3 hs. Conversión (CGL, t<sub>R</sub> = 14,1 min, condiciones de corrida: 5' a 100°C, 15°/min hasta 200°C): 100%.

R<sub>f</sub> (hexano:aceto de etilo 9:1) = 0,6

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 4,12 (q, 2H, -CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2,28 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-), 1,61 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), 1,26 (m, 28H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-), 1,24 (t, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,91 (t, 3H, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-).

#### ***N-Propiloctadecanamida (41)***

Luego del agregado de 330 μl de n-propilamina (4 mmoles), la reacción se continuó durante 8 días. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 19:1) obteniéndose 830 mg de 41 (85%).

CGL (4' a 100°C, 15°/min hasta 200°C): t<sub>R</sub> = 20,2 min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 5,47 (s, 1H, NH), 3,21 (q, 2H, -CONH-CH<sub>2</sub>-), 2,15 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-CONH-), 1,60 (m, 4H, -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- y -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-), 1,26 (m, 28H, (CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-), 0,92 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-), 0,88 (t, 3H, -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 174,32 (-CONH-), 45,29 (-CONH-CH<sub>2</sub>-),

33,89 (-CH<sub>2</sub>CONH-), 31,91, 29,69, 29,54, 29,37, 29,3, 25,59, 24,38, 22,77 (16 CH<sub>2</sub>), 14,11 y 11,05 (2 CH<sub>3</sub>).

EM (IE, m/z, %) : 325 [M<sup>+</sup>](1), 114 (24), 101(100), 86 (25), 42 (38), 40 (34), 31 (32).

***Cis-9-octadecenoato de etilo (42)***

950  $\mu\text{l}$  de ácido oleico (3 mmoles) en 5 ml de etanol absoluto reaccionaron en presencia de 500 mg de CAL en 3 hs. Conversión (CGL,  $t_R = 14,2$  min, condiciones de corrida: 4' a 100°C, 15°/min hasta 200°C): 100%.

Rf (hexano:aceto de etilo 9:1) = 0,6

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 5,33 (t, 2H, H-9 y H-10), 4,12 (q, 2H,  $-\text{CO}_2\text{CH}_2-$ ), 2,24 (t, 2H, H-2), 2,01 (m, 4H, H-8 y H-11), 1,61 (m, 2H, H-3), 1,28 (m, 20H, H-4 a H-7 y H-12 a H-17), 1,24 (t, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0,91 (t, 3H, H-18).

***N-Propil-cis-9-octadecenamida (43)***

Luego del agregado de 330  $\mu\text{l}$  de n-propilamina (4 mmoles), la reacción se continuó durante 8 días. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 19:1) obteniéndose 860 mg de **43** (89%).

CGL (4' a 100°C, 15°/min hasta 200°C):  $t_R = 20,2$  min

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 5,73 ( $s_b$ , 1H, NH), 5,34 (t, 2H,  $J=5,2$  Hz, H-9 y H-10), 3,20 (q, 2H,  $-\text{CONH}-\text{CH}_2-$ ), 2,15 (t, 2H, H-2), 2,05 (m, 4H, H-8 y H-11), 1,57 (m, 4H,  $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  y H-3), 1,26 (m, 20H, H-4 a H-7 y H-12 a H-17), 0,95 (t, 3H, H-18), 0,88 (t, 3H,  $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 174,53 ( $-\text{CONH}-$ ), 130,02, 129,79 (C-9 Y C-10), 45,22 ( $-\text{CONH}-\text{CH}_2-$ ), 34,43 (C-2), 32,00, 29,86, 29,75, 29,46, 29,30, 29,17, 27,30, 27,19, 25,19, 24,45, 22,91 (C-3 a C-8 y C-11 a C-17), 14,13 ( $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) y 11,02 (C-18).

EM (IE, m/z, %) : 323 [ $\text{M}^+$ ](1), 114 (31), 101(42), 86 (12), 55 (29), 43 (45), 41 (32), 30 (100).

***Trans-9-octadecenoato de etilo (44)***

850 mg de ácido trans-9-octadecenoico (3 mmoles) en 5 ml de etanol absoluto reaccionaron en presencia de 500 mg de CAL en 3 hs. Conversión (CGL,  $t_R = 12,6$  min, condiciones de corrida: 4' a 100°C, 15°/min hasta 200°C): 100%.

Rf (hexano:aceto de etilo 9:1) = 0,6

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 5,37 (t, 2H, H-9 y H-10), 4,12 (q, 2H, -CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2,28 (t, 2H, H-2), 1,97 (m, 4H, H-8 y H-11), 1,61 (m, 2H, H-3), 1,28 (m, 20H, H-4 a H-7 y H-12 a H-17), 1,24 (t, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,88 (t, 3H, H-18).

#### ***N-Propil-trans-9-octadecenamida (45)***

Luego del agregado de 330 μl de n-propilamina (4 mmoles), la reacción se continuó durante 8 días. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 19:1) obteniéndose 810 mg de **45** (84%).

CGL (4' a 100°C, 15°/min hasta 200°C): t<sub>R</sub> = 21,8 min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 5,76 (s, 1H, NH), 5,38 (t, 2H, J=5,2 Hz, H-9 y H-10), 3,21 (q, 2H, -CONH-CH<sub>2</sub>-), 2,15 (t, 2H, C-2), 1,96 (m, 4H, H-8 y H-11), 1,61 (m, 4H, -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- y C-3), 1,27 (m, 20H, H-4 a H-7 y H-12 a H-17), 0,95 (t, 3H, H-18), 0,88 (t, 3H, -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 174,53 (-CONH-), 130,52, 130,21 (C-9 y C-10), 45,32 (-CONH-CH<sub>2</sub>-), 34,14 (C-2), 32,61, 31,95, 29,56, 29,37, 29,12, 24,71, 24,52, 22,73 (C-3 a C-8 y C-11 a C-17), 14,09 (-CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) y 11,07 (C-18).

EM (IE, m/z, %) : 323 [M<sup>+</sup>](1), 114 (29), 101(40), 86 (11), 55 (31), 43 (46), 41 (34), 30 (100).

#### ***Succinato de dietilo (54)***

360 mg de ácido succínico (3 mmoles) en 5 ml de etanol absoluto reaccionaron en presencia de 500 mg de CAL en 24 hs. Conversión (CGL, t<sub>R</sub> = 6,9 min, condiciones de corrida: 5' a 80°C, 5°/min hasta 200°C): 100%.

Rf (hexano:aceto de etilo 1:1) = 0,7

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 4,15 (q, 4H, 2 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OCO-), 2,62 (s, 4H, -COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 1,26 (t, 6H, 2 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OCO-).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 172,32 (2-CO-), 60,79 (2 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OCO-), 29,63 (-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-), 14,11 (2 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OCO-).

EM (IE, m/z, %) : 174[M<sup>+</sup>](1), 129 [ M<sup>+</sup> - OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>] (58), 101 [129- CO] (100), 73 (29), 55 (39), 45 (26).

### **3-(*N*-Propilcarbamoil)propanoato de etilo (55)**

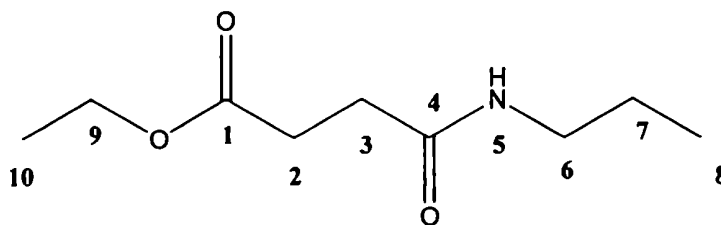
Luego del agregado de 330 µl de *n*-propilamina (4 mmoles), la reacción se continuó durante 2 días. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 1:1) obteniéndose 390 mg de **55** (70%).

CGL (4' a 80°C, 15°/min hasta 200°C): t<sub>R</sub> = 13,4 min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 5,70 (s<sub>a</sub>, 1H, H-5), 4,12 (q, 2H,H-9, 3,22 (q, 2H, H-6), 2,63 (t, 2H, H-3), 2,46 (t, 2H,H-2), 1,52 (m, 2H, H-7), 0,94 (t, 3H, H-8) y 0,89 (t, 3H, H-10).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 173,40 (C-4), 171,42 ( C-1), 51,95 (C-9), 39,68 (C-6), 30,93 (C-2), 29,94 (C-3), 27,89 ( C-7), 14,36 (C-10) y 13,11 (C-8).

EM (IE, m/z, %) : 187 [M<sup>+</sup>](6), 142 [ M<sup>+</sup> - OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>] (33), 129 [ M<sup>+</sup> - NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>] (77), 101 (100), 73 (25), 58 (46), 43 (55), 30 (69).



### ***N*-Propilsuccinimida (56)**

Luego del agregado de 330 µl de *n*-propilamina (4 mmoles), la reacción se continuó durante 6 días. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 1:1) obteniéndose 230 mg de **56** (54%).

CGL (4' a 80°C, 15°/min hasta 200°C): t<sub>R</sub> = 9,9 min



RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 3,48 (t, 2H, -N-CH<sub>2</sub>-), 2,69 (s, 4H, -COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-), 1,60 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 0,97 (t, 3H, N-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 176,80 (CO), 38,23 (N-CH<sub>2</sub>-), 28,65 (-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-), 26,18 (N-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 13,21 (N-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

EM (IE, m/z, %) : 141[M<sup>+</sup>](40), 100 (100), 84 (39), 54 (88), 41 (31), 31 (89).

### ***Lactato de etilo (60)***

260 μl de ácido D,L láctico (85% en agua; 3 mmoles) en 5 ml de etanol absoluto reaccionaron en presencia de 500 mg de CAL en 24 hs. Conversión (CGL, t<sub>R</sub> = 11,6 min, condiciones de corrida: 1' a 80°C, 5°/min hasta 200°C): 100%.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 4,27 (q, 1H, CH<sub>3</sub>CH(OH)COO-), 4,24 (q, 2H, -COOCH<sub>2</sub>-), 3,10 (s, 1H, OH), 1,40 (d, 3H, J= 6,82 Hz, CH<sub>3</sub>CHOHCOO-), 1,31 (t, 3H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

### ***N-Propilactamida (61)***

Luego del agregado de 330 μl de n-propilamina (4 mmoles), la reacción se continuó durante 4 días obteniéndose 385 mg de **61** (98%).

CGL (4' a 80°C, 15°/min hasta 200°C): t<sub>R</sub> = 15,6 min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 7,23 (s, 1H, NH), 4,15 (q, 1H, J= 6,82 Hz, CH<sub>3</sub>CHOHCONH-), 3,20 (q, 2H, -CONH-CH<sub>2</sub>-), 1,55 (m, 2H, -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,36 (d, 3H, J= 6,82 Hz, CH<sub>3</sub>CHOHCONH-), 0,94 (t, 3H, -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 175,60 (-CONH-), 75,61 (CH<sub>3</sub>CHOHCONH-), 45,53 (-CONH-CH<sub>2</sub>-), 23,84 (-CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 18,39 (CH<sub>3</sub>CHOHCONH-) y 10,90 (-CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

EM (IE, m/z, %) : 131[M<sup>+</sup>](4), 87 (20), 45 (66), 43 (100), 41 (30).

***N-Hexanoil-N'-metil-1,3-propanodiamina (65)***

Luego del agregado de 350  $\mu$ l de N-metil etilendiamina (4 mmoles), la reacción se continuó durante 3 días obteniéndose 550 mg de 65 (99 %).

CGL (4' a 70°C, 15°/min hasta 200°C):  $t_R = 16,3$  min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 6,71 (s, 1H, NH), 3,34 (q, 2H, -CONH-CH<sub>2</sub>-), 2,68 (t, 2H, -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH-), 2,43 (s, 3H, -NH-CH<sub>3</sub>), -, 2,19 (s, 1H, -NHCH<sub>3</sub>), 2,15 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-CONH-), 1,67 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH- y -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,30 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-), 0,89 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 174,56 (-CONH-), 49,11 (-CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 41,23 (-CONH-CH<sub>2</sub>-), 34,31 (-CH<sub>2</sub>CONH-), 33,26 (-CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 33,12 (-NH-CH<sub>3</sub>), 31,65, 26,72, 22,46 (-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CONH-, 13,89 (CH<sub>3</sub>-).

EM (IE, m/z, %) : 186 [M<sup>+</sup>](1), 100 (74), 86 (25), 71 (26), 58 (71), 44 (100).

***(2'-N-Hidroxietyl)hexanamida (67)***

Luego del agregado de 240  $\mu$ l de 2-aminoetanol (4 mmoles), la reacción se continuó durante 3 días. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 19:1) obteniéndose 315 mg de 67 (98 %).

CGL (4' a 80°C, 15°/min hasta 200°C):  $t_R = 20,3$  min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 6,37 (s, 1H, NH), 3,67 (t, 2H, -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OH), 3,39 (q, 2H, -CONH-CH<sub>2</sub>-), 2,18 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-CONH-), 1,61 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-), 1,28 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-), 0,87 (t, 3H, -CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 174,66(-CONH-), 63,18 (-CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OH), 45,73 (-CONH-CH<sub>2</sub>-), 34,21 (-CH<sub>2</sub>CONH-), 31,56, 26,12, 22,32 (3 CH<sub>2</sub>), 13,89 (CH<sub>3</sub>).

EM (IE, m/z, %) : 159 [M<sup>+</sup>](1), 116 (20), 99 (23), 71 (23), 60 (32), 44(24), 43 (100), 41 (31).

***N*-bencilhexanamida (68)**

Luego del agregado de 430  $\mu$ l de bencilamina (4 mmoles), la reacción se continuó durante 3 días. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 19:1) obteniéndose 600 mg de **68** (98 %).

CGL (4' a 70°C, 15°/min hasta 200°C):  $t_R = 21,6$  min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 7,30 (m, 5H, -Ph), 5,87 (s<sub>a</sub>, 1H, NH), 4,42 (d, 2H, -CONH-CH<sub>2</sub>-Ph), 2,20 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-CONH-), 1,65 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-), 1,30 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-), 0,89 (t, 3H, CH<sub>3</sub>-).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 170,46 (-CONH-), 138,55, 128,46, 127,72, 127,13 (Ph), 43,38 (-CONH-CH<sub>2</sub>-Ph), 34,31 (-CH<sub>2</sub>CONH-), 31,59, 25,84, 22,46 (3 CH<sub>2</sub>), 13,79 (2 CH<sub>3</sub>).

EM (IE, m/z, %) : 205 [M<sup>+</sup>](10), 149 (45), 91 (100), 65 (23), 43 (63), 41 (31).

### 3. BIOTRANSFORMACIONES CATALIZADAS POR CÉLULAS ENTERAS

#### 3.a. Reacciones catalizadas por levadura de panadería (Levex®)

**Reducciones en agua:** 1g de levadura de panadería (levex®) fue resuspendida en 40 ml de agua tridestilada. Luego de agitar la suspensión a 30°C durante 30 min, se agregaron 70  $\mu$ l de acetoacetato de isopropilo (0,5 mmoles) y en las experiencias indicadas, 0,5 g de glucosa (2,77 mmoles). La mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación a la misma temperatura durante 24 hs. Transcurrido el tiempo indicado, se separó la levadura por centrifugación y se extrajo la fase líquida con acetato de etilo (3 x 60 ml). Las fases orgánicas se juntaron, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se llevaron a sequedad en el rotavapor.

**Reducciones en medio orgánico:** A una suspensión de 5 g de levadura de panadería (levex®) en 25 ml de solvente orgánico se le agregaron 2 ml de agua tridestilada y a continuación 70  $\mu$ l de acetoacetato de isopropilo (0,5 mmoles). Luego de mantener la mezcla bajo agitación a 30°C durante 24 hs, se separó la levadura por centrifugación y se llevó a sequedad en el rotavapor.

### 3.b. Reacciones catalizadas por *Mucor rouxii*

#### 3.b.1. Condiciones generales de reacción

La biomasa (2 g) obtenida de cultivos en distintas etapas de crecimiento fue suspendida en mezclas de solvente orgánico y agua o bien sólo en solvente orgánico (volumen total de solvente 5 ml). Las reducciones en medio acuoso se llevaron a cabo con 5 ml de agua estéril y 1 g de biocatalizador. Las esporas (el número de las mismas se indica para cada caso) y la biomasa seca (0,5 g) fueron resuspendidas en 1 y 2 ml de agua estéril respectivamente, previo al agregado del solvente orgánico. Los sustratos ( $\alpha$ - o  $\beta$ -cetoésteres) fueron agregados a estos sistemas (0,10-0,25 mmoles para los ensayos estándar) e incubados a 28° y 120 rpm durante los tiempos indicados. Se terminó la reacción por centrifugación a 10000 rpm y, según el caso, se separó el sobrenadante o se extrajeron las fases acuosas con acetato de etilo. Las soluciones se llevaron a sequedad en el rotavapor.

#### 3.b.2. Análisis de los productos de reacción

Los residuos (redisueltos en cloruro de metileno anhidro) fueron analizados por CGL para la determinación del rendimiento (Carbowax 20M, condiciones de corrida: 1' a 80°C, 2°/min hasta 200°C) y la pureza enantiomérica (Chiraldex G-TA, condiciones de corrida: 80°C isotérmica, split 1:200). La configuración absoluta de los productos se determinó mediante la medición de su poder rotatorio y comparación con datos bibliográficos. La identidad de los productos de reacción se determinó por FT/IR, EM, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C.

#### 3.b.3. Preparación de sustratos

Debido a que algunos de los  $\alpha$ -cetoésteres utilizados como sustratos en las reducciones no son comerciales, fue necesario prepararlos a partir de sus ácidos o bien sus sales de ácidos correspondientes.

**2-Oxo-4-metilpentanoato de etilo (83)**

400 mg de 2-oxo-4-metilpentanoato (2,6 mmoles) de sodio se disolvieron en 20 ml de ácido clorhídrico 5%. La suspensión resultante se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se unieron, se lavaron con agua y se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Por evaporación del solvente se obtuvieron 302 mg de ácido (2,3 mmoles), que se trataron con 15 ml de etanol y 450 mg de CAL. La suspensión resultante se agitó a 30°C durante una noche. La reacción se detuvo filtrando la enzima, por evaporación del solvente, se obtuvieron 360 mg de **83** (99%).

R<sub>f</sub> (hexano:aceto de etilo 1:1) = 0,5

t<sub>R</sub> = 11,6 min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 4,13 (q, 2H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,82 (d, 2H, -CH<sub>2</sub>COCOO-), 2,19 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>COCOO-), 1,27 (t, 3H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,98 (d, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>COCOO-).

**2-Oxoglutarato de isopropilo (85)**

A una solución de ácido α-cetoglutarico (200 mg, 1,4 mmoles) en isopropanol (5 ml), se le agregaron 230 mg de CAL. La suspensión resultante se agitó a 30°C durante una noche. La reacción se detuvo filtrando la enzima. Por evaporación del solvente, se obtuvieron 315 mg de **85** (98%).

R<sub>f</sub> (hexano:aceto de etilo 1:9) = 0,6

t<sub>R</sub> = 9,9 min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 5,12 (q, 1H, -COCOCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,98 (q, 2H, -CH<sub>2</sub>COOCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,11 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COCOO-), 2,60 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO-), 1,32 (d, 2H, -COCOCH(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,21 (d, 2H, -CH<sub>2</sub>COOCH(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**3.b.4. Preparación de compuestos mediante reducciones****(S)-3-Hidroxi-butanoato de isopropilo (72).**

A una suspensión de levadura fresca de *Mucor rouxii* (2 g) en 5 ml de hexano se le agregaron 23 μl de acetoacetato de isopropilo (0,16 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 2 hs, obteniéndose 23 mg de **72** (98%; ee = 97 %).

$t_R = 3,9$  min

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 5,06 (m, 1H,  $-\text{COOCH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$ ), 4,18 (m, 1H,  $-\text{CHOH}-$ ), 2,43 (d, 1H,  $-\text{CHOHCH}_2\text{COO}-$ ), 2,41 (d, 1H,  $-\text{CHOHCH}_2\text{COO}-$ ), 1,25 (t, 3H,  $-\text{COOCH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$ ), 1,22 (d, 3H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CHOHCH}_2\text{COO}-$ ).

RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 172,85 (CO), 68,91 ( $-\text{COOCH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$ ), 62,10 ( $-\text{CHOH}-$ ), 43,00 ( $-\text{CHOHCH}_2\text{COO}-$ ), 22,65 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CHOHCH}_2\text{COO}-$ ), 21,80 ( $-\text{COOCH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$ ).

EM (IE, m/z, %) : 146[M+](5), 131 (19), 101 (18), 87 [M+ - OCH(CH $_3$ ) $_2$ ] (16), 73 (82), 60 (100).

$[\alpha]_D^{20}$  (c= 10, EtOH) = + 12,7° (lit. $^{12}$   $[\alpha]_D^{20}$  (c= 10, EtOH) = + 13,1°).

### ***(S)*-3-Hidroxibutanoato de etilo (74)**

A una suspensión de levadura fresca de *Mucor rouxii* (2 g) en 5 ml de hexano se le agregaron 20  $\mu\text{l}$  de acetoacetato de etilo (0,16 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs, obteniéndose 21 mg de **74** (95%; *ee* = 95 %).

$t_R = 3,8$  min

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 4,19 (m, 1H,  $-\text{CHOH}-$ ), 4,17 (q, 2H,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ), 3,70 ( $s_b$ , 1H, OH), 2,47 (s, 1H,  $-\text{CHOHCH}_2\text{COO}-$ ), 2,44 (d, 1H,  $-\text{CHOHCH}_2\text{COO}-$ ), 1,27 (t, 3H,  $-\text{COOCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 1,24 (d, 3H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CHOHCH}_2\text{COO}-$ ).

RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 173,11 (CO), 64,23 ( $-\text{CHOH}-$ ), 60,19 ( $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ), 42,95 ( $-\text{CHOHCH}_2\text{COO}-$ ), 22,25 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CHOHCH}_2\text{COO}-$ ), 14,01 ( $-\text{COOCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ).

EM (IE, m/z, %) : 132[M+](4), 117 (41), 87 [M+ - OCH $_2$ CH $_3$ ] (59), 71 (60), 45 (100).

$[\alpha]_D^{20}$  (c= 0,98,  $\text{CHCl}_3$ ) = + 41,0° (lit. $^{13}$   $[\alpha]_D^{20}$  (c= 1,  $\text{CHCl}_3$ ) = + 43,5°).

### ***(S)*-3-Hidroxibutanoato de 2-metoxietilo (76)**

A una suspensión de levadura fresca de *Mucor rouxii* (2 g) en 5 ml de hexano se le agregaron 24  $\mu\text{l}$  de acetoacetato de 2-metoxietilo (0,16 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs, obteniéndose 25 mg de **76** (97%; *ee* = 94 %).

$t_R = 11,3$  min

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 4,28 (t, 2H,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ), 4,19 (m, 1H,  $-\text{CHOH}-$ ), 3,60 (t, 2H,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ), 3,39 (s, 3H,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ), 2,51 (s, 1H,  $-\text{CHOHCH}_2\text{COO}-$ ), 2,49 (d, 1H,  $-\text{CHOHCH}_2\text{COO}-$ ), 1,23 (d, 3H,  $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_2\text{COO}-$ ).

RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 172,70 (CO), 70,52 ( $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ), 64,17

( $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ), 60,35 ( $-\text{CHOH}-$ ), 58,63 ( $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ), 42,34 ( $-\text{CHOHCH}_2\text{COO}-$ ), 21,24 ( $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_2\text{COO}-$ ).

EM (IE, m/z, %) : 162[M+](1), 147 (4), 115 (5), 87 [M+ -  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ] (34), 71 (8), 58 (100).

$[\alpha]_D^{20}$  (c=1,  $\text{CHCl}_3$ ) = + 30,5° (lit.  $^{13}$   $[\alpha]_D^{22}$  (c=1,  $\text{CHCl}_3$ ) = + 32,5°).

### **(2R,3S)-3-Hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (78)**

#### **Reducción de 2-metil-3-oxobutanoato de etilo con *Mucor rouxii***

A una suspensión de levadura fresca de *Mucor rouxii* (2 g) en 5 ml de hexano se le agregaron 23  $\mu\text{l}$  de 2-metil-3-oxobutirato de etilo (0,16 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 19:1) obteniéndose 15 mg de **78** (64%; relación de diastereoisómeros (2R,3S):(2S,3S) 8:1; *ee* (2R,3S) = 99%). Las señales corresponden al producto mayoritario.

$t_R$  (2S,3S) = 3,8 min;  $t_R$  (2R,3S) = 4,1 min

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 4,14 (q, 2H, H-6), 4,01 (dq, 1H,  $J(3,2) = 4,17$  Hz,

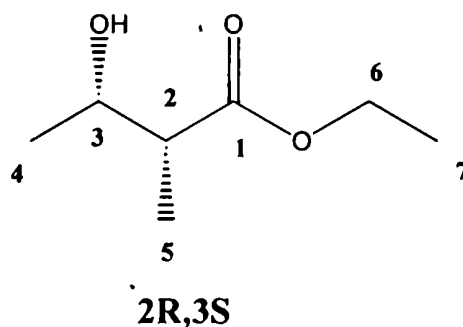
$J(3,4) = 6,26$  Hz, H-3), 2,72 (s, 1H, OH), 2,46 (dq, 1H,  $J(2,3) = 4,17$  Hz,  $J(2,5) = 7,21$  Hz, H-2), 1,25 (t, 3H, H-7), 1,16 (d, 3H,  $J(5,2) = 7,21$  Hz, H-5), 1,15 (d, 3H,  $J(4,3) = 6,26$  Hz, H-4).

RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 176,01 (C-1), 69,44 (C-3), 60,59 (C-6), 45,50 (C-2), 19,74 (C-4), 14,09 (C-7), 11,04 (C-5).

EM (IE, m/z, %) : 146 [M+](1), 128 [M+ -  $\text{H}_2\text{O}$ ] (7), 101 [M+ -  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ] (8), 83 (26), 70 (59), 55 (100).

$[\alpha]_D^{20}$  (c=1,  $\text{CHCl}_3$ ) = + 8,1° (lit.  $^{14}$  (2R,3S)  $[\alpha]_D^{25}$  (c=5,4,  $\text{CHCl}_3$ ) = + 2,3°; lit.  $^{15}$  (2R,3S:2S3S) 3:1  $[\alpha]_D^{22}$  (c=1,  $\text{CHCl}_3$ ) = + 9,1°, (2S,3S:2R,3S) 19:1  $[\alpha]_D^{22}$  (c=1,3,  $\text{CHCl}_3$ ) = + 19,1°).

Las asignaciones se basaron en las descriptas por Frater et al.  $^{15}$



**Reducción de 2-metil-3-oxobutanoato de etilo con levadura de panadería.**

A una suspensión de 5 g de levadura de panadería (Sigma) en 25 ml de solvente orgánico se le agregaron 2 ml de agua tridestilada y a continuación 70  $\mu$ l de 2-metil-3-oxobutirato de etilo (0,5 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 19:1) obteniéndose 46 mg de **78** (63%; relación de diastereoisómeros (2R,3S):(2S,3S) 8:1; *ee* (2R,3S) = 99%). Las señales corresponden al producto mayoritario.

$t_R$  (2S,3S) = 3,7 min;  $t_R$  (2R,3S) = 4,0 min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 4,14 (q, 2H, H-6), 4,01 (dq, 1H, J(3,2) = 4,17 Hz,

J(3,4) = 6,26 Hz, H-3), 2,72 (s, 1H, OH), 2,46 (dq, 1H, J(2,3) = 4,17 Hz, J(2,5) = 7,21 Hz, H-2),

1,25 (t, 3H, H-7), 1,16 (d, 3H, J(5,2) = 7,21 Hz, H-5), 1,15 (d, 3H, J(4,3) = 6,26 Hz, H-4).

**(2RS,3RS)-3-Hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (78). Reducción de 2-metil-3-oxobutanoato de etilo con borohidruro de sodio**

A una solución de 2-metil-3-oxobutirato de etilo (140  $\mu$ l, 1mmol) en metanol (5ml) se le agregaron 39,3 mg (1 mmol) de NaBH<sub>4</sub>. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Transcurrido este tiempo, se enfrió sobre hielo, se acidificó con ácido clorhídrico 5% y se extrajo tres veces con cloruro de metileno. Las fases orgánicas se unieron, se lavaron con agua y se secaron con sulfato de sodio anhidro. Por evaporación del solvente se obtuvieron 127 mg (87%) de un líquido aceitoso identificado como una mezcla de los 4 diastereoisómeros de **78**.



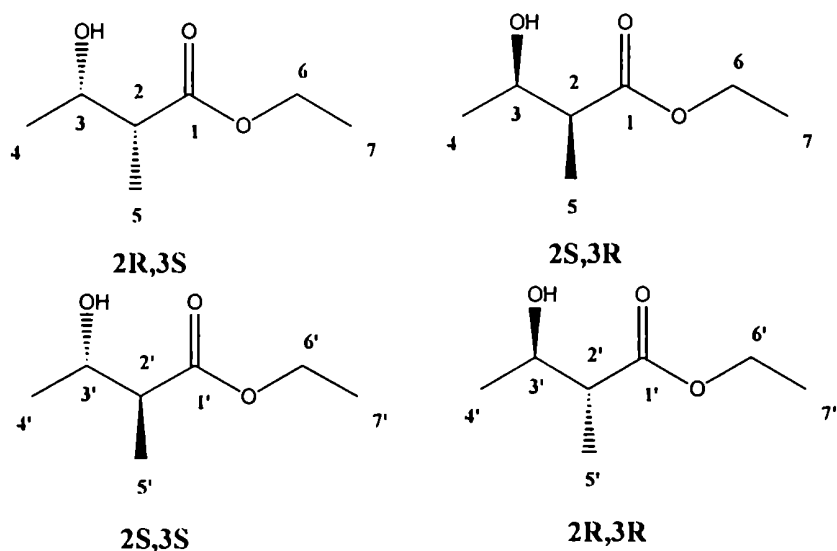
$t_R$  (2S,3S) = 3,7 min;  $t_R$  (2R,3S) = 4,1 min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 4,23-4,12 (2q, 4H, H-6 y H-6'), 4,05 (dq, 1H, J(3,2) = 4,2 Hz, J(3,4) = 6,6 Hz, H-3), 3,90 (m, 1H, J(3',2')= J(3',4') = 6,6 Hz, H-3'), 2,99 (s<sub>a</sub>, 2H, OH), 2,41 (dq, 1H, J(2,3) = 4,2 Hz, J(2,5) = 7,2 Hz, H-2), 2,37 (dq, 1H, J(2',3') = 6,6 Hz, J(2',5') = 7,2 Hz, H-2'), 1,28 (t, 6H, H-7 y H-7'), 1,23-1,16 (m, H-4, H-4', H-5 y H-5').

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 176,13 (C-1), 175,73 (C-1'), 69,10 (C-3), 67,91 (C-3'), 60,40 (C-6), 51,56 (C-6'), 46,80 (C-2'), 45,60 (C-2), 20,41 (C-4'), 19,82 (C-4), 14,01 (C-7), 14,73 (C-7'), 11,14 (C-5 y C-5').

EM (IE, m/z, %) : 146[M<sup>+</sup>](1), 128 [M<sup>+</sup> - H<sub>2</sub>O] (9), 101[M<sup>+</sup> - OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>] (12), 83 (36), 70 (65), 55 (100).

Las asignaciones se basaron en las descritas por Frater et al.<sup>15</sup>



Determinación de la proporción de diastereoisómeros en la reducción de 2-metil-3-oxobutanoato de etilo con *Mucor rouxii*

La proporción de diastereoisómeros se determinó por CGL empleando una columna de fase quiral. Las condiciones óptimas de corrida cromatográfica se buscaron empleando como patrón la mezcla de los 4 diastereoisómeros obtenida mediante la reducción de 2-metil-3-oxobutanoato de etilo con NaBH<sub>4</sub>. La determinación de la configuración absoluta se basó en la asignación de los tiempos de retención. Para ello se realizó la reducción de 2-metil-3-oxobutanoato de etilo empleando levadura de

panadería como catalizador, proceso ya descrito en literatura,<sup>16</sup> que da como únicos productos los diastéromeros 2R,3S y 2S,3S en relación 8:1. En consecuencia al realizar la corrida cromatográfica de los productos obtenidos mediante la reducción con levadura de panadería fue posible establecer los tiempos de retención de estos 2 diastereoisómeros, que coincidieron con los productos obtenidos en la reducción con *Mucor rouxii*.

**(S)-3-Hidroxi-4-metilpentanoato de etilo (80)**

A una suspensión de levadura fresca de *Mucor rouxii* (10 g) en 25 ml de hexano se le agregaron 130  $\mu$ l de 4-metil-3-oxopentanoato de etilo (0,8 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. El producto se purificó por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 4:1) obteniéndose 26 mg de **80** (20%; *ee* = 92 %).

$t_R = 9,4$  min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 4,12 (q, 2H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,71 (m, 1H, -CHOH-), 2,88 (s<sub>a</sub>, 1H, OH), 2,46 (s, 1H, -CHOHCH<sub>2</sub>COO-), 2,26 (d, 1H, -CHOHCH<sub>2</sub>COO-), 1,79 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCHOHCH<sub>2</sub>COO-), 1,24 (t, 3H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,97 (d, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCHOHCH<sub>2</sub>COO-).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 172,20 (CO), 73,07 (-CHOH-), 60,69 (-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 40,25 (-CHOHCH<sub>2</sub>COO-), 32,97 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCHOHCH<sub>2</sub>COO-), 17,25 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCHOHCH<sub>2</sub>COO-), 14,21 (-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

EM (IE, m/z, %) : 160[M<sup>+</sup>](2), 142 [M<sup>+</sup> - H<sub>2</sub>O](8), 115[M<sup>+</sup> - OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>] (14), 97 (15), 87 (59), 69 (100).

$[\alpha]_D^{20}$  (c=2,5, CHCl<sub>3</sub>) = + 15,1° (lit.<sup>17</sup>  $[\alpha]_D^{25}$  (c=2,5, CHCl<sub>3</sub>) = + 16,5°)

**(S)-2-Hidroxi-4-fenilbutanoato de etilo (82)**

800 mg de *Mucor rouxii* liofilizado se resuspendieron en 2 ml de agua estéril. A la suspensión resultante se le agregaron 5 ml de hexano y 33  $\mu$ l de 4-fenil-2-oxobutirato de etilo (0,16 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. El producto se purificó por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 4:1) obteniéndose 32 mg de **82** (96 %; *ee* = 91 %).

$t_R = 15,9$  min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 7,35-7,10 (m, 5H, H aromáticos), 4,20 (q, 2H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4,17 (m, 1H, -CHOH-), 2,93 (s<sub>a</sub>, 1H, OH), 2,77 (t, 2H, PhCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHOH COO-), 2,17-1,89 (m, 2H, PhCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHOH COO-), 1,28 (t, 3H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 175,79 (CO), 142,29, 128,74, 128,01, 125,47 (C aromáticos), 69,47 (-CHOH-), 60,91 (-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 34,78 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHOH COO-), 32,56 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHOH COO-), 14,01 (-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

EM (IE, m/z, %) : 208[M<sup>+</sup>](4), 190 [M<sup>+</sup> - H<sub>2</sub>O](6), 163 [M<sup>+</sup> - OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>] (49), 145 (69), 91 (100).

$[\alpha]_D^{20}$  (c=1,1, CHCl<sub>3</sub>) = + 19,4 ° (lit.<sup>18</sup>  $[\alpha]_D^{24}$  (c=1,1, CHCl<sub>3</sub>) = + 21,6 °)

#### **(S)-2-Hidroxi-4-metilpentanoato de etilo (84)**

800 mg de *Mucor rouxii* liofilizado se resuspendieron en 2 ml de agua estéril. A la suspensión resultante se le agregaron 5 ml de hexano y 25 mg de 4-metil-2-oxopentanoato de etilo (0,16 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. El producto se purificó por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 4:1) obteniéndose 25 mg de **84** (98 %; *ee* = 95 %).

$t_R = 12,9$  min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 4,25 (q, 2H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4,14 (dd, 1H, -CHOH-), 2,86 (s<sub>a</sub>, 1H, OH), 2,46 y 2,17 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CHOHCOO-), 1,94 (d, 1H, -CHCH<sub>2</sub>CHOHCOO-), 1,31 (t, 3H, -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,24 (d, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>CHOH COO-).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 175,91 (CO), 69,42 (-CHOH-), 60,19 (-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 42,15 (-CH<sub>2</sub>CHOH COO-), 24,96 (-CHCH<sub>2</sub>CHOH COO-), 21,59 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>CHOH COO-), 13,97 (-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

EM (IE, m/z, %) : 160[M<sup>+</sup>](2), 145 (12), 115 [M<sup>+</sup> - OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>] (45), 87 (63), 45 (100).

$[\alpha]_D^{20}$  (c=0,95, CHCl<sub>3</sub>) = -7,3 ° (lit.<sup>19</sup>  $[\alpha]_D^{20}$  (c=0,95, CHCl<sub>3</sub>) = -7,8 °)

**(S)-2-Hidroxipentanodioato de diisopropilo (86)**

800 mg de *Mucor rouxii* liofilizado se resuspendieron en 2 ml de agua estéril. A la suspensión resultante se le agregaron 5 ml de hexano y 37 mg de 2-oxoglutarato de isopropilo (0,16 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 hs. El producto se purificó por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 4:1) obteniéndose 36 mg de **86** (97 %; *ee* = 96 %).

$t_R = 11,9$  min

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 5,10 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOCOCOH-), 5,02 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOCOCH<sub>2</sub>-), 4,17 (dd, 1H, -CHOH-), 2,88 (s, 1H, OH), 2,38-2,53 (dd, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHOHCOO-), 2,07-2,24 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHOHCOO-), 1,81-1,99 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHOHCOO-), 1,29 (d, 6H, -CHOHCOOCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,24 (d, 6H, -COOCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 175,71 (-CH<sub>2</sub>CO-), 172,67 (-CHOHCO-), 70,64 (-CHOH-), 68,69 (-CHOHCOOCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 67,65 (-COOCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 31,33 (-OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHOHCOO-), 30,72 (-CH<sub>2</sub>CHOHCOO-), 21,71 (-CHOHCOOCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 21,11 (-COOCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

EM (IE, m/z, %) : 232[M+](3), 217 (4), 173 [M+ - OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (41), 87 (59), 59 (100).

$[\alpha]_D^{20}$  (c=1,4, MeOH) = -3.5° (lit.<sup>20</sup>  $[\alpha]_D^{20}$  (c=1,4, MeOH) = -3.7°)

**Referencias bibliográficas:**

1. Frenz, B.A. *Enraf-Nonius Structure Determination Package*; Enraf-Nonius: Delft, The Netherlands, 1983.
2. Sheldrick, G.M. *Acta Cryst.* 1990, A46, 467.
3. Sheldrick, G.M. SHELXL93. *Program for the Refinement of Crystal Structures*. University of Göttingen, Germany, 1993.
4. Chem SW<sup>TM</sup>, Inc. (1997) *Physical Properties! Pro<sup>TM</sup>, Computational Chemistry Program*, revision (1997) (Fairfield, California).
5. Especificaciones de Novo Nordisk sobre Lipasa SP 435.
6. Svanholm, H. *Enzymatic interesterification and esterification*, presentado en AOCS, mayo de 1989.
7. Bartnicki-García S., Nickerson W.J. *J. Bacteriol.*, 1962, 83, 841.
8. Societé Belge de l'Azote et des Produits Chimiques du Marly, Belg. 640,827, June 5, 1964, Appl. Dec.5, 1963. CA 63:587h (1965).
- 9 Nakakura, S., Japan 70 31,666, (Cl. c07cd, A 61K, B01J) Oct.13, 1970, Appl. Feb.25, 1967. CA 74:87855g (1971).

- 
10. Testa, E. y Fava, F. *Chimia*, **1957**, 11, 307.
  11. Itiba, A. , Miti, K. , *Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Research* ,**1938**, 35 ,73.
  12. Tai, A. , Harada, T. , Hiraki, Y. y Murakami, S. , *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, 56, 1414.
  13. Seebach, D. y Zuger, M., *Helvetica*, **1982**, 65(2), 495.
  14. Rodriguez, S.; Schroeder, K.T.; Kaiser, M.M. y Stewart, J.D., *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 2586.
  15. Fráter, G. , Muller, U. y Gunther, W. , *Tetrahedron*, **1984**, 40 (8), 1269.
  16. North, M., *Tetrahedron Letters*, **1996**, 37(10), 1699.
  17. Rodriguez, S.; Kaiser M.M. y Stewart J.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123(8), 1547.
  18. Dao, D.H., Okamura, M., Akasaka, T., Kawai, Y., Hida, K. y Ohno, A.; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 2725.
  19. Effenberger, F. y Ross, J. , *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, 11 (5), 1085.
  20. Drioli, S., Nitti, P., Pitacco, G., Tossut, L. y Valentin, E., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 2713.

# *Resumen*



## RESUMEN

En la primera parte de este trabajo (Capítulo III), se describe la aplicación de enzimas para la preparación de derivados de piridoxina, uno de los tres miembros del grupo de la vitamina B<sub>6</sub>. Trabajando en medio orgánico, se utilizaron lipasas de distintas fuentes como biocatalizadores en reacciones de acilación y de alcoholisis, obteniéndose en forma regioespecífica, derivados mono- y diacilados de piridoxina con altos rendimientos y bajo condiciones suaves de reacción.

Los mejores resultados tanto en las reacciones de acilación como en las de alcoholisis se lograron al emplear como catalizador la lipasa de *Candida antarctica*. En ambas reacciones la posición preferencial en donde actuaron las enzimas fue sobre el sustituyente presente en la posición 5 del anillo piridínico de la piridoxina, sin afectarse este comportamiento por la presencia de sustituyentes en los otros grupos hidroxilos.

La metodología enzimática permitió la preparación de cuatro compuestos citados en bibliografía y otros once compuestos no registrados en literatura. Diez de los compuestos preparados corresponden a derivados de ácidos grasos, cuyas estructuras, compuestas por un extremo hidrofílico debido a la piridoxina y de un largo extremo no polar debido al ácido graso, llevaron a considerar su potencial actividad como agentes tensioactivos. Al calcularse el balance hidrofílico-lipofílico (HLB) para estos compuestos se obtuvieron valores que se corresponden con emulsificantes aceite/agua. Teniendo en cuenta la actividad tensioactiva, su composición y lo poco contaminante que resulta el método enzimático para su preparación, estos compuestos podrían ser útiles como ingredientes en formulaciones cosméticas o farmacéuticas o bien como aditivos alimentarios.

Este procedimiento alternativo simplifica notablemente la preparación de derivados acilados de piridoxina, no requiriéndose el uso de grupos protectores debido a la regioselectividad evidenciada por los biocatalizadores. De esta forma disminuye la longitud del camino sintético previamente descrito para algunos derivados de ácidos grasos y de piridoxina, lo que permite su preparación con rendimientos superiores. Además, se requieren condiciones suaves de reacción lo que permite disminuir el gasto de energía y en consecuencia el daño que pueda ser ocasionado al ecosistema.



Continuando el trabajo con lipasas, se presentó un procedimiento enzimático muy eficiente para la preparación de carboxamidas N-sustituidas a partir de sus correspondientes ácidos carboxílicos (Capítulo IV). La metodología propuesta consiste en efectuar dos reacciones consecutivas, en un mismo recipiente y mediante un mecanismo que involucra la acción catalítica de la misma enzima. Así, la lipasa en un primer paso cataliza la esterificación del ácido con etanol que a su vez cumple la doble función de reactivo de esterificación y solvente de reacción. En una segunda etapa, la misma lipasa cataliza la aminólisis del éster etílico formado en el paso anterior.

El procedimiento tradicional para la obtención de amidas a partir de ácidos carboxílicos mediante síntesis química involucra condiciones drásticas de reacción, reactivos sensibles al aire o bien varios pasos de síntesis. La alternativa enzimática propuesta, en cambio, permite obtener en un solo paso amidas a partir de ácidos carboxílicos bajo condiciones suaves de reacción.

El procedimiento se probó con distintas enzimas, obteniéndose los mejores resultados al emplear la lipasa de *Candida antarctica*. La metodología resultó aplicable a una gran variedad de ácidos carboxílicos: de estructura lineal, cíclicos, saturados e insaturados, dicarboxílicos, con otros grupos funcionales presentes (hidroxiácidos), etc; permitiendo la preparación de trece amidas N-sustituidas. Además, la enzima mostró un comportamiento altamente selectivo que pudo evaluarse a partir de la reacción de ácido caproico con diferentes aminas: con N-metil-1,3-propanodiamina se observó una marcada regioselectividad en la reacción ya que se obtuvo como único producto la amida secundaria. En el caso de la aminólisis con 2-aminoetanol la reacción resultó quimioselectiva ya que condujo a la formación de la amida exclusivamente.

Finalmente, se estudiaron reacciones catalizadas por células enteras (Capítulo V). De acuerdo a la evidencia presentada, *Mucor rouxii* resultó un excelente biocatalizador para la reducción quimio- y enantioselectiva de  $\alpha$  y  $\beta$ -cetoésteres. En los ejemplos estudiados se observó la reducción quimioselectiva del grupo carbonílico a alcohol permaneciendo inalterada la función éster. Este comportamiento fue observado al emplear como biocatalizador *Mucor rouxii* en sus dos morfologías, micelio y levadura. Al emplear micelio de *Mucor rouxii*, la reducción se obtuvo con buenos rendimientos únicamente en medio acuoso, mientras que con levaduras de *Mucor rouxii* se observó también una excelente

actividad reductásica en solventes orgánicos de baja polaridad como tolueno y hexano. La reducción catalizada por el mencionado microorganismo mostró ser altamente estereoselectiva al emplearse solventes orgánicos, especialmente hexano. En medio acuoso, tanto para el micelio como para la levadura, la estereoselectividad fue moderada. En todos los casos, el producto sintetizado preferentemente por el microorganismo fue el alcohol *S*. Las esporas que el hongo produce como mecanismo de defensa y preservación, también resultaron catalizadores eficientes y estereoselectivos del proceso reductivo. Asimismo, las técnicas de secado del microorganismo (liofilización y secado por corriente de aire caliente) resultaron muy convenientes para la conservación de la biomasa de *Mucor rouxii* lográndose la misma eficiencia y selectividad en la reducción de acetoacetato de isopropilo que los cultivos frescos. Sin embargo, la liofilización directa resultó más adecuado ya que permitió el almacenamiento de la biomasa de *Mucor rouxii* por períodos de tiempo más largos sin observarse pérdida apreciable de actividad enzimática.

Los excelentes resultados obtenidos con los cultivos deshidratados demuestran que este procedimiento es una alternativa más simple y eficiente para llevar a cabo biotransformaciones catalizadas por células enteras tanto en medio acuoso como en medio orgánico.

El presente trabajo muestra la aplicación de biocatalizadores en reacciones de compuestos orgánicos ya sea en forma de enzimas aisladas como en células enteras y demuestra de la Biocatálisis puede ser considerada una alternativa eficiente en la solución de los desafíos que presenta la síntesis orgánica actual.

Parte del presente trabajo de tesis dio origen a las siguientes publicaciones :

**1) Lipase-catalyzed acylation and deacylation reactions of pyridoxine, a member of vitamin B<sub>6</sub> group.**

A.Baldessari, C.P.Mangone y E.G.Gros.

*Helvetica Chimica Acta*, **1998**, 81, 2407.

**2) One-Pot biocatalyzed preparation of substituted amides as intermediates of pharmaceuticals.**

A.Baldessari y C.P.Mangone.

*Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**, 11, 335.

**3) Enzyme-catalyzed preparation of novel fatty acid derivatives of pyridoxine with surfactant activity.**

A.Baldessari y C.P.Mangone.

*Biocatalysis and Biotransformation*, **2002**, 20 (4), 275.

**4) Chemo- and stereoselective reduction of  $\beta$ -keto esters by spores and various morphological forms of *Mucor rouxii*.**

C.P.Mangone, E.N. Pereyra, S. Arginión, S.M. Moreno de Colonna y A.Baldessari.

*Enzyme and Microbial Technology*, **2002**, 30, 596.

Asimismo, permitió la presentación de una patente de invención:

**Esteres derivados de vitamina B<sub>6</sub>, procedimiento enzimático para su preparación y sus formulaciones**

A. Baldessari y C. P. Mangone.

Acta AR 00 01 04171, Instituto Nacional de Propiedad Industrial, 11 de Agosto de 2000.

## AGRADECIMIENTOS

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

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por las Becas de Investigación y Perfeccionamiento otorgadas.

A la Dra. Alicia Baldessari, directora de esta Tesis, por guiarme con paciencia y comprensión durante el desarrollo de la misma. Por su dedicación, sus enseñanzas y en especial por el cariño brindado durante todos estos años.

Al Dr. Eduardo Gros, Director de las Becas antes mencionadas, por su confianza y su apoyo desinteresado.

A UMYMFOR y a LANAIS-EMAR, por permitirme utilizar su instrumental y por la realización de los espectros de masa.

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

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

A las Dras. Andrea Bruttomesso y Julieta Comin por los espectros de resonancia magnética nuclear realizados.

Al personal no docente del departamento, por su calidez y amable colaboración.

A las Dras. Verónica Barone, Anabel Fandiño y Mariana Gallo, por las referencias bibliográficas facilitadas.

Al Dr. Mariano Castro por su asesoramiento en tensioactivos y por permitirme el uso del equipo para la determinación de actividad superficial.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, Andrea Schvartzapel, Javier Ramírez, Julieta Comin, Esteban Ravaschino y Eleonora Elhalem, por contribuir con un clima de trabajo cómodo y ameno. Por los momentos compartidos, las discusiones y el respeto por el otro.

A todos mis compañeros del Departamento, en especial a María Joselevich, Fernando Durán, Rosana Misico, Pablo Di Chenna y Susana Hillar por los gratos almuerzos compartidos.

A los vecinos del Area de Bromatología, por la calidez brindada durante la escritura de la Tesis.

A mis amigas de siempre, Ile, Marian, Vero, Fabi y Karina, por estar al lado mío incondicionalmente.

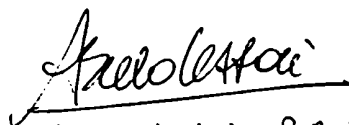
A mi padres, por su constante estímulo y preocupación.

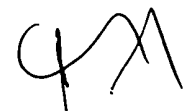
A mis hermanos, por su cariño y protección.

A Carolina, Franca y Patricio, por su afecto y constante apoyo.

A Juan Manuel, por darme fuerza y motivación para terminar esta Tesis.

En forma especial, quiero expresar mi agradecimiento a Cristián, por acompañarme con paciencia y amor durante estos largos y difíciles años.

  
Dra. ALICIA BALDESSARI

  
Lic. Constanza Mangone

