

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

TESIS DOCTORAL



**“Biocatalizadores vegetales aplicados a la producción de
moléculas bioactivas”**

Autora: Mgter. Daniela L. Bordón.

Director: Dr. M. Leandro Aimar

-Marzo 2020-

**Biocatalizadores vegetales aplicados a la producción
de moléculas bioactivas.**

Por

Mgter. Daniela L. Bordón

Dr. M. Leandro Aimar
Director

COMISIÓN ASESORA

Dr. M. Leandro Aimar
FCEFN - UNC

Dra. Cecilia Penci
FCEFN - UNC

Dr. Pablo Ribotta
FCEFN - UNC

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar por el grado académico de Doctora en Ciencias de la Ingeniería de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba.



Universidad Nacional de Córdoba
Posgrado - Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

ACTA DE EXAMEN

Libro: 00001 Acta: 00194 Hoja 01/01
LLAMADO: Llamado 1 25/03/2020
CATEDRA - MESA: 25-03-2020 Bordon

(P10-DI002) TESIS DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA

NÚMERO	APELLIDO Y NOMBRE	DOCUMENTO	INGR.	COND.	NOTA	FIRMA
34188716	BORDON, DANIELA LAURA	DNI 34188716	2015		A (Aprobado)	

CALANDRI, EDGARDO LUIS - ANDREATTA, Alfonsina Ester - PINTO, FEDERICO -
Observaciones:

Córdoba, ___/___/_____-.

Certifico que la/s firma/s que ha/n sido puesta/s en la presente Acta pertenece/n a: _____

1	0	1	0	1
Inscriptos	Ausentes	Examinados	Reprobados (0-3)	Aprobados (4-10)

27/03/2020 13.07.48

Libro/Acta: 0000100194

Hoja 01/01

“Tiempo de extrañar...

la certeza compartida de que somos segundos en lo eterno,

pedacitos desorientados en lo etéreo,

hormigas con un poco de miedo en la inmensidad,

brazos que sin otros brazos..., motivos que sin otros motivos...,

voluntades que sin otras voluntades... no son nada...”

Revista Sudestada-Pandemia 2020.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Córdoba, siempre es un orgullo ser parte de la educación pública, y espero poder devolver parte de todo lo recibido a lo largo de mi formación.

A la Secretaría de Ciencia y Tecnología-UNC por financiar mi formación doctoral.

A la Facultad de Ciencias Químicas, el espacio y las personas que vieron transitar mis primeros pasos como estudiante universitaria, y con los que todavía trabajo colaborativamente.

A la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, por permitirme ser parte de su plantel docente y abrirme las puertas para continuar mi formación académica.

A la Cátedra de Química Aplicada, el lugar que me recibió y me dejó convertirme en tantas cosas, dándome alas para llegar hasta donde yo quisiera. Especialmente a Stella, Leandro, Gladys y Vane, nada hubiera sido igual sin este equipo.

Al Dr. Leandro Aimar, mi director, entre otros roles.. por la paciencia, la flexibilidad y el acompañamiento durante todo el proyecto. Por preocuparse por mi futuro, a veces más que yo misma; por trabajar a la par en la mesada o durante una recolección, por la visión del detrás de escena invisible de una síntesis y por tantas charlas químicas, políticas, económicas y filosóficas. Gracias Leandro!

Al Laboratorio de Tecnología Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, especialmente a las Dras. Ana Vázquez y Florencia Decarlini por el trabajo en equipo y su ayuda desinteresada en este proyecto.

A la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Química, Universidad de la República-Montevideo, por recibirme desinteresadamente e incluirme a su grupo de trabajo. A la Asociación de Universidades del Grupo Montevideo por financiar estas estancias académicas. Y especialmente, a la Dra. Karen Ovsejevi, por su calidez humana, su persistencia en el trabajo y su paciencia para enseñarme el mundo de las enzimas.

A mis padres, por traerme al mundo y rodearme de un amor inmenso, dándome libertad para que, con mi terquedad, encontrara los caminos que quería transitar. A mi hermano Juan, gracias por dejarme verte crecer y hacerme crecer a la vez. A Jack, por su compañía incondicional.

A la familia que siempre está, confiando y apoyándome, a los que están acá cerquita y los que ya nos llevan algo de ventaja por otros lados. A mi nona Olga.

A las personas que la vida me permitió elegir como amigos para compartir tanta VIDA, especialmente a Luz y Sole.

Al MJS, mi familia salesiana, por compartir utopías que nos sirvieron para caminar más de lo que imaginábamos.

A Dios, porque estar en este mundo a veces escapa de toda ciencia.

RESUMEN

Es innegable que la química ha contribuido sustancialmente a mejorar la calidad de vida de la sociedad, pero también es cierto el impacto ambiental que ha generado esta industria, provocando altos niveles de contaminación alrededor del mundo. No obstante, actualmente los químicos participan activamente en la búsqueda de soluciones para remediar y prevenir la contaminación.

Recientemente se ha dado un gran impulso al empleo de reacciones químicas ambientalmente amigables (Química Verde) mediante la utilización de metodologías bioquímicas. Específicamente, se han realizado reducciones de compuestos carbonílicos utilizando microorganismos, tejidos animales y partes de vegetales. Es de destacar el creciente interés en emplearlos en la preparación de alcoholes quirales, siendo éstos intermediarios de síntesis para producir moléculas de conocida actividad biológica o importancia industrial.

En esta tesis se ha estudiado parte de la flora de la provincia de Córdoba para identificar vegetales que puedan ser utilizadas como biocatalizadores en sistemas de reacción ambientalmente amigables para lograr procesos reductivos. Posteriormente, con aquellos especímenes que mejores resultados presentaron, se ha estudiado su capacidad para reducir otro tipo de compuestos químicos determinando el alcance de la metodología desarrollada. Así mismo, se comprobó la viabilidad del bioproceso a mayor escala, para lo cual se estudió la disponibilidad y asequibilidad del biocatalizador vegetal y se optimizaron previamente las condiciones de reacción. Por último, se ha realizado una evaluación semi-cuantitativa mediante métricas que permiten analizar parámetros ecológicos y económicos para establecer cuán ambientalmente amigable es la metodología desarrollada en comparación con otros métodos reportados en bibliografía de referencia.

ABSTRACT

It is undeniable that chemistry has contributed substantially to improving the quality of life of society, but the environmental impact that this industry has generated is also true, causing high levels of pollution around the world. However, chemists are currently actively involved in finding solutions to remedy and prevent contamination.

Recently, a great boost has been given to the use of environmentally friendly chemical reactions (Green Chemistry) through the use of biochemical methodologies. Specifically, reductions of carbonyl compounds have been made using microorganisms, animal tissues, and plant parts. It is worth noting the growing interest in using them in the preparation of chiral alcohols, these being synthetic intermediates to produce molecules of known biological activity or industrial importance.

In this thesis, part of the flora of the province of Córdoba has been studied to identify vegetables that can be used as biocatalysts in environmentally friendly reaction systems to achieve reductive processes. Subsequently, with those specimens that presented the best results, their ability to reduce other types of chemical compounds has been studied, determining the scope of the methodology developed. Likewise, the viability of the bioprocess was verified on a larger scale, for which the availability and affordability of the plant biocatalyst was studied and the reaction conditions were previously optimized. Finally, a semi-quantitative evaluation has been carried out using metrics that allow analyzing ecological and economic parameters to establish how environmentally friendly the methodology developed is compared to other methods reported in the reference bibliography.

RESUMO

É inegável que a química contribuiu substancialmente para melhorar a qualidade de vida da sociedade, mas o impacto ambiental que essa indústria gerou também é verdadeiro, causando altos níveis de poluição em todo o mundo. No entanto, atualmente os químicos estão envolvidos ativamente na busca de soluções para remediar e prevenir a contaminação.

Recentemente, foi dado um grande impulso ao uso de reações químicas ambientalmente amigáveis (Green Chemistry) através do uso de metodologias bioquímicas. Especificamente, foram feitas reduções de compostos carbonílicos usando microorganismos, tecidos de animais e partes de plantas. Vale a pena notar o crescente interesse em utilizá-los na preparação de álcoois quirais, sendo estes intermediários sintéticos para produzir moléculas de atividade biológica conhecida ou importância industrial.

Nesta tese, parte da flora da província de Córdoba foi estudada para identificar vegetais que podem ser usados como biocatalisadores em sistemas de reação ambientalmente amigáveis para obter processos redutivos. Posteriormente, com as amostras que apresentaram os melhores resultados, sua capacidade de reduzir outros tipos de compostos químicos foi estudada, determinando o escopo da metodologia desenvolvida. Da mesma forma, a viabilidade do bioprocessos foi verificada em uma escala maior, para a qual foi estudada a disponibilidade e acessibilidade do biocatalisador da planta e as condições da reação foram previamente otimizadas. Finalmente, uma avaliação semi-quantitativa foi realizada usando métricas que permitem analisar parâmetros ecológicos e econômicos para estabelecer o quão ambientalmente amigável a metodologia desenvolvida é comparada com outros métodos relatados na bibliografia de referência

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	IX
RESUMEN	XI
ÍNDICE	XV
ABREVIACIONES	XIX
LISTA DE FIGURAS	XXI
LISTA DE TABLAS	XXIII
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	1
PARTE I: ANTECEDENTES	3
CAPÍTULO 1: AVANCES SOCIALES Y SU IMPACTO EN EL MEDIO: RELACIÓN CON LA QUÍMICA .5	
1.1 <i>LA QUÍMICA Y SU RELACIÓN CON LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL</i>	5
1.2 <i>EL DESARROLLO DE LA QUÍMICA ORGÁNICA</i>	8
1.3 <i>QUÍMICA VERDE</i>	9
1.4 <i>EL ROL DE LA CATÁLISIS</i>	12
1.5 <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	15
CAPÍTULO 2: BIOCATÁLISIS	19
2.1 <i>PRINCIPIOS DE LA CATÁLISIS ENZIMÁTICA</i>	20
2.1.1 <i>Estructura y Sitio activo</i>	21
2.1.2 <i>Selectividad</i>	22
2.1.3 <i>Afinidad enzima-sustrato</i>	23
2.1.4 <i>Cofactores/Coenzimas/iones metálicos</i>	24
2.1.5 <i>Mecanismos de reacción y constantes cinéticas</i>	26
2.1.6 <i>Inhibidores y Activadores</i>	29
2.1.7 <i>Condiciones de reacción</i>	29
2.2 <i>TIPOS DE REACCIONES</i>	31
2.3 <i>FUENTES PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCATALIZADORES</i>	35
2.3.1 <i>Animales</i>	36
2.3.2 <i>Vegetales</i>	37
2.3.3 <i>Microorganismos</i>	38
2.4 <i>SÍNTESIS ORGÁNICA, QUÍMICA VERDE Y PERSPECTIVAS</i>	39
2.5 <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	43
CAPÍTULO 3: REDUCCIÓN DE UN GRUPO CARBONILO	51
3.1 <i>SÍNTESIS ASIMÉTRICA: REDUCCIÓN ESTEREOSELECTIVA DE ARIL ALQUIL CETONAS</i>	53
3.1.1 <i>Metodologías Químicas</i>	55
3.1.2 <i>Metodologías Bioquímicas</i>	56
3.2 <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	59
PARTE II: BÚSQUEDA DE ESPECIES VEGETALES COMO POSIBLES BIOCATALIZADORES	63
CAPÍTULO 4: IDENTIFICACIÓN Y ALCANCE DE RAÍCES VEGETALES COMO POSIBLES BIOCATALIZADORES	65
4.1 <i>INTRODUCCIÓN</i>	65
4.1.1 <i>Botanoquímica: condiciones de reacción</i>	68
4.1.2 <i>Ventajas y desventajas de la Botanoquímica</i>	69
4.1.3 <i>Bioreducciones utilizando raíces vegetales</i>	70
4.2 <i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	70
4.2.1 <i>General</i>	70
4.2.2 <i>Análisis CG-FID y CG-EM</i>	71
4.2.3 <i>Cálculo de conversiones de reacción, excesos enantioméricos y rendimientos aislados</i> ...	71

4.2.4	Biocatalizadores vegetales	72
4.2.5	Bioreducción	74
4.2.6	Estudio cinético de la bioreducción de la Acetofenona.....	75
4.2.7	Datos Cromatográficos y Espectroscópicos	75
4.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
4.3.1	Biocatálisis utilizando raíces de plantas.....	79
4.3.2	Capacidad reductiva de <i>E. horridum</i> frente a acetofenonas sustituidas	83
4.4	CONCLUSIONES.....	86
4.5	BIBLIOGRAFÍA	89
CAPÍTULO 5: IDENTIFICACIÓN DE FRUTOS COMO POSIBLES BIOCATALIZADORES.....		97
5.1	INTRODUCCIÓN	97
5.1.1	Bioreducciones utilizando frutos vegetales.....	97
5.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	98
5.2.1	General	98
5.2.2	Análisis CG-FID y CG-EM.....	98
5.2.3	Cálculo de conversiones de reacción, excesos enantioméricos y rendimientos aislados....	98
5.2.4	Biocatalizadores vegetales	99
5.2.5	Bioreducciones.....	99
5.2.6	Estudio cinético de la bioreducción de la Acetofenona.....	99
5.2.7	Datos Cromatográficos y Espectroscópicos	100
5.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	100
5.3.1	Biocatálisis utilizando frutos de plantas.....	101
5.3.2	Capacidad reductiva de <i>L. lucidum</i> frente a acetofenonas sustituidas.....	102
5.4	CONCLUSIONES.....	106
5.5	BIBLIOGRAFÍA	109
PARTE III: OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO BIOREDUCTIVO PARA <i>L. LUCIDUM</i>.....		113
CAPÍTULO 6: POSIBILIDAD DE DISPONIBILIDAD Y ASEQUIBILIDAD DEL BIOCATALIZADOR VEGETAL: ESTUDIO DE ESTABILIDAD FRENTE AL ALMACENAMIENTO		115
6.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	116
6.2.1	General	116
6.2.2	Análisis CG-FID y CG-EM.....	116
6.2.3	Cálculo de conversiones de reacción y excesos enantioméricos	117
6.2.4	Estudios de estabilidad de frutos.....	117
6.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	117
6.4	CONCLUSIONES.....	120
6.5	BIBLIOGRAFÍA	121
CAPÍTULO 7: OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REDUCCIÓN CON <i>L. LUCIDUM</i>		123
7.1	INTRODUCCIÓN	123
7.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	124
7.2.1	General	124
7.2.2	Biocatalizador: frutos de <i>L. lucidum</i>	124
7.2.3	Deshidratación de frutos.....	124
7.2.4	Separación de las diferentes partes secas del fruto	125
7.2.5	Bioreducciones.....	126
7.2.6	Análisis CG-FID y CG-EM.....	126
7.2.7	Cálculo de conversiones de reacción y excesos enantioméricos	126
7.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	126
7.3.1	Identificación del sitio donde se encuentran las enzimas responsables del proceso de bioreducción.	126
7.3.2	Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción.....	129
7.3.3	Efecto de la hidratación previa del material vegetal	131
7.3.4	Efecto del pH del buffer utilizado	131
7.3.5	Efecto del cosolvente utilizado	133

7.3.6	Efecto de la concentración de sustrato	135
7.3.7	Capacidad de reciclado del biocatalizador	136
7.4	CONCLUSIONES.....	138
7.5	BIBLIOGRAFÍA.....	141
PARTE IV: AUMENTO DE LA ESCALA DEL PROCESO DE BIOREDUCCIÓN.....		- 145 -
CAPÍTULO 8: SÍNTESIS DE INTERMEDIARIOS CLAVE PARA LA PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS A ESCALA DE LABORATORIO.....		147
8.1	INTRODUCCIÓN	147
8.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	149
8.2.1	General.....	149
8.2.2	Biocatalizador: semillas deshidratadas de <i>L. lucidum</i>	149
8.2.3	Bioreducciones	149
8.2.4	Análisis CG-FID y CG-EM.....	150
8.2.5	Cálculo de conversiones de reacción, excesos enantioméricos y rendimientos aislados .	150
8.2.6	Datos Cromatográficos y Espectroscópicos.....	150
8.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	152
8.3.1	Biotransformaciones a escala laboratorio (500 mL) de intermediarios de síntesis claves 152	
8.4	CONCLUSIONES.....	155
8.5	BIBLIOGRAFÍA.....	157
CAPÍTULO 9: BIOREDUCCIÓN DE AF A (S)-1-FE PROMOVIDO POR SEMILLAS DE <i>L. LUCIDUM</i> A ESCALA PILOTO		161
9.1	INTRODUCCIÓN	161
9.1.1	Formato del biorreactor	163
9.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	164
9.2.1	Preparación Biocatalizador	164
9.2.2	Bioreducción escala 4L	164
9.2.3	Análisis CG-FID.....	166
9.2.4	Cálculo de conversiones de reacción, excesos enantioméricos y rendimientos aislados .	166
9.2.5	Datos Cromatográficos y Espectroscópicos.....	166
9.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	166
9.3.1	Ensayos a escala piloto del procedimiento de bioreducción de AF α (S)-1-FE.....	167
9.4	CONCLUSIONES.....	178
9.5	BIBLIOGRAFÍA.....	179
PARTE V: ESTUDIOS DE AMIGABILIDAD AMBIENTAL		183
CAPÍTULO 10: MÉTRICAS DE LA QUÍMICA VERDE: ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS DIFERENTES PROCESOS DE REDUCCIÓN ESTEREOSELECTIVA DE ACETOFENONA.....		185
10.1	INTRODUCCIÓN	186
10.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	189
10.2.1	Reacción Modelo	189
10.2.2	Características de los reportes utilizados.....	191
10.2.3	Metodologías de cálculo.....	191
10.2.4	Reducción estereoselectiva de Acetofenona.....	192
10.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	193
10.3.1	Preparación del catalizador.....	193
10.3.2	Reacción de reducción estereoselectiva.....	200
10.3.3	Proceso de Purificación.....	205
10.3.4	Calificación global del Proceso.....	209
10.3.5	Métodos Químicos vs Métodos Bioquímicos.....	212
10.3.6	ES vs GS.....	213
10.4	CONCLUSIONES.....	216
10.5	BIBLIOGRAFÍA.....	217
PARTE VI: CONSIDERACIONES FINALES		221

CAPÍTULO 11: CONCLUSIONES FINALES Y PROYECCIONES FUTURAS	223
PROYECCIONES FUTURAS.....	225
PUBLICACIONES REALIZADAS	227
PARTE VII: ANEXOS	229
ANEXOS A Y B	231
A. CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS DE RMN ¹ H Y ¹³ C DE LOS PRODUCTOS SINTETIZADOS.....	231
(-)-(S)-1-feniletanol.....	231
(-)-(S)-1-(2'-clorofenil)etanol	233
(-)-(S)-1-(3'-clorofenil)etanol	235
(-)-(S)-1-(4'-clorofenil)etanol	237
(-)-(S)-1-(2'-nitrofenil)etanol	239
(-)-(S)-1-(3'-nitrofenil)etanol	241
(-)-(S)-1-(4'-nitrofenil)etanol	243
(-)-(S)-1-(4'-fluorofenil)etanol.....	245
(-)-(S)-1-(4'-bromofenil)etanol	247
(-)-(S)-1-(4'-Trifluorometilfenil)etanol	249
(-)-(S)-1-(4'-Cianofenil)etanol	251
(-)-(S)-1-(4'-Metilfenil)etanol.....	253
(-)-(S)-1-(Tiofen-2-il)etanol.....	255
(-)-(S)-1-(Piridin-2-il)etanol.....	257
(-)-(S)-1-(3'Hidroxifenil)etanol.....	259
(-)-(R)-2-Cloro-1-(Fenil)etanol	262
(-)-(S)-1-(3'-metoxifenil)etanol	264
(+)-(S)-3-hidroxitirato de etilo	266
Alcohol Bencílico	268
Alcohol 4-CloroBencílico.....	270
Alcohol 2,4-diCloroBencílico.....	272
B. CAPTURAS DE PANTALLA DE CÁLCULOS MÉTRICAS VERDES (GS Y ES).....	275

ABREVIACIONES

ONU	Organización de las Naciones Unidas
NAD ⁺ /NADH	Dinucleótido de Nicotinamida Adenina
NADP ⁺ /NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleótido
FAD	Dinucleótido de Flavina y Adenina
FMN	Flavín Mononucleótido
ATP	Trifosfato de Adenosina
PLP	Fosfato de Piridoxal
TPP	Pirofosfato de Tiamina
SAM	S-adenosil metionina
ADH	Alcohol deshidrogenasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
FDH	Formiato deshidrogenasa
ES	Enzima-Sustrato
EP	Enzima-Producto
EHP	Esterasa de Hígado Porcino
HNL	Hidroxinitriloliasa
AF	Acetofenona
(S)-1-FE	(+)-(S)-1-feniletanol
(R)-1-FE	(-)-(R)-1-feniletanol
FEs	Feniletanoles
EPA	Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos)
FDA	Food and Drug Administration
rpm	Revoluciones por minuto
% e.e.	Exceso Enantiomérico Porcentual
CG	Cromatografía Gaseosa
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
FID	Flame Ionization Detector (Detector de Ionización de Llama)
EM	Espectrometría de Masas
IE	Ionización Electrónica
<i>m/z</i>	Relación masa / carga de un ión
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
DMSO	Dimetil sulfóxido

THF	Tetrahidrofurano
(S)-1-(3'OHFe)	(-)-(S)-1-(3'-hidroxifenil)etanol
(S)-1-(3'MeOFe)	(-)-(S)-1-(3'-metoxifenil)etanol
(R)-2-Cl-1-FE	(-)-(R)-2-Cloro-1-(fenil)etanol
(S)-3-EHOBu	(+)-(S)-3-hidroxibutirato de etilo
BA	Alcohol bencílico
4-CIBA	Alcohol 4-cloro bencílico
2,4-DiCIBA	Alcohol 2,4-dicloro bencílico
2,4-DiCIBAc	Ácido 2,4-dicloro benzoico
OD	Oxígeno Disuelto
TTO	Tasa de Transferencia de Oxígeno
AE	Economía Atómica
Em	Eficiencia másica
ACV	Análisis de Ciclo de Vida
RME	Eficiencia de Masa de Reacción
MI	Intensidad de Masa
ES	EcoScale
GS	Green Star

LISTA DE FIGURAS

2.1	Modo de acción enzimático según modelo del encaje inducido	Pág. 22
2.2	Ejemplos representativos de conversiones químico, regio y estereoselectivas en reacciones catalizadas por nitrilohidratasas, lipasas y deshidrogenasas	Pág. 23
2.3	Reciclado de NAD(P)H realizado <i>in situ</i> utilizando como cosustrato	Pág. 26
2.4	Perfil de energía libre para el proceso de una reacción catalizada por una enzima, que involucra la formación de complejos Enzima-Sustrato (ES) y Enzima-Producto (EP).	Pág. 27
2.5	Representación gráfica de la EC 2	Pág. 28
3.1	Reducción grupo carbonilo	Pág. 51
3.2	Reducción cetona asimétrica	Pág. 51
3.3	Reducción Acetofenona	Pág. 53
3.4	Fármacos que poseen alcoholes quirales en su estructura	Pág. 54
3.5	Diferentes métodos para acceder a enantiómeros puros	Pág. 55
4.1	Fármacos y moléculas bioactivas conteniendo una estructura derivada de 1-Fes	Pág. 65
4.2	Derivados de 1-FEs naturales: catecolaminas	Pág. 66
4.3	Vegetales utilizados como biocatalizadores (raíces)	Pág. 73-74
4.4	Cinética de reacción: biocatálisis de Acetofenona (0,67 g/L) con raíces de <i>E. horridum</i> (20 g/150 mL buffer). Condiciones de reacción: T=20 °C; pH=6,5; 1% p/v DMSO.	Pág. 82
5.1	Vegetales utilizados como biocatalizadores (frutos)	Pág. 99
5.2	Cinética de reacción: biocatálisis de Acetofenona (0,67 g/L) con frutos frescos molidos de <i>L. lucidum</i> (20 g/150 mL buffer). Condiciones de reacción: T=20 °C; pH=6,5; 1% p/v DMSO.	Pág. 101
5.3	Posibles estructuras de resonancia por desprotonación del hidrógeno fenólico en hidroxiacetofenonas	Pág. 105
6.1	Frutos de <i>L. lucidum</i> (siempreverde) en diferentes etapas de maduración	Pág. 118
6.2	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el porcentaje de conversión y % e.e. para la reducción de AF según las diferentes formas de conservación de frutos secos de siempreverde	Pág. 119
7.1	Sistema de separación de semillas por flotación con una corriente de aire	Pág. 125
7.2	A -Cinética de conversión de AF a (S)-1-FE a diferentes temperaturas, biocatalizadas por semillas secas de <i>L. lucidum</i> B -Constantes de velocidad de reacción a diferentes temperaturas	Pág. 130
7.3	Cinéticas de reducción de AF por <i>L. lucidum</i> a diferentes pH del medio de reacción (T=25 °C; masa semillas secas=10 g)	Pág. 132
7.4	Efecto del cosolvente utilizado sobre la conversión y exceso enantiomérico de la reacción	Pág. 134
7.5	Efecto de la concentración de DMSO sobre la eficiencia de conversión y el	

	exceso enantiomérico de la reacción (T=25 °C; t=72 h; masa semillas secas=10 g; pH=6)	Pág. 135
7.6	A -Efecto del aumento de carga de sustrato sobre la conversión de AF a (S)-1-FE en función del tiempo de reacción (T=25 °C, masa semillas secas <i>L. lucidum</i> =10 g; pH=6) B - Porcentaje de conversión y exceso enantiomérico a 72 h de reacción para cada concentración de sustrato	Pág. 136
7.7	Efecto del reciclado de semillas de <i>L. lucidum</i> como biocatalizador para la reducción de AF a (S)-1-FE (T=25 °C; t=72 h; pH=6)	Pág. 137
8.1	Equipo de extracción líquido-líquido continuo para líquidos menos densos que el agua	Pág. 150
9.1	Valor agregado por métodos biocatalíticos en diferentes mercados	Pág. 162
9.2	Biorreactor 'BioFlo 110'	Pág. 165
9.3	Impulsores utilizados tipo 'turbina de disco'	Pág. 165
9.4	Etapas del proceso de escalado	Pág. 167
9.5	Progreso de conversión de AF a (S)-1-FE en función del tiempo a escala piloto 4 L	Pág. 170
9.6	Valores de conversión y e.e.% a 72 h de bio-reducción en diferentes condiciones de buffer, a escala laboratorio	Pág. 173
9.7	Cinética de reducción y concentración de OD ensayo 6	Pág. 175
9.8	Cinética de reacción promedio de ensayos 7 y 8	Pág. 177
10.1	Reducción estereoselectiva de AF	Pág. 189
10.2	Ligandos quirales utilizados como inductores de quiralidad en los procesos de reducción estudiados	Pág. 194
10.3	Mapa conceptual de relación entre las métricas verdes y los 12 principios de química verde	Pág. 214

LISTA DE TABLAS

2.1	Resumen de coenzimas y cofactores	Pág. 25
2.2	Clasificación de las enzimas según las reacciones que catalizan	Pág. 32
2.3	Resumen de las transformaciones biocatalíticas más comunes según tipo de reacción	Pág. 33-34
4.1	Ensayos de reducción estereoselectiva de Acetofenona con raíces de especies vegetales	Pág. 81
4.2	Capacidad reductiva de raíces de <i>E. horridum</i> frente a distintas cetonas proquirales sustituidas	Pág. 84
5.1	Ensayos de reducción estereoselectiva de Acetofenona con frutos de especies vegetales	Pág. 100
5.2	Capacidad reductiva de frutos de <i>L. lucidum</i> frente a distintas cetonas proquirales sustituidas	Pág. 103
7.1	Reacción de reducción de AF mediada por frutos de <i>L. lucidum</i> en diferentes condiciones	Pág. 127
7.2	Resumen de variables de reacción optimizadas para la bioreducción de AF con <i>L. lucidum</i> (10 g de material vegetal como biocatalizador)	Pág. 138
8.1	Capacidad reductiva de semillas de <i>L. lucidum</i> en condiciones de reacción optimizadas a escala 500 mL	Pág. 153
9.1	Bioreducción de AF a (S)-1-FE por semillas de <i>L. lucidum</i> a escala piloto	Pág. 169
10.1	Metodologías seleccionadas para la reducción estereoselectiva de Acetofenona	Pág. 190
10.2	Etapa de preparación del catalizador	Pág. 195
10.3	Etapa de reducción de AF	Pág. 201
10.4	Etapa de purificación de 1-FE	Pág. 207
10.5	Amigabilidad ambiental (verdor) de diferentes metodologías de síntesis para la reducción estereoselectiva de Acetofenona	Pág. 210

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Algunas plantas seleccionadas que crecen en la provincia de Córdoba, Argentina poseen los sistemas enzimáticos necesarios para reducir compuestos carbonílicos a sus correspondientes alcoholes de manera eficiente y estereoselectiva. La utilización de estas especies vegetales como biocatalizadores proporciona sistemas de reacción ambientalmente amigables, útiles para obtención de intermediarios claves en la síntesis de moléculas bioactivas.

En base a esta hipótesis, se ha planteado como **OBJETIVO GENERAL** de la presente tesis:

- ✓ Analizar la flora seleccionada de la provincia de Córdoba como fuente potencial de enzimas capaces de ser utilizadas como biocatalizadores para producir reacciones de reducción de compuestos carbonílicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- I. Determinar la capacidad de algunos vegetales especialmente seleccionados que crecen en la provincia de Córdoba, para proporcionar sistemas enzimáticos capaces de reducir, de manera eficiente y estereoselectiva, a la acetofenona (sustrato modelo de cetonas proquirales).
- II. Determinar la capacidad de algunas plantas especialmente seleccionadas y que crecen en la provincia de Córdoba, para proporcionar sistemas enzimáticos capaces de reducir al benzaldehído (sustrato modelo de aldehídos aromáticos) de manera eficiente.
- III. Determinar la capacidad y la eficiencia reductiva los sistemas enzimáticos encontrados frente a distintos tipos de acetofenonas y benzaldehídos sustituidos.
- IV. Optimizar el proceso de reducción a escala de laboratorio para el sustrato modelo acetofenona.
- V. Aplicar el bioproceso desarrollado para la obtención de alcoholes que puedan ser utilizados como intermediarios claves en el proceso de obtención de moléculas bioactivas.
- VI. Estudiar la viabilidad del proceso biocatalítico al aumentar la escala de producción.

- VII. Establecer las potenciales ventajas y desventajas del método desarrollado en comparación con los métodos clásicos, mediante un análisis semi-cuantitativo que considere aspectos ambientales, económicos y de seguridad.

PARTE I: ANTECEDENTES

CAPÍTULO 1: Avances sociales y su impacto en el medio: relación con la química

Desde el comienzo de la humanidad, el hombre se ha caracterizado por utilizar los recursos naturales que estaban a su disposición para garantizar su subsistencia. Este precario dominio inicial de su entorno, fue realizado inicialmente de una forma más o menos racional, pero después de la primera Revolución Industrial, la sociedad humana ha centrado todos sus esfuerzos en sacar el mayor rendimiento productivo al medio que le rodea. Por supuesto, esta situación se apoyó en el preconcepto de que los recursos naturales son infinitos o ilimitados y esta tendencia se ha observado en todos los ámbitos de trabajo, siendo la química una de las ciencias que más ha afectado el medioambiente.

En este sentido, cabe mencionar que los químicos buscan constantemente nuevos compuestos útiles para mejorar la calidad de vida de la sociedad. Para ello no sólo extraen de la naturaleza todo tipo de nuevos compuestos, sino que además, utilizan los recursos naturales para comprobar sus posibles beneficios y tratar de desarrollar nuevos métodos que le proporcionen los productos encontrados de una forma eficiente¹. Como contraparte, este proceso productivo genera un flujo inverso de sustancias de deshecho que, sin el tratamiento adecuado, terminan afectando negativamente a los ecosistemas y muchas veces de manera irreversible.

No obstante, el bienestar de la sociedad moderna, que es altamente dependiente del avance tecnológico, se torna inimaginable sin numerosos materiales obtenidos a partir de procesos de síntesis orgánicas industriales. Ejemplos de ellos son los plásticos, los fármacos, los agroquímicos y más recientemente los materiales compuestos.

1.1 La química y su relación con la contaminación ambiental

La industria química -que sin lugar a dudas ha sido y será una de las industrias que más confort e innovaciones ha producido para la población- ha recorrido un complejo camino que la llevó a ser vista en la actualidad como una de las principales responsables de la contaminación del planeta. De hecho, es la industria que libera al medio ambiente la mayor cantidad y variedad de sustancias tóxicas. No obstante, no es menos cierto que los químicos también participan activamente en la búsqueda de soluciones para los problemas originados por la contaminación del

medioambiente². En este sentido, debemos definir aquí que la contaminación química es la alteración nociva de un medio como consecuencia de la introducción de un agente químico totalmente ajeno a ese medio (contaminante), causando inestabilidad, desorden, daño o malestar en un ecosistema, en su medio físico o en un ser vivo^{3,4}.

La gran mayoría de las metodologías químicas de producción clásicas generan grandes cantidades de residuos tóxicos. La escalofriante magnitud de los residuos industriales, junto con la toma de conciencia de las consecuencias generadas por las descargas descontroladas de efluentes tóxicos, además de las crecientes presiones para minimizar o, preferentemente, eliminar estos residuos, han estimulado a la industria química a tomar un papel más proactivo⁵⁻⁷ y tratar de minimizar su impacto productivo sobre el medioambiente.

A partir de la década de 1970 comenzó a tomar cuerpo la idea de que la mejor forma de solucionar los problemas originados por la producción de contaminantes es no generarlos⁸. Este enfoque traslada los controles ambientales desde su lugar tradicional (a continuación del proceso productivo) hacia el proceso productivo mismo (al cual deben ser integrados). Pero para lograr esta integración es necesario cambiar la forma de pensar la problemática ambiental y evolucionar desde una planificación remediadora -en la que los contaminantes deben ser eliminados de los efluentes y residuos después de haber sido generados- hacia una preventiva, cuyo objetivo es introducir en el proceso de producción las modificaciones necesarias para minimizar (o eliminar si es posible) tanto la generación de residuos y efluentes como la utilización de sustancias tóxicas. Es evidente entonces que el sistema económico basado en la máxima producción, el consumo, la explotación ilimitada de recursos y el beneficio como único criterio de progreso se torna insostenible debido al creciente ritmo de aumento de la población. El planeta no puede suministrar indefinidamente los recursos para este sistema, ya que sus recursos son limitados, y más aún, tampoco puede soportar la descarga desmedida e incontrolada de sustancias tóxicas.

Como respuesta a esta problemática, en 1992 se establecen las bases de Desarrollo Sustentable en la Declaración de la Cumbre de la Tierra, organizada por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y celebrada en Río de Janeiro, Brasil. La misma establece que *“Los seres humanos constituyen el centro de las preocupaciones relacionadas con el desarrollo sustentable. Tienen derecho a una vida saludable y productiva en armonía con la naturaleza. Para alcanzar el desarrollo*

*sustentable, la protección del medio ambiente debe ser parte del proceso de desarrollo y no puede ser considerado por separado*⁹ ". Por estas razones, hoy en día, el objetivo para la prevención de la contaminación es reemplazar los procesos que generan consecuencias ambientales negativas por otros no contaminantes o menos contaminantes.

Si bien las políticas preventivas poseen múltiples razones para su implementación, la principal ventaja de llevar a cabo estas prácticas es el aspecto económico, ya que a largo plazo siempre se alcanzan beneficios. Es importante tener en cuenta que la liberación de contaminantes al ambiente es un indicador de ineficiencia productiva y su eliminación genera ahorros y beneficios económicos. Es por ello que en las estrategias preventivas, la competitividad económica y la calidad ambiental están directamente relacionadas: al mejorar una, automáticamente mejora la otra. Y ésta es una de las mayores ventajas que presenta la producción limpia sobre las estrategias remediadoras¹⁰.

Este nuevo enfoque de producción limpia ha generado un gran impacto transformador sobre la concepción productiva de la Industria Química y en años recientes, ha comenzado a desarrollarse un proceso de cambio hacia la utilización de metodologías de producción ambientalmente compatibles¹¹.

El advenimiento del concepto filosófico de la Química Verde¹² (o Química Sustentable) ha dado un impulso notable al desarrollo y utilización de reacciones químicas ambientalmente amigables para la producción sustentable de productos químicos¹³. Obviamente, este nuevo concepto de producción limpia ha encontrado una rápida aceptación debido a un notable aumento de la conciencia ambientalista de la población mundial¹⁴.

No obstante, y debido a la normal evolución del conocimiento, la complejidad de las moléculas bioactivas que se utilizan en la actualidad está creciendo notablemente debido al aumento en el número de grupos funcionales y a la complejidad estereoquímica que estas poseen. Por este motivo, obtener un intermediario para construir una molécula compleja requiere, no solo disponer de procesos de síntesis con alta selectividad y que operen en condiciones compatibles con grupos funcionales sensibles, sino que, además, sean obtenidos mediante la utilización de procesos productivos ambientalmente amigables.

1.2 El desarrollo de la Química Orgánica

La historia y el desarrollo de la humanidad han estado siempre ligados al progreso del conocimiento del mundo que nos rodea y en los últimos siglos este conocimiento es fundamentalmente científico. Desde el principio de su existencia, el ser humano utilizó sus sentidos y su razón para tomar conciencia del mundo físico, y la química ha jugado un papel fundamental en el mejoramiento de las condiciones de vida del ser humano. Como ejemplo, vale citar la cocción de los alimentos, lo cual mejoró su digestibilidad. Adicionalmente, la creciente complejidad y la constante evolución del medio físico y cultural en el que nos manejamos, ha creado una necesidad permanente de ampliar los conocimientos para poder desenvolvernos y mejorar la calidad de vida de la población.

El nacimiento de la química orgánica se remonta a 1828, cuando Wöhler logró desarrollar la síntesis del producto natural urea a partir del isocianato de amonio. Este hito histórico fue la piedra angular que desestimó la teoría de la *fuera vital*, la cual sostenía que una sustancia producida por un organismo vivo no se podía producir sintéticamente. El descubrimiento de Wöhler tuvo un significado crucial: mostró que, en principio, todos los compuestos orgánicos pueden ser obtenidos en el laboratorio a partir de procesos químicos adecuados.

Desde entonces, más de 10 millones de compuestos orgánicos han sido obtenidos en los laboratorios partiendo de compuestos más simples a través de metodologías de síntesis. En campos tan variados como la salud y la alimentación, el ambiente y el hogar, la cultura y el arte, el transporte, la informática y las nuevas tecnologías, la química orgánica está presente a diario y es de resaltar que nuestra calidad de vida es fuertemente dependiente de un gran universo de productos químicos obtenidos por diferentes métodos¹⁶.

En este sentido, la complejidad molecular de los compuestos químicos usados en la actualidad está aumentando y es caracterizada por un número cada vez mayor de grupos funcionales y centros asimétricos dentro de su estructura. Por otra parte, debido a cuestiones de seguridad, razones terapéuticas y normas regulatorias, hay un creciente interés en desarrollar procesos capaces de producir fármacos enantioméricamente puros¹⁷⁻²⁰. Por estos motivos, cabe afirmar que los procedimientos de síntesis estereoselectivos para obtener moléculas enantioméricamente puras son, hoy en día, el paso más crítico en la preparación de intermediarios quirales para la industria farmacéutica²¹⁻²⁴.

1.3 **Química Verde**

Es ampliamente conocido que dentro de la industria química existe la necesidad creciente de llevar a cabo procesos compatibles con el medioambiente. En las últimas décadas, se comenzó a gestar un cambio de paradigma de los conceptos tradicionales de eficiencia de proceso, pasando de los modelos tradicionales centrados en el rendimiento químico, a modelos que asignan valor económico a la eliminación de residuos y a la disminución del uso de sustancias tóxicas o peligrosas²⁵.

El concepto de **Química Verde** fue introducido por la EPA en los inicios de los 1990 y es una herramienta conceptual basada en un nuevo enfoque filosófico cuyo principal objetivo es aumentar la protección del medio ambiente ante la contaminación originada por los procesos productivos de la industria química. La Química Verde se define como aquellos procesos químicos que utilizan eficientemente las materias primas (preferiblemente renovables), eliminan los residuos y evitan el uso de reactivos tóxicos y/o peligrosos y solventes en la fabricación y aplicación de productos químicos. El término “*Green Chemistry*” fue definido y acuñado por primera vez por Anastas en 1998 y es hoy universalmente aceptado. Química Sustentable es la traducción preferida cuando el término “verde” no parece adecuado en el contexto social de los países de habla hispana, aunque cabe aclarar que los dos términos no son totalmente equivalentes. En efecto, “sustentable”, en el contexto de la química, responde a la obligación ética de contribuir al desarrollo y bienestar de todas las naciones del planeta, sin afectar a los ecosistemas y por ende, a las generaciones futuras. Esta contribución tiene lugar de manera primordial por la sustentabilidad de la propia actividad química industrial, que ve amenazada la viabilidad de su producción por el previsible agotamiento irreversible de las fuentes de las materias de partida, y por las normativas legales, cada vez más estrictas y económicamente onerosas²⁶, formuladas en defensa de la sociedad y de la naturaleza.

El concepto de *Química Verde* fue expresado de manera atractiva por medio de los 12 principios introducidos oportunamente por Paul Anastas y John Warner¹². Ellos se resumen a continuación:

1-*Prevención*: Es mejor prevenir la generación de residuos que tratar o remediar los residuos después de que se formaron.

2-*Economía atómica*: Los métodos de síntesis deben ser diseñados para maximizar la incorporación en el producto final, de todos los materiales utilizados en el proceso.

3-*Síntesis química menos peligrosa*: Siempre que sea posible, los métodos sintéticos deben diseñarse para utilizar y generar sustancias que poseen poca o ninguna toxicidad para la salud humana y el medio ambiente.

4-*Diseño de productos químicos más seguros*: Los productos químicos deben diseñarse para su función deseada, pero minimizando al mismo tiempo su toxicidad.

5-*Disolventes y auxiliares más seguros*: El uso de sustancias auxiliares (por ejemplo, disolventes, agentes de separación, etc.) deben eliminarse del proceso productivo cuando sea posible y si esto no es posible, ellos deben ser inocuos cuando se los utiliza.

6-*Diseño para la eficiencia energética*: Los requerimientos energéticos de los procesos químicos deben ser reconocidos por sus impactos ambientales y económicos, y deben ser minimizados. Si es posible, los métodos sintéticos deben realizarse a temperatura y presión ambiente.

7-*Uso de materias primas renovables*: Las materias primas utilizadas deben ser recursos renovables, siempre que sea técnica y económicamente factible.

8-*Reducir derivados*: La derivatización innecesaria (uso de grupos de bloqueo, protección / desprotección, modificación temporal de procesos físicos y químicos) debe minimizarse o evitarse si es posible, ya que estos pasos requieren reactivos adicionales y pueden generar residuos.

9-*Catálisis*: la utilización de reacciones promovida por catalizadores (tan selectivos como sea posible) son preferibles a utilizar reactivos en cantidades estequiométricas.

10-*Diseño para la degradación*: Los productos químicos deben diseñarse de manera que al final de su función se descompongan en productos de degradación inocuos y no persistan en el medio ambiente.

11-*Análisis en tiempo real para la prevención de la contaminación*: Las metodologías analíticas deben continuar desarrollándose para permitir el monitoreo y control de procesos en tiempo real antes de la formación de sustancias peligrosas.

12-*Química inherentemente más segura para la prevención de accidentes:*
Las sustancias y las formas en que se las utilizan en los procesos químicos deben ser elegidas para minimizar la potencialidad de accidentes químicos, incluyendo liberaciones, explosiones e incendios.

Resulta obvio entonces que la Química Sustentable designa más claramente una finalidad general: la reducción de la contaminación provocada por las sustancias nocivas para la salud y para el medio ambiente, sin merma de las ventajas sociales que aporta la actividad química.

La Química Verde, en el sentido que Anastas y Warner le otorgan, contiene los principios de actuación para conseguir la sustentabilidad en la producción de las sustancias químicas. En este sentido, los 12 principios, constituyen así un instrumento eficaz y el fundamento filosófico para el modo de pensar propio de la química sustentable.

Se podría resumir el pensamiento de Anastas y Warner, en tres apartados fundamentales y distintivos:

a) *Prevención de la causa de riesgo,*

b) *Metodologías químicas, y*

c) *Acción de acuerdo con un diseño.*

Resultaba evidente entonces que, desde sus orígenes este instrumento no sería eficaz a menos que la industria lo hiciera suyo.

Hoy en día, la experiencia en América, Europa y Japón demuestra que su mensaje ha penetrado en la mente de los profesionales de química, por consideraciones no sólo éticas, sino también económicas. En efecto, su aplicación conduce a modificaciones económicamente rentables en los procesos industriales, en parte al reducir sustancialmente los costos de las químicas e ingenierías paliativas, imprescindibles cuando se generan y manejan sustancias peligrosas²⁷.

La necesidad de desarrollar reacciones químicas eficientes y que a la vez sean realizadas mediante procesos que respeten el medio ambiente (conocidos como 'procesos verdes') es ahora un esfuerzo vigoroso dentro de la química orgánica. Resulta obvio entonces, la necesidad de medir y clasificar la '*amigabilidad ambiental*' (o '*rendimiento verde*') de las reacciones químicas de una manera tan cuantitativa como sea posible para, de esta manera, determinar y clasificar el

impacto ambiental producido por un procedimiento de obtención de una determinada molécula. Para conocer el alcance del impacto de la actividad química, e incluso el de la Química Verde, es necesario estudiar las interacciones ambientales teniendo en cuenta el ciclo de vida completo de los productos en el ambiente^{28,29}.

1.4 El rol de la catálisis

Para la mejora de la sustentabilidad de un proceso químico resulta significativo también el llamado impacto de la base de los materiales e ingredientes; es decir, el impacto ambiental que ha generado la manufactura de estos materiales a partir de las fuentes. Una estrategia general para la reducción del impacto de base es, sin duda, sustituir las fuentes fósiles por recursos renovables³⁰.

Se podría asumir que, en cada paso sintético de la manufactura de una sustancia química, se generan residuos y se consume energía. Por lo tanto, se puede inferir como aproximación, que cuanto menor sea el número de etapas sintéticas, menor será la cantidad de recursos y energía consumida y por ende, será menor el impacto acumulado³¹.

La reducción del número de pasos sintéticos implica obviamente la introducción de nuevas metodologías que permitan la conversión directa de las materias primas en compuestos definidos. En este sentido, los residuos generados en la producción de compuestos orgánicos consisten principalmente en sales inorgánicas y solventes y este hecho es consecuencia directa del uso de reactivos en cantidades estequiométricas. La solución es evidente: la sustitución de las metodologías estequiométricas clásicas por alternativas catalíticas más limpias³².

En una primera aproximación la catálisis puede definirse como la transformación química promovida por sustancias que no se alteran con el curso de la reacción. Todos los catalizadores tienen en común la capacidad de aumentar la velocidad de una reacción química y poder ser recuperados luego de finalizado el proceso, en la misma forma en que fueron introducidos al inicio.

El aumento de la velocidad de una reacción química determinada por un catalizador implica tres consecuencias importantes:

- ✓ Permite el empleo de condiciones de reacción menos agresivas
- ✓ Reduce el tiempo necesario para que la reacción ocurra. En algunos casos este hecho posibilita la implementación de procesos que de otra manera hubieran sido inviables.

- ✓ El catalizador provee una ruta con una energía de activación menor para una reacción en particular, por lo que ésta podrá ocurrir más rápidamente que otras que se desarrollen paralelamente y, consecuentemente, el gasto energético será menor.

En general, los catalizadores más empleados actualmente en síntesis orgánica por la industria química son metales de transición tales como paladio, rutenio, rodio e iridio³³⁻³⁵, los cuales son recursos naturales escasos y no renovables y por lo tanto, susceptibles de agotamiento irreversible. Estos materiales han estado confinados en sus yacimientos durante millones de años y son extraídos y procesados por la industria minera. Indudablemente, estos metales resultan extraños al ambiente superficial y, por consiguiente, su descarga como deshecho una vez utilizados, en el caso que no se lleve a cabo un proceso de reciclado del mismo, provoca un impacto absolutamente desconocido el cual puede resultar persistente e irreversible. Debido a esto, en los últimos años se ha desarrollado un gran interés por utilizar catalizadores basados en metales de transición asequibles (mayor abundancia y menor costo) y ordinariamente empleados por los seres vivos, tales como hierro³⁶, zinc³⁷, cobalto^{38,39} y molibdeno⁴⁰, a los que se les pueden añadir oro⁴¹, plata⁴², níquel⁴³, cobre⁴⁴; metales que, aunque no inocuos ni renovables, han sido empleados durante muchos siglos.

Dentro de la misma línea de pensamiento, presenta aún un mayor interés el desarrollo de la llamada organocatálisis (sin metales) en donde, por supuesto, la biocatálisis ocupa un lugar fundamental⁴⁵.

Al día de hoy se encuentra bien establecido que en los organismos vivos existe una diversidad de moléculas que desempeñan el rol de catalizadores. Estas moléculas reciben el nombre de **enzimas**, término acuñado por Kühne en 1878⁴⁶ para designar a los extractos de levadura con actividad catalítica. Estas moléculas de origen biológico poseen una capacidad extraordinaria para llevar a cabo transformaciones químicas cuando interactúan con los grupos funcionales de un compuesto en particular.

Es decir, análogamente se puede definir a la **biocatálisis** como una disciplina que involucra el uso de moléculas biológicas denominadas biocatalizadores (enzimas) para la realización de la transformación química de la materia y el compuesto que sufre la transformación en estas condiciones es llamado **sustrato**. Es importante señalar que los sustratos empleados en una reacción biocatalizada no son

necesariamente aquellos que son transformados por la enzima en las reacciones que forman parte del metabolismo del organismo del cual proviene la misma.

Las enzimas utilizadas en biocatálisis pueden emplearse tanto integradas en el organismo vivo (es decir, usar células enteras o tejidos como biocatalizadores) como enzimas aisladas a partir de los mismos con mayor o menor grado de pureza. Existe también otro término asociado al uso de biocatalizadores que se conoce como **biotransformación**, la cual puede definirse como aquellos procesos de transformación de la materia en el que un organismo vivo modifica un compuesto químico para transformarlo en otro.

Adicionalmente es necesario mencionar que varias de las características intrínsecas de la biocatálisis se ajustan muy bien al contexto de la química verde⁴⁷ y estas particularidades de amigabilidad ambiental serán discutidas en detalle en el capítulo siguiente.

1.5 Bibliografía

- [1] Ramos Castellanos, P. (2007). *Uso eficiente y sostenible de los recursos naturales*. (Ediciones Universidad de Salamanca).
- [2] Lichtfouse, E.; Schwarzbauer, J.; Robert, D. (2005). *Environmental chemistry. Green chemistry and pollutants in ecosystems*. (Springer).
- [3] Anderson, K. A.; Hillwalker, W. E. (2008). 'Bioavailability'. in *Encyclopedia of Ecology* 348–357. (Academic Press Inc.).
- [4] Tornero, V.; Ribera d'Alcalà, M. (2014). 'Contamination by hazardous substances in the Gulf of Naples and nearby coastal areas: A review of sources, environmental levels and potential impacts in the MSFD perspective'. *Sci. Total Environ.* 466–467, 820–840.
- [5] Allen, D. T. (1992). 'An overview of industrial waste generation and management practices'. *MRS Bull.* 17, 30–33.
- [6] El-Halwagi, M. M. (1997). *Pollution prevention through process integration: systematic design tools*. (Elsevier Science).
- [7] Johnson, E. (2012). *Sustainability in the chemical industry*. (Springer, 2012).
- [8] Lichtfouse, E.; Schwarzbauer, J.; Robert, D. (2012). *Environmental chemistry for a sustainable world. Volume 2: remediation of air and water pollution*. (Springer).
- [9] (1992). 'Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo'.
- [10] Cheremisinoff, N. P. (2001). Cap. 3: 'The economics of pollution prevention' (110-150) en *Handbook of pollution prevention practices*. (Marcel Dekker, Inc.).
- [11] Ahuja, S. (2013). 'Green Chemistry and other novel solutions to water pollution: Overview'. *Am. Chem. Soc.* 1, 1–14.
- [12] Anastas, P. T.; Warner, J. C. (1998). *Green Chemistry: Theory and practice*. (Oxford University Press).
- [13] Li, C.-J.; Trost, B. M. (2008). 'Green chemistry for chemical synthesis.' *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13197–13202.
- [14] Dunn, P. J. (2012). 'The importance of green chemistry in process research and development'. *Chem. Soc. Rev.* 41, 1452–1461.
- [15] Dunn, P.; Wells, A.; Williams, M. (2010). *Green chemistry in the pharmaceutical industry*. (Wiley).
- [16] Wade, L. (2003). *Química Orgánica*. (Prentice-Hall Hispanoamericana).

- [17] Stinson, S. (1992). 'Chiral drugs'. *Chem. Eng. News* 70, 46–79.
- [18] Hutt, A. J.; Tan, S. C. (1996). 'Drug chirality and its clinical significance.' *Drugs* 52, 1–12.
- [19] Rouhi, A. M. (2003). 'Chiral business'. *Chem Eng News* 81, 45–61.
- [20] Elder, D. (2018). 'ICH Q6A Specifications'. in *ICH Quality Guidelines: An implementation guide* 433–466. (2018).
- [21] (1992). 'Food and drug administration'. *Development of New Stereoisomeric Drugs* Disponible en:
<https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122883.htm>.
- [22] Nguyen, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. (2006). 'Chiral drugs: an overview'. *Int. J. Biomed. Sci.* 2, 85–100.
- [23] Calcaterra, A.; D'Acquarica, I. (2018). 'The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds'. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147, 323–340.
- [24] Muñoz Solano, D.; Hoyos, P.; Hernáiz, M. J.; Alcántara, A. R.; Sánchez-Montero, J. M. (2012). 'Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs'. *Bioresour. Technol.* 115, 196–207.
- [25] Schwager, P.; Decker, N.; Kaltenecker, I. (2016). 'Exploring Green Chemistry, Sustainable Chemistry and innovative business models such as Chemical Leasing in the context of international policy discussions'. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 1, 18–21.
- [26] Mestres, R. (2013). 'Química Sostenible: Naturaleza, fines y ámbito'. *Educ. Quim.* 24, 103–112.
- [27] Anastas, P.; Beach, E. (2007). 'Green chemistry: the emergence of a transformative framework'. *Green Chem. Lett. Rev.* 1, 9–24.
- [28] Sanganyado, E.; Lu, Z.; Fu, Q.; Schlenk, D.; Gan, J. (2017). 'Chiral pharmaceuticals: A review on their environmental occurrence and fate processes'. *Water Res.* 124, 527–542.
- [29] Zhou, Y.; Wu, S.; Zhou, H.; Huang, H.; Zhao, J.; Deng, Y.; Wang, H.; Yang, Y.; Yang, J.; Luo, L. (2018). 'Chiral pharmaceuticals: Environment sources, potential human health impacts, remediation technologies and future perspective'. *Environ. Int.* 121, 523–537.
- [30] Sheldon, R. A. (2014). 'Green and sustainable manufacture of chemicals from

- biomass: state of the art'. *Green Chem.* 16, 950–963.
- [31] Rudroff, F.; Mihovilovic, M. D.; Gröger, H.; Snajdrova, R.; Iding, H.; Bornscheuer, U. T. (2018). 'Opportunities and challenges for combining chemo- and biocatalysis'. *Nat. Catal.* 1, 12–22.
- [32] Sheldon, R. A.; Arends, I.; Hanefeld, U. (2007). *Green Chemistry and Catalysis*. (Wiley).
- [33] Yoshimura, M.; Tanaka, S.; Kitamura, M. (2014). 'Recent topics in catalytic asymmetric hydrogenation of ketones'. *Tetrahedron Lett.* 55, 3635–3640.
- [34] Du, W.; Wang, Q.; Yu, Z. (2013). 'Ru(II) pyridyl-based NNN complex catalysts for (asymmetric) transfer hydrogenation of ketones at room temperature'. *Chinese J. Catal.* 34, 1373–1377.
- [35] Kolodiazhnyi, O. I.; Kukhar, V. P.; Kolodiazhna, A. O. (2014). 'Asymmetric catalysis as a method for the synthesis of chiral organophosphorus compounds'. *Tetrahedron Asymmetry* 25, 865–922.
- [36] Pellissier, H. (2019). 'Recent developments in enantioselective iron-catalyzed transformations'. *Coord. Chem. Rev.* 336, 1–31.
- [37] Zhang, S.; He, H.; Sun, F.; Zhao, N.; Du, J.; Pan, Q.; Zhu, G. (2017). 'A novel adenine-based zinc(II) metal-organic framework featuring the Lewis basic sites for heterogeneous catalysis'. *Inorg. Chem. Commun.* 79, 55–59.
- [38] Pellissier, H. (2018). 'Recent developments in enantioselective cobalt-catalyzed transformations'. *Coord. Chem. Rev.* 360, 122–168.
- [39] Guo, J.; Wang, H.; Xing, S.; Hong, X.; Lu, Z. (2019). 'Cobalt-Catalyzed asymmetric synthesis of gem-Bis(silyl)alkanes by double hydrosilylation of aliphatic terminal alkynes'. *Chem* 5, 881–895.
- [40] Thiruvengadam, P.; Chakravarthy, R. D.; Chand, D. K. (2019). 'A molybdenum based metallomicellar catalyst for controlled and chemoselective oxidation of activated alcohols in aqueous medium'. *J. Catal.* 376, 123–133.
- [41] Sugimoto, K.; Matsuya, Y. (2017). 'Recent applications of gold-catalyzed cascade reactions in total synthesis of natural product'. *Tetrahedron Lett.* 58, 4420–4426.
- [42] Shukla, K.; Shah, S.; Rana, N. K.; Singh, V. K. (2019). 'An efficient and highly diastereoselective synthesis of carbocyclic spiropyrazolones via one-pot sequential dual organo-silver catalyzed Michael-hydroalkylation reactions'. *Tetrahedron Lett.* 60, 92–97.
- [43] Wang, Z.; Yu, S.-L.; Wei, Z.-B.; An, D.-L.; Li, Y.-Y.; Gao, J.-X. (2019).

- 'Synthesis, characterization of novel Nickel(II) complexes with P_xN_y-Type ligands and their application in reduction of ketones'. *J. Organomet. Chem.* 898, 120882.
- [44] Zhang, S.; Li, Y.; Xu, Y.; Wang, Z. (2018). 'Recent progress in copper catalyzed asymmetric Henry reaction'. *Chinese Chem. Lett.* 29, 873–883.
- [45] Sheldon, R. A. (2016). 'Green chemistry, catalysis and valorization of waste biomass'. *J. Mol. Catal. A Chem.* 422, 3–12.
- [46] Dixon, M.; Webb, E. C. (1964). *Enzymes*. (Academic Press Inc., 1964).
- [47] Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. (2018). 'Role of biocatalysis in sustainable chemistry'. *Chem. Rev.* 118, 801–838.

CAPÍTULO 2: Biocatálisis

Resulta evidente que una industria química sustentable no puede basar su producción en materias primas escasas y con fuentes susceptibles de agotamiento irreversible, tal como es el caso de los materiales fósiles y de algunos metales de muy baja abundancia (Principio 7 de la Química Verde)¹. Debido a esto y sin lugar a dudas, la disminución del uso de materiales fósiles en la producción industrial ha de venir de la mano del empleo eficiente de la biomasa².

Asimismo, es un hecho que los sistemas biológicos son maquinarias químicas magistrales, creando cotidianamente una extraordinaria complejidad a partir de compuestos simples, los cuales son obtenidos del medio ambiente. En este sentido, las **enzimas** son las macromoléculas responsables primarias de la transformación de un gran número de sustratos químicos, los cuales proporcionan materiales y energía que aseguran la supervivencia de los seres vivos.

El término '**biocatálisis**' describe el uso de enzimas (nativas o modificadas) en transformaciones sintéticas de materiales de partida no naturales. Las enzimas utilizadas para transformaciones sintéticas *in vitro* se llaman **biocatalizadores**, y los procesos se denominan **transformaciones biocatalíticas o biotransformaciones**³. Estos procesos representan una prometedora alternativa para la construcción de moléculas complejas y es por eso que la utilización de métodos biocatalíticos es cada vez más aceptada. De esta manera, es posible convertir un compuesto químico, al que se denomina sustrato, en otro denominado producto, empleando una molécula de origen biológico como agente transformador.

La utilización de la biocatálisis como herramienta productiva comenzó a principios del siglo XX, cuando las enzimas ya se utilizaban en métodos industriales de producción de alimentos. Desde entonces, el número de aplicaciones biotecnológicas basadas en el continuo desarrollo en la producción de enzimas ha aumentado exponencialmente, así como sus aplicaciones en procesos de biotransformación^{4,5}.

En la actualidad, alrededor del 80% de todos los procesos químicos mundiales se llevan a cabo catalíticamente. En este contexto, los métodos biocatalíticos son el principal pilar de la biotecnología aplicada, la cual ha sido denominada '*White Biotechnology*' (biotecnología blanca) representando claramente la aplicación del conjunto de herramientas biológicas a la producción industrial sustentable⁶. Debido

a esto, existe un continuo aumento en la utilización de métodos biocatalíticos para la obtención de diferentes compuestos en campos tan diversos como la producción de polímeros, alimentos procesados, cosmética, agroindustria e industria del papel y mayoritariamente, en la producción de fármacos⁷⁻¹³. Debido a esto, se ha vuelto rutinario la utilización de enzimas y el empleo de células enteras para llevar a cabo una amplia variedad de reacciones orgánicas clásicas¹⁴. Como consecuencia directa, los procedimientos de biotransformación se están aceptando como un método prometedor en la síntesis orgánica¹⁵ y por esta razón, el mercado global de enzimas se proyecta en alza (U\$5,01 billones en 2016 a U\$6,32 billones para el año 2021)¹⁶.

Sin embargo, aunque el objetivo de los químicos sintéticos es obtener una molécula 'target' particular o 'building blocks', es importante comprender el mecanismo de acción de los biocatalizadores y de los procesos de biotransformación, estableciendo claramente sus ventajas, alcances y limitaciones.

2.1 Principios de la catálisis enzimática

Las reacciones químicas que ocurren en los seres vivos son tan variadas como complejas. Estos procesos pueden ocurrir a velocidades de reacción elevadas en condiciones por demás suaves, lo cual representa un aspecto prioritario en la mayoría de los diseños experimentales realizados por un profesional de la química.

Las enzimas son proteínas globulares que hacen posible la ocurrencia de las reacciones vitales. Sus estructuras, por lo general, son muy complejas y reciben sus nombres en función de la actividad específica que desempeñan en un proceso metabólico. Por su utilidad, las propiedades catalíticas de las enzimas se reconocieron mucho antes de que se conociera su naturaleza química y su estructura. Esta propiedad fundamental se logra por una alteración de la velocidad a la que se alcanza un equilibrio termodinámico, sin modificarlo, por lo tanto, implica que las enzimas funcionan de manera reversible y la aceleración en la velocidad de reacción se logra al disminuir la energía de activación del proceso general. En resumen, estas proteínas altamente especializadas son maquinarias catalíticas extraordinarias que producen tasas de aceleración exponenciales respecto a la misma reacción no catalítica¹⁷. En este sentido, factores de aceleración de 10^{15} no son extraños. A su vez, las enzimas a menudo muestran altas selectividades, las cuales a veces resultan asombrosas. Más aún, son sustancias completamente biodegradables, motivo por el cual son compatibles con el medio ambiente¹⁸.

Por otro lado, aunque no es necesario determinar los parámetros cinéticos para la aplicación de los procesos biocatalíticos en la síntesis química, el conocimiento de cómo transcurre la reacción puede ser útil para decidir en qué aspectos se podrían realizar modificaciones para mejorar el proceso¹⁹. Del mismo modo, no es esencial, pero a menudo es muy útil comprender el mecanismo de la reacción catalizada por enzimas por las mismas razones que cualquier reacción empleada en una ruta sintética clásica.

A continuación se describen más detalladamente algunos de estos aspectos fundamentales, que determinarán la actividad catalítica de las enzimas.

2.1.1 Estructura y Sitio activo

Las enzimas son macromoléculas polares, definidas por una secuencia de aminoácidos que están unidos a través de enlaces peptídicos (uniones amida). La estructura terciaria/cuaternaria adquirida por estas cadenas de aminoácidos genera una superficie tridimensional única. A la luz de muchos estudios se ha logrado establecer que no toda la superficie de la enzima presenta actividad catalítica, sino únicamente una región relativamente pequeña (10-20%), la cual se denomina *sitio* o *centro activo*. El sitio activo es la zona de la enzima en la que se unen los sustratos para ser transformados en productos. La estructura tridimensional de este sector es responsable de la biocatálisis y de las relaciones geométricas y electrónicas que se establecerán entre él y los sustratos, lo cual determinará la especificidad de la enzima²⁰. Debido a esto, se ha propuesto que las enzimas contienen dentro del sitio activo grupos ácidos y/o básicos, y el hecho de que puedan existir estos grupos funcionales al mismo tiempo permite racionalizar una explicación química del efecto selectivo observado en la catálisis enzimática²¹. Como consecuencia, los sustratos se unen a la superficie específica del sitio activo a través de múltiples interacciones no covalentes. De esta manera, se produce una micro-heterogeneización y la concentración local de sustrato aumenta en relación con la observada en el medio de reacción. Más aún, al unirse el sustrato al sitio activo se produce la exclusión del agua de su interior y el potencial químico de grupos específicos puede cambiar temporalmente convergiendo ambos aspectos al fenómeno observado de alta aceleración en la velocidad de reacción²².

2.1.2 Selectividad

Como se mencionó anteriormente, las reacciones biocatalíticas suelen mostrar selectividades muy elevadas, la cuales a veces resultan imposibles de obtener si no es a través de la utilización de este tipo de sistemas. A menudo, las enzimas catalizan únicamente la reacción de transformación de un grupo funcional del sustrato mientras que no afecta a otros similares dentro de la misma molécula. Esta singular propiedad se denomina **quimioselectividad** y puede interpretarse mediante en el modelo 'llave-cerradura con ajuste inducido' (Figura 2.1), donde ambas moléculas, la enzima y el sustrato, poseen complementariedad geométrica. Debido a esto, el sustrato se 'encastrará' en el sitio activo de la enzima sólo en una única posición que resulta ser la geoméricamente adecuada.

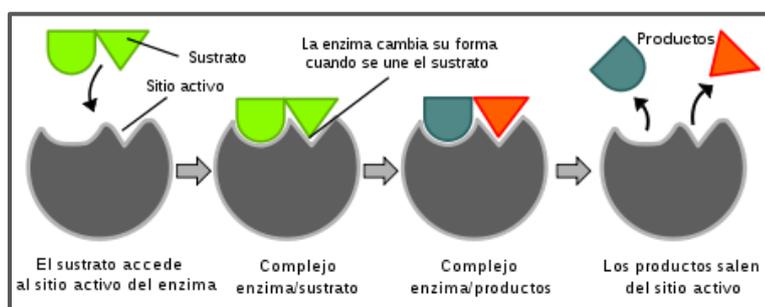


Figura 2.1: Modo de acción enzimático según modelo del encaje inducido.

Otra propiedad muy útil en el proceso de obtención de diferentes productos de interés que caracteriza a las enzimas es la **regioselectividad**. Esta característica se refiere a la capacidad de transformar un grupo funcional específico, dejando sin modificación otros fragmentos idénticos (o casi idénticos) ubicados en diferentes lugares espaciales dentro del sustrato.

Por último, todos los aminoácidos excepto la glicina, (bloques de construcción de las enzimas) poseen al menos un centro asimétrico en su estructura y debido a esto, las enzimas son catalizadores intrínsecamente quirales. La naturaleza asimétrica de los sitios activos de las enzimas da lugar a procesos **enantioselectivos** y por esta razón, cuando un sustrato proquiral se une al sitio activo, es posible la formación de un producto enantioméricamente puro. Esta especificidad respecto a la producción de un enantiómero en particular se puede cuantificar en porcentajes de excesos enantioméricos. Un clásico ejemplo de este tipo de transformaciones se observa en las reducciones de cetonas proquirales²³ catalizados por reductasas.

De la misma manera, la naturaleza quiral de estos biocatalizadores hacen que sea posible transformar sólo uno de los enantiómeros de un material de partida racémico²⁴⁻²⁶. A continuación, en la Figura 2.2 se exponen de manera resumida, ejemplos representativos de conversiones **quimio- regio- y estereoselectivas** de reacciones catalizadas por diferentes enzimas.

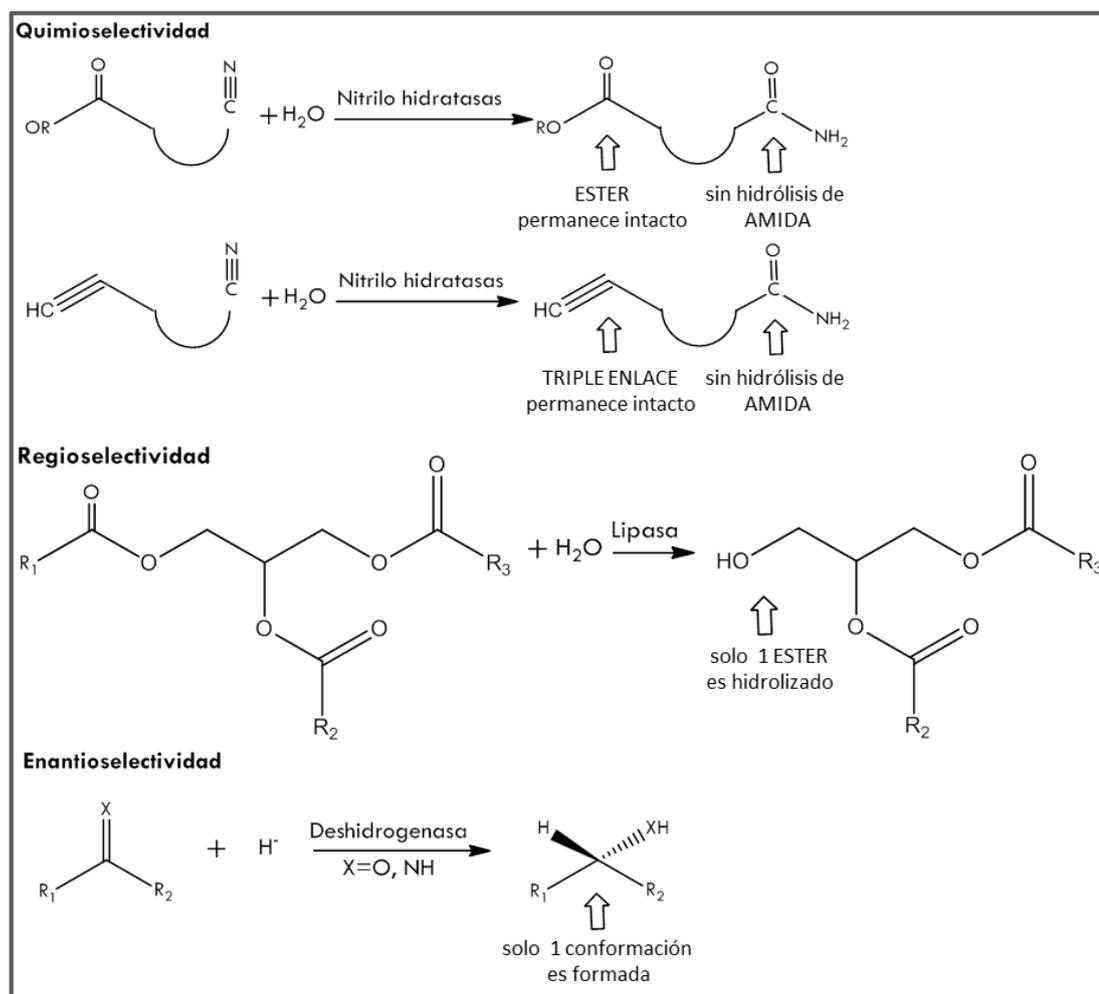


Figura 2.2: Ejemplos representativos de conversiones quimio, regio y estereoselectivas en reacciones catalizadas por nitrilohidratasa, lipasa y deshidrogenasa³.

Evidentemente, la exquisita especificidad de las enzimas es la característica en la cual la biocatálisis presenta su mayor potencial y la que hace que estos procedimientos sean especialmente atractivos para la producción de moléculas complejas.

2.1.3 Afinidad enzima-sustrato

La maximización de las interacciones selectivas no covalentes entre la enzima y el sustrato para formar el estado de transición, es clave para mejorar la eficiencia del proceso de transformación y dado que la fuerza de estos enlaces no covalentes

depende en gran medida de la distancia y del ángulo de interacción, un encastre óptimo del sustrato en el sitio activo de la enzima puede producir una unión asombrosamente selectiva²⁷. Debido a esto, también es indudable que las restricciones estéricas contribuyen a la diferenciación exquisita entre estructuras similares durante la interacción sustrato-enzima.

Por a estas características singulares, el reconocimiento del sustrato resulta ser un proceso dinámico, no solo con respecto a su asociación y disociación con la enzima, sino que también puede implicar movimientos de la cadena de polipéptidos que conforman el sitio activo en respuesta al encastre del sustrato. La proximidad de los reactivos y la orientación precisa, junto con el efecto de la micro-heterogenización discutido anteriormente, se traduce en un desempeño catalítico singular y excepcional^{28,29}.

2.1.4 Cofactores/Coenzimas/iones metálicos

El potencial químico de las cadenas laterales que se encuentran en los aminoácidos es limitado debido a que, por lo general, no hay aceptores de electrones eficientes. Por esta razón, algunas reacciones catalizadas por enzimas utilizan sólo grupos funcionales que se encuentran en las proteínas, aunque el número y la variedad de restos de aminoácidos de la cadena lateral limitan gravemente la gama de reacciones accesibles. Como consecuencia y si es necesario, la catálisis enzimática incorpora un potencial químico adicional mediante coordinación con iones metálicos específicos, coenzimas y/o cofactores³⁰, y por lo general las enzimas son inactivas catalíticamente si no se encuentran en presencia de estas sustancias químicas.

A manera de resumen, en la tabla 2.1 se muestran algunos ejemplos de ellos.

Tabla 2.1: Resumen de coenzimas y cofactores.

COMPUESTO	FUNCIÓN
Dinucleótido de Nicotinamida Adenina (NAD⁺ / NADH)	Reacciones redox y transferencia de hidrógeno
Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NADP⁺ / NADPH)	
Dinucleótido de Flavina y Adenina (FAD)	
Flavín Mononucleótido (FMN)	
Compuesto de coordinación de hemoproteínas con Fe	Transferencia de electrones
Coenzima A	Transferencia de grupos acilo
Trifosfato de Adenosina (ATP)	Energía metabólica Transferencia de fosfato, pirofosfato, adenilación
Fosfato de Piridoxal (PLP)	Transaminación Descarboxilación de aminoácidos
Pirofosfato de Tiamina (TPP)	Descarboxilación Transferencia de unidades C ₂
Biotina	Transferencia de CO ₂
Ácido tetrahidrofólico	Transferencia de grupos C ₁
S-adenosil metionina (SAM)	Metilación
Adenosil - cobalamina	Isomerización
Metil-cobalamina	Metilación

Por otra parte, las coenzimas están unidas en un equilibrio de asociación/disociación a las enzimas y necesariamente tienen que estar presentes en una concentración suficiente para alcanzar la máxima actividad catalítica. En tales casos, la coenzima se consume en relación estequiométrica con la formación del producto pero claramente esta relación puede hacer que la síntesis enzimática sea bastante costosa a menos que se puedan idear ciclos adicionales y eficientes para la regeneración de las coenzimas/cofactores involucrados en el proceso³¹.

En algunos casos, coenzimas/cofactores se regeneran en el ciclo catalítico mientras se unen a la enzima, por lo que las cantidades son suficientes para mantener la reacción. Otros, requieren una o más reacciones separadas con cosustratos distintos al oxígeno para regenerar el material de partida³². Esta situación es válida, por ejemplo, para NAD(P)⁺, NAD(P)H, SAM, coenzima A, ATP y otros nucleótidos trifosfatos.

A modo de ejemplo, en la Figura 2.3 se propone la regeneración de NAD(P)H mediante la utilización de 3 cosustratos o sustratos de sacrificio diferentes: 2-propanol, glucosa y ácido fórmico, y sus coenzimas correspondientes. Por este motivo, en los últimos años se han desarrollado con éxito métodos de regeneración *in situ*, especialmente adaptados para las coenzimas de nicotinamida^{33,34}.

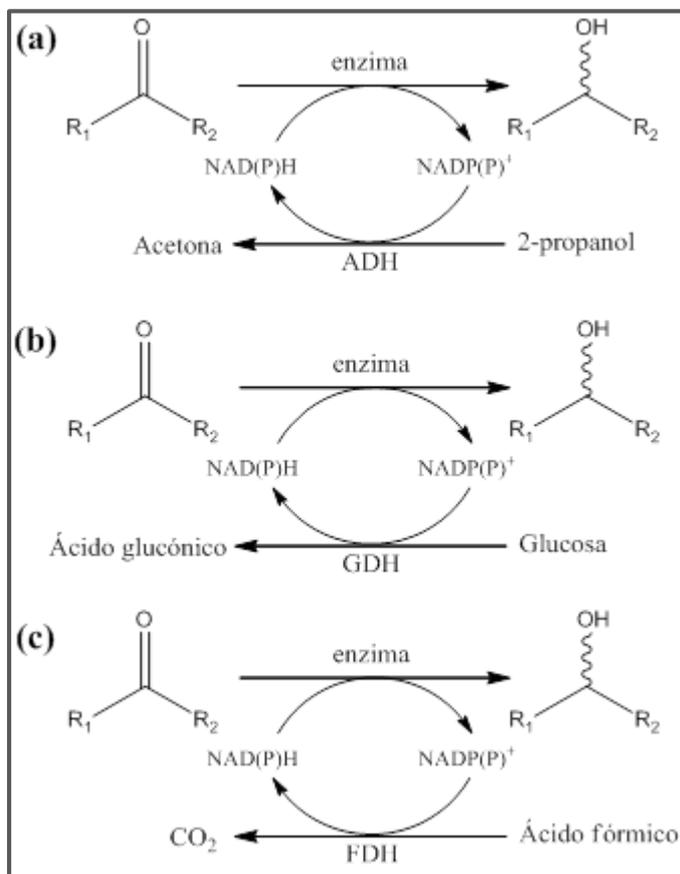


Figura 2.3: Reciclado de NAD(P)H realizado *in situ* utilizando como cosustrato (a) 2-propanol, (b) glucosa y (c) ácido fórmico, con sus correspondientes enzimas de reciclado (a) ADH: alcohol deshidrogenasa, (b) GDH: glutamato deshidrogenasa y (c) FDH: formiato deshidrogenasa.

2.1.5 Mecanismos de reacción y constantes cinéticas

Los mecanismos de reacción describen las secuencias de la ruptura y formación de enlaces, mientras que la cinética se refiere al estudio de las velocidades de reacción y a la manera en que progresa la misma en determinadas condiciones³⁵. Por ende, la cantidad de sustrato que se consume y el/los productos que se forman, determinará la complejidad cinética de la reacción. Es decir: cada reacción enzimática individual tiene una **combinación única de propiedades cinéticas y de mecanismo de reacción que la describen**.

Una reacción biocatalítica puede describirse mediante los siguientes pasos observados en la Figura 2.4, la cual esquematiza el perfil energético en función de

la coordenada de reacción para una catálisis enzimática. Inicialmente, se produce la unión de la enzima E y el sustrato S; posteriormente, mientras el sustrato está unido a la enzima, se convierte en el producto P y finalmente, el producto P es liberado de la enzima y ésta, al encontrarse libre, vuelve a estar disponible para iniciar el próximo ciclo catalítico.

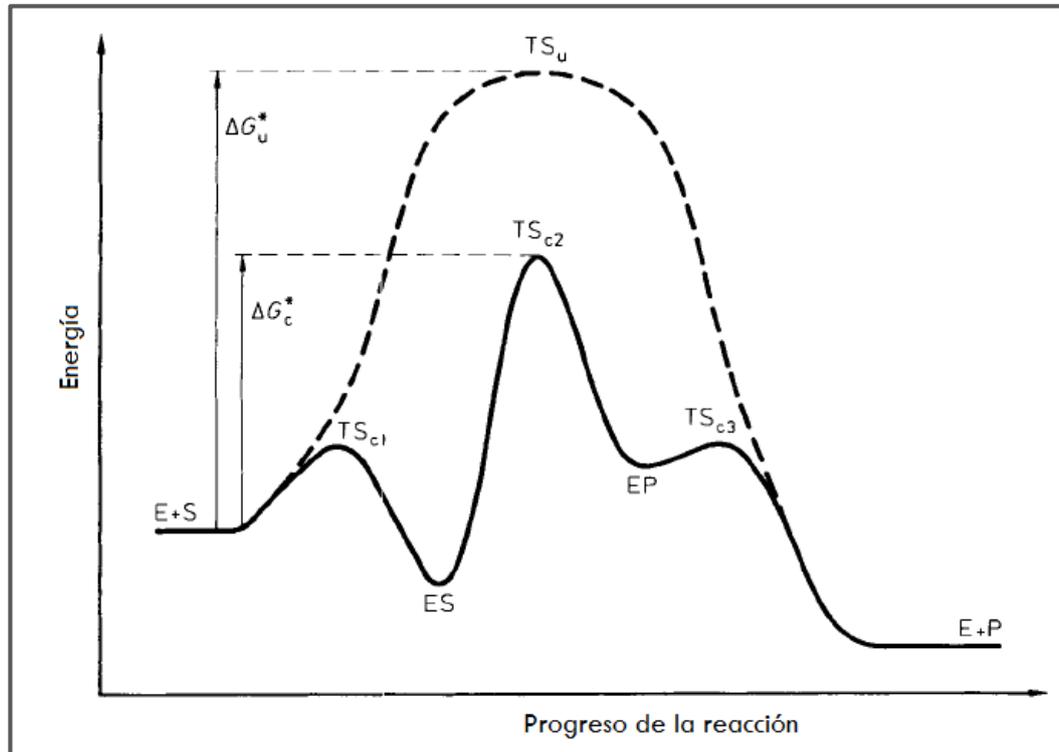
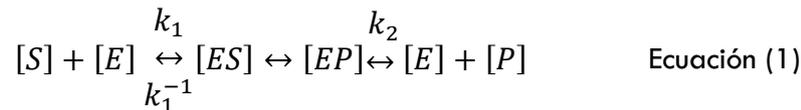


Figura 2.4: Perfil de energía libre para el proceso de una reacción catalizada por una enzima, que involucra la formación de complejos Enzima-Sustrato (ES) y Enzima-Producto (EP). El perfil esquemático para la reacción no catalizada se muestra en línea discontinua. La trayectoria de reacción atraviesa los estados de transición TS_{c1} , TS_{c2} y TS_{c3} con energía libre estándar de activación ΔG_c^* . El paso limitante de la velocidad es la conversión de ES en EP. El efecto catalítico se debe a la disminución de la energía libre estándar de activación de ΔG_u^* a ΔG_c^* , y no está gobernado por la diferencia de energía libre entre S y P.

Las reacciones catalizadas por enzimas que ocurren en el medio biológico se encuadran dentro de los mecanismos de las reacciones orgánicas. Las enzimas hacen más probable que la reacción ocurra, creando condiciones para una aproximación óptima de los reactivos. Por un lado, existe una etapa básicamente **química** que implica una descripción detallada de la ruptura y formación de enlaces, y por otro, hay una etapa **enzimática** en la que la interacción en el sitio activo enzimático y los sustratos permite explicar la biocatálisis. A veces, la enzima estabiliza estados de transición y otras veces, grupos funcionales del sitio activo participan activamente

favoreciendo la formación del intermediario en donde este sector espacial actúa como una cavidad que optimiza la interacción enzima-sustrato. De esta manera, se incrementa enormemente el número de moléculas de sustrato que alcanzan el estado de transición activado por unidad de tiempo.

En el caso simple de una reacción enzimática de un sustrato, la descripción del proceso descrito en la Figura 2.4 puede realizarse mediante la siguiente ecuación (EC 1), oportunamente propuesta por Michaelis y Menten³⁶:



Las constantes k_1 , k_2 y k_1^{-1} (EC 1) describen la velocidad a la que los sustratos unidos a una enzima se convierten en productos, para luego volver a formar la enzima libre y comenzar el siguiente ciclo de catálisis. Incluye tanto las etapas de unión ES como la de liberación del producto³⁶.

Asimismo, Michaelis y Menten describieron la velocidad de reacción de un sistema enzimático constituido por un solo sustrato mediante la ecuación matemática presentada a continuación (EC 2) y representada gráficamente en la Figura 2.5. Este modelo sólo es válido cuando la concentración del sustrato es mayor que la concentración de la enzima, y para condiciones de estado estacionario, es decir, cuando la concentración del complejo enzima-sustrato es constante.

$$V = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ecuación (2)}$$

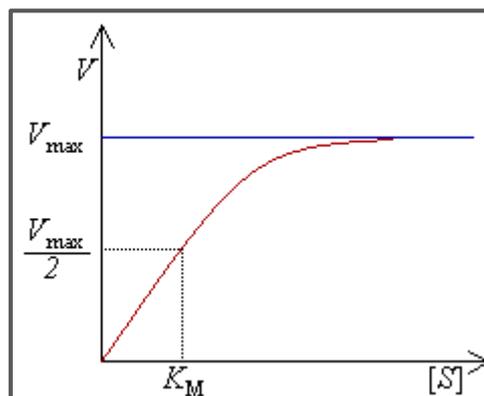


Figura 2.5: Representación gráfica de la EC 2

En este caso se asume que la formación del complejo ES es un proceso reversible y más rápido que la liberación de producto. La descripción gráfica de la EC 2 representa una curva hiperbólica, la cual relaciona la velocidad de reacción con la concentración del sustrato. La hipérbola se describe mediante 2 parámetros: V_{max} y

K_m , donde V_{max} es la velocidad de reacción máxima posible si cada molécula de enzima presente está saturada con sustrato, siendo esta una propiedad de cada enzima en particular, lo cual puede estar relacionado con la su masa molecular. K_m es la llamada constante de Michaelis-Menten y se define como la concentración de sustrato para la cual la velocidad de reacción observada es la mitad de V_{max} . El valor de K_m caracteriza la afinidad entre el sustrato y la enzima y, en una primera aproximación, puede verse como la constante de disociación del complejo $[ES]$ ¹⁷.

2.1.6 Inhibidores y Activadores

También se debe considerar que pueden existir compuestos que poseen una influencia negativa sobre la velocidad de reacción de un proceso enzimático, tanto de manera reversible como irreversible³⁷. Estas sustancias son llamadas inhibidoras. Los inhibidores irreversibles pueden ser análogos del sustrato, los cuales después de la unión con la enzima forman un enlace covalente que bloquea el sitio activo de manera permanente, impidiendo el funcionamiento de la enzima. Por lo general, tales reacciones se diseñan intencionalmente para inhibir una actividad enzimática específica no deseada^{38,39}. Por otro lado, los inhibidores reversibles forman complejos enzima-inhibidor específico y por lo tanto, influyen en la velocidad de reacción.

Es importante considerar que tanto sustratos como productos también pueden inhibir un proceso enzimático. Adicionalmente, muchas enzimas pueden ser activadas por iones inorgánicos, como Ca^{2+} , K^+ o Cl^- , posiblemente elevando la V_{max} por estabilización de ciertas conformaciones proteicas⁴⁰.

Por otro lado, es importante considerar la existencia de enzimas alostéricas: enzimas que cambian su conformación estructural al unirse a una sustancia diferente del sustrato llamada efector. La actividad alostérica puede ser tanto positiva como negativa, favoreciendo o no la entrada del sustrato en el sitio activo enzimático, por lo que estas enzimas juegan un papel fundamental en la naturaleza, regulando rutas metabólicas. Tal comportamiento es importante para los sistemas vivos, pero rara vez se utiliza en enzimas empleadas en síntesis orgánica⁴¹.

2.1.7 Condiciones de reacción

Por lo general, las enzimas han evolucionado para funcionar bajo las condiciones que existen dentro de sus respectivos entornos celulares. Esto significa que desempeñan su actividad generalmente a temperatura ambiente, valores de pH

casi neutros y utilizan agua como solvente de reacción. Debido a estas características intrínsecas, los sistemas biocatalíticos funcionan en condiciones suaves, las cuales no solo son seguras para el operador, sino que resultan ambientalmente amigables cuando son aplicadas en la producción de diversos compuestos químicos.

2.1.7.1 Disolvente

La mayor desventaja al utilizar medios de reacción acuosos es la escasa solubilidad de muchos de los sustratos y productos involucrados en síntesis orgánica³⁵. Debido a esto, se requiere trabajar con concentraciones de sustratos bajas, lo que por lo general alarga los tiempos de reacción, complica los procesos de purificación del producto y por ende reduce los rendimientos obtenidos. Esta situación puede ser resuelta en parte, mediante la utilización de cosolventes orgánicos miscibles con el agua⁴² o utilizando medios de reacción no convencionales como fluidos supercríticos⁴³, líquidos iónicos⁴⁴, solventes eutécticos⁴⁵ y sistemas bifásicos⁴⁶. En todos los casos, los solventes deben ser elegidos cuidadosamente y estudiados en detalle, para evitar posibles efectos tóxicos sobre el proceso productivo⁴⁷.

2.1.7.2 Temperatura

Al igual que todas las reacciones químicas, las tasas de conversión catalítica aumentan con el aumento de la temperatura. Sin embargo, esta relación sólo se aplica a un intervalo limitado, ya que las enzimas por lo general son desactivadas por altas temperaturas⁴⁸. Adicionalmente los sustratos y/o productos pueden sufrir degradaciones por la misma causa.

Esto significa que los efectos de la temperatura sobre la velocidad de la reacción y la estabilidad de los sustratos y productos son opuestos y la mejor opción es necesariamente un compromiso. En la práctica, la mayoría de los procesos biocatalíticos poseen temperaturas óptimas de reacción comprendidas entre 20 °C y 50 °C, aproximadamente⁴⁹⁻⁵¹.

Debe tenerse en cuenta también que algunas enzimas han evolucionado para funcionar en condiciones extremas. Por ejemplo, microorganismos extremófilos son fuentes valiosas de enzimas con estabilidades térmicas mayores a lo habitual⁵². Por otra parte, las enzimas que se encuentran normalmente fuera de las células (enzimas extracelulares) también son generalmente más estables, ya que su entorno operativo es menos predecible. Esta diversidad en las estabilidades térmicas a menudo permite elegir una temperatura de reacción que equilibre buenos

resultados de conversión con la estabilidad característica de la enzima, maximizando así los rendimientos en función del tiempo de reacción⁵³.

2.1.7.3 pH

Otro aspecto a considerar es el pH del medio de reacción. La superficie de los sitios activos de las enzimas está conformada por aminoácidos polares, los cuales pueden protonarse o no según el pH del medio circundante. En consecuencia, se alteran las cargas superficiales y por ende, la conformación del sitio activo por lo que la velocidad con la que la enzima transforma el sustrato dependerá del pH⁵⁴. Durante una reacción enzimática, generalmente se establece un valor definido de pH, el cual se mantiene utilizando soluciones buffer de fuerza iónica adecuada. Es importante resaltar que el pH es una de las variables más importantes, no solo para la actividad enzimática sino también para la estabilidad de la propia enzima y muchas veces, el rango de valores permitidos para el funcionamiento óptimo del proceso resulta ser acotado. Más aún, desafortunadamente los valores óptimos de pH para la actividad y la estabilidad de la enzima no son necesariamente idénticos por lo que el control de este parámetro es crucial para encontrar la máxima eficiencia catalítica⁵⁵.

2.2 Tipos de reacciones

En la naturaleza, las enzimas catalizan las transformaciones de los metabolitos que se producen tanto dentro como fuera de las células vivas. Aunque algunas enzimas aceptan solo una variedad limitada de sustratos, una gran fracción de ellas posee una tolerancia más amplia permitiendo la conversión de materiales de partida no naturales (sustratos exógenos) y esta es una de las más importantes características de los sistemas biocatalíticos. Debido a esta singular característica, el campo de la biocatálisis descansa fundamentalmente en la **promiscuidad parcial** que poseen las enzimas para llevar a cabo transformaciones sobre diversos sustratos que no le son naturales dentro del metabolismo para lo cual fueron diseñadas por la naturaleza⁵⁶.

Por esta razón, el objetivo de la biocatálisis es identificar o diseñar enzimas o sistemas enzimáticos que sean suficientemente generales para aceptar una amplia variedad de sustratos relacionados, pero suficientemente selectivos para generar un producto individual como, por ejemplo, un enantiómero.

Hasta hace pocas décadas se pensaba que los biocatalizadores eran muy específicos y tradicionalmente se clasifican de acuerdo con el tipo de reacciones que

catalizaban en los procesos metabólicos en los que estaban involucradas⁵⁷. En la Tabla 2.2 se puede observar su clasificación.

Tabla 2.2: Clasificación de las enzimas según las reacciones que catalizan.	
TIPO DE ENZIMA	REACCIÓN CATALIZADA
Oxidorreductasas	Reacción de óxido-reducción
Transferasas	Transferencia de grupos funcionales
Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis
Liasas	Adiciones a dobles enlaces
Isomerasas	Reacciones de isomerización
Ligasas	Formación de enlaces

Sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que hay enzimas que muestran una inusual promiscuidad catalítica, promoviendo reacciones diferentes a la condición natural para las que evolucionaron en la naturaleza^{6,56,58}.

A continuación, en Tabla 2.3 se presenta una recopilación de las transformaciones biocatalíticas más comunes, ordenadas respecto al tipo de reacción, sustratos, productos y enzimas necesarias para llevarlas a cabo. Este resumen proporciona una referencia rápida para la planificación retrosintética utilizada en el diseño de síntesis de moléculas específicas.

En capítulos siguientes se detallará en particular la reducción del grupo carbonilo para obtener los alcoholes correspondientes, transformación estudiada en el proyecto de esta tesis.

Tabla 2.3: Resumen de las transformaciones biocatalíticas más comunes, según tipo de reacción¹⁰.

TIPO DE REACCIÓN	SUSTRATOS	PRODUCTOS	USOS COMUNES	TIPOS DE ENZIMAS
HIDRÓLISIS	Esteres	Alcoholes y ácidos carboxílicos	Síntesis de alcoholes y ácidos carboxílicos, resolución de ésteres, alcoholes y ácidos	Lipasa, esterasa, proteasa
	Amidas	Aminas y ácidos carboxílicos	Síntesis de aminas y ácidos carboxílicos, resolución de amidas, aminas y ácidos	Lipasa, esterasa, proteasa
	Nitrilos	Amidas	Síntesis de amidas primarias, resolución de nitrilos	Nitrilo hidratasa
	Nitrilos	Ácidos carboxílicos	Síntesis de ácidos carboxílicos, resolución de ácidos	Nitrilasa
	Epóxidos	1,2-dioles	Síntesis de dioles, resolución de epóxidos	Epóxido hidrolasa
ESTERIFICACIÓN	Ácido carboxílico y alcohol	Ester	Síntesis de esterres, resolución de ácidos carboxílicos y alcoholes	Lipasa, esterasa, proteasa
AMIDACIÓN	Ácidos carboxílico y amina	Amida	Síntesis de amidas, resolución de ácidos carboxílicos y aminas	Lipasa, esterasa, proteasa
TRANSESTERIFICACIÓN	Alcohol y ester	Alcohol y ester	Síntesis de esterres, resolución de esterres y alcoholes	Lipasa, esterasa, proteasa
TRANSAMINACIÓN	Cetona y amina	Cetona y amina	Síntesis de aminas	Transaminasa
DESHIDROHALOGENACIÓN	Halohidrina	Epóxido	Síntesis de epóxidos, resolución de halohidrinras y epóxidos	Halohidrina dehalogenasa
REDUCCIÓN DE CARBONILO	Cetona	Alcohol	Síntesis de alcoholes	Alcohol deshidrogenasa, cetoreductosa
	Aldehído	Alcohol	Síntesis de alcoholes	Alcohol deshidrogenasa, cetoreductosa
REDUCCIÓN DEL GRUPO ALQUENO	α,β -aldehído insaturado, cetona, ester	Aldehído saturado, cetona, ester	Reducción asimétrica de unión C=C	Alqueno reductosa (enoato reductasa y enoreductosa)
AMINACIÓN REDUCTORA	Cetona, 2-cetoácido	Amina, 2-amino ácido	Síntesis de aminas	Amino ácido deshidrogenasa

OXIDACIÓN ALCOHÓLICA	Alcohol secundario	Cetona	Síntesis de cetonas	Alcohol deshidrogenasa, alcohol oxidasa
	Alcohol primario	Aldehído	Síntesis de aldehídos	Alcohol deshidrogenasa, alcohol oxidasa
OXIDACIÓN DE AMINAS	Amina	Aldehído, cetona	Síntesis de aldehídos y cetonas, resolución de aminas	Amina oxidasa
	α -aminoácido	α -cetoácido	Síntesis de α -ceto ácidos, resolución de aminoácidos	Aminoácido oxidasa, aminoácido deshidrogenasa
HIDROXILACIÓN	Unión C-H saturada	Alcoholes	Síntesis de alcoholes	Monooxigenasa, peroxidasa
	Unión C-H aromática	Fenoles	Síntesis de fenoles	Monooxigenasa, dioxigenasa, peroxidasa
DESALQUILACIÓN OXIDATIVA	Fenil éteres	Fenol, aldehído	Síntesis de fenoles, desalquilación de metilo u otros alquil éteres	Monooxigenasa, peroxidasa
	Anilinas alquiladas	Amina, aldehído	Síntesis de aminas, desalquilación de metilo u otras aminas secundarias	Monooxigenasa, peroxidasa
OXIDACIÓN BAEYER-VILLIGER	Cetona	Ester	Síntesis de esteres y lactonas	Monooxigenasa Baeyer-Villiger
FORMACIÓN DE CIANOHDRIINAS	Aldehído o cetona	2-hidroxinitrilo	Síntesis de 2-hidroxinitrilos	Oxinitrilasa (hidroxinitriloliasa)
CONDENSACIÓN ALDÓLICA	Aldehído	2-cetoácido	Síntesis de 2-hidroxicetonas	Piruvato descarboxilas, benzoilformato descarboxilas, fenilpiruvato descarboxilasa
	Aldehído	2-hidroxialdehído	Síntesis de 3,4-dihidroxialdehídos	Desoxirribosa fosfato aldolasa
	Aldehído, dihidroxiacetona fosfato	2-ceto-3,4-diol-1-fosfato	Síntesis de polihidroxifosfato-2-cetonas	Dihidroxiacetona fosfato aldolasa
	Aldehído	2-aminoácidos	Síntesis de 3-hidroxi-2-aminoácidos	Treonina aldolasa

2.3 Fuentes para la obtención de biocatalizadores

Hace casi 7000 años, las culturas antiguas descubrieron que los jugos del estómago de algunos mamíferos podían ser utilizados para elaborar queso. La elaboración de la cerveza, el vino y el pan con organismos y sus enzimas nativas también se conocen desde la antigüedad. Debido a que la producción de alimentos y bebidas a menudo implica los mismos sustratos que los encontrados por las enzimas en organismos vivos, estas industrias estuvieron entre los primeros usuarios de la biocatálisis *in vitro*⁴⁰.

Hasta el siglo XIX, las enzimas se obtenían como mezclas o extractos crudos a partir de organismos enteros desconociéndose por completo la naturaleza del catalizador responsable de una reacción en particular. El desarrollo de la biocatálisis 'moderna' se remonta a los estudios llevados a cabo por Buchner (1897) sobre extractos de levadura de panadería⁵⁹. En ellos se demostró concluyentemente que una mezcla no viva, libre de células, retenía la capacidad intacta para convertir la glucosa en etanol y dióxido de carbono, tal como lo llevaba a cabo la célula viva de origen. Esto refutó definitivamente la noción de que las enzimas contenían una '*fuera vital*' que les daba la capacidad de catalizar reacciones solo cuando las células se encontraban con vida. Debido a esto, quedó claro que las enzimas son simplemente otro tipo de catalizadores que obedecen las mismas leyes químicas y físicas que rigen para todos los procesos químicos¹⁶. Este conocimiento indujo a la idea de que las enzimas podrían ser utilizadas para catalizar reacciones diferentes a las encontradas en los organismos originales, concepto base de la biocatálisis como disciplina científica⁶⁰. Como consecuencia, desde los tiempos de Buchner, identificar y obtener una enzima adecuada que resuelva un problema químico particular ha sido el inicio de casi todos los proyectos que han sido llevados a cabo en el área de la biocatálisis⁶¹.

Finalmente, en esta sección se intenta revisar algunas de las fuentes de provisión de enzimas con aplicaciones sintéticas utilizadas para la realización de reacciones químicas útiles.

Genéricamente, las fuentes de provisión pueden ser divididas en dos grupos: enzimas naturales las cuales son proporcionadas por microorganismos, plantas y animales y las fuentes no naturales las cuales involucran enzimas totalmente sintéticas, fabricadas por el hombre y que no poseen equivalentes naturales conocidos.

2.3.1 Animales

Desde la antigüedad, un gran número de enzimas utilizadas en biocatálisis se obtuvieron a partir de tejidos de animales. En este sentido, los animales representan una fuente particularmente rica de enzimas hidrolíticas las cuales se utilizan especialmente para digerir las grasas, las proteínas y los polisacáridos complejos. Más aún, debido a que las enzimas hidrolíticas de origen animal se han utilizado durante mucho tiempo en las industrias de alimentos, bebidas y cueros, se encuentran fácilmente disponibles y en grandes cantidades de manera comercial²².

La mayoría de las enzimas hidrolíticas derivadas de animales se obtienen a partir de hígado, estómago, páncreas y otras partes no comestibles de ganado que, a su vez, son relativamente baratas y disponibles de manera abundante debido a que son subproductos de la industria cárnica^{62,63}. Por esta razón, las lipasas, proteasas y esterases derivadas de animales han sido y son ampliamente utilizadas en procedimiento de síntesis orgánica. Como ejemplo comercialmente disponible, cabe mencionar a la esterasa de hígado porcino (EHP), la cual es una enzima versátil utilizada en la hidrólisis de una amplia variedad de ésteres⁶⁴.

Otro ejemplo ampliamente utilizado es la pepsina, una importante proteasa digestiva obtenida del estómago bovino cuyo papel nativo es la hidrólisis de enlaces amida. Esta enzima se encuentra comercialmente disponible y es ampliamente utilizada en la industria del cuero para eliminar los restos de cabello y grasa de las pieles parcialmente procesadas⁶⁵. Adicionalmente, cabe mencionar que la acilasa de riñón porcino, la cual hidroliza selectivamente N-acetilaminoácidos ha sido utilizada durante mucho tiempo para resoluciones cinéticas de aminoácidos⁶⁶. Finalmente, si bien las enzimas animales que hidrolizan carbohidratos complejos a azúcares simples son importantes para la industria alimentaria, al día de hoy no se han detallado aplicaciones significativas en la síntesis de moléculas orgánicas pequeñas.

Más aún, además de las hidrolasas, otras enzimas animales han encontrado aplicaciones importantes en biocatálisis. La aldolasa de músculo de conejo se encuentra comercialmente disponible y ha demostrado que puede catalizar condensaciones aldólicas entre fosfato de dihidroxiacetona y varios aldehídos no naturales de manera muy eficiente⁶⁷.

Evidentemente y como una consecuencia directa de estos ejemplos la biocatálisis ha ido encontrando numerosos nichos de aplicación en los que ha podido ser

aceptada como una herramienta eficaz para la realización de reacciones químicas de importancia.

2.3.2 Vegetales

Las enzimas provenientes de plantas también han sido utilizadas desde la antigüedad. El malteado de los cereales y la hidrólisis de polisacáridos complejos son dos de los usos más antiguamente conocidos. Al igual que sus homólogos animales, la mayoría de las enzimas derivadas de plantas y comercialmente disponibles son hidrolasas, particularmente lipasas y proteasas^{68,69}. La papaína, una cisteína proteasa obtenida de la papaya (*Carica papaya*)⁷⁰, es la enzima hidrolítica vegetal más conocida y ampliamente utilizada⁷¹. La bromelina obtenida del ananá (*Anana comosus*)⁷² y la ficaina extraída de la savia del árbol de látex (*Hevea brasiliensis*)⁷³ son cisteína proteasas similares, que también han encontrado aplicaciones en biocatálisis^{58,74}. Más aún, la peroxidasa obtenida del rábano picante (*Armoracia rusticana*) es una enzima versátil que es capaz de oxidar varias clases de compuestos orgánicos^{75,76}. Otro ejemplo interesante lo representa la hidroxinitrilo liasa (HNL, a menudo llamada oxinitrilasa) obtenida de la almendra amarga (*Prunus dulcis*)⁷⁷. Esta enzima es utilizada para promover la adición estereoselectiva de HCN a aldehídos y dar lugar a la formación de cianhidrinas quirales⁷⁸. Es interesante remarcar que esta reacción fue reportada por primera vez ya hace más de un siglo⁷⁹.

Desde entonces, los vegetales como fuente de enzimas y la enzimología vegetal han evolucionado hasta considerar el uso directo de material vegetal sin ningún procesamiento previo. Esta nueva metodología de trabajo promueve que, en lugar de aislar enzimas o llevar a cabo laboriosos procesos biotecnológicos, se utilice directamente partes enteras de los vegetales sin procesar como biocatalizadores^{80,81}. Una de las mayores ventajas de utilizar partes enteras de vegetales es evitar el agregado de los cofactores/coenzimas necesarios para el funcionamiento de la enzima, lo cual disminuye considerablemente los costos del proceso productivo⁸².

Debido a esto, en los últimos años han aparecido numerosos reportes donde se describe el uso de células vegetales enteras y partes de material vegetal sin procesar como potenciales agentes biocatalíticos para llevar a cabo importantes biotransformaciones⁸³⁻⁸⁸.

2.3.3 Microorganismos

Desde la antigüedad es bien conocido que muchas biotransformaciones pueden realizarse utilizando microorganismos. El ejemplo más documentado es levadura de cerveza (*Saccharomyces cereviceae*) la cual ha sido ampliamente utilizada en la elaboración de bebidas alcohólicas y de alimentos, especialmente en la industria de la panificación.

Como ejemplo particular, no se puede dejar de mencionar que la obtención de vitamina C desarrollada por Reichstein en 1934⁸⁹, fue una de las primeras aplicaciones de una reacción biocatalítica a gran escala. En el paso clave de este proceso, se utilizaron células de *Gluconobacter suboxydans* para oxidar l-sorbitol a l-sorbosa con una regioselectividad completa.

En este caso particular, es importante mencionar que los oxidantes químicos generan productos secundarios debido a la oxidación de otros grupos hidroxilo y debido a ello, la biocatálisis presenta una clara ventaja para eliminación de estas reacciones colaterales.

Debido a esto, muchas de las primeras aplicaciones biocatalíticas de los microorganismos fueron para la realización de reacciones de oxidación-reducción y en el caso particular de las levaduras, cabe mencionar que ellas contienen muchas y variadas clases de enzimas. Por esta razón, en la actualidad, su utilización en reacciones de óxido-reducción de grupos carbonilo es una de las principal aplicaciones de este tipo biocatalizadores en la síntesis orgánica de diversos productos de interés comercial^{12,90,91}.

Adicionalmente, es necesario mencionar que los microorganismos se pueden utilizar en forma de células enteras para llevar a cabo reacciones biocatalíticas, lo cual posee la ventaja de evitar el agregado de los costosos cofactores/coenzimas necesarios para el funcionamiento del sistema enzimático.

Ya a finales del siglo XX y con el vertiginoso desarrollo de la biología molecular, se dio un impulso notable al desarrollo de microorganismos recombinantes, los cuales poseen la capacidad de sobre-expresar proteínas exógenas. Debido a esto, las lipasas, esterasas y proteasas actualmente son producidas de manera comercial, en grandes cantidades⁹². La utilización de huéspedes recombinantes ha permitido que estas enzimas sean accesibles y económicas y esto, a su vez, ha colaborado notablemente en amplificar sus aplicaciones prácticas, tanto a nivel de laboratorio como a escala industrial⁹³. Otra gran ventaja de utilizar microorganismos recombinantes, es la posibilidad de utilizarlos como 'fábricas' de proteínas, que

luego serán purificadas o bien, utilizar de manera directa la célula entera del microorganismo, evitando así el agregado de cofactores/coenzimas para llevar a cabo el bioproceso⁹⁴.

2.4 Síntesis orgánica, química verde y perspectivas

El conjunto extraordinario de reactividad y de compatibilidad ambiental hacen que las enzimas sean observadas como los catalizadores ideales, los cuales pueden ofrecer grandes posibilidades de aplicación en la síntesis orgánica. Debido a esta situación, los procedimientos biocatalíticos están siendo observados como la herramienta ideal para el desarrollo de una química sustentable⁹⁵⁻⁹⁷.

Por este motivo, el área de aplicación de la biocatálisis ha experimentado un enorme crecimiento y al día de hoy, ella se ha establecido como una opción importante para la realización de variados pasos en la síntesis orgánica moderna. Las elevadas selectividades de las enzimas son cada vez más apreciadas. Debido a esto, ya no resulta raro que los enfoques biocatalíticos se evalúen de manera rutinaria como una primera opción cuando se planifica una nueva ruta sintética⁹⁸.

En los últimos quince años, los avances científicos y tecnológicos alcanzados en los procedimientos de síntesis orgánica han colocado a la biocatálisis como una alternativa práctica y ambientalmente amigable, incluso por sobre la metalo- y organocatálisis tradicionales, tanto en el laboratorio como a escala industrial⁹⁹. Por este motivo, la utilización de procedimientos biocatalíticos incluye desde la producción de compuestos químicos básicos hasta la obtención de intermediarios claves para la producción de fármacos avanzados⁹¹.

Por otra parte, además de las extraordinarias eficiencias y selectividades catalíticas, la biocatálisis también puede desempeñar un papel clave en el aumento de la sustentabilidad de los procesos químicos. Las reacciones que implican enzimas (catalizador biodegradable y derivado de materias primas renovables) se llevan a cabo normalmente en mezclas acuosas con pequeñas cantidades de sales inorgánicas para regular el pH, a temperatura y presión ambiente. Debido a esto, la naturaleza 'verde' de la biocatálisis es en la actualidad uno de los aspectos más prometedores, lo cual está llevando a los químicos sintéticos a considerarla como un procedimiento de primera elección^{100,101}.

Evidentemente, el futuro de la biocatálisis promete un crecimiento sostenido y continuo, y el progreso de la misma dependerá de los avances científicos y de las

mejoras tecnológicas y comerciales que faciliten aún más no solo su disponibilidad, sino también un aumento de su productividad.

A continuación, se enumeran algunos aspectos de la biocatálisis sobre los cuales se pretende trabajar a futuro:

- ✓ Nuevos tipos de reacciones biocatalíticas: sólo un pequeño conjunto de enzimas conocidas se han aplicado a la síntesis orgánica, motivo por lo cual existe un amplio campo inexplorado para la catálisis *in vitro* de diversas reacciones que puedan tener importantes aplicaciones prácticas a nivel industrial.
- ✓ Mayor cantidad de estudios sistemáticos para nuevas reacciones biocatalíticas: existen muchos ejemplos en los que se ha reportado actividad catalítica potencialmente útil, pero no se han explorado lo suficiente para definir su valor y aplicaciones potenciales en la química orgánica^{45,102–104}.
- ✓ Reacciones inusuales promovidas por enzimas conocidas: es necesario llevar adelante minuciosos estudios mecanísticos para asegurar que las 'nuevas' reacciones siguen la ruta catalítica propuesta, como así también para predecir nuevas actividades catalíticas^{105,106}.
- ✓ Diseño computacional de nuevos biocatalizadores: enzimas diseñadas en el laboratorio sin contraparte natural conocida.
- ✓ Biocatalizadores 'híbridos': Una manera de aumentar la gama de reacciones accesibles, es acoplar catalizadores organometálicos sintéticos a enzimas^{107–109}.
- ✓ Trabajo interdisciplinario: es necesario armar equipos de trabajo con profesionales en las áreas de la biología, la química e ingeniería, sobre todo si los procesos biocatalíticos quieren perfeccionarse y llevarse a escalas mayores, por lo cual es indispensable registrar los datos del proceso en un lenguaje común^{110–113}.

Una mayor comprensión de los fundamentos de la biocatálisis combinada con una creciente disponibilidad comercial de enzimas (aisladas o no) y una mayor experiencia en sus aplicaciones, ha proporcionado una hoja de ruta para futuros desarrollos. Las enzimas pueden ser la llave que permita abrir la puerta a la obtención de muchas clases de compuestos, a menudo con rendimientos, selectividades y productividades que no tienen rival en otras metodologías y hasta imposibles de obtener por los métodos químicos tradicionales. Claramente, lo

indispensable y necesario es poseer la voluntad de entender la experiencia pasada y utilizarla como base para la obtención de futuros desarrollos sin perder de vista el impacto medioambiental de los procedimientos utilizados.

2.5 Bibliografía

- [1] (2019). 'Green Chemistry'. EPA program Recuperado de: <https://www.epa.gov/greenchemistry>. (1/10/2019)
- [2] Lempert, R. J.; Norling, P.; Pernin, C.; Resetar, S.; Mahnovski, S. (2003). *Next generation environmental technologies: Benefits and barriers*. (RAND).
- [3] Goswami, A.; Stewart, J. D. (2016). *Organic Synthesis Using Biocatalysis*. (Elsevier Inc.).
- [4] Hudlicky, T.; Reed, J. W. (2009). 'Applications of biotransformations and biocatalysis to complexity generation in organic synthesis.' *Chem. Soc. Rev.* 38, 3117–3132.
- [5] Sugai, T.; Higashibayashi, S.; Hanaya, K. (2018). 'Recent examples of the use of biocatalysts with high accessibility and availability in natural product synthesis'. *Tetrahedron* 74, 3469–3487.
- [6] Faber, K. (2011). *Biotransformations in organic chemistry*. (Springer).
- [7] Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C. (2008). *Industrial Biotransformations*. (Wiley).
- [8] Wohlgemuth, R. (2010). 'Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry'. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 713–724.
- [9] Patel, R. N. (2016). 'Applications of biocatalysis for pharmaceuticals and chemicals'. in *Organic Synthesis Using Biocatalysis* 11, 339–411. (Elsevier Inc.).
- [10] Patel, R. N. (2018). 'Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals'. *Bioorganic Med. Chem.* 26, 1252–1274.
- [11] Sun, H.; Zhang, H.; Ang, E. L.; Zhao, H. (2018). 'Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates'. *Bioorganic Med. Chem.* 26, 1275–1284.
- [12] Rosenthal, K.; Lütz, S. (2018). 'Recent developments and challenges of biocatalytic processes in the pharmaceutical industry'. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 11, 58–64.
- [13] Jegannathan, K. R.; Nielsen, P. H. (2013). 'Environmental assessment of enzyme use in industrial production-a literature review'. *J. Clean. Prod.* 42, 228–240.
- [14] Tylecote, A. (2019). 'Biotechnology as a new techno-economic paradigm that will help drive the world economy and mitigate climate change'. *Res. Policy* 48, 858–868.
- [15] Rogers, L.; Jensen, K. F. (2019). 'Continuous manufacturing-the Green Chemistry promise?' *Green Chem.* 21, 3481–3498.
- [16] Chapman, J.; Ismail, A. E.; Dinu, C. Z. (2018). 'Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks'. *Catalysts* 8, 20–29.
- [17] Segel, I. H. (2008). *Enzyme Kinetics: Behaviour and analysis of rapid equilibrium*

- and steady-state enzyme systems. *Biochemical Education* (Wiley).
- [18] Makarova, A. S.; Baurin, D. V.; Gordienko, M. G.; Kudryavtseva, E. I. (2017). 'Green chemistry for the optimum technology of biological conversion of vegetable waste'. *Sustain. Prod. Consum.* 10, 66–73.
- [19] Ayuk, E. L.; Okoro, U. C.; Ugwur, M. O. (2016). 'A Review on Biological Catalysts in Organic Synthesis'. *Int. J. Adv. Eng. Res. Appl.* 2, 296–321.
- [20] Bugg, T. D. H. (2004). *Introduction to enzyme and coenzyme chemistry. 2da Ed.* (Blackwell Publishing).
- [21] Buchholz, K.; Kasche, V.; Bomscheuer, U. T. (2012). 'Basics of enzymes as biocatalysts'. in *Biocatalysts and enzyme technology* 27–46. (Waley-VCH).
- [22] Goswami, A.; Stewart, J. D. (2016). 'Introduction, types of reactions and sources of biocatalysts'. in *Organic Synthesis Using Biocatalysis* 1–38. (Elsevier Inc.).
- [23] Ni, Y.; Xu, J. H. (2012). 'Biocatalytic ketone reduction: A green and efficient access to enantiopure alcohols'. *Biotechnol. Adv.* 30, 1279–1288.
- [24] Tamborini, L.; Romano, D.; Pinto, A.; Contente, M.; Iannuzzi, M. C.; Conti, P.; Molinari, F. (2013). 'Biotransformation with whole microbial systems in a continuous flow reactor: Resolution of (RS)-flurbiprofen using *Aspergillus oryzae* by direct esterification with ethanol in organic solvent'. *Tetrahedron Lett.* 54, 6090–6093.
- [25] Vandenberghe, A.; Marko, I. E.; Lucaccioni, F.; Lutts, S. (2013). 'Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables'. *Ind. Crops Prod.* 42, 380–385.
- [26] Zilinskas, A.; Sereikaite, J. (2013). 'Stereoselective bioreduction for the resolution of racemic mixtures of bicyclo[3.3.1]nonane-2,6-dione using vegetables'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 90, 66–69.
- [27] Magallanes-Noguera, C.; Ferrari, M. M.; Kurina-Sanz, M.; Orden, A. A. (2012). 'Deracemization of secondary alcohols by chemo-enzymatic sequence with plant cells'. *J. Biotechnol.* 160, 189–194.
- [28] Daigner, H. P.; Blencowe, C.; Freyberg, C. E. (1996). 'Prevalence of steric restrictions in enzymatic nitrile-hydrolysis of a preparation from *Rhodococcus* sp. 409'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 1, 61–70.
- [29] Guo, X.; He, D.; Huang, L.; Liu, L.; Liu, L.; Yang, H. (2012). 'Strain energy in enzyme-substrate binding: An energetic insight into the flexibility versus rigidity of enzyme active site'. *Comput. Theor. Chem.* 995, 17–23.
- [30] Pandey, A.; Webb, C.; Fernandes, M.; Larroche, C. (2006). *Enzyme technology.* (Springer-Verlag New York).
- [31] Wang, X.; Saba, T.; Yiu, H. H. P.; Howe, R. F.; Anderson, J. A.; Shi, J. (2017). 'Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways'. *Chem* 2, 621–654.
- [32] Zheng, L.; Zhang, X.; Bai, Y.; Fan, J. (2018). 'Using algae cells to drive

cofactor regeneration and asymmetric reduction for the synthesis of chiral chemicals'. *Algal Res.* 35, 432–438.

- [33] Guarneri, A.; van Berkel, W. J.; Paul, C. E. (2019). 'Alternative coenzymes for biocatalysis'. *Curr. Opin. Biotechnol.* 60, 63–71.
- [34] Gröger, H.; Hummel, W.; Rollmann, C.; Chamouleau, F.; Hüsken, H.; Werner, H.; Wunderlich, C.; Abokitse, K.; Drauz, K.; Buchholz, S. (2004). 'Preparative asymmetric reduction of ketones in a biphasic medium with an (S)-alcohol dehydrogenase under in situ-cofactor-recycling with a formate dehydrogenase'. *Tetrahedron* 60, 633–640.
- [35] Wade, L. (2003). *Química Orgánica*. (Prentice-Hall Hispanoamericana).
- [36] Drauz, K.; Waldmann, H. (2002). *Enzyme catalysis in organic synthesis*. (Wiley).
- [37] Punekar, N. S. (2018). 'Enzyme inhibition analyses'. in *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms* 231–236. (Springer).
- [38] Wolfenden, R. (1976). 'Transition state analog inhibitors and enzyme catalysis'. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 5, 271–306.
- [39] Hiratake, J. (2005). 'Enzyme inhibitors as chemical tools to study enzyme catalysis: Rational design, synthesis, and applications'. *Chem. Rec.* 5, 209–228.
- [40] Kula, M.-R. (2002). 'Introduction'. in *Enzyme catalysis in organic synthesis* 1–38. (Wiley).
- [41] Bisswanger, H. (2017). 'Cooperativity and allosteric enzymes'. in *Enzyme Kinetics: Principles and Methods* 27–52. (Wiley).
- [42] Moore, J. C.; Pollard, D. J.; Kosjek, B.; Devine, P. N. (2007). 'Advances in the enzymatic reduction of ketones'. *Acc. Chem. Res.* 40, 1412–1419.
- [43] Cao, C.; Matsuda, T. (2016). *Biocatalysis in organic solvents, supercritical fluids and ionic liquids. Organic Synthesis Using Biocatalysis* (Elsevier Inc.).
- [44] Claus, J.; Sommer, F. O.; Kragl, U. (2018). 'Ionic liquids in biotechnology and beyond'. *Solid State Ionics.* 314, 119–128.
- [45] Gotor-Fernández, V.; Paul, C. E. (2019). 'Deep eutectic solvents for redox biocatalysis'. *J. Biotechnol.* 293, 24–35.
- [46] Hu, J.; Xu, Y. (2006). 'Anti-Prelog reduction of prochiral carbonyl compounds by *Oenococcus oeni* in a biphasic system'. *Biotechnol. Lett.* 28, 1115–1119.
- [47] Kim, P. Y.; Pollard, D. J.; Woodley, J. M. (2007). 'Substrate supply for effective biocatalysis'. *Biotechnol. Prog.* 23, 74–82.
- [48] Salvi, N. A.; Chattopadhyay, S. (2016). 'Laboratory scale-up synthesis of chiral carbinols using *Rhizopus arrhizus*'. *Tetrahedron Asymmetry* 27, 188–192.
- [49] Decarlini, M. F.; Aimar, M. L.; Vázquez, A. M.; Vero, S.; Rossi, L. I.; Yang, P. (2017). 'Fungi isolated from food samples for an efficient stereoselective production of phenylethanols'. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 12, 275–285.

- [50] Chang, X.; Yang, Z.; Zeng, R.; Yang, G.; Yan, J. (2010). 'Production of chiral aromatic alcohol by asymmetric reduction with vegetable catalyst'. *Chinese J. Chem. Eng.* 18, 1029–1033.
- [51] Bódai, V.; Nagy-Győr, L.; Örkényi, R.; Molnár, Z.; Kohári, S.; Erdélyi, B.; Nagymáté, Z.; Romsics, C.; Paizs, C.; Poppe, L.; Hornyánszky, G. (2016). 'Wickerhamomyces subpelliculosus as whole-cell biocatalyst for stereoselective bioreduction of ketones'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 134, 206–214.
- [52] Drauz, K.; Waldmann, H. (1995). 'Enzymes from extreme thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria'. in *Enzyme catalysis in organic synthesis* 313–331. (Wiley).
- [53] Oroz-Guinea, I.; Sánchez-Moreno, I.; Mena, M.; García-Junceda, E. (2015). 'Hyperthermophilic aldolases as biocatalyst for C–C bond formation: rhamnulose 1-phosphate aldolase from *Thermotoga maritima*'. *App. Microbiol. Biotechnol.* 99, 3057-3068.
- [54] Gao, C.; Zhang, W.; Lv, C.; Li, L.; Chunhui Hu, C. M.; Xu, P. (2010). 'Efficient production of 2-oxobutyrate from 2-hydroxybutyrate by using whole cells of *Pseudomonas Stutzeri* strain SDM'. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1679–1682.
- [55] Salis, A.; Monduzzi, M. (2016). 'Not only pH. Specific buffer effects in biological systems'. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 23, 1–9.
- [56] Kazlauskas, R. J. (2005). 'Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis'. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 195–201.
- [57] Gurung, N.; Ray, S.; Bose, S.; Rai, V. (2013). 'A Broader View: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond'. *Biomed Res. Int.* 1–18.
- [58] Giri, A.; Dhingra, V.; Giri, C. .; Singh, A.; Ward, O. P.; Narasu, M. L. (2001). 'Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects'. *Biotechnol. Adv.* 19, 175–199.
- [59] 'Eduard Buchner'. *The Nobel Prize Recuperado de:* <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1907/buchner/biographical/>. (1/10/2019)
- [60] de Carvalho, C. C. C. R. (2017). 'Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry'. *Microb. Biotechnol.* 10, 250–263.
- [61] Gröger, H. (2016). 'Practical and engineering aspects of running enzyme reactions'. in *Organic Synthesis Using Biocatalysis* 39–66. (Elsevier Inc.).
- [62] Lynch, S. A.; Mullen, A. M.; O'Neill, E.; Drummond, L.; Álvarez, C. (2018). 'Opportunities and perspectives for utilisation of co-products in the meat industry'. *Meat Sci.* 144, 62–73.
- [63] Ravindran, R.; Jaiswal, A. K. (2016). 'Exploitation of food industry waste for high-value products'. *Trends Biotechnol.* 34, 58–69.
- [64] De María, P. D.; García-Burgos, C. A.; Bargeman, G.; Van Gemert, R. W. (2007). 'Pig liver esterase (PLE) as biocatalyst in organic synthesis: From

- nature to cloning and to practical applications'. *Synthesis*. 1439–1452.
- [65] Thanikaivelan, P.; Rao, J. R.; Nair, B. U.; Ramasami, T. (2004). 'Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing'. *Trends Biotechnol.* 22, 181–188.
- [66] Chenault, H. K.; Dahmer, J.; Whitesides, G. M. (1989). 'Kinetic resolution of unnatural and rarely occurring amino acids: enantioselective hydrolysis of N-Acyl amino acids catalyzed by acylase I'. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 6354–6364.
- [67] Bednarski, M. D.; Simon, E. S.; Bi, N.; Fessner, W.; Kim, M.; Lees, W.; Saito, T.; Waldmann, H.; Whitesides, G. M. (1989). 'Rabbit Muscle Aldolase as a Catalyst in Organic Synthesis'. 1, 627–635.
- [68] Domínguez de María, P.; Sinisterra, J. V.; Tsai, S. W.; Alcántara, A. R. (2006). 'Carica papaya lipase (CPL): An emerging and versatile biocatalyst'. *Biotechnol. Adv.* 24, 493–499.
- [69] Rivera, I.; Mateos, J. C.; Marty, A.; Sandoval, G.; Duquesne, S. (2013). 'Lipase from Carica papaya latex presents high enantioselectivity toward the resolution of prodrug (R,S)-2-bromophenylacetic acid octyl ester'. *Tetrahedron Lett.* 54, 5523–5526.
- [70] Thomás, G. E.; Rodolfo, H. G.; Juan, M. D.; Georgina, S. F.; Luis, C. G.; Ingrid, R. B.; Santiago, G. T. (2009). 'Proteolytic activity in enzymatic extracts from Carica papaya L. cv. Maradol harvest by-products'. *Process Biochem.* 44, 77–82.
- [71] Fernández-Lucas, J.; Castañeda, D.; Hormigo, D. (2017). 'New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry'. *Trends Food Sci. Technol.* 68, 91–101.
- [72] Ramli, A. N. M.; Manas, N. H. A.; Hamid, A. A. A.; Hamid, H. A.; Ilias, R. M. (2018). 'Comparative structural analysis of fruit and stem bromelain from Ananas comosus'. *Food Chem.* 266, 183–191.
- [73] Klempier, N.; Griengl, H.; Hayn, M. (1993). 'Aliphatic (S)-cyanohydrins by enzyme catalyzed synthesis'. *Tetrahedron Lett.* 34, 4769–4772.
- [74] North, M. (2003). 'Synthesis and applications of non-racemic cyanohydrins'. *Tetrahedron Asymmetry* 14, 147–176.
- [75] Pavoković, D.; Buđa, R.; Andrašec, F.; Roje, M.; Bubalo, M. C.; Redovniković, I. R. (2017). 'Plant-mediated asymmetric reduction of 1-(3,4-dimethylphenyl)ethanone'. *Tetrahedron Asymmetry* 28, 730–733.
- [76] Ding, C.; Zhang, M.; Zhao, F.; Zhang, S. (2008). 'Disposable biosensor and biocatalysis of horseradish peroxidase based on sodium alginate film and room temperature ionic liquid'. *Anal. Biochem.* 378, 32–37.
- [77] Alagöz, D.; Tükel, S. S.; Yildirim, D. (2015). 'Enantioselective synthesis of various cyanohydrins using covalently immobilized preparations of hydroxynitrile lyase from Prunus dulcis'. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 177, 1348–1363.

- [78] Asano, Y.; Tamura, K.; Doi, N.; Ueatrongchit, T.; H-Kittikun, A.; Ohmiya, T. (2005). 'Screening for new hydroxynitrilases from plants'. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 2349–2357.
- [79] Rosenthaler, L. (1908). 'Enzyme-effected asymmetric syntheses'. *Biochem Z.* 14, 238–253.
- [80] Patil, D. (2015). 'Biocatalysis using plant material: A green access to asymmetric reduction'. *Int. J. ChemTech Res.* 8, 318–324.
- [81] Bennamane, M.; Razi, S.; Zeror, S.; Aribi-Zouioueche, L. (2018). 'Preparation of chiral phenylethanols using various vegetables grown in Algeria'. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 14, 52–56.
- [82] Xie, Y.; Xu, J. H.; Lu, W. Y.; Lin, G. Q. (2009). 'Adzuki bean: A new resource of biocatalyst for asymmetric reduction of aromatic ketones with high stereoselectivity and substrate tolerance'. *Bioresour. Technol.* 100, 2463–2468.
- [83] Bizerra, A. M. C.; Gonzalo, G. de; Lavandera, I.; Gotor-Fernández, V.; de Mattos, M. C.; de Oliveira, M. da C. F.; Lemos, T. L. G.; Gotor, V. (2010). 'Reduction processes biocatalyzed by *Vigna unguiculata*'. *Tetrahedron Asymmetry* 21, 566–570.
- [84] Mohammadi, M.; Yousefi, M.; Habibi, Z. (2011). 'Highly enantioselective bioreduction of prochiral ketones by stem and germinated plant of *Brassica oleracea* variety *italica*'. *Biocatal. Biotransformation* 29, 1–9.
- [85] Bennamane, M.; Zeror, S.; Aribi-Zouioueche, L. (2014). 'Asymmetric reduction of ketones by biocatalysis using medlar (*Mespilus germanica* L) fruit grown in Algeria'. *Biocatal. Biotransformation* 32, 327–332.
- [86] Luna, H.; Hernández-Vázquez, L.; Reyo, A.; Arias, L.; Manjarrez, N.; Navarro-Ocaña, A. (2014). 'Banana and maize leaf wastes as a green alternative for the preparation of benzyl alcohols used as starting materials for fragrances'. *Ind. Crops Prod.* 59, 105–108.
- [87] Bennamane, M.; Zeror, S.; Aribi-Zouioueche, L. (2015). 'Asymmetric reduction of ketones by biocatalysis using clementine mandarin (*citrus reticulata*) fruit grown in annaba or by ruthenium catalysis for access to both enantiomers'. *Chirality* 27, 205–210.
- [88] da Silva, F. F. M.; Ferreira, D. A.; Monte, F. J. Q.; de Lemos, T. L. G. (2017). 'Synthesis of chiral esters and alcohols via enantioselective esterification with *Citrus aurantium* peels as biocatalyst'. *Ind. Crops Prod.* 96, 23–29.
- [89] Reichstein, T.; Grüssner, A. (1934). 'Eine ergiebige Synthese der 1-Ascorbinsäure (C-Vitamin)'. 17, 311–328.
- [90] Moore, J. C.; Savile, C. K.; Pannuri, S.; Kosjek, B.; Janey, J. M. (2012). 'Industrially relevant enzymatic reductions'. in *Comprehensive Chirality* 9, 318–341. (Elsevier Ltd.).
- [91] Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. (2012). 'Engineering the third wave of biocatalysis'. *Nature* 485, 185–194.

- [92] Kratzer, R.; Woodley, J. M.; Nidetzky, B. (2015). 'Rules for biocatalyst and reaction engineering to implement effective, NAD(P)H-dependent, whole cell bioreductions'. *Biotechnol. Adv.* 33, 1641–1652.
- [93] Wang, M.; Si, T.; Zhao, H. (2012). 'Biocatalyst development by directed evolution'. *Bioresour. Technol.* 115, 117–125.
- [94] Sheldon, R. A.; Pereira, P. C. (2017). 'Biocatalysis engineering: The big picture'. *Chem. Soc. Rev.* 46, 2678–2691.
- [95] Lin, B.; Tao, Y. (2017). 'Whole-cell biocatalysts by design'. *Microb. Cell Fact.* 16, 1–12.
- [96] Sheldon, R. A.; Brady, D. (2018). 'The limits to biocatalysis: Pushing the envelope'. *Chem. Commun.* 54, 6088–6104.
- [97] Turner, N. J.; Kumar, R. (2018). 'Editorial overview: Biocatalysis and biotransformation: The golden age of biocatalysis'. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 43, A1–A3.
- [98] Hilterhaus, L.; Liese, A.; Kettling, U.; Antranikian, G. (2016). *Applied Biocatalysis: from fundamental science to industrial applications*. (Wiley).
- [99] de Souza, R. O. M. A.; Miranda, L. S. M.; Bornscheuer, U. T. (2017). 'A Retrosynthesis approach for biocatalysis in organic synthesis'. *Chem. - A Eur. J.* 23, 12040–12063.
- [100] Dunn, P. J. (2012). 'The importance of green chemistry in process research and development'. *Chem. Soc. Rev.* 41, 1452–1461.
- [101] Goswami, A.; Stewart, J. D. (2016). 'Future of biocatalysis in the synthesis of organic compounds'. in *Organic Synthesis Using Biocatalysis* 413–419. (Elsevier Inc.).
- [102] Ma, Y.; Zeng, X.; Ma, X.; Yang, R.; Zhao, W. (2019). 'A simple and eco-friendly method of gelatin production from bone: One-step biocatalysis'. *J. Clean. Prod.* 209, 916–926.
- [103] Lambruschini, C.; Basso, A.; Banfi, L. (2018). 'Integrating biocatalysis and multicomponent reactions'. *Drug Discov. Today Technol.* 29, 3–9.
- [104] Pellis, A.; Cantone, S.; Ebert, C.; Gardossi, L. (2018). 'Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities'. *N. Biotechnol.* 40, 154–169.
- [105] Hammer, S. C.; Knight, A. M.; Arnold, F. H. (2017). 'Design and evolution of enzymes for non-natural chemistry'. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 7, 23–30.
- [106] Kim, J.; Park, C. B. (2019). 'Shedding light on biocatalysis: photoelectrochemical platforms for solar-driven biotransformation'. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 49, 122–129.
- [107] Hyster, T. K.; Knörr, L.; Ward, T. R.; Rovis, T. (2012). 'Biotinylated Rh(III) complexes in engineered streptavidin for accelerated asymmetric C-H activation'. *Science (80-.)*. 338, 500–503.
- [108] Dürrenberger, M.; Ward, T. R. (2014). 'Recent achievements in the design and

- engineering of artificial metalloenzymes'. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19, 99–106.
- [109] Jeschek, M.; Panke, S.; Ward, T. R. (2018). 'Artificial Metalloenzymes on the Verge of New-to-Nature Metabolism'. *Trends Biotechnol.* 36, 60–72.
- [110] Jiang, W.; Yang, R.; Lin, P.; Hong, W.; Fang, B. (2019). 'Bioinspired genetic engineering of supramolecular assembled formate dehydrogenase with enhanced biocatalysis activities'. *J. Biotechnol.* 292, 50–56.
- [111] López-Gallego, F. (2019). 'On-pot and cell-free biocatalysis using coimmobilized enzymes on advanced materials'. *Methods Enzymol.* 617, 385–411.
- [112] Ávila, S. N. S.; Gutarra, M. L. E.; Fernandez-Lafuente, R.; Cavalcanti, E. D. C.; Freire, D. M. G. (2019). 'Multipurpose fixed-bed bioreactor to simplify lipase production by solid-state fermentation and application in biocatalysis'. *Biochem. Eng. J.* 144, 1–7.
- [113] Badenhorst, C. P. S.; Bornscheuer, U. T. (2018). 'Getting momentum: from biocatalysis to advanced synthetic biology'. *Trends Biochem. Sci.* 43, 180–198.

CAPÍTULO 3: Reducción de un grupo carbonilo

La reducción de un grupo carbonilo es una de las reacciones más importantes de la Química Orgánica y este proceso fundamental permite la obtención de alcoholes. Su importancia no solo radica en la obtención de los alcoholes propiamente dichos, sino que el grupo funcional hidroxilo puede ser fácilmente convertido en otros grupos funcionales (éteres, ésteres, halogenuros de alquilo, alquenos, sulfatos, carbonatos y fosfatos, Figura 3.1). Por estos motivos, la reducción de aldehídos y cetonas es un paso de síntesis clave en la obtención de diversos compuestos químicos de interés¹.

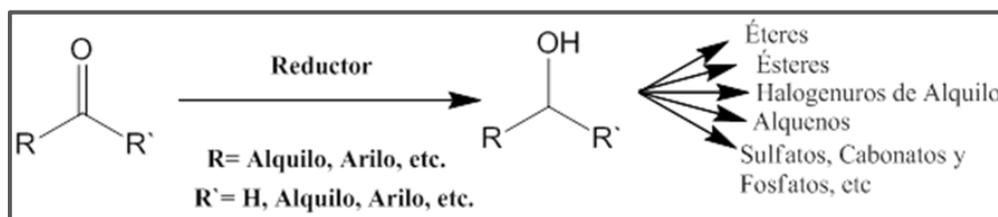


Figura 3.1: Reducción grupo carbonilo.

En el caso particular de las cetonas asimétricas (sustituyentes diferentes), el proceso de reducción adquiere mayor importancia aún, debido a la posibilidad de obtener alcoholes en sus dos formas enantioméricas (Figura 3.2):

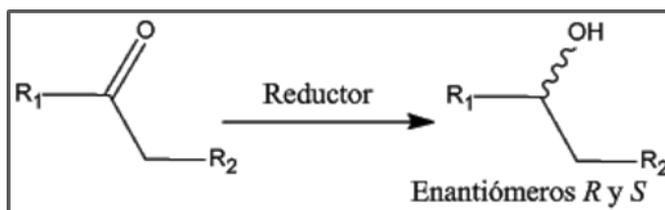


Figura 3.2: Reducción cetona asimétrica.

Un grupo hidroxilo sobre un centro asimétrico es un ejemplo clásico de intermediario clave en la síntesis de productos ópticamente activos, tanto para la industria farmacéutica como para la industria de los plaguicidas y cosméticos. Más aún, estos alcoholes enantioméricamente puros pueden ser fácilmente convertidos en otras funcionalidades sin racemización^{2,3}.

La quiralidad es una característica intrínseca del universo y juega un papel clave en la ciencia y la tecnología. La vida depende de la quiralidad molecular, ya que muchas funciones biológicas son inherentemente asimétricas y debido a esto, la

mayoría de los fenómenos fisiológicos surgen de interacciones moleculares altamente precisas, en las que el organismo es capaz de reconocer de manera preferencial a uno de los enantiómeros⁴.

A menudo, los enantiómeros poseen olor y sabor diferentes, y en el caso de las drogas sintéticas, propiedades terapéuticas diferentes, muchas veces contrapuestas⁵. De hecho, se ha demostrado que los enantiómeros de una serie de fármacos quirales pueden presentar grandes diferencias con respecto a la farmacodinámica, la farmacocinética y las propiedades toxicológicas^{2,6,7}. La situación antes expuesta, es esencialmente debido a que los sitios receptores en el cuerpo humano son quirales y sólo interactúan con moléculas del fármaco que tiene la configuración espacial adecuada. Esta situación da lugar a diferencias marcadas en las actividades farmacológicas de los enantiómeros y el ejemplo más trágico ha sido la talidomida. Este fármaco que fue introducido a finales de los años cincuenta como un medicamento antiemético para el tratamiento de las náuseas y vómitos en las mujeres embarazadas, fue utilizado inicialmente como una mezcla racémica, pero si bien la (R)-Talidomida tiene las propiedades deseables, desafortunadamente su enantiómero S es teratogénico e induce malformaciones fetales^{8,9}.

A pesar de esta nefasta experiencia, incluso a principios de los noventa, aproximadamente el 90% de los fármacos sintéticos se comercializaban como racematos, es decir, mezclas equimolares de ambos enantiómeros, lo que claramente reflejaba la dificultad en la síntesis y producción de compuestos enantioméricamente puros¹⁰.

En 1992, la FDA creó una guía con respecto a los 'interruptores racémicos', con el fin de estimular la comercialización de fármacos enantioméricamente puros¹¹. Tales normas de comercialización para las drogas sintéticas, junto con el progreso reciente en la síntesis orgánica estereoselectiva, dio lugar a un aumento significativo en la proporción de fármacos comercializados en forma de enantiómeros puros. Para los años 2000, las ventas mundiales de compuestos enantioméricamente puros alcanzaron los 123.000 millones de dólares en Estados Unidos¹².

El desarrollo de metodologías de síntesis verdaderamente eficientes para lograr la pureza enantiomérica requerida, ha sido un reto sustancial para los químicos, tanto en la investigación académica como en la industria. Inicialmente, los compuestos enantioméricamente puros se obtuvieron mediante la técnica de resolución racémica o mediante modificaciones en compuestos naturales quirales,

tales como aminoácidos, ácidos tartárico y láctico, carbohidratos, terpenos o alcaloides¹³.

No obstante, durante los últimos treinta años, la fabricación de productos farmacéuticos ha sufrido cambios revolucionarios. Las moléculas bioactivas se han vuelto cada vez más complejas y a partir de finales de los '80, la presión legislativa ha estimulado la comercialización de moléculas quirales como enantiómeros puros. Esto a su vez, estimuló el desarrollo de métodos no solamente eficientes, sino también rentables para la síntesis estereoselectiva de ellos^{14,15}. Adicionalmente, también ha habido un cambio de paradigma desde el concepto tradicional de eficiencia de proceso a uno que asigna valor económico a la conservación de la energía y las materias primas, disminuyendo los residuos y evitando el uso de productos químicos tóxicos y/o peligrosos^{16,17}.

3.1 Síntesis asimétrica: reducción estereoselectiva de aril alquil cetonas

La complejidad molecular de los compuestos químicos usados en la actualidad está aumentando y se caracteriza por un número cada vez mayor de centros quirales dentro de su estructura.

La reducción estereoselectiva de cetonas para formar alcoholes quirales es una de las reacciones más útiles en la síntesis orgánica¹⁸. Un grupo hidroxilo sobre un centro asimétrico es un ejemplo clásico de intermediario clave en la síntesis de productos ópticamente activos. En el caso particular de la reducción estereoselectiva de aril alquil cetonas (derivados de la acetofenona, Figura 3.3) los procedimientos reductivos realizados de manera enantioselectiva sobre ellas son de gran importancia debido a que existen numerosos compuestos de aplicación farmacéutica que han sido obtenidos por su reducción asimétrica.

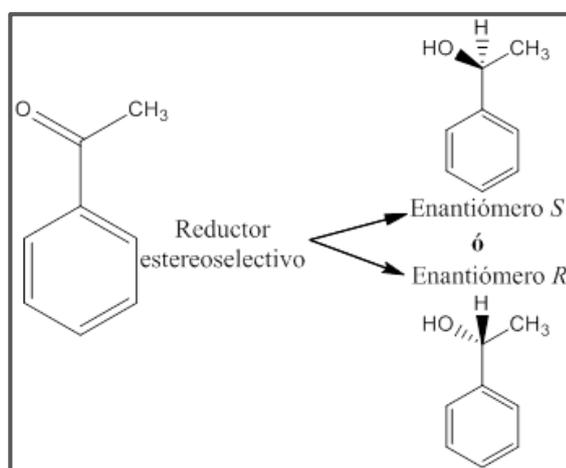


Figura 3.3: Reducción acetofenona.

En la Figura 3.4 se muestran algunos ejemplos de fármacos que poseen centros asimétricos en sus estructuras.

Por otra parte, debido a cuestiones de seguridad, razones terapéuticas y de normas regulatorias, hay un creciente interés en desarrollar procesos capaces de producir fármacos enantioméricamente puros a un costo reducido. En 2008, las ventas mundiales de productos de tecnología quiral para los mercados farmacéuticos, biotecnológicos y agroquímicos fueron de U\$4,3 mil millones; que aumentaron a U\$4,5 mil millones en 2009 (lo que representa un crecimiento del 3,3%), a 5,3 mil millones en 2011 y se esperaba que alcanzara los 7,2 mil millones para finales de 2016¹⁹.

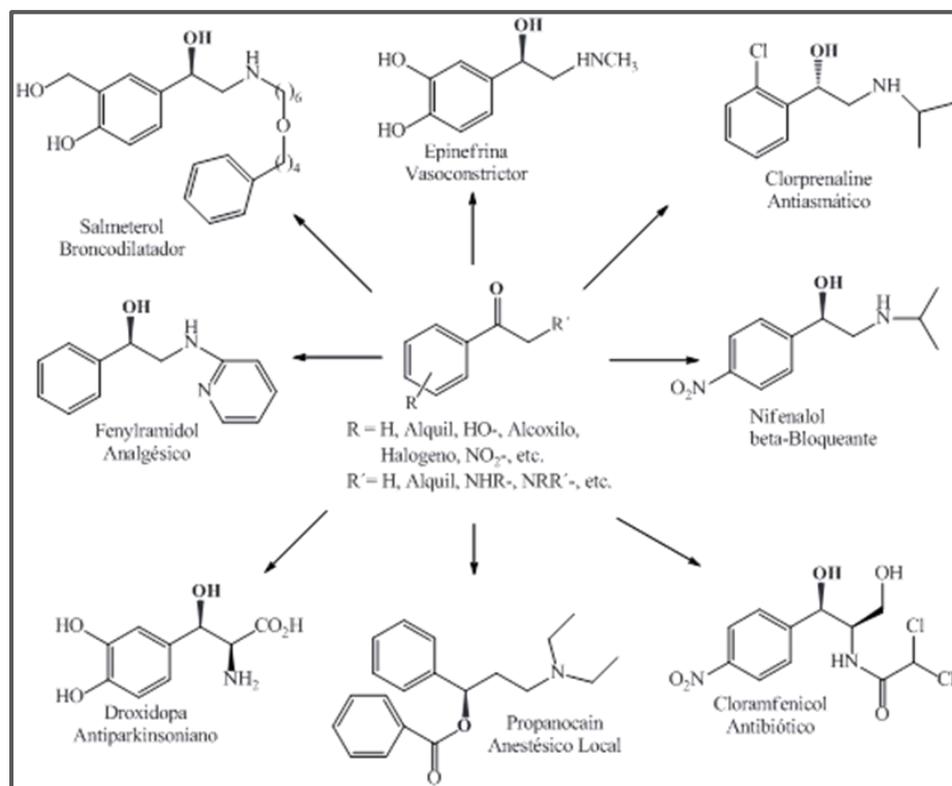


Figura 3.4: Fármacos que poseen alcoholes quirales en sus estructuras.

Por lo tanto, cabe afirmar que los procedimientos de síntesis estereoselectivos para obtener moléculas enantioméricamente puras es el paso más crítico en la preparación de intermediarios quirales para la industria farmacéutica.

Como se puede observar en la Figura 3.5, se han reportado varios métodos para acceder a compuestos enantioméricamente puros.

Hasta el presente, los procesos reductivos utilizados para realizar la transformación de compuestos carbonílicos en alcoholes, pueden ser clasificados en dos categorías: a) reducciones llevadas a cabo mediante la utilización de

metodologías químicas y b) reducciones llevadas a cabo mediante la utilización de metodologías bioquímicas. Ambos sistemas de reducción poseen rasgos característicos como así también su propio espectro de aplicación y en las secciones siguientes se discutirá cada una de estas metodologías.

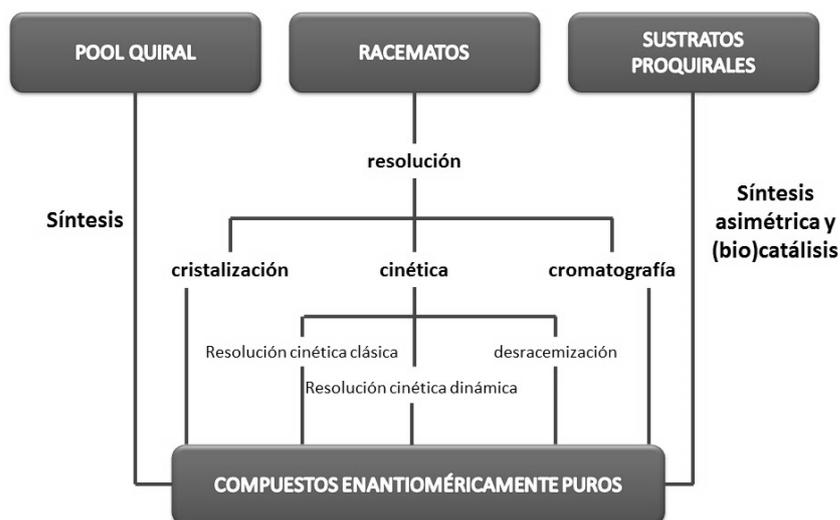


Figura 3.5: Diferentes métodos para acceder a enantiómeros puros²⁰.

3.1.1 Metodologías Químicas

En el caso de las reducciones que involucran *metodologías químicas*, varios sistemas catalíticos y no catalíticos han sido desarrollados. En el caso particular de la obtención de compuestos quirales, la utilización de compuestos de boro^{21,22,23} o compuestos organometálicos^{24,25} (derivados del Cu²⁶, Al²⁷, Ru^{28,29}, Rh^{30,31}, Pt³², Co³³, entre otros) acomplejados con ligandos quirales y en solventes orgánicos como medio de reacción, han sido intensamente explorados. Estos procedimientos han sido capaces de promover reacciones con muy buenos rendimientos y con enantioselectividades desde buenas a excelentes.

La síntesis asimétrica tradicional usando una cantidad estequiométrica de un compuesto quiral, ha sido viable solamente si el costoso auxiliar quiral, asociado a un sustrato o reactivo, es fácilmente reciclable, de lo contrario es un procedimiento que representa una mera curiosidad sintética sin aplicación práctica. Por consiguiente, los requisitos para una síntesis asimétrica exitosa incluyen alta estereoselectividad, alta productividad, economía atómica, rentabilidad, simplicidad operacional, respeto al medio ambiente y bajo consumo de energía. Debido a esto, por incumplimiento de varios de los requisitos anteriores, la metodología química no catalítica está siendo dejada de lado por sobre la vía catalítica^{34,35}.

No obstante, todas las metodologías químicas han sido desarrolladas sin tener en cuenta el impacto ambiental que producen, ya sea por el agotamiento de los recursos minerales (utilizados para la producción de los reductores específicos) o por la producción de desechos tóxicos difíciles de tratar y disponer al final de la reacción.

3.1.2 Metodologías Bioquímicas

Como se mencionó anteriormente, en años recientes se ha dado un impulso notable, de la mano del advenimiento del concepto de Química Verde, a la utilización de reacciones químicas ambientalmente amigables mediante el empleo de metodologías bioquímicas. En concordancia con esto, se ha incrementado notablemente^{36,37} la utilización de procedimientos biocatalíticos para la síntesis a escala industrial de productos químicos de interés. Esta situación ha sido posible gracias al empleo de los sistemas enzimáticos presentes en algunos seres vivos como en microorganismos (bacterias³⁸, hongos³⁹ y algas⁴⁰), tejidos de animales⁴¹ y recientemente plantas^{42,43,44}.

Este interés creciente en utilizar procesos biocatalíticos es debido esencialmente al amplio potencial biotecnológico de las reacciones enzimáticas ya que estos sistemas poseen una altísima eficiencia (rendimientos del 100% son comunes), a que el medio de reacción es usualmente agua y a que los residuos producidos son compatibles con el medio ambiente ya que el catalizador es biodegradable⁴⁵. Adicionalmente, y no de menor importancia, la utilización de procedimientos biocatalíticos pueden proporcionar reacciones con una estereoselectividad asombrosa. En este sentido, excesos enantioméricos mayores al 99% son también comunes.

Estas reacciones químicas producidas por los sistemas biológicos sobre sustratos exógenos se basan en la utilización de los organismos vivos (como fuente de enzimas y cofactores) por su capacidad para producir reacciones químicas con excelentes perspectivas de aplicación práctica.

Características sobresalientes de estos procesos incluyen: bajo costo, alta versatilidad y eficiencia, en conjunción con aspectos químicos altamente deseables como quimioselectividad, regioselectividad y enantioselectividad. Más aún, estos sistemas poseen una ventaja adicional, ellos pueden ser utilizados como reactivos químicos sobre una base sustentable más que sobre una base de agotamiento de recursos no renovables⁴⁶. Adicionalmente, estos sistemas de reacción son más

benignos en cuanto a la generación de desechos tóxicos y debido a estas características sobresalientes, en la pasada década la aplicación de los procedimientos biocatalíticos en la síntesis de productos comerciales ha sufrido una revolución^{47,48}.

La síntesis de alcoholes quirales a partir de la reducción de cetonas catalizadas por enzimas se considera en la actualidad el enfoque de 'primera opción' en la fabricación de una amplia gama de intermedios en la industria farmacéutica, agroquímica, química fina y alimentaria. Más aún, está reemplazando la catálisis química para superar las desventajas de los subproductos no deseados, los efluentes tóxicos y la escasa selectividad del proceso^{49,50}.

3.2 Bibliografía

- [1] Smith, M. B.; March, J. (2006). *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure*. (Wiley).
- [2] Hutt, A. J.; Tan, S. C. (1996). 'Drug chirality and its clinical significance.' *Drugs* 52, 1–12.
- [3] Rouhi, A. M. (2003). 'Chiral business'. *Chem Eng News* 81, 45–61.
- [4] Kondepudi, D. (2018). 'Chiral asymmetry in nature'. in *Chiral Analysis: Advances in Spectroscopy, Chromatography and Emerging Methods* 3–28. (Elsevier B.V.)
- [5] Hoffmann, R. (1995). *The same and not the same*. (Columbia university press).
- [6] Lam, Y. W. F. (1988). 'Stereoselectivity: An issue of significant importance in clinical pharmacology'. *Pharmacotherapy* 8, 147–157.
- [7] Nguyen, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. (2006). 'Chiral drugs: an overview'. *Int. J. Biomed. Sci.* 2, 85–100.
- [8] Gordon, J. N.; Goggin, P. M. (2003). 'Thalidomide and its derivatives: emerging from the wilderness.' *Postgrad. Med. J.* 79, 127–132.
- [9] Leleu, X.; Micol, J. B.; Guieze, R.; Berthon, C.; Kuhnovsky, F.; Terriou, L.; Moreau, A. S.; Yakoub-Agha, I.; Bauters, F.; Facon, T. (2005). 'Thalidomide: mechanisms of action and new insights in hematology'. *Rev. Med. Interne* 26, 119–127.
- [10] Noyori, R. (2002). 'Asymmetric Catalysis: Science and Opportunities (Nobel lecture)'. *Angew. Chemie* 41, 2008–2022.
- [11] Stinson, S. (1992). 'Chiral drugs'. *Chem. Eng. News* 70, 46–79.
- [12] Stinson, S. (2001). 'Chiral chemistry'. *Chem Eng News* 79, 45.
- [13] Kagan, H. B.; Gopalaiah, K. (2011). 'Early history of asymmetric synthesis: Who are the scientists who set up the basic principles and the first experiments?' *New J. Chem.* 35, 1933–1937.
- [14] Uteng, M.; Urban, L.; Brees, D.; Muller, P. Y.; Kullak-Ublick, G. A.; Bouchard, P.; Tougas, G.; Chibout, S. D. (2019). 'Safety differentiation: emerging competitive edge in drug development'. *Drug Discov. Today* 24, 285–292.
- [15] Koenig, S. G.; Dillon, B. (2017). 'Driving toward greener chemistry in the pharmaceutical industry'. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 7, 56–59.
- [16] Dunn, P.; Wells, A.; Williams, M. (2010). *Green chemistry in the pharmaceutical industry*. (Wiley).
- [17] Chaturvedi, U.; Sharma, M.; Dangayach, G. S.; Sarkar, P. (2017). 'Evolution

- and adoption of sustainable practices in the pharmaceutical industry: An overview with an Indian perspective'. *J. Clean. Prod.* 168, 1358–1369.
- [18] Smith, M. B. (2017). 'Functional group exchange reactions: Reductions'. in *Organic Synthesis* 309–418. (Elsevier Inc.).
- [19] Dewan, S. S. (2012). 'Global Markets for Chiral Technology'. *BCC Research* Recuperado de: <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/chiral-products-technology-global-markets.html> (1/10/2019)
- [20] Ahmed, M.; Kelly, T.; Ghanem, A. (2012). 'Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemisation'. *Tetrahedron* 68, 6781–6802.
- [21] Li, D. R.; He, A.; Falck, J. R. (2010). 'Enantioselective, organocatalytic reduction of ketones using bifunctional thiourea-amine catalysts'. *Org. Lett.* 12, 1756–1759.
- [22] Chauhan, M. S.; Singh, S. (2015). 'Asymmetric reduction of ketones catalyzed by α,α -diphenyl-(L)-prolinol modified with imidazolium ionic liquid and $\text{BH}_3\cdot\text{SMe}_2$ as a recoverable catalyst'. *J. Mol. Catal. A Chem.* 398, 184–189.
- [23] Yang, S. D.; Shi, Y.; Sun, Z. H.; Zhao, Y. Bin; Liang, Y. M. (2006). 'Asymmetric borane reduction of prochiral ketones using imidazolium-tagged sulfonamide catalyst'. *Tetrahedron Asymmetry* 17, 1895–1900.
- [24] Kagan, H. B. (1982). 'Asymmetric Synthesis using Organometallic Catalysts'. *Compr. Organomet. Chem.* 53, 463–498.
- [25] van Leeuwen, P. W. N. M. (2016). 'Homogeneous Metal Catalysis: An Undergraduate Introduction'. *Ref. Modul. Chem. Mol. Sci. Chem. Eng.*
- [26] Wu, J.; Ji, J.-X.; Chan, A. S. C. (2005). 'A remarkably effective copper(II)-dipyridylphosphine catalyst system for the asymmetric hydrosilylation of ketones in air'. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 3570–3575.
- [27] Li, W.; Ma, X.; Walawalkar, M. G.; Yang, Z.; Roesky, H. W. (2017). 'Soluble aluminum hydrides function as catalysts in deprotonation, insertion, and activation reactions'. *Coord. Chem. Rev.* 350, 14–29.
- [28] Wu, J.; Chen, H.; Zhou, Z.; Yeung, C. H.; Chan, A. S. C. (2001). 'A new chiral dipyridylphosphine ligand Xyl-P-Phos and its application in the Ru-catalyzed asymmetric hydrogenation of β -ketoesters'. *Tetrahedron Lett.* 43, 1050–1054.
- [29] Du, W.; Wang, Q.; Yu, Z. (2013). 'Ru(II) pyridyl-based NNN complex catalysts for (asymmetric) transfer hydrogenation of ketones at room

- temperature'. *Chinese J. Catal.* 34, 1373–1377.
- [30] Wettergren, J.; Zaitsev, A. B.; Adolfsson, H. (2007). 'Rhodium-Catalyzed Asymmetric Transfer Hydrogenation of Aryl Alkyl Ketones Employing Ligands Derived from Amino Acids'. *Adv. Synth. Catal.* 349, 2556–2562.
- [31] Echeverria, P.-G.; Féraud, C.; Phansavath, P.; Ratovelomanana-Vidal, V. (2015). 'Synthesis, characterization and use of a new tethered Rh(III) complex in asymmetric transfer hydrogenation of ketones'. *Catal. Commun.* 62, 95–99.
- [32] Lou, L. L.; Yang, T.; Yu, W.; Qu, H.; Feng, Y.; Li, H.; Yu, K.; Liu, S. (2017). 'Effective and durable Pt nanocatalyst supported on three-dimensionally ordered macroporous carbon for asymmetric hydrogenation'. *Catal. Today* 298, 197–202.
- [33] Yu, F.; Zhang, X.-C.; Wu, F.-F.; Zhou, J.-N.; Fang, W.; Wu, J.; Chan, A. S. C. (2011). 'Cobalt(II)-catalyzed asymmetric hydrosilylation of simple ketones using dipyridylphosphine ligands in air'. *Org. Biomol. Chem.* 9, 5652–5654.
- [34] Anastas, P. T.; Kirchoff, M. M.; Tracy C. Williamson. (2001). 'Catalysis as a foundational pillar of green chemistry'. *Appl. Catal. A Gen.* 221, 3–13.
- [35] Centi, G.; Perathoner, S. (2003). 'Catalysis and sustainable (green) chemistry'. *Catal. Today* 77, 287–297.
- [36] Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. (2001). 'Industrial biocatalysis today and tomorrow'. *Nature* 409, 258–268.
- [37] Yazbeck, D. R.; Martinez, C. A.; Hu, S.; Tao, J. (2004). 'Challenges in the development of an efficient enzymatic process in the pharmaceutical industry'. *Tetrahedron Asymmetry* 15, 2757–2763.
- [38] Kataoka, M.; Kita, K.; Wada, M.; Yasohara, Y.; Hasegawa, J.; Shimizu, S. (2003). 'Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols'. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 437–445.
- [39] Chartrain, M.; Greasham, R.; Moore, J.; Reider, P.; Robinson, D.; Buckland, B. (2001). 'Asymmetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceuticals'. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* 11, 503–512.
- [40] Utsukihara, T.; Misumi, O.; Kato, N.; Kuroiwa, T.; Horiuchi, C. A. (2006). 'Reduction of various ketones by red algae'. *Tetrahedron Asymmetry* 17, 1179–1185.
- [41] Nakamura, K.; Yamanaka, R.; Harada, T.; Matsuda, T.; Harada, T. (2003). 'Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts'. *Tetrahedron: Asymmetry* 14, 2659–2681.

- [42] Yang, Z. H.; Zeng, R.; Yang, G.; Wang, Y.; Li, L. Z.; Lv, Z. S.; Yao, M.; Lai, B. (2008). 'Asymmetric reduction of prochiral ketones to chiral alcohols catalyzed by plants tissue'. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1047–1051.
- [43] Vandenberghe, A.; Markó, I. E.; Lucaccioni, F.; Lutts, S. (2013). 'Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables'. *Ind. Crops Prod.* 42, 380–385.
- [44] Xie, B.; Yang, J.; Yang, Q.; Yuan, W. (2009). 'Enantioselective reduction of fluorenones in surfactant-aqueous solution by fruits and vegetables'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 61, 284–288.
- [45] Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. (2018). 'Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry'. *Chem. Rev.* 118, 801–838.
- [46] Pellis, A.; Cantone, S.; Ebert, C.; Gardossi, L. (2018). 'Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities'. *N. Biotechnol.* 40, 154–169.
- [47] Wohlgemuth, R. (2010). 'Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry'. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 713–724.
- [48] Rosenthal, K.; Lütz, S. (2018). 'Recent developments and challenges of biocatalytic processes in the pharmaceutical industry'. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 11, 58–64.
- [49] Huisman, G. W.; Liang, J.; Krebber, A. (2010). 'Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases'. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14, 122–129.
- [50] Turner, N. J.; Kumar, R. (2018). 'Editorial overview: Biocatalysis and biotransformation: The golden age of biocatalysis'. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 43, A1–A3.

PARTE II: BÚSQUEDA DE ESPECIES VEGETALES COMO POSIBLES BIOCATALIZADORES

CAPÍTULO 4: Identificación y alcance de raíces vegetales como posibles biocatalizadores

4.1 Introducción

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, los compuestos enantioméricamente puros son potenciales bloques de construcción para la síntesis de moléculas bioactivas. Ya ha sido destacado también que la producción de Feniletanos (FEs) quirales es un paso determinante en la obtención de intermediarios claves para la producción de fármacos y de otras moléculas de importancia comercial. Algunos ejemplos de medicamentos que involucran en su estructura al 1-Feniletanol (1-FE quiral) y sus derivados (Figura 4.1) son: *solabegron* (tratamiento del intestino irritable y disfunción de la vejiga)¹⁻³, *clorprenalina* (broncodilatador)⁴, *tembamida* (actividad antiviral contra el HIV)⁵, *aegolina* (actividad antihiperoglucemiante)⁶, *rivastigmina* (tratamiento del Alzheimer)⁷⁻¹⁰, *sotalol* (antiarrítmico)¹¹, *montelukast* (antiasmático y antialérgico)¹²⁻¹⁴ y *NPS-R-568* (anti hormona paratiroidea)^{15,16}, además de otras estructuras químicas que se encuentran actualmente en proceso de estudio y desarrollo¹⁷.

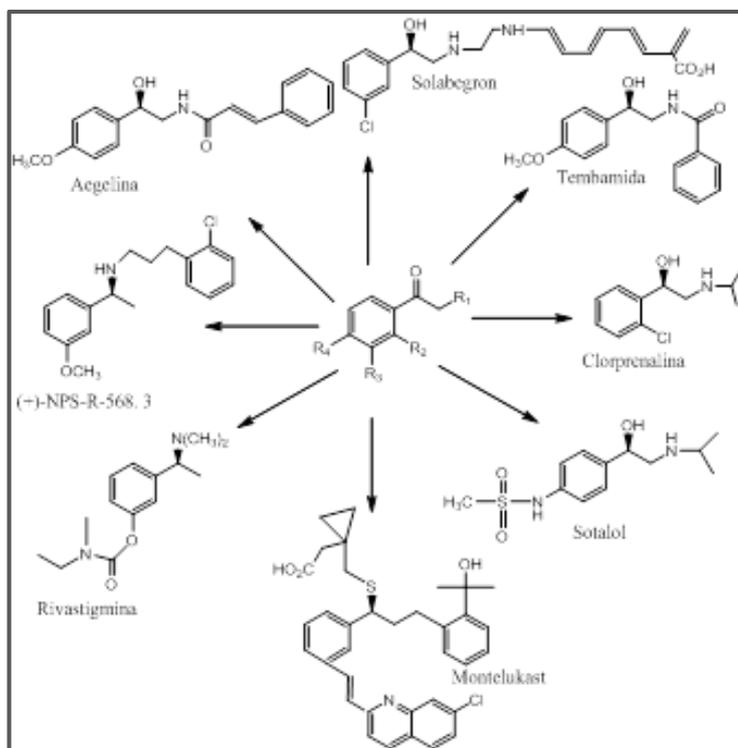


Figura 4.1: Fármacos y moléculas bioactivas conteniendo una estructura derivada de 1-FEs.

Es de remarcar que no debe resultar sorprendente la actividad biológica presentada por los derivados de 1-FE ya que todos ellos se encuentran estructuralmente relacionados a la *adrenalina* y a la *noradrenalina* (Figura 4.2), dos sustancias endógenas de nuestro organismo que cumplen variadas funciones hormonales y de neurotransmisor¹⁸.

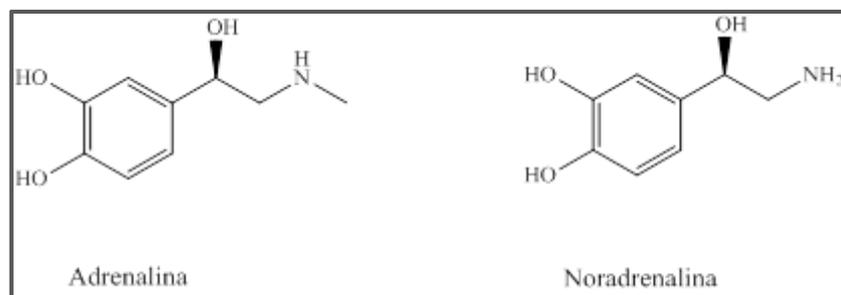


Figura 4.2: Derivados de 1-FEs naturales: catecolaminas.

Para la obtención de estos intermediarios, se ha reportado ampliamente la utilización de microorganismos (hongos¹⁹ y bacterias²⁰) como biocatalizadores. No obstante, la utilización de este tipo de biosistemas se encuentra menos extendida que el empleo de los tradicionales catalizadores químicos. A pesar de esto, hoy en día existe un gran interés en encontrar y desarrollar nuevos procedimientos que empleen la biocatálisis como metodología productiva y esto se debe en parte, al amplio potencial biotecnológico demostrado por este tipo de sistemas²¹⁻²⁵.

En la sección 3.1.2 se ha discutido las características sobresalientes de los biocatalizadores, y debido a la combinación de estos factores, las reacciones químicas biocatalizadas son observadas en la actualidad como una posibilidad muy atractiva para la obtención de diversas sustancias claves²⁶.

Dentro de los sistemas que utilizan procedimientos biocatalíticos, recientemente ha surgido una metodología novedosa, denominada *botanoquímica*, la cual emplea trozos sin procesamiento previo de diversos vegetales como biocatalizadores. Esta nueva metodología de trabajo ofrece ventajas en términos de biodisponibilidad y tiempo ya que, en general, no son necesarios los pasos determinantes de preparación, multiplicación, extracción y aislamiento del biocatalizador los cuales caracterizan al empleo de los microorganismos^{20,27,28}. Más aún, el empleo de células vegetales intactas asegura la preservación máxima de las actividades enzimáticas involucradas como responsables de una transformación específica²⁹.

En años recientes, la posibilidad de llevar a cabo reducciones estereoselectivas utilizando partes de vegetales frescos ha hecho que muchos investigadores observen

con detenimiento a esta metodología de biocatálisis, ya que las enzimas oxidoreductasas-alcohol deshidrogenasas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Más aún, el empleo de trozos enteros de material vegetal crudo posee una ventaja adicional: no es necesario el agregado de costosas coenzimas ya que ellos se encuentran naturalmente dentro de la célula. Debido a esta clara ventaja con respecto a las transformaciones llevadas a cabo utilizando enzimas aisladas, en las últimas años se han reportado progresos importantes^{30,31} en transformaciones realizadas sobre sustratos xenobióticos³²⁻³⁸.

Es sencillo aseverar entonces, que los vegetales contienen una gran variedad de sistemas enzimáticos que podrían ser potencialmente utilizados con el objetivo de realizar transformaciones químicas importantes. No obstante, al ser una disciplina nueva dentro de la biocatálisis, su utilización como '**reactores biológicos**' ha sido poco estudiada a pesar de la enorme diversidad del reino vegetal.

Adicionalmente, esta metodología se presenta como una forma interesante de promover la utilización de subproductos de la agricultura, tales como restos de vegetales que no pueden ser utilizados para el consumo humano^{39,40}, o para el empleo de aquellas especies vegetales que no tienen ninguna otra utilidad práctica reportada y son simplemente consideradas malezas⁴¹.

Por esta razón, este trabajo se ha centrado fundamentalmente en el estudio de vegetales que carecen de utilidad industrial o alimentaria, ya sea porque son consideradas malezas o porque ecológicamente afectan a la biodiversidad como es el caso de las plantas exóticas que desarrollan procesos invasivos desplazando a nuestra flora nativa.

En este sentido, cabe resaltar que la provincia de Córdoba ofrece condiciones ambientales que muestran una gran variabilidad climática y de suelos, lo que se ve reflejado en la amplia diversidad de su flora. Algunos autores se han ocupado del estudio taxonómico de la vegetación de Córdoba y recientemente, un importante trabajo ha sido publicado sobre las plantas que crecen en nuestra provincia⁴². A pesar de ello, la flora local y los especímenes foráneos, no han sido mayormente estudiados desde el punto de vista fitoquímico, farmacológico y mucho menos aun valorando la posibilidad de ser empleadas como fuente potencial de enzimas capaces de promover procedimientos biocatalíticos. Por este motivo, todos los especímenes son potencialmente candidatos a ser estudiados para evaluar su posible utilización como fuente de enzimas capaces de provocar reacciones de reducción de compuestos carbonílicos.

4.1.1 Botanoquímica: condiciones de reacción

La combinación de la biocatálisis vegetal con la química sintética ofrece una ruta atractiva para la obtención de productos naturales complejos y compuestos relacionados de importancia industrial. Las células vegetales a menudo proporcionan sistemas enzimáticos únicos, que pueden emplearse eficazmente como biocatalizadores en la transformación de distintos sustratos exógenos a los productos finales deseados. Tales conversiones suelen ser superiores a las obtenidas utilizando reactivos químicos clásicos, dado que, por lo general, la ruta sintética es más eficiente. Alternativamente, cabe mencionar que el uso de enzimas aisladas a partir del cultivo de células vegetales para llevar a cabo la dilucidación de las vías biosintéticas, puede proporcionar información importante para su utilización en un diseño sintético específico⁴³.

En comparación con la catálisis química clásica o enzimática, la amplia disponibilidad y el bajo costo económico de los biocatalizadores vegetales, la practicidad del proceso, así como el aspecto ecológico de la técnica, hacen de la 'botanoquímica' un método sintético atractivo para el químico orgánico.

Como se verá en las secciones siguientes, existen algunos reportes de trabajos realizados con diferentes partes de la planta, no siendo necesario utilizar todo el material vegetal sino la zona donde se encuentra el sistema enzimático de interés. Las plantas generalmente se adquieren en un mercado local o se recolectan en un ambiente específico donde ellas normalmente se desarrollan; se lavan cuidadosamente, si es necesario se pelan y se cortan en trozos. Las piezas resultantes se suspenden en agua o buffer si fuera necesario controlar el pH. A continuación, se añade el sustrato a la mezcla de reacción, ya sea puro o diluido en algún cosolvente para favorecer su solubilidad en el medio. Finalmente, se mantiene bajo agitación el tiempo de reacción necesario y el progreso se controla generalmente mediante análisis por CG o HPLC. Una vez terminada la biotransformación, la suspensión se filtra para separar el material vegetal y la solución acuosa es extraída con un disolvente orgánico. La purificación final del residuo bruto se consigue generalmente por cromatografía en columna²⁹.

Resulta evidente que la principal ventaja de este enfoque sintético, es la amigabilidad ambiental de las reacciones y la practicidad para el operador, además de un prometedor potencial económico debido a la revalorización que podrían experimentar aquellas especies de vegetales que carecen de utilidad práctica.

4.1.2 Ventajas y desventajas de la Botanoquímica

Debido a la simplicidad del protocolo experimental, la *botanoquímica* es una alternativa atractiva con respecto a la biocatálisis clásica, la cual requiere enzimas purificadas más el agregado de costosas coenzimas, cultivos de células o microorganismos. A continuación, se enumeran las principales ventajas de la botanoquímica:

- ✓ Accesibilidad y asequibilidad del biocatalizador
- ✓ Simplicidad y seguridad experimental
- ✓ Sustentabilidad ambiental

Sin embargo, también se debe considerar algunos posibles inconvenientes específicos asociados con esta metodología, sobre los cuales se continúa trabajando para superarlos y es primordial tenerlos presentes durante el procedimiento para evitar resultados no deseados:

- ✓ La cantidad de biomasa: Típicamente, 40 g de plantas se usan para transformar aproximadamente 100 mg de sustrato. Esta relación se puede reducir probablemente mediante la optimización de las condiciones de reacción. Alternativamente, se podría prever el uso de biomaterial liofilizado.
- ✓ La reproducibilidad de los resultados: Las variaciones en los resultados obtenidos pueden deberse a varios factores, como selección de una variedad vegetal errónea, cambio local y estacional, entre otras variables; por lo tanto, es fundamental realizar una correcta identificación taxonómica del material vegetal, con un profesional capacitado, así como la descripción adecuada del biomaterial en la literatura compartida entre la comunidad científica.
- ✓ La 'aceptación científica' de la técnica: en primera instancia, la *botanoquímica* generalmente no es preferida por los químicos orgánicos y tiende a ser descartada como metodología para llevar a cabo un proceso sintético. No obstante, el creciente número de publicaciones científicas utilizando vegetales para llevar a cabo biotransformaciones, así como la amplia gama de aplicaciones en síntesis de productos de interés industrial, están gradualmente cambiando esta percepción.

4.1.3 Bioreducciones utilizando raíces vegetales

En un contexto de búsqueda de nuevas metodologías ambientalmente amigables, algunos reportes han descripto la posibilidad de utilizar raíces de plantas frescas como bioreductores. Reconociendo las dificultades inherentes asociadas al uso de microorganismos, Baldassarre y colaboradores (2000) fueron los primeros en informar la utilización de *Daucus carota* (zanahoria)³⁷ para la bioreducción estereoselectiva de cetonas proquirales exógenas. Trabajos posteriores continuaron reportando y ampliando el potencial biocatalítico de la zanahoria^{32,35,44}. Con el correr del tiempo, han surgido nuevos reportes que describen ensayos utilizando tejidos de plantas silvestres endémicas de América del Sur⁴⁵, además de agua de coco⁴⁶, hojas de pasionaria⁴⁷, diversas parte de vegetales comestibles^{31,48-52}; raíces de mandioca⁵³, ginseng⁵⁴ y canola⁵⁵, y otras raíces de especies que crecen en la provincia de Córdoba⁴¹.

Objetivos del presente Capítulo: Identificar raíces vegetales capaces de reducir de manera eficiente y estereoselectiva a la Acetofenona (AF), y con potencial para reducir otras fenilcetonas proquirales.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 General

Acetofenona (AF), acetofenonas sustituidas, 2-acetiltiofeno, 2-acetilpiridina y borohidruro de sodio (NaBH_4) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich S.A. (Argentina). En todas las experiencias se utilizó agua desionizada esteril obtenida de un equipo Milli Q. Previo a su utilización, los solventes (hexano y acetato de etilo) fueron purificados por destilación simple. Las extracciones del crudo de reacción fueron realizadas con acetato de etilo. Posteriormente la fase orgánica fue evaporada y los productos fueron purificados por cromatografía en columna sobre sílica gel, utilizando como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo (90:10). El producto obtenido fue analizado mediante el empleo de un cromatógrafo en fase gaseosa (CG) Buck Scientific modelo 910/310 o un CG Shimadzu modelo GC14A, ambos con detector de ionización de llama (FID). La caracterización fue realizada utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP 5890 Series II GC

equipado con un detector de masa HP 5970, un equipo de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C Bruker Avance II 400 MHz y mediante la medición del ángulo de rotación óptica específica utilizando un polarímetro JASCO O-100.

4.2.2 Análisis CG-FID y CG-EM

Para establecer las condiciones cromatográficas, el sustrato fue previamente reducido con borohidruro de sodio (NaBH_4) en etanol para obtener la mezcla racémica de los correspondientes alcoholes (enantiómeros *R* y *S*). Los análisis cromatográficos fueron llevadas a cabo utilizando una columna capilar quiral de sílice fundida Supelco β -Dex120 (polisiloxano de fenilo con 20% de β -ciclodextrina permetilada; 30 m; 0,25 mm; 0,25 μm) o Restek rt- β -DEXsa (2,3-di-acetoxi-6-*O*-*tert*-butil dimetilsilil β -ciclodextrina añadida en 14% de cianopropilfenilo/86% dimetil polisiloxano; 30 m; 0,25 mm; 0,25 μm) bajo las siguientes condiciones generales de operación: Split, 145 mL/min; inyector, 220 °C; detector FID, 220 °C; gas carrier, N_2 ; presión de cabeza, 29 psi. Los porcentajes de conversión de las reacciones fueron determinados utilizando el área de los picos normalizados sin factor de corrección⁵⁶. Si bien podría cometerse un error sistemático al no considerar la diferente respuesta de los compuestos en el detector, se ha asumido para estos análisis que el error es despreciable, al tratarse compuestos químicamente similares y con un factor de respuesta para FID comparables entre sí. Los análisis por cromatografía en fase gaseosa acoplado a espectrometría de masa (CG-EM) (70 eV) fueron realizados con las mismas condiciones que los análisis CG-FID, pero utilizando una columna capilar Hewlett Packard HP-5 (PhMe Siloxano 5%; espesor de la película 30 m; 0,32 mm; 0,25 μm).

4.2.3 Cálculo de conversiones de reacción, excesos enantioméricos y rendimientos aislados

Los porcentajes de conversión y sus correspondientes excesos enantioméricos (e.e.) fueron determinados usando las áreas normalizadas de los picos sin un factor de corrección⁵⁷.

Los porcentajes de conversión a un tiempo de reacción determinado fueron determinados utilizando la ecuación (Ec. 4.1):

$$\% \text{ conversión (t)} = \frac{A_{ol(R)} + A_{ol(S)}}{A_{ol(R)} + A_{ol(S)} + A_{AF t}} \times 100 \quad (\text{Ec. 4.1})$$

donde $A_{ol(R)}$ = área del alcohol producido, enantiómero R, $A_{ol(S)}$ = área del alcohol producido, enantiómero S y $A_{AF t}$ = área del sustrato de partida remanente a un tiempo de reacción t.

El cálculo del exceso enantiomérico fue realizado empleando la ecuación (Ec. 4.2):

$$\% e. e. = \frac{A_{ol(S)} - A_{ol(R)}}{A_{ol(R)} + A_{ol(S)}} \times 100 \quad (\text{Ec. 4.2})$$

Los porcentajes de rendimiento de producto aislado (% m/m), luego de realizar el proceso de purificación, fueron establecidos empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{moles producto aislado}}{\text{moles sustrato inicial}} \times 100 \quad (\text{Ec. 4.3})$$

Cabe aclarar que el porcentaje de conversión hace referencia a la relación porcentual entre la cantidad de producto formado y la cantidad de sustrato que queda sin transformarse en el crudo de reacción, siendo éste valor determinado por una técnica analítica (CG-FID). Por otra parte, el porcentaje de rendimiento se calcula de acuerdo a la cantidad de moles de producto recuperados luego de haber realizado los procesos de purificación en relación a la cantidad de moles de sustrato inicialmente utilizados. Por lo tanto, valor porcentual de rendimiento obtenido indica la masa final de producto recuperado del medio de reacción y este porcentaje hace referencia a la eficiencia global del proceso.

4.2.4 Biocatalizadores vegetales

Raíces de *Nothoscordum gracile*, *Alternanthera pungens*, *Pastinaca sativa*, *Conium maculatum*, *Cyclosporum leptophyllum*, *Eryngium horridum*, *Mandevilla petraea*, *Berberis ruscifolia*, *Puya spathacea*, *Canna indica*, *Maytenus vitis-idaea*, *Euphorbia portulacoides*, *Iris pseudacorus*, *Mirabilis jalapa*, *Cyclopogon elatus*, *Sacoila lanceolata*, *Oxalis articulata*, *Limonium brasiliense*, *Talinum paniculatum* y *Talinum polygaloides* fueron recolectadas en diferentes lugares de la provincia de Córdoba (Argentina) e identificados por un botánico*. En la Figura 4.3 se muestran imágenes de cada especie vegetal. Para llevar a cabo los estudios, las raíces fueron previamente

* Agradecemos al Dr. Juan José Cantero – Universidad Nacional de Río Cuarto por su colaboración.

lavadas con agua de red para eliminar suciedad y tierra, y luego fueron desinfectadas por inmersión durante 15-20 min en solución de hipoclorito de sodio al 0,05%^{58,59}. Finalmente, las raíces fueron lavadas nuevamente con agua deionizada estéril. Para asegurar la integridad de los sistemas enzimáticos, todos los especímenes fueron utilizados en las experiencias inmediatamente después de su recolección.



Nothoscordum gracile



Alternanthera pungens



Pastinaca sativa



Conium maculatum



*Cyclosporum
leptophyllum*



Eryngium horridum



Mandevilla petraea



Berberis ruscifolia



Puya spathacea



Canna indica



Maytenus vitis-idaea



Euphorbia portulacoides

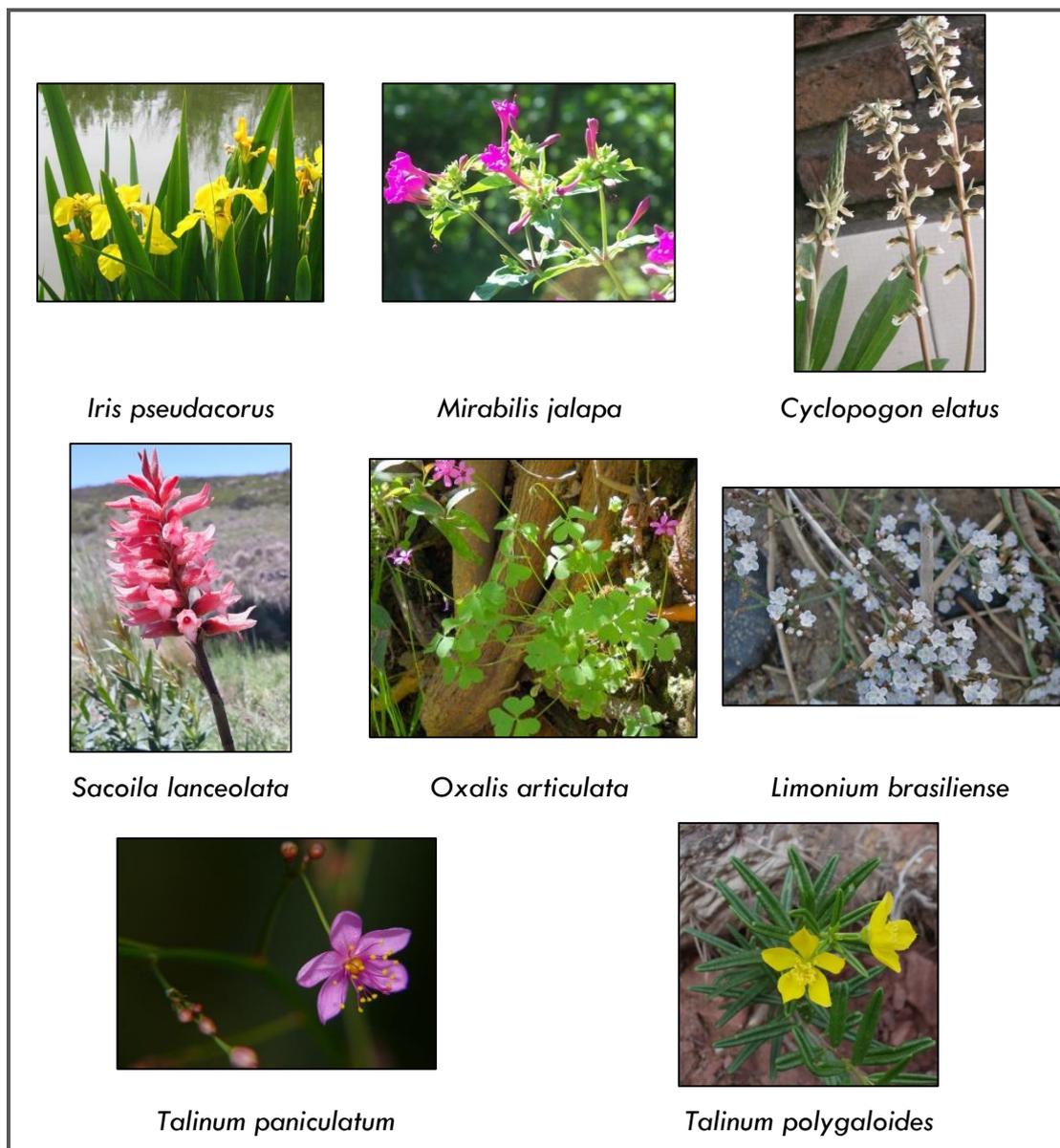


Figura 4.3: Vegetales utilizadas como biocatalizadores (raíces).

4.2.5 Bioreducción

La metodología utilizada para la realización de las experiencias fue una adaptación de las técnicas descritas por Yadav *et al.* 2002³² y Machado *et al.* (2006)⁵³. Las raíces fueron peladas y cortadas en trozo de aproximadamente 1 cm² utilizando un cuchillo desinfectado. La muestra del vegetal (20 g) se agregó a un erlenmeyer (250 mL) con solución de buffer fosfato (150 mL, pH: 6,5) y posteriormente se agregó el sustrato (100 mg) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO, 1% p/v en la solución de reacción final). La reacción fue llevada a cabo sobre un agitador orbital (120 rpm) a 20 °C, al reparo de la luz. Finalmente, el crudo de reacción fue filtrado a través de algodón para remover partículas en suspensión y

se le realizó una extracción con 40 mL de acetato de etilo a la solución obtenida, la cual fue agitada suavemente para evitar la formación de emulsiones. De manera similar, un ensayo control se llevó a cabo sin la adición de sustrato. Todos los extractos orgánicos obtenidos de la manera anterior fueron analizados por CG-FID con columna quiral y CG-EM.

Los tiempos de reacción establecidos para cada especie se determinaron en base a los resultados obtenidos experimentalmente durante el transcurso del bioproceso, analizando en tiempo real las muestras extraídas. Aquellos vegetales que no mostraron transformación del sustrato, se los mantuvo durante 10 días como tiempo máximo. Para las demás especies con actividad enzimática positiva, se ha buscado obtener la mayor conversión posible, deteniendo la reacción cuando se ha alcanzado una meseta en la evolución a producto.

4.2.6 Estudio cinético de la bio-reducción de la Acetofenona.

Con el objetivo de establecer el tiempo de reacción óptimo del biocatalizador que mejor performance alcanzó, se realizó un estudio cinético con el sustrato modelo. El progreso de la reacción fue monitoreado tomando muestras (5 mL) cada 24 h, las cuales fueron sometidas a extracción por agitación con acetato de etilo (2 mL). La fase orgánica fue separada y se le adicionó cloruro de calcio para eliminar el agua disuelta. Por último, las muestras fueron filtradas y analizadas (1 μ L) por CG utilizando las condiciones generales descritas en la sección 4.2.2. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado y se informan los promedios de los valores de conversión obtenidos en cada caso, con su desviación estándar correspondiente.

4.2.7 Datos Cromatográficos y Espectroscópicos

Los productos fueron identificados comparando sus tiempos de retención obtenidos mediante análisis por (CG-FID) con muestras testigos y por comparación de sus espectros de EM, RMN ^1H y ^{13}C con datos bibliográficos⁶⁰⁻⁶⁴.

(-)-(S)-1-Feniletanol: condiciones CG: $T_1=80$ °C (1 min), $\Delta T=2,5$ °C/min, $T_2=140$ °C. CG Rt acetofenona: 15,15 min, Rt (+)-(R)-1-feniletanol: 20,88 min, y Rt (-)-(S)-1-feniletanol: 21,58 min. $[\alpha]^{23}_D = -44,7$; $c = 0,51$ MeOH ($[\alpha]^{25}_D = -39,1$; $c = 3,5$ MeOH)³². ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm)=1,49 (d, 3H, CH_3); 2,03 (s, 1H, OH); 4,89 (q, 1H, CH); 7,25–7,39 (m, 5H, ArH). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm)= 25,16; 70,44; 125,39; 127,50; 128,52; 145,81. Espectrometría de masa por

ionización electrónica (EM IE) m/z (rel. int. %)=123 ($M^+ +1$; 4); 122(M^+ , 29); 121 ($M^+ -1$; 6); 107 (74); 105 (13); 79 (100); 78 (26); 77 (68); 57 (19); 51 (30).

(-)-(S)-1-(2'-Clorofenil)etanol: condiciones CG: $T_1=110$ °C, $\Delta T=3$ °C/min, $T_2=210$ °C. CG Rt 2'-cloroacetofenona: 10,88 min; Rt (+)-(R)-1-(2'-clorofenil)etanol: 17,04 min; y Rt (-)-(S)-1-(2'-clorofenil)etanol: 18,30 min. $[\alpha]^{23}_D = -60,3$; $c=0,5$ MeOH ($[\alpha]^{25}_D = -62,7$; $c=0,894$ $CHCl_3$)⁶⁵. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=1,50 (d, 3H, CH_3); 1,92 (s, 1H, OH); 5,30 (c, 1H, CH); 7,18–7,24 (m, 1H, ArH); 7,28–7,34 (m, 2H, ArH); 7,59 – 7,61 (m, 1H, ArH). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=23,52; 67,00; 126,41; 127,22; 128,42; 129,42; 131,67; 143,04. EM IE m/z (rel. int. %)=158 ($M^+ +2$; 5); 156(M^+ , 15); 143 (24); 141 (82); 113 (26); 77 (100); 51 (28).

(-)-(S)-1-(3'-Clorofenil)etanol: condiciones CG: $T_1=110$ °C (1 min), $\Delta T=3$ °C/min, $T_2=210$ °C. CG Rt 3'-cloroacetofenona: 12,94 min; Rt (+)-(R)-1-(3'-clorofenil) etanol: 19,60 min; y Rt (-)-(S)-1-(3'-clorofenil)etanol: 20,14 min. $[\alpha]^{23}_D = -41,1$; $c=0,48$ MeOH ($[\alpha]^{25}_D = -43,5$; $c=1,08$, $CHCl_3$)⁶⁵. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=1,48 (d, 3H, CH_3); 1,89 (d, 1H, OH); 4,85 – 4,90 (m, 1H, CH); 7,22–7,30 (m, 3 H); 7,36–7,39 (m, 1 H). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=25,25; 69,83; 123,54; 125,64; 127,55; 129,80; 134,39; 147,86. EM IE m/z (rel. int. %)=158 ($M^+ +2$; 5), 156 (M^+ , 16); 143 (16); 141 (54); 121 (11); 115 (11); 113 (38); 77 (100); 75(17); 51 (23).

(-)-(S)-1-(4'-Clorofenil)etanol: condiciones CG: $T_1=110$ °C, $\Delta T=3$ °C/min, $T_2=210$ °C (20 min). CG Rt 4'-cloroacetofenona: 13,26 min; Rt (+)-(R)-1-(4'-clorofenil)etanol: 18,09 min y Rt (-)-(S)-1-(4'-clorofenil)etanol: 18,65 min. $[\alpha]^{23}_D = -45,9$; $c=0,38$ MeOH ($[\alpha]^{25}_D = -49,0$; $c=1,84$; Eter)⁽³⁾. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=1,47 (d, 3H, CH_3); 1,83 (s, 1H, OH); 4,87 (q, 1H, CH); 7,26–7,31 (m, 4H, ArH). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=25,29; 69,77; 126,80; 128,62; 133,09; 144,25. EM IE m/z (rel. int. %)=158 ($M^+ +2$; 4), 156 (M^+ , 16); 143 (20); 141 (70); 121 (9); 113 (28); 77 (100); 75 (19); 51 (24).

(+)-(S)-1-(2'-Nitrofenil)etanol: condiciones CG: $T_1=100$ °C, $\Delta T=2$ °C/min, $T_2=210$ °C (20 min). CG Rt 2'-nitroacetofenona: 31,15 min; Rt (-)-(R)-1-(2'-nitrofenil)etanol: 40,48 min y Rt (-)-(S)-1-(2'-nitrofenil)etanol: 42,23 min. $[\alpha]^{23}_D = +18,0$; $c=0,022$ MeOH ($[\alpha]^{25}_D = +30,6$; $c=3,06$ $CHCl_3$)⁶⁶. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=1,56 (d, 3H, CH_3); 2,41 (b, 1H, OH); 5,40 (c, CH); 7,40 (dt, 1H, ArH); 7,63 (dt, 1H, ArH); 7,82 (dd, 1H, ArH); 7,88 (dd, 1H, ArH). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=24,20; 65,59; 124,30; 127,58; 128,11; 133,59; 140,90; 147,89. EM IE m/z (rel. int. %) =165 ($M^+ -2$; 1); 150 (100); 123 (12); 104 (7); 91 (11); 77 (14); 76 (35); 74 (14); 63 (11); 51 (50).

(-)-(S)-1-(3'-Nitrofenil)etanol: condiciones CG: $T_1=100$ °C, $\Delta T=2$ °C/min, $T_2=210$ °C (20 min). CG Rt 3'-nitroacetofenona: 34,18 min; Rt (+)-(R)-1-(3'-nitrofenil)etanol: 45,97 min y Rt (-)-(S)-1-(3'-nitrofenil)etanol: 46,35 min. $[\alpha]^{23}_D = -27,9$; $c=0,44$ MeOH ($[\alpha]^{25}_D = -30,5$; $c=2,99$ $CHCl_3$)⁶⁶. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=1,54 (d, 3H, CH_3); 2,17 (b, 1H, OH); 5,02 (c, 1H, CH); 7,50–7,54 (t, 1H, ArH); 7,71–7,73 (d, 1H, ArH); 8,11 – 8,14 (dm, 1H, ArH); 8,27 (t, 1H, ArH). ^{13}C RMN (100 MHz,

CDCl₃) δ (ppm)=25,49; 69,39; 120,45; 122,37; 129,44; 131,57; 147,91; 148,42. EM IE *m/z* (rel. int. %)=167 (M⁺, 1); 166 (M⁺-1; 1); 152 (100); 121 (12); 107 (60); 106 (20); 105 (38); 78 (38); 77 (82); 76 (19); 51 (32).

(-)-(S)-1-(4'-Nitrofenil)etanol: condiciones CG: T₁=100 °C, ΔT=2 °C/min, T₂=210 °C (20 min). CG Rt 4'-nitroacetofenona: 37,18 min; Rt (+)-(R)-1-(4'-nitrofenil)etanol: 48,66 min y Rt (-)-(S)-1-(4'-nitrofenil)etanol: 49,96 min. [α]²³_D= -30,0; c=0,55 MeOH ([α]²⁵_D= -30,5; c=4 CHCl₃)³². ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=1,52 (d, 3H, CH₃); 2,05 (b, 1H, OH); 5,02 (c, 1H, CH); 7,53–7,56 (d, 2H, ArH); 8,20–8,22 (d, 2H, ArH). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm)= 25,53; 50,88; 123,78; 126,12; 142,25; 153,04. EM IE *m/z* (rel. int. %)=167 (M⁺, 3); 166 (M⁺-1; 1); 152 (100); 122 (13); 107 (89); 106 (22); 105 (22); 94 (31); 78 (35); 77 (74); 66 (13); 51 (33).

(-)-(S)-1-(4'-Fluorfenil)etanol: condiciones CG: T₁=100 °C, ΔT=2 °C/min, T₂=200 °C. CG Rt 4'-fluoracetofenona: 9,52 min; Rt (+)-(R)-1-(4'-fluorfenil)etanol: 15,65 min y Rt (-)-(S)-1-(4'-fluorfenil)etanol: 16,54 min. [α]²³_D= -35,2; c=0,045 ([α]²⁵_D= -37,7; c=0,931; MeOH)⁶⁵. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=1,47 (d, 3H, CH₃); 2,39 (b, 1H, OH); 4,87 (c, 1H, CH); 7,00–7,05 (m, 2H, ArH); 7,31–7,35 (m, 2H, ArH). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=25,27; 69,79; 115,25 (d, J=21,2 Hz); 127,04 (d, J=8 Hz); 141,49 (d, J=3.1 Hz); 163,34 (d, J=243,8 Hz). EM IE *m/z* (rel. int. %)=140 (M⁺, 27); 125 (100); 123 (13); 97 (87); 96 (24); 95 (26); 77 (29); 75 (20); 51 (12).

(-)-(S)-1-(4'-Bromofenil)etanol: condiciones CG: T₁=100 °C, ΔT=2 °C/min, T₂=200 °C (20 min). CG Rt 4'-bromoacetofenona: 25,76 min; Rt (+)-(R)-1-(4'-bromofenil)etanol: 33,44 min y Rt (+)-(S)-1-(4'-bromofenil)etanol: 34,18 min. [α]²³_D= -35,1; c=0,46 MeOH ([α]²⁵_D= -37,9; c=1,13; CHCl₃)⁶⁵. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=1,47 (d, 3H, CH₃); 1,92 (b, 1H, OH); 4,86 (c, 1H, CH); 7,23–7,26 (m, 2H, ArH); 7,46–7,48 (m, 2H, ArH). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=25,27; 69,80; 121,18; 127,16; 131,57; 144,78. EM IE *m/z* (rel. int. %)=202 (M⁺+1; 27); 200 (25); 187 (81); 185 (86); 183 (9); 159 (25); 157 (31); 156 (9); 121 (23); 103 (12); 102 (8); 78 (55); 77 (100); 76 (20); 75 (21); 51 (42).

(-)-(S)-1-(4'-Trifluorometilfenil)etanol: condiciones CG: T₁=100 °C, ΔT=2 °C/min, T₂=200 °C. CG Rt 4'-trifluoroacetofenona: 8,87 min; Rt (+)-(R)-1-(4'-trifluorfenil)etanol: 16,93 min y Rt (-)-(S)-1-(4'-trifluorfenil)etanol: 18,13 min. [α]²³_D= -26,3; c=0,066 MeOH ([α]²⁵_D= -28,1; c=1,13; MeOH)⁶⁵. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=1,51 (d, 3H, CH₃); 1,92 (b, 1H, OH); 4,97 (c, 1H, CH); 7,48–7,51 (d, 2H, ArH); 7,60–7,62 (d, 2H, ArH). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=25,41; 69,83; 125,44; 125,47; 125,65; 149,71. EM IE *m/z* (rel. int. %)=190 (M⁺, 13); 175 (84); 171 (11); 145 (14); 127 (100); 95 (6); 77 (12); 69 (9); 51 (10).

(-)-(S)-1-(4'-Cianofenil)etanol: condiciones CG: T₁=100 °C, ΔT=2 °C/min, T₂=200 °C. CG Rt 4'-cianoacetofenona: 31,11 min; Rt (+)-(R)-1-(4'-cianofenil)etanol: 41,87 min y Rt (-)-(S)-1-(4'-cianofenil)etanol: 43,04 min. [α]²³_D= -40,0; c=0,44 MeOH (enantiómero R [α]²⁵_D= +41,7; c=1,063; MeOH)⁶⁷. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=1,50 (d, 3H, CH₃); 2,01 (b, 1H, OH); 4,97 (c, 1H, CH);

7,48–7,50 (d, 2H, ArH); 7,64–7,66 (dd, 2H, ArH). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm)=25,46; 69,70; 111,16; 118,86; 126,06; 132,37; 151,05. EM IE m/z (rel. int. %)=147 (M^+ , 7); 132 (64); 130 (10); 105 (12); 104 (100); 102 (22); 77 (21); 75 (13); 63 (6); 51 (12); 50 (10).

(-)-(S)-1-(4'-Metilfenil)etanol: condiciones CG: $T_1=100\text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta T=2\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, $T_2=200\text{ }^\circ\text{C}$. CG Rt 4'-metilacetofenona: 14,83 min; Rt (+)-(R)-1-(4'-metilfenil)etanol: 18,13 min y Rt (-)-(S)-1-(4'-metilfenil)etanol: 19,10 min. $[\alpha]^{23}_D = -40,4$; $c=0,049$ MeOH ($[\alpha]^{25}_D = -43,5$; $c=0,998$; MeOH)⁶⁵ (3). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm)=1,47 (d, 3H, CH_3); 1,89 (b, 1H, OH); 2,33 (s, 3H, CH_3); 4,86 (c, 1H, CH); 7,15 (d, 2H, ArH); 7,25 (d, 2H, ArH). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm)=21,10; 25,09; 70,27; 125,37; 129,18; 137,17; 142,89. EM IE m/z (rel. int. %)=136 (M^+ , 39); 121 (98); 119 (9); 117 (5); 93 (100); 92 (21); 91 (77); 77 (45); 65 (27); 51 (15).

(-)-(S)-1-(Tiofen-2-il)etanol: condiciones CG: $T_1=100\text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta T=1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, $T_2=200\text{ }^\circ\text{C}$. CG Rt 2-acetiltiofeno: 13,86 min; Rt (+)-(R)-1-(tiofen-2-il)etanol: 19,33 min y Rt (-)-(S)-1-(tiofen-2-il)etanol: 20,39 min. $[\alpha]^{23}_D = -22,3$; $c=0,051$ MeOH⁶⁸ ($[\alpha]^{24}_D = -26,0$; $c=1,02$; CHCl_3). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm)=1,61 (d, 3 H, CH_3); 1,99 (b, 1 H, OH); 5,14 (c, 1 H, CH); 6,95–6,99 (m, 2 H); 7,23–7,26 (dd, 1 H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm)=25,27; 66,30; 123,20; 124,46; 126,67; 149,87. EM IE m/z (rel. int. %)=128 (M^+ , 29); 113 (55); 111 (15); 95 (16); 85 (100); 84 (19); 69 (7); 58 (11); 57 (9); 51 (7).

(-)-(S)-1-(Piridin-2-il)etanol: condiciones CG: $T_1=40\text{ }^\circ\text{C}$ (15 min), $\Delta T=1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, $T_2=160\text{ }^\circ\text{C}$ (20 min). CG Rt 2-acetilpiridina: 37,19 min; Rt (+)-(R)-1-(piridin-2-il)etanol: 43,52 min y Rt (-)-(S)-1-(piridin-2-il)etanol: 43,94 min. $[\alpha]^{23}_D = -53,9$; $c=0,056$ MeOH ($[\alpha]^{25}_D = -58,3$; $c=0,51$ EtOH)⁶⁸. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm)=1,51–1,52 (d, 3H, CH_3); 3,64 (b, OH); 4,76 (b, 1H, OH); 4,91 (c, 1H, CH); 7,20–7,23 (m, 1H, ArH); 7,30–7,32 (m, 1H, ArH); 7,69–7,73 (m, 1H, ArH); 8,53–8,54 (d, 1H, ArH). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm)=24,16; 68,87; 119,96; 122,32; 137,08; 147,93; 163,04. EM IE m/z (rel. int. %)=123 (M^+ , 3); 122 (8); 119 (1); 108 (100); 106 (40); 80 (52); 79 (43); 78 (47); 53 (20); 52 (38); 51 (27).

(-)-(S)-1-(3'-hidroxifenil)etanol: condiciones CG: $T_1=100\text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta T=2\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, $T_2=200\text{ }^\circ\text{C}$ (determinada como ester monoacetato luego de derivatizar). CG Rt 3'-hidroxiacetofenona: 48,44 min; Rt (+)-(R)-1-(3'-hidroxifenil)etanol esterificado: 41,06 min y Rt (-)-(S)-1-(3'-hidroxifenil)etanol esterificado: 41,33 min $[\alpha]^{22}_D = -11$; $c=0,3$ MeOH ($[\alpha]^{20}_D = +32$; $c=1$ MeOH)⁶⁹. RMN ^1H NMR (400 MHz, DMSO- D_6) δ (ppm)=1,27 (d, 3H); 4,59–4,62 (q, 1H, CH); 5,04 (s, 1H, OH); 6,57–6,60 (m, 1H, ArH); 6,71–6,76 (m, 1H, ArH); 7,05–7,09 (s, 2H, ArH); 8,27 (s, 1H, ArOH); ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- D_6) δ (ppm)=25,40; 68,47; 112,64; 113,81; 116,40; 129,32; 149,47; 157,61. EM IE m/z (rel. int. %)=138 (M^+ , 35); 123 (40); 120 (20); 95 (100); 91 (15); 77 (50); 65 (20).

(-)-(R)-2-Cloro-1-(fenil)etanol: condiciones CG: $T_1=110\text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta T=1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, $T_2=145\text{ }^\circ\text{C}$ (1 min). CG Rt 2-cloroacetofenona: 26,76 min; Rt (-)-(R)-2-Cloro-1-(fenil)etanol: 32,22 min y Rt (+)-(S)-2-Cloro-1-(fenil)etanol: 33,47 min $[\alpha]^{22}_D = +25,6$; $c=0,1$ CHCl_3 ($[\alpha]^{25}_D = 54,06$; $c=1,0$ CHCl_3 ²⁷). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm)=2,36 (s, 1H, OH); 3,63–3,77 (m, 2H, CH_2); 4,89–4,92 (q, 1H, CH); 7,31–

7,40 (m, 5H, ArH). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm)=50,95; 74,09; 126,07; 128,49; 128,70; 139,90. EM IE m/z (rel. int. %) = 156 (M+, 3); 107 (100); 79 (63); 77 (40); 70 (12); 61 (14); 51 (15).

4.3 Resultados y Discusión

Esta tesis se inició con el objetivo de identificar procedimientos ambientalmente amigables para obtener intermediarios químicos, utilizando plantas como biocatalizadores, capaces de llevar a cabo reacciones de reducción estereoselectivas de grupos carbonilos. Con esta meta en mente, se inició un estudio de algunas especies vegetales que crecen en nuestra provincia y que potencialmente podrían ser utilizadas como biocatalizadores en la reducción de cetonas proquirales, a fin de obtener alcoholes quirales.

Como parte del proceso de evaluación para encontrar un biocatalizador eficiente y ambientalmente sustentable, se ensayaron 20 raíces de especies vegetales locales utilizando Acetofenona como sustrato modelo. Las especies vegetales ensayadas y los correspondientes resultados de este estudio se muestran en la Tabla 4.1. Adicionalmente, para asegurar que el material vegetal no contenía el alcohol aromático quiral o el correspondiente sustrato, se llevó a cabo un experimento control, trabajando con el material vegetal sin añadir sustrato. Los crudos de todas las reacciones fueron analizados por CG con columna quiral y CG-EM, obteniéndose ausencia de sustrato o sus correspondientes alcoholes, en todos los casos.

4.3.1 Biocatálisis utilizando raíces de plantas

Como se puede observar en la Tabla 4.1, diecisiete sobre un total de veinte especies estudiadas lograron reducir la AF a 1-FE, difiriendo en los porcentajes de conversión y en los excesos enantioméricos alcanzados.

De acuerdo a estos resultados, se puede observar que las especies pertenecientes a la familia Apiaceae lograron la mejor enantioselectividad (porcentajes de excesos enantioméricos comprendidos entre 91 y >99%). En este sentido, *P. sativa*, *C. maculatum*, *C. leptophyllum* y *E. horridum* (Tabla 4.1, entradas 3-6) mostraron excesos enantioméricos desde muy buenos a excelentes. Es de destacar que los mejores resultados se obtuvieron utilizando *P. sativa* y *E. horridum* (Tabla 4.1, entradas 3 y 6). Estos resultados son consistentes con el hecho de que la

zanahoria (*D. carota*, Apiaceae)³² es la planta modelo utilizada como biocatalizador para este tipo de reacciones, pero a diferencia de la zanahoria, cabe resaltar que los resultados aquí expuestos representan un nuevo y potencial uso no tradicional para *P. sativa* y *E. horridum*.

Adicionalmente es necesario remarcar también que recientemente se ha comunicado que la especie *P. sativa* (Apiaceae)⁵² fue muy eficiente para la resolución de mezclas racémicas de biciclo[3.3.1]nonano-2,6-diona mediante bioreducción estereoselectiva.

Tabla 4.1: Ensayos de reducción estereoselectiva de Acetofenona catalizada con raíces frescas de especies vegetales.

N°	Familia	Nombre científico	Nombre vulgar†	Parte vegetal	Tiempo (días)	Conv. (%) ^{a,b}	e.e. (%) ^{a,c}
1	Alliaceae	<i>Nothoscordum gracile</i> (Dryand. ex Aiton) Stearn var. <i>gracile</i>	----	Raíces	4	42	36 (S)
2	Amaranthaceae	<i>Alternanthera pungens</i> Kunth.	Yerba del pollo		4	21	79 (S)
3	Apiaceae	<i>Pastinaca sativa</i> L.	Chirivía		3	91	98 (S)
4	Apiaceae	<i>Conium maculatum</i> L.	Cicuta		4	43	>99,9 (S)
5	Apiaceae	<i>Cyclospermum leptophyllum</i> (Pers.) Sprague var. <i>leptophyllum</i>	---		6	32	91(S)
6	Apiaceae	<i>Eryngium horridum</i> Malme	Carda – serrucheta		3	96	>99,9 (S)
7	Apocynaceae	<i>Mandevilla petraea</i> (A. St-Hil.) Pichon	----		3	3	55 (S)
8	Berberidaceae	<i>Berberis ruscifolia</i> Lam.	Espina amarilla		5	24	90 (S)
9	Bromeliaceae	<i>Puya spathacea</i> (Griseb.) Mez.	Casto - chaguar		10	0	nd ^d
10	Cannaceae	<i>Canna indica</i> L.	Achira		4	7	65 (S)
11	Celastraceae	<i>Maytenus vitis-idaea</i> Griseb.	Carne gorda		4	4	74 (R)
12	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia portulacoides</i> L. var. <i>portulacoides</i>	Pichoa		5	20	65 (S)
13	Iridaceae	<i>Iris pseudacorus</i> L.	Lirio amarillo		7	100	83 (S)
14	Nyctaginaceae	<i>Mirabilis jalapa</i> L.	Dondiego de noche		4	82	61 (S)
15	Orchidaceae	<i>Cyclopogon elatus</i> (Sw.) Schltr.	Zarzaparrilla de hoja		4	4	54 (S)
16	Orchidaceae	<i>Sacoila lanceolata</i> (Aubl.) Garay	---		2	5	26 (S)
17	Oxalidaceae	<i>Oxalis articulata</i> Savigny ssp. <i>articulata</i>	Vinagrillo Rosado		4	4	67 (S)
18	Plumbaginaceae	<i>Limonium brasiliense</i> (Boiss.) Kuntze	Guaycurú		10	0	nd
19	Talinaceae	<i>Talinum paniculatum</i> (Jacq.) Gaertn.	Joyas de opar – rama de sapo		10	0	nd
20	Talinaceae	<i>Talinum polygaloides</i> Gillies ex Am.	---		6	22	16 (R)

^a Determinado por análisis quiral en CG
^b Porcentaje de reducción
^c Porcentaje de exceso enantiomérico y entre paréntesis configuración absoluta
^d nd: no detectado

† Fuente: <http://www.darwin.edu.ar/> - <https://sib.gob.ar/portada>

Por otra parte, *I. pseudacorus* (Tabla 4.1, entrada 13) logró un porcentaje de conversión completo con buen valor de exceso enantiomérico (83%), mientras que *M. jalapa* (Tabla 4.1, entrada 14) presentó una buena actividad reductiva pero con baja estereoselectividad. Similarmente, *A. punges* y *B. ruscifolia* mostraron una buena enantioselectividad pero con una baja capacidad reductiva (Tabla 4.1, entradas 2 y 8 respectivamente). De las veinte raíces ensayadas, sólo dos mostraron preferencia por la formación del enantiómero (R) (configuración anti-Prelog): *M. vitis-idaea* y *T. polygaloides* (Tabla 4.1, entradas 11 y 20). Es interesante destacar que mientras *T. paniculatum* no logró reducir la AF al correspondiente alcohol (Tabla 4.1, entrada 19), otra planta perteneciente al mismo género, *T. polygaloides*, proporcionó un 22% de conversión (Tabla 4.1, entrada 20). Por otro lado, *P. spathacea*, *L. brasiliense* y *T. paniculatum* no mostraron capacidad para reducir la AF (Tabla 4.1, entradas 9, 18 y 19). Respecto a las demás especies ensayadas, se observaron capacidades reductoras y excesos enantioméricos variables.

Debido a los resultados alcanzados durante el transcurso del presente estudio, se desprende que los mejores fueron aquellos obtenidos utilizando *E. horridum*, por lo tanto se consideró continuar los ensayos con esta especie vegetal. Con el objetivo de establecer el tiempo óptimo de reacción se llevó a cabo un estudio cinético utilizando raíces de *E. horridum* como biocatalizador y AF como sustrato y los resultados pueden observarse en la Figura 4.3.

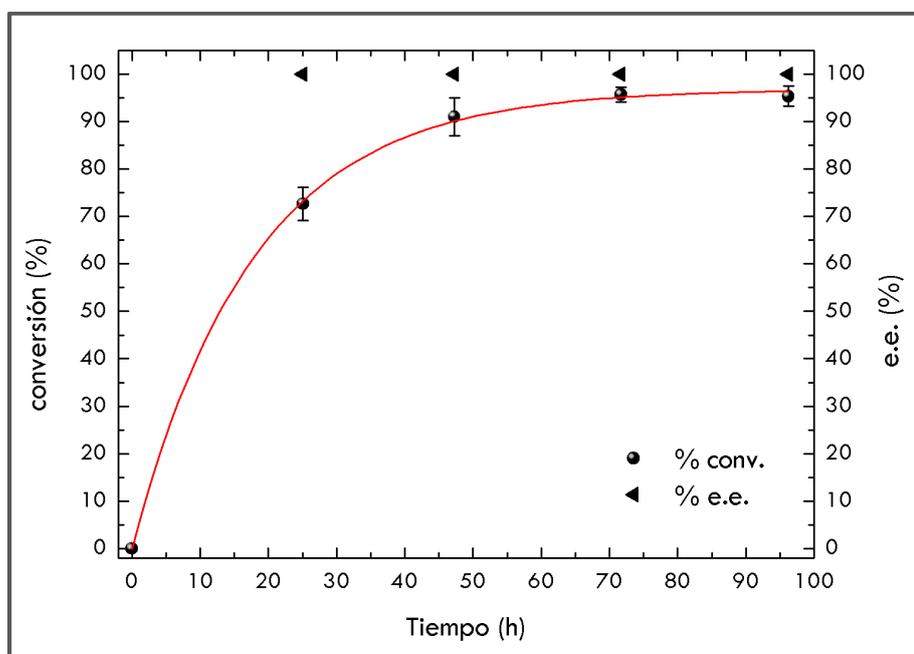


Figura 4.4: Cinética de reacción: biocatálisis de Acetofenona (0,67 g/L) con raíces de *E. horridum* (20 g/150 mL buffer). Condiciones de reacción: T=20 °C; pH=6,5; 1% p/v DMSO.

Como puede observarse en la Figura 4.4, es posible confirmar que la reacción alcanza su condición óptima luego de los 3 días de iniciada (96% de conversión) con una alta enantioselectividad (e.e.% > 99,9), lo cual revela la elevada eficiencia del complejo enzimático presente en las raíces de *E. horridum*.

Adicionalmente, también se realizó un estudio utilizando *E. horridum* previamente molidas y trituradas para tratar de aumentar la superficie específica del catalizador y así tratar de mejorar la performance de la reacción. No obstante, en esta oportunidad no se observó conversión alguna de la AF a 1-FE. El resultado obtenido en este ensayo sugiere que la integridad celular es necesaria y que la reacción ocurre dentro de las células de las raíces de la planta. Sin embargo, cabe aclarar que son necesarios más estudios que soporten esta afirmación.

4.3.2 Capacidad reductiva de *E. horridum* frente a acetofenonas sustituidas

Debido a la falta de una aplicación práctica, *E. horridum* es considerada una maleza problemática en los campos de pastoreo y en la actualidad se realizan enormes esfuerzos para erradicarla⁷⁰. Este vegetal se encuentra ampliamente distribuido en la Provincia de Córdoba, motivo por lo cual puede ser fácilmente localizado y recolectado.

Los prometedores resultados obtenidos en la reducción de la AF utilizando las raíces de *E. horridum* (Tabla 4.1) ha incentivado a realizar un estudio para tratar de determinar su capacidad para reducir otras acetofenonas sustituidas y así establecer su alcance y limitaciones como biocatalizador en reducciones estereoselectivas de cetonas proquirales. Los resultados se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Capacidad reductiva de raíces de *E. horridum* frente a distintas cetonas proquirales sustituidas

Enantiómero
R y/o *S*

N°	R ₁	R ₂	% conversión ^a	% e.e. ^{a,c}	% Rendimiento ^b
1	H-	Fenil-	96	>99,9 (<i>S</i>)	58
2	H-	2'-clorofenil-	100	>99,9 (<i>S</i>)	52
3	H-	3'-clorofenil-	90	99 (<i>S</i>)	50
4	H-	4'-clorofenil-	94	98 (<i>S</i>)	56
5	H-	2'-nitrofenil-	94	>99,9 (<i>S</i>)	22
6	H-	3'-nitrofenil-	95	>99,9 (<i>S</i>)	27
7	H-	4'-nitrofenil-	97	99 (<i>S</i>)	43
8	H-	4'-fluorofenil-	90	>99,9 (<i>S</i>)	40
9	H-	4'-trifluorometilfenil-	100	>99,9 (<i>S</i>)	41
10	H-	4'-bromofenil-	86	99 (<i>S</i>)	43
11	H-	4'-cianofenil-	99	99 (<i>S</i>)	58
12	H-	4'-metilfenil-	34	99 (<i>S</i>)	10
13	H-	2-tienil-	42	99 (<i>S</i>)	12
14	H-	2-piridil-	99	>99,9 (<i>S</i>)	48
15	H-	2'-hidroxifenil-	0	nd ^d	--- ^e
16	H-	3'-hidroxifenil-	0	nd ^d	--- ^e
17	H-	4'-hidroxifenil-	0	nd ^d	--- ^e
18	Cl-	Fenil-	67	86 (<i>R</i>)	9

^a Determinado por análisis en CG quiral luego de 3 días de reacción.
^b Rendimiento del producto aislado después de ser purificado por cromatografía en columna.
^c Porcentaje de exceso enantiomérico y entre paréntesis configuración absoluta
^d No detectado
^e No determinado

Como se puede observar en dicha tabla, las raíces de *E. horridum* demostraron ser un biocatalizador altamente estereoselectivo (e.e.% >98) para obtener diferentes 1-FE quirales. En este sentido es notable destacar que las conversiones fueron excelentes para la mayoría de los sustratos ensayados, con resultados cercanos a 100%, cuando se utilizó AF, 2'-cloroacetofenona, 4'-trifluorometilacetofenona, 4'-cianoacetofenona y 2-acetilpiridina (Tabla 4.2, entradas 1, 2, 9, 11 y 14, respectivamente). En contraste, 4'-metilacetofenona y 2-acetiltiofeno fueron reducidas a sus correspondientes alcoholes en cantidades de moderadas a bajas (Tabla 4.2, entradas 12 y 13), pero aún con una estereoselectividad igualmente alta (99% e.e.). Todos los demás sustratos ensayados pudieron ser reducidos de manera efectiva por el biocatalizador y sus productos presentaron una excelente pureza óptica.

Adicionalmente, en los resultados alcanzados se puede observar una posible influencia de la naturaleza donadora de electrones del sustituyente sobre la reducción del grupo carbonilo (Tabla 4.2, entradas 12 y 13). En efecto, cuando la reacción se llevó a cabo utilizando 4'-metilacetofenona y 2-acetiltiofeno se obtuvieron los alcoholes correspondientes en conversiones de bajas a moderadas (34% y 42%, respectivamente). Como contraparte, los grupos tomadores de electrones proporcionaron mayores porcentajes de conversión, observándose una transformación total a alcohol cuando se utilizaron como sustratos 4'-trifluorometiloacetofenona y 2'-cloroacetofenona (Tabla 4.2, entrada 2 y 9). Cabe destacar que un efecto similar ha sido reportado oportunamente para reacciones de reducción de acetofenonas sustituidas cuando se utilizó *D. carota*, *A. graveolens* y *L. culinaris* como biocatalizadores^{32,71,72}. Por otro lado, es interesante observar que para los casos en que la reducción fue viable, se respetó la regla de Prelog⁷³⁻⁷⁶.

Para el caso de 2'-, 3'- y 4'-nitroacetofenonas (Tabla 4.2, entradas 5, 6 y 7), se observó una excelente estereoselectividad en la bioreducción y más aún, la reacción resultó ser también quimioselectiva, sin que se observe la reducción del grupo nitro. En relación con esto, cabe destacar que utilizando plantas como biocatalizadores, existen reportes en la literatura de referencia que describen no solo la producción de alcoholes por reducción del grupo carbonilo, sino también la reducción del grupo nitro a amina, a partir de nitroacetofenonas⁷². Adicionalmente, es interesante remarcar la importancia de estos resultados, ya que la estructura (S)-1-(4'-nitrofenil)etanol forma parte del farmacóforo que se encuentra en medicamentos importantes como nifenalol y sotalol^{77,78}.

Adicionalmente, Ferreira *et al.* (2012, *L. culinaris*)⁷² y Liu *et al.* (2010, *A. graveolens*)⁷¹ han informado que factores estéricos pueden disminuir la conversión de la reacción por la presencia de un sustituyente en el anillo aromático, especialmente un sustituyente en la posición orto. En este caso particular, las influencias estéricas no se observaron al utilizar *E. horridum* como biocatalizador, por lo que los nitrofenilalcoholes correspondientes se obtuvieron en conversiones muy similares.

Por otra parte, cuando las reacciones se llevaron a cabo utilizando cloroacetofenonas se pudo observar una reactividad similar a la obtenida con AF y la conversión a sus correspondientes alcoholes estuvo ubicada en 90-100% (Tabla 4.1, entradas 2, 3, 4 y 17). No obstante, cabe mencionar que se observó una enantioselectividad algo menor para la 4'-cloroacetofenona (98% e.e.). Aquí se

debe señalar la importancia de estos resultados, ya que los clorofeniletanoles obtenidos forman la parte bioactiva en fármacos como la clorprenalina, solabegron y en otros medicamentos denominados agonistas del receptor β_3 -adrenérgico que se encuentran actualmente en desarrollo¹⁷.

Es muy importante señalar aquí, que los porcentajes de conversión y excesos enantioméricos informados utilizando *E. horridum* como biocatalizador fueron más altos que los oportunamente informados utilizando raíces de *D. carota*^{32,37,79,80}; *M. esculenta* y *M. dulcis*⁵³; homogenados de *F. vulgare*, *C. maxima*, *M. sapientum*, *C. pepo*⁸¹, *B. oleracea*, *B. oleracea*, *B. vulgaris* y *S. oleraceae*⁴⁸ ; cortezas de fruta de *P. edulis*⁸²; *Mespilus germanica* y *Citrus reticulata*^{74,83}. Además, es importante remarcar que todos los vegetales anteriormente nombrados son utilizados como alimentos. A diferencia de esto, *E. horridum* es una maleza altamente invasiva cuyas raíces no han reportado una utilidad práctica y, por este motivo, los resultados detallados aquí han identificado un uso potencial para este vegetal.

Por otro lado, cabe mencionar que los rendimientos obtenidos (de moderados a bajos) durante la purificación de los compuestos sintetizados se debieron al hecho de que durante los procedimientos de extracción se formaron emulsiones que fueron difíciles de tratar, lo que complicó significativamente el procedimiento de extracción. Finalmente, los desechos de las raíces de *E. horridum* que quedan después de la reacción pueden emplearse como abono e incluso se podría ensayar la viabilidad de reutilización del biocatalizador, minimizando así el desperdicio químico y el impacto ambiental producido por esta metodología de reducción de compuestos carbonílicos⁸⁴.

4.4 Conclusiones

A modo de conclusión parcial, los datos expuestos en el presente capítulo demuestran que gran parte de las raíces vegetales estudiadas y disponibles en la provincia de Córdoba poseen sistemas enzimáticos con la capacidad necesaria para reducir eficientemente a la AF y sus derivados a los correspondientes alcoholes quirales. Como resultado de este estudio preliminar, está claro que ha surgido una inesperada oportunidad para establecer nuevas aplicaciones para la flora de nuestra provincia, especialmente para aquellas especies que no tienen ninguna utilidad práctica reportada aún, son especies vegetales foráneas y altamente invasivas, o simplemente son consideradas malezas.

Adicionalmente, los resultados obtenidos utilizando raíces de *E. horridum* como biocatalizador para reducir acetofenonas sustituidas, de manera estereoselectiva, a sus correspondientes alcoholes quirales, ofrece una nueva estrategia eficiente para la reducción de fenilcetonas proquirales.

Más aún, la eficiente metodología de reducción estereoselectiva presentada aquí, podría potencialmente evitar el uso de agentes reductores metálicos costosos y no renovables además de eliminar la utilización de solventes orgánicos como medio de reacción, los cuales son las materias primas habitualmente utilizadas en los procesos químicos clásicos.

4.5 Bibliografía

- [1] Kelleher, D. L.; Hicks, K. J.; Williamson, R. R.; Alpers, D. H.; Dukes, G. E. (2008). 'Randomized, double-blind, placebo (PLA)-controlled, crossover study to evaluate efficacy and safety of the beta 3-adrenergic receptor agonist solabegron (SOL) in patients with irritable bowel syndrome (IBS).' *Neurogastroenterol. Motil.* 20, 131–132.
- [2] Hicks, A.; McCafferty, G. P.; Riedel, E.; Aiyar, N.; Pullen, M.; Evans, C.; Luce, T. D.; Coatney, R. W.; Rivera, G. C.; Westfall, T. D.; Hieble, J. P. (2007). 'GW427353 (solabegron), a novel, selective beta3-adrenergic receptor agonist, evokes bladder relaxation and increases micturition reflex threshold in the dog.' *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323, 202–209.
- [3] Grudell, A. B. M.; Camilleri, M.; Jensen, K. L.; Foxx-Orenstein, A. E.; Burton, D. D.; Ryks, M. D.; Baxter, K. L.; Cox, D. S.; Dukes, G. E.; Kelleher, D. L.; Zinsmeister, A. R. (2008). 'Dose-response effect of a 3-adrenergic receptor agonist, solabegron, on gastrointestinal transit, bowel function, and somatostatin levels in health'. *Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G1114–G1119.
- [4] Gomi, Y.; Shirahase, H.; Funato, H. (1979). 'Effects of 1-(2-chloro-4-hydroxyphenyl)-t-butyl-aminoethanol (HOKU-81), a new bronchodilator, on isolated trachea and atria of guinea pig'. *Japan J. Pharmacol.* 29, 515–524.
- [5] Cheng, M. J.; Lee, K. H.; Tsai, I. L.; Chen, I. S. (2005). 'Two new sesquiterpenoids and anti-HIV principles from the root bark of *Zanthoxylum ailanthoides*'. *Bioorganic Med. Chem.* 13, 5915–5920.
- [6] Narender, T.; Shweta, S.; Tiwari, P.; Papi Reddy, K.; Khaliq, T.; Prathipati, P.; Puri, A.; Srivastava, A. K.; Chander, R.; Agarwal, S. C.; Raj, K. (2007). 'Antihyperglycemic and antidyslipidemic agent from *Aegle marmelos*'. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 17, 1808–1811.
- [7] Camps, P.; Muñoz-Torrero, D. (2002). 'Cholinergic drugs in pharmacotherapy of Alzheimer's disease.' *Mini Rev. Med. Chem.* 2, 11–25.
- [8] Finkel, S. I. (2004). 'Effects of rivastigmine on behavioral and psychological symptoms of dementia in Alzheimer's disease'. *Clin. Ther.* 26, 980–990.
- [9] Emre, M.; Aarsland, D.; Albanese, A.; Byrne, E. J.; Deuschl, G.; De Deyn, P. P.; Durif, F.; Kulisevsky, J.; van Laar, T.; Lees, A.; Poewe, W.; Robillard, A.; Rosa, M. M.; Wolters, E.; Quarg, P.; Tekin, S.; Lane, R. (2004). 'Rivastigmine for dementia associated with Parkinson's disease'. *N. Engl. J. Med.* 351, 2509–2518.

- [10] Naik, R. S.; Hartmann, J.; Kiewert, C.; Duysen, E. G.; Lockridge, O.; Klein, J. (2009). 'Effects of rivastigmine and donepezil on brain acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice'. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 12, 79–85.
- [11] Anderson, J. L.; Prystowsky, E. N. (1999). 'Sotalol: An important new antiarrhythmic.' *Am. Heart J.* 137, 388–409.
- [12] Dufresne, C.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Ruel, R.; Trimble, L.; Labelle, M. (1996). 'Synthesis of Montelukast (MK-0476) metabolic oxidation products'. *J. Org. Chem.* 61, 8518–8525.
- [13] Labelle, M. et al. (1995). 'Discovery of MK-0476, a potent and orally active leukotriene D4 receptor antagonist devoid of peroxisomal enzyme induction'. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5, 283–288.
- [14] King, A. O.; Corley, E. G.; Anderson, R. K.; Larsen, R. D.; Verhoeven, T. R.; Reider, P. J.; Xiang, Y. B.; Belley, M.; Leblanc, Y.; Labelle, M.; Prasit, P.; Zamboni, R. J. (1993). 'An Efficient Synthesis of LTD4 Antagonist L-699,392'. *J. Org. Chem.* 58, 3731–3735.
- [15] Fox, J.; Lowe, S. H.; Petty, B. a; Nemeth, E. F. (1999). 'NPS R-568: a type II calcimimetic compound that acts on parathyroid cell calcium receptor of rats to reduce plasma levels of parathyroid hormone and calcium.' *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 473–479.
- [16] Wada, M.; Furuya, Y.; Sakiyama, J. I.; Kobayashi, N.; Miyata, S.; Ishii, H.; Nagano, N. (1997). 'The calcimimetic compound NPS R-568 suppresses parathyroid cell proliferation in rats with renal insufficiency: Control of parathyroid cell growth via a calcium receptor'. *J. Clin. Invest.* 100, 2977–2983.
- [17] Lu, C.; Luo, Z.; Huang, L.; Li, X. (2011). 'The Ru-catalyzed enantioselective preparation of chiral halohydrins and their application in the synthesis of (R)-clorprenaline and (S)-sotalol'. *Tetrahedron Asymmetry* 22, 722–727.
- [18] Gilman, A.; Goodman, L. (2006). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (McGrawHill).
- [19] Li, H.; Li, Z.; Ruan, G.; Yu, Y.; Liu, X. (2016). 'Asymmetric reduction of acetophenone into R-(+)-1-phenylethanol by endophytic fungus *Neofusicoccum parvum* BYEF07 isolated from *Illicium verum*'. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473, 874–878.
- [20] Kataoka, M.; Kita, K.; Wada, M.; Yasohara, Y.; Hasegawa, J.; Shimizu, S. (2003). 'Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols'. *Appl.*

- Microbiol. Biotechnol.* 62, 437–445.
- [21] Moore, J. C.; Pollard, D. J.; Kosjek, B.; Devine, P. N. (2007). 'Advances in the enzymatic reduction of ketones'. *Acc. Chem. Res.* 40, 1412–1419.
- [22] de Carvalho, C. C. C. R. (2017). 'Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry'. *Microb. Biotechnol.* 10, 250–263.
- [23] Bizerra, A. M. C.; Gonzalo, G. de; Lavandera, I.; Gotor-Fernández, V.; de Mattos, M. C.; de Oliveira, M. da C. F.; Lemos, T. L. G.; Gotor, V. (2010). 'Reduction processes biocatalyzed by *Vigna unguiculata*'. *Tetrahedron Asymmetry* 21, 566–570.
- [24] Goldberg, K.; Schroer, K.; Lütz, S.; Liese, A. (2007). 'Biocatalytic ketone reduction - A powerful tool for the production of chiral alcohols - Part II: Whole-cell reductions'. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 249–255.
- [25] Patel, R. N. (2016). 'Applications of biocatalysis for pharmaceuticals and chemicals'. in *Organic Synthesis Using Biocatalysis* 11, 339–411. (Elsevier Inc., 2016).
- [26] Anastas, P. T.; Lauren G. Heine; Tracy C. Williamson. (2000). *Green chemical syntheses and processes*. (American Chemical Society).
- [27] Aguirre-Pranzoni, C.; Bisogno, F. R.; Orden, A. A.; Kurina-Sanz, M. (2015). 'Lyophilized *Rhodotorula* yeast as all-in-one redox biocatalyst: Access to enantiopure building blocks by simple chemoenzymatic one-pot procedures.' *J. Mol. Catal. B Enzym.* 114, 19–24.
- [28] Ni, Y.; Zhang, B.; Sun, Z. (2012). 'Efficient Synthesis of (R)-2-Chloro-1-(3-chlorophenyl)ethanol by Permeabilized Whole Cells of *Candida ontarioensis*'. *Chinese J. Catal.* 33, 681–687.
- [29] Leroy, B. (2006). 'Botanochemistry: Whole plants for asymmetric catalysis'. 92, 84–90.
- [30] Chartrain, M.; Greasham, R.; Moore, J.; Reider, P.; Robinson, D.; Buckland, B. (2001). 'Asymmetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceuticals'. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* 11, 503–512.
- [31] Sokač, D. G.; Nujić, M.; Bušić, V.; Stanić, M. H.-. (2014). 'Biocatalytic reductions by plant tissue - Green alternative to alcohol production'. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 6, 51–60.
- [32] Yadav, J. S.; Nanda, S.; Thirupathi Reddy, P.; Bhaskar Rao, A. (2002). 'Efficient enantioselective reduction of ketones with *Daucus carota* root'. *J. Org. Chem.* 67, 3900–3903.

- [33] Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Sreelakshmi, C.; Narayana Kumar, G. G. K. S.; Rao, A. B. (2008). 'Enantioselective reduction of 2-substituted tetrahydropyran-4-ones using *Daucus carota* plant cells'. *Tetrahedron Lett.* 49, 2768–2771.
- [34] Caron, D.; Coughlan, A. P.; Simard, M.; Bernier, J.; Piché, Y.; Chênevert, R. (2005). 'Stereoselective reduction of ketones by *Daucus carota* hairy root cultures'. *Biotechnol. Lett.* 27, 713–716.
- [35] Yadav, J. S.; Reddy, G. S. K. K.; Sabitha, G.; Krishna, A. D.; Prasad, A. R.; Hafeez-U-R-Rahaman; Vishwaswar Rao, K.; Bhaskar Rao, A. (2007). '*Daucus carota* and baker's yeast mediated bio-reduction of prochiral ketones'. *Tetrahedron Asymmetry* 18, 717–723.
- [36] Omori, A. T.; Lobo, F. G.; Do Amaral, A. C. G.; De Souza De Oliveira, C. (2016). 'Purple carrots: Better biocatalysts for the enantioselective reduction of acetophenones than common orange carrots (*D. carota*)'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 127, 93–97.
- [37] Baldassarre, F.; Bertoni, G.; Chiappe, C.; Marioni, F. (2000). 'Preparative synthesis of chiral alcohols by enantioselective reduction with *Daucus carota* root as biocatalyst'. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* 11, 55–58.
- [38] Scarpi, D.; Occhiato, E. G.; Guarna, A. (2005). 'Selectivity of *Daucus carota* roots and baker's yeast in the enantioselective reduction of -nitroketones'. *Tetrahedron Asymmetry* 16, 1479–1483.
- [39] Sheldon, R. A. (2016). 'Green chemistry, catalysis and valorization of waste biomass'. *J. Mol. Catal. A Chem.* 422, 3–12.
- [40] Bersi, G.; Vallés, D.; Penna, F.; Cantera, A. M.; Barberis, S. (2019). 'Valorization of fruit by-products of *Bromelia antiacantha* Bertol.: Protease obtaining and its potential as additive for laundry detergents'. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 18, 101099.
- [41] Salvano, M. S.; Cantero, J. J.; Vázquez, A. M.; Formica, S. M.; Aimar, M. L. (2011). 'Searching for local biocatalysts: Bioreduction of aldehydes using plant roots of the Province of Córdoba (Argentina)'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 71, 16–21.
- [42] Barboza, G. E.; Cantero, J. J.; Nuñez, C.; Ariza Espinar, L. (2006). *Flora medicinal de la provincia de Córdoba (Argentina). Pteridófitas y Antófitas silvestres o naturalizadas.* (2006).
- [43] Kutney, J. P. (1996). 'Plant cell culture combined with chemistry - a powerful

- route to complex natural products'. *Pure Appl. Chem.* 68, 2073–2080.
- [44] Panić, M.; Elenkov, M. M.; Roje, M.; Bubalo, M. C.; Redovniković, I. R. (2018). 'Plant-mediated stereoselective biotransformations in natural deep eutectic solvents'. *Process Biochem.* 66, 133–139.
- [45] Orden, A. A.; Bisogno, F. R.; Giordano, O. S.; Kurina Sanz, M. (2008). 'Comparative study in the asymmetric bioreduction of ketones by plant organs and undifferentiated cells'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 51, 49–55.
- [46] Fonseca, A. M.; Monte, F. J. Q.; de Oliveira, M. da C. F.; de Mattos, M. C.; Cordell, G. A.; Braz-Filho, R.; Lemos, T. L. G. (2009). 'Coconut water (*Cocos nucifera* L.)-A new biocatalyst system for organic synthesis'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 57, 78–82.
- [47] Tamburini, E.; Costa, S. (2016). 'Biocatalytic activity of fresh *Passiflora* Spp. leaves in enantioselective oxido-reduction'. *Nat. Prod. Chem. Res.* 4, 1–5.
- [48] Suárez-Franco, G.; Hernández-Quiroz, T.; Navarro-Ocana, A.; Oliart-Ros, R. M.; Valerio-Alfaro, G. (2010). 'Plants as a green alternative for alcohol preparation from aromatic aldehydes'. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15, 441–445.
- [49] Pavoković, D.; Buđa, R.; Andrašec, F.; Roje, M.; Bubalo, M. C.; Redovniković, I. R. (2017). 'Plant-mediated asymmetric reduction of 1-(3,4-dimethylphenyl)ethanone'. *Tetrahedron Asymmetry* 28, 730–733.
- [50] Vandenberghe, A.; Markó, I. E.; Lucaccioni, F.; Lutts, S. (2013). 'Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables'. *Ind. Crops Prod.* 42, 380–385.
- [51] Mironowicz, A. (1998). 'Biotransformations of racemic acetates by potato and topinambur tubers'. *Phytochemistry* 47, 1531–1534.
- [52] Zilinskas, A.; Sereikaite, J. (2013). 'Stereoselective bioreduction for the resolution of racemic mixtures of bicyclo[3.3.1]nonane-2,6-dione using vegetables'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 90, 66–69.
- [53] Machado, L. L.; Souza, J. S. N.; de Mattos, M. C.; Sakata, S. K.; Cordell, G. A.; Lemos, T. L. G. (2006). 'Bioreduction of aldehydes and ketones using *Manihot* species'. *Phytochemistry* 67, 1637–1643.
- [54] Ge, H. X.; Zhang, J.; Lu, L. L.; Yu, B. Y. (2014). 'Biotransformation of tetrahydroprotoberberines by *Panax ginseng* hairy root culture'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 110, 133–139.
- [55] Orden, A. A.; Bisogno, F. R.; Cifuentes, D. A.; Giordano, O. S.; Kurina Sanz, M.

- (2006). 'Asymmetric bioreduction of natural xenobiotic diketones by *Brassica napus* hairy roots'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 42, 71–77.
- [56] Decarlini, M. F.; Aymar, M. L.; Vázquez, A. M.; Vero, S.; Rossi, L. I.; Yang, P. (2017). 'Fungi isolated from food samples for an efficient stereoselective production of phenylethanols'. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 12, 275–285.
- [57] Nealon, C. M.; Kim, C. S.; Dwamena, A. K.; Phillips, R. S. (2017). 'Mutagenesis of Met-151 and Thr-153 to alanine in *Thermoanaerobacter ethanolicus* secondary alcohol dehydrogenase changes substrate specificity for acetophenones'. *Enzyme Microb. Technol.* 105, 59–63.
- [58] Bertini, L. M.; Lemos, T. L. G.; Alves, L. A.; Monte, F. J. Q.; de Mattos, M. C.; de Oliveira, M. da C. F. (2012). 'Soybean (*Glycine max*) as a versatile biocatalyst for organic synthesis'. *African J. Biotechnol.* 11, 7766–7770.
- [59] da Silva, F. F. M.; Ferreira, D. A.; Monte, F. J. Q.; de Lemos, T. L. G. (2017). 'Synthesis of chiral esters and alcohols via enantioselective esterification with *Citrus aurantium* peels as biocatalyst'. *Ind. Crops Prod.* 96, 23–29.
- [60] Salvi, N. A.; Chattopadhyay, S. (2001). 'Studies on *Rhizopus arrhizus* mediated enantioselective reduction of arylalkanones'. *Tetrahedron* 57, 2833–2839.
- [61] Cheemala, M. N.; Gayral, M.; Brown, J. M.; Rossen, K.; Knochel, P. (2007). 'New paracyclophane phosphine for highly enantioselective ruthenium-catalyzed hydrogenation of prochiral ketones'. *Synthesis (Stuttg.)*. 24, 3877–3885.
- [62] Salvi, N. A.; Chattopadhyay, S. (2008). 'Asymmetric reduction of halo-substituted arylalkanones with *Rhizopus arrhizus*'. *Tetrahedron Asymmetry* 19, 1992–1997.
- [63] Matsugi, M.; Itoh, K.; Nojima, M.; Hagimoto, Y.; Kita, Y. (2004). 'A novel separation technique of diastereomeric esters of pyridylethanols by extraction: Formal total synthesis of PNU-142721, HIV-1 reverse transcriptase inhibitor'. *Tetrahedron* 60, 3311–3317.
- [64] Yu, F.; Zhang, X.-C.; Wu, F.-F.; Zhou, J.-N.; Fang, W.; Wu, J.; Chan, A. S. C. (2011). 'Cobalt(II)-catalyzed asymmetric hydrosilylation of simple ketones using dipyridylphosphine ligands in air'. *Org. Biomol. Chem.* 9, 5652–5654.
- [65] Nakamura, K. (1998). 'Highly stereoselective reduction of ketones by *Geotrichum candidum*'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 5, 129–132.
- [66] Andrade, L. H.; Utsunomiya, R. S.; Omori, A. T.; André, A. L.; Comasseto, J. V.

- (2006). 'Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 38, 84–90.
- [67] Mathre, D. J.; Thompson, A. S.; Douglas, A. W.; Hoogsteen, K.; Carroll, J. D.; Corley, E. G.; Grabowski, E. J. J. (1993). 'A Practical Process for the Preparation of Tetrahydro-1-methyl-3,3-diphenyl-1H,3H-pyrrolo[1,2-c]-[1,3,2]oxazaborole-Borane. A Highly Enantioselective Stoichiometric and Catalytic Reducing Agent'. *J. Org. Chem.* 58, 2880–2888.
- [68] Ohkuma, T.; Koizumi, M.; Yoshida, M.; Noyori, R. (2000). 'General Asymmetric Hydrogenation of Hetero-aromatic Ketones'. *Org. Lett.* 2, 1749–1751.
- [69] Cazetta, T. (2014). 'Desracemização de álcoois secundários por estereoinversão e redução de metilenoacetona por micro-organismos'. (Universidade Estadual de Campinas, 2014).
- [70] Lallana, V. H.; Elizalde, J. H. I.; Billard, C.; Lallana, M. del C. (2006). 'Control mecánico de *Eryngium horridum* ('Caraguatá') en un pastizal naturalizado de Entre Ríos. Argentina'. *Agrociencia* 10, 47–57.
- [71] Liu, X.; Pan, Z. G.; Xu, J. H.; Li, H. X. (2010). 'Enantioselective reduction of acetophenone analogues using carrot and celeriac enzymes system'. *Chinese Chem. Lett.* 21, 305–308.
- [72] Ferreira, D. A.; Da Costa Assunção, J. C.; De Lemos, T. L. G.; Monte, F. J. Q. (2012). 'Asymmetric reduction of acetophenone derivatives by *Lens culinaris*'. *Biocatal. Biotransformation* 30, 469–475.
- [73] Faber, K. (2011). *Biotransformations in organic chemistry*. (Springer, 2011).
- [74] Bennamane, M.; Zeror, S.; Aribi-Zouiouche, L. (2015). 'Asymmetric reduction of ketones by biocatalysis using clementine mandarin (*Citrus reticulata*) fruit grown in annaba or by ruthenium catalysis for access to both enantiomers'. *Chirality* 27, 205–210.
- [75] Pscheidt, B.; Glieder, A. (2008). 'Yeast cell factories for fine chemical and API production'. *Microb. Cell Fact.* 7,
- [76] Li, A.; Ye, L.; Guo, F.; Yang, X.; Yu, H. (2015). 'Biocatalytic anti-Prelog reduction of prochiral ketones with whole cells of a newly isolated strain *Empedobacter brevis* ZJUY-1401'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 117, 31–37.
- [77] Blay, G.; Hernández-Olmos, V.; Pedro, J. R. (2010). 'Synthesis of (S)-(+)-sotalol and (R)-(-)-isoproterenol via a catalytic enantioselective Henry reaction'. *Tetrahedron Asymmetry* 21, 578–581.

- [78] Pedragosa-Moreau, S.; Morisseau, C.; Baratti, J.; Zylber, J.; Archelas, A.; Furstoss, R. (1997). 'Microbiological transformations 37. An enantioconvergent synthesis of the β -blocker (R)-Nifenalol® using a combined chemoenzymatic approach'. *Tetrahedron* 53, 9707–9714.
- [79] Maćzka, W. K.; Mironowicz, A. (2004). 'Enantioselective reduction of bromo- and methoxy-acetophenone derivatives using carrot and celeriac enzymatic system'. *Tetrahedron Asymmetry* 15, 1965–1967.
- [80] Blanchard, N.; van de Weghe, P. (2006). 'Daucus carota L. mediated bioreduction of prochiral ketones'. *Org. Biomol. Chem.* 4, 2348–2353.
- [81] Bruni, R.; Fantin, G.; Maietti, S.; Medici, A.; Pedrini, P.; Sacchetti, G. (2006). 'Plants-mediated reduction in the synthesis of homochiral secondary alcohols'. *Tetrahedron Asymmetry* 17, 2287–2291.
- [82] Machado, L. L.; Monte, F. J. Q.; de Oliveira, M. da C. F.; de Mattos, M. C.; Lemos, T. L. G.; Gotor-Fernández, V.; de Gonzalo, G.; Gotor, V. (2008). 'Bioreduction of aromatic aldehydes and ketones by fruits' barks of *Passiflora edulis*'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 54, 130–133.
- [83] Bennamane, M.; Zeror, S.; Aribi-Zouiouche, L. (2014). 'Asymmetric reduction of ketones by biocatalysis using medlar (*Mespilus germanica* L) fruit grown in Algeria'. *Biocatal. Biotransformation* 32, 327–332.
- [84] Kumaraswamy, G.; Ramesh, S. (2003). 'Soaked *Phaseolus aureus* L: An efficient biocatalyst for asymmetric reduction of prochiral aromatic ketones'. *Green Chem.* 5, 306–308.

CAPÍTULO 5: Identificación de frutos como posibles biocatalizadores

5.1 Introducción

En los capítulos anteriores se describió la importancia de encontrar metodologías químicas sustentables para obtener compuestos de importancia sintética. Por este motivo, en el Capítulo 4 se describe la búsqueda de nuevos biocatalizadores obtenidos a partir de raíces vegetales que permitieron obtener de manera eficiente alcoholes quirales.

Continuando con la línea de trabajo y para ampliar aún más las prometedoras perspectivas de la *Botanoquímica*, en el presente capítulo se describen los estudios realizados para establecer la capacidad bioreductiva de frutos obtenidos a partir de diferentes especies vegetales recolectados en la Provincia de Córdoba.

De igual manera a lo realizado en el capítulo anterior, inicialmente se ha utilizado AF como sustrato modelo de cetonas proquirales, para así tratar de identificar cuáles frutos resultan más eficientes en el proceso reductivo. Posteriormente, se estableció la capacidad bioreductiva del fruto seleccionado frente a diferentes AF sustituidas, y el alcance y limitaciones del procedimiento han sido discutidas.

Por otra parte, es importante remarcar que, como resultado de los estudios resumidos en el presente capítulo, se ha logrado sintetizar productos que son intermediarios claves en el proceso de obtención de algunos de los fármacos descritos en la sección 4.1.3 (Figura 4.1).

5.1.1 Bioreducciones utilizando frutos vegetales

En un contexto de búsqueda de nuevas metodologías ambientalmente más amigables, algunos reportes han descrito la posibilidad de utilizar semillas y frutos obtenidos a partir de diferentes vegetales para llevar a cabo reducciones estereoselectivas de compuestos carbonílicos proquirales. Entre ellos es de destacar los trabajos oportunamente informados sobre la utilización de *Lens culinaris* (lentejas)¹, *Phaseolus angularis* (poroto Adzuki)², *Phaseolus vulgaris* (poroto común)³, *Sinapis alba* (mostaza amarilla)⁴, *Vigna unguiculata* (poroto mungo)⁵, *Glycine max*

(soja)⁶, además de otras semillas de pertenecientes a la familia de las leguminosas⁷. También se estudió la actividad biocatalítica de algunas frutas comestibles como *Citrus reticulata* (mandarina)⁸, *Prunus pérsica* (durazno)⁹, *Lycopersicum esculentum* (tomate)¹⁰, entre otros^{5,11-13}. Al igual que lo descrito en el capítulo anterior, es importante remarcar que todos estos estudios han sido realizados con vegetales que son comúnmente utilizados como alimentos, y la sustentabilidad de un proceso debería contemplar este aspecto, buscando alternativas que eviten la competencia de usos para un mismo producto.

Objetivo del presente Capítulo: Identificar frutos vegetales capaces de reducir de manera eficiente y estereoselectiva a la AF, y con potencial para reducir otras fenilcetonas proquirales.

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 General

Acetofenona, acetofenonas sustituidas, 2-acetilfeno, 2-acetilpiridina y borohidruro de sodio (NaBH_4) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich S.A. (Argentina). En todas las experiencias se utilizó el mismo procedimiento descrito en la sección 4.2.1.

5.2.2 Análisis CG-FID y CG-EM

Para establecer las condiciones cromatográficas, todos los sustratos utilizados en las reacciones fueron previamente reducidos con NaBH_4 en etanol para obtener la mezcla racémica de los correspondientes alcoholes. Los análisis cromatográficos fueron llevados a cabo de acuerdo a lo descrito en la sección 4.2.2.

5.2.3 Cálculo de conversiones de reacción, excesos enantioméricos y rendimientos aislados

Los porcentajes de conversión, los excesos enantioméricos y los porcentajes de rendimiento m/m fueron obtenidos de acuerdo a lo descrito en la sección 4.2.3 del capítulo precedente.

5.2.4 Biocatalizadores vegetales

Frutos maduros y sanos de *Ligustrum lucidum* (siempreverde o ligustro), *Nandina domestica*, *Pyracantha angustifolia* (pyracantha amarilla), *Pyracantha atalantioides* (pyracantha roja) y *Cotoneaster franchetii* (cotoneaster naranja) fueron recolectados en la provincia de Córdoba (Argentina) e identificados por un botánico. Los vegetales utilizados se muestran en la Figura 5.1. Las muestras frescas fueron tratadas de acuerdo a lo descrito en la sección 4.2.4 del capítulo precedente.

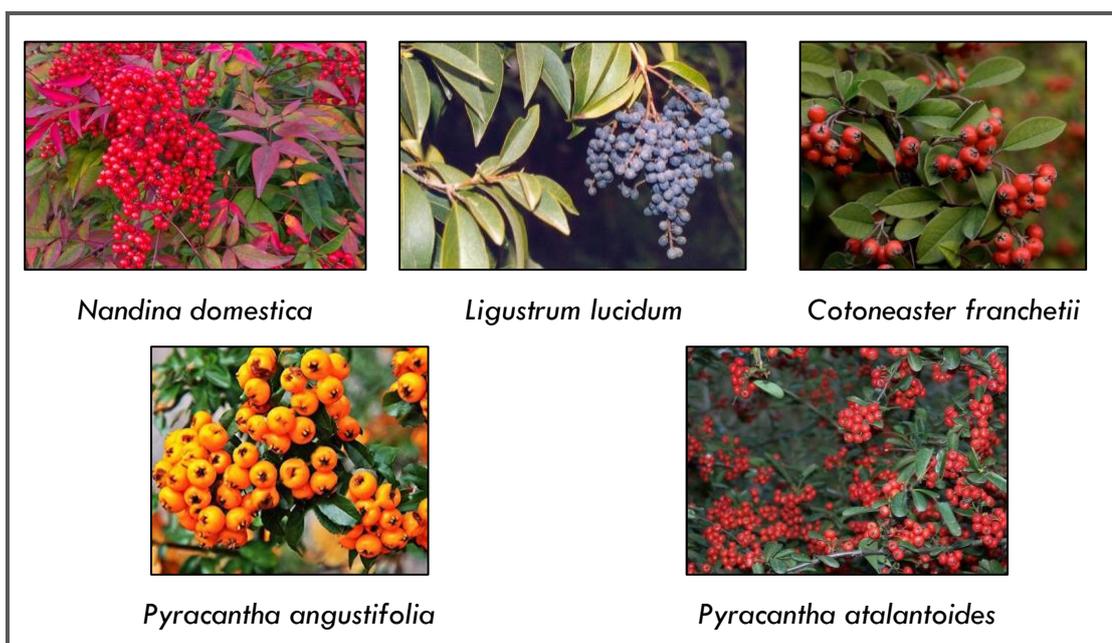


Figura 5.1: Vegetales utilizadas como biocatalizadores (frutos).

5.2.5 Bioreducciones

Las reacciones fueron realizadas utilizando el mismo procedimiento descrito en la sección 4.2.5 del capítulo precedente, utilizando el material vegetal fresco y levemente triturado en un molino de cuchillas, sin separación de ninguna de sus partes.

5.2.6 Estudio cinético de la bioreducción de la Acetofenona

Con el objetivo de establecer el tiempo de reacción óptimo del biocatalizador que mejor performance alcanzó, se realizó un estudio cinético mediante la correspondiente determinación del porcentaje de conversión como una función del

tiempo de reacción. El procedimiento realizado ha sido detallado oportunamente en la sección 4.2.6 del capítulo precedente.

5.2.7 Datos Cromatográficos y Espectroscópicos

De igual manera a como ha sido descrito en la sección 4.2.7 del capítulo anterior, los productos fueron identificados comparando sus tiempos de retención obtenidos mediante análisis CG-FID quiral con muestras testigos y por comparación de sus espectros de EM, RMN ^1H y ^{13}C con datos bibliográficos¹⁴⁻¹⁸.

5.3 Resultados y Discusión

Como parte del proceso de evaluación, se ensayaron cinco frutos de especies vegetales locales utilizando AF como sustrato modelo. Las especies vegetales ensayadas y los correspondientes resultados de este estudio se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1: Ensayos de reducción estereoselectiva de Acetofenona catalizada con frutos frescos de vegetales.							
Nº	Familia	Nombre científico	Nombre vulgar	Parte vegetal	Tiempo (días)	Conv. (%) ^{a,b}	e.e. (%) ^{a,c}
1	Berberida-ceae	<i>Nandina domestica</i> Thumb.	Bambú sagado	Frutos	6	9	53 (S)
2	Oleaceae	<i>Ligustrum lucidum</i> W. T. Aiton	Siempreverde		6	94	>99 (S)
3	Rosaceae	<i>Cotoneaster franchetii</i> Bois	Cotoneaster		6	5	>99 (S)
4	Rosaceae	<i>Pyracantha angustifolia</i> (Franch.) C. K. Schneid.	Piracanta anarilla		6	76	59 (S)
5	Rosaceae	<i>Pyracantha atalantoides</i> M. Roem.	Piracanta roja		6	26	56 (S)

^a Determinado por análisis quiral en CG
^b Porcentaje de reducción
^c Porcentaje de exceso enantiomérico y entre paréntesis configuración absoluta

Adicionalmente, para asegurar que el material vegetal no contenía el alcohol aromático quiral o el correspondiente sustrato, se llevó a cabo un experimento control, trabajando con el material vegetal sin añadir sustrato. Los crudos de estas reacciones fueron analizados por CG con columna quiral y CG-EM, obteniéndose ausencia de sustrato o sus correspondientes alcoholes, en todos los casos.

5.3.1 Biocatálisis utilizando frutos de plantas

Como se puede observar en la Tabla 5.1, la totalidad de los frutos estudiados lograron reducir la AF a 1-FE, difiriendo en los porcentajes de conversión y en los excesos enantioméricos alcanzados. En todos los casos, los tiempos de reacción fueron ajustados a 6 días.

De los resultados alcanzados, claramente sobresalen el porcentaje de conversión y la estereoselectividad presentada por los frutos frescos y maduros de *L. lucidum* (Tabla 5.1, entrada 2). En este sentido, (-)-(S)-1-feniletanol ((S)-1-FE) fue obtenido con un 94% de conversión y con exceso enantiomérico >99%. Debido a esto, ellos demostraron la mejor opción para obtener una bio-reducción eficiente y enantioselectiva de la AF.

Por otra parte, las otras especies estudiadas tuvieron menor eficiencia en su comportamiento reductivo.

Para determinar de manera efectiva el tiempo de reacción necesario para la reducción de AF a (S)-1-FE, se realizó un estudio cinético detallado utilizando los frutos maduros de *L. lucidum*. Los resultados de esta experiencia pueden ser observados en la Figura 5.2.

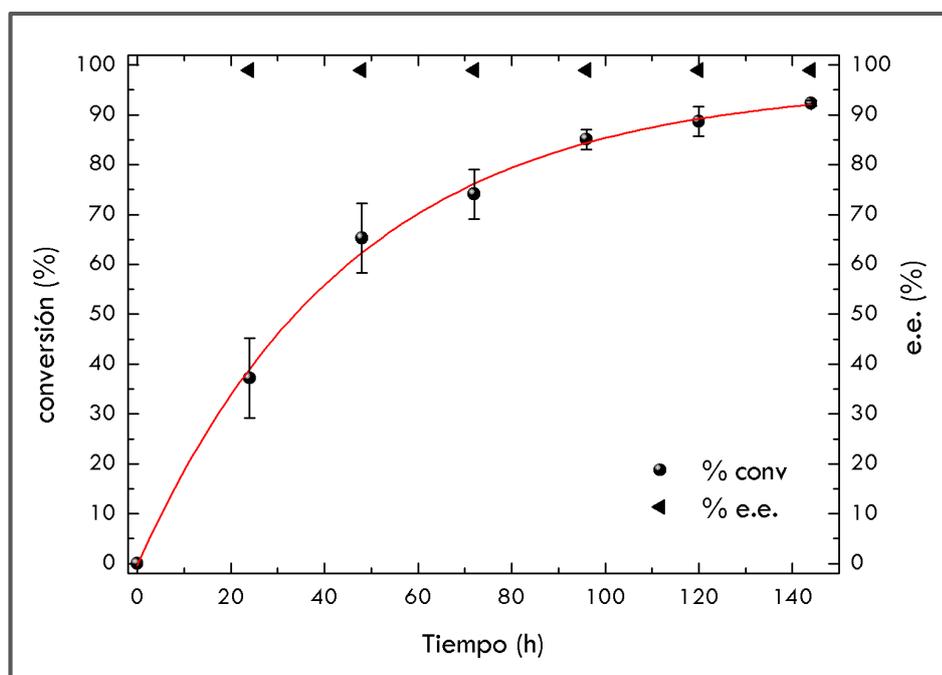


Figura 5.2: Cinética de reacción: biocatálisis de Acetofenona (0,67 g/L) con frutos frescos molidos de *L. lucidum* (20 g/150 mL buffer). Condiciones de reacción: T=20 °C; pH=6,5; 1% p/v DMSO.

Aquí claramente se puede observar que la reacción alcanza su condición óptima luego de transcurridos seis días de iniciado el proceso (94% de conversión). Es interesante remarcar que la enantioselectividad del proceso bioreductivo se mantuvo siempre constante durante todo el estudio (e.e.% >99) y este resultado pone de manifiesto la alta eficiencia y estereoselectividad del complejo enzimático presente en los frutos de esta especie vegetal.

A pesar de no haber realizado estudios para establecer el grupo de enzimas responsables de las transformaciones descritas durante el transcurso del presente capítulo, es probable que enzimas pertenecientes al grupo de las alcohol deshidrogenasas (cetoreductosa dependiente de coenzimas de nicotinamida como equivalentes redox^{2,19}) estén involucradas en este proceso biocatalítico.

Cabe señalar que, aunque hay algunos reportes en la literatura de referencia sobre el uso de partes de plantas como biocatalizadores en la reducción de cetonas proquirales, pocos estudios han sido realizados utilizando frutos. También es de destacar que los resultados obtenidos con *L. lucidum* (% conversión y % e.e.) fueron más prometedores que aquellos oportunamente informados utilizando *M. pumila* (40.9 %, 81.5 %e.e. (R))²⁰, *C. nucifera* (79 %, 95 %e.e. (S))²¹, *Passiflora edulis* (74%, 23 %e.e. (S))²² y *Lycopersicum esculentum* (80%, 95 %e.e. (S))¹⁰.

Adicionalmente es interesante mencionar, que a diferencia de todas las especies anteriores, *L. lucidum* es una especie foránea, altamente invasiva²³⁻²⁵ y competitiva con la flora autóctona de la provincia de Córdoba²⁶⁻²⁸, cuyo fruto carece de uso práctico reportado²⁹. Por lo tanto, utilizarlo como biocatalizador en procedimientos realizados para obtener 1-FEs quirales, es establecer una potencial oportunidad de aprovechamiento para los frutos de esta especie.

5.3.2 Capacidad reductiva de *L. lucidum* frente a acetofenonas sustituidas

Los alentadores resultados obtenidos utilizando *L. lucidum* como biocatalizador en las reducciones de AF, motivaron a estudiar este nuevo biocatalizador utilizando diferentes acetofenonas sustituidas. En este sentido, la misma serie de fenilcetonas sustituidas, oportunamente reducidas con *E. horridum*, fueron también sometidas a condiciones de reacción similares, pero utilizando los frutos frescos de *L. lucidum* como biocatalizador. Los resultados se pueden observar a continuación en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Capacidad reductiva de frutos frescos de *L. lucidum* frente a distintas cetonas proquirales sustituidas

Enantiómero
R y/o S

Nº	R ₁	R ₂	% conversión ^a	% e.e. ^{a,c}	% Rendimiento ^b
1	H-	Fenil-	94	>99 (S)	79
2	H-	2'-clorofenil-	90	>99,9 (S)	20
3	H-	3'-clorofenil-	93	97 (S)	26
4	H-	4'-clorofenil-	92	91(S)	38
5	H-	2'-nitrofenil-	7	88 (S)	Trazas
6	H-	3'-nitrofenil-	79	83 (S)	45
7	H-	4'-nitrofenil-	98	87 (S)	49
8	H-	4'-fluorofenil-	90	97 (S)	57
9	H-	4'-trifluorometilfenil-	84	78 (S)	5
10	H-	4'-bromofenil-	82	81 (S)	13
11	H-	4'-cianofenil-	97	95 (S)	30
12	H-	4'-metilfenil-	48	88 (S)	14
13	H-	2-tienil-	17	79 (S)	7
14	H-	2-piridil-	82	81 (S)	52
15	H-	2'-hidroxifenil-	5	>99,9 (S)	--- ^e
16	H-	3'-hidroxifenil-	76	>99,9 (S)	36
17	H-	4'-hidroxifenil-	0	nd ^d	--- ^e
18	Cl-	Fenil-	76	72 (R)	14

^a Determinado por análisis en CG quiral luego de 6 días de reacción.
^b Rendimiento del producto aislado después de ser purificado por cromatografía en columna.
^c Configuración absoluta entre paréntesis.
^d No detectado
^e No determinado

Como se puede observar en la Tabla 5.2, los frutos de *L. lucidum* demostraron ser un eficiente reductor biológico para llevar a cabo la obtención de alcoholes quirales mediante la reducción estereoselectiva de sus correspondientes cetonas. La eficiencia de la conversión del proceso osciló entre 79 y 98%, excepto para 2'-nitroacetofenona, 4'-metilacetofenona y 2-acetiltiofeno (conversiones del 7 a 48%; tabla 5.2, entradas 5, 12 y 13). Por otro lado, todos los demás sustratos ensayados pudieron ser reducidos eficientemente y la mayoría de sus productos se obtuvieron con purezas ópticas satisfactorias. En efecto, el exceso enantiomérico observado para todas las reacciones varió desde muy bueno (4'-trifluorometilacetofenona 78%; Tabla 5.2, entrada 10) a excelente (2'-cloroacetofenona % e.e. > 99,9%; Tabla 5.2, entrada 2).

De la misma manera que con *E. horridum*, al utilizar los frutos de *L. lucidum* como bioreductor, se pudo observar una posible influencia de la naturaleza electrónica

de los sustituyentes sobre la reducción del grupo carbonilo. En efecto, los grupos donadores de electrones disminuyen la reactividad de la cetona utilizada como sustrato, produciendo el alcohol correspondiente en conversiones de moderadas a bajas. En este sentido, cuando 4'-metilacetofenona (Tabla 5.2, entrada 12) fue utilizada como sustrato, se observó una conversión moderada (48%) y cuando se empleó 2-acetiltofeno (Tabla 5.2, entrada 13), se obtuvo una conversión aún más baja al alcohol correspondiente (17%).

Por otro lado, en general los grupos tomadores de electrones proporcionaron mayores porcentajes de conversión. En este sentido, se observó una conversión prácticamente cuantitativa cuando se utilizaron como sustratos a 4'-cianoacetofenona (97%) y 4'-nitroacetofenona (98%, Tabla 5.2, entradas 11 y 17 respectivamente). Es de destacar que una situación similar ha sido previamente reportada al utilizar como biocatalizadores a *Daucus carota*, *Apium graveolens* y *Lens culinaris*^{1,30,31}. En concordancia con esto, es interesante mostrar que en algunos procesos de oxidación se ha observado un efecto contrario al descrito en los resultados de esta tesis, y ha sido también atribuido a la influencia electrónica de los sustituyentes³². Por otra parte, al igual que con *E. horridum*, los frutos de *L. lucidum* redujeron todos los sustratos respetando la regla de Prelog³³.

Para el caso de 2'-, 3'- y 4'-nitroacetofenonas (Tabla 5.2, entradas 5, 6 y 7), también se observó una muy buena bio-reducción quimio- y estereoselectiva, sin provocar la reducción del grupo nitro.

A diferencia de lo observado al utilizar *E. horridum*, cuando se utilizaron como sustratos a las nitroacetofenonas, los productos de reducción obtenidos presentaron un porcentaje de conversión muy variable, y en el caso particular de la 2'-nitroacetofenona el alcohol correspondiente se obtuvo en una conversión muy baja. (7%, Tabla 5.2, entrada 5). Es posible que este resultado sea debido a una influencia estérica dentro del sitio activo de las enzimas responsables de la transformación ejercida por la cercanía del grupo NO₂ al grupo carbonilo. Como se explicitó en la sección 5.3.1, otros autores han observado, utilizando biocatalizadores vegetales, que factores estéricos pueden reducir la eficiencia de la reacción por la presencia de un sustituyente en la posición *orto* del anillo aromático^{1,31,34}.

Adicionalmente, cabe mencionar que se observó una reactividad similar a la AF cuando se utilizaron cloroacetofenonas como sustratos. En estos casos, la conversión a sus correspondientes alcoholes osciló entre el 90-93%. No obstante, la

enantioselectividad disminuyó en la secuencia 2'-, 3'- y 4'-cloroacetofenona (99,9; 97 y 91% respectivamente; Tabla 5.2, entradas 2, 3 y 4).

Es interesante observar los resultados obtenidos cuando las hidroxiacetofenonas se sometieron a ensayos de bioreducción. En las condiciones de reducción utilizadas en estos ensayos, la reacción falló completamente cuando se utilizó 4'-hidroxiacetofenona (Tabla 5.2, entradas 17). Adicionalmente, cuando se empleó como sustrato a 2'-hidroxiacetofenona la conversión al correspondiente alcohol fue observada solo en un 5% (Tabla 5.2, entrada 15). Por el contrario, cuando 3'-hidroxiacetofenona fue sometida a reacción, se produjo su transformación al correspondiente (S)-alcohol con una buena conversión y excelente enantioselectividad (Tabla 5.2, entrada 16). Ésta marcada diferencia en el comportamiento de las hidroxiacetofenonas podría explicarse por la formación de un intermedio quinona³⁵ por deprotonación del hidroxilo fenólico. Como se observa en la Figura 5.3, la eliminación del hidrógeno fenólico da lugar a la formación de un ion fenóxido y su carga podría ser estabilizada por resonancia sobre el anillo aromático. De esta manera, al aumentar la densidad electrónica sobre el átomo de carbono carbonílico, disminuye la posibilidad de ataque sobre el mismo cuando los sustituyentes HO⁻ se encuentran en las posiciones 2'- y 4'- (*orto* y *para*).

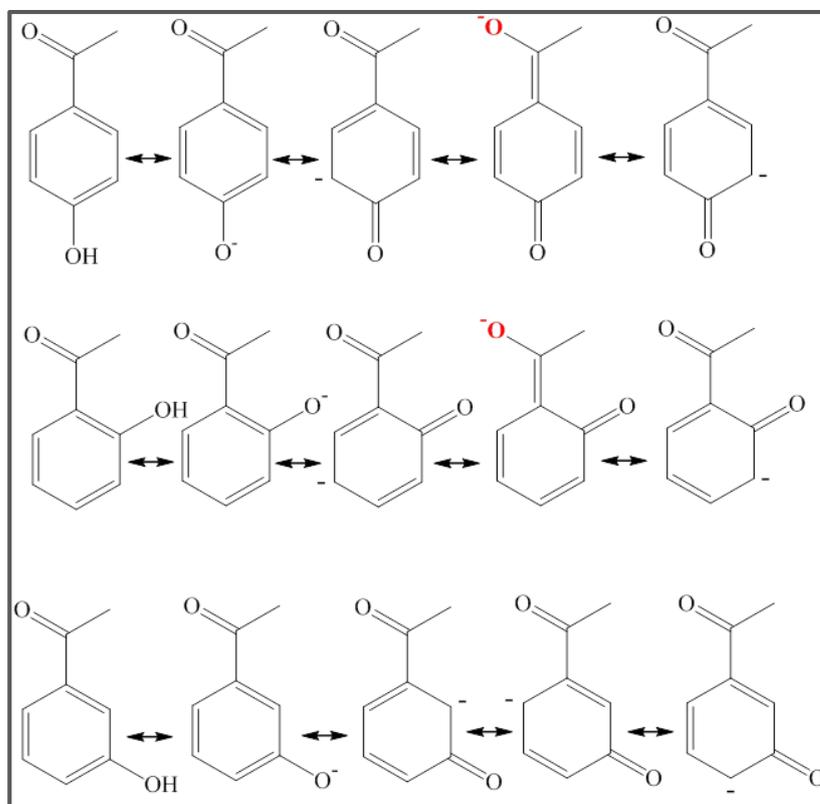


Figura 5.3: Posibles estructuras de resonancia por deprotonación del hidrógeno fenólico en hidroxiacetofenonas.

Este proceso de deslocalización de la carga puede alterar la reactividad del grupo carbonilo de estos sustratos frente al proceso de reducción. Esta situación no es posible con el isómero 3'- (*meta*) y quizás, por esta razón, las 2'- y 4'-hidroxiacetofenonas poseen una muy baja reactividad cuando los frutos de siempreverde son utilizados como catalizadores en el proceso de bio-reducción del grupo carbonilo. Sin embargo, es claro que se necesitan más estudios para apoyar estos supuestos.

Aunque los sistemas de reducción biocatalítica son reconocidos como un enfoque altamente eficiente para la producción de alcoholes enantioméricamente puros, los estudios sobre bio-reducción de hidroxiacetofenonas no protegidas, los cuales representan varias subestructuras dentro de una gran variedad de fármacos, son hasta ahora sorprendentemente raros³⁶. Por esta razón, es necesario resaltar la importancia de los resultados obtenidos en la reducción de la 3'-hidroxiacetofenona debido a que el producto obtenido, el (S)-1-(3-hidroxifenil) etanol, es el intermedio clave en el proceso de síntesis y fabricación del fármaco Rivastigmina (fármaco para el tratamiento del Alzheimer ³⁷⁻³⁹).

Al igual que en las reacciones realizadas utilizando *E. horridum*, los rendimientos moderados a bajos obtenidos durante la purificación de los compuestos sintetizados utilizando *L. lucidum* como biocatalizador, se debieron al hecho de que durante los procedimientos de extracción también se formaron emulsiones que fueron difíciles de tratar, lo que complicó significativamente el procedimiento de extracción.

Finalmente, de la misma manera que para otros biocatalizadores vegetales, los desechos de *L. lucidum* pueden utilizarse como abono o ensayar una posible reutilización del mismo para una nueva reacción, lo que claramente minimiza el impacto ambiental de este tipo de sistemas de reacción⁴⁰.

5.4 Conclusiones

Los resultados alcanzados durante el desarrollo de esta etapa de trabajo demuestran que los frutos de *L. lucidum*, poseen sistemas enzimáticos con la capacidad necesaria para reducir tanto el sustrato modelo, como acetofenonas sustituidas, a sus correspondientes alcoholes quirales de manera estereoselectiva. Como resultado de este estudio, es claro que se ha encontrado una oportunidad para establecer nuevas aplicaciones para los frutos esta especie vegetal destacando que, al día de hoy, ninguna otra utilidad práctica ha sido reportada.

Más aún, es importante considerar que dicha especie se ha convertido en un serio problema ambiental ya que está afectando la biodiversidad local en el territorio de Argentina y especialmente en la Provincia de Córdoba, lo cual hace imperioso, por un lado, su control o por otro, encontrar formas adecuadas de promover su utilización.

Adicionalmente, es de destacar que el método de bioreducción presentado aquí, permite obtener diferentes 1-FEs quirales de manera altamente estereoselectiva utilizando una metodología más económica y más ambientalmente amigable que las metodologías químicas clásicas ya que este tipo de procedimiento se basa en la utilización de recursos naturales renovables.

Finalmente, debido a las características intrínsecas de los sistemas biocatalíticos utilizando vegetales, es esperable que los procedimientos de bioreducción que los utilizan como catalizadores sigan ganando atención debido a sus ventajas comparativas con respecto a los métodos químicos clásicos. Más aún, teniendo en cuenta la amplia disponibilidad taxonómica de especies vegetales, el uso de este tipo de sistemas biocatalíticos ofrece numerosas opciones de aplicación que aún deben ser exploradas.

5.5 Bibliografia

- [1] Ferreira, D. A.; Da Costa Assunção, J. C.; De Lemos, T. L. G.; Monte, F. J. Q. (2012). 'Asymmetric reduction of acetophenone derivatives by *Lens culinaris*'. *Biocatal. Biotransformation* 30, 469–475.
- [2] Xie, Y.; Xu, J. H.; Lu, W. Y.; Lin, G. Q. (2009). 'Adzuki bean: A new resource of biocatalyst for asymmetric reduction of aromatic ketones with high stereoselectivity and substrate tolerance'. *Bioresour. Technol.* 100, 2463–2468.
- [3] Fruchey, E. R. (2011). 'Asymmetric reductions of ketones, imines, and oximes using biocatalytic enzymes found in pea plants'. (The Ohio State University).
- [4] de Sousa, E. Y. A.; da Silva, F. F. M.; de Souza, J. M. O.; Ferreira, D. A.; de Lemos, T. L. G.; Monte, F. J. Q. (2019). 'Preparation of chiral alcohols by enantioselective reduction of prochiral ketones with *Sinapis alba* seeds as biocatalyst'. *Ind. Crops Prod.* 141, 111729.
- [5] Bizerra, A. M. C.; Gonzalo, G. de; Lavandera, I.; Gotor-Fernández, V.; de Mattos, M. C.; de Oliveira, M. da C. F.; Lemos, T. L. G.; Gotor, V. (2010). 'Reduction processes biocatalyzed by *Vigna unguiculata*'. *Tetrahedron Asymmetry* 21, 566–570.
- [6] Bertini, L. M.; Lemos, T. L. G.; Alves, L. A.; Monte, F. J. Q.; de Mattos, M. C.; de Oliveira, M. da C. F. (2012). 'Soybean (*Glycine max*) as a versatile biocatalyst for organic synthesis'. *African J. Biotechnol.* 11, 7766–7770.
- [7] Haritha, V. (2008). 'Biotransformation of prochiral ketones to pharmaceutically potent chiral alcohols by legume seeds'. (SRM University).
- [8] Bennamane, M.; Zeror, S.; Aribi-Zouiouche, L. (2015). 'Asymmetric reduction of ketones by biocatalysis using clementine mandarin (*citrus reticulata*) fruit grown in annaba or by ruthenium catalysis for access to both enantiomers'. *Chirality* 27, 205–210.
- [9] Tong, L. P.; Cui, J. N.; Ren, W. M.; Wang, X. Y.; Qian, X. H. (2008). 'Asymmetric bioreduction of substituted acenaphthenequinones using plant enzymatic systems: A novel strategy for the preparation of (+)- and (-)-mono hydroxyacenaphthenones'. *Chinese Chem. Lett.* 19, 1179–1182.
- [10] Phukan, K.; Devi, N. (2012). 'Biocatalytic preparative method of asymmetric alcohols using *Lycopersicon esculentum* (Tomato)'. *Int. J. ChemTech Res.* 4, 203–207.
- [11] Xie, B.; Yang, J.; Yang, Q.; Yuan, W. (2009). 'Enantioselective reduction of

- fluorenones in surfactant-aqueous solution by fruits and vegetables'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 61, 284–288.
- [12] Misra, K.; Maity, H. S.; Chanda, S.; Nag, A. (2012). 'New greener alternatives for bioreduction of aromatic aldehydes and decarboxylation of aromatic acids using juice of fruits'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 82, 92–95.
- [13] Patil, D. (2015). 'Biocatalysis using plant material: A green access to asymmetric reduction'. *Int. J. ChemTech Res.* 8, 318–324.
- [14] Salvi, N. A.; Chattopadhyay, S. (2001). 'Studies on *Rhizopus arrhizus* mediated enantioselective reduction of arylalkanones'. *Tetrahedron* 57, 2833–2839.
- [15] Salvi, N. A.; Chattopadhyay, S. (2008). 'Asymmetric reduction of halo-substituted arylalkanones with *Rhizopus arrhizus*'. *Tetrahedron Asymmetry* 19, 1992–1997.
- [16] Yu, F.; Zhang, X.-C.; Wu, F.-F.; Zhou, J.-N.; Fang, W.; Wu, J.; Chan, A. S. C. (2011). 'Cobalt(II)-catalyzed asymmetric hydrosilylation of simple ketones using dipyridylphosphine ligands in air'. *Org. Biomol. Chem.* 9, 5652–5654.
- [17] Cheemala, M. N.; Gayral, M.; Brown, J. M.; Rossen, K.; Knochel, P. (2007). 'New paracyclophane phosphine for highly enantioselective ruthenium-catalyzed hydrogenation of prochiral ketones'. *Synthesis (Stuttg.)*. 24, 3877–3885.
- [18] Matsugi, M.; Itoh, K.; Nojima, M.; Hagimoto, Y.; Kita, Y. (2004). 'A novel separation technique of diastereomeric esters of pyridylethanol by extraction: Formal total synthesis of PNU-142721, HIV-1 reverse transcriptase inhibitor'. *Tetrahedron* 60, 3311–3317.
- [19] Blanchard, N.; van de Weghe, P. (2006). 'Daucus carota L. mediated bioreduction of prochiral ketones'. *Org. Biomol. Chem.* 4, 2348–2353.
- [20] Yang, Z. H.; Zeng, R.; Yang, G.; Wang, Y.; Li, L. Z.; Lv, Z. S.; Yao, M.; Lai, B. (2008). 'Asymmetric reduction of prochiral ketones to chiral alcohols catalyzed by plants tissue'. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1047–1051.
- [21] Fonseca, A. M.; Monte, F. J. Q.; de Oliveira, M. da C. F.; de Mattos, M. C.; Cordell, G. A.; Braz-Filho, R.; Lemos, T. L. G. (2009). 'Coconut water (*Cocos nucifera* L.)-A new biocatalyst system for organic synthesis'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 57, 78–82.
- [22] Machado, L. L.; Monte, F. J. Q.; de Oliveira, M. da C. F.; de Mattos, M. C.; Lemos, T. L. G.; Gotor-Fernández, V.; de Gonzalo, G.; Gotor, V. (2008).

- 'Bioreduction of aromatic aldehydes and ketones by fruits' barks of *Passiflora edulis*'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 54, 130–133.
- [23] Theoharides, K. A.; Dukes, J. S. (2007). 'Plant invasion across space and time: factors affecting nonindigenous species success during four stage of invasion'. *New Phytol.* 176, 256–273.
- [24] Aragón, R.; Groom, M. (2003). 'Invasion by *Ligustrum lucidum* (Oleaceae) in NW Argentina: plant characteristics in different habitats types'. *Rev. Biol. Trop.* 51, 59–70.
- [25] Aragón, R.; Morales, J. M. (2003). 'Species composition and invasion in NW Argentinian secondary forests: Effects of land use history, environment and landscape'. *J. Veg. Sci.* 14, 195–204.
- [26] Hoyos, L. E.; Gavier-Pizarro, G. I.; Kuemmerle, T.; Bucher, E. H.; Radeloff, V. C.; Tecco, P. A. (2010). 'Invasion of glossy privet (*Ligustrum lucidum*) and native forest loss in the Sierras Chicas of Córdoba, Argentina'. *Biol. Invasions* 12, 3261–3275.
- [27] Gavier-Pizarro, G. I.; Kuemmerle, T.; Hoyos, L. E.; Stewart, S. I.; Huebner, C. D.; Keuler, N. S.; Radeloff, V. C. (2012). 'Monitoring the invasion of an exotic tree (*Ligustrum lucidum*) from 1983 to 2006 with Landsat TM/ETM+ satellite data and Support Vector Machines in Córdoba, Argentina'. *Remote Sens. Environ.* 122, 134–145.
- [28] Salazar, J.; Barri, F.; Cardozo, G. (2013). 'Distribución espacial y tasa de invasión de flora exótica en la Reserva Natural de Vaquerías-Provincia de Córdoba (Argentina)'. *Quad. Bot. Amb. Appl.* 24, 3–12.
- [29] De Juana, J. I. (2009). 'Taxonomía actualizada del género *Ligustrum* L.'. *Bouteloua* 6, 16–71.
- [30] Yadav, J. S.; Nanda, S.; Thirupathi Reddy, P.; Bhaskar Rao, A. (2002). 'Efficient enantioselective reduction of ketones with *Daucus carota* root'. *J. Org. Chem.* 67, 3900–3903.
- [31] Liu, X.; Pan, Z. G.; Xu, J. H.; Li, H. X. (2010). 'Enantioselective reduction of acetophenone analogues using carrot and celeriac enzymes system'. *Chinese Chem. Lett.* 21, 305–308.
- [32] Kinen, C. O.; Rossi, L. I.; de Rossi, R. H. (2009). 'Mechanism of the selective sulfide oxidation promoted by HNO₃/FeBr₃'. *J. Org. Chem.* 74, 7132–7139.
- [33] Prelog, V. (1964). 'Specification of the stereospecificity of some oxidoreductases by diamond lattice sections'. *Pure Appl. Chem.* 9, 119–130.

- [34] Bennamane, M.; Razi, S.; Zeror, S.; Aribi-Zouiouèche, L. (2018). 'Preparation of chiral phenylethanol using various vegetables grown in Algeria'. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 14, 52–56.
- [35] Bell, K. H. (1969). 'Reductive removal by sodium borohydride of side-chain oxygen from phenolic ketones'. *Aust. J. Chem.* 22, 601–605.
- [36] Neupert, A.; Röss, T.; Wittmann, J.; Hummel, W.; Gröger, H. (2010). 'Enantioselective biocatalytic reduction of non-protected hydroxyacetophenones'. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. B J. Chem. Sci.* 65, 337–340.
- [37] Sethi, M. K.; Bhandya, S. R.; Kumar, A.; Maddur, N.; Shukla, R.; Jayalakshmi Mittapalli, V. S. N. (2013). 'Chemo-enzymatic synthesis of optically pure rivastigmine intermediate using alcohol dehydrogenase from baker's yeast'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 91, 87–92.
- [38] Sethi, M. K.; Bhandya, S. R.; Maddur, N.; Shukla, R.; Kumar, A.; Jayalakshmi Mittapalli, V. S. N. (2013). 'Asymmetric synthesis of an enantiomerically pure rivastigmine intermediate using ketoreductase'. *Tetrahedron Asymmetry* 24, 374–379.
- [39] Mangas-Sánchez, J.; Rodríguez-Mata, M.; Busto, E.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. (2009). 'Chemoenzymatic synthesis of rivastigmine based on lipase-catalyzed processes'. *J. Org. Chem.* 74, 5304–5310.
- [40] Kumaraswamy, G.; Ramesh, S. (2003). 'Soaked *Phaseolus aureus* L: An efficient biocatalyst for asymmetric reduction of prochiral aromatic ketones'. *Green Chem.* 5, 306–308.

**PARTE III: OPTIMIZACIÓN
DEL PROCESO
BIOREDUCTIVO PARA
*L. lucidum***

CAPÍTULO 6: Posibilidad de disponibilidad y asequibilidad del biocatalizador vegetal: Estudio de estabilidad frente al almacenamiento

6.1 Introducción

En un mundo cada vez más globalizado, la frecuencia y la escala espacial creciente de las invasiones biológicas han establecido una mayor necesidad de monitorear la propagación de especies foráneas para tratar de evitar la destrucción de los ecosistemas autóctonos. En este sentido, las plantas invasoras son consideradas como uno de los problemas ecológicos modernos más importantes y representan una problemática que afecta notablemente la conservación de la biodiversidad de todo tipo de habitat¹.

Uno de los árboles invasores más extendidos en el centro de Argentina es el '**ligustro**' o '**siempreverde**' (*Ligustrum lucidum*, W. T. Aiton (Oleaceae))². Originario de China e importado a nuestro país para uso ornamental por el hecho de que mantiene sus hojas durante todo el año, crece rápidamente alcanzando alturas de hasta 15 m. La dispersión de la especie se realiza a través de su abundante producción de frutos (semillas) las cuales son distribuidas por las aves, además de la correspondiente propagación vegetativa que puede realizar esta especie³.

Debido a estas características, el siempreverde compite con la mayoría de las plantas nativas debido a las densas arboledas perennes que desarrolla, creando así condiciones de baja luminiscencia durante todo el año lo cual dificultan notablemente el desarrollo de otros vegetales. Esta notable característica, sumada a la alta productividad de frutos, resulta en su prevalencia dentro de los ecosistemas, provocando una pérdida sustancial de la biodiversidad autóctona. Adicionalmente, varias especies de animales pueden verse afectadas negativamente por el territorio perdido, mientras que otras, como las aves que se alimentan de los frutos, pueden ser potencialmente favorecidas. Esta situación claramente provoca un desbalance de los ecosistemas.

Por otro lado, no se puede dejar de mencionar otras posibles consecuencias del desarrollo descontrolado de estas especies vegetales foráneas. Ellas incluyen cambios en el ciclo de nutrientes de los suelos y por consiguiente, en la modificación

de sus propiedades características, tornando así más graves los efectos de su proliferación⁴.

En los últimos años, este problema ecológico ha comenzado a tener un impacto notable en las sierras de Córdoba⁵⁻⁷, por lo cual la elección del biocatalizador vegetal ha sido influenciada por el hecho de seleccionar un fruto que no solamente carece de utilidad práctica (alimenticia o industrial), sino que además genera un perjuicio a la biodiversidad de nuestra provincia. Adicionalmente, cabe mencionar que a diferencia de lo que sucede con *L. lucidum*, *E. horridum* es una maleza autóctona.

Por otra parte, uno de los mayores inconvenientes que presenta la utilización de vegetales como biocatalizadores, es su disponibilidad estacional la cual está acotada a los períodos en la cual el vegetal o sus partes se encuentran disponibles para su utilización. Este es uno de los puntos más críticos al momento de decidir la elección del biocatalizador a utilizar.

Debido a todos los motivos antes expuestos, se decidió continuar trabajando con los **frutos de *L. lucidum*** y realizar estudios tendientes a encontrar las formas más adecuadas para conservarlos, sin perder su capacidad bioreductora, y poder independizarse de su producción estacional.

Objetivo del presente Capítulo: analizar el efecto del tiempo y de las condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad del complejo enzimático de frutos de *L. lucidum* responsable de la actividad biocatalítica.

6.2 Materiales y Métodos

6.2.1 General

En todas las experiencias se utilizó el mismo procedimiento descrito en la sección 4.2.1.

6.2.2 Análisis CG-FID y CG-EM

Las separaciones cromatográficas fueron llevadas a cabo como se describe en la sección 4.2.2.

6.2.3 Cálculo de conversiones de reacción y excesos enantioméricos

Los porcentajes de conversión y los excesos enantioméricos fueron obtenidos de acuerdo a lo descrito en la sección 4.2.3.

6.2.4 Estudios de estabilidad de frutos

Se realizó una recolección de frutos maduros y sanos de siempreverde los cuales fueron secados a temperatura ambiente en lugar cerrado durante una semana hasta peso constante. Los frutos secos fueron separados en 4 lotes. Dos de estos lotes se conservaron limpios y enteros, uno a temperatura ambiente y el otro bajo refrigeración (8 ± 1 °C). Los otros dos lotes restantes, fueron sometidos a molienda en un molino de cuchillas y posteriormente fueron conservados, uno a temperatura ambiente y el otro bajo refrigeración (8 ± 1 °C). Estos lotes fueron periódicamente controlados, llevando a cabo ensayos de bioreducción con AF como sustrato modelo y utilizando la misma metodología descrita en la sección 4.2.5. Todas las reacciones fueron realizadas por duplicado. Se muestran los promedios de los valores de conversión obtenidos en cada caso, con su desviación estándar correspondiente.

6.3 Resultados y Discusión

Como se mencionó anteriormente, las mayores desventajas en utilizar plantas como fuentes de enzimas capaces de producir reacciones químicas, es tener que adaptar el proceso a las limitaciones naturales de los ciclos vegetales, a la distribución geográfica de las especies seleccionadas y al corto período de tiempo en el cual los sistemas enzimáticos de la planta permanecen sin deterioro luego de haber realizado la recolección del material vegetal. Por estos motivos, para continuar con los estudios pertinentes, estas variables fueron tenidas en cuenta para la selección del biocatalizador a utilizar en próximas experiencias.

Comparando el uso de raíces de plantas respecto a frutos, la vida útil de las raíces luego de su recolección fue notablemente más cortas. Adicionalmente la realización de la recolección de raíces ha sido más dificultosa debido a la necesidad de extraerlas desde el suelo donde se desarrollan. Por otra parte, los frutos de *L. lucidum* ofrecieron la ventaja de poseer una mayor disponibilidad y

abundancia respecto a las raíces de *E. horridum*. Estas situaciones han motivado a continuar trabajando con los frutos de *L. lucidum*.

Ligustrum lucidum fructifica entre los meses de mayo a octubre y se presentan como una baya carnosa y globosa de 0,6 a 1 cm de diámetro (Figura 6.1). Cada fruto contiene 1-2 semillas en su interior, recubiertas de pulpa que cuando se encuentra madura posee un color negruzco o azul oscuro brillante. Las semillas son semiesféricas, comprimidas ventralmente, psilado-ruguladas, ápteras, con embrión mediano y endosperma abundante⁸.



Figura 6.1: Frutos de *Ligustrum lucidum* (siempreverde) en diferentes etapas de maduración.

Para cumplir con el objetivo de establecer una metodología de conservación y propiciar la independencia estacional del proceso de fructificación, en un primer estudio los frutos maduros, limpios y enteros de siempreverde fueron congelados en un freezer y mantenidos a temperatura constante de -18°C durante 1-2 semanas. Luego de esto, se llevó a cabo una reacción utilizando los frutos descongelados y AF como sustrato. Los resultados demostraron que la capacidad reductiva de los frutos conservados mediante esta metodología disminuyó considerablemente (9% de conversión y 81% de e.e.), lo que podría estar indicando que la integridad del sistema enzimático es deteriorada por la baja temperatura. Debido a esto, esta técnica fue descartada como una metodología para la conservación y almacenamiento de los frutos.

Por otro lado, simultáneamente se realizó una recolección de frutos maduros y sanos los cuales fueron, lavados, desinfectados y posteriormente deshidratados en un lugar controlado y a temperatura de 25°C hasta peso constante (aproximadamente dos semanas). Como resultado, se observó una pérdida de peso de aproximadamente 58%.

A continuación, los frutos secos fueron separados en 4 lotes. Dos de estos lotes se conservaron limpios y enteros, uno a temperatura ambiente y el otro bajo

refrigeración (8 ± 1 °C). Los otros dos lotes restantes, fueron sometidos a molienda con un molino a cuchillas y posteriormente, uno fue conservado a temperatura ambiente y el otro bajo refrigeración (8 ± 1 °C). Los cuatro lotes fueron periódicamente controlados para analizar la evolución de la capacidad reductora de los sistemas enzimáticos en las diferentes condiciones de almacenamiento. Para ello, se sometieron a ensayos de bioreducción utilizando AF como sustrato modelo. Los resultados alcanzados pueden ser observados a continuación:

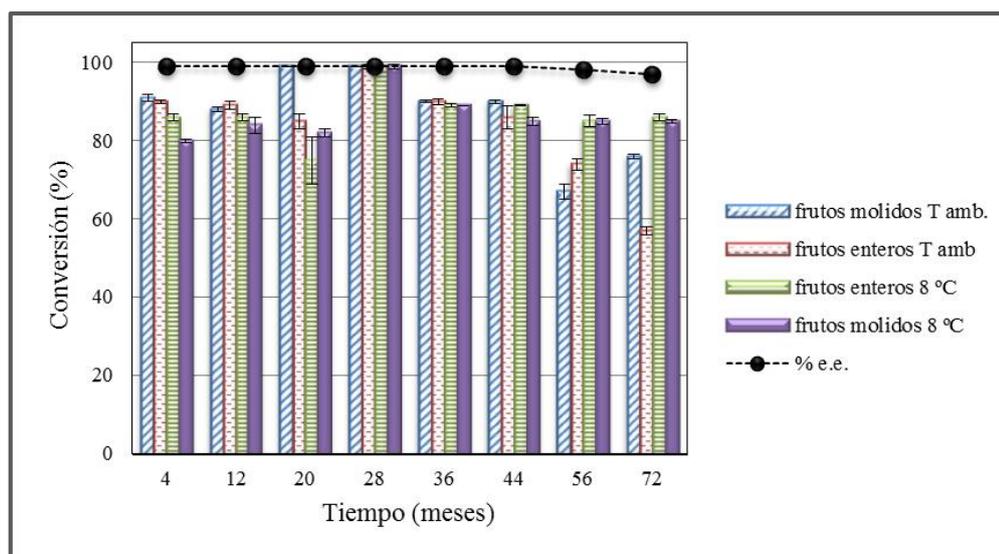


Figura 6.2. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el porcentaje de conversión y % e.e. para la reducción de AF según las diferentes formas de conservación de frutos secos de siempreverde.

Más allá de las fluctuaciones observadas en las determinaciones realizadas como una función del tiempo de almacenamiento, como se puede observar en la Figura 6.2, al menos durante los primeros 44 meses del estudio se observa que la capacidad reductiva es conservada y se mantiene aproximadamente constante. No obstante, se pueden observar algunas leves diferencias entre los lotes conservados en condiciones diferentes. Así mismo, durante este período de tiempo el exceso enantiomérico permaneció constante e invariable para todas las muestras ensayadas. Pasados los 44 meses de almacenamiento, se comienza a observar una leve disminución en la capacidad reductora del sistema, no solo de los porcentajes de conversión, sino también para el exceso enantiomérico de todas las muestras ensayadas. Es interesante destacar que los frutos conservados a 8 ± 1 °C presentaron una mejor performance a lo largo del tiempo respecto a aquellos lotes almacenados a temperatura ambiente, independientemente de la molienda.

Finalmente, es necesario manifestar que luego de 6 años de control se ha perdido un 10% de actividad reductiva frente a AF, para la mejor condición de almacenamiento (8 ± 1 °C).

Adicionalmente, es interesante mencionar que otros autores han realizado ensayos de secado de frutos de *L. lucidum* mediante la tecnología de lecho fluidizado, a temperaturas superiores a 30 °C°. Si bien se logró el objetivo propuesto en esos trabajos respecto a la disminución de la humedad de los frutos en menor tiempo, el material vegetal no funcionó como biocatalizador luego de esa operación, lo cual podríamos atribuirlo al efecto de la temperatura utilizada para el secado.

6.4 Conclusiones

En resumen, mediante una técnica simple de conservación ha sido posible independizarse de la disponibilidad estacional del fruto y de esta manera, disponer del biocatalizador vegetal durante un período de tiempo prolongado: al menos 4 años sin pérdidas significativas. Para ello, los frutos se deben recolectar en el período de fructificación, se deben lavar adecuadamente y se los debe deshidratar en lugar adecuado a una temperatura de 25 °C hasta peso constante. Posteriormente se los debe almacenar en recipientes cerrados bajo refrigeración, a una temperatura no inferior a 8 ± 1 °C.

Por otra parte, el proceso de deshidratación podría implicar una mejora en la relación sustrato/biomasa, ya que se ha observado una pérdida de peso del 58%, y de esta manera podría estudiarse el aumento de productividad del sistema.

Finalmente, es importante remarcar que hasta donde se ha revisado la literatura de referencia, al día de la fecha no existen estudios que hayan reportado alguna metodología de conservación de un biocatalizador vegetal que permita eliminar el problema su disponibilidad estacional. Más aún, como resultado de los estudios de estabilidad frente al almacenamiento por un período de tiempo prolongado, claramente ha quedado demostrado que los frutos de *L. lucidum* convenientemente deshidratados y conservados pueden ser utilizado como un reactivo químico clásico para llevar a cabo reacciones de reducción estereoselectiva de AF.

6.5 Bibliografía

- [1] Theoharides, K. A.; Dukes, J. S. (2007). 'Plant invasion across space and time: factors affecting nonindigenous species success during four stage of invasion'. *New Phytol.* 176, 256–273.
- [2] Aragón, R.; Morales, J. M. (2003). 'Species composition and invasion in NW Argentinian secondary forests: Effects of land use history, environment and landscape'. *J. Veg. Sci.* 14, 195–204.
- [3] Aragón, R.; Groom, M. (2003). 'Invasion by *Ligustrum lucidum* (Oleaceae) in NW Argentina: plant characteristics in different habitats types'. *Rev. Biol. Trop.* 51, 59–70.
- [4] Kolb, A.; Diekmann, M. (2004). 'Effects of environment, habitat configuration and forest continuity on the distribution of forest plant species'. *J. Veg. Sci.* 15, 199–208.
- [5] Hoyos, L. E.; Gavier-Pizarro, G. I.; Kueimmerle, T.; Bucher, E. H.; Radeloff, V. C.; Tecco, P. A. (2010). 'Invasion of glossy privet (*Ligustrum lucidum*) and native forest loss in the Sierras Chicas of Córdoba, Argentina'. *Biol. Invasions* 12, 3261–3275.
- [6] Gavier-Pizarro, G. I.; Kueimmerle, T.; Hoyos, L. E.; Stewart, S. I.; Huebner, C. D.; Keuler, N. S.; Radeloff, V. C. (2012). 'Monitoring the invasion of an exotic tree (*Ligustrum lucidum*) from 1983 to 2006 with Landsat TM/ETM+ satellite data and Support Vector Machines in Córdoba, Argentina'. *Remote Sens. Environ.* 122, 134–145.
- [7] Salazar, J.; Barri, F.; Cardozo, G. (2013). 'Distribución espacial y tasa de invasión de flora exótica en la Reserva Natural de Vaquerías-Provincia de Córdoba (Argentina)'. *Quad. Bot. Amb. Appl.* 24, 3–12.
- [8] De Juana, J. I. (2009). 'Taxonomía actualizada del género *Ligustrum* L.'. *Bouteloua* 6, 16–71.
- [9] Minniti, A.; Viglione Lara, M. (2016). 'Modelado y simulación de la operación de secado de material vegetal mediante la tecnología de lecho fluidizado'. *Proyecto integrador Ingeniería Química. FCEfYN-UNC.*

CAPÍTULO 7: Optimización de las condiciones de reducción con *L. lucidum*

7.1 Introducción

Para llevar a cabo biotransformaciones eficientes, es necesario que la molécula del sustrato establezca un contacto estrecho con las enzimas responsables de su transformación. Para que esta interacción sea eficiente, las condiciones del medio en el cual se lleva a cabo esta interacción deben ser ajustadas y controladas adecuadamente¹.

Si bien los biocatalizadores pueden ser empleados en un rango limitado de condiciones en las cuales su funcionamiento es óptimo, se ha descrito que en algunas situaciones particulares las condiciones de reacción pueden exceder por mucho a aquellas que normalmente suceden en los ambientes metabólicos de los organismos vivos en los cuales se ha producido su evolución (medios acuosos de pH y fuerza iónica controlados, temperatura compatible con el crecimiento de un organismo determinado, etc.)^{2,3}. Debido a esto, utilizar células enteras como biocatalizadores posee la ventaja de propiciar un ambiente controlado donde la estabilidad del sistema enzimático es regulada adecuadamente. Al trabajar en estas condiciones, los sistemas enzimáticos se encuentran protegidos dentro de su entorno natural e incluyen los cofactores y sus sistemas de regeneración, los cuales son necesarios para llevar a cabo la actividad catalítica. Esto, a su vez se traduce en un costo de funcionamiento del sistema más bajo debido a que no es necesario agregar al sistema los costos cofactores/coenzimas responsables de promover la regeneración de la enzima⁴.

No obstante, es necesario remarcar que el empleo de medios no convencionales para llevar a cabo biotransformaciones ha permitido en la actualidad, extender notablemente la aplicación de la biocatálisis hacia sistemas más complejos⁵⁻⁸.

En el presente capítulo se describe el trabajo llevado a cabo, para optimizar las condiciones de bio-reducción utilizando los frutos de *Ligustrum lucidum*. Para ello, se realizaron experiencias utilizando AF como sustrato modelo y el efecto de variables tales como parte de vegetal utilizada, hidratación previa del vegetal, temperatura de reacción, pH del medio de reacción, fuerza iónica del buffer utilizado, cosolvente y concentración utilizada del mismo y aumento de la carga de sustrato han sido

convenientemente establecidas. Los objetivos fundamentales del proceso de optimización han sido, por un lado, tratar de disminuir los tiempos de reacción y por otro, aumentar la carga de sustrato a reducir manteniendo los valores de conversión y estereoselectividad.

Objetivo del presente Capítulo: Establecer las condiciones óptimas de reacción a escala laboratorio de la bioreducción estereoselectiva de AF utilizando frutos de *L. lucidum* como biocatalizador.

7.2 Materiales y Métodos

7.2.1 General

En todas las experiencias se ha utilizado el mismo procedimiento descrito en la sección 4.2.1.

7.2.2 Biocatalizador: frutos de *L. lucidum*

Frutos maduros y sanos de *Ligustrum lucidum* (siempreverde) fueron recolectados el 8 de agosto de 2013 en diversos puntos de la Ciudad de Córdoba e identificados convenientemente por un experto botánico. Para llevar a cabo los estudios, los frutos fueron preparados según el procedimiento descrito en la sección 4.2.4. En el caso de las experiencias realizadas utilizando frutos frescos, ellos fueron utilizados inmediatamente después de su recolección. Los frutos así obtenidos fueron molidos hasta obtener una pasta heterogénea utilizando un molino de cuchillas previamente desinfectado.

7.2.3 Deshidratación de frutos

Para aquellas pruebas que fueron realizadas utilizando frutos deshidratados, los mismos fueron previamente secados a temperatura ambiente, en un espacio protegido de la contaminación, hasta peso constante (15 días aproximadamente). La pérdida de humedad resultante ha sido del 58% p/p. Posteriormente fueron almacenados en frascos de plástico con tapa hermética y almacenados a temperatura ambiente.

7.2.4 Separación de las diferentes partes secas del fruto

Los frutos secos se sometieron a una molienda suave utilizando un molino de cuchillas. Con esta operación se logra descascarar los frutos secos. Posteriormente, se procede a separar las semillas de los restos de cáscaras utilizando un sistema de separación por flotación en aire. Este sistema se basa en la diferencia de densidad de la cáscara y la pulpa seca respecto al de las semillas, siendo las semillas más densas. Para ello se ha construido el sistema de separación esquematizado en la Figura 7.1.

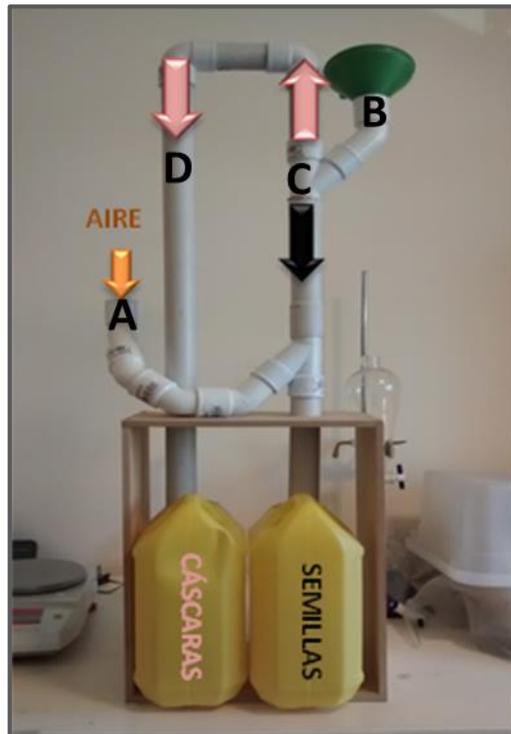


Figura 7.1: Sistema de separación de semillas por flotación con una corriente de aire

En el punto **A** ingresa la corriente de aire a temperatura ambiente, mediante un equipo externo de insuflado. Es importante no elevar la temperatura del sistema para evitar la inactivación del sistema enzimático del biocatalizador. En el punto **B** se ingresa el material vegetal (semillas y cáscaras secas). Al encontrarse con la corriente de aire en la intersección **C**, las partículas más livianas seguirán por la ruta **D** hacia el recipiente 'cáscaras', mientras que las partículas de mayor densidad caerán al reservorio 'semillas'.

7.2.5 Biorreducciones

Se llevó a cabo una adaptación del procedimiento descrito en la sección 4.2.5. Se colocó la muestra vegetal seca (10 g) en un Erlenmeyer desinfectado (250 mL) con buffer fosfato (75 mL, pH: 5,0-8,0; 100 mM), y luego se añadió el sustrato (50 - 280 mg) disuelto en DMSO (0,67-8% p/v en mezcla reactiva final). La reacción se desarrolló con agitación orbital (120 rpm) a 20-35 °C, con el Erlenmeyer cerrado y protegido de la luz directa. Finalmente, el producto fue extraído del crudo de reacción con acetato de etilo. Sólo se realizan ensayos por duplicado en el estudio del efecto de la temperatura, donde se muestran los promedios de los valores de conversión obtenidos con su desviación estándar correspondiente.

7.2.6 Análisis CG-FID y CG-EM

Las separaciones cromatográficas fueron llevadas a cabo como se describe en la sección 4.2.2.

7.2.7 Cálculo de conversiones de reacción y excesos enantioméricos

Los porcentajes de conversión y los excesos enantioméricos fueron obtenidos de acuerdo a lo descrito en la sección 4.2.3.

7.3 Resultados y Discusión

7.3.1 Identificación del sitio donde se encuentran las enzimas responsables del proceso de biorreducción.

Las reacciones descritas en capítulos anteriores fueron llevadas a cabo utilizando los frutos frescos, maduros y molidos de *L. lucidum*. Debido a que se desconoce en qué fracción del fruto se encuentra mayormente concentrado el sistema enzimático responsable del proceso de biotransformación se decidió llevar a cabo una serie de experiencias para tratar de establecer en qué parte del fruto se encuentran las enzimas que catalizan la conversión de AF a (S)-1-FE. Los resultados de las experiencias realizadas son detallados a continuación en la tabla 7.1. Adicionalmente y para poder de comparar, en la Tabla 7.1 (entrada 1), se incluye el resultado de la reducción de AF a escala laboratorio, utilizando frutos frescos, maduros y molidos de *L. lucidum*. Todas las reacciones fueron analizadas luego de transcurridos 6 días de transformación.

Tabla 7.1: Reacciones de reducción de AF promovida por frutos de <i>L. lucidum</i> en diferentes condiciones.			
Entrada	Condición del fruto utilizada	conversión (%) ^{a,b}	e.e. (%) ^{a,c}
1	Fruto fresco maduro molido	94	>99(S)
2	Extracto acuoso (sobrenadante pre-hidratación frutos frescos)	0	nd ^d
3	Sedimento resuspendido (frutos frescos pre-hidratados filtrados)	70,9	>99(S)
4	Cáscara + pulpa fruto seco, sin semillas	0	nd
5	Semillas enteras secas	97	>99(S)
6	Semillas partidas secas	97	>99(S)
7	Harina de semillas fruto seco	0	nd

^a Determinado por análisis quiral en CG
^b Porcentaje de reducción
^c Porcentaje de exceso enantiomérico y entre paréntesis configuración absoluta
^d nd: no detectado
Condiciones de reacción: T=20 °C; t=6 días; pH=6,5; masa biocatalizador=10 g

Para establecer si la reacción se produce dentro de las partículas sólidas del fruto o si las enzimas se solubilizan en el medio acuoso y la reacción transcurre el seno de la solución, se llevó a cabo serie de experiencias utilizando frutos frescos, maduros previamente molidos. Para ello, los frutos molidos fueron pre-hidratados durante 8 h en la solución buffer y posteriormente, por filtración se separó el material en suspensión del sobrenadante. De esta manera, por un lado, se llevó a cabo una reacción utilizando el sobrenadante (sin material sólido en suspensión) y por otro, el material sólido obtenido en la filtración fue resuspendido en una solución fresca del buffer. Para llevar a cabo la reacción, a ambas soluciones se les agregó la cantidad adecuada de AF.

Como se puede observar en la Tabla 7.1, (entrada 2), no se observó reacción de reducción de la AF cuando se utilizó la solución buffer de remojo que no contenían las partículas del fruto. Por el contrario, (Tabla 7.1, entrada 3), al utilizar las partículas del fruto resuspendidas en buffer fresco se observó la reducción de AF. Este resultado podría demostrar que la reducción estereoselectiva de la AF ocurre en el interior de las partículas del fruto de *L. Lucidum* y que las enzimas responsables de este proceso permanecen en el interior de las partículas las cuales no son solubilizadas en el medio de reacción. Como contraparte, es importante mencionar que en el trabajo reportado por Xie y colaboradores⁹ se observó que utilizando un extracto acuoso obtenido a partir de semillas de *Phaseolus angularis* (porotos Adzuki), ocurre la reducción de AF. Esta situación opuesta a la observada en las experiencias utilizando el material resuspendido, podría deberse a la

imposibilidad de extraer la enzima del sistema vegetal o a que se haya logrado una extracción enzimática parcial en el medio acuoso, pero sin disponibilidad de los cofactores necesarios. No obstante, estudios más profundos son necesarios para respaldar esta hipótesis.

En vista de los resultados alcanzados y para reforzar la hipótesis planteada de que la reacción transcurre dentro del material vegetal, se sometió a una muestra de frutos secos a separación mecánica para, por un lado, obtener la pulpa seca y la cáscara del fruto y por otro las semillas enteras. Una vez obtenida la separación, se llevaron a cabo experimentos de reducción de AF utilizando, por un lado, la pulpa seca y la cáscara (Tabla 7.1, entrada 4) y por otro, las semillas enteras (Tabla 7.1, entrada 5). Como resultado de dichos estudios se puede observar que solamente las semillas mostraron actividad catalítica mientras que la pulpa seca y las cáscaras fueron totalmente inertes. Estos resultados son importantes por dos motivos: primero, se ha logrado identificar a las semillas como el sitio en el que se ubicaban las enzimas responsables de la reacción y segundo, la eliminación de parte de la masa no activa del biocatalizador puede mejorar la relación entre la carga del sustrato y la masa del catalizador utilizado. Esto, además, podría permitir la pre-concentración del sistema enzimático y mejorar la performance del sistema de reacción.

Adicionalmente, con el objetivo de aumentar la superficie de contacto efectiva del biocatalizador y favorecer el proceso reductivo, se llevaron a cabo experiencias utilizando semillas secas molidas. En la Tabla 7.1, entrada 6, se muestran los resultados obtenidos con semillas partidas, mientras que en la entrada 7 de la misma tabla, se observan los resultados de la reacción llevada a cabo con harina obtenida a partir de las semillas (molienda y tamizado).

Como puede observarse en la Tabla 7.1 (entradas 5 y 6), no hubo diferencias entre la utilización de las semillas enteras y las semillas partidas. No obstante, cabe mencionar aquí, que es posible que el particionado de las semillas exponga al medio de reacción sustancias grasas propias del material vegetal, favoreciendo así la formación de una emulsión durante el procedimiento de extracción con solvente, y por lo tanto, obstaculizando los procedimientos de separación del producto formado. Por otra parte, y contrariamente a lo esperado, al emplear harina de las semillas (tabla 7.1, entrada 7) la reacción falló por completo. Esta situación posiblemente fue debida a la inactivación del complejo enzimático, provocada por

sobrecalentamiento del material vegetal en la etapa de molienda, o por la pérdida del ambiente celular interno.

Debido a los resultados obtenidos durante el transcurso de las experiencias detalladas anteriormente, se decidió utilizar sólo las semillas enteras obtenidas por separación mecánica de frutos maduros secos para llevar a cabo futuros ensayos.

7.3.2 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción

Una de las mayores desventajas de los procedimientos biocatalíticos es que, en algunos casos, los tiempos de reacción son prolongados comparados a los procedimientos químicos clásicos. Si bien todas las reacciones químicas aumentan su velocidad con el aumento de la temperatura, esta afirmación tiene sus limitaciones cuando los sistemas de reacción involucran la acción de enzimas. La temperatura es un factor crítico en un proceso biocatalítico, ya que este parámetro tiene una influencia significativa en la actividad, selectividad y estabilidad de los complejos enzimáticos¹⁰⁻¹² haciendo que cada enzima tenga una temperatura óptima o rango de temperaturas a las cuales la reacción de transformación del sustrato puede ocurrir eficientemente.

Por este motivo, se realizaron estudios tendientes a determinar la temperatura óptima de la reacción y de esta manera tratar de acortar los tiempos del proceso en los cuales la AF es transformada en (S)-1-FE.

Para determinar el efecto de la temperatura en la producción de (S)-1-FE, se realizaron ensayos a 20, 25, 30 y 35 °C utilizando 50 mg de AF como sustrato modelo, en las condiciones de reacción descritas en la sección 7.2.5. La reacción fue llevada a cabo durante 90 h y el progreso de los experimentos fue determinado tomando muestras a diferentes tiempos. Para calcular las constantes de velocidad de reacción, los perfiles cinéticos se ajustaron a ecuaciones de primer orden usando el software OriginPro 8. Los resultados se pueden observar en la Figuras 7.2.

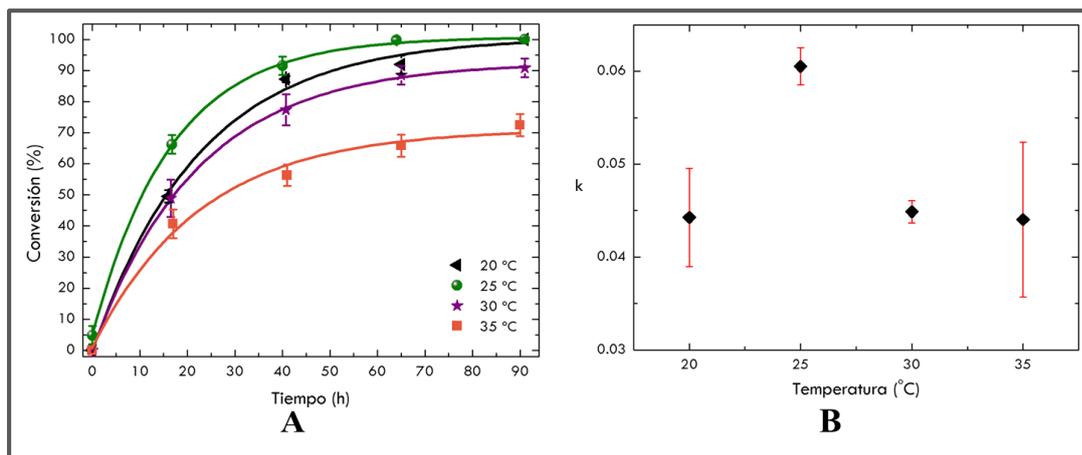


Figura 7.2: **A**-Cinéticas de conversión de AF a (S)-1-FE a diferentes temperaturas, biocatalizadas por semillas secas de *L. lucidum*.
B-Constantes de velocidad de reacción a diferentes temperaturas.

Como se puede observar en las Figuras 7.2 A, la temperatura tiene un efecto visible sobre el proceso reductivo. Cuando la reacción se realizó a 35 °C, el porcentaje de conversión final fue igual a 72% siendo menos eficiente el proceso de reducción, en esas condiciones experimentales. Por otro lado, se halló que la temperatura a la cual el proceso alcanza el mayor valor de conversión en menor tiempo de reacción fue la experiencia realizada a 25 °C. En la Figura 7.2 A, se puede observar que la reacción terminó aproximadamente a las 65 h de reacción (con un 97% de conversión). En la Figura 7.2 B, se muestran las constantes de velocidad en función de la temperatura, y se puede constatar que la constante de velocidad para 25 °C ha sido la más alta, significativamente diferente a las constantes obtenidas a otras temperaturas, en concordancia con lo expuesto anteriormente. También se debe remarcar que, en todas las experiencias desarrolladas, el exceso enantiomérico se mantuvo constante y con un desempeño excelente (> 99%), independientemente de la temperatura de trabajo.

Estos ensayos realizados a diferentes temperaturas, ponen de manifiesto claramente la sensibilidad de los complejos enzimáticos a esta variable. Por un lado, se ha podido establecer una temperatura óptima de trabajo y por otro, ha quedado demostrado que temperaturas superiores a 25 °C no solo no aumentan la velocidad de reacción, sino que además disminuyen la conversión de AF en (S)-1-FE. Estas últimas observaciones pueden deberse al hecho de que a temperaturas mayores a 25 °C comienza a inactivarse el complejo enzimático responsable de la reacción de reducción de la AF a (S)-1-FE, sin tener efecto sobre las características conformacionales del sitio activo de la enzima ya que el exceso enantiomérico

permaneció invariable al modificar la temperatura. No obstante, es indudable que estudios adicionales son necesarios.

7.3.3 Efecto de la hidratación previa del material vegetal

Teniendo en cuenta que el material vegetal utilizado se encontraba deshidratado por el proceso de secado realizado oportunamente y descrito en la sección 7.2.3, se consideró la posibilidad de acortar los tiempos de reacción ensayando una rehidratación del material, previo a llevar a cabo el proceso biocatalítico.

Para ello, se dejó en reposo 10 g del material vegetal con el buffer a utilizar durante 12 h aproximadamente, previo a iniciar la reacción. Los ensayos fueron realizados a 25 °C, realizando al mismo tiempo un control con las semillas sin hidratación previa, y en ambos casos por duplicado. Se tomaron muestras para determinar la evolución de la reacción y de esta manera obtener la cinética de descrita por el proceso hasta las 100 h.

Los resultados de estas pruebas, demostraron que existe una fase de retardo o letargo inicial en la cinética de reacción donde no se observa reducción (aproximadamente 8 h). Por lo tanto, no se han podido discriminar tendencias en las primeras 8 h de reacción como para considerar que la hidratación previa posea un efecto determinante de aceleración del proceso de biotransformación de la AF. Se podría suponer que este retraso se debe al tiempo necesario de movilidad del sustrato hacia el lugar donde se halla el sistema enzimático responsable del proceso reductivo (dentro de la semilla). Sin embargo, las causas de este comportamiento podrían ser muy variadas, y no ha sido objetivo de este trabajo investigar sobre las mismas.

7.3.4 Efecto del pH del buffer utilizado

Como es sabido, el pH es un factor clave en las reacciones biocatalíticas, ya que puede alterar el estado iónico del sustrato y/o modificar la ionización del sitio activo de las enzimas involucradas en el proceso afectando en consecuencia, el encaje del sustrato en el sitio activo de la enzima¹³⁻¹⁵. Además, cuando una reacción es catalizada por varias enzimas con diferentes selectividades, la variación de los valores de pH cambia el rendimiento del producto y el valor de exceso enantiomérico final.

A modo de reacción control, se realizó inicialmente una reacción utilizando frutos frescos maduros molidos y agua destilada como solvente de reacción. En este

caso la eficiencia de la reacción, tanto en conversión como en estereoselectividad, disminuyó levemente. Esta situación podría estar poniendo de manifiesto que la regulación del pH es necesaria para el correcto funcionamiento del sistema enzimático o bien es necesario que el medio de reacción presente una fuerza iónica adecuada para que la reacción transcurra adecuadamente. Para apoyar estas afirmaciones, se llevaron a cabo estudios cinéticos de la reducción de AF (50 mg), a una temperatura constante de 25 °C, utilizando la metodología descrita en la sección 7.2.5 con buffer fosfato a diferentes pH (5,0; 6,0; 6,5; 7,0 y 8,0 upH). Se tomaron muestras periódicamente y se analizaron mediante CG-FID quiral. En la Figura 7.3 se muestran los perfiles cinéticos de los ensayos.

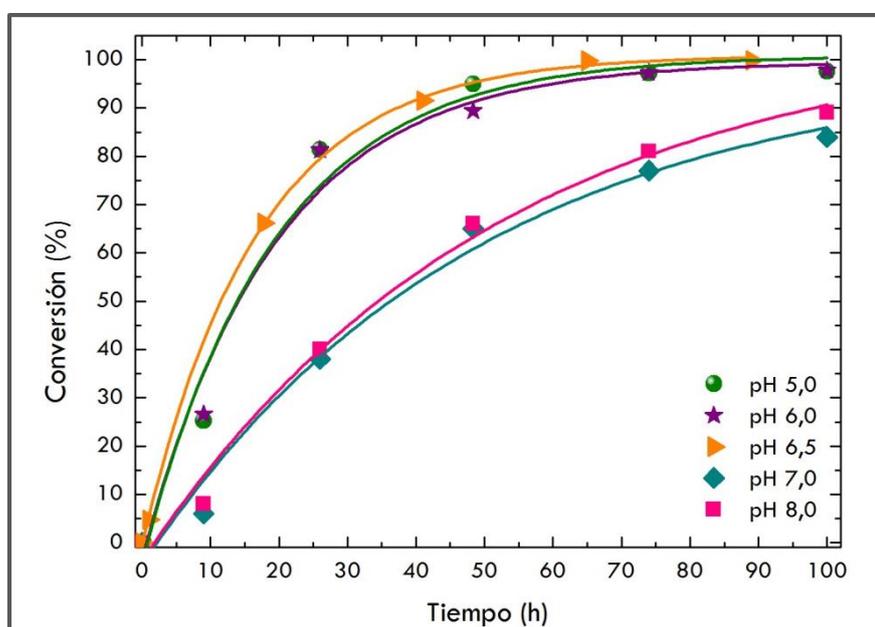


Figura 7.3. Cinéticas de reducción de AF por *L. lucidum* a diferentes pH del medio de reacción (T=25 °C; masa semillas secas=10 g).

Como puede observarse en la Figura 7.3, para valores de pH comprendidos entre 5,0 y 6,5 las cinéticas de reacción muestran tendencias similares, mientras que a valores de pH mayores o iguales a 7 la eficiencia de la reacción disminuye marcadamente. De hecho, para un valor de pH en el rango de 5,0-6,5 el final de la reacción se alcanza aproximadamente luego de 70 h (conversión > 95%), mientras que para valores de pH más altos la reacción no se ha completado en el mismo transcurso de tiempo. En base a esta evidencia, y debido a que existe una zona de aparente estabilidad en el rango de 5,0-6,5 upH, se ha considerado conveniente llevar a cabo los ensayos en un medio buffer con un valor de pH de 6,0.

7.3.5 Efecto del cosolvente utilizado

Aunque los sistemas biocatalíticos tienen el beneficio medioambiental de que el disolvente utilizado como medio de reacción es agua, esto también puede ser un inconveniente cuando los sustratos utilizados son moléculas orgánicas cuya solubilidad en este solvente es baja o nula. Sin embargo, esta situación puede resolverse mediante el uso de un cosolvente para aumentar la solubilidad del sustrato en el medio de reacción. No obstante, resulta evidente que debe determinarse previamente el posible efecto tóxico del cosolvente sobre la eficiencia enzimática¹⁶.

Es sabido que el empleo de solventes orgánicos permite mantener concentraciones mayores de sustratos y cosustratos en el medio de reacción. Más aún, si fuera posible, la elección adecuada de sistemas bifásicos o emulsiones podría permitir regular la concentración de los sustratos o productos en la fase en la que se encuentra el biocatalizador, disminuyendo así los efectos negativos que ocurrieren por inhibición o toxicidad¹⁷. Debido a esto, el uso de solventes orgánicos en reacciones catalizadas por enzimas ha permitido extender su aplicación a la transformación de sustratos que no son solubles en agua. El hecho de que esta metodología se haya aplicado con éxito, no solamente demuestra que las enzimas son capaces de mantener su estabilidad en el medio orgánico, sino que la especificidad de sustrato que puede presentar un biocatalizador puede ser lo suficientemente amplia como para aceptar moléculas estructuralmente diferentes a las que son transformadas naturalmente en el medio biológico por el mismo biocatalizador¹⁸.

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, se procedió a ensayar 12 cosolventes orgánicos a una concentración de 0,67% p/v, para llevar a cabo la bio-reducción de AF, utilizando la misma metodología experimental descrita en la sección anterior por un tiempo total de 75 h de reacción. Simultáneamente, a modo de control, se llevó a cabo un ensayo sin el agregado de cosolvente. El avance de la reacción fue determinado tomando muestras a intervalos de tiempo regulares y se analizándolas por CG-FID quiral. Los resultados de porcentaje de conversión y de exceso enantiomérico se muestran a continuación en la Figura 7.4.

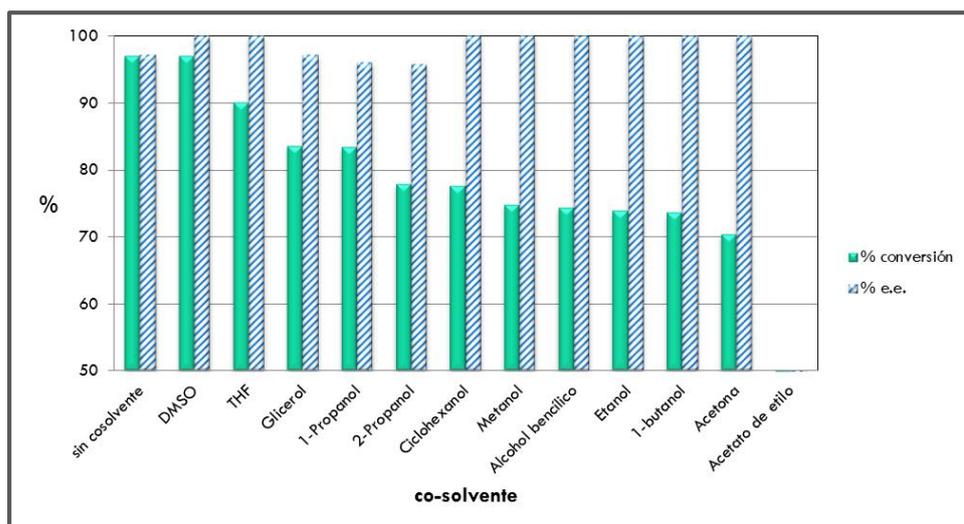


Figura 7.4: Efecto del cosolvente utilizado sobre la conversión y exceso enantiomérico de la reacción.

De los doce cosolventes ensayados, la mayoría tuvo efectos inhibitorios sobre el proceso de bioreducción, siendo el acetato de etilo el único que promovió una inhibición completa. Por otra parte, el DMSO fue el único cosolvente que no produjo un efecto adverso. Más aún, este cosolvente demostró tener una tendencia ligeramente beneficiosa sobre el exceso enantiomérico en comparación con la reacción realizada sin cosolvente.

Por otro lado, los ensayos realizados utilizando glicerol, 1-propanol, 2-propanol y sin cosolvente dieron como resultado una ligera disminución en la estereoselectividad de la reacción, mientras que los demás cosolventes ensayados no mostraron efectos sobre la pureza enantiomérica alcanzada. Es importante mencionar que, debido a que los resultados alcanzados sin la utilización de un cosolvente fueron aceptables, en el que caso que fuera posible se podría prescindir del solvente orgánico, haciendo la reacción ambientalmente más amigable. No obstante, si bien la AF es muy soluble en medio acuoso en las concentraciones aquí requeridas (solubilidad en agua: 5,5 g/L a 25 °C), otras cetonas proquirales de interés industrial y farmacológico ensayadas previamente (capítulos 4 y 5), no lo son. Debido a esto, aquí reside la importancia de encontrar un solvente orgánico compatible con el proceso de bioreducción que facilite no solo la solubilización de los sustratos en el medio de reacción, sino que no afecte el desempeño del sistema enzimático debido a su toxicidad.

Considerando los resultados obtenidos en estos experimentos, se decidió continuar utilizando al DMSO como cosolvente en los ensayos sucesivos.

Adicionalmente, el efecto de la cantidad de DMSO utilizado también fue estudiado, debido a que, si bien un aumento de la concentración del cosolvente puede mejorar la solubilidad de sustratos poco solubles en un medio acuoso, no puede descartarse un aumento de efectos tóxicos sobre el sistema enzimático. Por este motivo, se realizaron ensayos con concentraciones de DMSO de 0,67% p/v hasta 8,00% p/v, en las condiciones óptimas antes descritas, para un tiempo total de reacción de 72 h. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7.5.

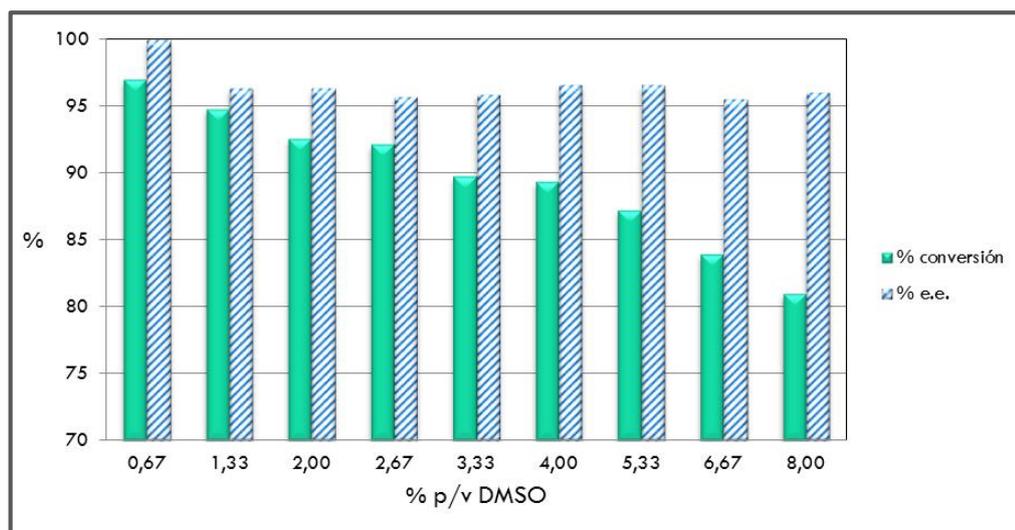


Figura 7.5: Efecto de la concentración de DMSO sobre la eficiencia de conversión y el exceso enantiomérico de la reacción ($T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $t=72\text{ h}$; masa semillas secas=10 g; $\text{pH}=6$).

Como se puede observar en la Figura 7.5, para concentraciones superiores a 0,67% p/v de DMSO comienza a visualizarse una tendencia de disminución continua en la capacidad reductiva del biocatalizador. En base a los resultados alcanzados durante el transcurso de estas experiencias, la concentración óptima de DMSO para llevar a cabo las bio reducciones con *L. lucidum* ha sido establecida en 0,67% p/v.

7.3.6 Efecto de la concentración de sustrato

Una de las principales desventajas de los métodos bioquímicos es, en general, la baja relación sustrato/biocatalizador, en comparación con la de las metodologías químicas clásicas^{12,19,20}. En consecuencia, es importante determinar el efecto tóxico de la concentración de sustrato sobre la eficiencia del proceso. Para ello se registró la evolución de la reducción a lo largo del tiempo a concentraciones crecientes de AF (0,67 g/L a 3,73 g/L), manteniendo las condiciones de reacción óptimas establecidas previamente. Estos ensayos se controlaron cada 24 h durante un

período de tiempo total de reacción de 144 h. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en las Figuras 7.6.

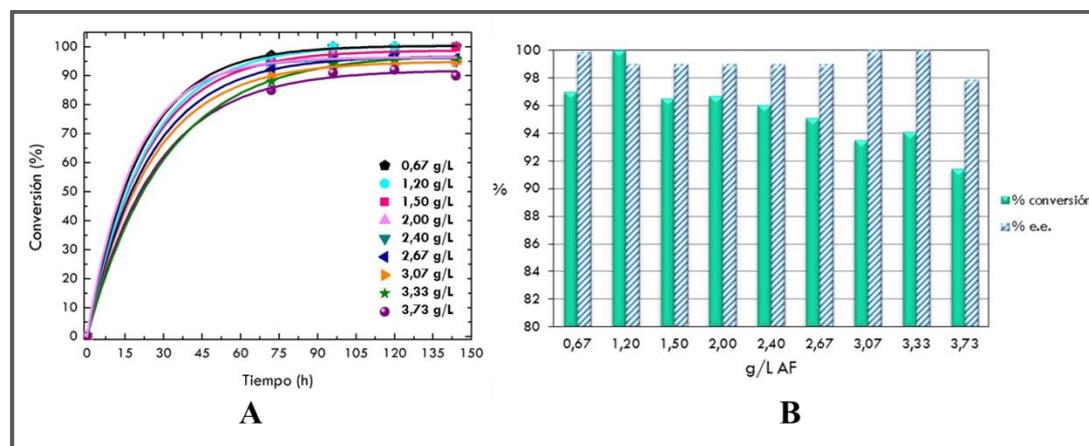


Figura 7.6: **A**-Efecto del aumento de carga de sustrato sobre la conversión de AF a (S)-1-FE en función del tiempo de reacción ($T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, masa semillas secas *L. lucidum*=10 g; $\text{pH}=6$).

B- Porcentaje de conversión y exceso enantiomérico a 72 h de reacción para cada concentración de sustrato.

Como se puede apreciar en la Figura 7.6 B, no se han observado diferentes tendencias en la enantioselectividad del proceso al variar la concentración de sustrato. Sin embargo, se observan valores variables de porcentajes de conversión al aumentar la carga de sustrato (97% de conversión a 0,67 g/L de AF, mientras que a 3,73 g/L de AF el porcentaje de conversión fue del 91%). Además, en las Figuras 7.6 A y B, se puede observar que fue posible usar una concentración de sustrato de hasta 2,67 g/L sin incurrir en una reducción en la eficiencia (porcentajes superiores a 95) y en un tiempo de reacción aceptable (72 h). Por lo tanto, fue posible cuadruplicar la concentración de AF (0,67 g/L a 2,67 g/L) y así aumentar la relación sustrato/biocatalizador, con poca pérdida en la eficiencia del proceso de reducción.

7.3.7 Capacidad de reciclado del biocatalizador

La posibilidad de reusar el catalizador para varios ciclos sucesivos de transformaciones sería, sin duda, una gran ventaja, ya que se podría disminuir la cantidad de residuos generados, los costos de producción^{16,21} y, a futuro, considerar la viabilidad de un sistema continuo^{20,22,23}. Por ello, se ha investigado la viabilidad de reciclar las semillas de *L. lucidum* para llevar a cabo la bioreducción de AF, en las condiciones óptimas de reacción descritas en las secciones previas. Entre cada

ciclo de la reacción, las semillas se recuperaron por filtración y se lavaron sucesivas veces con agua destilada, antes de reutilizarse para la siguiente ejecución. Cada ciclo de biotransformación comprendió 72 h y el avance de la reacción fue determinado tomando muestras las cuales se analizaron por CG-FID quiral. Los resultados alcanzados se muestran a continuación en la Figura 7.7.

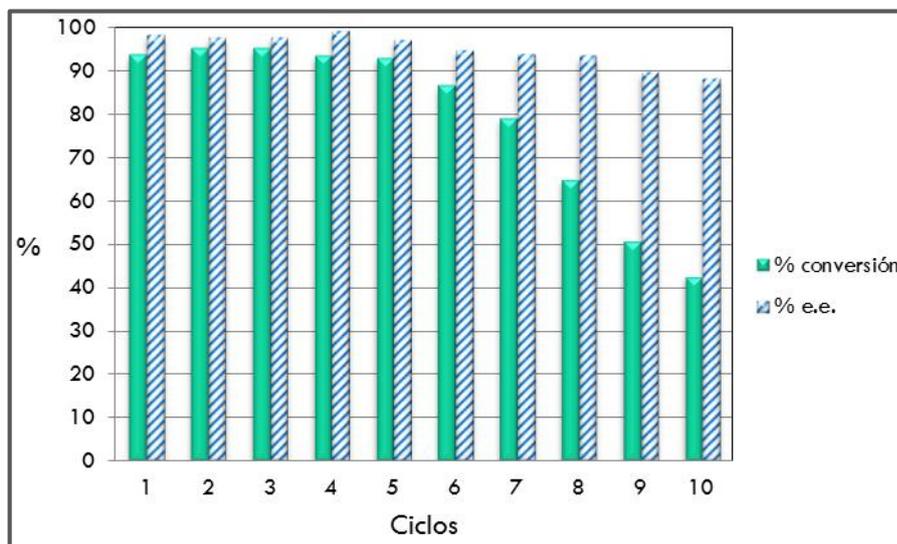


Figura 7.7: Efecto del reciclado de semillas de *L. lucidum* como biocatalizador para la reducción de AF α (S)-1-FE ($T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $t=72\text{ h}$; $\text{pH}=6$).

Como se puede observar en la Figura 7.7, las semillas de *L. lucidum* no pierden sus propiedades biocatalíticas desde el primer al quinto ciclo de reutilización, manteniendo los valores de conversión y enantioselectividad. Cuando se empleó el biocatalizador en su quinto ciclo de reuso, la conversión obtenida fue del 93% con un 97% de exceso enantiomérico. No obstante, en los ciclos de reutilización posteriores, la conversión comenzó a disminuir gradualmente hasta alcanzar el 43% de conversión con un 88% e.e. en el décimo ciclo. Debido a los resultados alcanzados en estas experiencias se ha logrado determinar como posible la reutilización del biocatalizador hasta cinco ciclos.

A modo de resumen comparativo, se exponen las variables estudiadas y sus respectivas condiciones óptimas establecidas para este proceso reductivo.

Tabla 7.2: Resumen de variables de reacción optimizadas para la bioreducción de AF con *L. lucidum* (10 g de material vegetal como biocatalizador)

VARIABLE	VALOR INICIAL	VALOR OPTIMIZADO
Biocatalizador vegetal	Fruto maduro, fresco y molido	Semillas enteras
Temperatura	20 °C	25 °C
Hidratación previa	Fruto entero fresco	Semillas dishidratadas
Buffer/pH medio	Fosfato 100 mM pH 6,5	Fosfato 100 mM pH 6,0
Cosolvente	0,67% p/v DMSO	0,67% p/v DMSO
Carga sustrato	0,67 g/L AF	2,67 g/L AF
Reutilización	1 ciclo	5 ciclos
Tiempo de biotransformación	6 días	3 días

7.4 Conclusiones

Los resultados alcanzados durante los estudios para optimizar el proceso de reducción estereoselectivo de la AF promovido por los frutos de *L. lucidum* demostraron que las enzimas responsables de la biotransformación se encuentran localizadas mayoritariamente en el interior de las semillas. Más aún, estos resultados mostraron que es posible eliminar parte del fruto (pulpa seca y cáscara) las cuales son inertes frente al proceso estudiado. Debido a esto, fue posible multiplicar por un factor de ≈ 4 , la relación de carga de sustrato/biocatalizador con respecto a los estudios iniciales de esta tesis utilizando los frutos frescos. Sin lugar a dudas, esto representa una mejora significativa en la productividad del sistema estudiado.

Por otra parte, también se estableció que la utilización de DMSO como cosolvente produjo una leve mejoría en los excesos enantioméricos respecto a la reacción llevada a cabo utilizando solamente una solución buffer como medio de reacción. Esta condición, claramente amplifica la posibilidad de llevar a cabo reacciones utilizando sustratos de baja solubilidad en agua.

Adicionalmente, la posibilidad de reutilización que presentaron las semillas enteras hasta cinco ciclos sucesivos, sin incurrir en una pérdida considerable de actividad, expande las posibilidades de otros diseños para este bioproceso.

Finalmente, debido a la optimización de las variables estudiadas se ha logrado disminuir el tiempo de reacción desde 6 días (frutos frescos, maduros y molidos) a 3 días (semillas).

7.5 Bibliografía

- [1] Drauz, K.; Waldmann, H. (2002). *Enzyme catalysis in organic synthesis*. (Wiley).
- [2] Cao, C.; Matsuda, T. (2016). 'Biocatalysis in organic solvents, supercritical fluids and ionic liquids'. en *Organic Synthesis Using Biocatalysis* 67–97. (Elsevier Inc.).
- [3] Sheldon, R. A.; Brady, D. (2018). 'The limits to biocatalysis: Pushing the envelope'. *Chem. Commun.* 54, 6088–6104.
- [4] Sokač, D. G.; Nujić, M.; Bušić, V.; Stanić, M. H.-. (2014). 'Biocatalytic reductions by plant tissue - Green alternative to alcohol production'. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 6, 51–60.
- [5] Gao, W. W.; Zhang, F. X.; Zhang, G. X.; Zhou, C. H. (2015). 'Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis'. *Biochem. Eng. J.* 99, 67–84.
- [6] Claus, J.; Sommer, F. O.; Kragl, U. (2018). 'Ionic liquids in biotechnology and beyond'. *Solid State Ionics* 314, 119–128.
- [7] Naushad, M.; AlOthman, Z. A.; Khan, A. B.; Ali, M. (2012). 'Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: A review'. *Int. J. Biol. Macromol.* 51, 555–560.
- [8] Panić, M.; Elenkov, M. M.; Roje, M.; Bubalo, M. C.; Redovniković, I. R. (2018). 'Plant-mediated stereoselective biotransformations in natural deep eutectic solvents'. *Process Biochem.* 66, 133–139.
- [9] Xie, Y.; Xu, J. H.; Lu, W. Y.; Lin, G. Q. (2009). 'Adzuki bean: A new resource of biocatalyst for asymmetric reduction of aromatic ketones with high stereoselectivity and substrate tolerance'. *Bioresour. Technol.* 100, 2463–2468.
- [10] Nakamura, K.; Yamanaka, R.; Harada, T.; Matsuda, T.; Harada, T. (2003). 'Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts'. *Tetrahedron: Asymmetry* 14, 2659–2681.
- [11] Zilinskas, A.; Sereikaite, J. (2013). 'Stereoselective bioreduction for the resolution of racemic mixtures of bicyclo[3.3.1]nonane-2,6-dione using vegetables'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 90, 66–69.
- [12] Salvi, N. A.; Chattopadhyay, S. (2016). 'Laboratory scale-up synthesis of chiral carbinols using *Rhizopus arrhizus*'. *Tetrahedron Asymmetry* 27, 188–192.
- [13] Li, H.; Li, Z.; Ruan, G.; Yu, Y.; Liu, X. (2016). 'Asymmetric reduction of acetophenone into R-(+)-1-phenylethanol by endophytic fungus

- Neofusicoccum parvum BYEF07 isolated from Illicium verum'. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473, 874–878.
- [14] Decarlini, M. F.; Aimar, M. L.; Vázquez, A. M.; Vero, S.; Rossi, L. I.; Yang, P. (2017). 'Fungi isolated from food samples for an efficient stereoselective production of phenylethanols'. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 12, 275–285.
- [15] Bódai, V.; Nagy-Győr, L.; Örkényi, R.; Molnár, Z.; Kohári, S.; Erdélyi, B.; Nagymáté, Z.; Romsics, C.; Paizs, C.; Poppe, L.; Hornyánszky, G. (2016). 'Wickerhamomyces subpelliculosus as whole-cell biocatalyst for stereoselective bioreduction of ketones'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 134, 206–214.
- [16] da Silva, F. F. M.; Ferreira, D. A.; Monte, F. J. Q.; de Lemos, T. L. G. (2017). 'Synthesis of chiral esters and alcohols via enantioselective esterification with Citrus aurantium peels as biocatalyst'. *Ind. Crops Prod.* 96, 23–29.
- [17] Andrade, L. H.; Piovan, L.; Pasquini, M. D. (2009). 'Improving the enantioselective bioreduction of aromatic ketones mediated by Aspergillus terreus and Rhizopus oryzae: the role of glycerol as a co-solvent'. *Tetrahedron Asymmetry* 20, 1521–1525.
- [18] Ren, J.; Dong, W.; Yu, B.; Wu, Q.; Zhu, D. (2012). 'Synthesis of optically active α -bromohydrins via reduction of α -bromoacetophenone analogues catalyzed by an isolated carbonyl reductase'. *Tetrahedron Asymmetry* 23, 497–500.
- [19] Kansal, H.; Banerjee, U. C. (2009). 'Enhancing the biocatalytic potential of carbonyl reductase of Candida viswanathii using aqueous-organic solvent system'. *Bioresour. Technol.* 100, 1041–1047.
- [20] Wachtmeister, J.; Rother, D. (2016). 'Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale'. *Curr. Opin. Biotechnol.* 42, 169–177.
- [21] da Silva, R. A. C.; de Mesquita, B. M.; de Farias, I. F.; do Nascimento, P. G. G.; de Lemos, T. L. G.; Queiroz Monte, F. J. (2018). 'Enzymatic chemical transformations of aldehydes, ketones, esters and alcohols using plant fragments as the only biocatalyst: Ximenia americana grains'. *Mol. Catal.* 445, 187–194.
- [22] Britton, J.; Majumdar, S.; Weiss, G. A. (2018). 'Continuous flow biocatalysis'. *Chem. Soc. Rev.* 47, 5891–5918.
- [23] Tamborini, L.; Fernandes, P.; Paradisi, F.; Molinari, F. (2018). 'Flow bioreactors as complementary tools for biocatalytic process intensification'. *Trends*

Biotechnol. 36, 73–88.

PARTE IV: AUMENTO DE LA ESCALA DEL PROCESO DE BIOREDUCCIÓN

CAPÍTULO 8: Síntesis de intermediarios clave para la producción de moléculas bioactivas a escala de laboratorio

8.1 Introducción

Cada día, la importancia de la quiralidad en las propiedades bioactivas de muchos compuestos químicos es más evidente, no solo por los efectos secundarios causados por uno de los enantiómeros, sino también por la baja efectividad al administrar o utilizar racematos^{1,2}. Debido a esto, la creciente demanda de compuestos enantioméricamente puros empleados tanto por la industria farmacéutica como la de agroquímicos es sostenida, en gran medida, por las restricciones aplicadas por los entes reguladores sanitarios de cada región los cuales empujan a la utilización de sustancias enantioméricamente puras como única opción³.

Por lo tanto, como se ha mencionado en capítulos anteriores del presente trabajo, el desarrollo de nuevos procesos de producción que presenten alta estereoselectividad sigue siendo, hasta el día de hoy, quizás el desafío central dentro de la síntesis orgánica.

En muchos casos existen variadas estrategias para alcanzar un objetivo sintético específico, por lo que un diseño racional basado en un análisis retrosintético adecuado es de importancia crucial para establecer rutas de fabricación eficientes pero que fundamentalmente sean ambientalmente amigables⁴. En este contexto, la biocatálisis, sin lugar a dudas ocupa un lugar preponderante, ya que puede proporcionar transformaciones altamente eficientes y asombrosamente selectivas. Más aún, también posee la ventaja adicional de la sustentabilidad ambiental⁵⁻⁷, debido a que utiliza materias primas renovables.

En la búsqueda de nuevas técnicas que promuevan una economía sostenible, la biocatálisis ha contribuido y contribuye con avances en diversas áreas, que involucran tanto a la producción de productos químicos a granel, a partir de materiales primas renovables, como a procedimientos de síntesis dentro del ámbito de la química fina^{8,9}.

No obstante, cabe mencionar que, en general, los procedimientos biocatalíticos poseen la desventaja de su baja productividad^{10,11} y debido a esto, un aspecto que

merece una especial atención en el desarrollo de un nuevo proceso biocatalítico, es el aumento de escala¹². Es evidente entonces que extrapolar un proceso de laboratorio a otro de escala industrial no es una tarea trivial en absoluto y debe ser convenientemente estudiado con el fin de optimizarlo¹³ y evitar los problemas específicos que puedan surgir. De hecho, el escalado exitoso de un proceso biocatalítico, requiere una buena comprensión de las interacciones entre el biocatalizador, el sustrato y el entorno químico-físico en el interior del reactor utilizado¹⁴. No obstante, se encuentra bien establecido que lo más complicado de controlar en un proceso de aumento de escala es el entorno físico, ya que esto implica poder modificar el formato del reactor para lograr una mayor escala de trabajo¹⁵.

En los capítulos previos, se ha presentado una nueva metodología de síntesis asimétrica la cual utiliza un procedimiento de biotransformación promovido por las semillas de *L. lucidum*, las cuales biocatalizan la reducción estereoselectiva de cetonas proquirales.

Inicialmente, utilizando los frutos de siempreverde se ha logrado reducir varias cetonas proquirales cuyos alcoholes poseen aplicación prácticas por ser utilizados como intermediarios clave en la producción de fármacos¹⁶ (Capítulo 5). Más aún, los resultados de los estudios de estabilidad de los frutos desecados frente al almacenamiento (Capítulo 6), demostraron que es posible independizarse del problema crucial de la producción estacional de la planta y mantenerlos en condiciones adecuadas durante un período de tiempo prologado, lo que nos permite su utilización como si fuese un reactivo químico clásico. Adicionalmente, también hemos detallado (Capítulo 7) los resultados alcanzados durante el proceso de optimización de la metodología a pequeña escala, utilizando a la AF como sustrato modelo.

Como consecuencia natural de todo lo anteriormente expuesto, se decidió aplicar el proceso biocatalítico para tratar de comprobar la viabilidad de llevar a cabo un procedimiento a mayor escala, pero dentro del laboratorio, y así obtener alcoholes que pueden ser utilizados como intermediarios claves en la producción de moléculas de importancia industrial.

Objetivo del presente Capítulo:

Aumentar la escala de reacción en formato laboratorio del proceso de bio-reducción de compuestos carbonílicos promovido por las semillas de *L. lucidum*.

8.2 Materiales y Métodos

8.2.1 General

En todas las experiencias se ha utilizado el procedimiento descrito en la sección 4.2.1.

8.2.2 Biocatalizador: semillas deshidratadas de *L. lucidum*

Frutos maduros y sanos de *Ligustrum lucidum* (siempreverde) fueron recolectados en diversos puntos de la Ciudad de Córdoba. Las semillas fueron obtenidas según lo descrito en las secciones 7.2.2, 7.2.3 y 7.2.4.

8.2.3 Bioreducciones

Para la realización de las experiencias, se llevó a cabo una adaptación del procedimiento descrito en la sección 4.2.5, considerando las condiciones de reacción optimizadas en el Capítulo 7. Para ello, se colocó la muestra vegetal (66,7 g de semillas secas enteras de *L. lucidum*) en un Erlenmeyer desinfectado (2 L) con buffer fosfato (500 mL, pH: 6,0; 100 mM), y luego se añadió el sustrato, según el ensayo a realizar (1,33 g), disuelto en DMSO (0,67% p/v). Cabe aclarar la excepción para el ensayo con 2,4-diclorobenzaldehído, que debido a su baja solubilidad en medios acuosos, para su reducción se debió optimizar la concentración de cosolvente. Para ello se utilizó DMSO a una concentración de 5,33% p/v.

En todos los casos, la reacción se desarrolló con agitación orbital (120 rpm) a 25 °C, con el matraz cerrado y protegido de la luz directa. El progreso de la reacción fue determinado tomando muestras (5 mL) a diferentes tiempos. Cada una de ellas fue extraída con acetato de etilo (2 mL) y la capa orgánica fue separada y secada con cloruro de calcio anhidro. Tanto porcentaje de conversión como el porcentaje de exceso enantioméricos fueron determinados por CG-FID con columna quiral.

Una vez alcanzado el máximo porcentaje de conversión, el crudo fue filtrado y la solución acuosa fue extraída con acetato de etilo utilizando un extractor líquido-líquido continuo (Figura 8.1). Finalmente, la fase orgánica así obtenida, fue evaporada en un evaporador rotatorio y el residuo seco fue purificado por

cromatografía en columna sobre sílica gel, utilizando como eluyentes mezclas de proporciones variables de hexano-acetato de etilo.

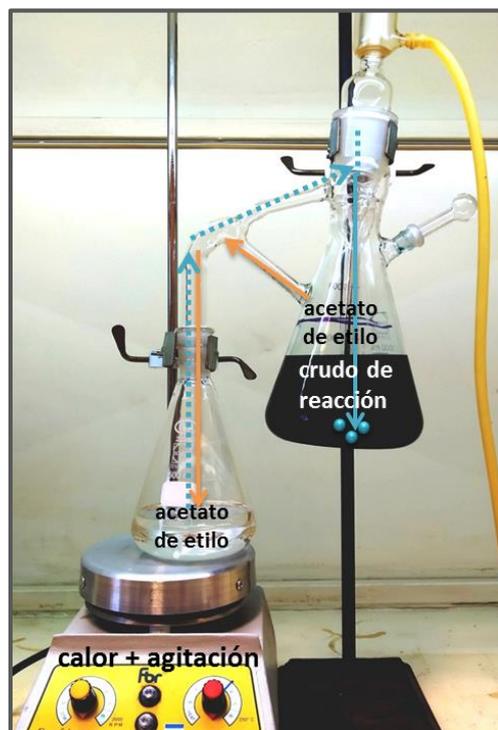


Figura 8.1: Equipo de extracción líquido-líquido continuo para líquidos menos densos que el agua.

8.2.4 *Análisis CG-FID y CG-EM*

Las determinaciones fueron llevadas a cabo según lo descrito en la sección 4.2.2.

8.2.5 *Cálculo de conversiones de reacción, excesos enantioméricos y rendimientos aislados*

Los porcentajes de conversión y los excesos enantioméricos fueron obtenidos de acuerdo a lo descrito en la sección 4.2.3.

8.2.6 *Datos Cromatográficos y Espectroscópicos*

Los productos fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención obtenidos mediante análisis por CG-FID con muestras testigos y por comparación de sus espectros de EM, RMN ^1H y ^{13}C con datos bibliográficos¹⁷⁻²¹.

(-)-(S)-1-Feniletanol ((S)-1-FE): ver Sección 4.2.7

(-)-(S)-1-(3'-hidroxifenil)etanol ((S)-1-(3'OHFE)): ver Sección 4.2.7

(-)-(S)-1-(3'-metoxifenil)etanol ((S)-1-(3'MeOFE)): condiciones CG: $T_1=130$ °C (40 min), $\Delta T=20$ °C/min, $T_2=210$ °C. CG Rt 3'-metoxiacetofenona: 14,8 min; Rt (+)-(R)-1-(3'-metoxifenil)etanol: 26,7 min y Rt (-)-(S)-1-(3'-metoxifenil)etanol: 28,0 min. Rendimiento: 0,36 g (27%). $[\alpha]^{23}_D=-44$; $c=2$ Cl₃CH ($[\alpha]^{25}_D=-39,8$; $c=0,944$ EtOH ²²). ¹H RMN (400M Hz, CDCl₃) δ (ppm) = 1,44 (d, 3H, CH₃); 2,63 (s, 1H, OH); 3,77 (s, 3H, -OCH₃); 4,80 (q, 1H, CH); 6,76-6,79 (m, 1H, ArH); 6,89-6,91 (m, 2H, ArH); 7,20-7,24 (m, 1H, ArH). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 25,10; 55,19; 70,19; 125,39; 110,98; 112,83; 117,75; 129,58; 147,69; 159,74. EM El m/z (rel. int. %) = 135 (M⁺-17; 10); 134 (M⁺-18; 100); 119 (10); 104 (60); 91 (87); 65 (83); 63 (20).

(-)-(R)-2-Cloro-1-(fenil)etanol ((R)-2-Cl-1-FE): ver Sección 4.2.7

(+)-(S)-3-hidroxiacetato de etilo ((S)-3-EHOAc): condiciones CG: $T_1=60$ °C (30 min), $\Delta T=4$ °C/min, $T_2=150$ °C, $\Delta T=20$ °C/min $T_3=210$. CG Rt acetoacetato de etilo: 44,92 min; (S)-3-hidroxiacetato de etilo: 47,56 min y (R)-3-hidroxiacetato de etilo: 47,93 min. Rendimiento: 0,23 g (17%). $[\alpha]^{23}_D=+30$; $c=2$ Cl₃CH ($[\alpha]^{20}_D=35,5$; $c=1$ Cl₃CH ²³). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=1,23 (d, 3H, CH₃); 1,28 (t, 3H, CH₃); 2,10 (s, 1H, OH); 2,39-2,52 (m, 2H, CH₂); 4,15-4,29 (m, 3H, CH y CH₂). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=14,15; 22,39; 42,76; 60,67; 64,29; 172,93. EM El m/z (rel. int. %)=131 (M⁺-1; 2), 117 (M⁺-15; 48), 103 (M⁺-29; 7); 88 (80); 87 (M⁺-45; 78); 71 (92); 60 (100).

Alcohol Bencílico (BA): condiciones CG: $T_1=80$ °C (5 min), $\Delta T=20$ °C/min, $T_2=180$ °C (7 min). CG Rt benzaldehído: 6,12 min; alcohol bencílico: 7,65 min. Rendimiento: 0,31 g (23%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=2,52 (s, 1H, OH); 4,68 (s, 2H, CH₂); 7,32-7,38 (m, 5H, ArH). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=65,26; 127,00; 127,68; 128,57; 140,85. EM El m/z (rel. int. %)=109 (M⁺+1; 8); 108 (M⁺, 98), 107 (M⁺-1; 68); 91 (18); 78 (100); 78 (11); 77 (45); 51 (19); 50 (10).

Alcohol 4-Clorobencílico (4-CIBA): condiciones CG: $T_1=80$ °C (5 min), $\Delta T=20$ °C/min, $T_2=180$ °C (7 min). CG Rt 4-chlorobenzaldehído: 10,69 min; Alcohol 4-chlorobencílico: 11,99 min. Rendimiento: 0,34 (25%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=1,88 (s, 1H, OH); 4,67 (s, 2H, CH₂); 6,76-7,40-7,50 (m, 4H, ArH). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=64,57; 128,27; 128,69; 133,39; 139,27. EM El m/z (rel. int. %)=144 (M⁺+2); 142 (M⁺, 28); 125 (M⁺-17; 5); 113 (12); 107 (M⁺-35; 55); 79 (87); 77 (100); 63 (10); 51 (30).

Alcohol 2,4-diclorobencílico (2,4-DiCIBA): condiciones CG: $T_1=80$ °C (5 min), $\Delta T=20$ °C/min, $T_2=180$ °C (7 min). CG Rt 2,4-diclorobenzaldehído: 10,05 min; alcohol 2,4-diclorobencílico: 11,51 min. Rendimiento: 0,23 g (17%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=4,76 (s, 2H, CH₂); 7,28-7,52 (m, 3H, ArH). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=62,21; 127,18; 128,16; 129,48; 133,44; 133,89;

136,74. EM El m/z (rel. int. %)=178 ($M^+ +2$; 10); 176 (M^+ , 26); 159 ($M^+ -17$; 7); 141 ($M^+ -35$; 41); 113 (46); 111 (43); 77 (100); 75 (35); 63 (10); 50 (23).

Ácido 2,4-diclorobenzoico (2,4-DiClBAC): condiciones CG: $T_1=80$ °C (5 min), $\Delta T=20$ °C/min, $T_2=180$ °C (7 min). CG Rt ácido 2,4-diclorobenzoico: 13,25 min. Rendimiento: 0,034g (3%). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=7,34-7,36 (dd, 1H, ArH); 7,52 (d, 1H, ArH); 7,98 (d, 1H, ArH). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=126,60; 127,18; 131,45; 133,49; 135,98; 139,53; 168,79. EM El m/z (rel. int. %) = 192 ($M^+ +2$; 35); 190 (M^+ , 58); 175 (67); 173 ($M^+ -17$; 100); 147 (13); 145 (27); 111 (10); 109 (28); 75 (55); 63 (17); 50 (48).

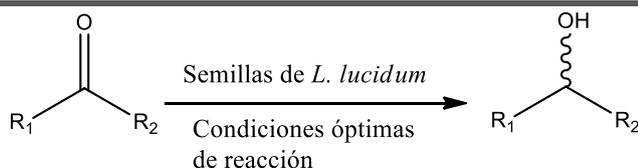
8.3 Resultados y Discusión

8.3.1 Biotransformaciones a escala laboratorio (500 mL) de intermediarios de síntesis claves

Como se ha mencionado previamente, la actividad biológica observada de los derivados de 1-FE no es sorprendente, ya que se encuentran estructuralmente relacionados con varias sustancias endógenas de nuestro organismo que cumplen diversas e importantes funciones, como las hormonas y los neurotransmisores²⁴. Por este motivo fundamental, resulta muy importante contar con procedimientos de síntesis que permitan obtener esta clase de compuestos químicos.

Por otra parte, los importantes resultados obtenidos al utilizar las semillas de *L. lucidum* como biocatalizador para reducir AF, nos alentaron a seleccionar diferentes compuestos carbonílicos que resulten intermediarios claves y establecer la viabilidad de su reducción, en formato laboratorio, pero aumentando sustancialmente las cantidades. Tanto los sustratos ensayados como los resultados alcanzados se muestran a continuación en la Tabla 8.1.

Tabla 8.1: Capacidad reductiva de semillas de *L. lucidum* en condiciones de reacción optimizadas a escala de 500 mL



Nº	R ₁	R ₂	Tiempo de reacción (h)	% conversión ^a	% e.e. ^a	% Rendimiento ^b
1	Fenil-	-CH ₃	72	97	>99 (S) ^c	35
2	3'-Hidroxi Fenil	-CH ₃	72	78	>99 (S)	33
3	3'-Metoxi Fenil	-CH ₃	51	68	>99 (S)	27
4	Fenil-	-CH ₂ -Cl	120	48	73 (R)	9
5	CH ₃ -	-CH ₂ -CO-Et	29	87	>99 (S)	17
6	Fenil-	-H	72	90	nd ^d	23
7	4-Cloro Fenil	-H	22	98	nd	25
8	2,4-diCloro Fenil	-H	36	98	nd	17

^a Determinado por análisis en CG quiral

^b Rendimiento del producto aislado después de ser purificado por cromatografía en columna.

^c Porcentaje de exceso enantiomérico y entre paréntesis configuración absoluta

^d nd: no corresponde

Como se puede observar en la Tabla 8.1, las semillas de *L. lucidum* demostraron ser un biocatalizador eficiente para transformar los grupos carbonilo de los sustratos ensayados a sus correspondientes alcoholes. En primer lugar, es interesante remarcar que utilizando a la AF fue posible replicar los resultados obtenidos previamente, aun habiendo incrementado la escala de reacción en un factor >6. Asimismo, es importante destacar que todos los productos sintetizados son intermedios en la producción de compuestos bioactivos. En este sentido, se obtuvieron (S)-1-(3'OHFE) y (S)-1-(3'MeOFE) con buenas conversiones y altos valores de exceso enantiomérico (Tabla 8.1, entradas 2 y 3), siendo ambos productos precursores claves en la síntesis de Rivastigmina (fármaco utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer)²⁵⁻²⁷. Más aún, (S)-1-(3'MeOFE) se ha utilizado como un intermediario clave en la síntesis del agente calcimimético NPS-R-568, un potente candidato experimental para el tratamiento del hiperparatiroidismo²⁸.

Aunque se reconoce que la reducción biocatalítica ha sido una alternativa altamente eficiente en la producción de alcoholes enantioméricamente puros, los estudios sobre bio-reducción de hidroxiacetofenonas no protegidas, que representan varias subestructuras en la gama de los fármacos colinérgicos, son hasta ahora poco frecuentes²⁹. Por esta razón, es necesario resaltar la importancia de los resultados obtenidos en la reducción de 3'-hidroxiacetofenona.

Por otro lado, las halohidrinan quirales son intermedios sintéticos importantes para productos industriales, debido al hecho de que ambos grupos funcionales de

estos compuestos (el resto hidroxilo y halógeno) pueden convertirse fácilmente en una amplia gama de otros productos quirales como pueden ser los epóxidos quirales, hidroxialdehído, hidroxiketona, hidroxácido y aminoalcoholes^{30,31}. En este sentido, cuando se utilizó 2-cloroacetofenona como sustrato, se obtuvo el alcohol quiral correspondiente con un valor de conversión del 48% y con un 73% de exceso enantiomérico (Tabla 8.1, entrada 4). Aunque la conversión alcanzada en este caso es menor a la alcanzada previamente en los estudios a menor escala presentados en la sección 5.3.2 de esta tesis, la estereoselectividad lograda fue similar. No obstante, cabe mencionar que fue menor que la observada para los otros sustratos. Este resultado afirma la hipótesis planteada anteriormente, respecto a que la introducción de un sustituyente (cloro) en el grupo metilo posee un efecto estérico sobre la actividad enzimática.

Cuando se utilizó acetoacetato de etilo como sustrato, se obtuvo como producto el correspondiente alcohol (S)-3-hidroxibutirato de etilo con una conversión de 87% y un 99%, de exceso enantiomérico (Tabla 8.1, entrada 5). Aquí, es importante mencionar que este compuesto quiral es un precursor en la síntesis de sulcatol, griseoviridin y *D*-acosamin³². Más aún, este alcohol quiral también es intermediario clave en la obtención de un importante grupo de antibióticos betalactámicos³³, y recientemente, ha sido utilizado para sintetizar polímeros biodegradables, los cuales además resultan ser biocompatibles por lo que presenta aplicaciones en varios campos, en particular, en medicina³⁴⁻³⁶.

Adicionalmente, debido a los buenos resultados logrados con el uso de cetonas proquirales, también se decidió ensayar otro tipo de compuestos carbonílicos y para ello se llevaron a cabo biotransformaciones utilizando como sustratos a algunos aldehídos especialmente seleccionados. En este sentido, cuando se utilizó benzaldehído, se obtuvo alcohol bencílico con un alto valor de conversión (Tabla 8.1, entrada 6). Cabe mencionar que el alcohol bencílico posee varias aplicaciones reportadas, incluso como conservante bacteriostático en medicamentos intravenosos y como anestésico local³⁷⁻³⁹, además de estar aprobado para su uso en solución al 5% para el tratamiento de pediculosis⁴⁰.

Utilizando el mismo procedimiento, también fue posible obtener alcohol 4-clorobencílico y alcohol 2,4-diclorobencílico con excelentes conversiones (Tabla 8.1, entradas 7 y 8). Cabe resaltar que ambos compuestos son intermediarios clave en la síntesis de los fármacos antimicóticos econazol y miconazol, respectivamente⁴¹. Adicionalmente, en el caso particular del alcohol 2,4-diclorobencílico, también se lo

utiliza como intermediario en la síntesis de oxiconazol⁴². Por otra parte, es necesario mencionar que durante la reacción de reducción del aldehído 2,4-diclorobencílico además de obtención del correspondiente alcohol, se observó la formación de una pequeña cantidad (3%) de ácido 2,4-diChlBz. Este hallazgo coincide con otras observaciones reportadas cuando se llevaron a cabo bio reducciones de aldehídos similares catalizadas por plantas⁴³. Más aún, también es necesario mencionar que a mayor tiempo de reacción la formación del ácido 2,4-diChlBz, aumentó (72 h, 42% de conversión a ácido). Este resultado es interesante debido a que plantea la posibilidad de llevar a cabo un proceso oxidativo catalizado por las semillas de *L. lucidum*. No obstante, más estudios son necesarios para avalar esta hipótesis.

Es importante mencionar que debido a la baja solubilidad en medio acuoso de 2,4-diclorobenzaldehído y su correspondiente alcohol, fue necesario optimizar nuevamente la concentración de cosolvente en el medio de reacción. Para ello se consideraron los resultados descritos en la sección 7.3.5 y se estudió el efecto del aumento de la concentración de DMSO sobre la conversión de aldehído a alcohol. Debido a los resultados de estos ensayos, fue posible aumentar 8 veces la concentración de cosolvente (5,33% p/v de DMSO), sin disminuir la conversión ni aumentar los tiempos de reacción. Es interesante observar que el aumento de DMSO para este sustrato no ha producido una disminución de la eficiencia de la reacción, como sí fue observada para la AF (Capítulo 7, sección 7.3.5). Es importante remarcar que estos resultados amplían la posibilidad de trabajar con sustratos poco solubles en el medio acuoso del sistema de reacción sin perjudicar el bioproceso.

Finalmente, los bajos rendimientos obtenidos de los compuestos sintetizados fueron debido a que durante el procedimiento de extracción se formaron emulsiones que fueron difíciles de romper. Más aún, es importante mencionar que el proceso de purificación no ha sido optimizado.

8.4 Conclusiones

En una primera aproximación, ha sido posible aumentar más de 6 veces el volumen de reacción, a escala de laboratorio. Considerando los resultados obtenidos con el sustrato modelo (AF), es de destacar que no se presentaron cambios considerables en el valor de conversión, tiempo de reacción y enantioselectividad alcanzada al aumentar el volumen de trabajo.

Adicionalmente, las semillas de *L. lucidum* han demostrado ser biocatalizadores eficientes, no sólo para la reducción de cetonas a sus correspondientes alcoholes quirales, sino también en la transformación de aldehídos a sus correspondientes alcoholes bencílicos.

Finalmente, como conclusiones preliminares, se ha demostrado que el proceso biocatalítico mediado por semillas de *L. lucidum* tiene potencial para ser llevado a una mayor escala utilizando para ello un bioreactor.

8.5 Bibliografía

- [1] Nguyen, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. (2006). 'Chiral drugs: an overview'. *Int. J. Biomed. Sci.* 2, 85–100.
- [2] Hutt, A. J.; Tan, S. C. (1996). 'Drug chirality and its clinical significance.' *Drugs* 52, 1–12.
- [3] Uteng, M.; Urban, L.; Brees, D.; Muller, P. Y.; Kullak-Ublick, G. A.; Bouchard, P.; Tougas, G.; Chibout, S. D. (2019). 'Safety differentiation: emerging competitive edge in drug development'. *Drug Discov. Today* 24, 285–292.
- [4] Albarrán-Velo, J.; González-Martínez, D.; Gotor-Fernández, V. (2018). 'Stereoselective biocatalysis: A mature technology for the asymmetric synthesis of pharmaceutical building blocks'. *Biocatal. Biotransformation* 36, 102–130.
- [5] Patel, R. N. (2013). 'Biocatalytic synthesis of chiral alcohols and amino acids for development of pharmaceuticals'. *Biomolecules* 3, 741–777.
- [6] Nestl, B. M.; Nebel, B. A.; Hauer, B. (2011). 'Recent progress in industrial biocatalysis'. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 187–193.
- [7] Ayuk, E. L.; Okoro, U. C.; Ugwur, M. O. (2016). 'A Review on Biological Catalysts in Organic Synthesis'. *Int. J. Adv. Eng. Res. Appl.* 2, 296–321.
- [8] Woodley, J. M. (2020). 'New frontiers in biocatalysis for sustainable synthesis'. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 21, 22–26.
- [9] Straathof, A. J. J.; Panke, S.; Schmid, A. (2002). 'The production of fine chemicals by biotransformations'. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 548–556.
- [10] Yazbeck, D. R.; Martinez, C. A.; Hu, S.; Tao, J. (2004). 'Challenges in the development of an efficient enzymatic process in the pharmaceutical industry'. *Tetrahedron Asymmetry* 15, 2757–2763.
- [11] Reetz, M. T. (2016). 'What are the limitations of enzymes in synthetic organic chemistry?' *Chem. Rec.* 16, 2449–2459.
- [12] Wachtmeister, J.; Rother, D. (2016). 'Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale'. *Curr. Opin. Biotechnol.* 42, 169–177.
- [13] Tufvesson, P.; Lima-Ramos, J.; Nordblad, M.; Woodley, J. M. (2011). 'Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes'. *Org. Process Res. Dev.* 15, 266–274.
- [14] Khan, N. R.; Rathod, V. K. (2017). 'Biocatalysis and its process intensification in the chemical industry'. en *Food Biosynthesis* 1–24. (Elsevier Inc.).

- [15] Palomares, L. A.; Ramírez, O. T. (2009). 'Bioreactor scale-up'. en *Encyclopedia of industrial biotechnology: Bioprocess, Bioseparation an Cell Technology* 195–205. (Wiley).
- [16] Muñoz Solano, D.; Hoyos, P.; Hernáiz, M. J.; Alcántara, A. R.; Sánchez-Montero, J. M. (2012). 'Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs'. *Bioresour. Technol.* 115, 196–207.
- [17] Salvi, N. A.; Chattopadhyay, S. (2001). 'Studies on *Rhizopus arrhizus* mediated enantioselective reduction of arylalkanones'. *Tetrahedron* 57, 2833–2839.
- [18] Salvi, N. A.; Chattopadhyay, S. (2008). 'Asymmetric reduction of halo-substituted arylalkanones with *Rhizopus arrhizus*'. *Tetrahedron Asymmetry* 19, 1992–1997.
- [19] Yu, F.; Zhang, X.-C.; Wu, F.-F.; Zhou, J.-N.; Fang, W.; Wu, J.; Chan, A. S. C. (2011). 'Cobalt(II)-catalyzed asymmetric hydrosilylation of simple ketones using dipyridylphosphine ligands in air'. *Org. Biomol. Chem.* 9, 5652–5654.
- [20] Cheemala, M. N.; Gayral, M.; Brown, J. M.; Rossen, K.; Knochel, P. (2007). 'New paracyclophane phosphine for highly enantioselective ruthenium-catalyzed hydrogenation of prochiral ketones'. *Synthesis*. 24, 3877–3885.
- [21] Matsugi, M.; Itoh, K.; Nojima, M.; Hagimoto, Y.; Kita, Y. (2004). 'A novel separation technique of diastereomeric esters of pyridylethanols by extraction: Formal total synthesis of PNU-142721, HIV-1 reverse transcriptase inhibitor'. *Tetrahedron* 60, 3311–3317.
- [22] Nakamura, K. (1998). 'Highly stereoselective reduction of ketones by *Geotrichum candidum*'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 5, 129–132.
- [23] Seebach, D.; Sutter, M. A.; Weber, R. H.; Züger, M. F. (1985). 'Yeast Reduction of Ethyl Acetoacetate: (S)-(+)-Ethyl 3-Hydroxybutanoate'. *Org. Synth.* 63, 1–7.
- [24] Gilman, A.; Goodman, L. (2006). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (McGrawHill).
- [25] Sethi, M. K.; Bhandya, S. R.; Maddur, N.; Shukla, R.; Kumar, A.; Jayalakshmi Mittapalli, V. S. N. (2013). 'Asymmetric synthesis of an enantiomerically pure rivastigmine intermediate using ketoreductase'. *Tetrahedron Asymmetry* 24, 374–379.
- [26] Sethi, M. K.; Bhandya, S. R.; Kumar, A.; Maddur, N.; Shukla, R.; Jayalakshmi

- Mittapalli, V. S. N. (2013). 'Chemo-enzymatic synthesis of optically pure rivastigmine intermediate using alcohol dehydrogenase from baker's yeast'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 91, 87–92.
- [27] Mangas-Sánchez, J.; Rodríguez-Mata, M.; Busto, E.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. (2009). 'Chemoenzymatic synthesis of rivastigmine based on lipase-catalyzed processes'. *J. Org. Chem.* 74, 5304–5310.
- [28] Şahin, E. (2017). 'Debaryomyces hansenii as a new biocatalyst in the asymmetric reduction of substituted acetophenones'. *Biocatal. Biotransformation* 35, 363–371.
- [29] Neupert, A.; Röss, T.; Wittmann, J.; Hummel, W.; Gröger, H. (2010). 'Enantioselective biocatalytic reduction of non-protected hydroxyacetophenones'. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. B J. Chem. Sci.* 65, 337–340.
- [30] North, M. (2003). 'Synthesis and applications of non-racemic cyanohydrins'. *Tetrahedron Asymmetry* 14, 147–176.
- [31] North, M. (2004). 'Synthesis and applications of non-racemic cyanohydrins and α -amino nitriles'. *Tetrahedron* 60, 10383–10384.
- [32] Fow, K. L.; Poon, L. C. H.; Sim, S. T.; Chuah, G. K.; Jaenicke, S. (2008). 'Enhanced asymmetric reduction of ethyl 3-oxobutyrate by baker's yeast via substrate feeding and enzyme inhibition'. *Eng. Life Sci.* 8, 372–380.
- [33] Georg, G. I.; Kant, J. (1988). 'An Asymmetric Synthesis of Carbapenem Antibiotic (+)-ps-5 from Ethyl 3-Hydroxybutanoate'. *J. Org. Chem.* 53, 692–695.
- [34] Li, F.; Guo, Z.; Wang, N.; Xia, H.; Liu, D.; Chen, S. (2019). 'Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate)-derived polymers with different 4-hydroxybutyrate fractions by a novel depolymerase from Paecilomycesp. 1407'. *Polym. Degrad. Stab.* 157, 107–115.
- [35] Tebaldi, M. L.; Maia, A. L. C.; Poletto, F.; de Andrade, F. V.; Soares, D. C. F. (2019). 'Poly(-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): Current advances in synthesis methodologies, antitumor applications and biocompatibility'. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 51, 115–126.
- [36] Sastri, V. R. (2014). 'Other Polymers: styrenics, silicones, thermoplastic elastomers, biopolymers, and thermosets'. en *Plastics in Medical Devices* 215–261. (Elsevier Inc.).
- [37] Martin, S.; Wilson, L. (1999). 'Benzyl alcohol as an alternative local

- anesthetic'. *Ann. Emerg. Med.* 33, 495–499.
- [38] Felton, L. (2012). *Essentials of pharmaceuticals*. Pharmaceutical Press (pharmaceutical Press).
- [39] Pugh, S.; McKenna, R.; Halloum, I.; Nielsen, D. R. (2015). 'Engineering *Escherichia coli* for renewable benzyl alcohol production'. *Metab. Eng. Commun.* 2, 39–45.
- [40] Meinking, T. L.; Villar, M. E.; Vicaria, M.; Eyerdam, D. H.; Paquet, D.; Mertz-Rivera, K.; Rivera, H. F.; Hiriart, J.; Reyna, S. (2010). 'The clinical trials supporting benzyl alcohol lotion 5% (Ulesfia TM): A safe and effective topical treatment for head lice (*pediculosis humanus capitis*)'. *Pediatr. Dermatol.* 27, 19–24.
- [41] Yañez, E. C.; Sánchez, A. C.; Manuel, J.; Becerra, S.; Muchowski, J. M. (2004). 'Synthesis of Miconazole and Analogs Through a Carbenoid Intermediate'. *Rev. Soc. Quim. Mex.* 48, 49–52.
- [42] Rad, M. N. S.; Khalafi-Nezhad, A.; Behrouz, S. (2009). 'Design and synthesis of some novel oxiconazole-like carboacyclic nucleoside analogues, as potential chemotherapeutic agents'. *Helv. Chim. Acta* 92, 1760–1774.
- [43] Salvano, M. S.; Cantero, J. J.; Vázquez, A. M.; Formica, S. M.; Aimar, M. L. (2011). 'Searching for local biocatalysts: Bioreduction of aldehydes using plant roots of the Province of Córdoba (Argentina)'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 71, 16–21.

CAPÍTULO 9: Bio reducción de AF a (S)-1-FE promovido por semillas de *L. lucidum* a escala piloto

9.1 Introducción

El diseño y desarrollo de nuevas rutas sintéticas reproducibles, económicas y ambientalmente amigables para la obtención de moléculas complejas es de suma importancia en la industria farmacéutica, y en este contexto, su obtención a gran escala es fundamental para que un procedimiento tenga posibilidades de industrialización^{1,2}.

Para ello, indudablemente se debe considerar que la ampliación de la escala productiva de un bioproceso depende estrictamente de la sustancia que se producirá. En este sentido, para muchos productos biotecnológicos como antibióticos, alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos y enzimas, un proceso comercialmente viable se logra sólo si se alcanza una escala final de fermentación del orden de cientos de miles de litros³. Son necesarios entonces, volúmenes de estas magnitudes para satisfacer mercados que requieren cantidades elevadas (10^2 a 10^7 t/año) de productos con un valor agregado bajo (10^{-1} a 10^3 U\$/kg). En contraste, otros compuestos químicos altamente específicos utilizados fundamentalmente en la industria farmacéutica o en química fina, posee un costo muchos más elevado (10^4 a 10^9 U\$/kg), y su demanda a nivel mundial es solo de 10^{-1} a 10^3 kg/año⁴. Por consiguiente, existe una relación logarítmica inversa entre los costos del producto y el tamaño del mercado⁵. En consecuencia, establecer adecuadamente la escala de trabajo de los bioprosos dependerá de la demanda que sea necesaria satisfacer⁶. A modo de resumen, en la Figura 9.1 se representa la importancia de la biocatálisis en diferentes mercados, considerando la demanda de acuerdo al campo de aplicación, el creciente valor agregado del producto buscado y los beneficios aportados por la metodología.

Como podemos observar, para productos con alta especificidad molecular, especialmente pureza enantiomérica, y alto valor agregado, los bioprosos presentan mayores posibilidades de éxito en el mercado productivo.

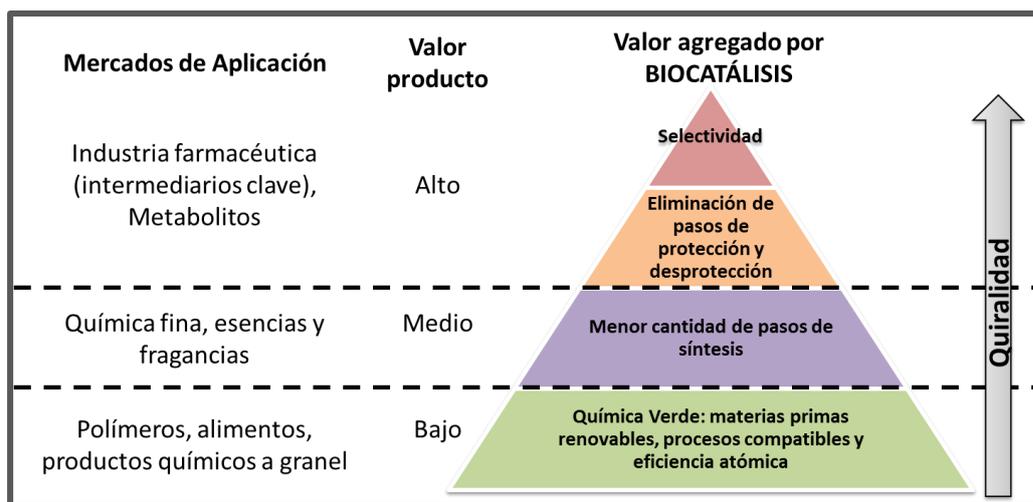


Figura 9.1: Valor agregado por métodos biocatalíticos en diferentes mercados.

Por otro lado, se entiende por **escalado de una biotransformación** al proceso de aumento de escala de la misma, basándose en resultados experimentales previos, obtenidos en el laboratorio con equipamientos de menor capacidad, con el objetivo de obtener cantidades mayores del producto deseado⁷. Cabe mencionar que varios factores juegan un papel fundamental en un proceso de escalado. La cinética y la termodinámica de la reacción no serán afectadas por el cambio de volumen, sin embargo, los fenómenos de transporte si se verán afectados por el cambio de escala⁸. La transferencia de masa dentro de un proceso depende en gran medida de la escala y las geometrías del biorreactor. El sistema de agitación influye en el tiempo de mezclado y todos ellos, como tales, en la disponibilidad de oxígeno y el suministro de sustrato⁹. Finalmente, considerando los resultados obtenidos en los ensayos de escalado, será posible proyectar la viabilidad de la biotransformación para llevar a cabo producciones a escala industrial con fines comerciales.

A principios de la década de 1970, cuando iniciaba la era de la automatización de bioprocesos, los procesos de fermentación existentes a nivel industrial (por ejemplo, la fabricación de penicilina) eran percibidos casi como un 'arte'. Hacer antibióticos no era mucho más sofisticado que hacer vino. Los ingredientes se colocaban en un tanque cerrado que luego se esterilizaba manualmente, se inoculaba con células vivas, también de manera manual, y finalmente se agitaba con aireación durante varios días. El único control automatizado podía ser un controlador neumático utilizado para la temperatura. El registro de datos para ese entonces consistía en que los operadores caminaran por la planta anotando periódicamente los valores leídos de medidores. La mayoría de los parámetros

mencionados anteriormente como factores claves, no podían ser monitoreados ni controlados en línea. A veces el mejor indicador de cuán bien progresaba la fermentación era el análisis subjetivo de un operador experimentado que miraba a través de un vidrio ubicado en la parte superior del fermentador¹⁰. Con el tiempo, fue indispensable el desarrollo de procesos menos variables, más reproducibles y con mayor productividad, lo cual debía ser acompañado por la evolución de sensores y sistemas de control computarizados adecuados. En las últimas décadas, las soluciones comerciales han alcanzado lentamente las necesidades de los bioprocesos, aunque todavía quedan varios nichos por cubrir¹¹.

9.1.1 Formato del biorreactor

El propósito de un biorreactor es proporcionar las condiciones ambientales adecuadas requeridas para un desarrollo óptimo y/o generación de productos, bajo un sistema contenido. Idealmente, el medio de reacción también debe ser homogéneo y controlado. En este sentido, el formato de tanque agitado es uno de los diseños de biorreactor más difundido, el cual está compuesto por un recipiente o vaso cilíndrico (con una relación altura del vaso/diámetro del líquido de 1:1 a 3:1) e impulsores, los cuales deben estar espaciados adecuadamente para favorecer la homogeneidad¹². En estos formatos de biorreactor la transferencia de oxígeno es de gran importancia y se debe prestar especial atención a las dimensiones del espacio superior libre si se anticipan problemas de espuma durante un proceso. En general, el aumento de altura debido a la espuma y al aumento de la altura del líquido por la retención de gas, se manejan considerando un espacio vacío equivalente a 20 a 30% del recipiente¹³.

Probablemente la característica más distintiva entre los diferentes diseños de biorreactores de tanque agitado es la configuración del impulsor o paletas de agitación. Muchos de estos impulsores se han diseñado con el objetivo de evitar daños mecánicos a las células frágiles presentes en el medio de reacción, pero manteniendo un ambiente homogéneo y altas tasas de transferencia de oxígeno (TTO). Con el mismo objetivo, en algunos formatos pueden excluirse los deflectores y minimizar la cantidad de accesorios involucrados dentro del tanque, como así también considerar posicionar el eje del impulsor excéntricamente para evitar la formación de vórtices.

Debido a su bajo costo y fácil manejo, los matraces o Erlenmeyer tradicionales se siguen utilizando ampliamente en el desarrollo temprano de bioprocesos, como en el

caso de estudio de esta tesis. Sin embargo, ofrecen posibilidades muy limitadas de monitoreo y control. Además, la hidrodinámica de los sistemas agitados orbitalmente difiere completamente de los sistemas en tanque agitado en biorreactores de mayor escala. Dichos sistemas de reacción, en etapas iniciales, no son representativos de los entornos de los biorreactores, por lo que es esperable que haya modificaciones en el comportamiento del bioproceso cuando sea realizado en un biorreactor⁷.

En el presente capítulo, se describen los estudios llevados a cabo utilizando un biorreactor tipo tanque agitado para determinar la viabilidad de aumentar la escala de producción (S)-1-FE promovido por las semillas de *L. lucidum*.

Objetivo del presente Capítulo:

Aumentar la producción de (S)-1-FE mediante el proceso biocatalítico promovido por semillas de *L. lucidum* a escala piloto (4 L) en un biorreactor tipo tanque agitado.

9.2 Materiales y Métodos

9.2.1 Preparación Biocatalizador

Frutos maduros y sanos de *Ligustrum lucidum* (siempreverde) fueron recolectados en diversos puntos de la Ciudad de Córdoba e identificados convenientemente por un experto botánico. Para obtener el biocatalizador, las semillas fueron obtenidas según lo descrito en las secciones 7.2.2, 7.2.3 y 7.2.4.

Las semillas fueron nuevamente desinfectadas con solución de hipoclorito de sodio inmediatamente antes de iniciar cada reacción.

9.2.2 Bioreducción escala 4L

Para el escalado de la bioreducción se utilizó un *Sistema de Fermentación Modular 'BioFlo 110 - New Brunswick Scientific* (Figura 9.2) tipo tanque agitado cilíndrico, de 7L de capacidad total, con agitación mecánica con 2 paletas tipo 'turbina de disco' (Figura 9.3), con control de temperatura, sensores en tiempo real (pH, oxígeno disuelto, nivel de espuma) y bombas peristálticas para adición y eliminación de líquidos y gases.

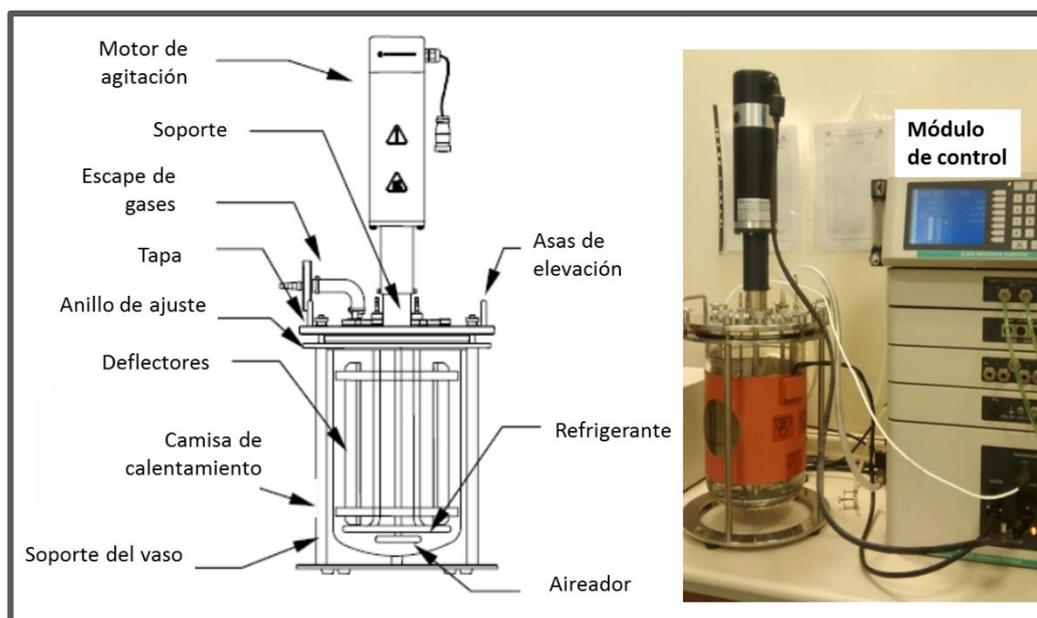


Figura 9.2: Descripción de partes del biorreactor 'BioFlo 110'

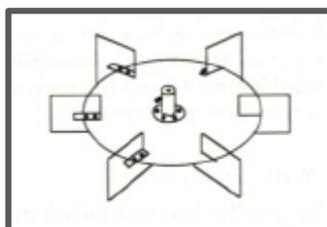


Figura 9.3: impulsor tipo 'turbina de disco'

Las reacciones se llevaron a cabo en modo discontinuo, tipo batch, realizando una carga inicial de: 4 L de buffer fosfato pH 6,0 100 mM o pH 6,5 200 mM; 24,2 mL de DMSO utilizado como cosolvente; 534 g de biocatalizador sólido (semillas de *L. lucidum*) y 10,4 mL de Acetofenona (Sigma Aldrich); sin re-alimentación, siendo todas las experiencias realizadas a una temperatura constante de 25 °C. Para los ensayos con aireación, se hizo burbujear aire, con regulación de caudal y filtro esterilizante colocado antes del ingreso al reactor. El seguimiento de la cantidad de oxígeno disuelto en el medio de reacción, se realizó mediante la utilización de un Datalogger Xplorer GLX (Pasco) con sensor de oxígeno disuelto, previamente calibrado¹⁴.

Para realizar el seguimiento de la reacción, se tomaron muestras de 5 mL a las cuales se le realizó una extracción con 2 mL de acetato de etilo. Posteriormente, la capa orgánica fue separada y secada con cloruro de calcio anhidro. 1 µL de dicha solución fue analizado por CG-FID quiral para determinar la conversión y el porcentaje de exceso enantiomérico.

9.2.3 Análisis CG-FID

Las separaciones cromatográficas fueron llevadas a cabo como se describe en la sección 4.2.2.

9.2.4 Cálculo de conversiones de reacción, excesos enantioméricos y rendimientos aislados

Los porcentajes de conversión, los excesos enantioméricos y los porcentajes de rendimiento m/m fueron obtenidos de acuerdo a lo descrito en la sección 4.2.3 del capítulo precedente.

Sólo se ha realizado el proceso de extracción y purificación del producto final obtenido para calcular rendimientos con los ensayos N° 7 y 8, siendo las pruebas que mejor eficiencia reductiva han alcanzado a escala de 4 L.

9.2.5 Datos Cromatográficos y Espectroscópicos

Los productos fueron identificados como se describe en la sección 4.2.7.

9.3 Resultados y Discusión

El proceso de escalado se lleva a cabo en dos etapas:

- ✓ Etapa 1: de preparación del catalizador y transformación del sustrato-**upstream**
- ✓ Etapa 2: de recuperación y purificación del producto-**downstream**

Las mismas son resumidas de manera esquemática en la Figura 9.4. Cabe mencionar que, cada uno de los pasos descritos en dicha figura, han sido convenientemente detallados a través de las diferentes secciones experimentales descritas en las secciones y capítulos precedentes de esta tesis.

Evidentemente, la optimización correcta de cada una de las etapas es fundamental para lograr un proceso eficiente y obtener altos rendimientos del producto deseado. En el marco de los objetivos del presente estudio, los esfuerzos se han centrado fundamentalmente en optimizar la etapa de transformación 1, siendo prioritario alcanzar altos porcentajes de conversión, sin aún haber podido profundizar la etapa 2 (proceso de aislamiento y purificación del producto).

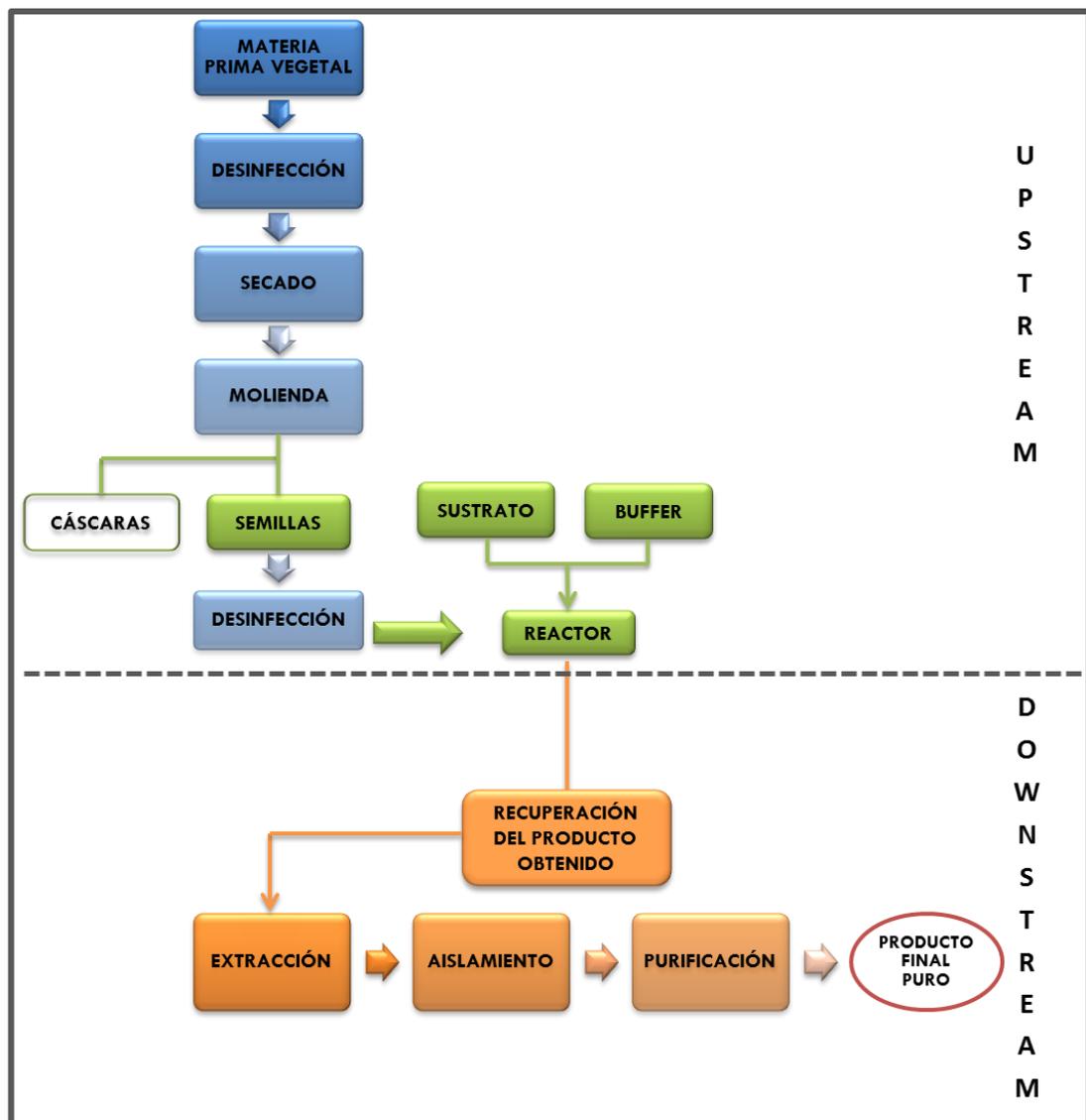


Figura 9.4: Etapas del proceso de escalado

9.3.1 Ensayos a escala piloto del procedimiento de bio-reducción de AF a (S)-1-FE.

En los capítulos previos, se establecieron las condiciones óptimas de reacción para el bioproceso de reducción de cetonas proquirales utilizando semillas de *L. lucidum* como biocatalizador. A su vez, se han logrado realizar reacciones a escala de laboratorio en un volumen de reacción de 500 mL, obteniéndose los resultados oportunamente descritos (Capítulo 8). Es por ello que se decidió continuar trabajando para aumentar la escala de bio-reducción de la AF por un factor de 8 veces, llevando el proceso a escala piloto en un biorreactor. Inicialmente, se mantuvieron las condiciones óptimas de reacción conseguidas a escala de laboratorio y las variables a optimizar en el biorreactor fueron: velocidad de

agitación y altura de las paletas, variables que previamente no existían en el formato de laboratorio debido a que todas las reacciones fueron llevadas a cabo sobre un agitador orbital. Además, inicialmente se consideró que de acuerdo con los resultados obtenidos a menor escala no era necesario incorporar aireación, si bien podría ser una variable a tener en cuenta, considerando evidencias oportunamente informada por otros autores^{15,16}. En todos los casos, la eficiencia del proceso fue establecida mediante la determinación cuantitativa del porcentaje de conversión del sustrato a su correspondiente alcohol y el exceso enantiomérico del producto formado, planteando como objetivo primordial alcanzar resultados comparables a los obtenidos en las pruebas a escala de laboratorio.

A continuación, se presentan los resultados evaluando la conversión y el exceso enantiomérico obtenidos en los 8 ensayos realizados a escala de 4 L, en función de las modificaciones que se fueron efectuando (Tabla 9.1). Adicionalmente y para establecer una comparación rápida, los primeros datos mostrados en dicha tabla (entrada **EL**) corresponden a los resultados obtenidos en una reacción a escala de laboratorio.

Cabe aclarar que la velocidad de agitación utilizada para llevar a cabo todas las experiencias, fue seleccionada realizando un ensayo previo en el biorreactor. Para ello, utilizando la cantidad adecuada de semillas y de solución buffer, sin el agregado del sustrato ni cosolvente, fueron cargadas en el reactor y se observó la homogeneidad del sistema a diferentes velocidades de agitación. Las velocidades ensayadas fueron 100, 200, 300 y 400 rpm, observando que la menor velocidad que produce homogeneidad en el sistema sin formación de espuma fue de 300 rpm.

Por otra parte, cabe mencionar que todas las reacciones fueron periódicamente monitoreadas para establecer la evolución cinética de las mismas. Para ello se tomaron muestras a periodos regulares de tiempo las cuales fueron analizadas y los resultados de las cinéticas de cada reacción se presentan en la Figura 9.5.

Tabla 9.1: Biorreducción de AF a (S)-1-FE promovidas por semillas de *L. lucidum* a Escala Piloto.

N°	Tratamiento biocatalizador	Concentración buffer fosfato (mM)	Deflectores	pH inicial	pH final	Altura paletas	Velocidad agitación (rpm)	Aireación	Tiempo reacción (días)	% Conv. ^a	% e.e. ^b
EL^d	Semillas pre-desinfectadas	100	-----	6,00	-----	-----	120 ^e	No	3	95	99(S)
1	Semillas pre-hidratadas	100	Si	6,01	5,57	Inferior: 5 cm Superior: 10 cm	300	No	7	77	98(S)
2	----	100	Si	6,04	5,11	Inferior: 0 cm Superior: 4 cm	300	No	7	59	98(S)
3	----	100	No	5,95	4,57	Inferior: 0 cm Superior: 10 cm	300	No	7	70	97(S)
4	----	100	No	5,90	4,73	Inferior: 0 cm Superior: 10 cm	300	No	7	59	98(S)
5	Semillas pre-desinfectadas	100	No	6,03	4,68	Inferior: 0 cm Superior: 10 cm	300	0,4 L/min	6	47	94(S)
6	Semillas pre-desinfectadas	200	No	6,50	6,38	Inferior: 0 cm Superior: 10 cm	300	2,0 L/min	4	92	98(S)
7	Semillas pre-desinfectadas	200	No	6,50	6,47	Inferior: 0 cm Superior: 10 cm	300	2,0 L/min	3	92	98(S)
8					6,35					92	98(S)

^a Porcentaje de reducción determinado por análisis en CG
^b Porcentaje de exceso enantiomérico y entre paréntesis configuración absoluta
^c Rendimiento del producto aislado después de ser purificado por cromatografía en columna.
^d Reacción a escala de laboratorio (75 mL de volumen final).
^e Agitación orbital.

Como se puede observar en la Tabla 9.1 (entrada 1), la primera prueba se llevó a cabo en las mismas condiciones óptimas de la detalladas a escala de laboratorio (Tabla 9.1, entrada **EL**). Para ello se realizó el control de la temperatura utilizando camisa de calentamiento y refrigerantes internos, además de los deflectores provistos con el equipo para tratar de evitar la formación de vórtices. Por otra parte, se utilizó una disposición estándar de las paletas agitadoras, según lo establecido en el manual de uso del equipo¹⁷.

Como se puede observar en dicha tabla (entrada 1), aun a tiempos de reacción prologados no se alcanzaron valores de conversión similares a los obtenidos a escala de laboratorio.

Por otra parte, si se observa la cinética de reacción de esta prueba (Figura 9.5; ●1) se comprueba que a partir de las 96 h la reacción se detiene, alcanzando un porcentaje de conversión del 77%. Debido a esto y analizando los resultados de este ensayo se realizaron modificaciones en las pruebas siguientes.

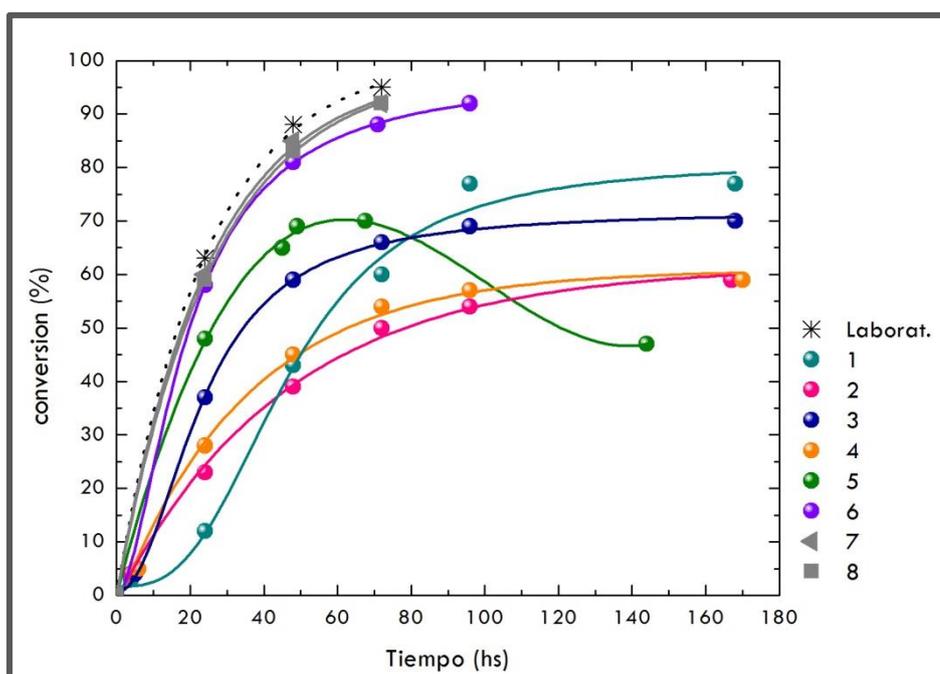


Figura 9.5: Progreso de conversión de AF en (S)-1-FE en función del tiempo a escala piloto 4 L.

En una primera instancia, para el segundo ensayo (Tabla 9.1, entrada 2) se modificó la altura de las paletas para asegurar un movimiento continuo de todo el biocatalizador en el medio de reacción, priorizando la homogeneidad del sistema. Por una cuestión de practicidad se decidió también eliminar la etapa de prehidratación de las semillas, ya que las pruebas realizadas a escala laboratorio

demonstraron que este tratamiento no acelera ni beneficia la biotransformación (Capítulo 7). Los resultados de esta segunda prueba no fueron alentadores, y al igual que en el caso anterior, un mayor tiempo de reacción no proporcionó mayor conversión.

A continuación, antes de comenzar el tercer ensayo (Tabla 9.1, entrada 3) se procedió a retirar los deflectores, por producir atascamiento de semillas, evidenciado en los ensayos anteriores. Como han planteado otros autores, se debe evitar introducir accesorios dentro del tanque que no sean necesarios, ya que podrían dañar el material biológico o afectar la homogeneidad del sistema¹¹. En este caso, se obtuvieron resultados similares a los del primer ensayo, pero observando las cinéticas de reacción (Figura 9.5; ●3) se puede comprobar que a tiempos cortos se logró mejorar los porcentajes de conversión obtenidos, lo que podría estar indicando que el proceso reductivo se detiene debido a algún factor aún no considerado. Por la misma razón que en el caso anterior, para el cuarto ensayo (Tabla 9.1, entrada 4) se decidió eliminar el sistema de refrigeración interno y controlar la temperatura mediante termostatación de la habitación, obteniéndose resultados similares al ensayo 2.

Debido a los resultados observados en los ensayos 1-4, se plantearon dos posibles hipótesis:

- 1) la posible contaminación con microorganismos que afectase de alguna manera la bio-reducción o produjesen reacciones paralelas con los sustratos, compitiendo con la reducción o,
- 2) una baja concentración de oxígeno disuelto (OD) en el medio de reacción debido al cambio de formato, tipo de agitación y al aumento del volumen, que afectase el funcionamiento óptimo del sistema enzimático. No obstante, es importante mencionar que en otros estudios se ha reportado la dependencia de oxígeno para llevar a cabo reacciones metabólicas específicas o regeneración de cofactores¹⁸⁻²⁰.

Para subsanar estas consideraciones, antes de realizar el quinto ensayo (Tabla 9.1, entrada 5) se procedió a desinfectar las semillas con solución de hipoclorito en el instante previo a la incorporación del biocatalizador al reactor y además se incorporó un sistema de aireación. Si bien el resultado final obtenido no fue alentador, analizando la cinética de esta reacción (Figura 9.5; ●5) se observa que aproximadamente a las 72 h el porcentaje de conversión fue de un 70%, no obstante, cabe mencionar que a tiempos iniciales de reacción (24 h), los valores de

conversión fueron similares a los obtenidos en las cinéticas a escala de laboratorio (Figura 9.5, línea punteada).

Es importante destacar que la pureza óptica se mantuvo constante y alta para todos los ensayos, aun cuando la reacción no fue eficiente en cuanto a la conversión. No obstante, el quinto ensayo (Tabla 9.1, entrada 5) resultó una excepción, ya que se observó una pequeña disminución en el valor de exceso enantiomérico al finalizar esta experiencia.

Adicionalmente, en todos los ensayos analizados hasta este punto (Tabla 9.1, entradas 1-5) se observó que no fue posible mantener un valor constante de pH durante el tiempo que duraron las experiencias, por lo que se supuso que la concentración del buffer (capacidad buffer) utilizada no resultó suficiente.

Debido a que existen reportes en la literatura de referencia que plantean que las rutas regenerativas para el NADPH, en presencia de enzimas glucosa deshidrogenasas, involucrando glucosa como cosustrato pueden liberar al medio de reacción ácido glucónico, la disminución del valor de pH puede ser atribuida a uno de los ciclos de regeneración de los cofactores involucrados²¹⁻²⁴. Por otra parte, como una consecuencia de la compleja composición de las semillas, que aún no ha sido estudiada, es posible considerar la presencia de glúcidos y otras enzimas, lo cual podría permitir la regeneración de cofactores *in-situ*. No obstante, mayores estudios son necesarios para apoyar esta hipótesis. Debido a esto, es posible que la variación observada en el valor del pH pueda estar afectando el progreso del proceso de bio-reducción. Por ese motivo, se procedió a determinar el efecto del aumento de la concentración del buffer a escala de laboratorio para tratar de evitar la modificación de su valor durante la conversión de la AF a (S)-1-FE. A continuación, en la Figura 9.6 se pueden observar los resultados obtenidos.

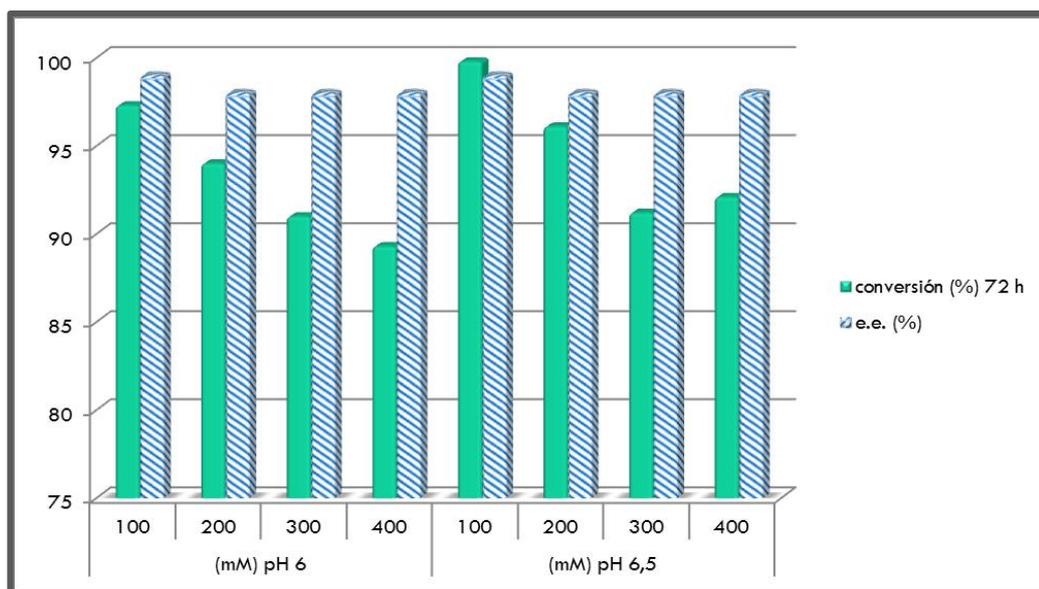


Figura 9.6: Valores de conversión y e.e.% a 72 h de bioreducción en diferentes condiciones de buffer fosfato, a escala de laboratorio.

Como se puede observar en la Figura 9.6, tanto a pH = 6,0 como a pH = 6,5 el proceso biocatalítico presenta una tendencia a decaer al aumentar la concentración de sales en el medio. No obstante, el exceso enantiomérico no se ve afectado. Por otra parte, la tendencia de decaimiento observada en el valor de pH fue menos marcada a los valores de concentración cercanos a 100 mM. Es de remarcar que han sido oportunamente reportados similares resultados referidos a la concentración y tipo de buffer utilizados en otros sistemas que involucran biotransformaciones²⁵⁻²⁷.

Adicionalmente, cabe recordar que debido a los estudios de optimización previamente realizados y oportunamente informados en el Capítulo 7, se estableció una zona de estabilidad comprendida entre pH 5,0 y pH 6,5 en la cual el funcionamiento del proceso bioreductivo resulta óptimo. Debido a esto, se consideró que llevar a cabo el proceso de bioreducción de la AF a pH = 6,5 podría dar un mayor margen para evitar una disminución del valor del pH por debajo de 5,0 en el caso que la capacidad buffer no sea suficiente. Por otro lado, adicionalmente el aumento de la concentración del buffer podría contribuir a mantener más estable el valor de pH a lo largo del tiempo de reacción. Por estos motivos y buscando una relación adecuada entre concentración del buffer y su pH, se decidió proseguir trabajar a una concentración de 200 mM del buffer fosfato y a un valor de pH igual a 6,5.

Adicionalmente, a partir de esta experiencia también se decidió controlar la concentración de OD (medido en tiempo real mediante la utilización de un sensor

específico adicionado al biorreactor) debido a que es posible que su disponibilidad en el medio de reacción, no fuese adecuada y esto promoviera una causa adicional que frenase el progreso de la transformación de la AF. Para ello, además de modificar la concentración del Buffer y el pH, también se decidió simultáneamente oxigenar la solución mediante burbujeo de aire estéril a un flujo de 0,4 L/min. Con estos nuevos ajustes se llevó a cabo el sexto ensayo a una escala de 4 L en el biorreactor.

Como podemos observar en la Tabla 9.1 (entrada 6) por un lado, los resultados obtenidos fueron prometedores y casi concordantes con aquellos alcanzados a escala de laboratorio (Figura 9.6; pH 6,5; 200 mM: 95% de conversión y 98% de e.e.). Cómo era de suponer, modificando la concentración del Buffer y ajustando el pH a 6,5; la disminución del valor de esta variable fue menor ($\Delta\text{pH} \approx 0,2$ unidades) a la que fue observada oportunamente en las experiencias anteriores (Tabla 9.1, entradas 1-5: $\Delta\text{pH} \approx 2$ unidades). Más aún, observando la curva que representa la cinética de reacción (Figura 9.5; ●6) se pone de manifiesto que se logra no solo mejorar la conversión, sino que también se acortaran los tiempos de reacción al haber realizado estas modificaciones en conjunto. Por otro lado, observando la conversión en conjunto a la variación de la concentración de OD en el medio de reacción en función del tiempo (Figura 9.7) se pudo establecer que existe también una relación directa entre la cantidad de oxígeno disponible y el progreso en la conversión de la AF a (S)-1-FE. Cabe mencionar que este efecto de dependencia de la conversión con la concentración de OD del medio de reacción ha sido atribuido, en otros bioprocesos, a la necesidad de este oxidante durante el reciclado de los cofactores^{28,29}.

Como se puede observar en la Figura 9.7, luego de las 24 h el caudal de aireación suministrado no ha sido suficiente para la demanda del proceso reductivo y claramente se produjo un marcado descenso (casi lineal) de la concentración de OD. Por otra parte, es necesario mencionar que utilizando este mismo batch y luego de transcurridas 72 h de reacción (86% de conversión), se decidió aumentar el flujo de aire para comprobar si era posible aumentar la concentración de OD y alcanzar los valores de conversión observados en la reacción a escala de laboratorio.

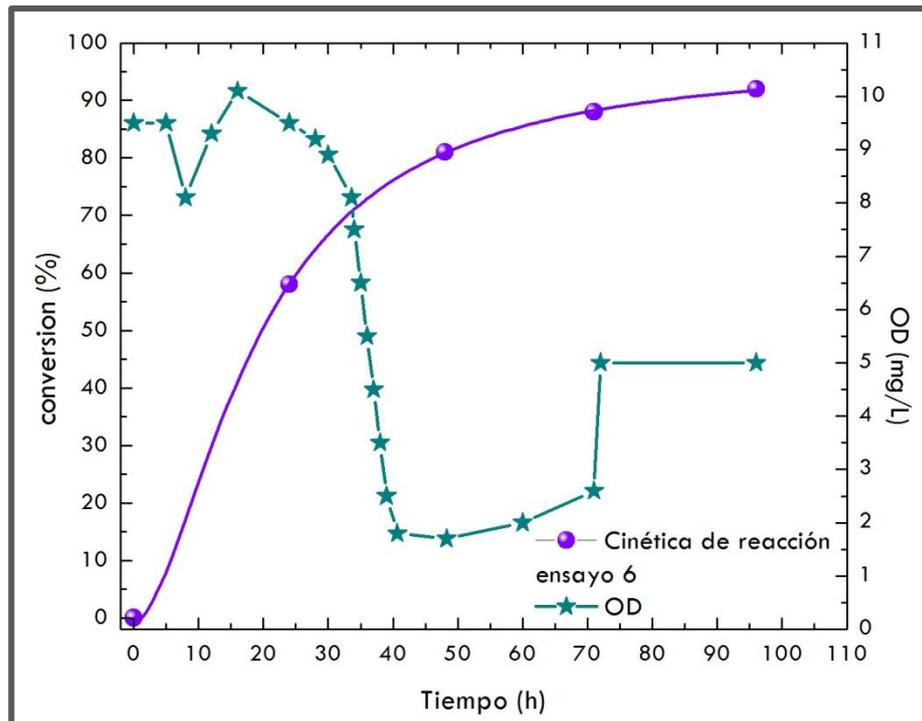


Figura 9.7: Cinética de reducción y concentración de OD ensayo 6.

Como podemos observar en la figura anterior, después de aumentar el flujo de aire (0,4 L/min a 2,0 L/min) la concentración de OD comenzó a aumentar y se pudo observar además un leve aumento en el porcentaje de conversión llegando a un valor de 92% para un tiempo total de 4 días de reacción (Tabla 9.1, entrada 6). Sin embargo, cabe mencionar que no fue posible alcanzar los valores iniciales de OD (Figura 9.7, ★OD). Esta situación podría atribuirse tal vez al cambio de viscosidad y composición del medio de reacción debido a la solubilización de diferentes componentes presentes dentro de las semillas. Al respecto, cabe mencionar que la solubilidad de oxígeno molecular en soluciones acuosas a presión atmosférica es muy baja (aproximadamente 0,3 mM)²², por lo tanto, es importante identificar las limitaciones en la transferencia de oxígeno, ya que podría afectar la productividad final del proceso. La velocidad de transferencia de oxígeno está condicionada por el tamaño de las burbujas de gas en la mezcla de reacción, determinado a su vez, por los sistemas de aireación y agitación¹⁵ utilizados. De todas maneras, serían necesarios estudios exhaustivos, que exceden a esta tesis, para corroborar esta hipótesis.

En base a esta evidencia recolectada en la sexta experiencia realizada en el biorreactor, se decidió trabajar utilizando un mayor caudal de aire estéril (2,0 L/min) durante todo el proceso. De esta manera se podría favorecer la TTO y así

tratar de evitar un decaimiento en la concentración de OD. En el séptimo y octavo ensayo realizados a esta escala de trabajo, manteniendo en ambos casos las mismas condiciones de reacción a modo de duplicados (Tabla 9.1, entradas 7 y 8), se observó que el porcentaje de conversión (92%) y porcentaje de exceso enantiomérico (98%) fueron muy similares a los alcanzados en los ensayos a escala de laboratorio (Figura 9.5).

Es importante mencionar que tanto en la séptima experiencia como en la octava (Tabla 9.1 entradas 7 y 8) se observaron perfiles de la concentración de OD como una función del tiempo de reacción, similares al mostrado en la Figura 9.6, aun cuando el caudal de aire ingresado fue más elevado desde el inicio del proceso.

Por otra parte, al obtener buenos resultados en ambos ensayos, se procedió a llevar a cabo el aislamiento y la purificación del (S)-1-FE. Se obtuvieron valores de rendimiento del producto puro aislado iguales a 32% para el ensayo 7 y 49% para el ensayo 8. En el caso de la séptima experiencia el tiempo de extracción utilizado en el extractor líquido-líquido (12 h) fue menor que el utilizado en la octava experiencia (24 h) y es posible que las diferencias observadas en los rendimientos sean debidas a esto. No obstante, mayores estudios son necesarios a fin de optimizar el proceso de aislamiento del producto.

Adicionalmente, para tratar de establecer una similitud entre los resultados alcanzados a escala de laboratorio (75 mL) con los resultados obtenidos en los ensayos realizados en el biorreactor (4 L) (factor de escala aproximado de 53) los gráficos correspondientes a cada uno de los procesos cinéticos pueden ser observados a continuación en la Figura 9.8. Adicionalmente, los datos fueron ajustados a una cinética de primer orden y las constantes de velocidad fueron calculadas utilizando el software OriginPro 8.

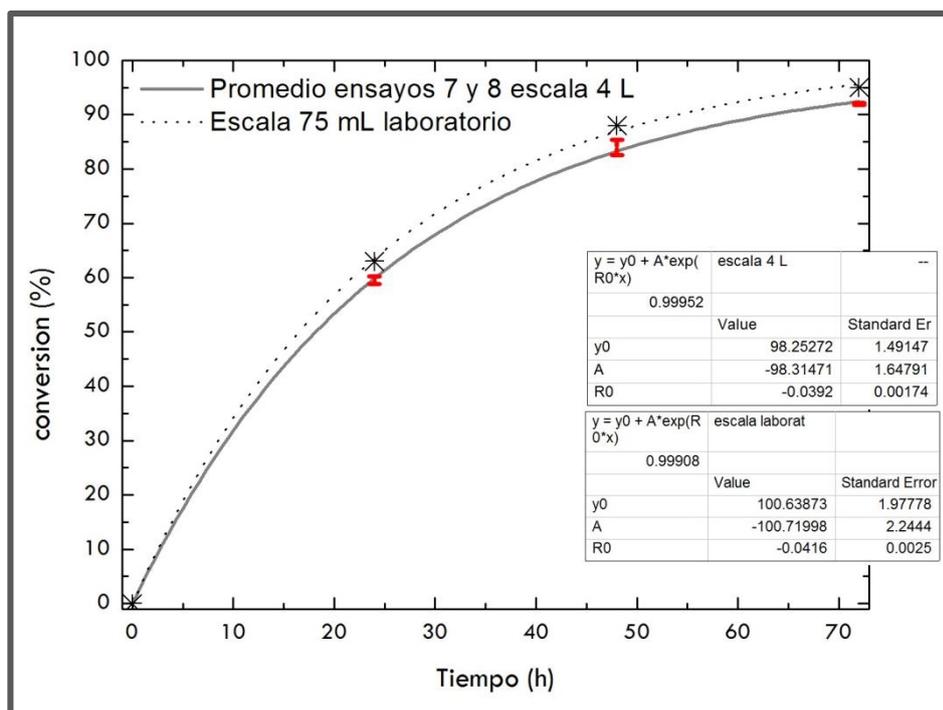


Figura 9.8: Cinética de reacción promedio de ensayos 7 y 8.

NOTA: la desviación estándar se representa en rojo.

Como se puede observar en la figura anterior, el valor promedio de la constante cinética para la reacción llevada a cabo en el biorreactor (4 L) presentó un valor de $0,039 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ mientras que el valor de la constante cinética para la reacción a escala de laboratorio (75 mL) fue de $0,042 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$. Debido a esta pequeña diferencia entre ambos valores de las constantes de primer orden es claro que es posible confirmar la cerrada similitud entre ambos procedimientos.

Finalmente, en base a los resultados alcanzados, ha sido posible establecer que las variables que tuvieron una importancia significativa para trabajar en un biorreactor como el utilizado en estas experiencias resultaron ser el pH, la concentración de buffer utilizado, y concentración de oxígeno disuelto. Debido a esto, resulta necesario mencionar que el cambio de formato del reactor, aun manteniendo los valores de variables optimizadas oportunamente establecidas para la escala de laboratorio, afectó significativamente al proceso de bio-reducción de la AF a (S)-1-FE llevado a cabo a una escala de 4 L en un biorreactor tipo tanque agitado. Es importante mencionar que observaciones similares han sido oportunamente reportadas para otros sistemas biocatalíticos³⁰.

9.4 Conclusiones

Durante el desarrollo del presente estudio, se ha logrado establecer las semillas de *L. lucidum* como eficientes reductores biológicos para transformar la AF en (S)-1-FE a una escala piloto de 4 L, en un biorreactor tipo tanque agitado. Luego de optimizar las variables más importantes observadas al cambiar el formato del reactor, se obtuvieron resultados prometedores y totalmente comparables a los valores de conversión, excesos enantioméricos y tiempos de reacción obtenidos a escala de laboratorio. Esto claramente demuestra la capacidad del biocatalizador para llevar a cabo la producción de (S)-1-FE enantioméricamente puro, a una escala aproximadamente 53 veces mayor que la obtenida en las experiencias de laboratorio. Debido a esto, la metodología propuesta presenta viabilidad para ser realizada a escalas de trabajo mayores. Más aún, es importante remarcar que los resultados alcanzados han demostrado ser altamente reproducibles, al obtener porcentajes de conversión y de excesos enantioméricos de (S)-1-FE, prácticamente iguales para los diferentes batch, realizados en diferentes momentos de este trabajo.

Por otra parte, es necesario que el proceso de aislamiento y purificación del producto final, no han sido optimizados y es esperable que, llevando a cabo un estudio detallado de la etapa de aislamiento y purificación (downstream), los rendimientos de (S)-1-FE puedan ser aumentados.

Es necesario continuar estudiando la viabilidad del reciclado de las semillas para su utilización en un sistema de batch sucesivos, como así también ensayar a escala piloto la bioreducción de otros sustratos, cuyos productos sean intermediarios claves en la síntesis de moléculas bioactivas de alto valor agregado.

Finalmente, es oportuno considerar dos características importantes del sistema desarrollado: por un lado, el procedimiento no posee la necesidad de trabajar en condiciones totalmente estériles, lo cual es una necesidad inevitable cuando se trabaja con microorganismos, y por otro, la utilización de un medio de reacción acuoso evita el empleo de solventes orgánicos, lo cual es común cuando se emplean los sistemas de reducción químicos clásicos para producir alcoholes quirales. Más aún, a diferencia de los procedimientos químicos clásicos, el promotor de esta reducción altamente eficiente y estereoselectiva es un recurso natural renovable.

9.5 Bibliografía

- [1] Muñoz Solano, D.; Hoyos, P.; Hernáiz, M. J.; Alcántara, A. R.; Sánchez-Montero, J. M. (2012). 'Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs'. *Bioresour. Technol.* 115, 196–207.
- [2] Woodley, J. M. (2018). 'Innovative process development and production concepts for small-molecule API manufacturing'. en *Computer Aided Chemical Engineering 3*, 67–84. (Elsevier B.V.).
- [3] Pellis, A.; Cantone, S.; Ebert, C.; Gardossi, L. (2018). 'Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities'. *N. Biotechnol.* 40, 154–169.
- [4] Humphrey, A. E. (1994). 'Plant cells as chemical factories: control and recovery of valuable products'. en *Advances in Bioprocess Engineering* 103–107. (Springer).
- [5] Tufvesson, P.; Lima-Ramos, J.; Nordblad, M.; Woodley, J. M. (2011). 'Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes'. *Org. Process Res. Dev.* 15, 266–274.
- [6] Woodley, J. M.; Breuer, M.; Mink, D. (2013). 'A future perspective on the role of industrial biotechnology for chemicals production'. *Chem. Eng. Res. Des.* 91, 2029–2036.
- [7] Tufvesson, P.; Fu, W.; Jensen, J. S.; Woodley, J. M. (2010). 'Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis'. *Food Bioprod. Process.* 88, 3–11.
- [8] He, C.; Ye, P.; Wang, H.; Liu, X.; Li, F. (2019). 'A systematic mass-transfer modeling approach for mammalian cell culture bioreactor scale-up'. *Biochem. Eng. J.* 141, 173–181.
- [9] Doran, P. M. (1998). *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. (Editorial Acribia).
- [10] Alford, J. S. (2006). 'Bioprocess control: Advances and challenges'. *Comput. Chem. Eng.* 30, 1464–1475.
- [11] Baeza, J. A. (2017). 'Principles of bioprocess control'. en *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls* 527–561. (Elsevier B.V.).
- [12] Davis, R. Z. (2010). 'Design and scale-up of production scale stirred tank

- fermenters'. *All Graduate Theses and Dissertations*. (Utah State University).
- [13] Palomares, L. A.; Ramírez, O. T. (2009). 'Bioreactor scale-up'. in *Encyclopedia of industrial biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology* 195–205. (Wiley).
- [14] PASCO. *Guía del Usuario Datalogger Xplorer GLX Pasco*.
- [15] Ramesh, H.; Nordblad, M.; Whittall, J.; Woodley, J. M. (2016). 'Considerations for the application of process technologies in laboratory- and pilot-scale biocatalysis for chemical synthesis'. in *Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations* 3 1–30. (Wiley).
- [16] Goundry, W. R. F.; Adams, B.; Benson, H.; Demeritt, J.; McKown, S.; Mulholland, K.; Robertson, A.; Siedlecki, P.; Tomlin, P.; Vare, K. (2017). 'Development and scale-up of a biocatalytic process to form a chiral sulfoxide'. *Org. Process Res. Dev.* 21, 107–113.
- [17] (2007). *Guide to operations: BioFlo 110. Modular benchtop fermentor*. (New Brunswick Scientific).
- [18] Martín, M.; Montes, F. J.; Galán, M. A. (2008). 'On the contribution of the scales of mixing to the oxygen transfer in stirred tanks'. *Chem. Eng. J.* 145, 232–241.
- [19] Martín, M.; Montes, F. J.; Galán, M. A. (2008). 'Bubbling process in stirred tank reactors II: Agitator effect on the mass transfer rates'. *Chem. Eng. Sci.* 63, 3223–3234.
- [20] Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E. (2009). 'Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview'. *Biotechnol. Adv.* 27, 153–176.
- [21] Zheng, L.; Zhang, X.; Bai, Y.; Fan, J. (2018). 'Using algae cells to drive cofactor regeneration and asymmetric reduction for the synthesis of chiral chemicals'. *Algal Res.* 35, 432–438.
- [22] Delgove, M. A. F.; Elford, M. T.; Bernaerts, K. V.; Wildeman, S. M. A. D. (2018). 'Toward upscaled biocatalytic preparation of lactone building blocks for polymer applications'. *Org. Process Res. Dev.* 22, 803–812.
- [23] Wang, X.; Saba, T.; Yiu, H. H. P.; Howe, R. F.; Anderson, J. A.; Shi, J. (2017). 'Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways'. *Chem* 2, 621–654.
- [24] De Oliveira Lopes, R.; Ribeiro, J. B.; Silva De Miranda, A.; Vieira Da Silva, G. V.; Miranda, L. S. M.; Ramos Leal, I. C.; Mendonça Alves De Souza, R. O.

- (2014). 'Continuous flow whole cell bioreduction of fluorinated acetophenone'. *Tetrahedron* 70, 3239–3242.
- [25] Li, H.; Li, Z.; Ruan, G.; Yu, Y.; Liu, X. (2016). 'Asymmetric reduction of acetophenone into R-(+)-1-phenylethanol by endophytic fungus *Neofusicoccum parvum* BYEF07 isolated from *Illicium verum*'. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473, 874–878.
- [26] Ni, Y.; Zhang, B.; Sun, Z. (2012). 'Efficient Synthesis of (R)-2-Chloro-1-(3-chlorophenyl)ethanol by Permeabilized Whole Cells of *Candida ontarioensis*'. *Chinese J. Catal.* 33, 681–687.
- [27] Bódai, V.; Nagy-Győr, L.; Örkényi, R.; Molnár, Z.; Kohári, S.; Erdélyi, B.; Nagymáté, Z.; Romsics, C.; Paizs, C.; Poppe, L.; Hornyánszky, G. (2016). 'Wickerhamomyces subpelliculosus as whole-cell biocatalyst for stereoselective bioreduction of ketones'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 134, 206–214.
- [28] Schmidt, F. R. (2005). 'Optimization and scale up of industrial fermentation processes'. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 425–435.
- [29] Nielsen, J. (2002). 'Fermentation monitoring, design and optimization'. en *Encyclopedia of bioprocess technology: Fermentation, biocatalysis and bioseparation* 1147–1189. (Wiley).
- [30] Woodley, J. M. (2020). 'New frontiers in biocatalysis for sustainable synthesis'. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 21, 22–26.

PARTE V: ESTUDIOS DE AMIGABILIDAD AMBIENTAL

CAPÍTULO 10: Métricas de la Química Verde: Estudio comparativo de los diferentes procesos de reducción estereoselectiva de Acetofenona

¿Por qué medir el progreso en la integración de la química verde en un proceso?

Comprender la importancia de adoptar un enfoque holístico para evaluar la 'amigabilidad ambiental' de una reacción química implica considerar las métricas de química verde como una herramienta para trabajar hacia soluciones más ecológicas y sustentables. Para ello, las métricas utilizadas deben permitirnos llegar a las siguientes metas:

- ✓ Identificar puntos críticos en aspectos ambientales
- ✓ Identificar etapas de reacción ambientalmente amigables
- ✓ Facilitar la evaluación comparativa: poder obtener una línea de base con la cual comparar nuevas metodologías químicas, en cuanto a su impacto en el ambiente
- ✓ Analizar ventajas y desventajas de rutas sintéticas, considerando la sustentabilidad y aceptabilidad ambiental de las mismas.

Las métricas de la Química Verde se han utilizado como una herramienta para identificar posibles puntos de mejora, para hacer que una reacción o un proceso químico sea más sustentable^{1,2}. Pero como cualquier proceso de medición impulsado por la performance, es importante que se registre y utilice las herramientas o métricas de referencia correctas, ya que es inherente de la naturaleza humana adoptar el instrumento de medición que mejores resultados arroje para su proceso, perdiendo todo objetividad en el análisis.

En definitiva, la química verde debe impulsar la búsqueda de procesos químicos sintéticos que reduzcan el impacto ambiental, en el contexto social actual, permitiendo mantener el progreso químico que ha contribuido a aumentar la calidad de vida de toda la población mundial³.

10.1 Introducción

El desarrollo del movimiento de la química verde ha desafiado a químicos e ingenieros en todos los campos a considerar el impacto ambiental de un proceso químico como una parte integral de su programa de desarrollo⁴. De esta manera, la química verde tiene como objetivo minimizar los riesgos ambientales de los procesos químicos y sus productos y, de esta forma, hacer que los procesos sean sustentables. De hecho, los dos conceptos van de la mano: la sustentabilidad debe ser la meta final y la Química Verde es la herramienta para alcanzarla.

Indudablemente el aspecto más importante de la Química Verde es el nuevo concepto asociado al diseño adecuado de los procesos productivos y en este sentido, los Doce Principios son ‘reglas de diseño’ que guían a los químicos a lograr el objetivo de la sustentabilidad. De esta manera, la Química Verde se caracteriza por una cuidadosa planificación de los procesos de síntesis química y el diseño molecular con el objetivo de eliminar o reducir los impactos adversos producidos por los ‘procesos químicos sucios’⁵. El enfoque de la Química Verde entonces, se esfuerza por lograr la sustentabilidad a nivel molecular.

A partir de allí, muchas tecnologías nuevas fueron promocionadas por la industria como ambientalmente amigables, basándose solamente en el hecho de que cumplían uno o varios de los doce principios. Sin embargo, no se debe perder de vista que los doce principios son cualitativos y no garantizan *per se* una protección medioambiental beneficiosa en términos cuantitativos. Por este motivo, para establecer la amigabilidad ambiental de un proceso químico se necesitó disponer de una metodología que pudiese establecer, de manera cuantitativa, el impacto medioambiental que puede provocar su utilización para justificar así, su aceptación como un ‘proceso verde’⁶. Desde entonces, los profesionales de la química se encuentran discutiendo y diseñando nuevas herramientas para tratar de establecer cuantitativamente, la amigabilidad ambiental o ‘verdor’ de las reacciones químicas⁷.

En este sentido, varios esfuerzos se han realizado para encontrar herramientas de medición para establecer, de una manera eficaz, la seguridad ambiental de una reacción química. Parámetros tales como la economía de átomos (AE)⁸, el factor de impacto ambiental basado en la masa (Em)^{9,10}, la eficiencia de carbono, el análisis del ciclo de vida (ACV)^{11,12}, la eficiencia de masa de reacción (RME)¹³ y la intensidad de masa (MI)¹⁴ entre otros, se han definido y utilizado para establecer un valor numérico (‘métrica’) del verdor de los procedimientos químicos. Cabe resaltar que, el término ‘métrica’ denota una relación o número que indica el

comportamiento respetuoso de un proceso químico con el medio ambiente. Sin embargo, es necesario reconocer que cada uno de estos parámetros tiene su propio alcance y limitaciones y por este motivo, la comunidad científica está reconsiderando constantemente las herramientas utilizadas con el objeto de mejorar las existentes^{15,16}.

Esto requiere un cambio de comportamiento significativo tanto para la industria como para el mundo académico, y para apoyar y reforzar este cambio es necesario medir el progreso en el desarrollo de procesos 'más verdes'. En resumen, medir el verdor no es sólo determinar la cantidad de residuos que se generan, sino que requiere un enfoque holístico, teniendo en cuenta diversos factores. A continuación, se listan ciertas capacidades que debería poder considerar una métrica ideal:

- ✓ Medir la seguridad inherente a los procesos o la falta de la misma
- ✓ Identificar los análisis realizados en tiempo real durante el proceso que permitan evitar la contaminación
- ✓ Cuantificar la toxicidad de todas las sustancias participantes
- ✓ Medir la potencial degradación del producto/subproductos
- ✓ Cuantificar el costo energético
- ✓ Analizar el impacto del ciclo de vida del producto
- ✓ Cuantificar la renovabilidad del proceso, analizando el uso y re-uso de recursos y,
- ✓ Establecer la eficiencia química del proceso

En este sentido, recientemente se han introducido dos metodologías semicuantitativas para evaluar las reacciones químicas desde un punto de vista más integral de su compatibilidad con el medio ambiente. La EcoScale (ES)¹⁷ y la Green Star (GS)¹⁸ son herramientas disponibles para evaluar el verdor de los procedimientos sintéticos y ambos métodos se aplican fácilmente si se conoce en detalle el proceso químico a evaluar. Por un lado, ES analiza seis parámetros que influyen en la calidad de una reacción (rendimiento, costo de los componentes de la reacción, seguridad, configuración técnica, necesidades energéticas y elaboración y purificación) y se obtiene como resultado, similar al rendimiento, una puntuación en una escala de 1 a 100 estableciendo penalidades numéricas o deméritos. Por otra parte, GS fue diseñado para considerar simultáneamente todos los Principios de la Química Verde aplicables en cada situación (una reacción, una vía sintética, un proceso químico, etc.). En la construcción de GS, para cada sustancia que interviene,

se consideran los peligros para la salud humana y el medio ambiente, los posibles accidentes químicos (salud y peligros físicos), así como la renovabilidad y la tendencia a descomponerse en productos de degradación inocuos.

Por sus características intrínsecas, ambos métodos favorecen un análisis holístico, ya que se realiza una evaluación simultánea de varios parámetros implicados en el proceso químico y esta característica los distingue claramente de otras métricas usadas para establecer el veredor de cualquier reacción química en particular.

Por otra parte, como se discutió en capítulos anteriores, la reducción asimétrica de cetonas proquirales representa una transformación fundamental de la síntesis orgánica, ya que los alcoholes quirales son precursores muy importantes para un gran número de productos farmacéuticos. Estos procesos de reducción estereoselectiva pueden realizarse utilizando diferentes metodologías. Entre ellos, se han descrito metodologías catalíticas y no catalíticas. Además, los métodos catalíticos se pueden clasificar en aquellos que utilizan catálisis química y métodos que utilizan la biocatálisis¹⁹. En la actualidad, existe una interesante discusión en la comunidad científica sobre qué método de síntesis es más verde y por lo tanto, los métodos químicos y bioquímicos tienen sus devotos y detractores¹⁵.

Objetivo del presente Capítulo: Evaluar comparativamente la amigabilidad ambiental del proceso de reducción estereoselectiva de AF desde los principios de la Química Verde, estableciendo el impacto y desventajas de cada metodología de síntesis como así también las limitaciones, practicidad y alcance de la utilización de las métricas verdes.

10.2 Materiales y Métodos

10.2.1 Reacción Modelo

Para la realización de los estudios comparativos, se utilizó la reducción estereoselectiva de AF a (*R*)- o (*S*)-1-FE como un sistema modelo de reducción de cetonas proquirales (Figura 10.1). Este procedimiento de síntesis es el que normalmente se utiliza como reacción modelo para determinar la eficiencia de las nuevas metodologías de reducciones estereoselectivas cuando se estudia un nuevo reactivo/catalizador²⁰⁻²².

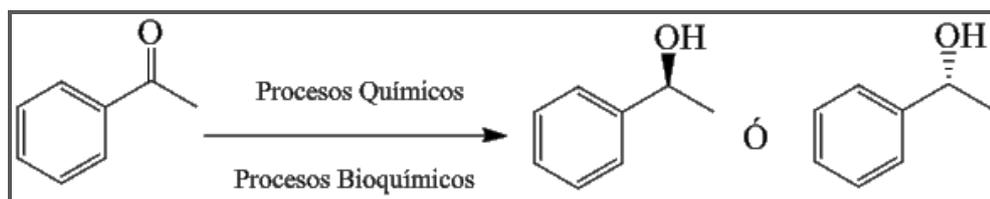


Figura 10.1: Reducción estereoselectiva de AF.

Esta elección se debe a que existe un número muy importante de fármacos que poseen dentro de su estructura molecular a la unidad 1-FE quiral como parte del grupo de átomos que conforman el farmacóforo. La importancia de esta aseveración puede ser comprendida gráficamente observando un grupo muy reducido de ejemplos descritos en la sección 3.1, Figura 3.4.

A pesar de que resulta obvio, no se puede dejar de mencionar que en las reacciones de reducción estereoselectivas de compuestos carbonílicos, la transferencia de un ión hidruro deberá ser realizada a través de un proceso que posea una clara preferencia por una de las estereocaras del grupo carbonilo. Esta preferencia está directamente relacionada, por un lado, a las características intrínsecas de catalizador utilizado y por otro, a la forma en la que el grupo carbonilo se ubica sobre dicho centro catalítico. En este sentido, varias metodologías han sido empleadas con éxito para llevar a cabo estas transformaciones de manera eficiente y con estereoselectividades casi absolutas. No obstante, contar con un agente reductor que posea las características adecuadas para producir este tipo de reducciones asimétricas ha sido quizás uno de los mayores retos de la Química Orgánica, como se ha expuesto en el capítulo 3 de esta tesis.

Por estas razones y debido a la importancia intrínseca de estos procesos, dieciséis diferentes metodologías reportadas en la literatura fueron seleccionadas y evaluadas desde el punto de vista de su amigabilidad ambiental. Ellas fueron

agrupadas de acuerdo a las características intrínsecas del procedimiento reductivo empleado y se las puede observar en la Tabla 10.1 presentada a continuación.

Tabla 10.1: Metodologías seleccionadas para la reducción estereoselectiva de AF.							
Entrada	Metodología de reducción		Reactivos/Catalizador	% Rend.	% e.e.	Autores	Referencia
1	Química	No Catalítica	catecolborano	88	98 (S)	Li <i>et al.</i> , 2010	[21]
2			Ipc ₂ BCl ^b o DIP-Cl	72	99 (S)	Brown <i>et al.</i> , 1988	[22]
3		Catalítica	Complejo de Ru	100	99 (R)	Guo <i>et al.</i> , 2012	[23]
4			Complejo de Ru	> 99	98 (S)	Fujii <i>et al.</i> , 1996	[24]
5			Complejo de Ru	100	98 (R)	Arakawa <i>et al.</i> , 2006	[25]
6			Complejo de Ru	99	99 ^a	Geldbach <i>et al.</i> , 2004	[26]
7			Complejo de Fe	97	98 ^a	Yu <i>et al.</i> , 2012	[27]
8			Complejo de Ir	95	98 (S)	Meriç <i>et al.</i> , 2016	[28]
9	Bioquímica	Catalítica	Microorganismo (bacteria entera)	99	> 99 (R)	Li <i>et al.</i> , 2015	[29]
10			Microorganismo (bacteria entera)	98	98 (R)	Hu <i>et al. Biotechnol Lett.</i> 2006	[30]
11			Microorganismo (hongo entero)	80	> 99 (S)	Kurbanoglu <i>et al.</i> , 2011	[31]
12			Microorganismo (hongo entero)	99	> 99,9 (R)	Decarlini <i>et al.</i> 2017	[32]
13			Microorganismo (hongo entero)	85	> 99 (S)	Kansal <i>et al.</i> , 2009	[33]
14			Vegetal	79	> 99 (S)	Aimar <i>et al.</i> , 2014	[36]
15			Enzima aislada de <i>Corynebacterium</i> sp	86	96 (S)	Itoh <i>et al.</i> , 1999	[34]
16			Enzima aislada de <i>T. ethanolicus</i>	79	98 (R)	Musa <i>et al.</i> , 2009	[35]

^a Configuración enantiomérica absoluta no especificada por los autores.

Para el estudio comparativo se utilizaron dos metodologías químicas no-catalíticas que emplean como agente reductor, un borano quiral (Tabla 10.1, entradas 1²³ y 2²⁴) y seis metodologías químicas catalíticas que utilizan un metal de transición (Ru, Fe e Ir) acompañado con un ligando quiral (Tabla 10.1, entradas 3-8²⁵⁻³⁰). Además, también se estudiaron ocho metodologías biocatalíticas las cuales incluyeron la utilización de células enteras, tanto de bacterias (Tabla 10.1, entradas 9³¹ y 10³²), como de hongos (Tabla 10.1, entradas 11-13³³⁻³⁵), ambas en sistemas mono y bifásicos. Adicionalmente también se analizaron sistemas que utilizan enzimas aisladas y sus cofactores tanto en sistemas monofásicos como bifásicos (Tabla 10.1, entradas 15³⁶ y 16³⁷). Por otra parte, también se realizaron los cálculos necesarios para establecer el veredor del proceso desarrollado durante el

transcurso de esta tesis, mediante la utilización de un vegetal como fuente de enzimas (Tabla 10.1, entrada 14³⁸) para llevar a cabo estas transformaciones, en las condiciones de reacción sin optimizar, previamente detalladas en la sección 4.2.5.

10.2.2 Características de los reportes utilizados

Para la realización de este estudio, la elección de las referencias bibliográficas fue crucial para poder realizar una comparación objetiva de los diferentes métodos sintéticos. Es importante aclarar que se consideraron resultados ya publicados, inclusive para la metodología desarrollada en esta tesis. El criterio de selección fue el mismo que describieron Selva y Perosa (2008)³⁹. En este sentido, se utilizaron dos criterios principales para seleccionar los ejemplos de la literatura a ser analizados: (i) mejor performance general (máximo rendimiento y estereoselectividad) del proceso, y (ii) disponibilidad de la descripción detallada del procedimiento utilizado. No obstante, cabe mencionar que al menos para algunos de los artículos citados, los autores podrían no haber optimizado las condiciones experimentales en términos del flujo total de materiales (solventes, proporción molar de los reactantes, etc.). Además, debido a que tanto ES como GS no tienen en cuenta en sus cálculos el porcentaje de exceso enantiomérico, sólo se han utilizado para los estudios comparativos, aquellos reportes que han informado metodologías con estereoselectividades mayores o iguales al 96%. Si bien la pureza enantiomérica mínima requerida de los productos farmacéuticos es del 98%, este criterio se utilizó para poder analizar un mayor número de metodologías y así extender la comparación.

10.2.3 Metodologías de cálculo

ES y GS fueron utilizadas como herramientas de medición para evaluar el valor de los procedimientos químicos seleccionados. Básicamente, ES utiliza una escala de 0 a 100, con 0 representando una reacción totalmente fallida y 100 representando la reacción ideal (desde el punto de vista de la Química Verde). La idea principal es asignar penalidades a seis elementos específicos de reacción (rendimiento, costo del componente, seguridad, configuración técnica, temperatura/tiempo de proceso, elaboración y purificación). Dentro de cada uno de estos parámetros, se asignan puntos de penalización individuales, con implicancias relativas que tienen en cuenta todas las situaciones experimentales posibles al llevar a cabo un experimento o

síntesis de química orgánica. Los puntos de penalización son acumulativos para todos los componentes de la preparación y con la siguiente fórmula:

$$\text{EcoScale} = 100 - \text{suma de penalidades individuales,}$$

es posible establecer un valor numérico. Utilizando las puntuaciones siguientes: > 75, excelente; > 50, aceptable; y <50, inadecuada, es posible asignar un valor de veredor de la reacción¹⁷. Se utilizó la aplicación disponible online de acceso libre (<http://ecoscale.cheminfo.org/calculator>) para calcular el valor de la amigabilidad ambiental de cada metodología seleccionada para el análisis, las capturas de pantalla correspondientes a los cálculos realizados se encuentran disponibles en el Anexo B.

Por otra parte, la idea básica de GS es construir una estrella con un número de esquinas igual al número de principios utilizados para la evaluación de la reacción de síntesis. En este sentido, se utilizan los 12 principios de la Química Verde o sólo algunos si los restantes no son aplicables. Cada punta de la estrella se representa con una longitud proporcional al grado de cumplimiento del principio correspondiente. Se puede obtener entonces una vista semicuantitativa del veredor global de la reacción observando la estrella y apreciando el tamaño de su área: cuanto más grande es el área, más ambientalmente amigable es la reacción¹⁸. Al igual que para la ES, se utilizó la aplicación online de acceso libre (<http://educa.fc.up.pt/avaliacaoverdura/>) para determinar un valor de amigabilidad ambiental de cada metodología seleccionada, las capturas de pantalla correspondientes a los cálculos realizados se encuentran disponibles en el Anexo B.

10.2.4 Reducción estereoselectiva de Acetofenona

La síntesis de (*R*)- ó (*S*)-1-feniletanol a partir de la reducción estereoselectiva de AF usando diferentes metodologías ha sido descrita en un gran número de fuentes académicas. Sin embargo, pocas metodologías tienen la capacidad de reducir la AF con un alto exceso enantiomérico (> 96%). La Tabla 10.1 resume los dieciséis métodos seleccionados para la realización de estos estudios.

Con el fin de determinar el veredor de la reacción de reducción, cada metodología de síntesis fue dividida en tres etapas, en donde cada una de ellas representa un paso del proceso de obtención. La primera etapa implica la preparación del catalizador, la segunda etapa identifica el proceso de reducción estereoselectiva y la tercera etapa se relaciona a los procedimientos de purificación

llevados a cabo para aislar el producto final. Esta división se realizó para tratar de facilitar la identificación de alguna etapa que tuviese un mayor impacto negativo en el proceso de síntesis. Por último, se estableció un valor de verdor del proceso global con la finalidad de comparar los procesos de manera integral.

10.3 Resultados y Discusión

10.3.1 Preparación del catalizador.

Para llevar a cabo el análisis del impacto generado por la síntesis del catalizador en cada uno de los casos de estudio, se confeccionó la Tabla 10.2, resumiendo las condiciones de cada uno de los procesos de síntesis: solventes, atmósfera, temperatura, tiempo y rendimiento global.

Como se mencionó anteriormente, dentro de la Química clásica, estos procesos de reducciones asimétricas han sido llevados a cabo utilizando tanto sistemas catalíticos como no catalíticos (Tabla 10.1, entradas 1-8). Por este motivo, para estos análisis se seleccionaron dos procesos no catalíticos los cuales involucraron al catecolborano utilizado en cantidad estequiométrica (Tabla 10.2, entrada 1) en presencia del ligando quiral L1 (derivado del 1,2-diaminociclohexano quiral, Figura 10.2)²³ y al isopinocanfenilcloroborano (Tabla 10.2, entrada 2)²⁴. Por otra parte, también se utilizaron en estos análisis reportes de procesos catalíticos que utilizan un sistema que combina un catalizador que posee un centro metálico acomplejado con un ligando quiral (inductor de quiralidad). Estos catalizadores, posteriormente son transformados en el medio de reacción en iones hidruros, los cuales una vez formados, funcionan como agentes reductores. Como se puede observar en la Tabla 10.2, en este estudio se utilizaron tres metales: Ru acomplejado con los ligandos L2 (derivado de la metalocenil fosfinooxazolina, Figura 10.2), L3 (derivado del p-TsNCH(C₆H₅)CH(C₆H₅)NH₂ (η^6 -mesitileno), Figura 10.2), L4 (sulfonamida quiral soportada sobre un polímero de p-estirenosulfonato, Figura 10.2) y L5 (derivado del tetrafluoroborato metalocenil 1,2-dimetilimidazolium acomplejado con N-tosyl-1,2-diphenylethylenediamine quiral, Figura 10.2); Fe acomplejado con el ligando L6 (macrocielo derivado de la reacción entre el 1,2-diaminociclohexano quiral y bis(o-formilfenil)fenilfosfano, Figura 10.2), e Ir acomplejado con el ligando L7 (derivado del ferrocenil fosfinito, Figura 10.2).

Cabe resaltar que en la actualidad, los químicos sintéticos disponemos de varios catalizadores que utilizan diferentes metales (Rh, Zn, Co, Ni, Cu, etc), acomplexados con ligandos quirales de estructuras variadas⁴⁰ no obstante, los reportes que existen en la literatura de referencia son similares en cuanto a funcionamiento y materiales utilizados a los que hemos seleccionado para realizar los estudios de este capítulo.

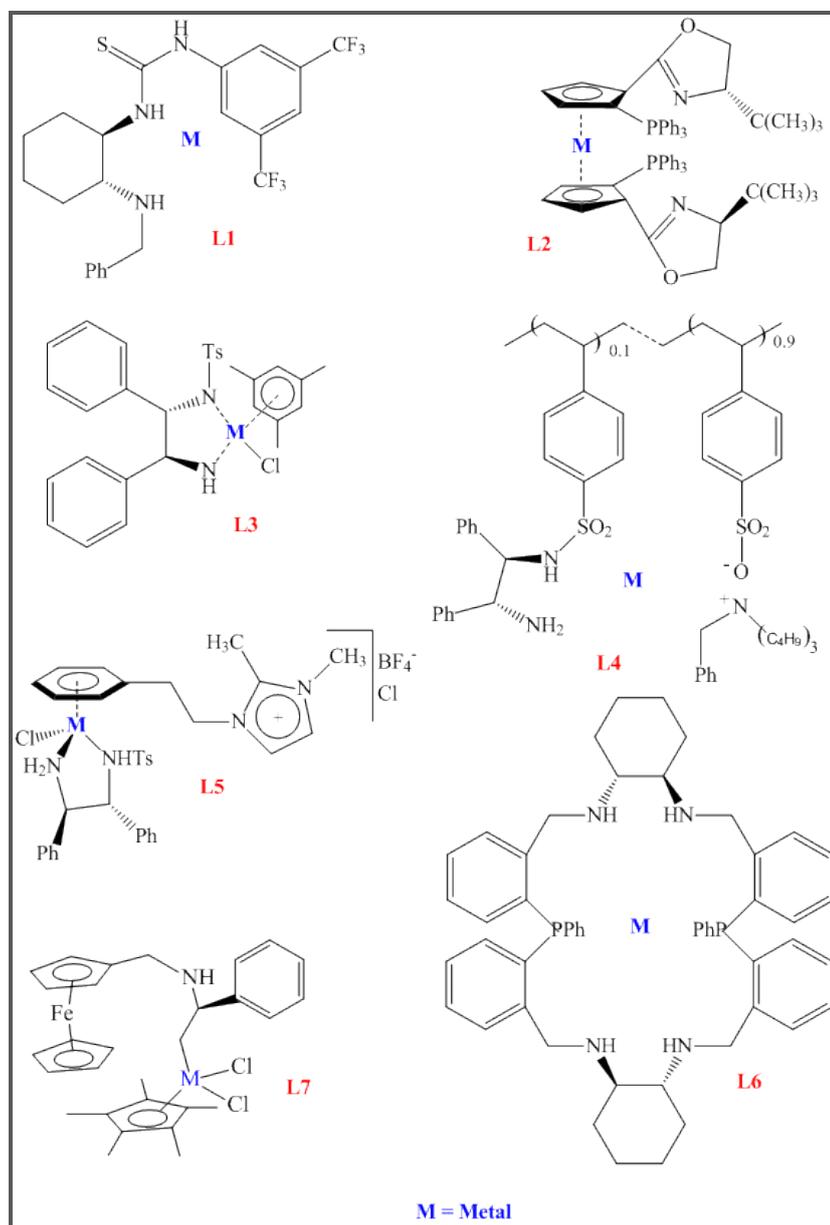


Figura 10.2: Ligandos quirales utilizados como inductores de quiralidad en los procesos de reducción estudiados.

Tabla 10.2: Etapa preparación del catalizador.												
Entrada	Metodología de reducción	Reactivos/ Catalizador	Ligando ^A / enzima	Solvente/ Medio de cultivo	Atm	T (°C)	Tiempo (h)	Rend. (%)	ES ^E	GS ^F	Referencia	
1	Química	No Catalítica	catecolborano	L1	Diclorometano/ metanol	Ar	0	14,7	75	28	25	Li <i>et al.</i> , 2010 ²¹ .
2			Ipc ₂ BCl ^B o DIP-Cl	----	THF/dietil éter	Ar/N ₂	-78	2	75	30,5	25	Brown <i>et al.</i> , 1988 ²² .
3		Catalítica	Complejo de Ru	L2	THF/diclorometano/TMEDA	N ₂	-78	24,7	30	0	25	Guo <i>et al.</i> 2012 ²³ .
4			Complejo de Ru	L3	TEA/iso-PrOH	aire	80	1	64	43	30	Fujii <i>et al.</i> , 1996 ²⁴ .
5			Complejo de Ru	L4 poli	DMF	Vacío	-196	1	79	64,5	30	Arakawa <i>et al.</i> , 2006 ²⁵ .
6			Complejo de Ru	L5	THF/tolueno/ dietileter/ diclorometano/ metanol/DMF	N ₂	110	60,5	80	0	35	Geldbach <i>et al.</i> , 2004 ²⁶ .
7			Complejo de Fe	L6	EtOH/cloroforno	N ₂	50	64	60	18	30	Yu <i>et al.</i> , 2012 ²⁷ .
8			Complejo de Ir	L7	Metanol/ diclorometano/etil éter/tolueno	N ₂ /Ar	65	62,5	41	0	30	Meriç <i>et al.</i> , 2016 ²⁸ .
9	Bioquímica	Catalítica	Microorganismo (bacteria entera)	<i>Empedobacter brevis</i>	Sales inorgánicas / extractos / agar	aire	37	24-72 h		52	58	Li <i>et al.</i> , 2015 ²⁹ .
10			Microorganismo (bacteria entera)	<i>Oenococcus oeni</i>		aire	37		93	92	Hu <i>Biotechnol Lett.</i> 2006 ³⁰ .	
11			Microorganismo (hongo entero)	<i>Cryptococcus laurentii</i>		aire	25		58	75	Kurbanoglu <i>et al.</i> , 2011 ³¹ .	
12			Microorganismo (hongo entero)	<i>Galactomyces candidus</i>		aire	25		95	100	Decarlini <i>et al.</i> , 2017 ³² .	
13			Microorganismo (hongo entero)	<i>Candida viswanathii</i>		aire	25		80	100	Kansal <i>et al.</i> , 2009 ³³ .	
14			Vegetal	<i>Ligustrum lucidum</i>			100	100	Aimar <i>et al.</i> , 2014 ³⁶ .			
15			Enzima aislada de <i>Corynebacterium</i> sp	PAR ^C	Sales inorgánicas / extractos / agar	Estireno	30	24-72 h	90	53	42	Itoh <i>et al.</i> , 1999 ³⁴ .
16			Enzima aislada de <i>T. ethanolicus</i>	I86A TeSADH ^D		aire	37		80	35	66,7	Musa <i>et al.</i> , 2009 ³⁵ .

^A Estructura del Ligando: ver Figura 10.2, ^B Ipc₂BCl o DIP-Cl = Di-iso-pinocamfenilcloroborano, ^C PAR = Fenilacetaldehido reductasa desde *Corynebacterium* sp
^D Alcohol deshidrogenasa I86A desde *Thermoanaerobacter ethanolicus*
^E Cálculo realizado online: <http://ecoscale.cheminfo.org/calculator>, ^F Cálculo realizado online: <http://educa.fc.up.pt/avaliacaoverdura/>

Adicionalmente, debemos mencionar que el Rh, ampliamente utilizado como catalizador, posee la desventaja que, debido a su escasa disponibilidad, resulta más costoso que el Ru, ya que a igual peso este último posee un valor de mercado de un tercio del Rh. Por este motivo, catalizadores con este metal no fueron incluidos en los estudios realizados, ya que el costo es una de las variables tenidas en cuenta en el puntaje proporcionado por la ES.

Con el objeto de contribuir a la discusión que existe sobre qué metodología resulta ambientalmente más amigable, también se seleccionaron para los análisis comparativos, procesos que involucran metodologías bioquímicas. En este sentido, como se puede observar en la Tabla 10.2, estas metodologías utilizan como biocatalizadores células enteras de bacterias como de *E. brevis* y *O. oeni* (entradas 9 y 10). Otros trabajos seleccionados utilizan células enteras de hongos como *C. laurentii* (Tabla 10.2, entrada 11); *Gal. candidus* GZ1 (Tabla 10.2, entrada 12) y *C. viswanathii* (Tabla 10.2, entrada 13). Adicionalmente se realizaron las determinaciones del verdor de reacciones utilizando enzimas aisladas provenientes de *Corynebacterium* sp (Tabla 10.2, entrada 15) y una enzima aislada de *T. ethanolicus* (Tabla 10.2, entrada 16). Resulta necesario aclarar que en el caso de biocatálisis mediada por microorganismos enteros, no es posible hablar de porcentaje de rendimiento en la producción de dichos biocatalizadores, mientras que sí lo es para el caso de enzimas aisladas y purificadas. Finalmente, para poder comparar con la metodología desarrollada en el transcurso de los estudios incluidos en esta tesis, también se incluyó el procedimiento de bio-reducción de AF promovido por frutos de *L. lucidum* (Tabla 10.2, entrada 14). Aquí, es interesante destacar que el procedimiento desarrollado en esta tesis es el único que carece de preparación de biocatalizador, ya que el vegetal recolectado ha sido directamente utilizado como tal, sin alterar el ecosistema. Por este motivo, se consideraron valores de 100 en ambas métricas, sin atribuirle ninguna penalidad ya que sólo han sido lavados con agua corriente de la red domiciliaria y desinfectados con una solución de hipoclorito diluida (0,05%), considerando despreciable el impacto de toxicidad del cloro.

Como se puede observar en la Tabla 10.2, los valores obtenidos mediante la utilización de los cálculos aportados por ES y GS para la preparación del catalizador, en general demuestran que los procesos biocatalíticos son mayormente más ambientalmente amigables que los procesos químicos clásicos.

En este sentido, resaltan los resultados desfavorables obtenidos por la aplicación de la ES para los métodos reportados por Guo *et al.* (2012)²³, Geldbach *et al.* (2004)²⁶ y Meriç *et al.* (2016)²⁸ (Tabla 10.2, entradas 3, 6 y 8) en donde el valor calculado por esta metodología resultó ser igual cero. Aquí cabe resaltar que, en la mayoría de los casos, el procedimiento de síntesis del ligando que acompleja el metal, posee un impacto muy negativo dentro del cálculo de amigabilidad ambiental para la obtención del catalizador. Por ejemplo, la obtención de L2 (Figura 10.2) y la formación del catalizador se llevó a cabo en tres pasos de síntesis, utilizando reactivos como alquil litio en THF, con un rendimiento global bajo (30%) y uno de los pasos fue realizado a -78 °C. Por otra parte, la obtención del ligando L5 (Figura 10.2) fue realizada en cinco pasos de síntesis y con un buen rendimiento global (80%), pero los reactivos y solventes utilizados en su obtención no son ambientalmente amigables lo que se tradujo en un impacto altamente negativo en el valor obtenido para en la ES. Para el caso del ligando L7 (Figura 10.2) la situación planteada fue similar a la anterior y la obtención del catalizador fue realizada también en cinco pasos de síntesis con un rendimiento global del 41%. Las condiciones de reacción, reactivos, solventes utilizados y los procedimientos de su purificación no fueron compatibles con el medio ambiente (CH₂Cl₂, Éter, Tolueno, hexano, condiciones de reflujo, etc) y esta situación se evidenció en el resultado de la evaluación por ES.

Para los casos de las metodologías reportadas por Li *et al.* (2010)²¹, Brown *et al.* (1988)²² y Fujii *et al.* (1996)²³, si bien los valores calculados para la ES no fueron extremos como en los casos anteriores, los resultados obtenidos no fueron aceptables. En efecto, la metodología reportada en la Tabla 10.2-entrada 1 no sería un procedimiento catalítico propiamente dicho, ya que el agente reductor es utilizado en una relación estequiométrica de exceso con respecto al sustrato, pero el ligando quiral es usado en una cantidad del 10% y el valor calculado por la ES para este sistema resultó bajo (28). Por otra parte, la metodología reportada en la Tabla 10.2-entrada 2, es una metodología química no catalítica neta. El proceso de síntesis del catalizador involucra condiciones de reacción, reactivos y solventes que en general no resultan compatibles con el medio ambiente (BH₃.S(CH₃)₂, THF, HCl gaseoso, operando a una temperatura de -78 °C) y allí radica el bajo valor obtenido cuando se realizó la determinación de la ES. Adicionalmente, la metodología reportada por Fujii *et al.* (1996)²⁴, reportó un valor de ES igual a 43 puntos. Esta metodología utiliza el ligando L3 (Figura 10.2) el cual fue obtenido a

partir de un único paso de síntesis utilizando dos reactivos comerciales ($[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-mesitileno})]_2$ y (1R,2R)-N-(p-tolilsulfonil)-1,2-difeniletilediamina) en una mezcla de $\text{N}(\text{Et})_3/\text{iso-PrOH}$ como solvente. El producto fue aislado por evaporación del solvente y el residuo fue filtrado.

Al observar la Tabla 10.2, sobresale como una excepción el resultado obtenido en el valor de la ES para la obtención del catalizador utilizando el método reportado por Arakawa *et al.* (2006)²⁵ (Tabla 10.2, entrada 5). En este ejemplo, el ligando L4 (Figura 10.2) fue obtenido a través de un único paso de síntesis mediante un procedimiento de copolimerización entre meso-1,2-difeniletilediamina, divinilbenceno y p-estirensulfonato, realizado a 60 °C en DMF en presencia de AIBN durante 15 h, en una ampolla cerrada y con un rendimiento relativamente alto (79%). Posteriormente, este ligando es acomplejado con el Ru en un sistema de reacción que utiliza H_2O como solvente. Esta metodología más simple que las anteriores (Tabla 10.2, entradas 5 vs 1-4, 6-8) demuestra que una economía de pasos de síntesis en combinación con la utilización de reactivos y solventes más verdes resulta claramente en un menor impacto ambiental del proceso.

Para el caso de los procesos biocatalíticos, los valores arrojados por la ES fueron, en general, significativamente mejores que aquellos obtenidos para los métodos químicos clásicos. Más aún para la metodología utilizada en este trabajo de tesis con frutos de siempreverde, el cual carece de etapas de síntesis o preparación del catalizador, y es claro que el evitar pasos en los procesos químicos es uno de los objetivos claves de la química verde. Tres de las metodologías estudiadas (Tabla 10.2, entradas 10,12-13) arrojaron como resultado valores claramente amigables para el medioambiente y solo una resultó no compatible desde el punto de vista de su verdor (Tabla 10.2, entrada 16). En este sentido, el puntaje más bajo se obtuvo cuando se utilizó una enzima aislada de *T. ethanolicus* y esto es atribuible a los procesos utilizados para realizar la purificación de dicha enzima.

Adicionalmente, tres metodologías reportaron por ES valores límites entre lo aceptable y lo no aceptable desde el punto de vista de su impacto ambiental (Tabla 10.2, entradas 9,11 y 15). En este sentido, la metodología reportada por Li *et al.* (2015)²⁹ (Tabla 10.2, entrada 9) utiliza una bacteria (*Empedobacter brevis*) como biocatalizador la cual fue desarrollada a través de varios pasos de cultivo. Inicialmente *E. brevis* se dejó crecer en un medio de cultivo que utiliza varias sales inorgánicas ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , K_2HPO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y las células

luego fueron aisladas y suspendidas en una solución salina en presencia de AF. Esta metodología fue repetida 4 veces para mejorar el desarrollo de la producción de las ADHs necesarias para llevar a cabo la transformación de la AF. Posteriormente, la bacteria aislada fue desarrollada en un medio específico (triptona, extracto de levadura y NaCl) y aislada para su utilización como biocatalizador. Este procedimiento de varios pasos y la utilización de varios reactivos, se ve reflejado en el valor observado para ES. Por otra parte, la metodología descrita por Itoh *et al.* (1999)³⁴ (Tabla 10.2, entrada 15) utiliza como biocatalizador, una enzima aislada a partir de una especie de *Corynebacterium* sp. Este microorganismo fue cultivado a 30 °C por 3 días sobre un medio sólido compuesto de (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄, NaCl, MgSO₄·7H₂O, extracto de levadura, y agar, bajo atmósfera de estireno. Luego las células fueron suspendidas en buffer de fosfato de potasio y recolectadas por filtración. Posteriormente, la obtención de la enzima a partir de las células se realizó utilizando un proceso mecánico de disrupción celular en presencia de Al₂O₃ y lavadas con buffer de fosfato. La mezcla fue centrifugada y el sobrenadante fue dializado. La enzima fue concentrada por ultrafiltración, mezclada con una solución de (NH₄)₂SO₄ y purificada por columna sobre un gel específico. Obviamente, la cantidad de pasos necesarios para llevar a cabo el aislamiento y la purificación de la enzima, así como también las condiciones de trabajo y los reactivos utilizados, se ve reflejado en el valor obtenido mediante el cálculo de la ES.

Las técnicas de producción de biocatalizadores que presentaron los mejores resultados en estos análisis mediante el uso de la ES fueron las metodologías reportadas por Hu *et al.* (2006)³⁰; Tabla 10.2, entrada 10), Decarlini *et al.* (2017)³²; Tabla 10.2, entrada 12) y Kansal *et al.* (2009)³³; Tabla 10.2, entrada 13). En este sentido, las metodologías utilizaron medios de cultivos simples y condiciones de trabajo sencillas lo cual se ve reflejado en los valores obtenidos por medio de la ES. Por ejemplo, la metodología reportada por Hu *et al.* (2006)³⁰ cultivó una cepa de *Oenococcus oeni* en un medio que contiene glucosa, extracto de levadura, y sales minerales. El microorganismo desarrollado fue separado por centrifugación. Por otra parte, la metodología reportada por Kansal *et al.* (2009)³³, utilizó una cepa de *Candida viswanathii*, la cual fue desarrollada en un medio de cultivo formulado a base de peptona, extracto de carne, extracto de levadura, NaCl y manitol. Las células fueron separadas del medio de cultivo y lavadas con una solución de buffer de fosfato. Finalmente, en la metodología utilizada por Decarlini *et al.* (2017)³², *Gal. candidus* GZ1 fue obtenido mediante procesos similares. El uso de estas

metodologías más simples, que involucran medios y reactivos compatibles con el medio ambiente, se ve reflejado en los valores obtenidos mediante el cálculo por ES.

Por otra parte, los cálculos realizados utilizando GS también reflejan una ventaja de los métodos biocatalíticos sobre los métodos químicos en cuanto a la preparación del catalizador. En general, los valores obtenidos para la obtención de los catalizadores químicos clásicos presentaron valores de GS que oscilaron entre 25-35 puntos (Tabla 10.2, entradas 1-3 y 6) y ninguno de ellos resultó ambientalmente compatible. Por otro lado, los valores obtenidos mediante la GS para la preparación de los biocatalizadores oscilaron entre los valores de 42-100 puntos (Tabla 10.2, entradas 15 vs 12-13). Aquí cabe resaltar que, tanto ES y GS coincidieron en establecer puntajes altos para los mismos procedimientos (Tabla 10.2 entradas 10, 12-13), destacando una alta compatibilidad con el ambiente de estos procedimientos.

Finalmente, no se puede dejar de mencionar que mediante la utilización de la GS se observó una relativa incapacidad para discriminar finamente el verdor dentro de las metodologías químicas clásicas. Esto pondría en evidencia una característica intrínseca de la GS: es una metodología más cualitativa que la ES. En este sentido, los resultados alcanzados mediante la aplicación de la GS no fueron demasiado diferentes para las metodologías químicas estudiadas, pero la ES brindó resultados numéricos que permitieron diferenciar fácilmente los métodos menos aceptables de aquellos que tienen una mayor amigabilidad ambiental. Finalmente, debemos mencionar que evitar la etapa de síntesis de catalizador siempre será ambientalmente más favorable (Tabla 10.2, entrada 14).

10.3.2 Reacción de reducción estereoselectiva.

En esta sección hemos analizado el impacto que genera la etapa de reducción propiamente de la AF, teniendo en cuenta las condiciones de reacción para lograrlo. En la Tabla 10.3 se resumen algunas de las condiciones de reacción de reducción de AF empleando las metodologías seleccionadas (entradas 1-16, columnas correspondientes a Agente de transferencia de hidruro, Solvente, Atmosfera, Temperatura y Tiempo de reacción).

Tabla 10.3: Etapa de reducción de AF.															
Entrada	Metodología de reducción	Reactivos/ Catalizador	Ligando ^A / enzima	Agente de transferencia de hidruro	Solvente	Atm	T (°C)	Tiempo (h)	Rend. (%)	e.e. (%)	ES ^E	GS ^F	Referencia		
1	No Catalítica	catecolborano	L1	catecolborano	Tolueno	Ar	-46	24	88	98	34	25	Li et al., 2010 ²¹ .		
2		lpc ₂ BCl ^B o DIP-Cl	----	lpc ₂ BCl ^B o DIP-Cl	THF	N ₂	-25	8	72	98	13	25	Brown et al., 1988 ²² .		
3	Química	Catalítica	Complejo de Ru	L2	H ₂	iso-PrOH	H ₂	0	25	100	99,1	51	20	Guo et al., 2012 ²³ .	
4			Complejo de Ru	L3	HCO ₂ H / TEA		aire	28	20	>99	98	78,5	20	Fujii et al., 1996 ²⁴ .	
5			Complejo de Ru	L4 poli	HCO ₂ Na	Agua	aire	25	4	100	98	75	35	Arakawa et al., 2006 ²⁵ .	
6			Complejo de Ru	L5	HCO ₂ H / TEA / Líquido iónico		aire	35	24	99	99	65,5	25	Geldbach et al., 2004 ²⁶ .	
7			Complejo de Fe	L6	KOH / NH ₄ Cl / iso-PrOH		aire	55	1	97	98	45,5	25	Yu et al., 2012 ²⁷ .	
8			Complejo de Ir	L7	KOH / iso-PrOH		H ₂	25	0,33	100	98	61,5	30	Meriç et al., 2016 ²⁸ .	
9	Bioquímica	Catalítica	Bacteria entera	<i>Empedobacter brevis</i>		Buffer pH 7	aire	30	12	99	99	74	55	Li et al., 2015 ²⁹ .	
10			Bacteria entera	<i>Oenococcus oeni</i>		Buffer pH 8,5/nonano	aire	30	48	98	98	82	50	Hu et al., <i>Biotechnol Lett.</i> 2006 ³⁰ .	
11			Hongo entero	<i>Cryptococcus laurentii</i>		Buffer pH 6,5	aire	30	36	80	99,9	77	70	Kurbanoglu et al., 2011 ³¹ .	
12			Hongo entero	<i>Galactomyces candidus</i> GZ1		Buffer pH 7	aire	25	48	99	99,9	71	80	Decarlini et al., 2017 ³² .	
13			Hongo entero	<i>Candida viswanathii</i>		Buffer pH 7/hexano (iso-PrOH)	aire	30	1	85	96	67	50	Kansal et al., 2009 ³³ .	
14			Vegetal	<i>Ligustrum lucidum</i>		Buffer pH 6,5	aire	20	144	79	99	59,5	60	Aimar et al., 2014 ³⁶ .	
15			Enzima aislada de <i>Corynebacterium</i> sp	PAR ^C	Cofactores NAD ⁺		Buffer pH 7	aire	25	19	100	96	60	55	Itoh et al., 1999 ³⁴ .
16			Enzima aislada de <i>T. ethanolicus</i>	I86A TeSADH ^D	Cofactores NADP ⁺		Bifásico agua/hexano	aire	50	24	79	98	27,5	50	Musa et al., 2009 ³⁵ .

^A Estructura del Ligando: ver Figura 10.2, ^B lpc₂BCl o DIP-Cl = Di-iso-pinocamfenilcloroborano, ^C PAR = Fenilacetaldhído reductasa desde *Corynebacterium* sp
^D Alcohol deshidrogenasa I86A desde *Thermoanaerobacter ethanolicus*
^E Cálculo realizado online: <http://ecoscale.cheminfo.org/calculator>, ^F Cálculo realizado online: <http://educa.fc.up.pt/avaliacaoverdura/>

Respecto a los agentes de transferencia del ión hidruro, en las metodologías que incluyen Ru, se utilizó atmósfera de H₂ en iso-PrOH (Tabla 10.3 entrada 3), una mezcla de HCO₂H/N(Et)₃ (Tabla 10.3, entrada 4), HCO₂Na en agua (Tabla 10.3, entrada 5) y HCO₂H / N(Et)₃ pero usando como solvente una mezcla de iso-PrOH / líquido iónico (Tabla 10.3, entrada 6). Para el caso de las metodologías con Fe, se utilizó una mezcla de iso-PrOH / KOH / NH₄Cl (Tabla 10.3, entrada 7) y para el caso del Ir, se utilizó una mezcla de iso-PrOH / KOH (Tabla 10.3, entrada 8).

Dentro de las metodologías bioquímicas, algunas utilizan como biocatalizadores células enteras de bacterias como de *E. brevis* en un buffer pH 7 (entrada 9) y *O. oeni* en un sistema bifásico conformado por buffer y nonano (entrada 10). Otros autores seleccionados utilizan células enteras de hongos como *C. laurentii* (Tabla 10.3, entrada 11) en buffer pH 6,5; *Gal. candidus* GZ1 (Tabla 10.3, entrada 12) en buffer pH 7 y *C. viswanathii* (Tabla 10.3, entrada 13) en sistema bifásico compuesto por una mezcla de buffer y hexano con el agregado de iso-PrOH para facilitar el reciclado de los cofactores. Adicionalmente se realizaron las determinaciones del verdor de reacciones utilizando enzimas aisladas provenientes de *Corynebacterium* sp (Tabla 10.3, entrada 15) en buffer pH 7,0 con el agregado de sus cofactores y una enzima aislada de *T. ethanolicus* (Tabla 10.3, entrada 16) en un sistema bifásicos compuesto por agua y hexano, más el agregado de sus cofactores. Finalmente, para poder comparar con la metodología desarrollada en el transcurso de esta tesis, también se incluyó el procedimiento de bioreducción de AF promovido por la utilización de un vegetal como catalizador (Tabla 10.3, entrada 14). Aquí, cabe aclarar que se consideró el proceso sin optimización de las condiciones de reacción, utilizando frutos frescos molidos de *L. lucidum*, pH 6,5 y 20 °C, por ser las condiciones que han sido publicadas en una revista científica.

Como se puede observar en la Tabla 10.3, tres de las metodologías químicas analizadas por ES presentaron valores desfavorables desde el punto de vista ambiental (Tabla 10.3, entradas 1-2, 7). En el sistema de reducción utilizado por Li *et al.* (2010)²¹ (Tabla 10.3, entrada 1) la reducción fue realizada utilizando un catecolborano en presencia de L1 al 10% (Figura 10.2) a una temperatura baja (desde -78 a -46 °C), bajo atmósfera de Argón, durante un período de tiempo de 24 h y utilizando tolueno con el agregado de NaOH y tamices moleculares de 4 Å.

Por otra parte, la metodología reportada por Brown *et al.* (1988)²² (Tabla 10.3, entrada 2), fue la que menor puntaje reportó para la valoración de la ES (13 puntos), debido a que la reacción de reducción fue realizada utilizando un borano

quiral en condiciones casi estequiométricas de sustrato y catalizador, a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, bajo atmósfera de Nitrógeno y utilizando THF como solvente. Por otra parte, la metodología reportada por Yu *et al.* (2012)²⁷ (Tabla 10.3, entrada 7) reportó por ES un valor de 45,5 puntos. La reacción de reducción fue llevada a cabo utilizando el catalizador conformado por $\text{Fe}_3(\text{CO})_{12}$ y L4 (Figura 10.2) más el agregado de NH_4Cl , KOH e iso-PrOH como solvente y a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La metodología reportada por Guo *et al.* (2012)²³, produjo un valor de ES en el límite de aceptabilidad para su impacto ambiental (Tabla 10.3, entrada 3). Dicha metodología fue realizada bajo atmósfera de Argón, en iso-PrOH, el cual primero fue calentado a reflujo para disolver el catalizador (Ru y L2) para luego ser enfriado a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se agregó *tert*-BuOK y la reacción fue agitada bajo atmósfera de H_2 . Es interesante remarcar que a pesar de que la reacción utiliza H_2 como parte del sistema de reacción para producir la reducción de AF, el valor proporcionado mediante el cálculo de la ES, no fue del todo incompatible con el medio ambiente, ya que el valor hallado por la ES (51 puntos) se encuentra en el límite de aceptabilidad.

Los mejores resultados para la ES fueron encontrados al analizar las metodologías reportadas por Meriç *et al.* (2016)²⁸, (Tabla 10.3, entrada 8), Geldbach *et al.* (2004)²⁶ (Tabla 10.3, entrada 6), Arakawa *et al.* (2006)²⁵ (Tabla 10.3, entrada 5) y en especial la reportada por Fujii *et al.* (1996)²⁴ (Tabla 10.3, entrada 4). En este sentido, la metodología reportada en la entrada 8 (Tabla 10.3) fue realizada utilizando un catalizador de Iridio acomplejado con el ligando L7 (Figura 10.2) y utilizando un sistema de reacción que incluyó como reactivos KOH en iso-PrOH a reflujo y produjo un valor de ES de 61,5 puntos. Por otra parte, la metodología de reportada en la entrada 6 (Tabla 10.3) fue realizada utilizando un catalizador de Ru acomplejado con L5 (Figura 10.2) en un medio de reacción que involucró como reactivos a una mezcla de $\text{HCO}_2\text{H}/\text{N}(\text{Et})_3$ /líquido iónico. Al finalizar la reacción el producto fue extraído con hexano y el valor obtenido por medio de la ES fue 64,5 puntos.

Para el caso de la metodología de reducción reportada por Arakawa *et al.* (2006)²⁵ (Tabla 10.3, entrada 5), la reacción se llevó a cabo utilizando un catalizador de Ru acomplejado con el ligando polimérico L4 (Figura 10.2) y el procedimiento reductivo fue realizado utilizando HCO_2Na en H_2O como solvente, en atmósfera de aire y a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. La puntuación reportada por la ES para esta metodología fue ambientalmente amigable (75 puntos).

Los mejores resultados, en cuanto a puntuación por la ES fue asignada a la metodología química de reducción estereoselectiva de la AF reportada por Fujii *et al.* (1996)²⁴ (Tabla 10.3, entrada 4). El procedimiento fue llevado a cabo utilizando un catalizador de Ru acomplejado con el ligando L3 (Figura 10.2) en un sistema de reacción que involucró el uso de una mezcla de HCO₂H/N(Et)₃ bajo atmósfera de aire y a 28 °C. La puntuación otorgada por la ES fue ambientalmente amigable (78,5 puntos).

Para el caso de las metodologías bioquímicas, los valores reportados por la ES estuvieron comprendidos entre 27,5 (Musa *et al.*, 2009³⁵; Tabla 10.3 entrada 16) y 82 puntos (Hu *et al.*, 2006³⁰; Tabla 10.3 entrada 10). Aquí es necesario remarcar que la metodología reportada en la Tabla 10.3-entrada 16 (Musa *et al.* 2009)³⁵, fue la única que resultó ser ambientalmente no compatible. Este procedimiento involucró la utilización de una enzima asilada a partir de una cepa de *T. ethanolicus* con el agregado de sus cofactores los cuales poseen un valor elevado. La reacción se llevó a cabo en un sistema de reacción bifásico agua/hexano, a una temperatura de 50 °C y el valor hallado por medio de la ES fue claramente no compatible con el medio ambiente (27,5 puntos). Aquí cabe resaltar que el hexano también tuvo un aporte negativo en el valor hallado para la ES ya que este solvente se encuentra dentro de la lista de los solventes no verdes por su alta presión de vapor y su inflamabilidad.

Por otra parte, la metodología reportada por Hu *et al.* (2006)³⁰, resultó claramente compatible con el medio ambiente. La reacción de reducción fue llevada a cabo suspendiendo las células de *O. oeni* en un sistema bifásico (buffer pH 8,5/nonano) con el agregado de glucosa. Resulta obvio que la compatibilidad ambiental de este sistema es debido a su naturaleza simple y a las condiciones de reacción utilizadas. Más aún, el nonano puede ser considerado (al igual que el heptano) un solvente verde debido a su baja presión de vapor. El valor hallado mediante el cálculo de la ES fue de 82 puntos.

Para el caso de la metodología utilizada en esta tesis y reportada por Aimar *et al.* (2014)³⁶, el valor obtenido por medio de la ES fue de 59,5 puntos (Tabla 10.3, entrada 14). Esta relativamente baja puntuación fue debida al prolongado tiempo de reacción (6 días) para llevar a cabo la reacción de transformación de la AF. Estos aspectos serán objetos de estudio en próximos trabajos de investigación, fuera del alcance de esta tesis. En investigaciones posteriores, se buscará optimizar el proceso de reducción de AF con frutos de siempreverde y de esta manera alcanzar

mejores rendimientos en menor tiempo de reacción, sin perder la alta selectividad. De esta manera se deberían alcanzar valores de GS y ES mayores para la etapa de reducción, disminuyendo aún más el impacto ambiental del proceso.

En el caso de la metodología reportada por Ioth *et al.* (1999)³⁴ el valor hallado por medio de la ES fue de 60 puntos (Tabla 10.3, entrada 15) y esto fue debido al costo de la coenzima utilizada (NADH).

Para el resto de las metodologías biocatalíticas analizadas, la situación fue similar a lo reportado por Hu *et al.* (2006)³⁰ debido a que los sistemas de reacción también fueron simples. En efecto, los valores obtenidos mediante el cálculo de la ES fueron similares (67-77 puntos, Tabla 10.3, entradas 1,3-7) y compatibles con el medio ambiente.

Por otra parte, al igual que en el análisis realizado en la sección anterior para la obtención de los catalizadores, los cálculos realizados utilizando GS nuevamente reflejan una ventaja de los métodos biocatalíticos sobre los métodos químicos para llevar a cabo el proceso de reducción. En general, los valores obtenidos para la reducción estereoselectiva de la AF por los métodos químicos clásicos presentaron valores de GS que oscilaron entre 20-35 puntos (Tabla 10.3, entradas 1-8) y ninguno de ellos resultó ambientalmente compatible. Por otro lado, los valores obtenidos con GS para la reacción de reducción utilizando metodologías biocatalíticas, oscilaron entre los valores de 50-80 puntos (Tabla 10.3, entradas 9-16).

10.3.3 Proceso de Purificación.

Uno de los inconvenientes más importantes al momento de analizar los procedimientos de purificación de los productos obtenidos mediante su correspondiente análisis por ES y GS para los reportes bibliográficos seleccionados, es la falta de datos referidos a los procesos, solventes y cantidades utilizadas para obtener el producto puro. Adicionalmente, tampoco se debería dejar de mencionar que algunas de las publicaciones analizadas no informan rendimiento del producto aislado, sino el valor de conversión medida por una técnica analítica adecuada y, como ya se estableció en la sección 4.2.3 de esta tesis, estos valores no son equivalentes.

Para subsanar este inconveniente y poder calcular los correspondientes valores de amigabilidad ambiental aportados tanto por la ES como por la GS, se realizaron algunas aproximaciones. Por un lado, en aquellos reportes en que sólo se

informa el dato de conversión analítica se asumieron como si fuesen datos de rendimiento del producto puro aislado, generando un resultado falsamente ventajoso. Por otra parte, en algunos de los reportes analizados, si bien se establece el solvente de extracción utilizado, no se detallan las cantidades necesarias. En el mismo sentido, tampoco se publican las cantidades de sílica gel utilizadas para las purificaciones en columna ni las cantidades de solventes utilizada en ella, etc., los cuales son requisitos para la realización de los cálculos. Para paliar esta situación, en los cálculos de ES y GS se utilizaron las proporciones de solventes y sílica gel utilizadas para purificar (S)-1-FE obtenido mediante el proceso de síntesis usando frutos de siempreverde. De esta manera, aunque en forma aproximada, fue posible solucionar este inconveniente y obtener valores de ES y GS, que, si bien no son exactamente correctos, nos fueron suficientes para comparar los diferentes métodos estudiados. Los resultados son expuestos en la Tabla 10.4, presentada a continuación.

Como se puede observar en la Tabla 10.4 (entradas 1-8 vs 9-16) y a diferencia de lo descrito en las secciones anteriores, en general las metodologías químicas clásicas proporcionaron puntuaciones levemente superiores a las obtenidas para las metodologías bioquímicas durante el análisis de las metodologías de purificación utilizadas. En este sentido, los valores obtenidos por ES para las metodologías químicas estuvieron comprendidos entre 35 y 90,5 puntos de amigabilidad ambiental (Tabla 10.4, entradas 3 y 4), mientras que, para las metodologías bioquímicas, el puntaje estuvo comprendido entre 16,5 y 55 puntos (Tabla 10.4, entradas 16 y 15, respectivamente).

Tabla 10.4: Etapa de purificación de 1-FE.										
Entrada	Metodología de reducción	Reactivos/ Catalizador	Ligando ^A / enzima	Purificación	Conv. (%)	Rend. (%)	ES ^E	GS ^F	Referencia	
1	Química	No Catalítica	catecolborano	L1	Cromatografía en columna	88	88	39	50	Li et al., 2010 ²¹ .
2			Ipc ₂ BCl ^B o DIP-Cl	----	Destilación CG preparativa	72	72	73	100	Brown et al., 1988 ²² .
3		Catalítica	Complejo de Ru	L2	Cromatografía en columna	100	No inf.	35	50	Guo et al., 2012 ²³ .
4			Complejo de Ru	L3	Destilación	>99	>99	90,5	100	Fujii et al., 1996 ²⁴ .
5			Complejo de Ru	L4 poli	No informado	100	No inf.	50	50	Arakawa et al., 2006 ²⁵ .
6			Complejo de Ru	L5	No informado	99	No inf.	49,5	50	Geldbach et al., 2004 ²⁶ .
7			Complejo de Fe	L6	No informado	97	No inf.	48,5	50	Yu et al., 2012 ²⁷ .
8			Complejo de Ir	L7	No informado	95	No inf.	46,5	50	Meriç et al., 2016 ²⁸ .
9	Bioquímica	Catalítica	Bacteria entera	<i>Empedobacter brevis</i>	No informado	99	No inf.	48,5	67	Li et al., 2015 ²⁹ .
10			Bacteria entera	<i>Oenococcus oeni</i>	No informado	98	No inf.	41	50	Hu et al., <i>Biotechnol Lett.</i> 2006 ³⁰ .
11			Hongo entero	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Cromatografía en columna	100	80	36	50	Kurbanoglu et al., 2011 ³¹ .
12			Hongo entero	<i>Galactomyces candidus</i> GZ1	Cromatografía en columna	99	82	43	50	Decarlini et al., 2017 ³² .
13			Hongo entero	<i>Candida viswanathii</i>	No informado	85	No inf.	54,5	50	Kansal et al., 2009 ³³ .
14			Vegetal	<i>Ligustrum lucidum</i>	Cromatografía en columna	94	79	39,5	50	Aimar et al., 2014 ³⁶ .
15			Enzima aislada de <i>Corynebacterium</i> sp	PAR ^C	Cromatografía en columna	100	86	55	58	Itoh et al., 1999 ³⁴ .
16			Enzima aislada de <i>T. ethanolicus</i>	I86A TeSADH ^D	Cromatografía en columna	79	No inf.	16,5	50	Musa et al., 2009 ³⁵ .

^A Estructura del Ligando: ver Figura 10.2, ^B Ipc₂BCl o DIP-Cl = Di-iso-pinocamfenilcloroborano, ^C PAR = Fenilacetaldehido reductasa desde *Corynebacterium* sp
^D Alcohol deshidrogenasa I86A desde *Thermoanaerobacter ethanolicus*
^E Cálculo realizado online: <http://ecoscale.cheminfo.org/calculator>, ^F Cálculo realizado online: <http://educa.fc.up.pt/avaliacaoverdura/>

En este sentido, para el caso de las metodologías químicas, las que demostraron peor desempeño fueron la reportada por Guo *et al.* (2012)²³ (Tabla 10.4, entrada 3) y por Li *et al.* (2010)²¹ (Tabla 10.4, entrada 1). En ambos casos la purificación del 1-FE fue realizada por concentración al vacío del crudo de reacción y purificación por cromatografía en columna.

De las metodologías químicas analizadas, solamente dos resultaron ser ambientalmente amigables según el valor del verdor aportado por la ES. Los reportes informados por Brown *et al.* (1988)²² (Tabla 10.4, entrada 2) y por Fujii *et al.* (1996)²⁴ (Tabla 10.4 entrada 4) presentaron puntajes de 73 y 90,5 respectivamente. Esta situación ha sido consecuencia de la purificación del crudo de reacción mediante un proceso de destilación.

Por otro lado, las demás metodologías estudiadas (Tabla 10.4, entradas 5-8) produjeron valores levemente por debajo de lo aceptable y en estos casos, debido a que no se reporta la metodología de purificación, se asumió un proceso similar al utilizado en este trabajo de tesis durante el aislamiento de (S)-1-FE y allí radica la poca diferencia observada en la puntuación obtenida (valores de 46,5-50 puntos, Tabla 10.4 entradas 5-8).

Para el caso de las metodologías bioquímicas, los puntajes obtenidos por la ES estuvieron comprendidos entre 16,5 (Musa *et al.*, 2009³⁵; Tabla 10.4, entrada 16) y 55 (Itoh *et al.*, 2009³⁴; Tabla 10.4, entrada 15). Aquí es necesario remarcar que la metodología reportada en la Tabla 10.4-entrada 16 (Musa *et al.* 2009)³⁵, fue la que resultó ambientalmente menos compatible debido a que el procedimiento involucró la utilización de éter etílico como solvente de extracción, el cual es considerado un solvente no verde. Posteriormente, el producto fue aislado por cromatografía en columna.

Por otra parte, dos metodologías resultaron levemente amigables con el ambiente durante los cálculos de la ES. En este sentido la metodología reportada por Kansal *et al.* (2009)³³ (Tabla 10.4, entrada 13) arrojó un puntaje de 54,5 puntos mientras que la metodología informada por Itoh *et al.* (2009)³⁴ (Tabla 10.4, entrada 15) dio como resultado un puntaje de 55 puntos. En caso del proceso informado por Kansal *et al.*, (2009)³³ (Tabla 10.4 entrada 13) se procedió a evaporar el solvente orgánico (hexano) y luego se llevó a cabo una purificación en columna. Por otro lado, la metodología reportada por Itoh *et al.* (2009)³⁴, los procedimientos para la purificación fueron realizados mediante una extracción con acetato de etilo (solvente verde) y el producto posteriormente purificado por

cromatografía en placa delgada (Tabla 10.4, entrada 15) utilizando una mezcla de hexano/iso-propanol como fase móvil.

El resto de las metodologías tuvieron procedimientos de purificación similares y los valores obtenidos para la ES oscilaron entre 36 y 48,5 puntos.

En el caso de los cálculos realizados utilizando la GS, la situación fue similar a lo observado mediante el empleo de la ES. Las metodologías químicas, en general reportaron valores levemente superiores que los aportados por las metodologías bioquímicas.

Al observar los valores obtenidos por la GS para las metodologías químicas, claramente resaltan los resultados obtenidos para los procedimientos reportados por Brown *et al.* (1998)²² (Tabla 10.4, entrada 2), y por Fujii *et al.* (1996)²⁴ (Tabla 10.4, entrada 4). En ambos casos los procesos de purificación especificados fueron completamente verdes (100 puntos). El resto de las metodologías arrojaron como resultado un puntaje ubicado en el límite (50 puntos). Aquí cabe remarcar que, los valores aportados por la GS, coincidieron en identificar como verdes a las mismas metodologías que obtuvieron alta puntuación en los cálculos utilizando la ES.

Para el caso de las metodologías bioquímicas, los valores obtenidos mediante el cálculo de puntaje a través de la GS, arrojaron valores comprendidos entre 50 y 67 puntos (Tabla 10.4, entradas 9 y 15 vs 10-14 y 16) y la mayoría de los procedimientos produjeron valores en el límite de la amigabilidad ambiental.

10.3.4 Calificación global del Proceso.

Para realizar el proceso de evaluación global de los procedimientos estudiados, empleando tanto la ES como la GS, se realizó el cálculo online utilizando todos los reactivos, solventes, tiempos de reacción, etc., que se describen para realizar todos los pasos de síntesis involucrados en la producción y obtención del producto puro. En la Tabla 10.5 se resumen los valores obtenidos en los cálculos de amigabilidad ambiental mediante ES y GS. Cabe aclarar que se ha realizado el cálculo global independiente de los cálculos previos, y el valor obtenido no es igual a la suma de deméritos de las etapas por separado.

Tabla 10.5: Amigabilidad ambiental (verdor) de diferentes metodologías de síntesis para la reducción estereoselectiva de AF.

Entrada	Metodología de reducción	Preparación del catalizador	Reacción de reducción		Proceso de purificación		Calificación global del proceso		Referencias		
			ES ^A	GS ^B	ES ^A	GS ^B	ES ^A	GS ^B		ES ^A	GS ^B
1	Química	No-catalítico	28	25	34	25	39	50	0	30	Li et al., 2010 ²¹ .
2			30,5	25	13	25	73	100	0	25	Brown et al., 1988 ²² .
3		Catalítico	0	25	51	20	35	50	0	20	Guo et al., 2012 ²³ .
4			43	30	78,5	20	90,5	100	57,5	20	Fujii et al., 1996 ²⁴ .
5			64,5	30	75	35	50	50	14	25	Arakawa et al., 2006 ²⁵ .
6			0	35	64,5	25	49,5	50	0	25	Geldbach et al., 2004 ²⁶ .
7			18	30	45,5	25	48,5	50	0	25	Yu et al., 2012 ²⁷ .
8			0	30	61,5	30	46,5	50	0	25	Meriç et al., 2016 ²⁸ .
9	Bioquímica	Catalítico	52	58	74	55	48,5	67	10	40	Li et al., 2015 ²⁹ .
10			93	92	82	50	41	50	24	50	Hu et al., <i>Biotechnol Lett.</i> 2006 ³⁰ .
11			58	75	77	70	36	50	0	70	Kurbanoglu et al., 2011 ³¹ .
12			95	100	71	80	43	50	23	55	Decarlini et al., 2017 ³² .
13			80	100	67	50	54,5	50	12	50	Kansal et al., 2009 ³³ .
14			---	---	59,5	60	39,5	50	19,5	60	Aimar et al., 2014 ³⁶ .
15			53	42	60	55	55	58	0	55	Itoh et al., 1999 ³⁴ .
16			35	66,7	27,5	50	16,5	50	0	50	Musa et al., 2009 ³⁵ .

^A Cálculo realizado online: <http://ecoscale.cheminfo.org/calculator>
^B Cálculo realizado online: <http://educa.fc.up.pt/avaliacaoverdura/>

Como se puede observar en la Tabla 10.5, dentro de las metodologías químicas analizadas por ES, sólo una produjo la obtención de 1-FE enantioméricamente puro de manera ambientalmente amigable. En este sentido, la metodología reportada por Fujii *et al.* (1996)²⁴ (Tabla 10.5, entrada 4) arrojó una puntuación de 57,5 puntos. Esta situación pone en evidencia la importancia de seleccionar cuidadosamente los reactivos, condiciones y metodologías de purificación empleadas. En este sentido cabe remarcar que si bien el procedimiento implica un catalizador de Ru acomplejado con L3 (Figura 10.2) y el proceso de obtención de dicho catalizador, no resultó ambientalmente amigable, los procedimientos de reducción del sustrato y purificación del producto sí lo fueron. Aquí cabe remarcar que la purificación fue llevada a cabo mediante una destilación del producto, lo que representa una clara ventaja frente a la combinación de métodos de extracción con solvente y posterior purificación por cromatografía. El resto de las metodologías químicas analizadas por ES presentaron valores netamente incompatibles con el medio ambiente. En este sentido, los procesos reportados en las entradas 1-3, 6-8 (Tabla 10.5), arrojaron valores extremos.

Por otro lado, en el caso de las metodologías bioquímicas, ninguna resultó ambientalmente amigable cuando se calcularon los valores globales por ES. Valores extremos fueron hallados en los reportes presentados en las entradas 11, 15 y 16 (Tabla 10.5).

Es interesante observar que las dos metodologías que utilizaron enzimas aisladas y sus cofactores, tanto en un sistema mono como bifásico, obtuvieron una puntuación de 0 puntos en el análisis por ES. Adicionalmente, la metodología reportada por Kurbanuglu *et al.* (2011)³¹ (Tabla 10.5, entrada 11), la cual utiliza un hongo levaduriforme en un sistema monofásico, también produjo un resultado extremo.

Para el caso de los resultados globales aportados por la GS, las metodologías bioquímicas presentaron una amigabilidad ambiental levemente mayor respecto a las metodologías químicas clásicas. En este sentido, GS identificó como no verdes (puntaje de 20-30 puntos, Tabla 10.5, entradas 1-8) a todas las metodologías químicas mientras que para el caso de los procedimientos biocatalíticos, solo una resultó ser no ambientalmente amigable (Li *et al.*, 2015²⁹; Tabla 10.5, entrada 9). El resto de las metodologías bioquímicas presentaron valores de verdor comprendidos entre 50 y 70 puntos (Tabla 10.5, entradas 10, 13 y 15 vs 11).

10.3.5 Métodos Químicos vs Métodos Bioquímicos.

Una de las mayores desventajas que presentan los métodos químicos clásicos, es sin lugar a dudas, la utilización de materias primas no renovables y condiciones de reacción, a veces extremas. En este sentido, la utilización de metales como catalizadores que presentan una baja abundancia relativa y, por ende, un alto costo ambiental de extracción, es una penalización importante al momento de evaluar su amigabilidad ambiental. Más aún, las condiciones de reacción en las que deben ser utilizados para llevar a cabo las transformaciones requeridas, en algunos casos, involucran sistemas complejos y que poseen peligros intrínsecos de operación. Este puede ser el caso de las reacciones llevadas a cabo utilizando H_2 .

Por otra parte, los metales *per se*, en general no poseen la capacidad de proporcionar ambientes quirales para realizar la transferencia estereoselectiva del ión hidruro al sustrato. Esta propiedad es impartida por el ligando que acompleja el metal. El conjunto ligando quiral-metal conforma espacialmente el centro activo responsable de realizar la transformación de una manera estereoselectiva. En este sentido, es claro que no se puede dejar de incluir en el cálculo de amigabilidad ambiental, el impacto que tendrán todos los procedimientos de fabricación del ligando, que es, en última instancia, el que proporciona el ambiente espacial para que el hidruro metálico realice la reducción estereoselectiva correspondiente. Por este motivo, más allá de lo interesante y novedoso que sea el ligando utilizado, si éste es producido en un gran número de pasos de síntesis, el costo de penalización ambiental también será elevado (Tabla 10.3, entrada 5 vs entradas 3 y 6 columna ES, preparación del catalizador). Esta situación claramente se ha visto manifestada en los resultados observados en la Tabla 10.3 a través de las puntuaciones obtenidas al medir la ES y la GS.

Por otra parte, si bien, los procedimientos bioquímicos utilizan en general materias primas renovables, baratas y de manipulación relativamente sencilla, las reacciones deben ser, en general, llevadas a cabo utilizando agua como solvente o en sistemas bifásicos conformados por agua y un solvente orgánico inmiscible.

Si bien el agua es considerada el solvente ideal desde el punto de vista de amigabilidad ambiental, la mayoría de los sustratos orgánicos utilizados poseen baja o nula solubilidad en dicho solvente y esta limitación tiene un gran impacto no sólo en la productividad del sistema, sino también en la dificultad intrínseca de los procedimientos que se deben llevar a cabo para realizar la purificación¹⁵. La utilización de grandes volúmenes de agua para bajas productividades y complejos

procedimientos de purificación, claramente penalizan a estos métodos de producción.

Adicionalmente, la utilización de los materiales y de los procesos empleados durante los procedimientos de purificación del producto final, deben ser cuidadosamente evaluados y seleccionados para, de esta manera, evitar deméritos al momento de medir el impacto ambiental de los procedimientos. Como ejemplo cabe mencionar que los solventes considerados no verdes deben ser excluidos en su utilización: el éter etílico y hexano pueden y deben, en general ser reemplazados por el acetato de etilo u otros solventes considerados verdes. Por otra parte, los procedimientos de purificación que involucran extracciones y la realización de columnas cromatográficas deben ser reemplazadas por otros que posean un menor impacto ambiental. Un ejemplo de esto, fue observado al analizar las metodologías que utilizaron destilaciones como el procedimiento de purificación del producto final.

10.3.6 ES vs GS.

Tanto ES como GS han resultado ser herramientas, no sólo de fácil manejo cuando se cuenta con toda la información necesaria para aplicarlas al análisis de amigabilidad ambiental, sino también útiles en la información del verdor que pueden proporcionar. No obstante, se pueden establecer algunas diferencias y similitudes entre ambos sistemas de evaluación. Por un lado, GS es una herramienta más cualitativa que ES. En efecto, debido a su naturaleza intrínseca presenta una incapacidad de discriminación fina entre metodologías y esto fue observado al comparar los resultados alcanzados con la ES. Esta situación es debida a que la GS se basa directamente en evaluar la aplicación de los 12 principios de la química verde, a modo de cumple o no cumple, con valores fijos para cada situación de respuesta. Mientras, la ES se basa en los 12 principios de química verde, pero considera además aspectos cuantitativos particulares respecto a cada uno de ellos, como es el caso de cantidades máxicas, rendimientos y costos económicos. Como se mencionó en la introducción del presente capítulo, ES evalúa el proceso químico en seis aspectos, considerando los principios de química verde como algo transversal y estableciendo una escala de deméritos más amplia, lo que permite mayor discriminación del impacto ambiental comparado con la GS.

Adicionalmente, la posibilidad de utilizar las aplicaciones correspondientes disponibles de manera gratuita en la web, hacen que estas herramientas estén al alcance de cualquier usuario que desee evaluar sus procedimientos desde el punto de vista del impacto ambiental.



Figura 10.3: Mapa conceptual de relación entre las métricas verdes y los 12 principios de química verde⁴¹.

Agrupando los doce principios, como se observa en la Figura 10.3, se proporciona un marco en el cual es posible explorar qué métricas verdes están disponibles y qué tan efectivas son para impulsar el cambio de comportamiento que se desea. El mapa sugiere que las medidas de uso de los recursos, el uso de energía, la eficiencia de la química y los procesos, y los impactos del ciclo de vida están relacionados. Luego, la toxicidad inherente y el potencial de degradación también lo están. Por supuesto, existen otras relaciones entre los 12 principios, pero el mapa ofrece una visión global de los importantes.

Está claro que no hay una sola métrica unificada disponible para medir el 'verdor' de un proceso químico. Las herramientas que uno elige utilizar deben adaptarse a su contexto y evaluarse continuamente en términos de su utilidad, aplicabilidad y adecuación. También deben probarse y validarse regularmente

para asegurar que estén logrando los objetivos establecidos por el grupo de trabajo, además de ser entendidas y aceptadas fácilmente por las partes interesadas.

Otro principio general para evaluar las métricas verdes es que deben promover el análisis estratégico y la mejora continua. Si los resultados obtenidos de las métricas se recopilan, pero no se evalúan regularmente, y las decisiones basadas en los resultados de las métricas no se toman, no tiene sentido recopilarlas. Esto puede parecer un punto obvio, pero las métricas no siempre son cuestionadas, evaluadas y evolucionadas para ayudar a tomar decisiones estratégicas o hacerlas más útiles para un grupo de investigación, industria o ente de control gubernamental. El desarrollo de métricas verdes para procesos químicos requiere un punto de vista holístico del sistema en una amplia gama de disciplinas. Las métricas generalmente también dependen del contexto; un tipo o un conjunto de métricas no satisfacen todas las situaciones. Por otro lado, las diferentes organizaciones o empresas tendrán que emprender un arduo trabajo para identificar, evaluar e implementar métricas que sean más aplicables a sus necesidades.

La buena noticia es que hay amplia disponibilidad de métricas que ya se han identificado y muchas de ellas han de satisfacer las necesidades de la mayoría de las organizaciones o empresas.

Finalmente, es poco probable que solo un profesional posea el conocimiento suficiente en todas las áreas de interés para identificar las métricas clave, por lo que debería ser una práctica común que las métricas verdes se desarrollen aprovechando los recursos de los equipos multidisciplinarios. Además, si realmente se ha estado transitando en la dirección correcta, es decir, hacia el diseño de procesos de entorno más sustentables, existe la necesidad de resistir la tentación de abordar las métricas de una manera compartimentalizada, ya que muchas de estas métricas están interrelacionadas. En este aspecto, podemos considerar que, para el análisis llevado a cabo en este capítulo, la aplicación de ES ha sido una herramienta más holística y menos compartimentalizada que la GS.

10.4 Conclusiones

Es claro que el camino que resta por recorrer para encontrar metodologías de producción de compuestos químicos que posean un bajo o nulo impacto ambiental, es largo y se necesita aún diseñar y perfeccionar las herramientas de evaluación que permitan claramente establecer la amigabilidad ambiental de cada proceso. Solo basta pensar que a la naturaleza le llevó millones de años de evolución encontrar la manera de realizar sus transformaciones químicas de manera compatible con el medioambiente, como para tomar conciencia del esfuerzo que debemos realizar.

Particularmente respecto a la metodología desarrollada en esta tesis, podemos afirmar que promete ser **una alternativa ambientalmente más amigable que otros métodos utilizados en la actualidad para llevar a cabo un proceso reductivo de manera eficiente y estereoselectiva.**

En este sentido, también es claro que tanto las metodologías químicas como las bioquímicas tienen sus limitaciones y contextos en las que pueden ser aplicadas, pero **es indiscutible que es necesario desarrollar procedimientos que utilicen exclusivamente insumos renovables.** Por este motivo, la discusión sobre qué metodología produce menor impacto ambiental continuará abierta hasta encontrar sistemas que utilicen materias primas renovables y que permitan llevar a cabo la obtención y purificación del producto de una manera sencilla, segura y compatible con los ecosistemas.

10.5 Bibliografía

- [1] Sheldon, R. A. (2017). 'The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability'. *Green Chem.* 19, 18–43.
- [2] Clark, J. H.; Farmer, T. J.; Macquarrie, D. J.; Sherwood, J. (2013). 'Using metrics and sustainability considerations to evaluate the use of bio-based and non-renewable Brønsted acidic ionic liquids to catalyse Fischer esterification reactions'. *Sustain. Chem. Process.* 1, 1–13.
- [3] Tucker, J. L. (2006). 'Green chemistry, a pharmaceutical perspective'. *Org. Process Res. Dev.* 10, 315–319.
- [4] Summerton, L.; Hunt, A. J.; Clark, J. H. (2013). 'Green Chemistry for postgraduates'. *Educ. Quim.* 24, 150–155.
- [5] Anastas, P.; Eghbali, N. (2010). 'Green Chemistry: Principles and Practice'. *Chem. Soc. Rev.* 39, 301–312.
- [6] Tickner, J. A.; Becker, M. (2016). 'Mainstreaming green chemistry: The need for metrics'. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 1, 1–4.
- [7] Ribeiro, M. G. T. C.; Machado, A. A. S. C. (2013). 'Greenness of chemical reactions – limitations of mass metrics'. *Green Chem. Lett. Rev.* 6, 1–18.
- [8] Trost, B. M. (1991). 'Atom Economy - A search for synthetic efficiency'. *Science.* 254, 1471–1477.
- [9] Sheldon, R. A. (1994). 'Consider the environmental quotient'. *Chemtech* 38–47.
- [10] Sheldon, R. A. (2008). 'E factors, green chemistry and catalysis: An odyssey'. *Chem. Commun.* 3352–3365.
- [11] Anastas, P. T.; Lankey, R. L. (2000). 'Life cycle assessment and green chemistry: the yin and yang of industrial ecology'. *Green Chem.* 2, 289–295.
- [12] Herrchen, M.; Klein, W. (2000). 'Use of the life-cycle assessment (LCA) toolbox for an environmental evaluation of production processes'. *Pure Appl. Chem.* 72, 1247–1252.
- [13] Andraos, J.; Sayed, M. (2007). 'On the use of "Green" Metrics in the undergraduate organic chemistry lecture and lab to assess the mass efficiency of organic reactions'. *J. Chem. Educ.* 84, 1004–1010.
- [14] Jimenez-Gonzalez, C.; Ponder, C. S.; Broxterman, Q. B.; Manley, J. B. (2011). 'Using the right green yardstick: Why process mass intensity is used in the pharmaceutical industry to drive more sustainable processes'. *Org. Process Res. Dev.* 15, 912–917.
- [15] Ni, Y.; Holtmann, D.; Hollmann, F. (2014). 'How green is biocatalysis? to

- calculate is to know'. *ChemCatChem* 6, 930–943.
- [16] Sheldon, R. A. (2014). 'Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art'. *Green Chem.* 16, 950–963.
- [17] Van Aken, K.; Streckowski, L.; Patiny, L. (2006). 'EcoScale, a semi-quantitative tool to select an organic preparation based on economical and ecological parameters'. *Beilstein J. Org. Chem.* 2, 1–7.
- [18] Ribeiro, M. G. T. C.; Costa, D. a.; Machado, A. a. S. C. (2010). "'Green Star": a holistic Green Chemistry metric for evaluation of teaching laboratory experiments'. *Green Chem. Lett. Rev.* 3, 149–159.
- [19] Smith, M. B.; March, J. (2006). *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure.* (Wiley).
- [20] Huisman, G. W.; Liang, J.; Kriebber, A. (2010). 'Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases'. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14, 122–129.
- [21] Barros-Filho, B. A.; Nunes, F. M.; de Oliveira, M. da C. F.; Lemos, T. L. G.; de Mattos, M. C.; de Gonzalo, G.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. (2010). 'Bioreduction of prochiral ketones by growing cells of *Lasiodiplodia theobromae*: Discovery of a versatile biocatalyst for asymmetric synthesis'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 65, 37–40.
- [22] Yadav, J. S.; Nanda, S.; Thirupathi Reddy, P.; Bhaskar Rao, A. (2002). 'Efficient enantioselective reduction of ketones with *Daucus carota* root'. *J. Org. Chem.* 67, 3900–3903.
- [23] Li, D. R.; He, A.; Falck, J. R. (2010). 'Enantioselective, organocatalytic reduction of ketones using bifunctional thiourea-amine catalysts'. *Org. Lett.* 12, 1756–1759.
- [24] Brown, H. C.; Chandrasekharan, J.; Ramachandran, P. V. (1988). 'Chiral synthesis via organoboranes. 14. Selective reductions. 41. Diisopinocampheylchloroborane, an exceptionally efficient chiral reducing agent'. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 1539–1546.
- [25] Guo, H.; Liu, D.; Butt, N. A.; Liu, Y.; Zhang, W. (2012). 'Efficient Ru(II)-catalyzed asymmetric hydrogenation of simple ketones with C₂-symmetric planar chiral metallocenyl phosphinooxazoline ligands'. *Tetrahedron* 68, 3295–3299.
- [26] Fujii, A.; Hashiguchi, S.; Uematsu, N.; Ikariya, T.; Noyori, R. (1996). 'Ruthenium(II)-catalyzed asymmetric transfer hydrogenation of ketones using a formic acid-triethylamine mixture'. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 2521–2522.

- [27] Arakawa, Y.; Haraguchi, N.; Itsuno, S. (2006). 'Design of novel polymer-supported chiral catalyst for asymmetric transfer hydrogenation in water'. *Tetrahedron Lett.* 47, 3239–3243.
- [28] Geldbach, T. J.; Dyson, P. J. (2004). 'A versatile ruthenium precursor for biphasic catalysis and its application in ionic liquid biphasic transfer hydrogenation: conventional vs task-specific catalysts'. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 8114–8115.
- [29] Yu, S.; Shen, W.; Li, Y.; Dong, Z.; Xu, Y.; Li, Q.; Zhang, J.; Gao, J. (2012). 'Iron-Catalyzed highly enantioselective reduction of aromatic ketones with chiral P2N4-Type macrocycles'. *Adv. Synth. Catal.* 354, 818–822.
- [30] Meriç, N.; Aydemir, M. (2016). 'Enantioselective transfer hydrogenation of various ketones with novel efficient iridium(III) ferrocenyl-phosphinite catalysts'. *J. Organomet. Chem.* 819, 120–128.
- [31] Li, A.; Ye, L.; Guo, F.; Yang, X.; Yu, H. (2015). 'Biocatalytic anti-Prelog reduction of prochiral ketones with whole cells of a newly isolated strain *Empedobacter brevis* ZJUY-1401'. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 117, 31–37.
- [32] Hu, J.; Xu, Y. (2006). 'Anti-Prelog reduction of prochiral carbonyl compounds by *Oenococcus oeni* in a biphasic system'. *Biotechnol. Lett.* 28, 1115–1119.
- [33] Kurbanoglu, E. B.; Zilbeyaz, K.; Kurbanoglu, N. I. (2011). 'Cryptococcus laurentii as a new biocatalyst for the asymmetric reduction of substituted acetophenones'. *Tetrahedron Asymmetry* 22, 345–350.
- [34] Decarlini, M. F.; Aimar, M. L.; Vázquez, A. M.; Vero, S.; Rossi, L. I.; Yang, P. (2017). 'Fungi isolated from food samples for an efficient stereoselective production of phenylethanols'. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 12, 275–285.
- [35] Kansal, H.; Banerjee, U. C. (2009). 'Enhancing the biocatalytic potential of carbonyl reductase of *Candida viswanathii* using aqueous-organic solvent system'. *Bioresour. Technol.* 100, 1041–1047.
- [36] Itoh, N.; Mizuguchi, N.; Mabuchi, M. (1999). 'Production of chiral alcohols by enantioselective reduction with NADH-dependent phenylacetaldehyde reductase from *Corynebacterium* strain, ST-10'. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* 6, 41–50.
- [37] Musa, M. M.; Lott, N.; Laivenieks, M.; Watanabe, L.; Vieille, C.; Phillips, R. S. (2009). 'A single point mutation reverses the enantiopreference of thermoanaerobacter ethanolicus secondary alcohol dehydrogenase'. *ChemCatChem* 1, 89–93.

- [38] Aimar, M. L.; Bordón, D. L.; Formica, S. M.; Cantero, J. J.; Vazquez, A. M.; Velasco, M. I.; Rossi, L. I. (2014). 'Fruits of the glossy privet (*Ligustrum lucidum*-Oleaceae) as biocatalysts for producing chiral aromatic alcohols'. *Biocatal. Biotransformation* 32, 348–357.
- [39] Selva, M.; Perosa, A. (2008). 'Green chemistry metrics: a comparative evaluation of dimethyl carbonate, methyl iodide, dimethyl sulfate and methanol as methylating agents'. *Green Chem.* 10, 457–464.
- [40] Noyori, R. (1994). 'Organometallic ways for the multiplication of chirality'. *Tetrahedron* 50, 4259–4292.
- [41] Dunn, P.; Wells, A.; Williams, M. T. (2010). *Green chemistry in the pharmaceutical industry*. (Wiley-VCH).

**PARTE VI:
CONSIDERACIONES
FINALES**

CAPÍTULO 11: Conclusiones Finales y Proyecciones Futuras

En base a los resultados alcanzados durante la búsqueda de nuevos biocatalizadores vegetales aplicados a la producción de moléculas bioactivas, es posible remarcar algunas observaciones finales:

Se ha podido determinar que la mayoría de las especies vegetales utilizadas en los estudios comprendidos en esta tesis (22 sobre un total de 25) poseen sistemas enzimáticos capaces de promover el proceso de reducción de compuestos carbonílicos a sus correspondientes alcoholes, corroborando la hipótesis propuesta inicialmente.

De las 22 especies que presentaron esta actividad biocatalítica, dos tuvieron un desempeño excelente (conversión > 94%). En este sentido se destaca la capacidad reductiva de las raíces de *Eryngium horridum* y de las semillas de *Ligustrum lucidum* para promover la transformación de AFs a sus correspondientes 1-FEs quirales con una eficiencia y estereoselectividad que, en la mayoría de los casos, resultó asombrosa.

Más aún, los estudios realizados para encontrar formas adecuadas de conservación del material vegetal para ser utilizado posteriormente como biocatalizador, ha permitido establecer que los frutos deshidratados de *L. lucidum* pueden ser almacenados durante un período de tiempo considerable sin perder su capacidad reductiva. Resulta claro que esta estabilidad observada durante el almacenamiento, ha permitido independizarse de la estacionalidad de fructificación la planta y debido a esto, es posible tener disponible el biocatalizador para su utilización en el momento que sea necesario, de manera similar a lo que sucede con un reactivo químico clásico. Asimismo, estos resultados han demostrado que los frutos de *L. lucidum* almacenados adecuadamente pueden ser utilizados como una 'bolsa estable de enzimas', las cuales además poseen capacidad para ser reutilizadas en hasta cinco reacciones sucesivas, sin pérdida apreciable de capacidad reductiva.

Por otra parte, los estudios realizados durante los procedimientos llevados a cabo para optimizar el proceso bio reductivo, permitieron no solo acortar los tiempos de reacción (de seis días se disminuyó a tres días), sino que también se logró aumentar la relación de carga de sustrato, aumentando la concentración en el

medio de reacción de 0,67 g/L hasta una carga final de 2,67 g/L. Adicionalmente, también se logró establecer que 25 °C fue la temperatura óptima para llevar a cabo este proceso, lo cual indica que la reacción transcurre de manera eficiente a temperatura ambiente.

Las reacciones llevadas a cabo a una escala productiva de laboratorio (500 mL volumen final) demostraron la viabilidad de la metodología desarrollada para sintetizar importantes intermediarios utilizados en la fabricación de productos bioactivos, la mayoría de los cuales se encuentran hoy disponibles comercialmente como fármacos (Rivastigmina, Miconazol, Econazol, etc).

Adicionalmente, los estudios realizados a escala piloto para determinar la posibilidad de producción industrial del proceso llevado a cabo utilizando AF como sustrato modelo en un biorreactor (4 L de volumen final de reacción) demostraron que es posible proponer un aumento de escala productiva sin pérdida de la capacidad reductiva. En este punto es necesario mencionar que al modificar la escala de trabajo y realizar cambios en el sistema de agitación, se observó la necesidad de llevar a cabo las reacciones bajo burbujeo constante de aire. Esta necesidad de oxígeno sugiere que podría estar involucrado en la regeneración de las coenzimas necesarias para este proceso. No obstante, mayores estudios son necesarios para apoyar esta hipótesis.

Por otro lado, mediante el análisis de la amigabilidad ambiental llevado a cabo utilizando los programas de cálculo EcoScale y Green Star, se logró establecer la eco-compatibilidad del método desarrollado. Aquí es necesario mencionar que, si bien el valor calculado para la metodología de síntesis desarrollada en esta tesis no resultó tan elevado como era de esperar, debemos remarcar que el procedimiento de purificación de los productos sintetizados no ha sido convenientemente optimizado, y allí radicaría los deméritos involucrados en el puntaje obtenido.

Es importante remarcar que en base a los resultados alcanzados se ha establecido una novedosa oportunidad de aplicación no tradicional para algunos vegetales pertenecientes a la flora de la provincia de Córdoba. Más aun, hasta el momento no se han reportado aplicaciones biocatalíticas con vegetales que no posean una finalidad alimenticia. Este hecho es especialmente importante para aquellas especies que no tienen ninguna utilidad práctica reportada y son simplemente consideradas malezas, como así también para especies exóticas

introducidas en esta región con finalidad ornamental y que actualmente su propagación es descontrolada. Debido a esto, también es posible visualizar un beneficio adicional al llevar a cabo la recolección de los frutos de siempreverde: se podría morigerar la propagación de esta planta y promover una protección de los ecosistemas autóctonos.

Finalmente, es importante enfatizar que el procedimiento bio reductivo presentado en este trabajo, utiliza como biocatalizador una materia prima renovable no utilizada para este fin hasta el momento, lo cual claramente representa ventaja comparativa con respecto a los métodos químicos clásicos.

Proyecciones Futuras.

Una de las mayores desventajas de las biotransformaciones llevadas a cabo utilizando como biocatalizador a materiales vegetales sin pre-tratamientos, es la relativamente baja productividad del sistema, comparada con los métodos químicos clásicos. Esta situación es debida fundamentalmente a los inconvenientes presentados durante los procedimientos realizados para aislar el producto desde el medio de reacción, especialmente por la compleja y desconocida composición del crudo final. Debido a esto, sin lugar a dudas es necesario continuar trabajando en la optimización de los procesos de **downstream**, para mejorar la cantidad de producto recuperado y de esta manera, aumentar los porcentajes de rendimientos obtenidos. Adicionalmente, cabe mencionar que esto tendrá un impacto positivo sobre los valores calculados de amigabilidad ambiental del proceso global.

Por otro lado, habiendo comprobado la viabilidad del reciclado de las semillas de *L. lucidum* a escala de laboratorio, es necesario realizar estudios tendientes a determinar la posibilidad de reutilización de las semillas trabajando a escala piloto, ya que es indudable el atractivo de este aspecto, tanto desde el punto de vista de la producción industrial como del posible diseño y planificación de un proceso de producción en continuo.

Adicionalmente, es indudable la necesidad de estudiar y establecer **las características del sistema enzimático responsable de la actividad biocatalítica**. Hasta el momento, se han realizado algunos estudios preliminares sobre este

aspecto, considerando por un lado la posibilidad de la presencia de microorganismos endófitos dentro de las semillas y por otro, la presencia de enzimas propias del metabolismo del vegetal como responsables del proceso bioreductorio.

El hallazgo e identificación del sistema enzimático responsable de la actividad catalítica mejora la posibilidad de optimizar la relación biomasa/producto obtenido. Si atribuimos la actividad a microorganismos endófitos, estos podrían ser aislados y replicados, para luego utilizarlos en procedimientos clásicos de biocatálisis de manera directa. No obstante, esta última posibilidad implicaría la necesidad de trabajar en condiciones estériles.

Por otra parte, si se confirma la presencia de enzimas propias del metabolismo de las semillas de *L. lucidum*, sería posible realizar extractos enzimáticos pre-concentrados, que tendría un impacto directo, no solo sobre el mejoramiento de la capacidad de carga del sustrato en el medio de reacción, sino que también tendrá un efecto benéfico sobre los procedimientos realizados para aislar y purificar el producto final, ya que al trabajar con un pre-concentrado enzimático, es posible que se eliminen algunas de las sustancias que dificultan el downstream. Adicionalmente, ambas posibilidades podrían aumentar la eficiencia del proceso, mejorando la interacción enzima-sustrato, lo cual podría disminuir los tiempos de reacción.

Publicaciones realizadas

- ❖ “Comparative green analysis between different catalytic methodologies used in stereoselective reduction reaction of acetophenone” Daniela L. Bordón, María F. Decarli, Ana M. Vázquez, Gabriela I. Demmel, Laura I. Rossi & Mario L. Aimar. *Catalysis Reviews*. DOI: [10.1080/01614940.2021.1926849](https://doi.org/10.1080/01614940.2021.1926849) (2021)
- ❖ “Optimization of the bioreduction process of carbonyl compounds promoted by seeds of Glossy Privet (*Ligustrum lucidum* - Oleaceae) and its application to the synthesis of key intermediates”. Bordon, Daniela L.; Vázquez, Ana M.; Decarli, María F.; Demmel, Gabriela I.; Rossi, Laura I.; Aimar, Mario Leandro. *Biocatalysis and Biotransformation*. 39, 1 (2021) 1-15.
- ❖ “Reducción estereoselectiva de acetofenona. Análisis desde métricas de la química verde”. Daniela L. Bordón, María F. Decarli, Ana M. Vázquez, Gabriela I. Demmel, Laura I. Rossi, Mario L. Aimar. XXII Simposio Nacional de Química Orgánica. Mendoza, Argentina. (Noviembre, 2019)
- ❖ “Kinetic profiles of the stereoselective reduction of acetophenone and its derivatives promoted by *Galactomyces candidus* GZ1. A mechanistic interpretation”. Decarli, M. Florencia; Bordón, Daniela L.; Vázquez, Ana M.; Demmel, Gabriela; Rossi, Laura I.; Aimar, Mario L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 17 (2019) 7-14.
- ❖ “Weeds as biocatalysis in the stereoselective synthesis of chiral phenylethanols used as key intermediates for pharmaceuticals”. Bordón, Daniela L.; Villalba, Leonardo D.; Aimar, Mario L.; Cantero, Juan J.; Vázquez, Ana M.; Formica, Stella M.; Krapacher, Claudio R.; Rossi, Laura I. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 4 (2015) 493-499.
- ❖ “Fruits of the glossy privet (*Ligustrum lucidum* - Oleaceae) as biocatalysts for producing chiral aromatic alcohols”. Aimar, Mario L.; Bordón, Daniela L.; Formica, Stella M.; Cantero, Juan J.; Vázquez, Ana M.; Velasco, Manuel I.; Rossi, Laura I. *Biocatalysis and Biotransformation*. 32 (2014) 348–357.

- ❖ “Estudios de optimización de la reducción estereoselectiva de la Acetofenona promovida por frutos de *Ligustrum lucidum* W. T. Aiton (Oleaceae)” Daniela L. Bordón, Stella M. Formica, Ana M. Vázquez, Laura I. Rossi, Mario L. Aimar.
II Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones (SiLaBB II)-VII Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones. Montevideo, Uruguay.
(Diciembre, **2016**)

PARTE VII: ANEXOS

ANEXOS A y B

A. Cromatogramas y Espectros de RMN ^1H y ^{13}C de los productos sintetizados

(-)-(*S*)-1-feniletanol

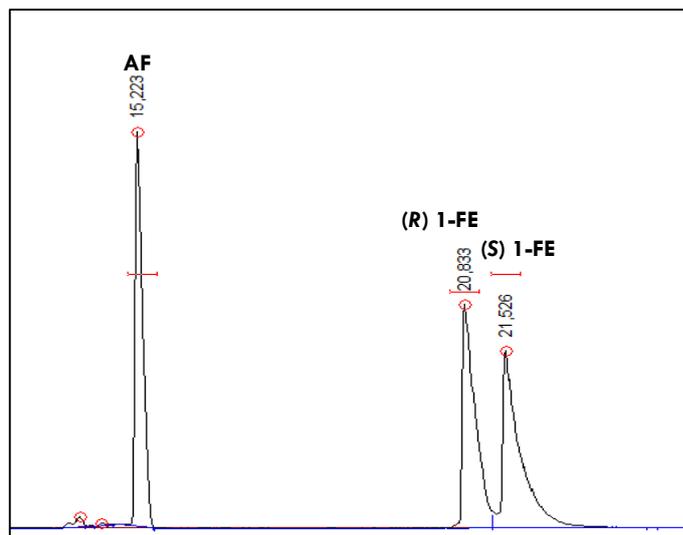


Figura A.1. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de AF con Borohidruro de sodio (CG-FID).

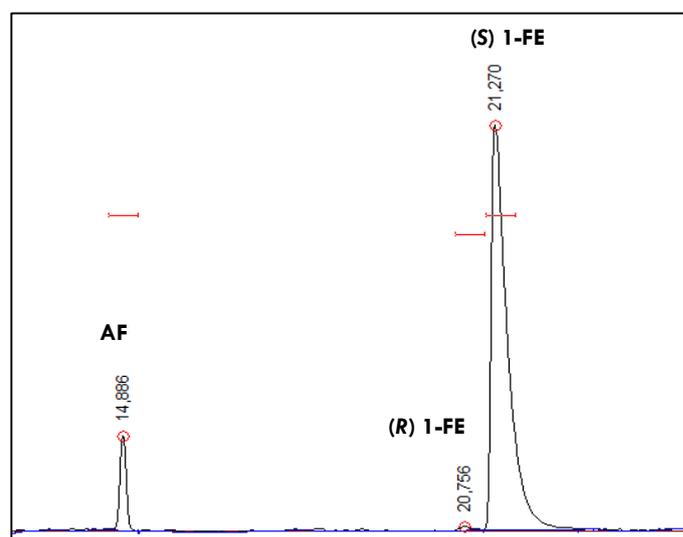


Figura A.2. Cromatograma de AF reducida con frutos de *L. lucidum* (CG-FID).

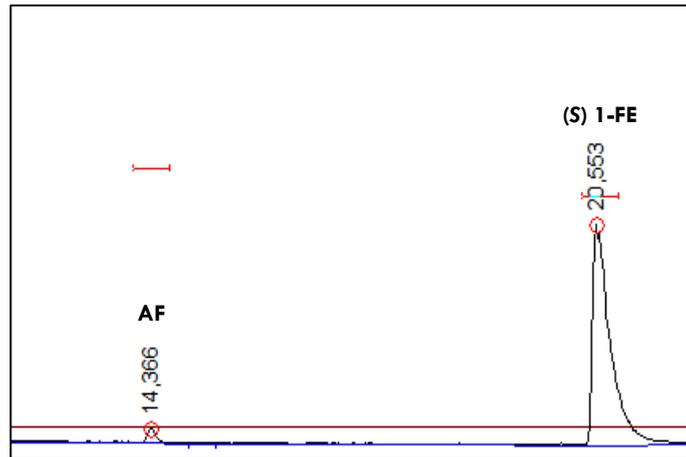


Figura A.3. Cromatograma de AF reducida con raíces de *E. horridum* (CG-FID).

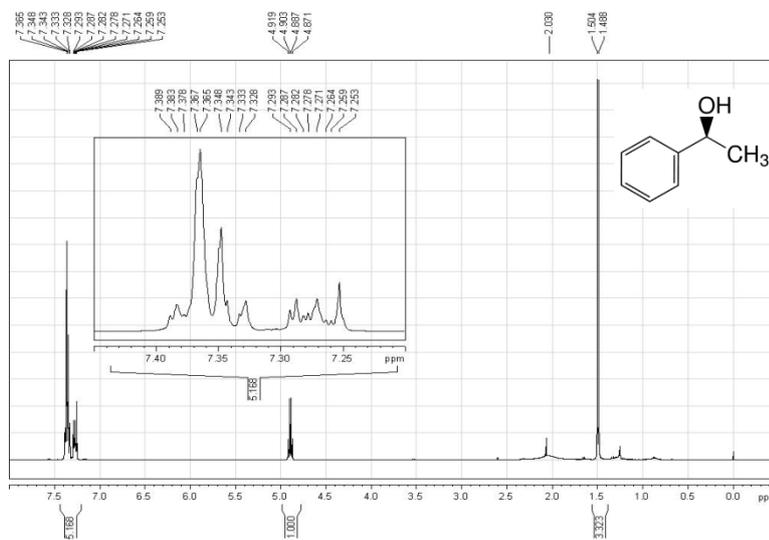


Figura A4. Espectro RMN ^1H de (S)-1-FE.

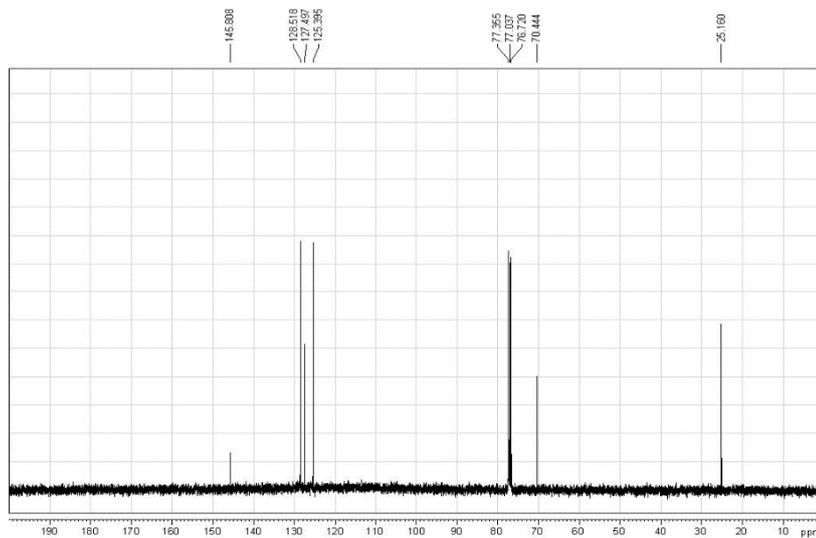


Figura A.5. Espectro RMN ^{13}C de (S)-1-FE.

(-)-(S)-1-(2'-clorofenil)etanol

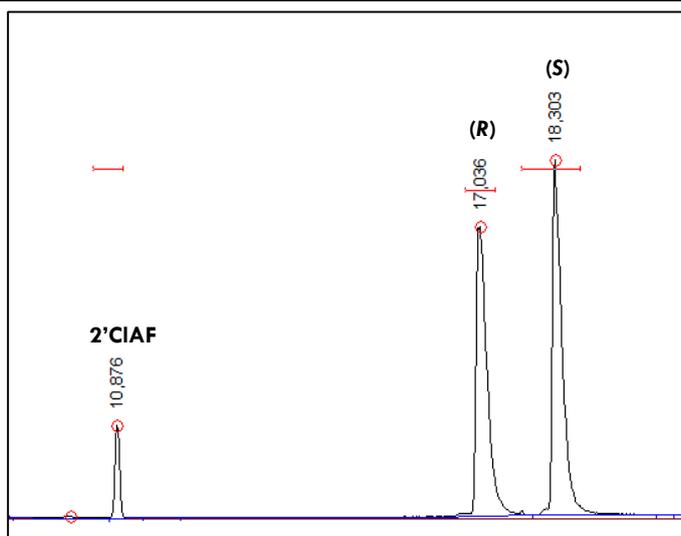


Figura A.6. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de 2' CIAF con Borohidruro de sodio (CG-FID).

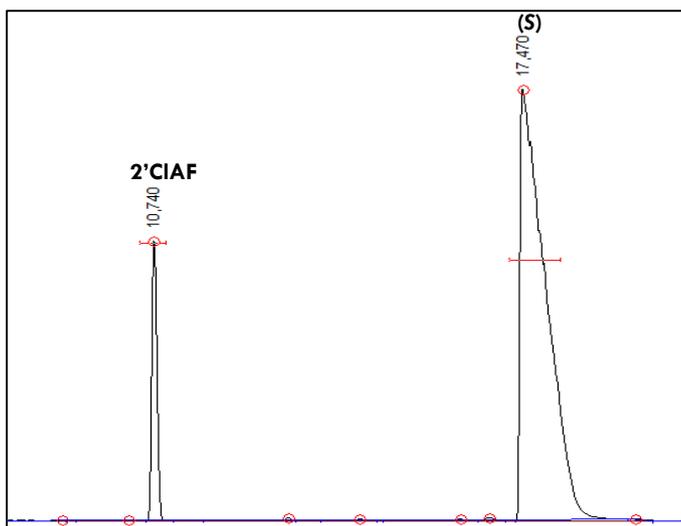


Figura A.7. Cromatograma de 2' CIAF reducida con frutos de *L. lucidum* (CG-FID).

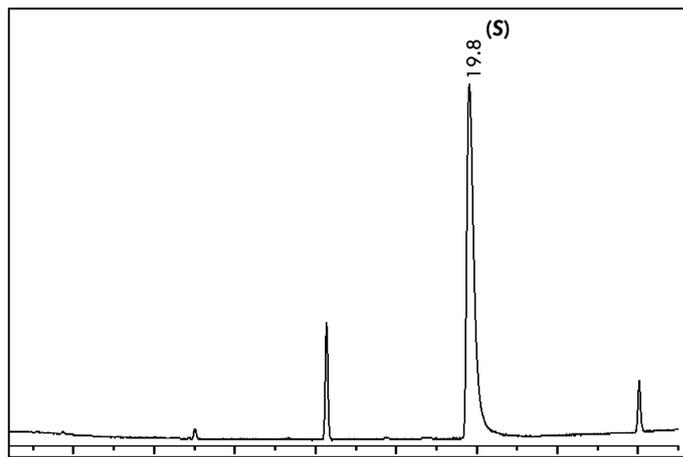


Figura A.8. Cromatograma de AF reducida con raíces de *E. horridum* (CG-FID).

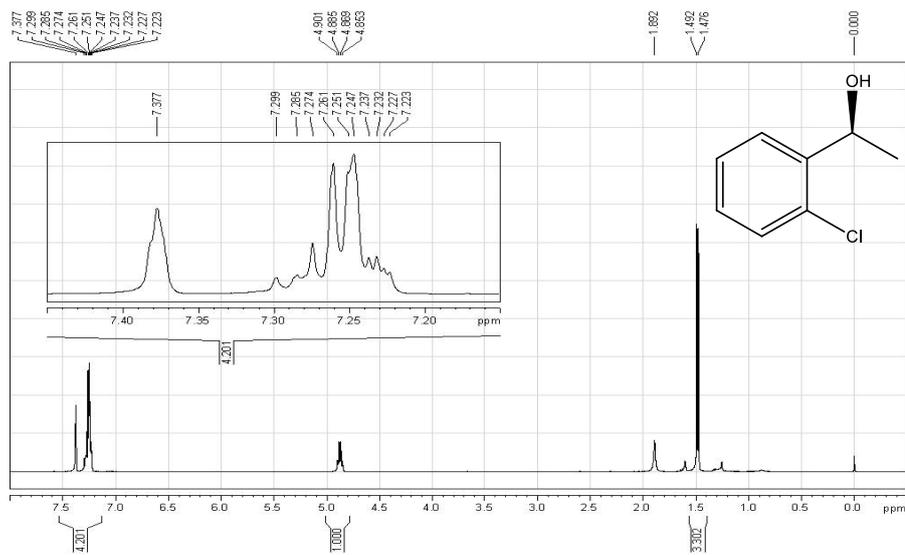


Figura A.9. Espectro RMN ¹H de (S)-1-(2'-Clorofenil)etanol.

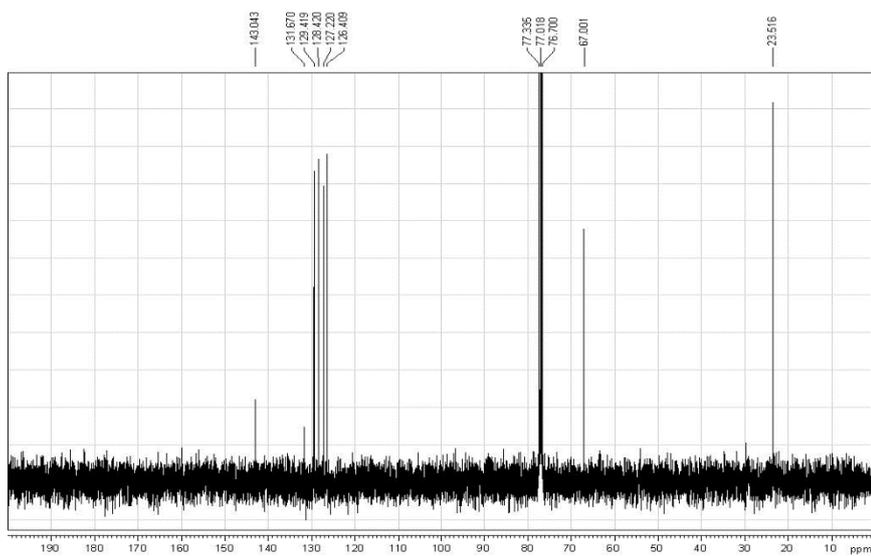


Figura A.10. Espectro RMN ¹³C de (S)-1-(2'-Clorofenil)etanol.

(-)-(*S*)-1-(3'-clorofenil)etanol

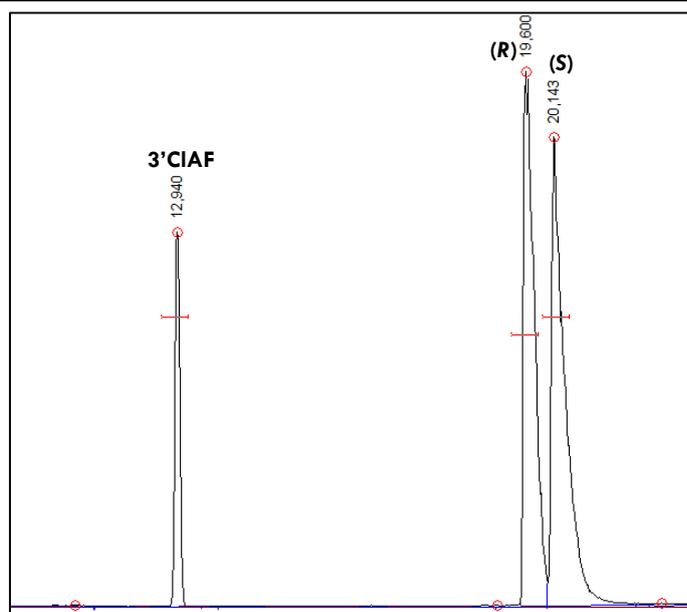


Figura A.11. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de 3'ClAF con Borohidruro de sodio (CG-FID).

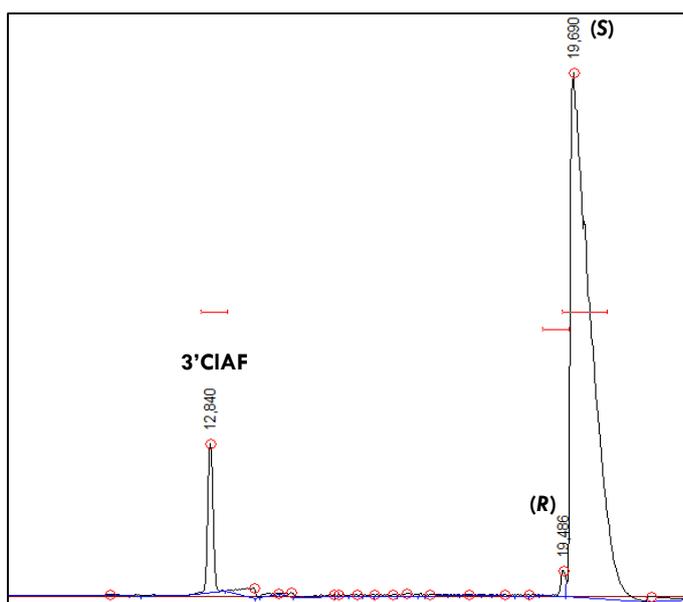


Figura A.12. Cromatograma de 3'ClAF reducida con frutos de *L. lucidum* (CG-FID).

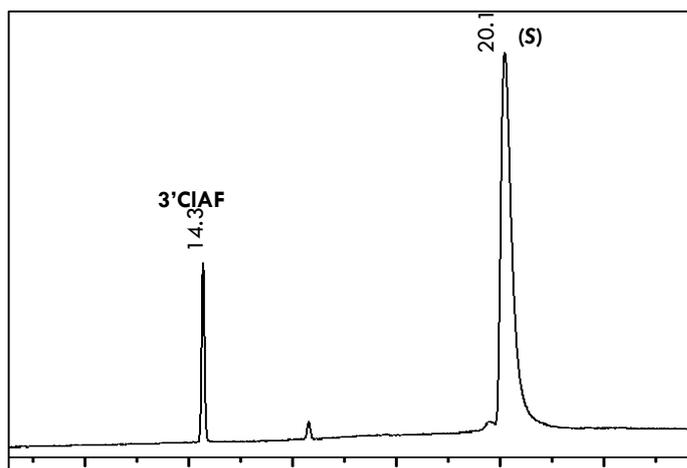


Figura A.13. Cromatograma de 3'ClAF reducida con raíces de *E. horridum* (CG-FID).

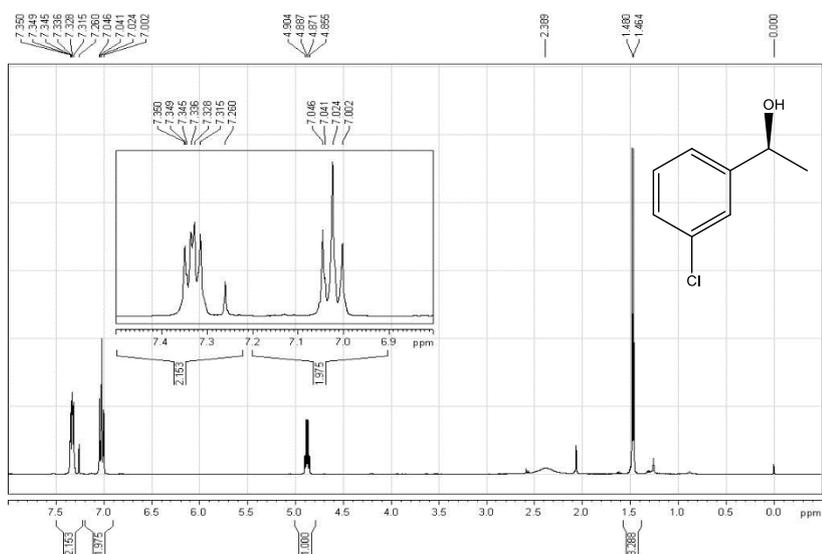


Figura A.14. Espectro RMN ^1H de (S)-1-(3'-Clorofenil)etanol.

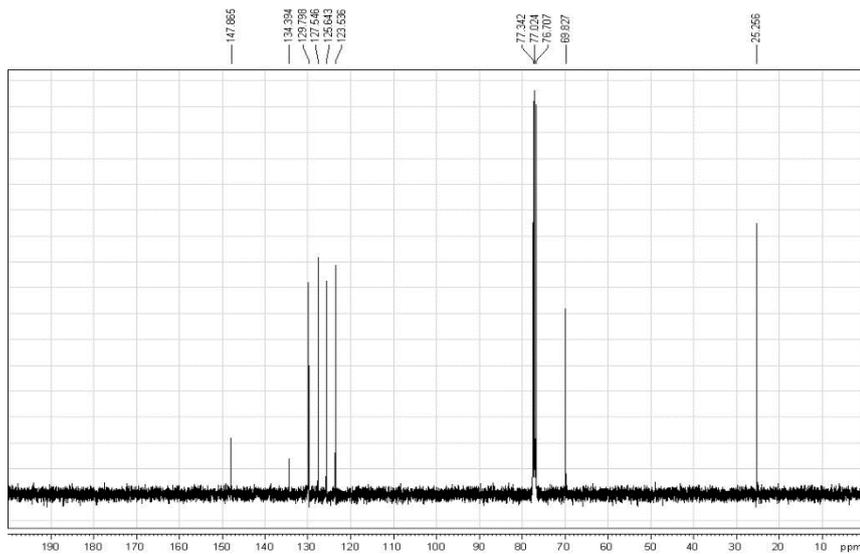


Figura A.15. Espectro RMN ^{13}C de (S)-1-(3'-Clorofenil)etanol.

(-)-(S)-1-(4'-clorofenil)etanol

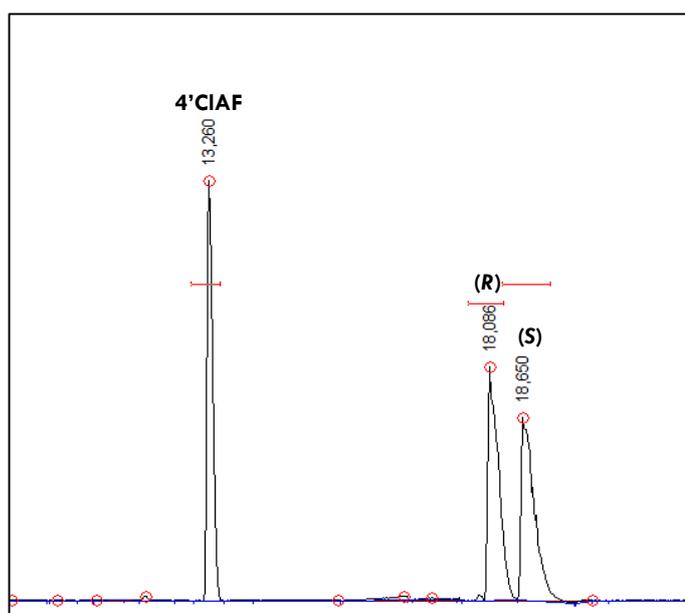


Figura A.16. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de 4'ClAF con Borohidruro de sodio (CG-FID).

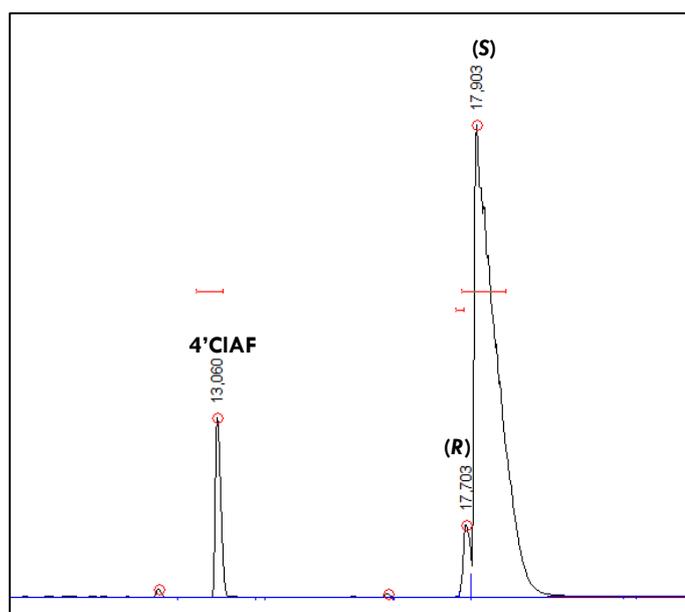


Figura A.17. Cromatograma de 4'ClAF reducida con frutos de *L. lucidum* (CG-FID).

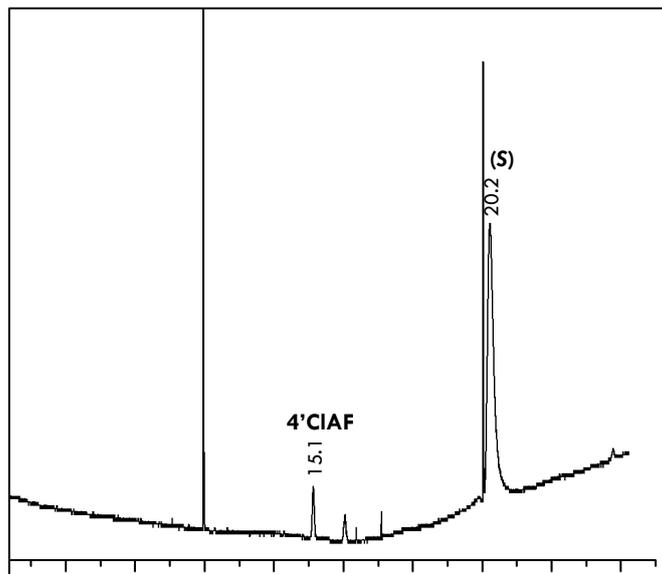


Figura A.18. Cromatograma de 4'ClAF reducida con raíces de *E. horricum* (CG-FID).

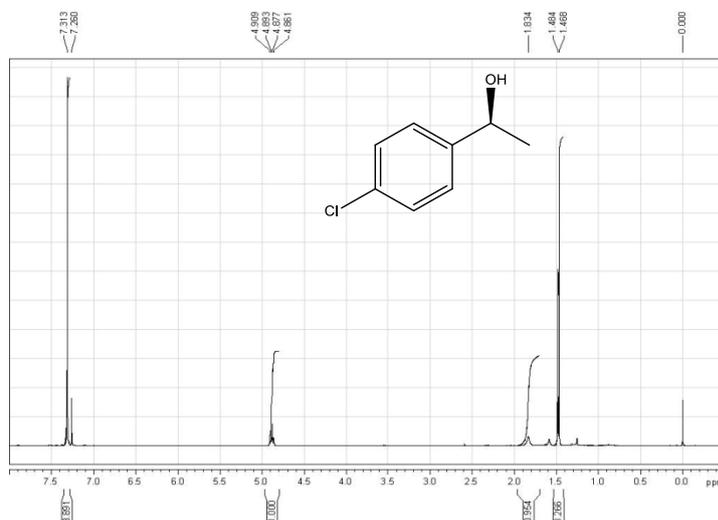


Figura A.20. Espectro RMN ^1H de (S)-1-(4'-Clorofenil)etanol.

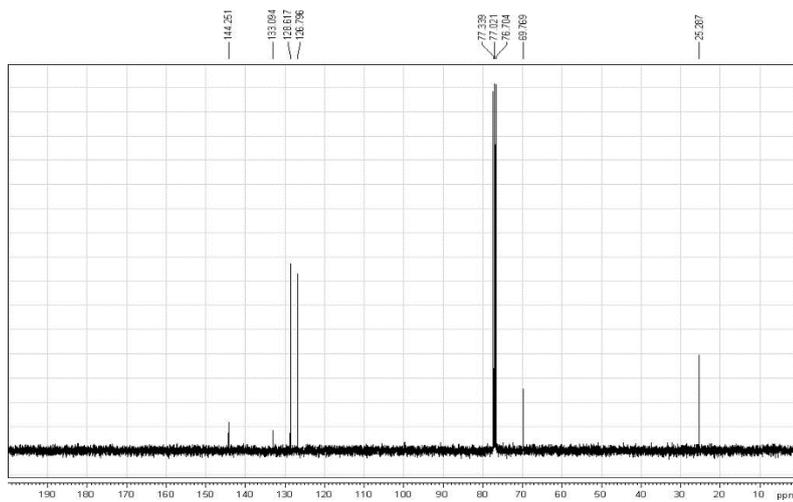


Figura A.21. Espectro RMN ^{13}C de (S)-1-(4'-Clorofenil)etanol.

(-)-(S)-1-(2'-nitrofenil)etanol

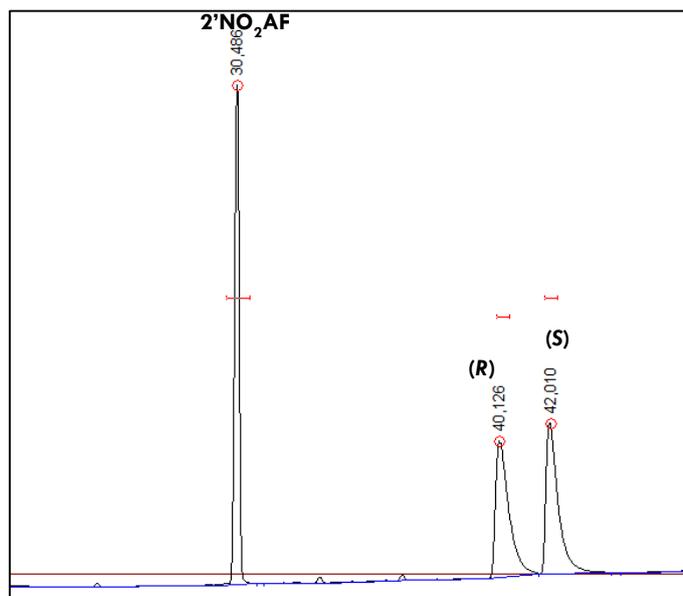


Figura A.22. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de 2'NO₂AF con Borohidruro de sodio (CG-FID).

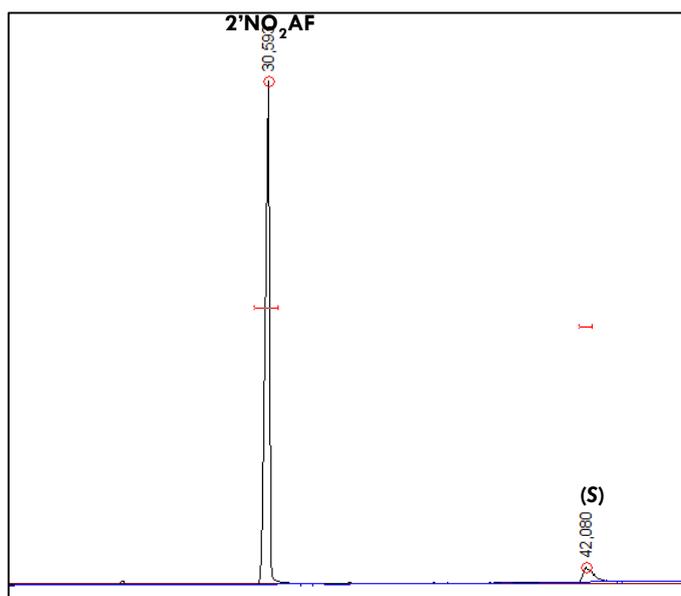


Figura A.23. Cromatograma de 2'NO₂AF reducida con frutos de *L. lucidum* (CG-FID).

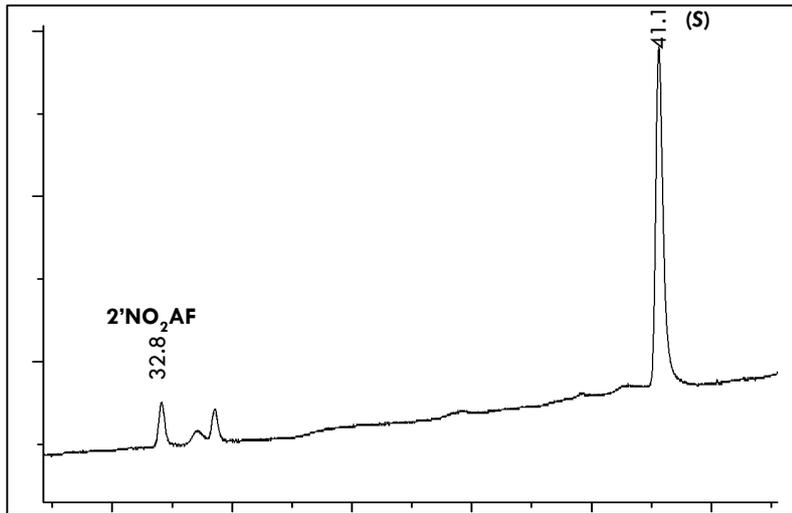


Figura A.24. Cromatograma de 2'NO₂AF reducida con raíces de *E. horridum* (CG-FID).

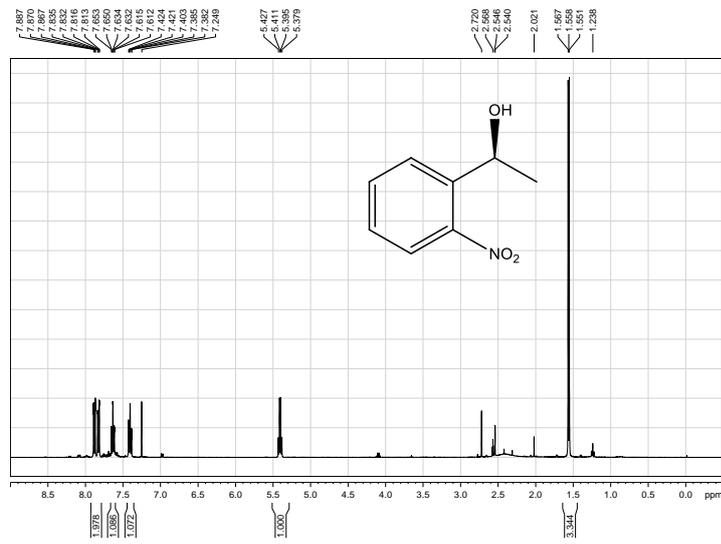


Figura A.25. Espectro RMN ¹H de (S)-1-(2'-Nitrofenil)etanol.

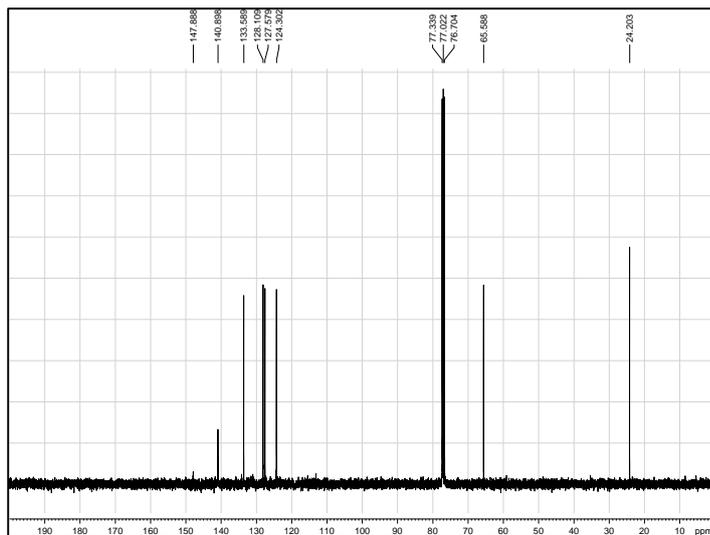


Figura A.26. Espectro RMN ¹³C de (S)-1-(2'-Nitrofenil)etanol.

(-)-(S)-1-(3'-nitrofenil)etanol

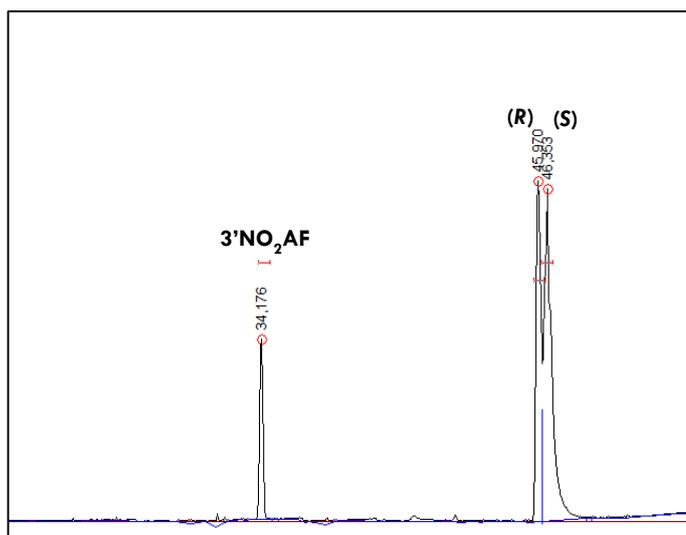


Figura A.27. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de 3'NO₂AF con Borohidruro de sodio (CG-FID).

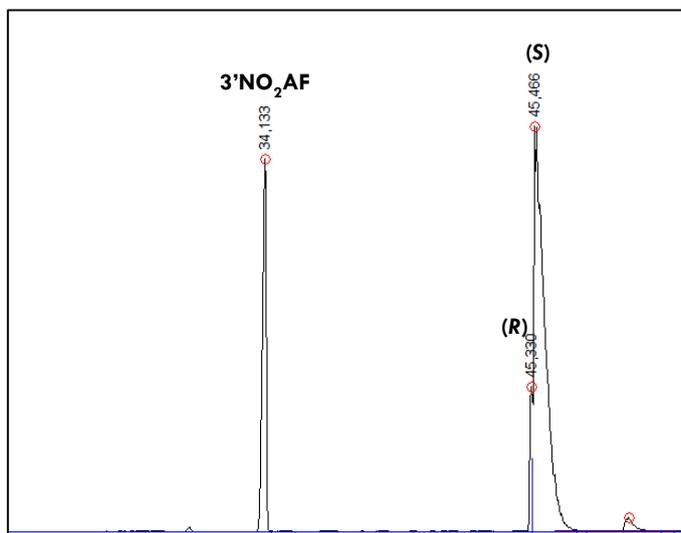


Figura A.28. Cromatograma de 3'NO₂AF reducida con frutos de *L. lucidum* (CG-FID).

(-)-(S)-1-(4'-nitrofenil)etanol

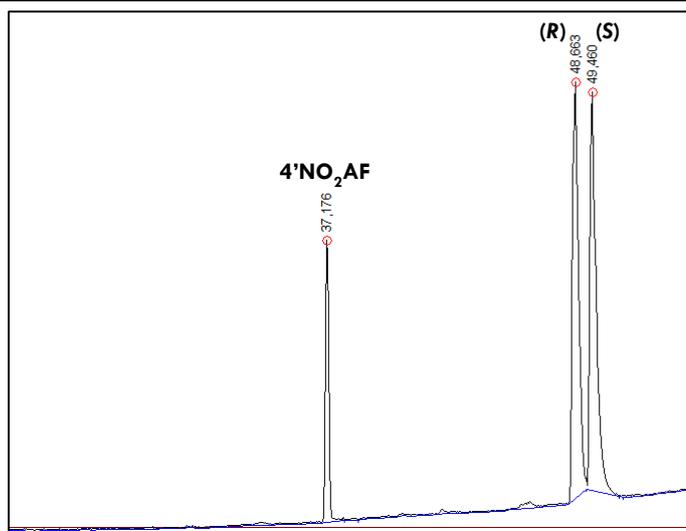


Figura A.32. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de 4'NO₂AF con Borohidruro de sodio (CG-FID).

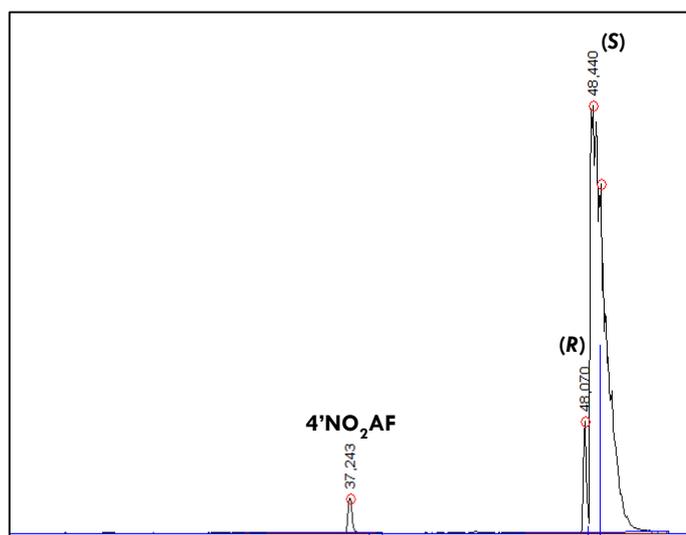


Figura A.33. Cromatograma de 4'NO₂AF reducida con frutos de *L. lucidum* (CG-FID).

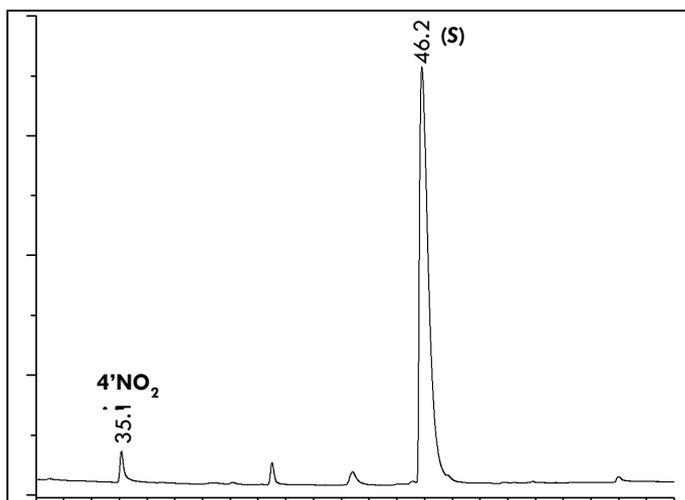


Figura A.34. Cromatograma de 4'NO₂AF reducida con raíces de *E. horridum* (CG-FID).

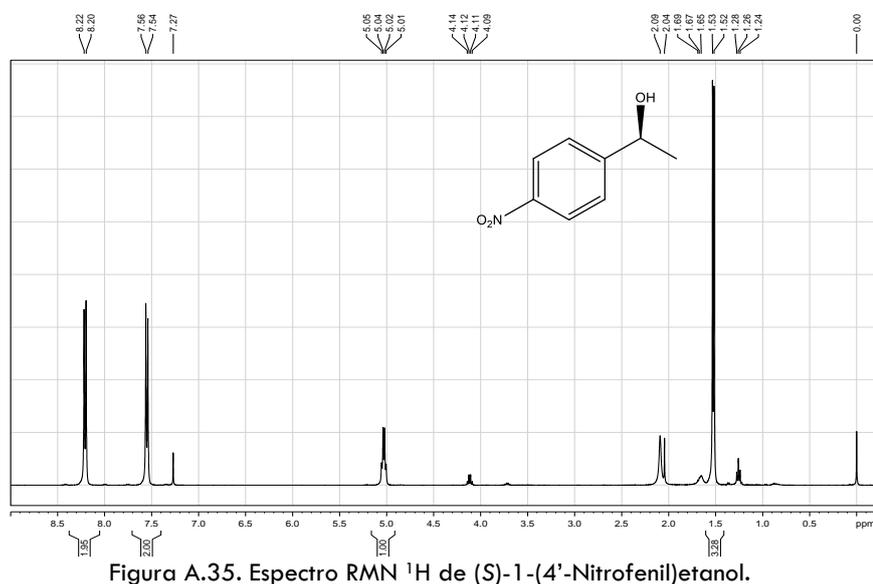


Figura A.35. Espectro RMN ¹H de (S)-1-(4'-Nitrofenil)etanol.

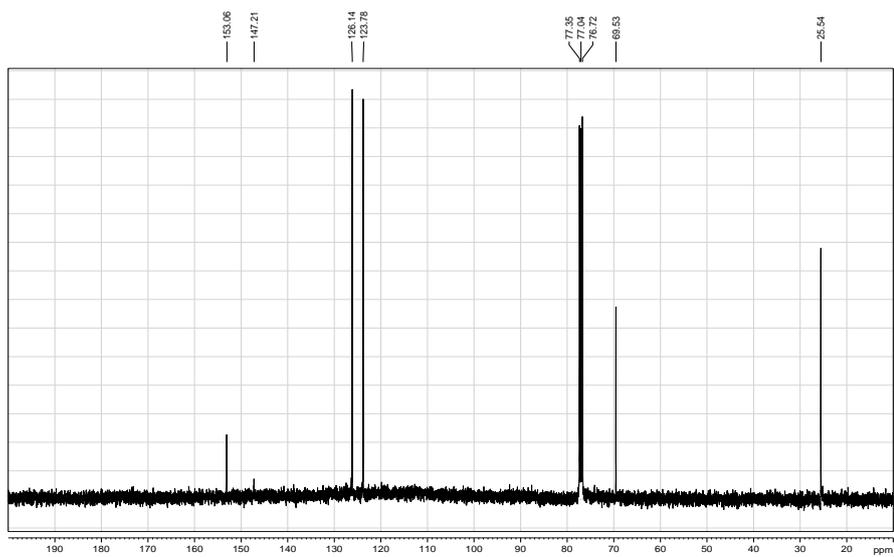


Figura A.36. Espectro RMN ¹³C de (S)-1-(4'-Nitrofenil)etanol.

(-)-(S)-1-(4'-fluorufenil)etanol

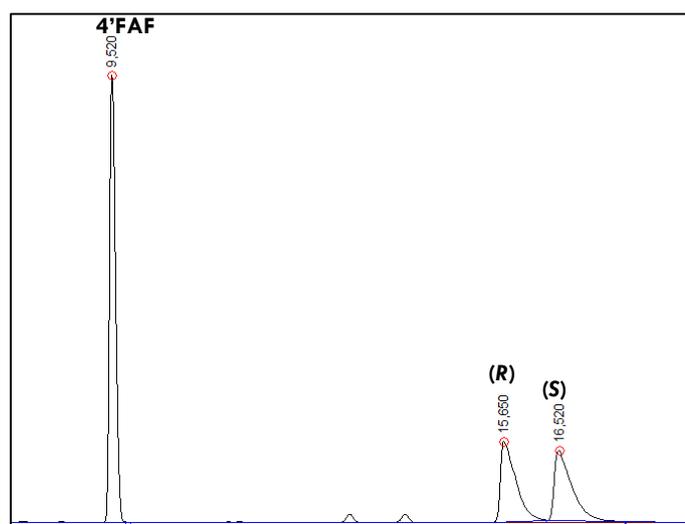


Figura A.37. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de 4'FAF con Borohidruro de sodio (CG-FID).

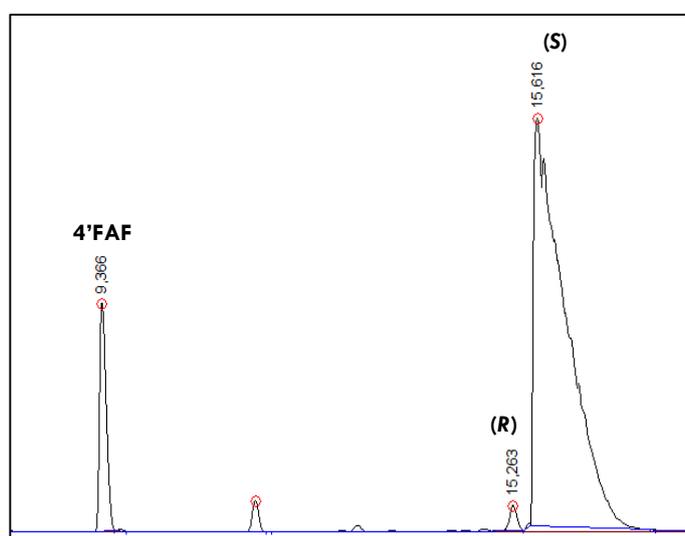


Figura A.38. Cromatograma de 4'FAF reducida con frutos de *L. lucidum* (CG-FID).

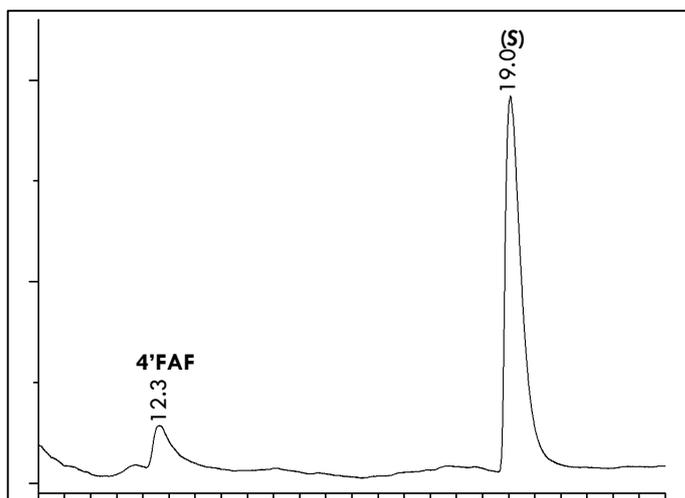


Figura A.39. Cromatograma de 4'FAF reducida con raíces de *E. horridum* (CG-FID).

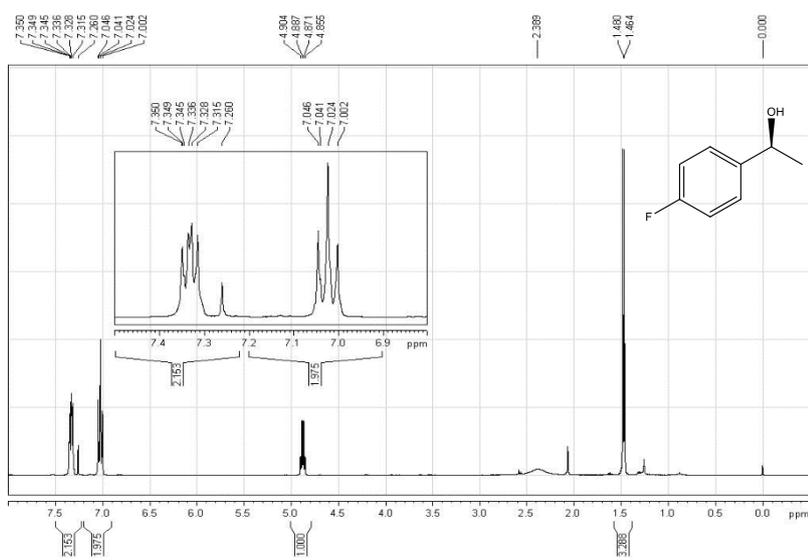


Figura A.40. Espectro RMN ^1H de (S)-1-(4'-fluorofenil)etanol.

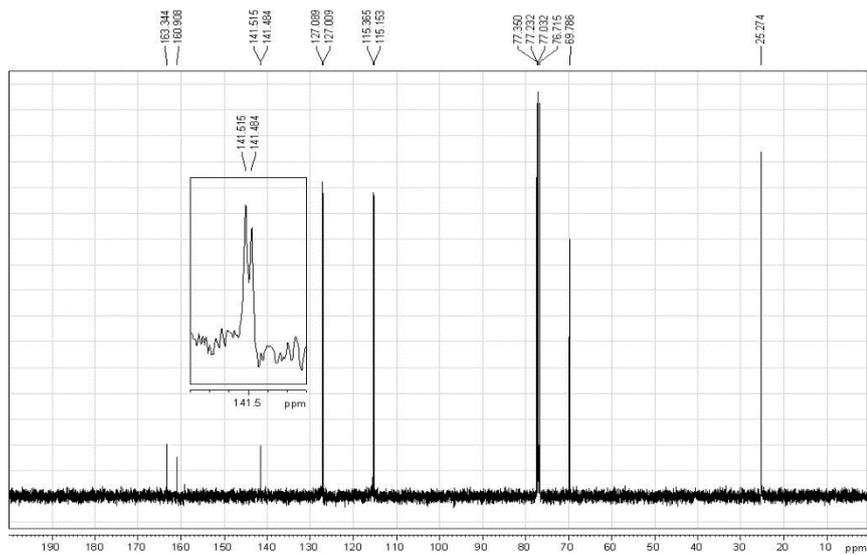


Figura A.41. Espectro RMN ^{13}C de (S)-1-(4'-fluorofenil)etanol.

(-)-(S)-1-(4'-bromofenil)etanol

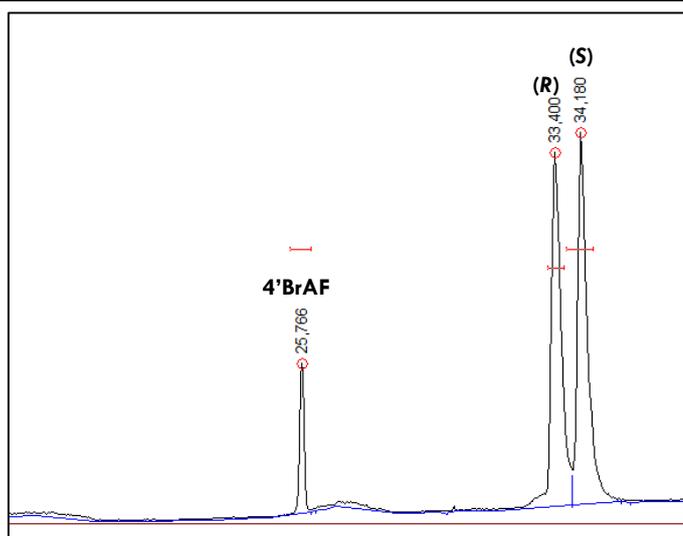


Figura A.42. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de 4'BrAF con Borohidruro de sodio (CG-FID).

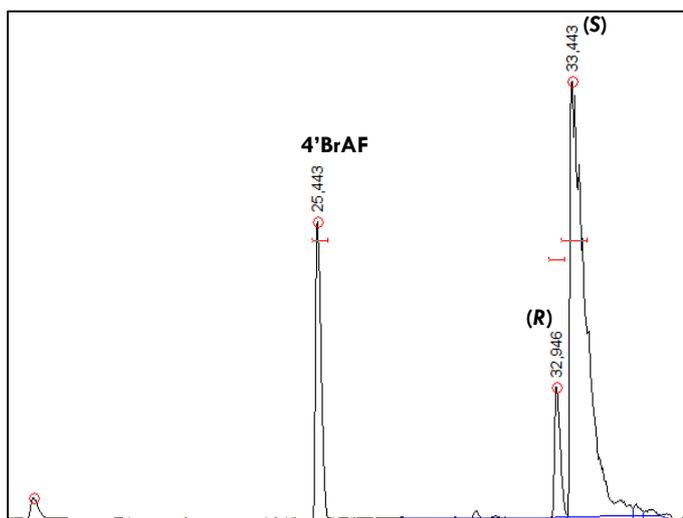


Figura A.43. Cromatograma de 4'BrAF reducida con frutos de *L. lucidum* (CG-FID).

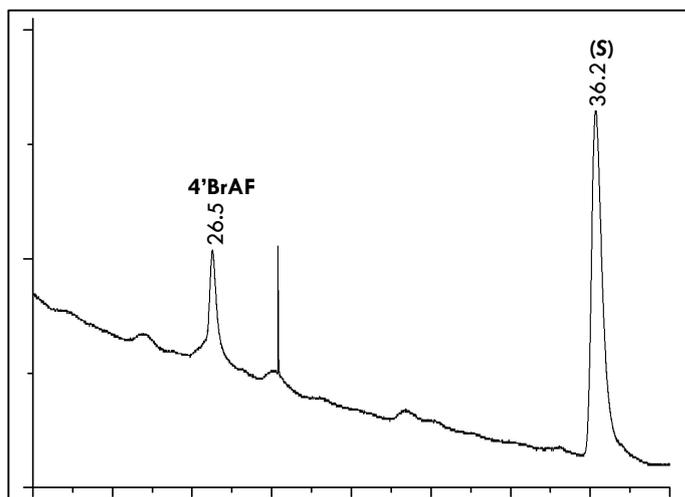


Figura A.44. Cromatograma de 4'BrAF reducida con raíces de *E. horridum* (CG-FID).

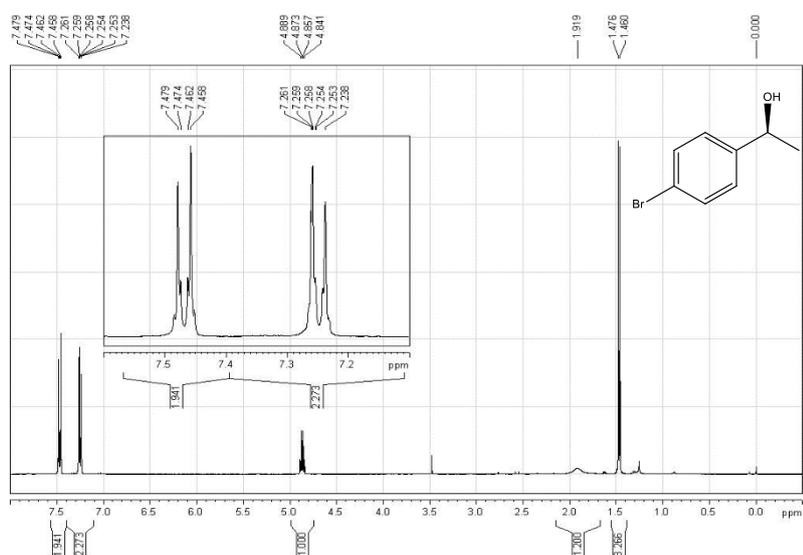


Figura A.45. Espectro RMN ¹H de (S)-1-(4'-bromofenil)etanol.

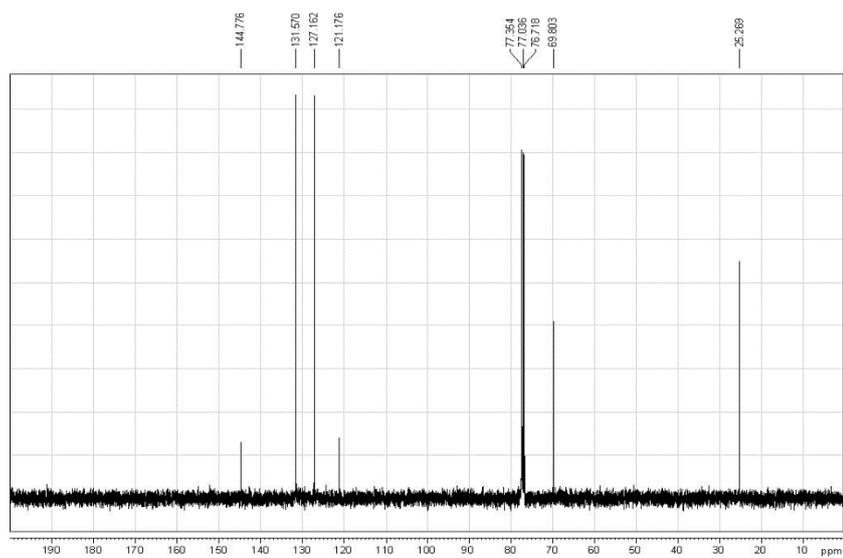


Figura A.46. Espectro RMN ¹³C de (S)-1-(4'-bromofenil)etanol.

(-)-(S)-1-(4'-Trifluorometilfenil)etanol

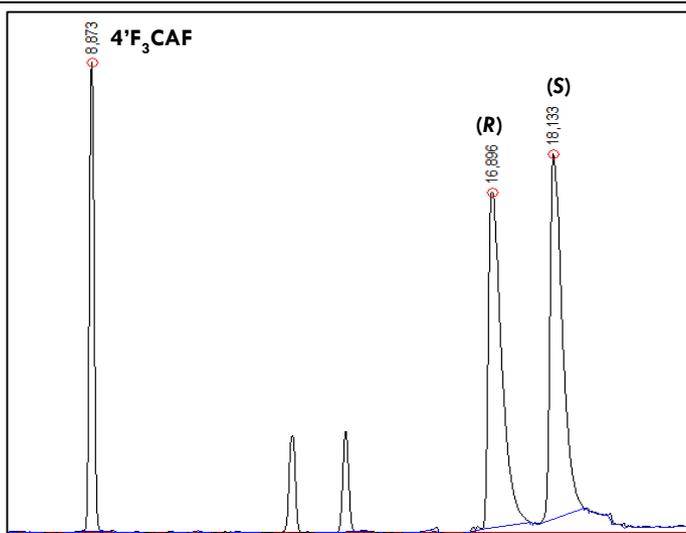


Figura A.47. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de 4'F₃CAF con Borohidruro de sodio (CG-FID).

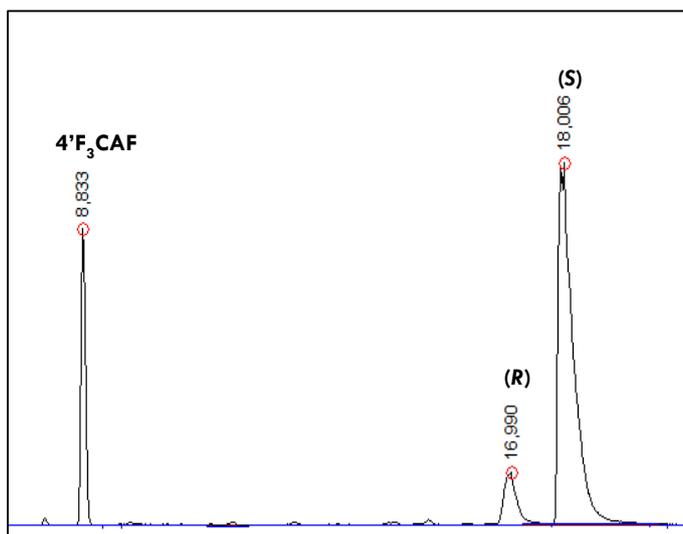


Figura A.48. Cromatograma de 4'F₃CAF reducida con frutos de *L. lucidum* (CG-FID).

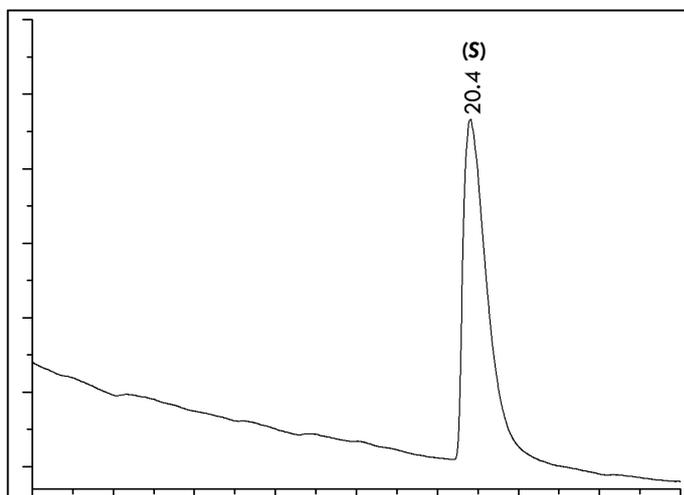


Figura A.49. Cromatograma de 4'³F₃CAF reducida con raíces de *E. horridum* (CG-FID).

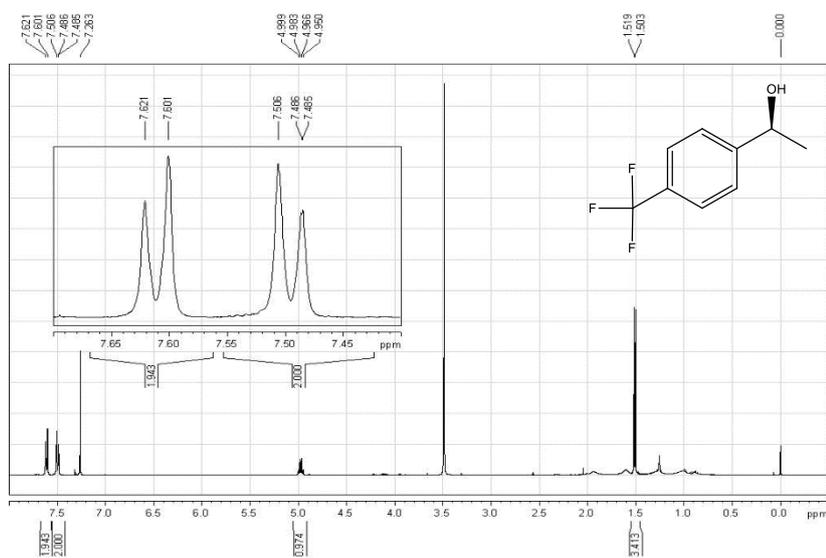


Figura A.50. Espectro RMN ¹H de (S)-1-(4'-trifluorometilfenil)etanol.

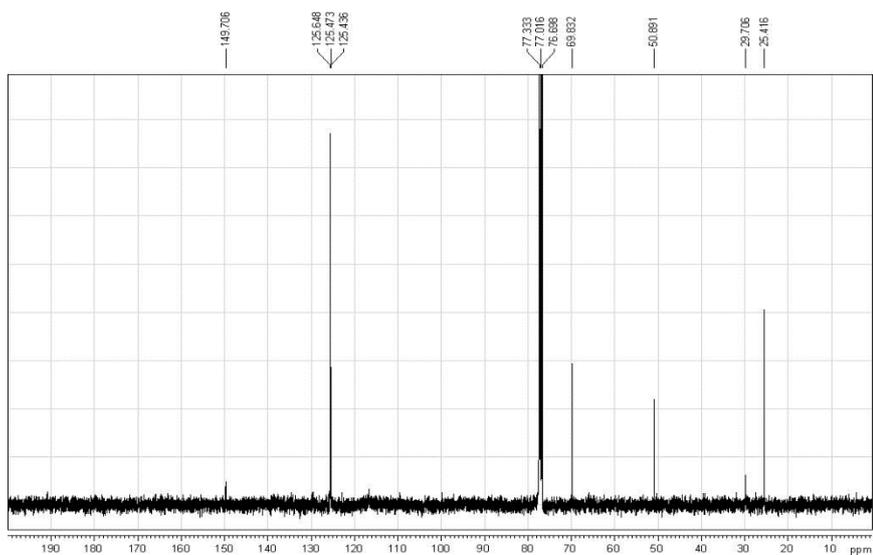


Figura A.51. Espectro RMN ¹³C de (S)-1-(4'-trifluorometilfenil)etanol.

(-)-(S)-1-(4'-Cianofenil)etanol

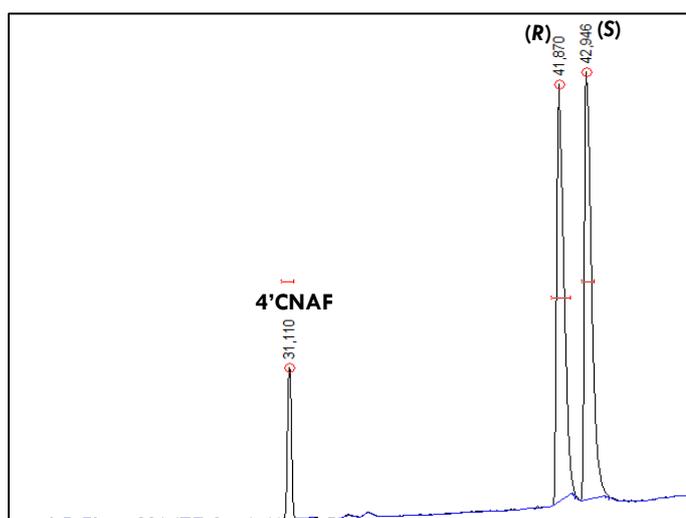


Figura A.52. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de 4'CNAF con Borohidruro de sodio (CG-FID).

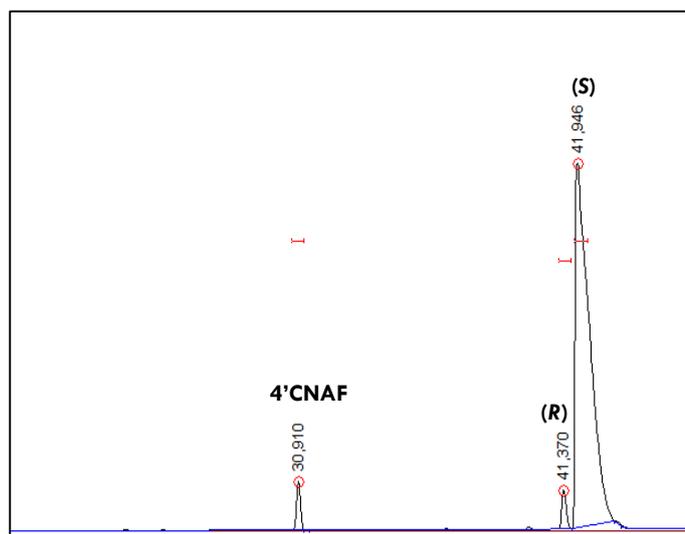


Figura A.53. Cromatograma de 4'CNAF reducida con frutos de *L. lucidum* (CG-FID).

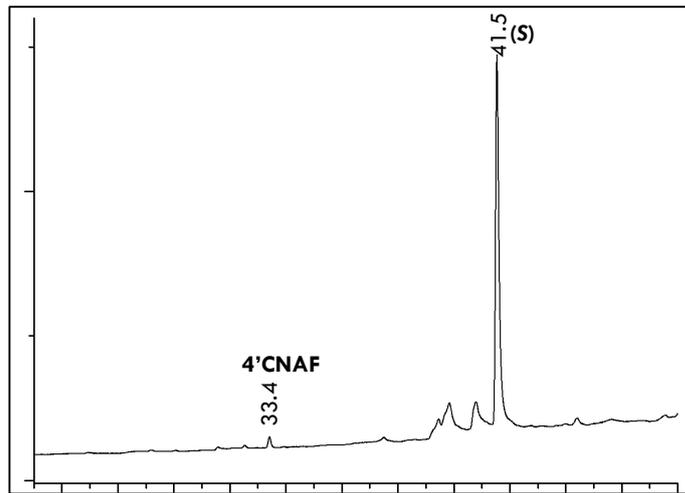


Figura A.54. Cromatograma de 4'CNAF reducida con raíces de *E. horridum* (CG-FID).

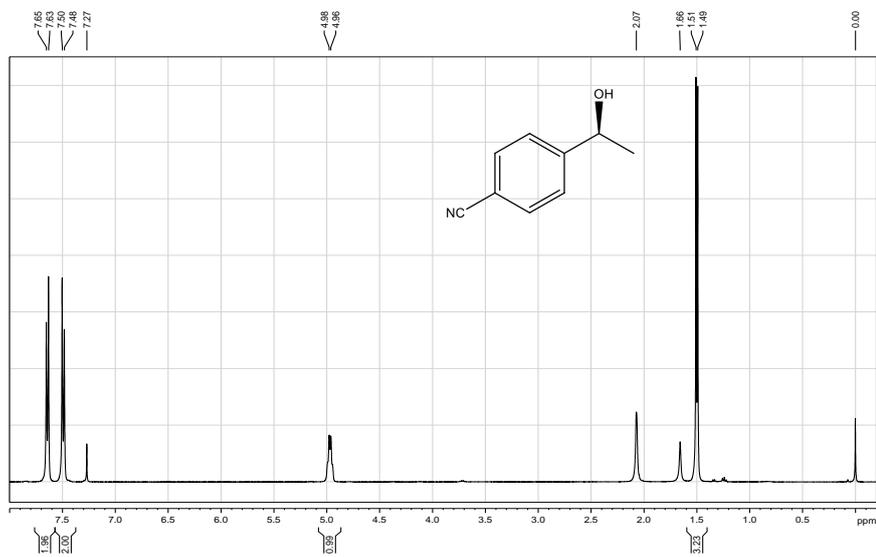


Figura A.55. Espectro RMN ¹H de (S)-1-(4'-cianofenil)etanol.

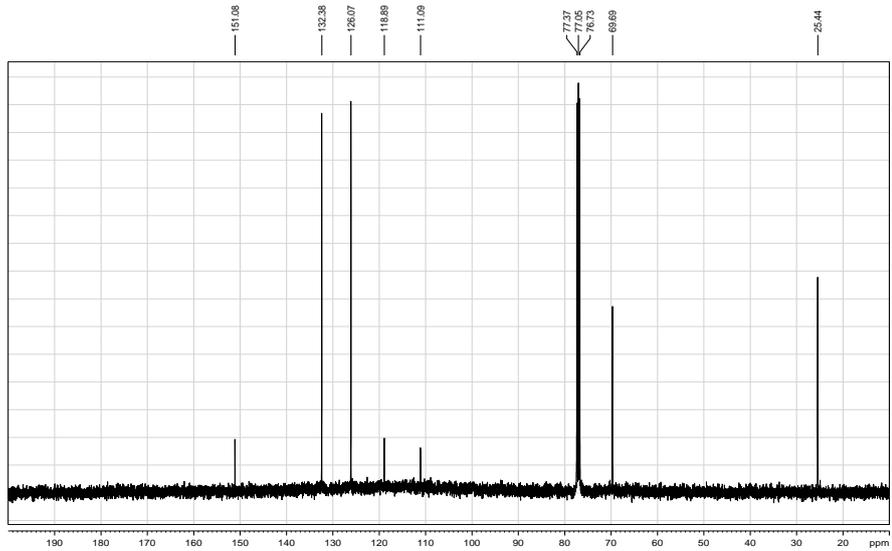


Figura A.56. Espectro RMN ¹³C de (S)-1-(4'-cianofenil)etanol.

(-)-(S)-1-(4'-Metilfenil)etanol

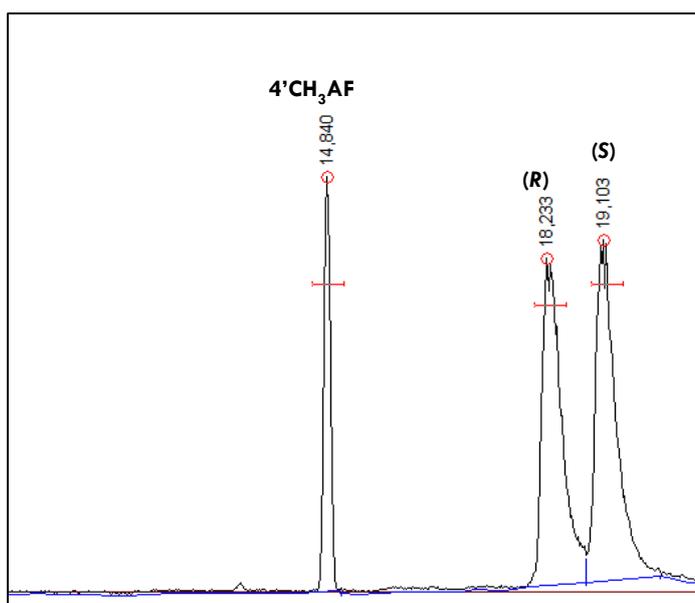


Figura A.57. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de $4'CH_3AF$ con Borohidruro de sodio (CG-FID).

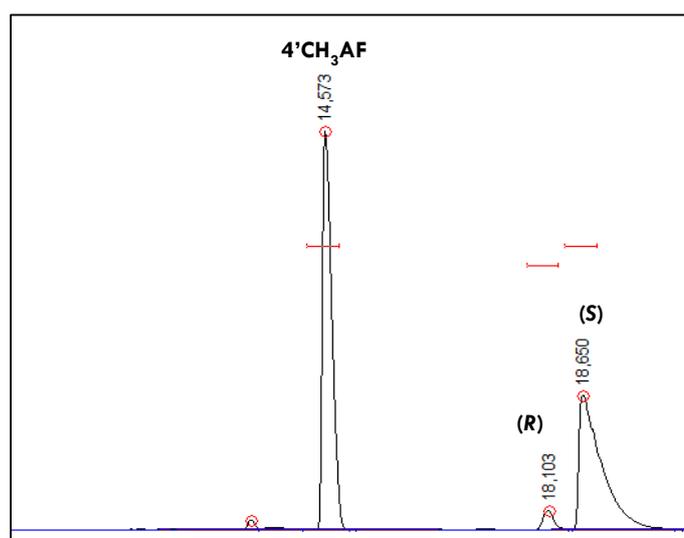


Figura A.58. Cromatograma de $4'CH_3AF$ reducida con frutos de *L. lucidum* (CG-FID).

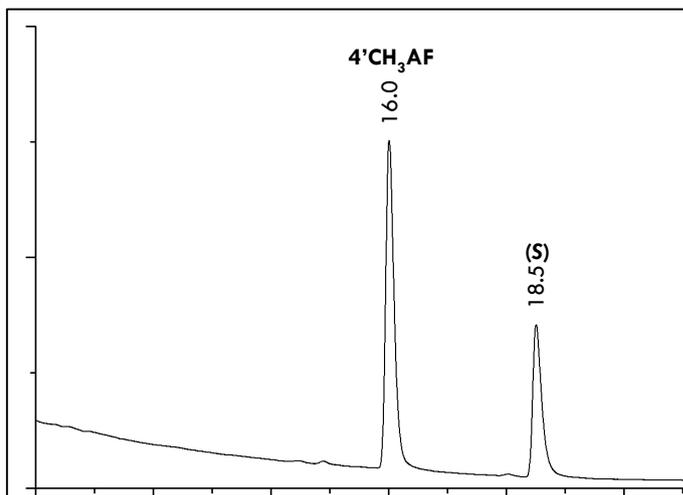


Figura A.59. Cromatograma de 4'CH₃AF reducida con raíces de *E. horridum* (CG-FID).

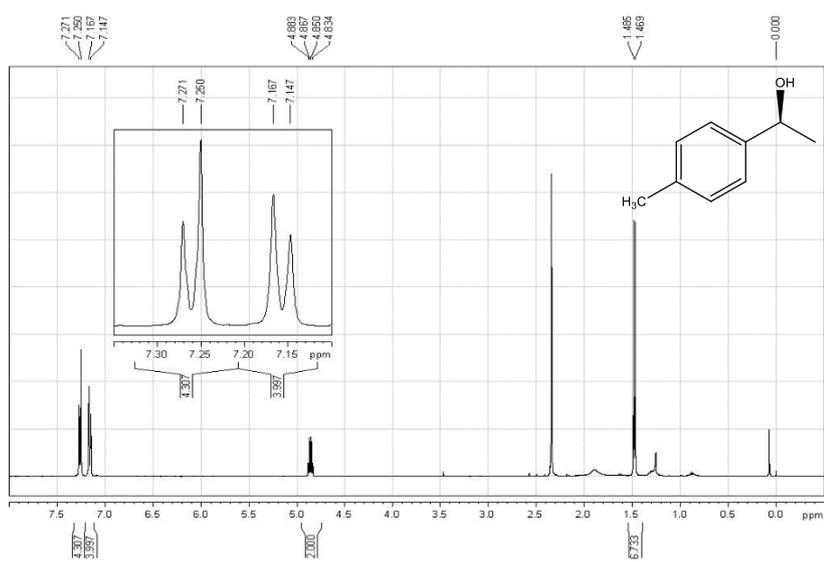


Figura A.60. Espectro RMN ¹H de (S)-1-(4'-metilfenil)etanol.

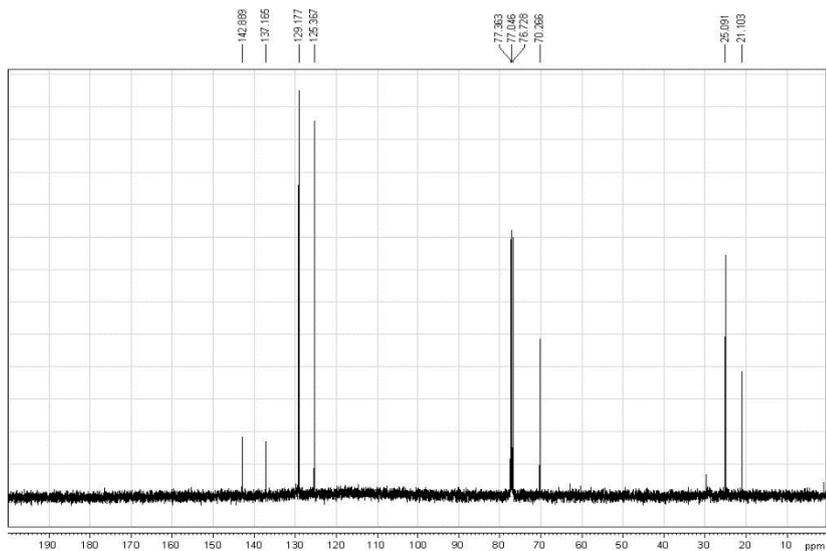


Figura A.61. Espectro RMN ¹³C de (S)-1-(4'-metilfenil)etanol.

(-)-(S)-1-(Tiofen-2-il)etanol

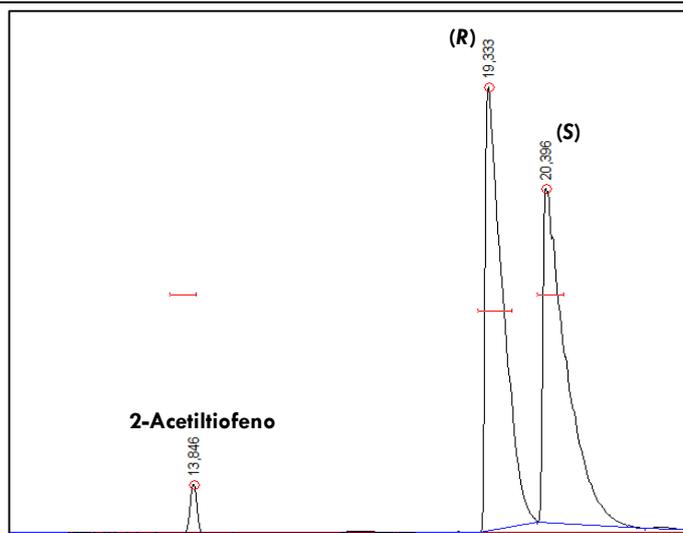


Figura A.62. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de 2-Acetilthiopheno con Borohidruro de sodio (CG-FID).

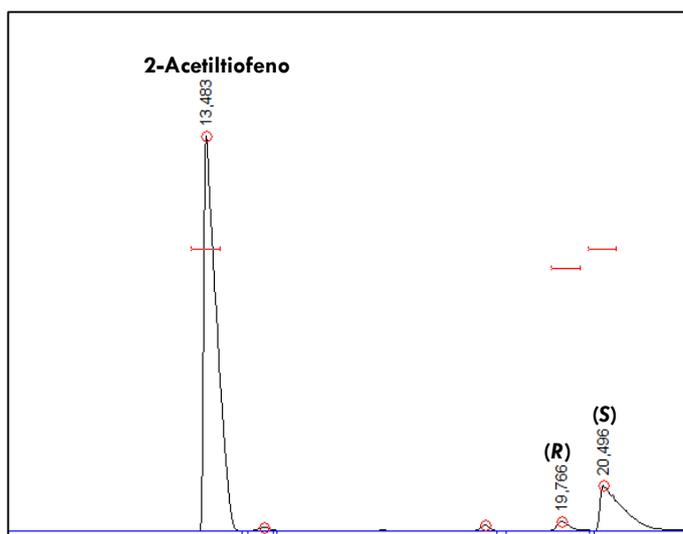


Figura A.63. Cromatograma de 2-Acetilthiopheno reducida con frutos de *L. lucidum* (CG-FID).

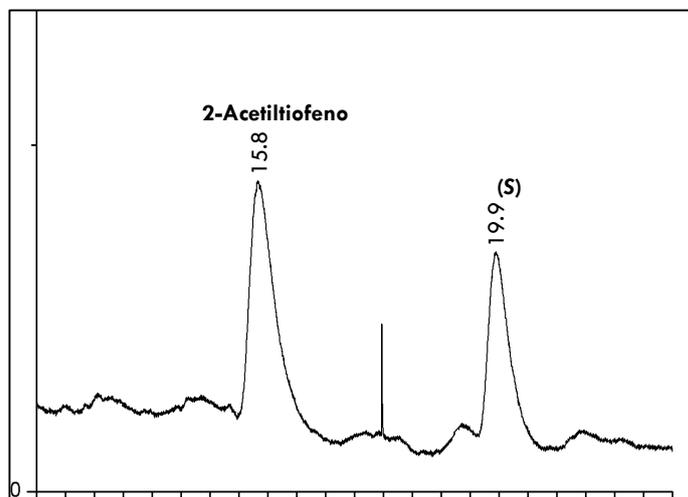


Figura A.64. Cromatograma de 2-Acetilthiopheno reducida con raíces de *E. horridum* (CG-FID).

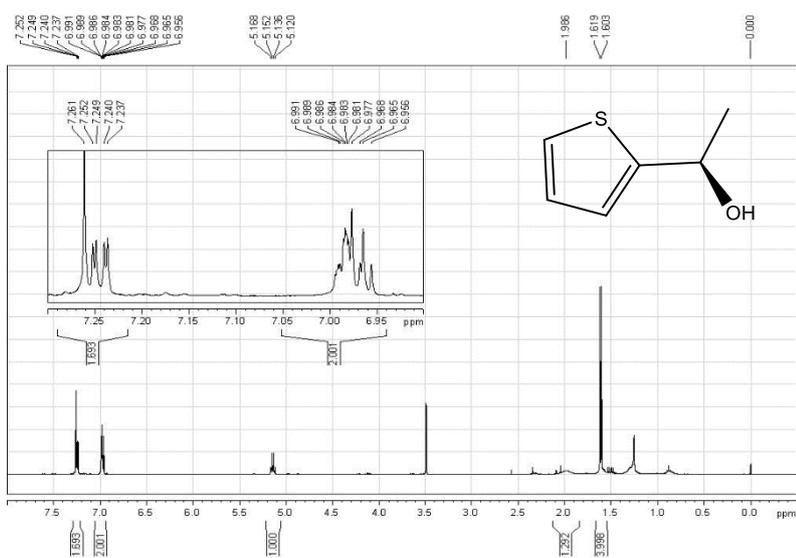


Figura A.65. Espectro RMN ¹H de (S)-1-(tiofen-2-il)etanol.

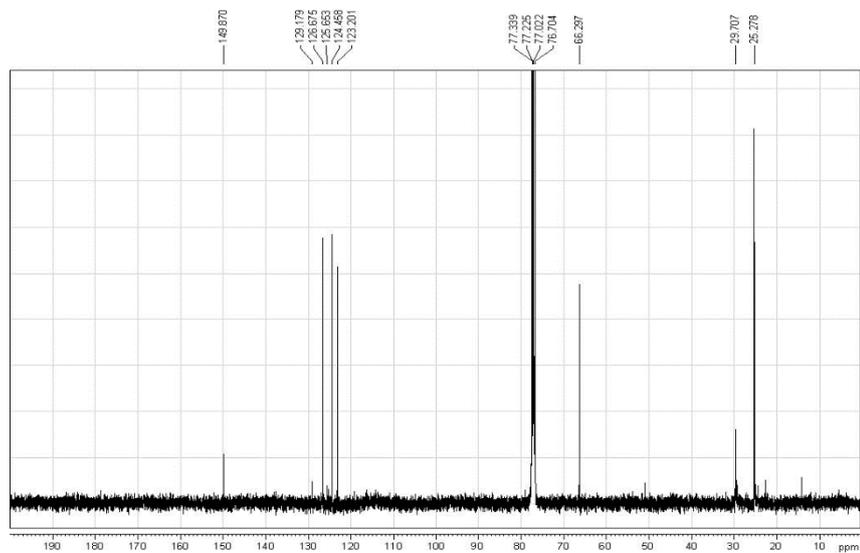


Figura A.66. Espectro RMN ¹³C de (S)-1-(tiofen-2-il)etanol.

(-)-(S)-1-(Piridin-2-il)etanol

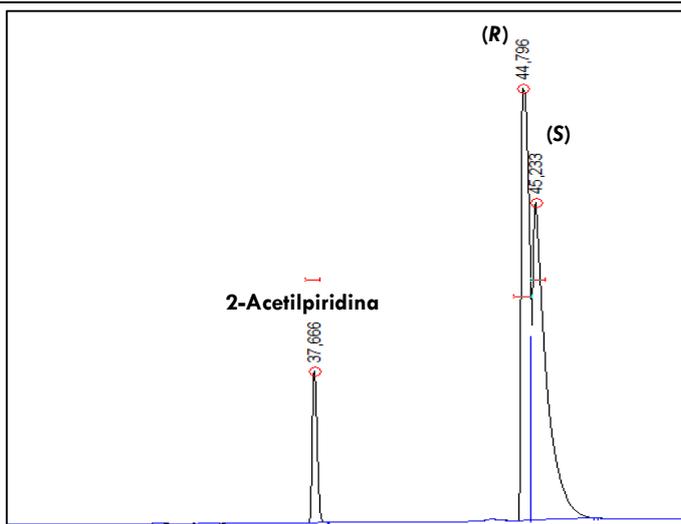


Figura A.67. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de 2-Acetilpiridina con Borohidruro de sodio (CG-FID).

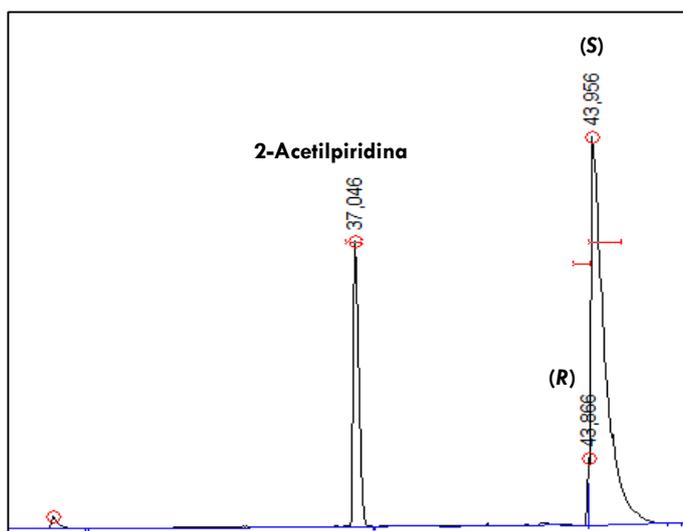


Figura A.68. Cromatograma de 2-Acetilpiridina reducida con frutos de *L. lucidum* (CG-FID).

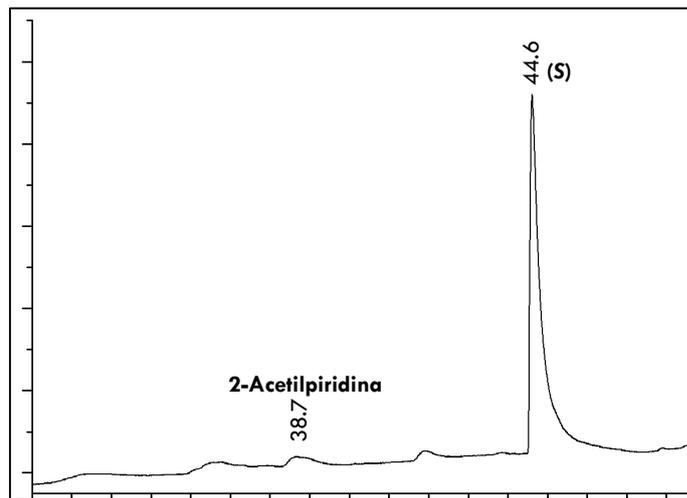


Figura A.69. Cromatograma de 2-Acetilpiridina reducida con raíces de *E. horridum* (CG-FID).

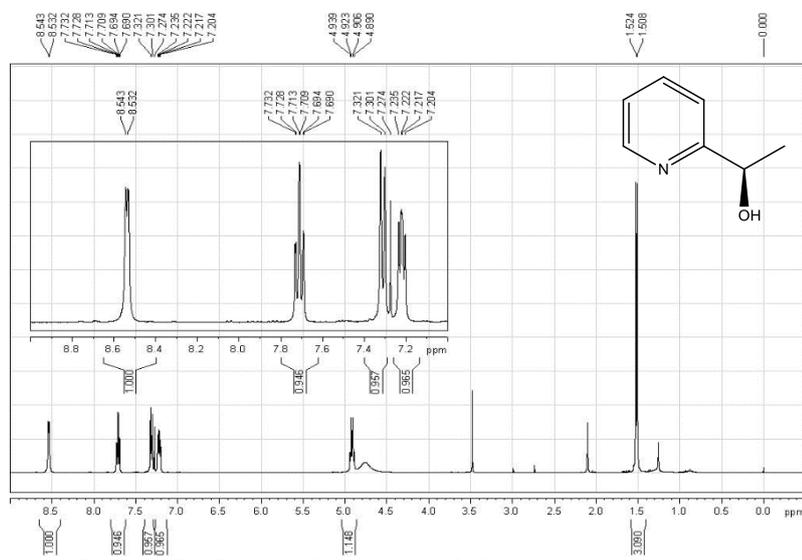


Figura A.70. Espectro RMN ¹H de (S)-1-(piridin-2-il)etanol.

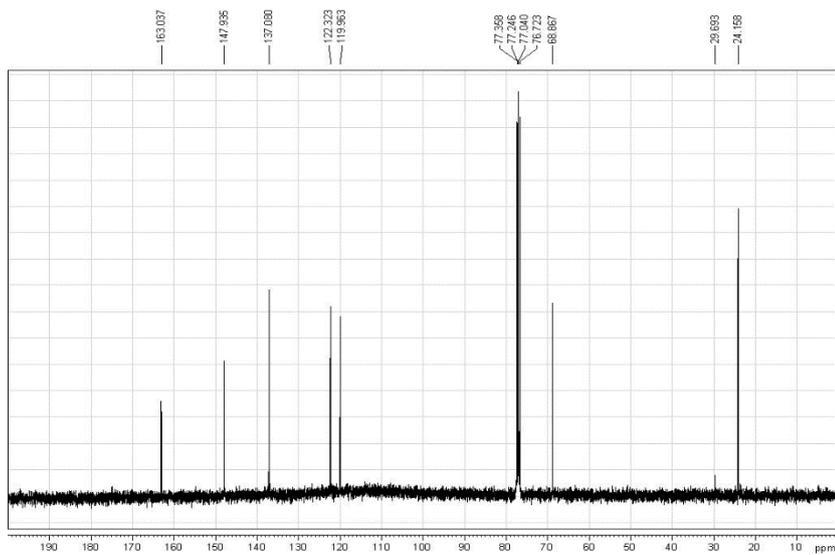


Figura A.71. Espectro RMN ¹³C de (S)-1-(piridin-2-il)etanol.

(-)-(S)-1-(3'Hidroxifenil)etanol

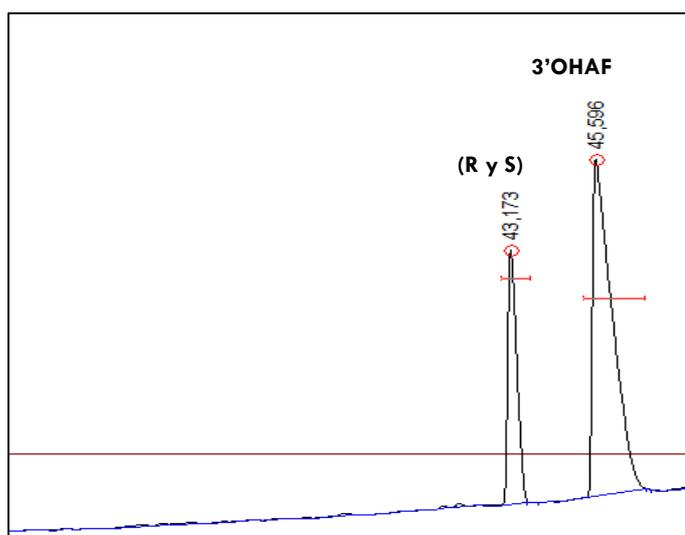


Figura A.72. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de 3'-OHAF con Borohidruro de sodio (CG-FID).

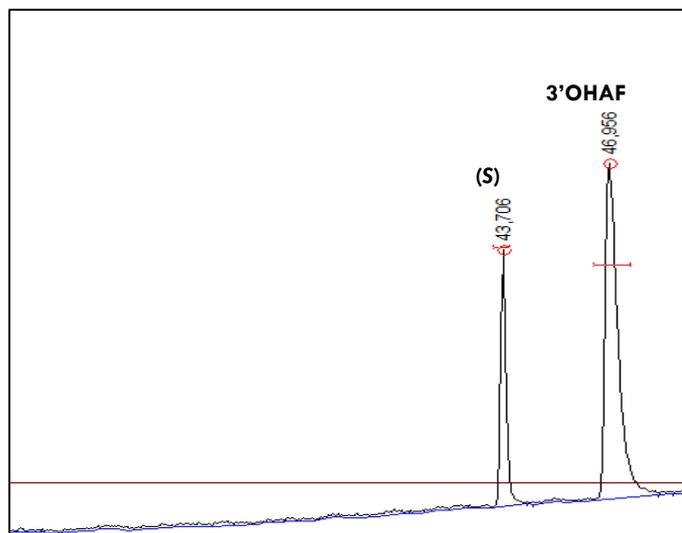


Figura A.73. Cromatograma de 3'-OHAF reducida con frutos de *L. lucidum* (CG-FID).

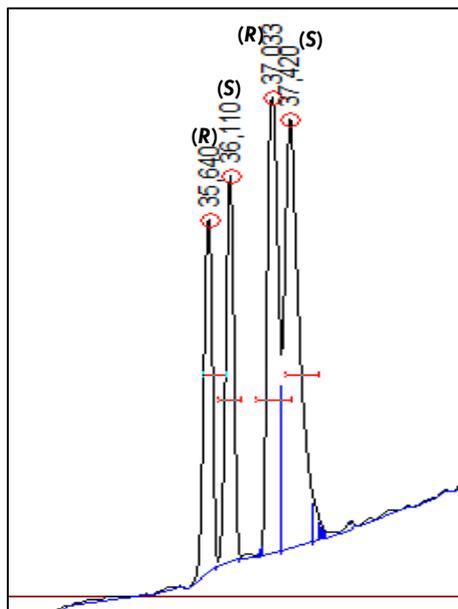


Figura A.74. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de 3'-OHAF mono- y di- esterificada (CG-FID).

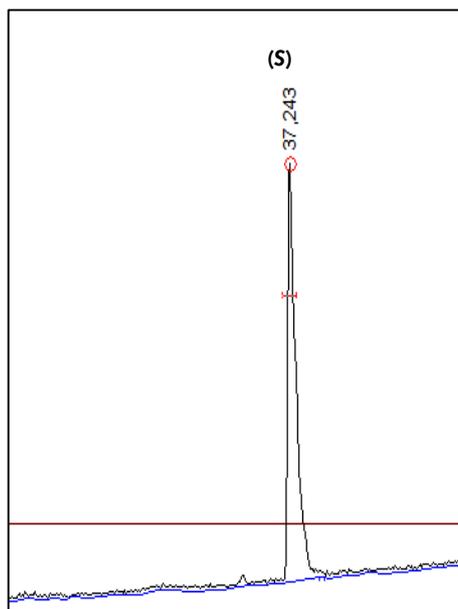


Figura A.75. Cromatograma de 3'-OHAF reducida con frutos de *L. lucidum* purificada y esterificada(CG-FID).

(-)-(R)-2-Cloro-1-(Fenil)etanol

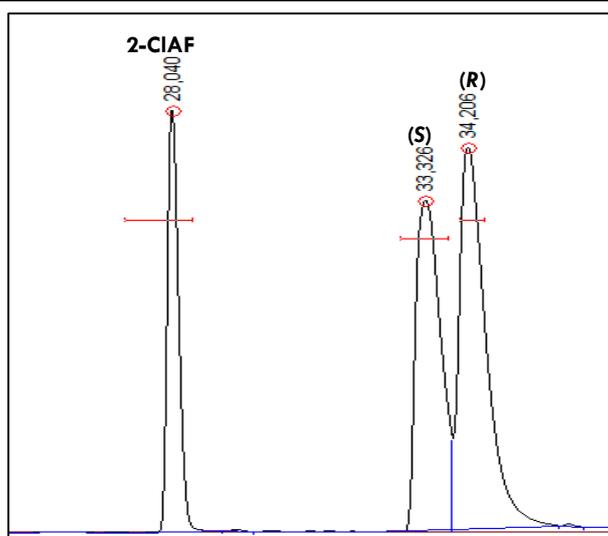


Figura A.78. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de 2-ClAF con Borohidruro de sodio (CG-FID).

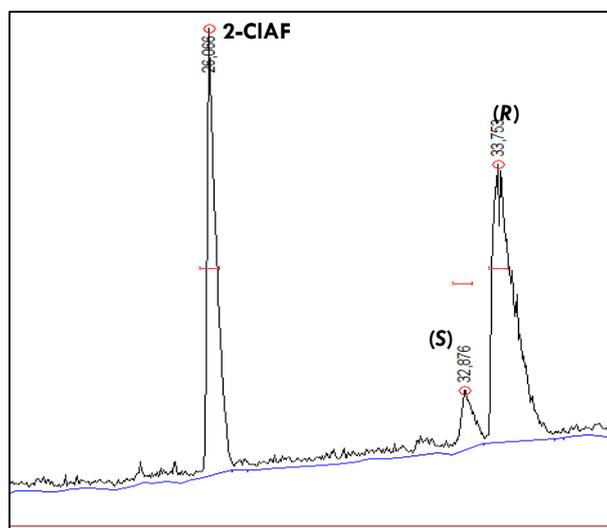


Figura A.79. Cromatograma de 2-ClAF reducida con frutos de *L. lucidum* (CG-FID).

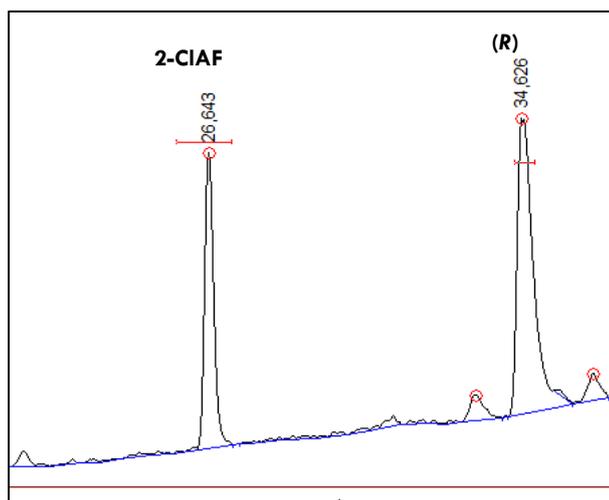


Figura A.80. Cromatograma de 2-CIAF reducida con raíces de *E. horridum* (CG-FID).

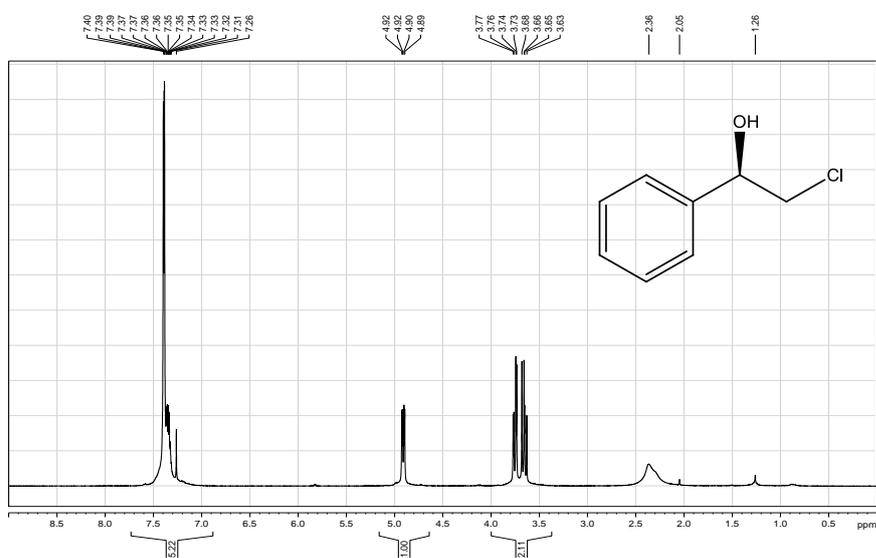


Figura A.81. Espectro RMN ^1H de (R)-2-Cloro-1-(fenil)etanol.

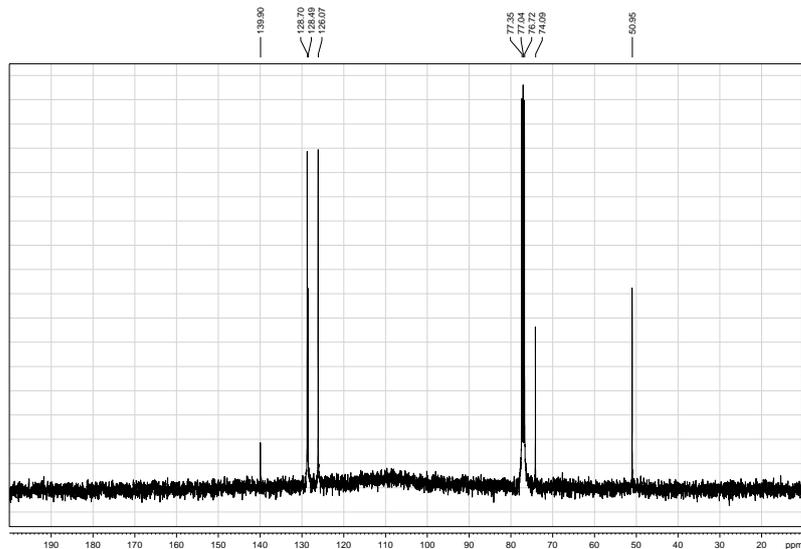


Figura A.82. Espectro RMN ^{13}C de (R)-2-Cloro-1-(fenil)etanol.

(-)-(S)-1-(3'-metoxifenil)etanol

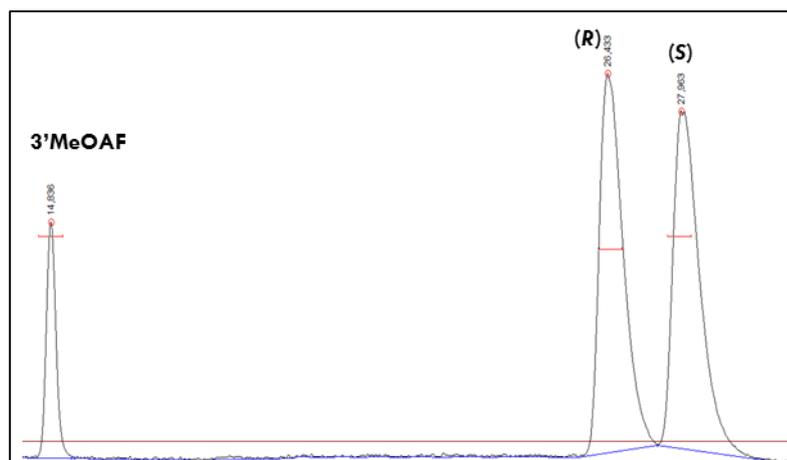


Figura A.83. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de 3'MeOAF con Borohidruro de sodio (CG-FID).

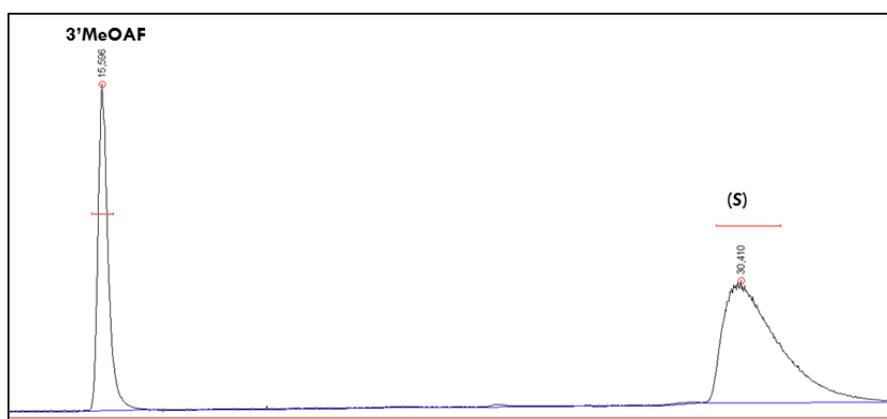


Figura A.84. Cromatograma de 3'MeOAF reducida con semillas de *L. lucidum* (CG-FID).

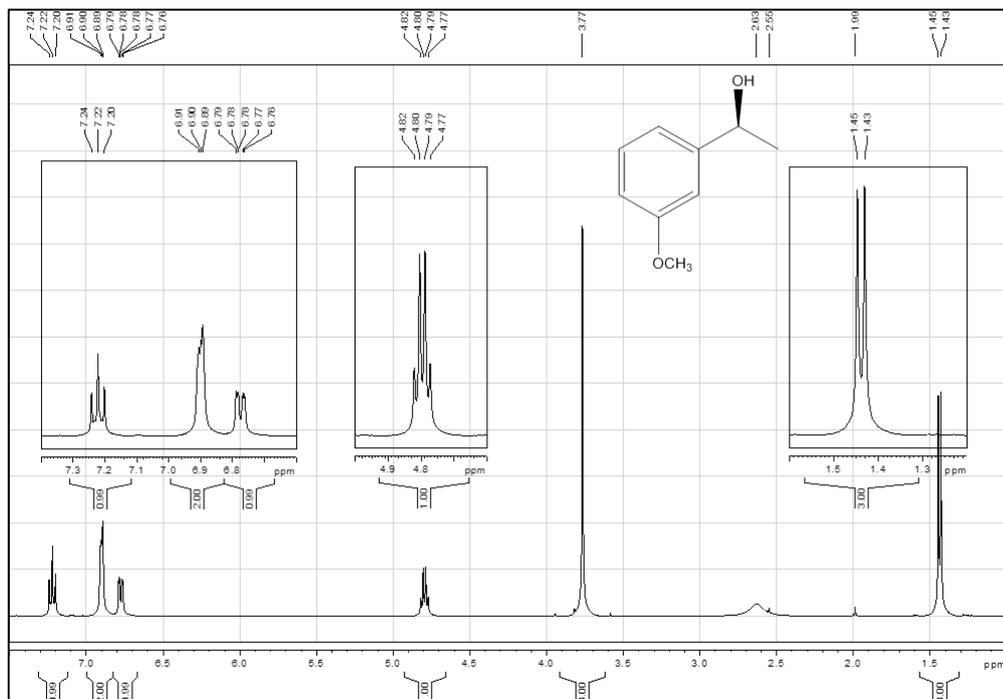


Figura A.85. Espectro RMN ¹H de (S)-1-(3'Metoxifenil)etanol.

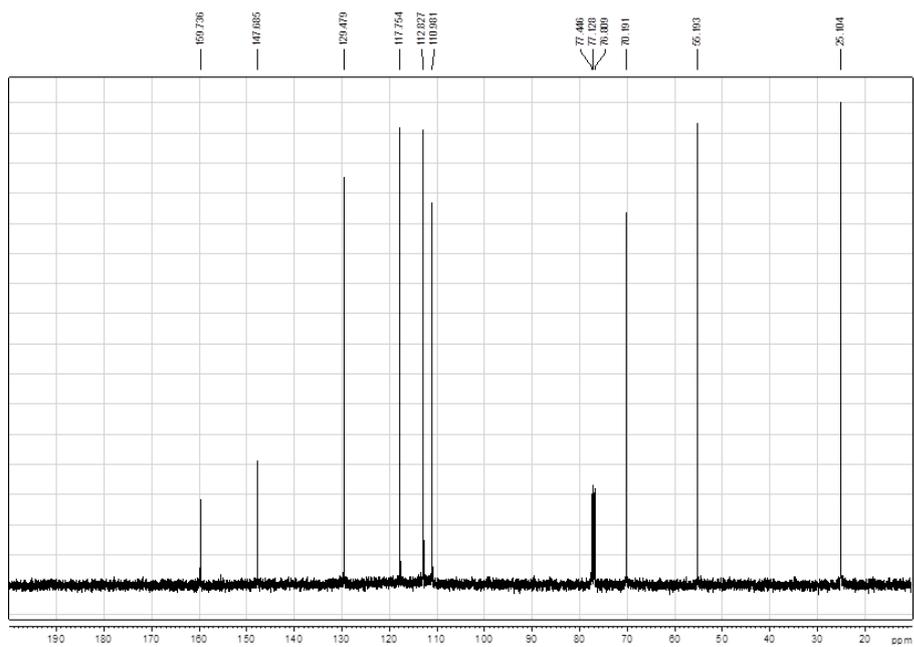


Figura A.86. Espectro RMN ¹³C de (S)-1-(3'Metoxifenil)etanol.

(+)-(S)-3-hidroxi butirato de etilo

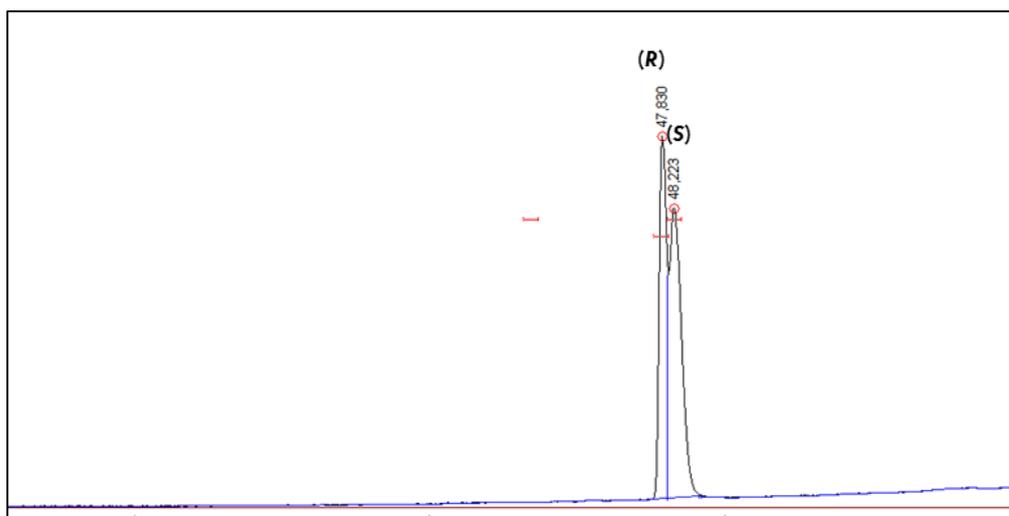


Figura A.87. Mezcla racémica. Cromatograma de la reducción de Acetoaceto de Etilo con Borohidruro de sodio (CG-FID).

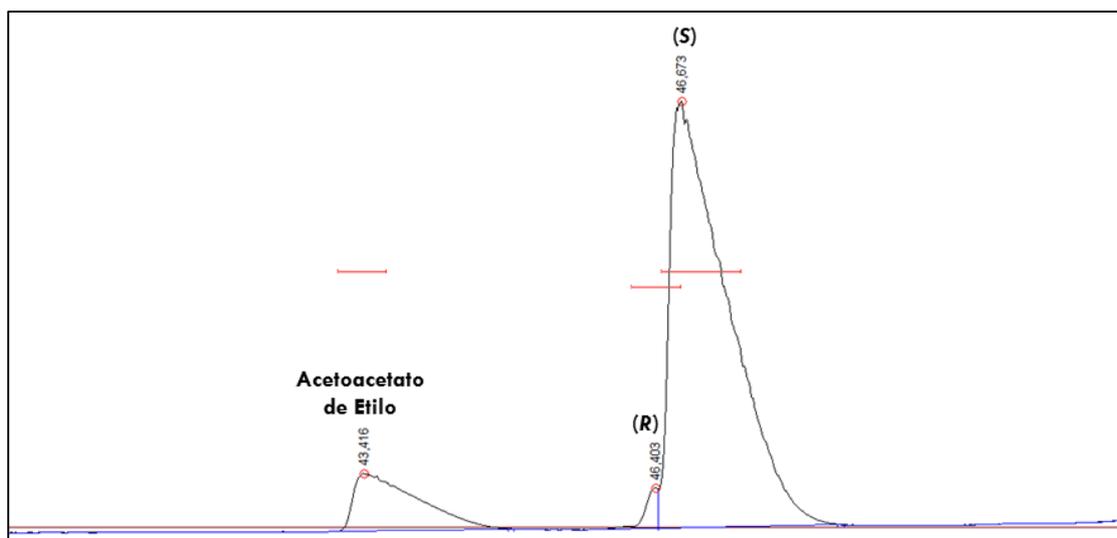


Figura A.88. Cromatograma de Acetoacetato de Etilo reducida con semillas de *L. lucidum* (CG-FID).

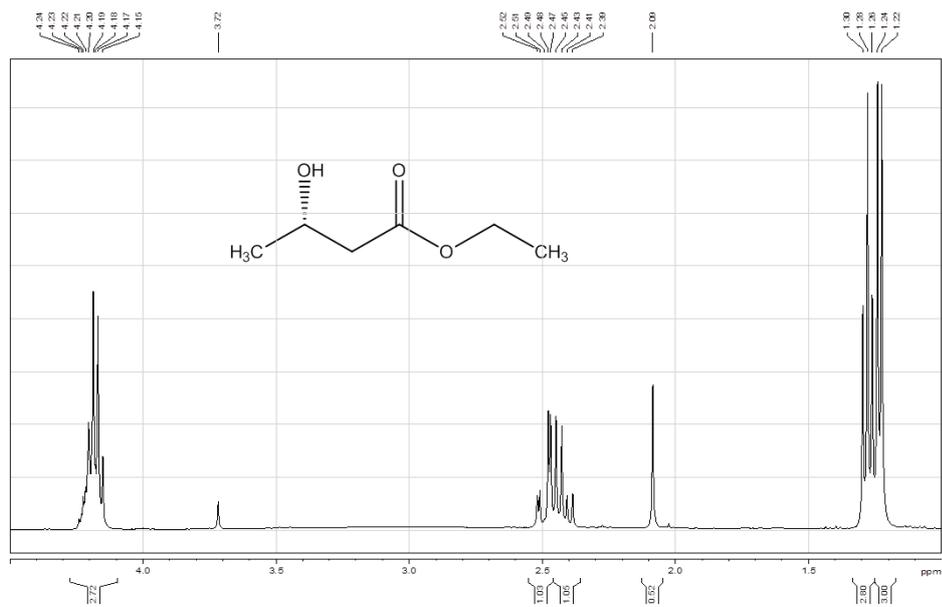


Figura A.89. Espectro RMN ^1H de (S)-3-hidroxitirato de etilo.

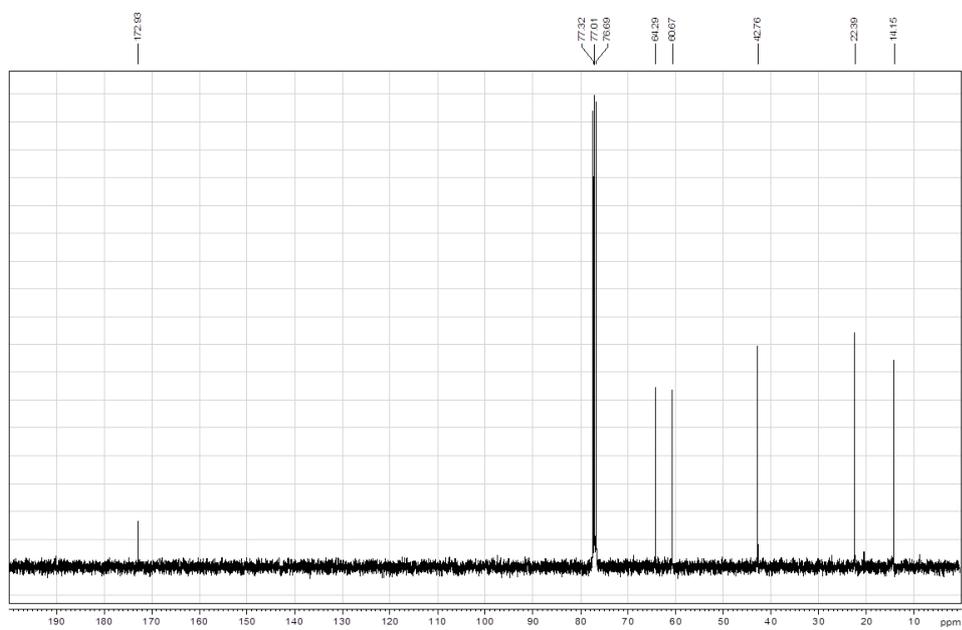


Figura A.90. Espectro RMN ^{13}C de (S)-3-hidroxitirato de etilo.

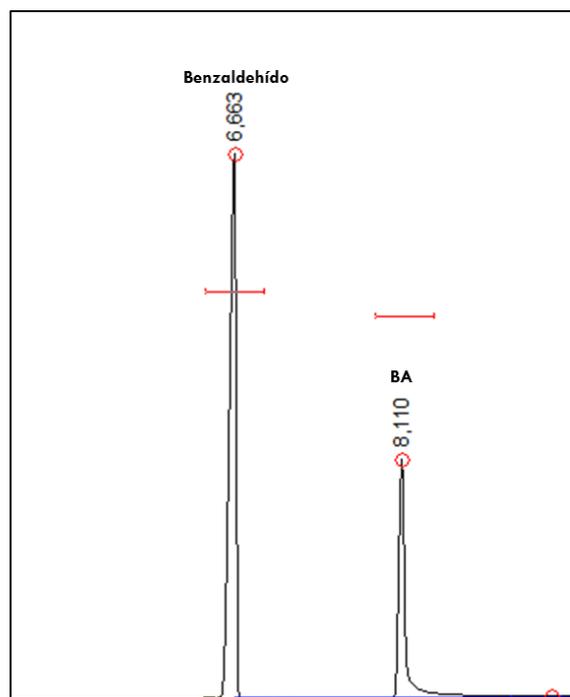


Figura A.91. Cromatograma de la reducción de Benzaldehído con Borohidruro de sodio (CG-FID).

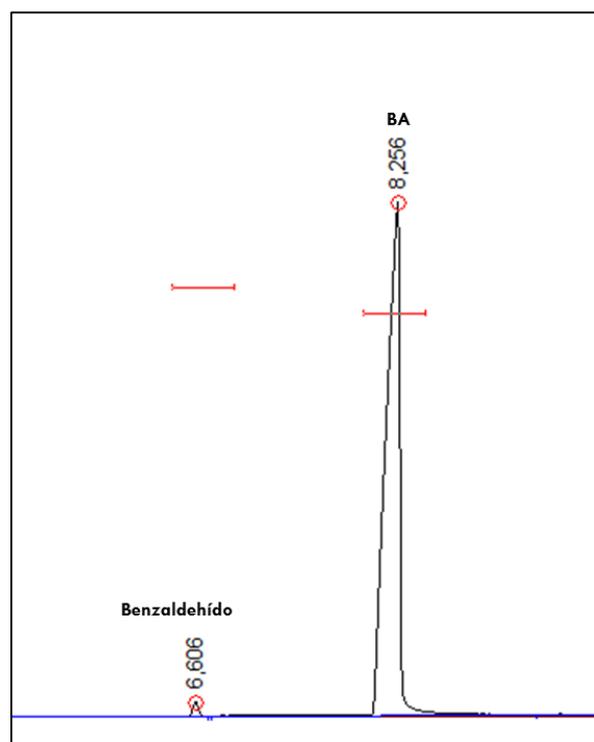


Figura A.92. Cromatograma de Benzaldehído reducida con semillas de *L. lucidum* (CG-FID).

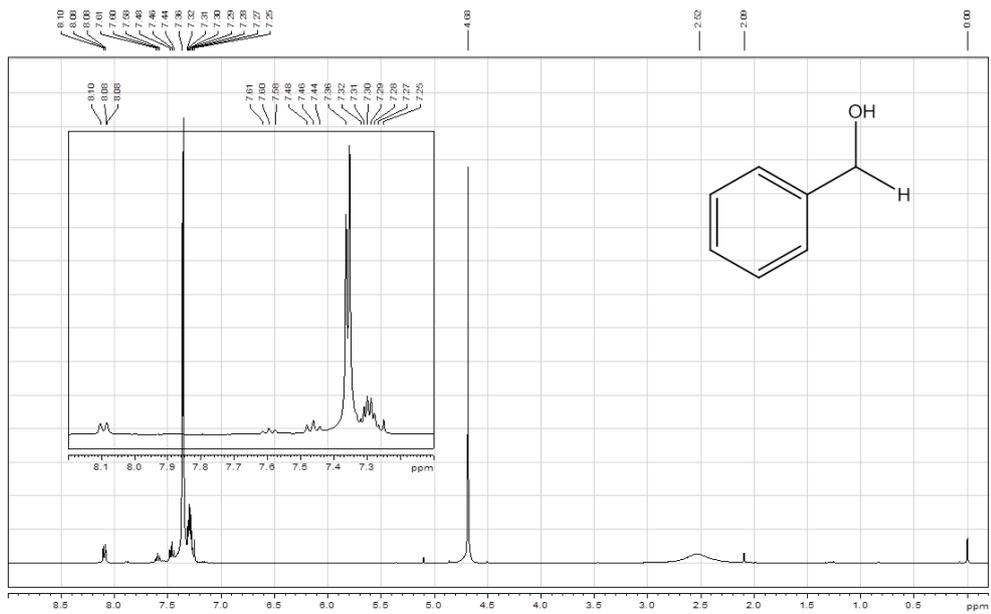


Figura A.93. Espectro RMN ^1H de Alcohol bencílico.

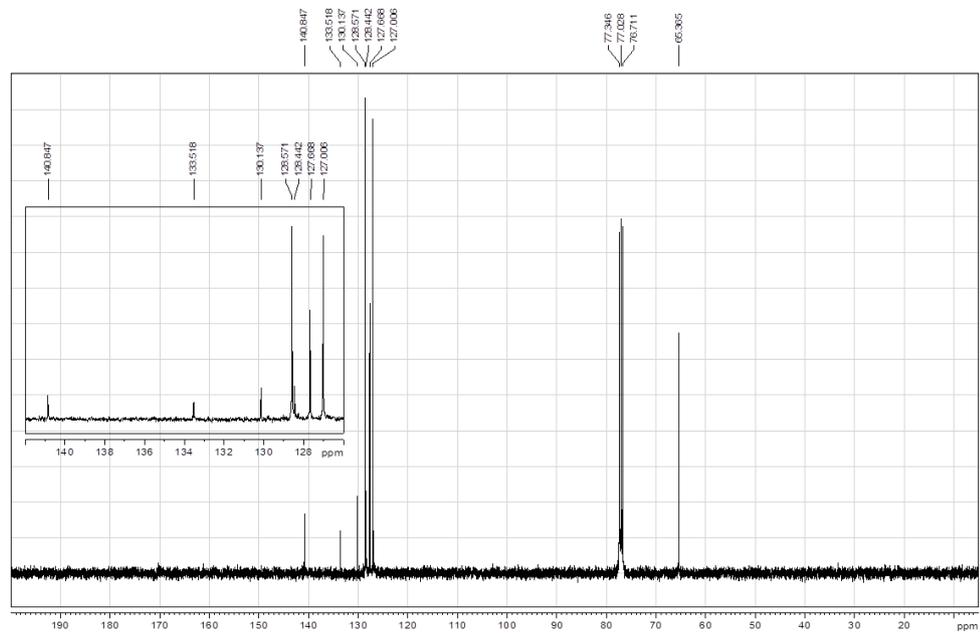


Figura A.94. Espectro RMN ^{13}C de Alcohol Bencílico.

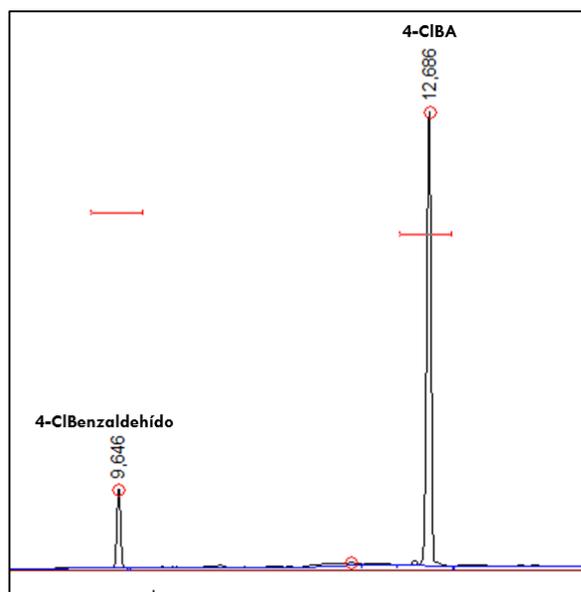


Figura A.95. Cromatograma de la reducción de 4-CloroBenzaldehído con Borohidruro de sodio (CG-FID).

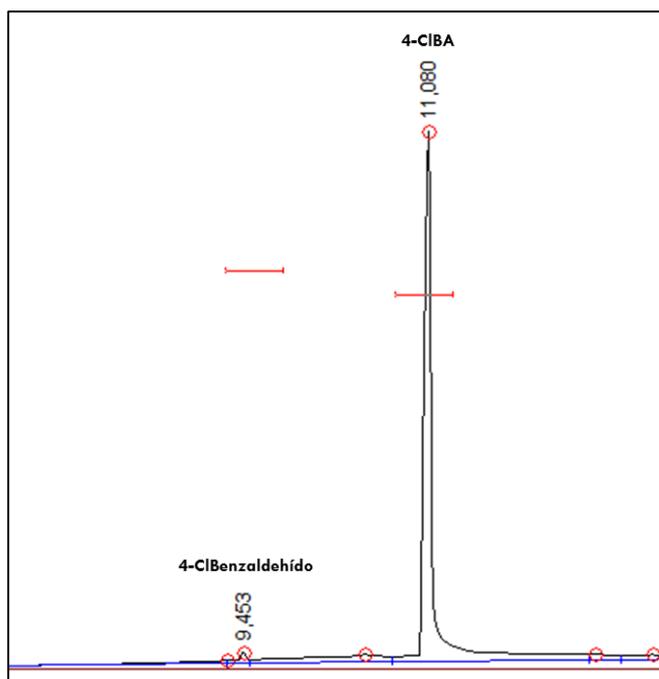


Figura A.96. Cromatograma de 4-CloroBenzaldehído reducida con semillas de *L. lucidum* (CG-FID).

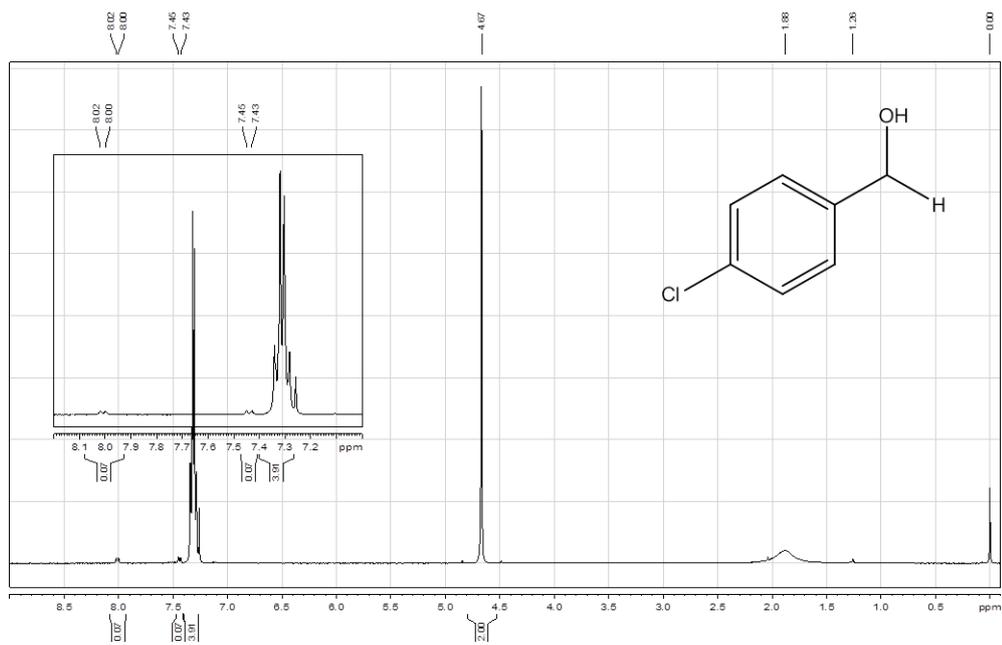


Figura A.97. Espectro RMN ^1H de Alcohol 4-Clbencílico.

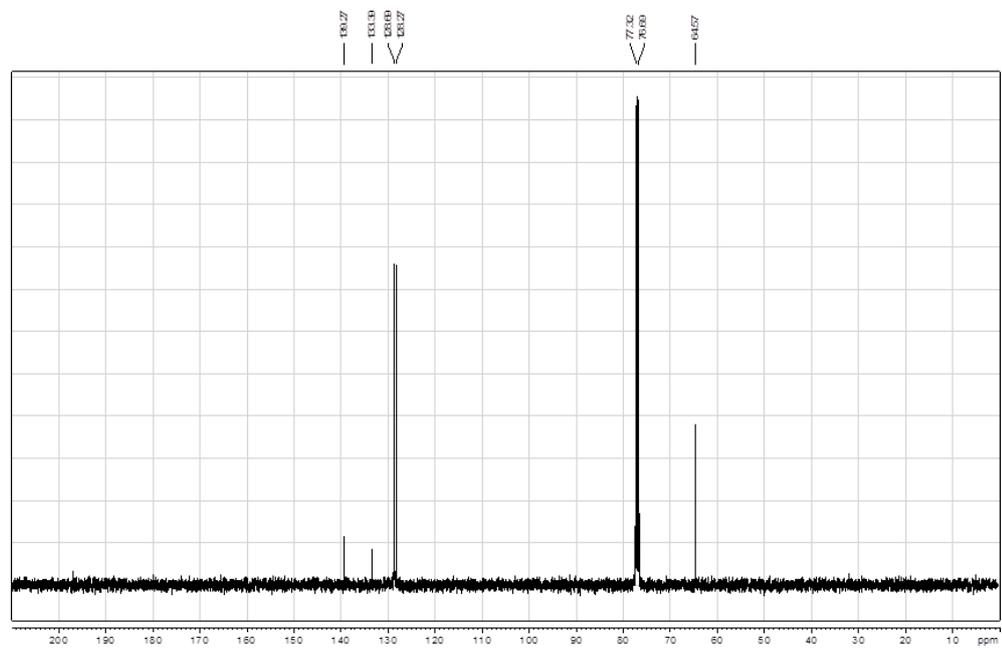


Figura A.98. Espectro RMN ^{13}C de Alcohol 4-Clbencílico.

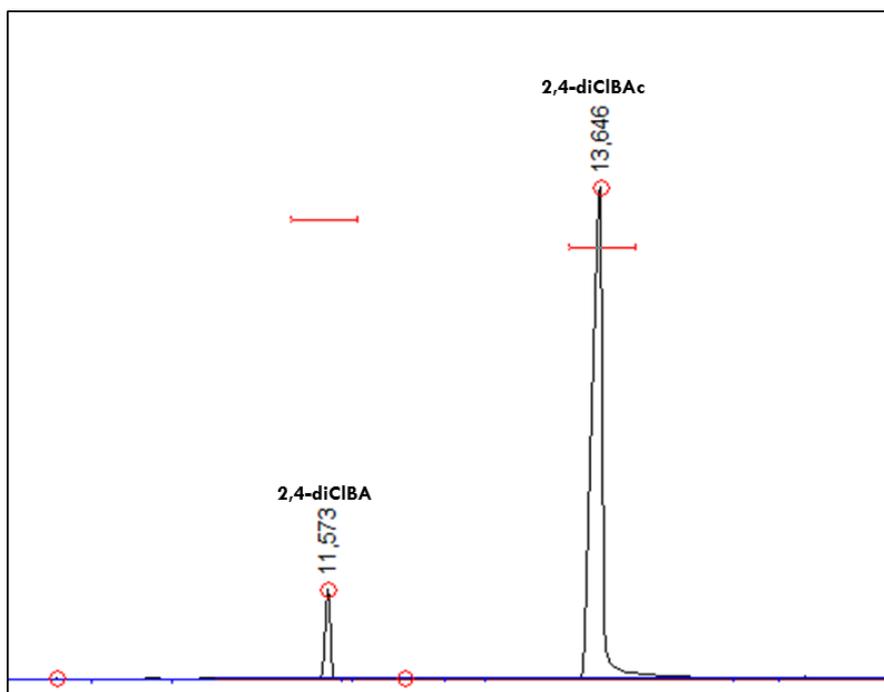


Figura A.99. Cromatograma de la reducción de 2,4-diCloroBenzaldehído con Borohidruro de sodio (CG-FID).

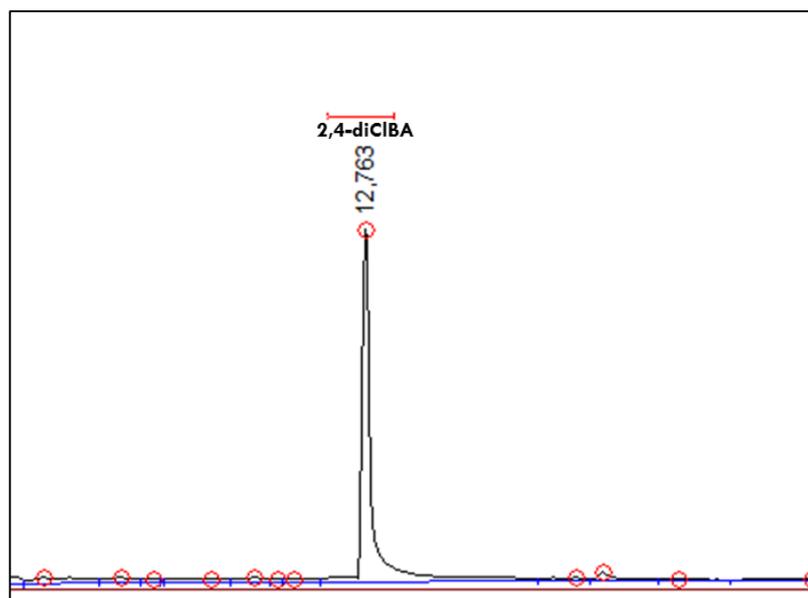


Figura A.100. Cromatograma de 2,4-diCloroBenzaldehído reducida con semillas de *L. lucidum* (CG-FID).

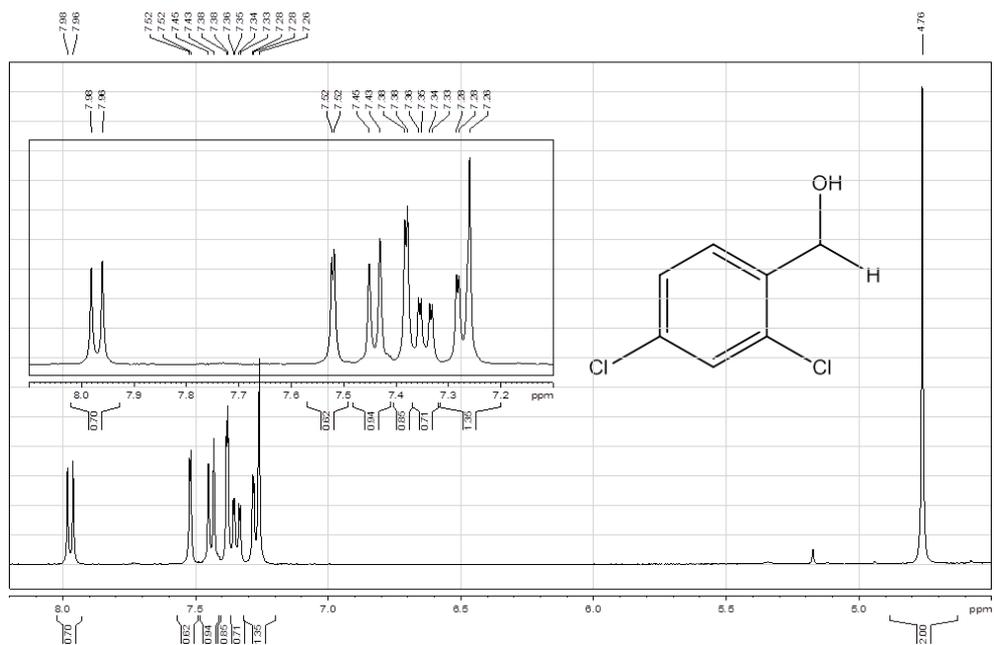


Figura A.101. Espectro RMN ^1H de Alcohol 2,4-diClBencílico.

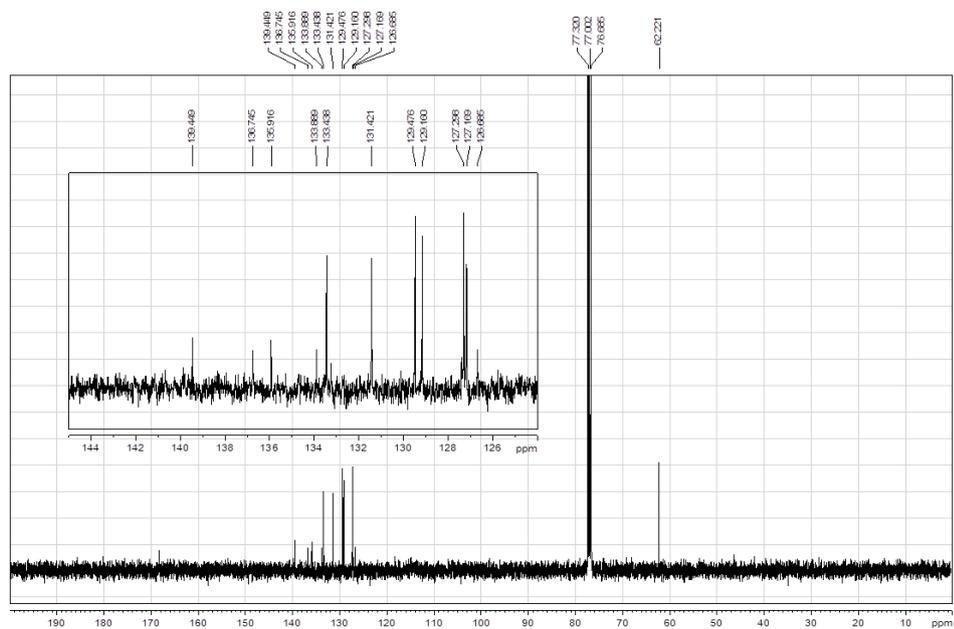


Figura A.102. Espectro RMN ^{13}C de Alcohol 2,4-diClBencílico.

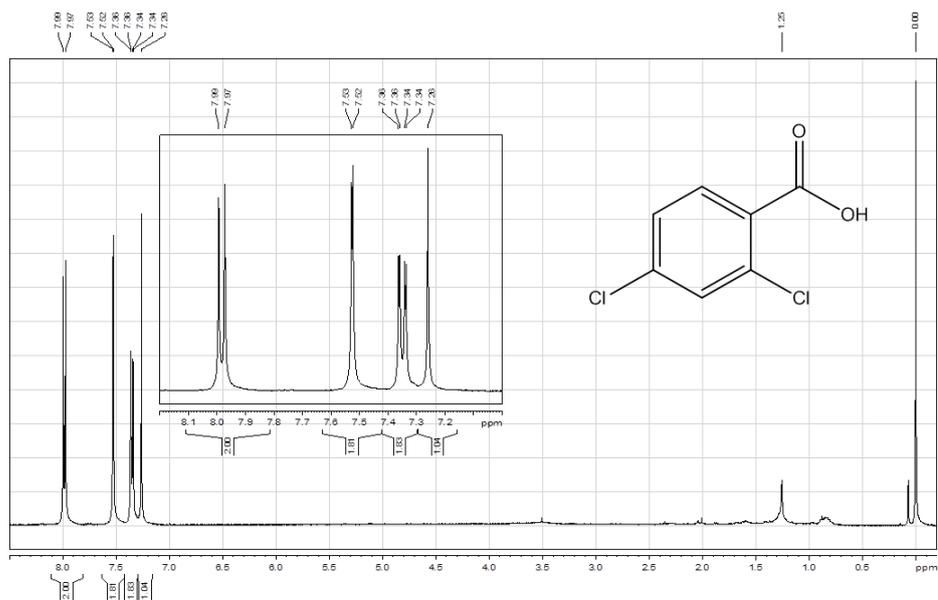


Figura A.103. Espectro RMN ^1H de Ácido 2,4-diclorobenzóico.

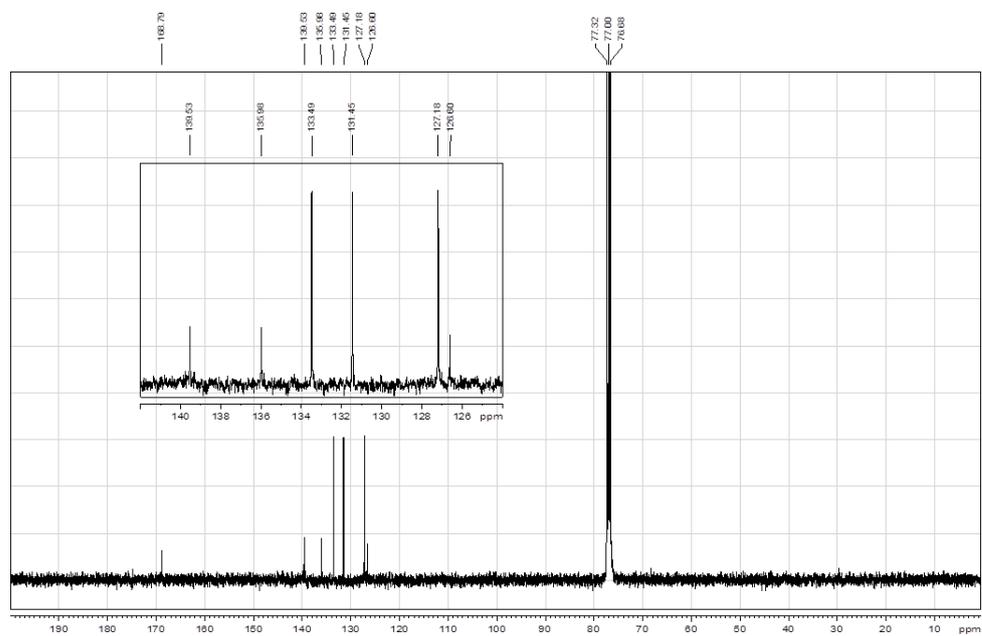


Figura A.104. Espectro RMN ^{13}C de Ácido 2,4-diclorobenzóico.

B. Capturas de pantalla de cálculos métricas verdes (GS y ES)

Las capturas de pantalla de los procedimientos de cálculo con las métricas utilizadas para cada una de las metodologías reductivas discutidas en el capítulo 10 se encuentran disponibles en ingresando al siguiente link:

https://drive.google.com/open?id=1E0uKUg8rPNwFtR3_4HwGKOPecYOpTKrd

El orden de presentación se corresponde a lo mostrado en dicho capítulo.