



**RIDAA**  
Repositorio Institucional  
Digital de Acceso Abierto de la  
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad  
Nacional  
de Quilmes

Ardanaz, Sebastián Mario

# Condensación aldólica catalizada por albúmina de suero bovino



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

*Cita recomendada:*

Ardanaz, S. M. (2022). *Condensación aldólica catalizada por albúmina de suero bovino. (Tesis de doctorado).* Bernal, Argentina: Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes  
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/3906>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

## Condensación aldólica catalizada por albúmina de suero bovino

**TESIS DOCTORAL**

**Sebastián Mario Ardanaz**

sebastian.ardanaz@gmail.com

### Resumen

La biocatálisis brinda metodologías sintéticas suaves, selectivas y sustentables, y está consolidada como una fuente de alternativas a los métodos químicos tradicionales. En este sentido, se han hallado numerosas enzimas con actividades catalíticas inesperadas, lo que se denomina promiscuidad catalítica. En el presente trabajo se propone como objetivo general ampliar el campo de aplicación de la promiscuidad, centrándose en el estudio de la condensación aldólica cruzada catalizada por albúmina de suero bovino (BSA), una proteína no enzimática. En particular, la tesis desarrolla un método alternativo para obtener cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas (enonas), que transcurre en condiciones suaves de reacción y utiliza un catalizador sustentable y compatible con el medio ambiente. En el Capítulo 1 se presenta una introducción sobre biocatálisis y biotransformaciones, promiscuidad y BSA. En el Capítulo 2 se muestran los resultados del estudio de la reacción de condensación aldólica cruzada entre acetona y una serie de benzaldehídos, catalizada por BSA. Esta reacción tiene valores elevados de conversión a las correspondientes enonas y se lleva a cabo en agua y etanol, solventes económicos y no contaminantes. También es destacable el gran potencial de reúso del biocatalizador, por su elevada estabilidad. Además, se presenta el efecto que tienen sobre la conversión a enona los sustituyentes del sustrato aldehídico aromático, el solvente de reacción y su proporción. En el Capítulo 3 se describen los resultados de la condensación aldólica cruzada entre benzaldehído, p-nitro-benzaldehído y cuatro cetonas alifáticas (butanona, 3-pentanona, ciclopentanona, ciclohexanona), catalizada por BSA. Tanto las cetonas cíclicas como las acíclicas ensayadas permiten obtener elevados porcentajes de conversión a las enonas correspondientes, evidenciando una aceptable tolerancia de sustratos tanto en el grupo dador como aceptor frente a la reacción de condensación aldólica. Además, se postuló un mecanismo de reacción bi-bi ordenado que incluye residuos del sitio catalítico de la proteína con valores de pKa

anormales. En el Capítulo 4 se muestran ensayos de reacciones de ciclación aldólica intramolecular catalizadas por BSA. Si bien con la mayoría de los sustratos ensayados no ocurren reacciones aldólicas, con 2-acetilbenzaldehído se obtiene el cetol 3-hidroxi-1-indanona. Además, los experimentos sugieren que la ciclación que conduce a este producto no ocurre en el mismo sitio de unión de la proteína donde se cataliza la reacción entre acetona y benzaldehído. El trabajo realizado permitió ampliar el campo de aplicaciones promiscuas de la BSA y avanzar en la comprensión de la reacción de condensación aldólica cruzada catalizada por esta proteína. El procedimiento biocatalítico desarrollado en la tesis, suave y sencillo, permitió obtener un conjunto de 14 cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas a escala preparativa y presenta potencialidad en la condensación aldólica de compuestos lábiles en medio fuertemente básico.



Universidad Nacional de Quilmes

*Condensación aldólica catalizada por  
albúmina de suero bovino*

Tesis Doctoral

Lic. Sebastián Mario Ardanaz

2022

Director de tesis

Dr. Luis Emilio Iglesias

El presente trabajo de Tesis Doctoral, para optar por el grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes, ha sido realizado en el Laboratorio de Biotransformaciones y Química de Ácidos Nucleicos del Departamento de Ciencia y Tecnología de dicha Universidad, bajo la dirección del Dr. Luis E. Iglesias

# Agradecimientos

*Porque en la vida todo se construye en equipo y valoro mucho la importancia de ser agradecido, quiero agradecer especialmente a:*

*Mis padres Verónica y Gustavo, por no dejarme rendirme nunca y siempre impulsarme a dar lo mejor de mí y no conformarme fácilmente.*

*Luis, por darme esta oportunidad que pensaba ya no iba a tener, de volver a conectarme con el mundo académico y vivir la experiencia de hacer investigación.*

*Yami, por darme un espacio tanto en el laboratorio como en su corazón, por transmitirme como no logró nadie el valor del orden en el trabajo.*

*Toti, por hacerme siempre la segunda, darme consejos en momentos claves y ser esa compañía que se necesita en los días largos y arduos de mesada.*

*Romi, por darme esa serenidad y madurez clave cuando me sentía perdido o agobiado.*

*Adolfo, por ser un referente inigualable, siempre dispuesto a arremangarse y ayudar en lo que haga falta.*

*Ely, por su calidez y cariño permanente, por enseñarme tanto con tanta humildad.*

*Tefy, por su energía y creatividad que fueron como una bocanada de aire fresco.*

*Lauty, por esa sana rebeldía de cuestionar lo establecido y encontrar alternativas.*

*La Universidad Nacional de Quilmes y el CONICET, por darme el apoyo económico, el espacio y la libertad para desarrollarme y aprender de profesionales tan valiosos y a la vez cercanos.*

*Mis abuelas Heve y Olga y mis hermanas Pau y Flor, por estar siempre pendientes y preguntando como iba con la tesis, poniendo esa presión necesaria para avanzar.*

*Mis amigos de toda la vida, por interesarse y valorar mi trabajo, motivándome a seguir hasta el final cueste lo que cueste.*

*Bela, por su amor, compañerismo y aliento permanente, llegando a mi vida cuando más lo necesitaba, transitando juntos tantos cambios y desafíos.*

# Índice

|                                                                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Capítulo 1 – Introducción y objetivos</b>                                                                               | <b>9</b>  |
| 1.1. Biocatálisis y biotransformaciones                                                                                    | 10        |
| 1.2. Promiscuidad                                                                                                          | 16        |
| 1.2.1. Definiciones y tipos                                                                                                | 16        |
| 1.2.2. Hidrolasas como catalizadores promiscuos                                                                            | 18        |
| 1.3. Albúmina de suero bovino                                                                                              | 20        |
| 1.3.1. Estructura y generalidades                                                                                          | 20        |
| 1.3.2. BSA como catalizador promiscuo                                                                                      | 21        |
| 1.3.3. Ensayos de control en el estudio de reacciones promiscuas                                                           | 25        |
| 1.3.4. Optimización de condiciones de reacción de una biotransformación                                                    | 26        |
| 1.3.5. Mecanismo catalítico de la BSA                                                                                      | 28        |
| 1.4. Reacciones aldólicas                                                                                                  | 31        |
| 1.4.1. Generalidades                                                                                                       | 31        |
| 1.4.2. Antecedentes de reacciones aldólicas catalizadas por BSA                                                            | 34        |
| 1.5. Objetivos                                                                                                             | 36        |
| <b>Capítulo 2 - Condensación aldólica de aldehídos aromáticos y acetona catalizada por albúmina de suero bovino</b>        | <b>38</b> |
| 2.1. Introducción                                                                                                          | 39        |
| 2.2. Materiales y métodos                                                                                                  | 41        |
| 2.2.1. General                                                                                                             | 41        |
| 2.2.2. Condensación aldólica de <b>1a-f</b> catalizada por BSA                                                             | 42        |
| 2.2.3. Preparación de los productos <b>2d-f</b> y <b>3a-f</b> catalizada por BSA                                           | 42        |
| 2.2.5. Ensayos de hidratación de <b>3d</b> y <b>3e</b> catalizada por BSA                                                  | 46        |
| 2.2.6. Ensayos de reutilización de BSA                                                                                     | 46        |
| 2.3. Resultados y discusión                                                                                                | 46        |
| 2.3.1. Ensayos de control                                                                                                  | 46        |
| 2.3.2. Optimización de parámetros de reacción para la condensación aldólica de acetona con benzaldehído catalizada por BSA | 47        |
| 2.3.3. Condensación aldólica catalizada por BSA de acetona con benzaldehídos sustituidos                                   | 50        |
| 2.3.4. Deshidratación catalizada por BSA                                                                                   | 53        |
| 2.3.5. Reutilización de la BSA                                                                                             | 54        |
| 2.3.6. Mecanismo de la condensación aldólica catalizada por BSA                                                            | 54        |

|                                                                                                               |                                                                                                                                                        |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.4.                                                                                                          | Conclusiones .....                                                                                                                                     | 56        |
| <b>Capítulo 3 - Extensión de la condensación aldólica cruzada catalizada por BSA a otras cetonas .....</b>    |                                                                                                                                                        | <b>58</b> |
| 3.1.                                                                                                          | Introducción .....                                                                                                                                     | 59        |
| 3.2.                                                                                                          | Materiales y métodos .....                                                                                                                             | 61        |
| 3.2.1.                                                                                                        | General.....                                                                                                                                           | 61        |
| 3.2.2.                                                                                                        | Procedimiento general para la condensación aldólica catalizada por BSA en escala analítica .....                                                       | 62        |
| 3.2.3.                                                                                                        | Procedimiento a escala preparativa para las condensaciones aldólicas biocatalizadas de butanona ( <b>1</b> ) y 3-pentanona ( <b>8</b> ).....           | 62        |
| 3.2.4.                                                                                                        | A partir de butanona y benzaldehído .....                                                                                                              | 63        |
| 3.2.5.                                                                                                        | A partir de 3-pentanona y benzaldehído .....                                                                                                           | 64        |
| 3.2.6.                                                                                                        | A partir de 3-pentanona y <i>p</i> -nitrobenzaldehído .....                                                                                            | 64        |
| 3.2.7.                                                                                                        | Procedimiento a escala preparativa para las condensaciones aldólicas biocatalizadas de ciclohexanona ( <b>14</b> ) y ciclopentanona ( <b>19</b> )..... | 65        |
| 3.2.8.                                                                                                        | A partir de ciclohexanona y benzaldehído.....                                                                                                          | 65        |
| 3.2.9.                                                                                                        | A partir de ciclohexanona y <i>p</i> -nitrobenzaldehído.....                                                                                           | 66        |
| 3.2.10.                                                                                                       | A partir de ciclopentanona y benzaldehído .....                                                                                                        | 66        |
| 3.2.11.                                                                                                       | A partir de ciclopentanona y <i>p</i> -nitrobenzaldehído .....                                                                                         | 66        |
| 3.2.12.                                                                                                       | Cinética de la condensación catalizada por BSA de ciclohexanona y <i>p</i> -nitrobenzaldehído ...                                                      | 67        |
| 3.3.                                                                                                          | Resultados y discusión .....                                                                                                                           | 68        |
| 3.3.1.                                                                                                        | Condensación aldólica cruzada de butanona ( <b>1</b> ) catalizada por BSA .....                                                                        | 68        |
| 3.3.2.                                                                                                        | Condensación aldólica cruzada de ciclohexanona ( <b>19</b> ) catalizada por BSA.....                                                                   | 73        |
| 3.3.3.                                                                                                        | Condensación aldólica catalizada por BSA de ciclopentanona ( <b>14</b> ) y 3-pentanona ( <b>8</b> ).....                                               | 75        |
| 3.3.4.                                                                                                        | Cinética de la condensación aldólica catalizada por BSA de ciclohexanona con <i>p</i> -nitrobenzaldehído.....                                          | 79        |
| 3.4.                                                                                                          | Conclusiones .....                                                                                                                                     | 83        |
| <b>Capítulo 4 - Ensayos de ciclación aldólica intramolecular catalizada por albúmina de suero bovino ....</b> |                                                                                                                                                        | <b>84</b> |
| 4.1.                                                                                                          | Introducción.....                                                                                                                                      | 85        |
| 4.2.                                                                                                          | Materiales y métodos .....                                                                                                                             | 87        |
| 4.2.1.                                                                                                        | General.....                                                                                                                                           | 87        |
| 4.2.2.                                                                                                        | Ensayos cualitativos con 2-acetilbenzaldehído, 1,2-diacetilbenzaldehído y 2,5-hexanodiona .....                                                        | 88        |
| 4.2.3.                                                                                                        | Ensayo de adición aldólica de 2-acetilbenzaldehído con BSA en escala preparativa .....                                                                 | 88        |
| 4.2.4.                                                                                                        | Análisis por MALDI-MS de adición aldólica de 2-acetilbenzaldehído con BSA .....                                                                        | 89        |



|        |                                                                                                   |            |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.   | Resultados y discusión .....                                                                      | 89         |
| 4.3.1. | Ensayos de ciclación aldólica intramolecular biocatalizada de los sustratos <b>1, 2 y 7</b> ..... | 89         |
| 4.3.2. | Análisis por MALDI-TOF de BSA ligada a 2-acetilbenzaldehído .....                                 | 93         |
| 4.4.   | Conclusiones .....                                                                                | 97         |
|        | Referencias.....                                                                                  | 99         |
|        | <b>Conclusiones</b> .....                                                                         | <b>111</b> |

# Capítulo 1

## Introducción y objetivos

## 1.1. Biocatálisis y biotransformaciones

Las **biotransformaciones** son procesos en los que se utilizan sistemas biológicos con el fin de lograr cambios químicos sobre sustratos no naturales; la **biocatálisis** es la utilización de enzimas o células, libres o inmovilizadas, para catalizar la transformación de compuestos orgánicos. La utilización comercial de extractos o preparaciones de enzimas comenzó entre fines del siglo XIX y principios del XX, en aplicaciones relativamente sencillas como la fabricación de productos alimenticios o para facilitar el lavado de ropas. Con el paso de los años, se fueron expandiendo sus aplicaciones hasta ser incluidas de forma cada vez más frecuente en la síntesis orgánica de moléculas complejas, como las utilizadas en la industria farmacéutica o agroquímica.

Actualmente se utilizan biocatalizadores para catalizar reacciones tan diversas como las siguientes, a modo de panorama general:

- hidrólisis-síntesis de ésteres, amidas, lactonas, anhídridos, epóxidos y nitrilos;
- oxidación-reducción de alcanos, alquenos, compuestos aromáticos, alcoholes, aldehídos y cetonas, sulfuros y sulfóxidos;
- adición-eliminación de agua, amoníaco, ácido cianhídrico;
- halogenaciones y deshalogenaciones, alquilaciones y desalquilaciones, isomerizaciones, etc.

Debido al elevado número de enzimas presentes en la naturaleza, la Unión Internacional de Bioquímica (IUB) estableció una Comisión de Enzimas (EC) a cargo de desarrollar una nomenclatura para clasificar las enzimas. El nombre dado a cada enzima se reconoce por un código numérico que comienza por las letras EC, seguido de cuatro números separados por puntos. El primer número señala el tipo de reacción que cataliza la enzima, el segundo denota el subtipo, indicando el tipo de sustrato o molécula que es transferida, el tercero marca la naturaleza del cosustrato y el cuarto es un número individual establecido para cada enzima.

De esta forma, según las propiedades de las reacciones catalizadas por enzimas, el sistema numérico de la Comisión de Enzimas (EC) dividió las enzimas en 6 clases principales en 1961 (Tabla 1): Óxidoreductasas (EC1), transferasas (EC2), hidrolasas (EC3), liasas (EC4), isomerasas (EC5) y ligasas (EC6). Estas seis categorías no cambiaron durante muchos años hasta que se agregó una nueva clase, las translocasas (EC7), en agosto de 2018. Pese a que la predicción de clases de enzimas es un tema muy importante, aún existe un importante número de enzimas cuya función o clasificación se desconoce.

**Tabla 1.** Clasificación de las enzimas según la Unión Internacional de Bioquímica

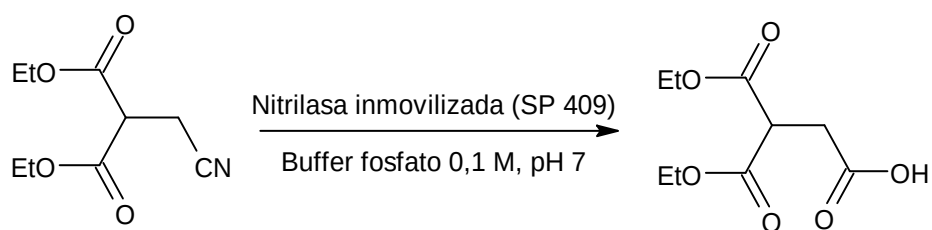
| Clase de enzima       | Tipo de reacción                                                                         |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Óxidoreductasas (EC1) | Oxidación-reducción de grupos CH-CH, CH-OH, CH-NH, C=O                                   |
| Transferasas (EC2)    | Transferencia de grupos: acilo, cetónico, aldehídico, fosforilo, metilo                  |
| Hidrolasas (EC3)      | Hidrólisis y síntesis de ésteres, anhídridos y amidas, hidrólisis de nitrilos y epóxidos |
| Liasas (EC4)          | Adición y eliminación de moléculas pequeñas sobre uniones C=C, C=N, C=O y C=P            |
| Isomerasas (EC5)      | Isomerizaciones, como racemización y epimerización                                       |
| Ligasas (EC6)         | Formación y ruptura de uniones C-O, C-S, C-N y C-C, acompañada de ruptura de trifosfato  |
| Translocasas (EC7)    | Translocación de H, aminoácidos, cationes y aniones                                      |

Por otra parte, además de las enzimas, y de central importancia para este trabajo de tesis, existen proteínas que *in vivo* no tienen función catalítica pero que pueden presentar actividad catalítica *in vitro*.

### 1.1.1. Ventajas y desventajas de las reacciones biocatalizadas

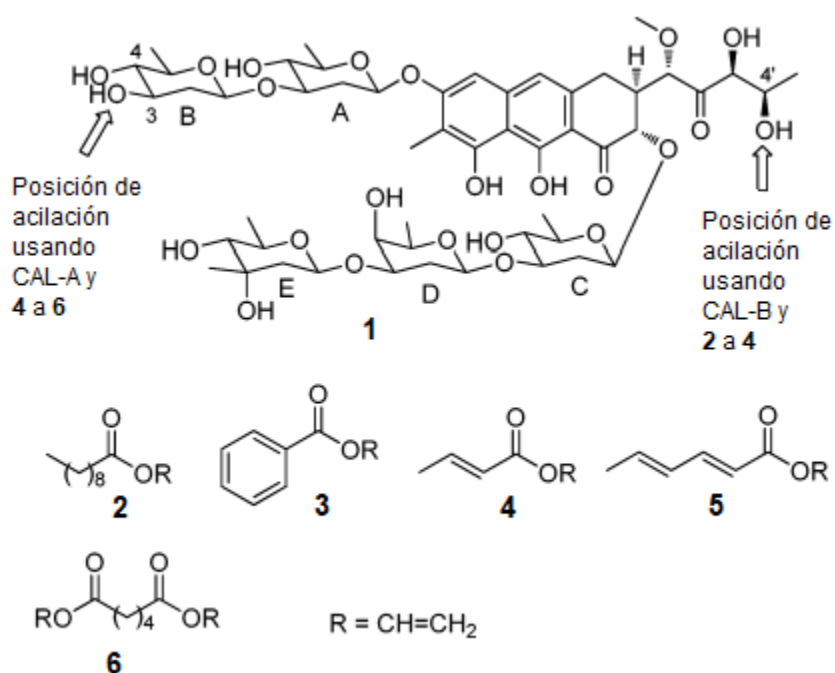
Las principales ventajas de las reacciones biocatalizadas se indican a continuación:

- Las enzimas son catalizadores muy eficientes; en algunos casos, una reacción catalizada por una enzima puede alcanzar una velocidad hasta  $10^{17}$  mayor que la de la reacción sin catálisis enzimática.
- Poseen propiedades notables en cuanto a la selectividad, agrupadas en 3 tipos:
  - **Quimioselectividad:** pueden reconocer entre distintos grupos funcionales de reactividad similar presentes en una misma molécula (Figura 1).



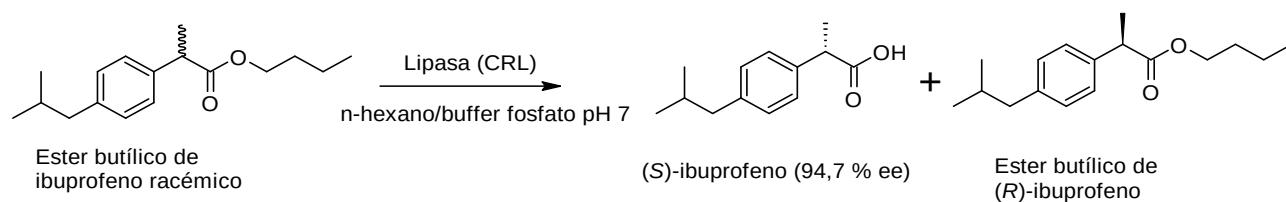
**Figura 1.** Hidrólisis quimioselectiva de nitrilos catalizada por nitrilasa inmovilizada a temperatura ambiente (De Raadt *et al.*, 1992).

- **Regioselectividad:** pueden distinguir grupos funcionales idénticos ubicados en sitios distintos de una molécula (Figura 2).



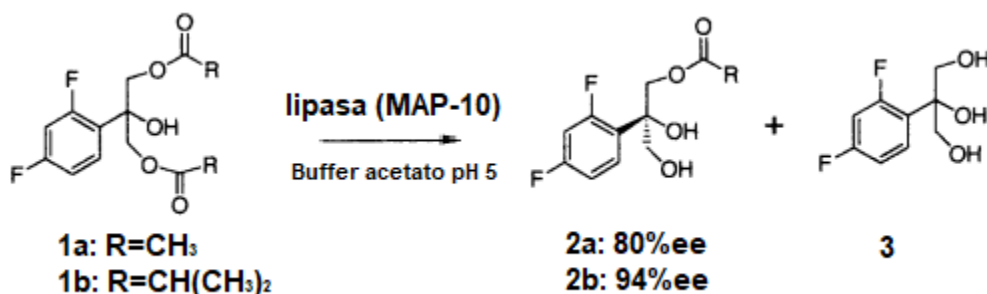
**Figura 2.** Acilación regioselectiva de mitramicina (1) con los ésteres 2-6, empleando las lipasas A y B de *Candida antártica* (CAL-A y CAL-B, respectivamente) a 45 °C (Sabín *et al.*, 2011).

- **Estereoselectividad:** al tratarse de catalizadores quirales, pueden reconocer entre dos enantiómeros, dando velocidades distintas de reacción para cada uno. Esto se debe que los estados de transición del complejo sustrato-enzima tienen distintas energías para cada enantiómero. En este caso, hablamos de **enantioselectividad**, que se caracteriza por elevados excesos enantioméricos (ee), como ilustra el ejemplo de la Figura 3.



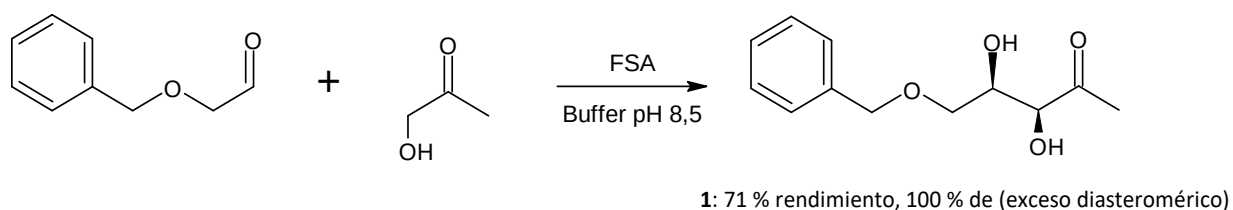
**Figura 3.** Hidrólisis enantioselectiva del éster butílico de ibuprofeno catalizada por lipasa de *Candida rugosa* en n-hexano:buffer fosfato pH 7 (1:1) a 40°C (Yousefi *et al.*, 2014)

De igual manera, en el caso de compuestos proquirales, se podrá obtener mayoritariamente uno de los productos quirales posibles. Esto es difícil de lograr con catalizadores tradicionales, como se muestra en el ejemplo de la Figura 4.



**Figura 4.** Hidrólisis enantioselectiva de **1a-b** catalizada por lipasa de *Mucorjavanicus* (MAP-10) a 30°C (Yasohara *et al.*, 2001).

- Las enzimas también son capaces de reconocer entre diastéromeros, dando lugar a reacciones diastereoselectivas que tampoco son fáciles de lograr con catalizadores químicos convencionales, como se aprecia en el ejemplo de la Figura 5.



**Figura 5.** Obtención diastereoselectiva de un producto de adición aldólica (**1**) mediante la catálisis de fructosa 6-fosfato aldolasa (FSA) (Concia *et al.*, 2009)

- A diferencia de los catalizadores tradicionales, tanto las proteínas aisladas como las células enteras son **biodegradables**, por lo que no producen impacto ambiental considerable.

- Los biocatalizadores suelen trabajar en **condiciones suaves de reacción**, a pH neutro o cercano al neutro y a temperaturas cercanas a la ambiental. Junto con la selectividad enzimática esta propiedad es fundamental en síntesis orgánica, ya que previene reacciones secundarias no deseadas que pueden ocurrir en medios netamente ácidos o básicos, tales como isomerización, racemización o deshidratación. Esto aumenta la eficiencia global del proceso y disminuye aún más el impacto ambiental.
- Dado que distintos biocatalizadores suelen ser compatibles, estos pueden combinarse y lograr así reacciones complejas en pasos consecutivos, en un mismo recipiente (*one-pot*), en procesos denominados cascadas enzimáticas. Esto permite evitar pasos de purificación intermedia, que encarecen y disminuyen la compatibilidad ambiental del proceso.
- Como podrá apreciarse en este trabajo de tesis, los biocatalizadores no están limitados a su rol natural, pudiendo catalizar un amplio espectro de reacciones y aceptando sustratos no naturales.
- Los biocatalizadores pueden catalizar reacciones en solventes orgánicos de polaridades tanto bajas como altas, lo que permite expandir su utilización a sustratos que no son solubles en agua y a reacciones que son incompatibles o se desfavorecen en agua, como la síntesis de ésteres.

En cuanto a las desventajas de los procesos biocatalizados, cabe señalar las siguientes:

- Los biocatalizadores naturales se encuentran en una única forma enantiomérica, por lo que la quiralidad de la reacción que catalice será única para un sustrato determinado. Para lograr la quiralidad inversa deberán realizarse modificaciones a la enzima o encontrar otro biocatalizador. Gracias a los avances recientes en biología molecular e ingeniería genética, se incrementa la versatilidad de las enzimas, y de esta forma, se puede obtener la quiralidad deseada.
- Los parámetros de reacción para la mayoría de los biocatalizadores suelen tener límites estrechos, por lo que de ser necesario realizar cambios para mejorar el rendimiento, solo podrá utilizarse un determinado rango de pH o temperatura. Por fuera de esos límites se puede inactivar la enzima. Nuevamente, los progresos obtenidos en biología molecular y evolución dirigida de enzimas están logrando catalizadores más versátiles.
- Los biocatalizadores naturales expresan su máxima actividad catalítica en medios acuosos, que no son los ideales para reacciones orgánicas, tanto por la baja solubilidad acuosa de muchos compuestos orgánicos como por el hecho ya mencionado de que numerosas reacciones

orgánicas no son compatibles con un medio acuoso. El remplazo de agua por solventes orgánicos permite trabajar en estos casos, pero sacrificando capacidad catalítica.

- Los biocatalizadores son susceptibles al fenómeno de inhibición por sustrato o producto. Esto debe sortearse utilizando cantidades bajas de sustrato o removiendo productos, lo cual puede complicar el proceso.

A la hora de definir si es más conveniente trabajar con células enteras o enzimas aisladas deben considerarse diversos factores como el tipo de reacción, la necesidad de utilizar cofactores y si estos deben reciclarse, así como la escala en la cual se desarrollará la biotransformación. Ambas opciones tienen ventajas y desventajas entre las que se encuentran:

- El empleo de enzimas aisladas implica una metodología experimental más simple, porque evita el cultivo de microorganismos y permite una recuperación más sencilla del producto y el biocatalizador; además, otorga una productividad más elevada al permitir utilizar una mayor concentración de sustrato. No obstante, en procesos como los que se basan en óxidorreductasas es necesario reciclar el cofactor utilizado en la reacción. En estos casos, el empleo de células enteras, cuya maquinaria es capaz de efectuar el reciclado, suele ser una elección ventajosa.
- Una alternativa para facilitar la recuperación y la reutilización de las proteínas catalíticas es la inmovilización del biocatalizador. La inmovilización de una proteína catalítica consiste en la utilización de un proceso tras el cual se confina dicha proteína a un sitio definido. La inmovilización puede ser por retención química: adsorción y unión covalente; o retención física: inmovilización por atrapamiento o microencapsulación. Como desventaja de este proceso se debe mencionar que durante la inmovilización puede alterarse la conformación natural de la proteína, llevando a una disminución en la actividad enzimática.
- Si se utilizan células enteras la eficiencia puede disminuir por problemas de difusión o de concentración de sustrato y es esperable que debido al metabolismo celular ocurran reacciones secundarias, lo que no ocurre al usar enzimas aisladas.
- Además de las enzimas, las células enteras también pueden inmovilizarse, lo que permite reutilizar el biocatalizador, pero también puede disminuir la actividad debido al proceso de inmovilización.



## 1.2. Promiscuidad

### 1.2.1. Definiciones y tipos

En el presente trabajo se pondrá de relieve una propiedad de las proteínas que se conoce con el nombre de **promiscuidad**. Aunque hasta el presente ha sido estudiada desde numerosas perspectivas y es un fenómeno que dista mucho de ser algo poco común, extendido ampliamente en las proteínas (Khersonsky y Tawfik, 2010), su definición sigue siendo objeto de discusión (Copley, 2015). Según el enfoque, la palabra promiscuidad puede describir distintos fenómenos y a continuación se presentará este término desde distintos enfoques.

Desde un punto de vista **bioquímico**, la promiscuidad se asocia con la amplitud de interacciones que puede presentar una proteína, a menudo no relevantes a nivel fisiológico o bioquímico (Copley, 2003). También se asocia con las proteínas que cumplen más de una función fisiológica, con frecuencia reguladora y estructural en vez de enzimática (Copley, 2017). Un ejemplo es la proteína Clf1p de *S. cerevisiae*, que participa en el empalme del pre-ARNm y para la cual se informó su rol en el inicio de la replicación del ADN (Zhu *et al.*, 2002). No obstante, para las proteínas con más de una función fisiológica actualmente existe la tendencia a denominarlas proteínas *moonlighting*, separándolas del concepto de promiscuidad (Copley, 2017).

El punto de vista **enzimático** es el enfoque de la promiscuidad más utilizado en biocatálisis y biotransformaciones. En una primera aproximación, se puede entender por **promiscuidad enzimática** tanto la capacidad de una enzima de catalizar reacciones de distinta base química como de aceptar sustratos de una amplia diversidad estructural (Hult y Berglund, 2007). En particular, la **promiscuidad catalítica** se define como la capacidad de un sitio activo de catalizar reacciones químicas distintas a las que ocurren en entornos fisiológicos, con mecanismos y estados de transición diferentes (Babtie *et al.*, 2010; Humble y Berglund, 2011; Copley, 2017). La promiscuidad catalítica de una enzima se asocia entonces con la catálisis de una reacción secundaria en el mismo sitio activo donde ocurre la actividad primaria (Kazlauskas, 2005).

Es importante diferenciar a la **promiscuidad catalítica** de la **promiscuidad de sustrato** (Bornscheuer y Kazlauskas, 2004; Hult y Berglund, 2007), que es simplemente la amplitud en la especificidad de sustrato, sin mayores diferencias en cuanto al mecanismo de reacción. Un ejemplo típico de enzimas que presentan promiscuidad de sustrato son las lipasas, que *in vivo* catalizan la hidrólisis de triglicéridos, mientras que *in vitro* hidrolizan ésteres de una enorme diversidad estructural. No obstante, cabe

destacar que existen numerosas enzimas que, para cumplir su rol biológico, durante la evolución adquirieron una gran versatilidad en términos de reconocimiento de sustratos; por ejemplo, las monooxigenasas de citocromo P450, que oxidan sustratos muy diversos estructuralmente. En la actualidad, en enzimas con amplia tolerancia estructural de sustratos biológicamente relevantes se prefiere hablar de **multiplicidad de sustrato** para referirse a esta propiedad, en lugar de emplear el término promiscuidad (Copley, 2017). Por otra parte, cabe señalar que también existe el término **promiscuidad de condiciones de reacción**, referido a la capacidad de una enzima de ser catalíticamente activa en condiciones de reacción diferentes a las fisiológicas, tales como medios no acuosos (solventes orgánicos, líquidos iónicos, solventes eutécticos profundos (DES)) o temperaturas altas.

La promiscuidad catalítica se ha relacionado con la evolución de las proteínas. Desde el punto de vista **evolutivo**, Khersonsky y Tawfik (2010) definen la promiscuidad catalítica como la capacidad de una enzima para catalizar una reacción diferente a aquella para la cual evolucionó la proteína; la promiscuidad parece funcionar como un reservorio de diversas capacidades catalíticas (Danchin, 2009). Se considera que las primeras enzimas eran de alta promiscuidad y que la evolución operó sobre ellas a nivel molecular, diversificando y produciendo las nuevas familias y superfamilias de enzimas que se conocen en la actualidad (Elias y Tawfik, 2012). La conservación de características estructurales y catalíticas observadas en superfamilias como la de las enolasas (Babbitt *et al.*, 1996) sugieren que la especialización enzimática surgió por vías evolutivas divergentes (duplicación genética y mutaciones subsiguientes), dirigidas por presión selectiva ambiental a partir de enzimas precursoras promiscuas. Basándose en los mecanismos de la evolución natural de las enzimas, han surgido trabajos de investigación que específicamente buscan promiscuidades catalíticas como punto de partida para luego aplicar métodos de evolución dirigida y obtener nuevas capacidades catalíticas (Copley, 2003; Bornscheuer y Kazlauskas, 2004; Yoshikuni *et al.*, 2006). De esta forma, las aplicaciones de promiscuidad enzimática en el campo de la biotecnología han motivado aplicaciones de ingeniería genética como la mutación y evolución dirigidas, con el fin de potenciar actividades catalíticas latentes en enzimas existentes (Kazlauskas, 2005).

Se han identificado estructuras a nivel molecular que se relacionan con la promiscuidad catalítica. Por ejemplo, los bolsillos o cavidades hidrofóbicas con alguna característica estructural inusual suelen dar interacciones promiscuas (Copley, 2003). De la misma manera, se han encontrado promiscuidades en regiones desordenadas de las proteínas (Kim *et al.*, 2008; Tyagi *et al.*, 2009) y en regiones conservadas del sitio activo (Anandarajah *et al.*, 2000). Como regla general, las actividades promiscuas son más lentas

que las canónicas, pero se han encontrado ejemplos donde la actividad promiscua supera la canónica (Khersonsky *et al.*, 2006).

El potencial sintético de las biotransformaciones ha aumentado notablemente gracias al descubrimiento de la promiscuidad catalítica de las enzimas. La utilidad sintética de la promiscuidad se demuestra con los ejemplos publicados durante la última década, mayormente utilizando hidrolasas (Guan *et al.*, 2015; López-Iglesias y Gotor-Fernández, 2015; Miao *et al.*, 2015; Dwivedee *et al.*, 2018). Como se comentó anteriormente, la promiscuidad no se restringe a las enzimas, sino que es una propiedad general de las proteínas que no se limita a meras excepciones (Babtie *et al.*, 2010; Tawfik, 2010). A partir de esta propiedad surgen nuevas aplicaciones sintéticas de proteínas que no son enzimas y cuyo rol *in vivo* no es la catálisis, tal como se presentará en esta tesis. Debido a esto, en este trabajo no utilizaremos el término promiscuidad enzimática y emplearemos el término promiscuidad de modo general.

### 1.2.2. Hidrolasas como catalizadores promiscuos

Es conocido que las **lipasas** son un grupo de enzimas muy versátiles y que en medio orgánico catalizan reacciones como la aminólisis o la esterificación, distintas a las de su función *in vivo*, la catálisis de reacciones de hidrólisis de lípidos. Sin embargo, las reacciones nombradas comparten un mismo mecanismo de reacción, sustitución nucleofílica, y transcurren mediante estados de transición similares; por ende, tal como se discutió en la sección anterior, se trata más bien de casos de promiscuidad de sustrato y de medio de reacción, pero no de promiscuidad catalítica propiamente dicha. En el año 2003 se publicó la autoadición aldólica de los aldehídos propanal y hexanal catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B), trabajo que presentaba una reacción muy novedosa para una lipasa y que luego se convirtió en referencia para el área de la promiscuidad catalítica (Branneby *et al.*, 2003). El aporte de este trabajo reside en que se trata de una adición nucleofílica que conduce a la formación de un nuevo enlace C-C, que es de vital importancia en la química orgánica ya que permite generar o extender esqueletos hidrocarbonados de moléculas. En los años posteriores a este trabajo se han informado actividades promiscuas de diversos biocatalizadores, principalmente lipasas, proteasas y acilasas (Busto *et al.*, 2010, 2011) en reacciones de gran interés sintético.

Siguiendo con lipasas, distintas preparaciones comerciales de CAL-B también lograron catalizar la **adición de aminas** secundarias a acrilonitrilo (Torre *et al.*, 2004). En otro trabajo, se incrementó la especificidad de la CAL-B por diseño racional mediante la sustitución de un aminoácido (Ser105Ala) del sitio activo de la enzima (Svedendahl *et al.*, 2005). Esta lipasa mutante catalizó la **adición de Michael**

entre compuestos 1,3-dicarbonílicos y compuestos  $\alpha,\beta$ -insaturados más rápidamente que la versión *wild-type* de la enzima. Complementariamente, Strohmeier *et al.* (2009) catalizaron la adición de Michael de cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas de cadena corta y nitroalquenos monosustituídos a ésteres con hidrógeno  $\alpha$  ácido, mediante diversas lipasas inmovilizadas. También demostraron que la reacción fue catalizada enzimáticamente, ya que al desnaturalizar o inhibir la CAL-B la reacción no ocurrió. En otra aplicación de promiscuidad catalítica de lipasas, se logró catalizar la **reacción de Mannich** en medio de reacción acuoso y con una estrategia *one-pot*, es decir, en un mismo recipiente y sin necesidad de pasos de aislamiento intermedios (Li *et al.*, 2009). Estas reacciones promiscuas dieron los resultados más satisfactorios al utilizar la lipasa de *Mucor miehei* (MML) en acetona/agua 1:1 y se mostró que se requieren aldehídos aromáticos, siendo esta una de las primeras aplicaciones de promiscuidad enzimática en reacciones que involucran tres componentes. Otro ejemplo interesante a mencionar es el trabajo publicado por Wang *et al.* (2011), que presenta la obtención de 1,4-dihidropiridinas mediante la reacción tipo **Hantzsch** de tres componentes, catalizada por la lipasa CAL-B a partir de aldehídos, compuestos 1,3-dicarbonílicos y acetamida en solventes orgánicos (principalmente metilterbutiléter). Esta es la primera utilización de acetamida como fuente de amoníaco para una reacción biocatalizada tipo Hantzsch.

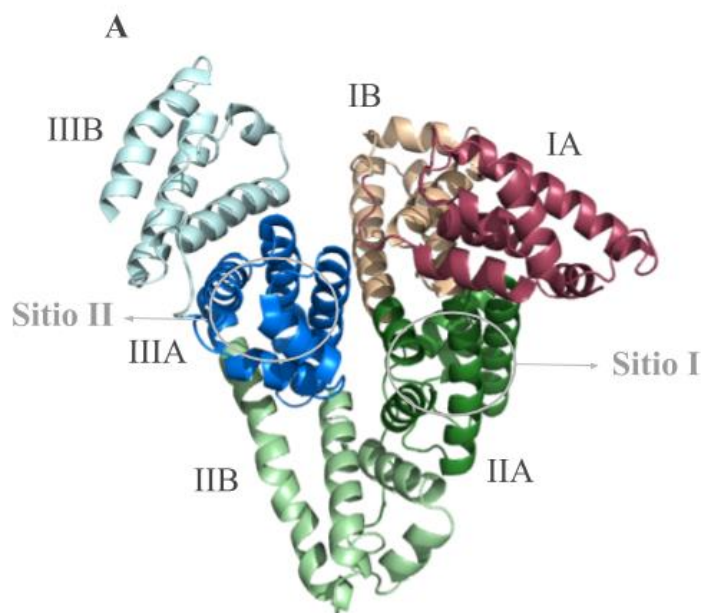
Diversas **proteasas** también mostraron actividad catalítica para reacciones aldólicas asimétricas. En particular, la pepsina catalizó con altos rendimientos la **adición aldólica** cruzada entre acetona y 4-nitrobenzaldehído, con enantioselectividad moderada (Li *et al.*, 2010). Esta reacción también fue probada con diversas lipasas, como la pancreática porcina y la lipasa de *Rhizomucor miehei* (Li *et al.*, 2008). Mediante experimentos de fluorescencia se determinó que a pH neutro la pepsina mantenía su conformación natural, que tiene una gran importancia en la promiscuidad de esta enzima. Otra enzima, la proteasa ácida de *Aspergillus usamii*, catalizó la reacción aldólica directa entre aldehídos aromáticos y cetonas cíclicas en acetonitrilo con agua (Xie *et al.*, 2012). Se alcanzaron enantioselectividades de hasta 88% y diastereoselectividades de hasta 97:3 (*anti/syn*).

Además del interés que presenta la promiscuidad catalítica desde el punto de vista del conocimiento de una enzima, es importante recordar que el uso de enzimas hidrolíticas para las reacciones descriptas en los ejemplos anteriores tiene como ventaja las condiciones de reacción suaves en que transcurre la catálisis, como también su accesibilidad comercial, precio acorde y técnicas sencillas de utilización, lo que simplifica su recuperación y reutilización.

## 1.3. Albúmina de suero bovino

### 1.3.1. Estructura y generalidades

Las albúminas séricas forman parte de una familia de proteínas que incluye la alfa-fetoproteína, la alfa-albúmina y la proteína de unión a vitamina D (Peters, 1995). Las albúminas son las proteínas de suero más abundantes presentes en mamíferos, tienen un peso molecular que ronda los 65 kDa y son solubles en agua. Son proteínas monoméricas y se componen de tres dominios alfa-helicoidales homólogos denominados I, II y III, los cuales, a su vez, se componen de dos subdominios: A y B (Figura 6). *In vivo* se encargan de transportar una amplia gama de compuestos hidrofóbicos, tanto endógenos como exógenos, utilizando sitios específicos de unión (Andersson y Eaker, 1971). Entre los compuestos que transportan cabe señalar ácidos grasos y hormonas, además de diversas drogas y minerales. Por otra parte, la alta solubilidad acuosa de las albúminas hace que tengan un importante papel en la regulación de la presión osmótica de la sangre.



**Figura 6.** Subdivisión de los dominios (I al III) y subdominios (A y B) de albúminas séricas, ejemplificado sobre la seroalbúmina humana (estructura cristalográfica, PDB ID 1AO6); también se muestran las ubicaciones aproximadas del sitio I y del sitio II de unión a drogas (Bhattacharya *et al.*, 2000).

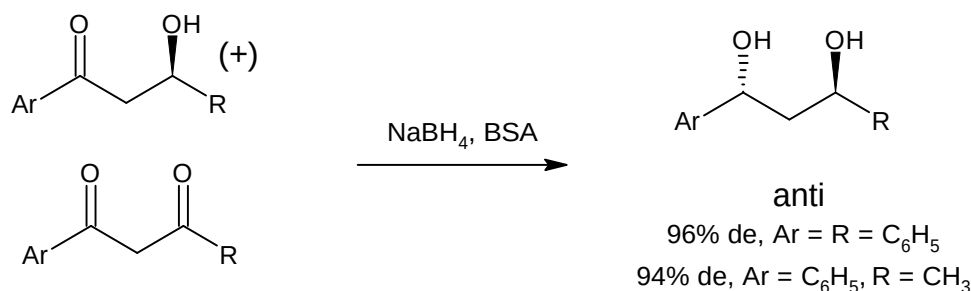
La seroalbúmina humana (HSA), una albúmina muy estudiada, tiene diversos sitios de unión claramente identificados para ácidos grasos no esterificados; por ejemplo cinco sitios de unión a ácido mirístico (Bhattacharya *et al.*, 2000). Uno de estos sitios se ubica en el subdominio IB; otros dos, en los subdominios IIB y IIIB, respectivamente; otro, entre los subdominios IA y IIA; y dos, en el subdominio IIIA. El estudio estructural por cristalización de otras albúminas séricas de mamíferos posibilitó la identificación de sitios de unión a drogas similares a los observados en la albúmina humana (Panjehshahin *et al.*, 1992; Ho *et al.*, 1993; Sułkowska, 2002). También se encontraron sitios de unión a ácidos grasos análogos a los observados en la albúmina humana (Spector *et al.*, 1969; Cistola *et al.*, 1987). Dentro de la familia de albúminas séricas de mamíferos se observa una notoria conservación estructural y secuencial, así como analogías en las cavidades y los sitios de unión (Velez Rueda, 2020). Las uniones específicas que presentan las albúminas son de gran interés en medicina, farmacia, bioquímica y de gran potencial en química orgánica, como podrá apreciarse en el presente trabajo.

A partir de la base de datos UniProtKB, la albúmina de suero bovino (BSA) tiene un peso molecular de 66.382 Da y está formada por una cadena de 607 aminoácidos, con un alto contenido en ácidos glutámico (58 residuos) y aspártico (41 residuos), lisina (60 residuos), cisteína (35 residuos) y arginina (26 residuos). Como se indicó anteriormente, posee una estructura predominantemente alfa-helicoidal y consta de tres dominios homólogos (I, II y III), que tienen a su vez dos subdominios (A y B). La BSA presenta 8 confórmeros en la base de datos de diversidad conformacional en el estado nativo de las proteínas (CoDNas), La predicción de cavidades hecha por el grupo de Bioinformática Estructural de la Universidad Nacional de Quilmes, a cargo del Dr. Gustavo Parisi, dio un total de 24 cavidades en promedio para los confórmeros mencionados (Velez Rueda, 2020).

### 1.3.2. BSA como catalizador promiscuo

La BSA ha sido ensayada como catalizador promiscuo en diferentes reacciones orgánicas tanto en medio acuoso como orgánico (Albanese y Gaggero, 2015). Como primer ejemplo se encuentra la **reducción** enantioselectiva de cetonas proquirales en buffer acuoso catalizada por BSA (Sugimoto *et al.*, 1978). A lo largo de los años posteriores y gracias a la variedad de transformaciones ensayadas, se fue consolidando la idea de que la albúmina es capaz de catalizar diversas reacciones orgánicas. La BSA y la HSA son catalizadores muy versátiles, que permiten abarcar reacciones de mecanismos muy diversos, desde reacciones de oxidación y reducción a condensaciones y cicloadiciones. Por ejemplo, los 1,3-dioles, compuestos naturales de alto valor como precursores sintéticos, pueden obtenerse por reducción con borohidruro de sodio de las dicetonas correspondientes o de  $\beta$ -hidroxicetonas en presencia de BSA

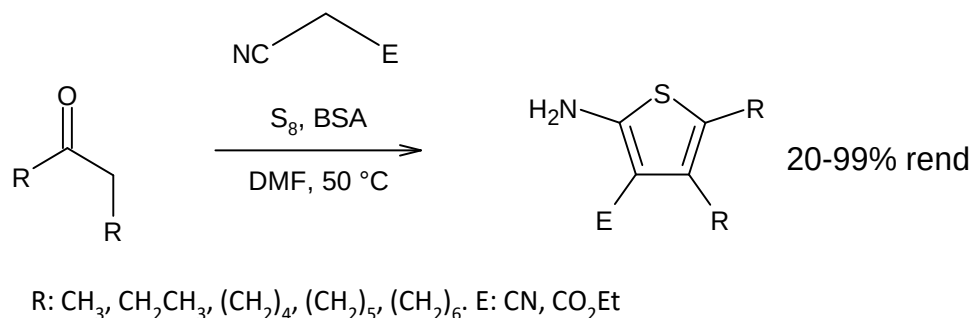
(Figura 7), con un exceso diastereomérico (de) de hasta 96 % para el diastereómero *anti* (Berti *et al.*, 2011).



**Figura 7.** Reducción de dicetonas o  $\beta$ -hidroxicetonas con NaBH<sub>4</sub> en presencia de cantidades estequiométricas de BSA.

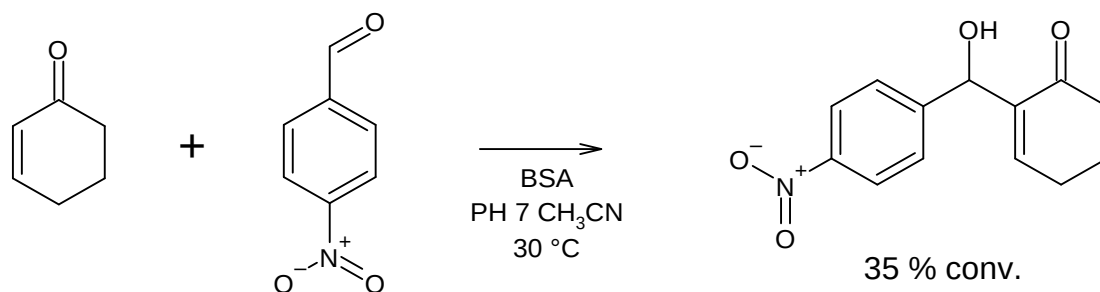
Uno de los usos promiscuos de la BSA más interesantes es imitar a las metaloenzimas (Li *et al.*, 2013), biocatalizadores muy eficientes y versátiles que permiten realizar transformaciones tal como la **oxidación** selectiva de hidrocarburos, promovida por el citocromo P-450 (Ortiz de Montellano, 2005). Esto es posible en parte debido a que la estructura de la albúmina incluye un sitio de unión lo suficientemente grande como para contener al sustrato y al catalizador metálico simultáneamente.

La **condensación de Gewald**, es el método más común para obtener 2-aminotiofenos sustituidos, que presentan actividades farmacológicas diversas y son de gran utilidad como precursores químicos. El primer protocolo biocatalítico para llevar a cabo la condensación de Gewald utilizó BSA (Figura 8, Zhao *et al.*, 2013).



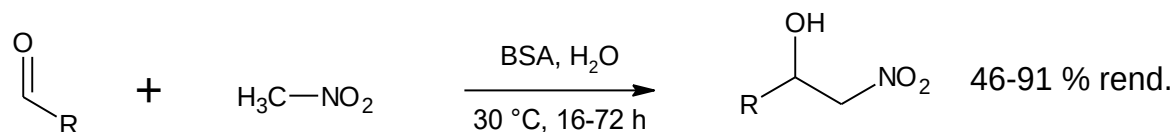
**Figura 8.** Reacción de condensación de Gewald catalizada por BSA.

La BSA también ha demostrado ser un catalizador apropiado para la reacción de **Morita-Baylis-Hillman** de 2-ciclohexen-1-ona y *p*-nitrobenzaldehído en buffer fosfato a pH 7,0 (Figura 9, Reetz *et al.*, 2007).



**Figura 9.** Reacción de Morita-Baylis-Hillman catalizada por BSA.

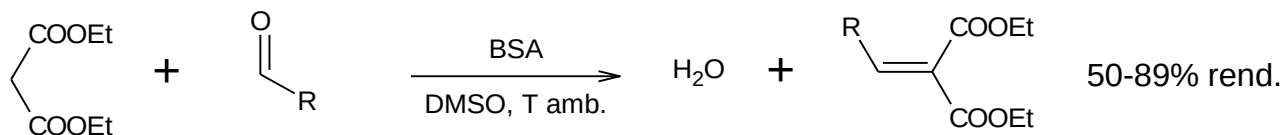
En otro trabajo se presenta un procedimiento para la síntesis de  $\beta$ -nitroalcoholes aromáticos y heteroaromáticos en medio acuoso, catalizada por BSA y vía la **reacción de Henry** (Figura 10, Busto *et al.*, 2011).



R: 4-NO<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 3-NO<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 4-CN-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 2-piridin, 3-piridin, 4-piridin,  
4-Br-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 4-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 2-naftalen, 1-naftalen.

**Figura 10.** Reacción de Henry catalizada por BSA en medio acuoso.

Se logró también catalizar mediante BSA (inmovilizada covalentemente en un polímero epoxi funcionalizado) la reacción de **condensación de Knoevenagel** entre malonato de dietilo y aldehídos alifáticos y aromáticos en DMSO a temperatura ambiente, obteniéndose altos rendimientos (Figura 11, Ramesh *et al.*, 2014).



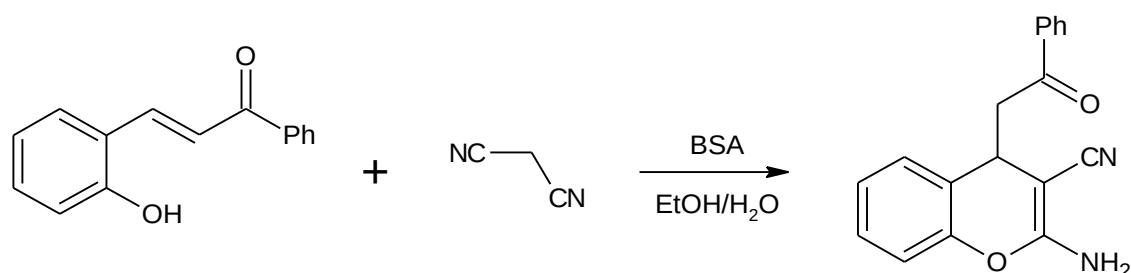
R: *i*-Bu, *i*-Pr. *n*-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>, *p*-F-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, *p*-MeO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 2-furil, 2-tienil, 3-Py

**Figura 11.** Reacción de condensación de Knoevenagel catalizada por BSA.

Los 2-amino-4*H*-cromenos son muy utilizados en cosmética, colorantes y como precursores de numerosos principios biológicamente activos. Habitualmente estos compuestos son sintetizados por reacciones multicomponentes, como la condensación de Knoevenagel de aldehídos salicílicos con

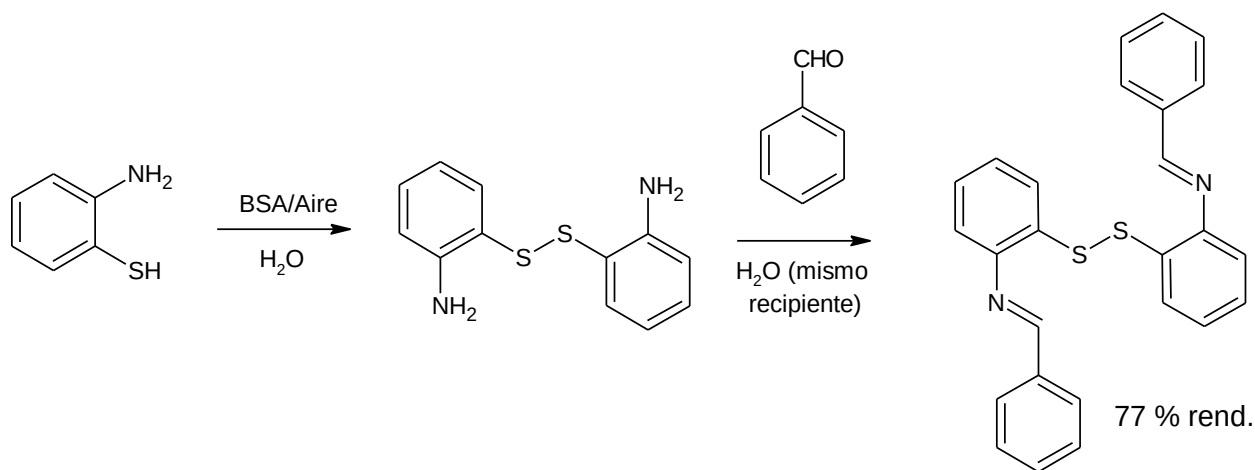


compuestos con metileno activo, seguida de un paso de ciclación intramolecular. Se suelen utilizar bases orgánicas, líquidos iónicos u organocatalizadores (Wang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012; Kulkarni *et al.*, 2013). En el trabajo de Li y coautores (2015) se presenta la obtención de 2-amino-4*H*-cromenos mediante una reacción en cascada catalizada por BSA en etanol (Figura 12). Dicho procedimiento consiste en una **adición de Michael** seguida por una **ciclación** intramolecular y da los productos deseados con un rendimiento de 31 – 96%. Como modelo de reacción para optimizar el método se usó la reacción de 3-(2-hidroxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona con malononitrilo (Figura 12).



**Figura 12.** Reacción en dominó catalizada por BSA para la obtención de 2-amino-4*H*-cromeno.

También se ha explorado la BSA en acoplamientos oxidativos de tioles (aromáticos, heterocíclicos y alifáticos) en agua, para la formación de disulfuros y sin utilizar complejos metálicos o no metálicos, bases o aditivos. Se ha descrito un procedimiento secuencial que incluye un acoplamiento oxidativo y una reacción de condensación partiendo de 2-aminotiofenol y benzaldehído (Figura 13, Saima *et al.*, 2015).



**Figura 13.** Procedimiento secuencial de acoplamiento oxidativo y posterior condensación partiendo de 2-aminotiofenol y benzaldehído.

Dicho procedimiento es el primer ejemplo de una **oxidación/condensación secuencial** catalizada por BSA en la cual se forma un enlace S-S y dos C-N, en un medio acuoso. Es de destacar que los procedimientos secuenciales, al utilizar un mismo medio de reacción y evitar pasos de purificación, permiten ahorrar energía y tiempo y reducir los residuos, en concordancia con los principios de la química verde.

La albúmina de suero bovino también puede discriminar entre enantiómeros de una molécula quiral y gracias a esto se ha usado como agente de resolución en su forma inmovilizada (Allenmark, 1983, 1986; Allenmark *et al.*, 1989). Los ejemplos mencionados en este apartado permiten apreciar la gran capacidad catalítica de la BSA, a pesar de su clasificación canónica como proteína no enzimática.

### 1.3.3. Ensayos de control en el estudio de reacciones promiscuas

Como en cualquier reacción biocatalizada, los ensayos de control son muy importantes para demostrar que la actividad catalítica promiscua efectivamente se debe al biocatalizador. Por una parte, se realiza un ensayo sin agregado de biocatalizador, habitual en biocatálisis, y que permite asegurar que la reacción estudiada no ocurre sin el biocatalizador. Por otra parte, en la mayoría de los ensayos de control realizados en el estudio de promiscuidad, se busca alterar el biocatalizador, sea con un agente desnaturalizante o un compuesto que bloquee específicamente el sitio catalítico. Con estos ensayos se intenta obtener información acerca de si la catálisis observada es específica o no.

En numerosos ensayos de control de las reacciones promiscuas de hidrolasas se usa la hidrolasa tratada previamente con urea; las condiciones de dicho tratamiento son variables: urea 8M en buffer fosfato pH 7,2 a 4 °C durante 24 h (Strohmeier *et al.*, 2009), urea a 100 °C durante 24 h (Wang *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2012) o 10 h (Li *et al.*, 2010), a 60 °C durante 12 h (Li *et al.*, 2009), etc. A modo de ejemplos representativos, la CAL-B tratada con urea a 4 °C durante 24 h condujo a un 1% de conversión a un producto de adición de Michael, mientras que con la CAL-B sin tratar se obtuvo un 91 % (Strohmeier *et al.*, 2009). Con la lipasa MML sin tratar se obtuvo un producto de Mannich con un rendimiento del 72%, a diferencia del 8% obtenido con la lipasa tratada a 60 °C durante 12 h (Li *et al.*, 2009); la proteasa ácida de *Aspergillus usamii* dio 63% de rendimiento de un producto de adición aldólica, del que solo se obtuvieron trazas cuando la proteasa se trató previamente con urea a 100 °C durante 24 h (Xie *et al.*, 2012).

En un trabajo que presenta la reducción con borohidruro de sodio de  $\beta$ -hidroxicetonas en presencia de BSA (Li *et al.*, 2013) se realizaron experimentos de control sin BSA, que dieron los correspondientes

dioles *anti* y *syn* en relaciones cercanas a 1:1. En otro trabajo, la síntesis catalizada por BSA de 2-amino-4H-cromenos (Li *et al.*, 2015) se realizaron diversos controles para demostrar la actividad catalítica de la BSA. En ausencia de proteína el producto se obtiene con un 4% de rendimiento, mientras que con BSA se obtiene con un 70% de rendimiento. El tratamiento con agua a 100 °C por 24 h disminuyó el rendimiento al 41%, mostrando que dicha temperatura causó algún grado de desnaturalización de la BSA, afectando su capacidad catalítica. En otro experimento se usó Cu<sup>+2</sup> como agente desnaturalizante, resultando en un rendimiento muy bajo (7%). La BSA también se trató con hidrocloreuro de guanidina obteniendo un rendimiento del 33% y con dodecilsulfato de sodio (SDS), del 28%. Todos estos tratamientos demuestran que la actividad catalítica más elevada la da la forma nativa de la proteína. Adicionalmente se utilizó BSA de otro proveedor, obteniéndose rendimientos similares: 87% para la de Sigma, 78% para la de J&K.

#### 1.3.4. Optimización de condiciones de reacción de una biotransformación

En una biotransformación, dados un biocatalizador y un sustrato determinados, el solvente de reacción es una variable experimental que juega un papel crucial en la transformación estudiada. Además, temperatura y cantidad de biocatalizador son variables que también influyen de modo importante sobre el rendimiento de la biotransformación. Teniendo en cuenta que en este trabajo se estudiarán reacciones catalizadas por seroalbúmina bovina (BSA), a continuación, se presenta una reseña de antecedentes sobre el efecto del solvente, de la cantidad de biocatalizador y de la temperatura sobre las biotransformaciones catalizadas por albúmina.

Gracias a un gran número de trabajos enfocados en comprender el comportamiento de los biocatalizadores en **solventes orgánicos**, se demostró que los solventes polares son los más desnaturalizantes, ya que las enzimas precisan una cantidad mínima de agua para poder alcanzar la conformación adecuada y los solventes polares captan esa cantidad de agua, denominada agua esencial. Las enzimas resultan ser catalíticamente activas en solventes no polares o poco polares, como hexano, acetato de etilo y solventes clorados (Carrea y Riva, 2000). Sin embargo, las albúminas toleran incluso solventes polares miscibles con agua. Algunos ejemplos son: etanol al 100% (en la reacción de Biginelli catalizada por BSA entre diversos aldehídos, cetonas y amidas para obtener 3,4-dihidropirimidin-2-(1H)-onas) (Sharma *et al.*, 2012), *N,N*-dimetilformamida (DMF) al 100 % (en la síntesis de 2-aminotiofenos via reacción de Gewald catalizada por BSA, entre diversas cetonas o aldehídos, nitrilos activados y azufre elemental) (Zhao *et al.*, 2013); acetonitrilo al 10% en agua (en la reducción estereoselectiva de 1,3-dicetonas y  $\beta$ -hidroxicetonas a dioles *anti* catalizada por BSA) (Berti *et al.*, 2011) y dimetilsulfóxido

(DMSO) al 100% (en la condensación de Knoevenagel de dietilmalonato y diversos aldehídos catalizada por BSA inmovilizada) (Ramesh *et al.*, 2014). En la reacción en cascada para la síntesis de 2-amino-4H-cromenos catalizada por BSA a partir de 2-hidroxichalconas y malonitrilo, los solventes próticos o muy polares (etanol, metanol, isopropanol, DMSO, DMF y MeCN) brindan rendimientos más elevados (70-85%) que los de baja polaridad (THF, cloroformo, 1,4-dioxano) (Li *et al.*, 2015). Los autores sugieren que la dispersión de la BSA y la solubilidad de los sustratos pueden explicar la diferencia en los rendimientos. Como las enzimas requieren una cantidad mínima de agua para ser catalíticamente activas, la cantidad de agua en un solvente orgánico afecta la actividad enzimática. A su vez, la cantidad de agua requerida varía según el solvente orgánico (Wang *et al.*, 2011); por otra parte, la cantidad de agua puede afectar la solubilidad de los sustratos, por lo cual la proporción de agua en el solvente de reacción también es una variable a estudiar. En el caso de Li *et al.* no se observó diferencia apreciable de rendimiento al utilizar etanol absoluto o una mezcla con un 10% de agua. Contrariamente, el rendimiento decayó pronunciadamente al aumentar la proporción de agua, probablemente debido a la disminución en la solubilidad de los compuestos.

Sin embargo, Dalal y coautores (2016) estudiaron solventes de diferentes polaridades, en un modelo de reacción de formación de dihidropirano[2,3-c]pirazoles, aplicando catálisis de BSA. Al utilizar agua se obtuvo un 39% de rendimiento, mientras que con otros solventes tales como etanol, metanol, acetonitrilo, THF y DMF solo se lograron rendimientos en el orden de trazas. Sin embargo, observaron que la combinación de agua y etanol en diferentes proporciones incrementó el rendimiento de la reacción. Al revés que lo observado por Li *et al.*, el mejor resultado (94 %) se obtuvo utilizando una mezcla de agua/etanol 7:3, una elevada proporción de agua. Estos dos ejemplos muestran que la predicción del solvente o mezcla de solventes más satisfactorio es muy limitada, ya que depende no solo del biocatalizador, sino también de la reacción y los sustratos de cada caso particular. Por lo tanto, en la práctica debe realizarse un *screening* de solventes, generalmente laborioso.

En cuanto a la **cantidad** de biocatalizador, los dos trabajos discutidos anteriormente son representativos del efecto de esta variable. Trabajando con 0,3 mmoles de 3-(2-hidroxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona y 0,9 mmoles de malononitrilo en etanol/agua 9:1, Li y coautores (2015) observaron un aumento de rendimiento (50-85%) al incrementar la masa de BSA de 10 a 30 mg, sin apreciar un mejor resultado con masas de 30 a 90 mg. Los autores plantean que esto se debe a que la BSA no está en solución, por lo que a mayor cantidad, menor dispersión de la proteína, reduciendo la eficiencia del biocatalizador. En cuanto a lo descrito por Dalal y coautores (2016), partiendo de 2 mmoles de sustrato un incremento de la masa de BSA desde 20 mg hasta 60 mg aumenta el rendimiento de formación de dihidropirano[2,3-

c]pirazoles, mientras que no se observa una mejora considerable en el rendimiento por encima de dicho valor. El rendimiento más satisfactorio en cuanto a conversión a producto y masa de biocatalizador empleado (94%) se obtiene con 60 mg de BSA.

Como en toda reacción, la **temperatura** es un factor importante a tener en cuenta ya que afecta el rendimiento. Un aumento en la temperatura puede acelerar la reacción, pero también puede conducir a productos indeseados que disminuyan el rendimiento del producto esperado y/o a la inactivación del biocatalizador. En el trabajo de Li y coautores (2015), el mejor rendimiento se obtuvo a 30°C. Por encima de dicho valor se observa una caída en la obtención del producto deseado y la aparición de subproductos. En el ya mencionado estudio de Dalal y colaboradores (2016), sobre la formación de dihidropirano[2,3-c]pirazoles, se trabajó a una temperatura entre 20 y 50 °C. Los resultados indican que el rendimiento aumenta notablemente al incrementar de 20 a 30 °C y alcanza un máximo de 94% a 40 °C y 1 hora de reacción. Un mayor incremento de la temperatura (50 °C) no modifica el rendimiento obtenido.

Con el fin de mejorar las perspectivas del uso comercial del biocatalizador, es crucial determinar su **reusabilidad**. Para ello, se debe evaluar el rendimiento obtenido en la mayor cantidad de reusos que se puedan realizar, o hasta alcanzar un rendimiento del 50% con respecto al obtenido en el primer uso. Por ejemplo, en el trabajo de Dalal y colaboradores (2016), se reutilizó la BSA tres veces, con un rendimiento del 94% para el primer uso y un 82% para la última reutilización. De similar manera, en el estudio de Saima *et al.* (2015) sobre acoplamiento oxidativo de tioles catalizado por BSA en agua a temperatura ambiente, luego de cuatro ciclos de uso el rendimiento solo cayó de 97 al 90% para el sustrato 4-metoxitiofenol. Por otra parte, en la condensación de Knoevenagel entre malonato de dietilo y aldehídos alifáticos y aromáticos, en DMSO a temperatura ambiente, utilizando como catalizador BSA inmovilizada covalentemente en un polímero epoxi funcionalizado, se pudo reciclar el catalizador por filtración cinco veces sin pérdida de rendimiento (Ramesh *et al.*, 2014). Si bien todos estos ejemplos muestran que la BSA admite su reuso, es difícil predecir el potencial de reutilización de un biocatalizador particular en una reacción y un medio determinados, por lo que se requiere realizar experimentos de reutilización para determinar la cantidad de reusos posibles del biocatalizador.

### 1.3.5. Mecanismo catalítico de la BSA

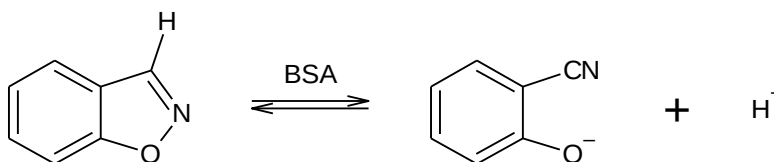
Diversos autores, cuyos trabajos tienen un enfoque más bien bioquímico, asocian la actividad catalítica de la BSA con el subdominio IIA de la proteína, donde en un bolsillo hidrofóbico existe un residuo de lisina anormalmente ácido, Lis-222 (en HSA, Lis-199), residuo al que se identifica con la actividad

catalítica (He y Carter, 1992; Kikuchi *et al.*, 1996; Hollfelder *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2013; Albanese y Gaggero, 2015). Al estudiar la unión de fluoresceína a BSA, Andersson *et al.* (1971) determinaron que este compuesto tiene tres sitios de unión a la proteína y propusieron que la unión de la fluoresceína a la BSA se debe principalmente a interacciones hidrofóbicas. Estudiando con mayor detalle estos sitios de unión, trataron BSA con isotiocianato de fluoresceína, un compuesto que reacciona con los grupos aminos de las cadenas laterales. Obtuvieron una cinética de reacción que indica la existencia de un grupo amino muy reactivo y otro de menor reactividad; el resto de los grupos aminos no reaccionaron o lo hicieron con una velocidad muy baja. Posteriormente digirieron con tripsina una muestra de BSA que había incorporado un mol de isotiocianato de fluoresceína y encontraron la marca del reactivo en un heptapéptido, unido a Lis-222. Este resultado sugiere entonces que la reacción con el isotiocianato de fluoresceína no ocurre inespecíficamente y que se da preferentemente con este residuo de lisina (Andersson *et al.*, 1971; Taylor, 1976; Kikuchi *et al.*, 1996; Hollfelder *et al.*, 2000). Al ensayar la reacción de isotiocianato de fluoresceína con diversos fragmentos peptídicos de BSA, estos autores encontraron que incluso pequeñas fragmentaciones causan una caída marcada de la capacidad de ligar fluoresceína, lo que sugiere que la conformación nativa de la BSA desempeña un papel clave.

A su vez, la reacción de **eliminación de Kemp** (Figura 14), típico ejemplo de una eliminación concertada (E2) iniciada por la abstracción de un protón del carbono pobre en electrones, se ha utilizado para demostrar la actividad catalítica tanto de anticuerpos generados a partir de haptenos catiónicos que imitan los estados de transición (Thorn *et al.*, 1995), como de la BSA (Hollfelder *et al.*, 1996; Kikuchi *et al.*, 1996), obteniéndose resultados similares en ambos casos. Hilbert y colaboradores (Hu *et al.*, 2004) llegan a la conclusión que la eficiencia de estos sistemas biológicos deriva de tener una base catalítica localizada en un sitio activo hidrofóbico y destacan que en el caso de los anticuerpos, esto se obtiene por diseño de haptenos, mientras que para las albúminas es el resultado del proceso evolutivo.

Por otra parte, en un estudio de la adición aldólica de acetona y 6-metoxi-2-naftaldehído catalizada por BSA en solución acuosa, la reacción sigue una cinética de Michaelis-Menten y dicha actividad se conserva en un polipéptido derivado de la secuencia del subdominio IIA de la albúmina (Benedetti *et al.*, 2011; Luisi *et al.*, 2013). Estos resultados también apoyan la idea de que la catálisis de BSA no es inespecífica o debida a impurezas de la albúmina comercial (Benedetti *et al.*, 2011; Albanese y Gaggero, 2015). Además, los resultados del estudio de la reacción retroaldólica de metodol (4-hidroxi-4-(6-metoxi-2-naftil)-2-butanona), realizado con dos preparaciones comerciales distintas de BSA, mostraron que ambas tenían actividad catalítica; en cambio, dicha actividad se eliminaba al acetilar la BSA, lo que refuerza la evidencia de que la actividad no se debe a un contaminante (Schmidt *et al.*, 2013).

En concordancia con las evidencias discutidas en las líneas anteriores, varios trabajos que describen aplicaciones biocatalíticas de BSA conjeturan posibles mecanismos para las reacciones estudiadas, basados en la idea de una lisina catalíticamente activa; no obstante, por lo general estos trabajos no especifican ninguna lisina en particular (Zhao *et al.*, 2013; Saima *et al.*, 2015; Dalal *et al.*, 2016).



**Figura 14.** Eliminación de Kemp catalizada por BSA

En cambio, en una aplicación de la BSA para la síntesis de  $\beta$ -nitroalcoholes aromáticos y heteroaromáticos en medio acuoso, basada en la reacción de Henry (Busto *et al.*, 2011), al llevar a cabo la reacción en presencia de BSA desnaturalizada los autores también encontraron conversión cuantitativa a producto, resultado que sugiere una catálisis inespecífica para esta reacción. Otros trabajos que informan aplicaciones biocatalíticas de BSA tampoco sugieren que la catálisis de esta proteína sea específica. Por ejemplo, en la reacción de Morita-Baylis-Hillman (Reetz *et al.*, 2007) los autores conjeturan que la actividad catalítica de BSA se puede deber a los distintos grupos nucleofílicos presentes en las cadenas laterales de la proteína, tanto residuos de lisina como de serina.

En otros trabajos, BSA es considerada directamente un catalizador inespecífico. Al ensayar lipasas como catalizadores promiscuos de la adición aldólica (Birolli *et al.*, 2017) y de la reacción de Knoevenagel (Li *et al.*, 2015), la BSA se incluyó dentro del *screening* de biocatalizadores empleados; en ambos casos los autores indicaron que fue tomada como ejemplo de catalizador inespecífico y como ensayo de control de las lipasas probadas.

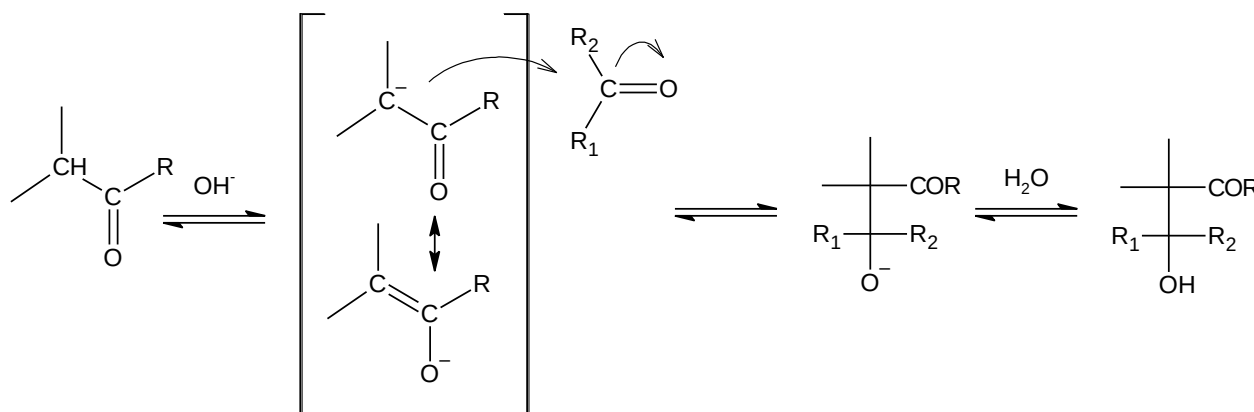
Si bien en los datos presentados hay evidencias que hablan a favor de un mecanismo catalítico que no es inespecífico, la bibliografía discutida muestra que no hay un consenso generalizado y que el mecanismo catalítico de la BSA sigue estando en discusión. En este sentido, al planear esta tesis también se tuvo en cuenta que el trabajo significara algún aporte a la comprensión del mecanismo.

## 1.4. Reacciones aldólicas

### 1.4.1. Generalidades

En la adición aldólica cruzada, el carbono  $\alpha$  del carbonilo de una molécula de aldehído o cetona se **adiciona** al carbono del carbonilo de otra (Figura 15). Habitualmente la reacción se lleva a cabo en medio básico y aunque la base más usada como catalizador es hidróxido, también pueden utilizarse bases más fuertes como *t*-butóxido (March, 1992).

El ion hidróxido no es una base lo suficientemente fuerte como para convertir la totalidad de un aldehído o cetona a su enolato correspondiente, sino que el equilibrio tiende marcadamente hacia la izquierda, tanto para aldehídos como cetonas (Figura 15). Sin embargo, se forma una cantidad suficiente de ion enolato como para que la reacción pueda continuar.

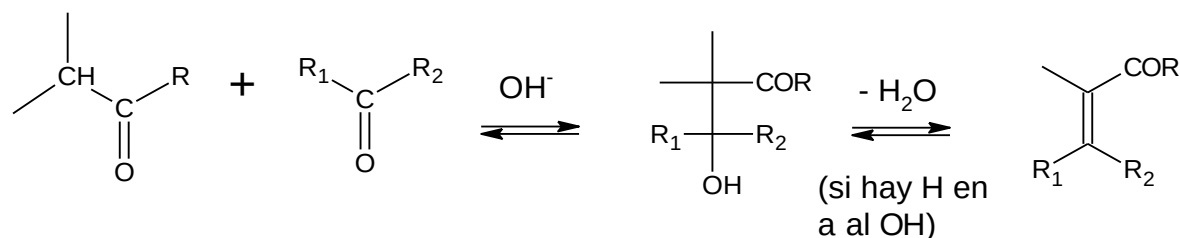


**Figura 15.** Mecanismo de una adición aldólica cruzada en medio básico

El producto de la **adición aldólica** es un β-hidroxi aldehído, también llamado *aldol*, o una β-hidroxicetona o *cetol*, que en algunos casos se deshidrata durante el curso de la reacción; en este caso, la reacción se denomina **condensación aldólica** y conduce a aldehídos/cetonas α,β-insaturados (Figura 16). Incluso si la deshidratación no fuera espontánea, puede realizarse de manera sencilla, dado que el nuevo doble enlace estará en conjugación con el carbonilo, lo que favorece termodinámicamente su formación. Debido a esto, las reacciones aldólicas permiten obtener tanto β-hidroxi aldehídos/cetonas como aldehídos/cetonas α,β-insaturados; las cetonas α,β-insaturadas, productos que aparecerán con frecuencia en este trabajo de tesis, también se denominan enonas. Incluyendo los pasos de deshidratación, la reacción completa (condensación aldólica) está en equilibrio, por lo que tanto los β-



hidroxi aldehídos/cetonas como los aldehídos/cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturados pueden escindirse por tratamiento con  $\text{OH}^-$  (reacción retroaldólica).

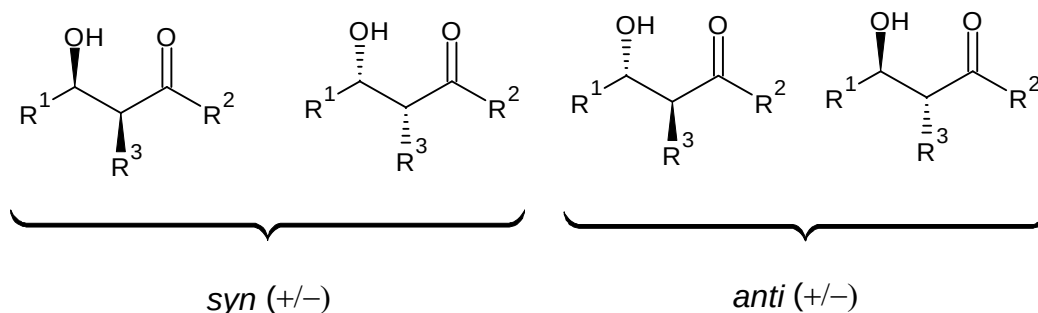


**Figura 16.** Condensación aldólica cruzada (adición aldólica cruzada seguida de eliminación)

El alcance de las reacciones aldólicas en medio básico general puede resumirse en 4 categorías:

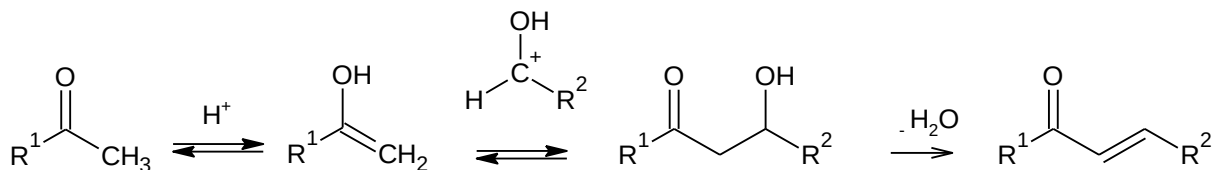
- Reacción entre dos moléculas del mismo aldehído: el equilibrio puede desplazarse hacia la derecha si posee sustituyentes que extiendan la conjugación del sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado. Muchos aldehídos se convierten a los aldoles o sus productos de condensación correspondientes de este modo.
- Reacción entre dos moléculas de la misma cetona: en este caso el equilibrio se encuentra fuertemente desplazado hacia la izquierda, por lo que la reacción solo es posible si logra modificarse el equilibrio, por ejemplo, retirando el producto del medio de reacción.
- Reacción entre dos aldehídos diferentes: en términos generales, esta reacción dará 4 productos distintos y hasta 8 si se consideran las olefinas. Sin embargo, si uno de los aldehídos no tiene hidrógeno  $\alpha$ , solo se producirán 2 aldoles y en muchos casos el producto de la aldólica cruzada (una molécula de cada aldehído) será el principal. La condensación aldólica cruzada suele llamarse reacción **de Claisen-Schmidt**.
- Reacción entre un aldehído y una cetona: esta reacción es posible, sobre todo cuando el aldehído no tiene hidrógenos  $\alpha$ , dado que la autocondensación de la cetona es poco probable. Esta reacción también se denomina **Claisen-Schmidt** y se estudiará en este trabajo de tesis. La cetona actúa como dadora de enolato y el aldehído, como aceptor.

La adición aldólica puede crear dos nuevos centros quirales, dando por ende cuatro posibles estereoisómeros del producto (Figura 17):

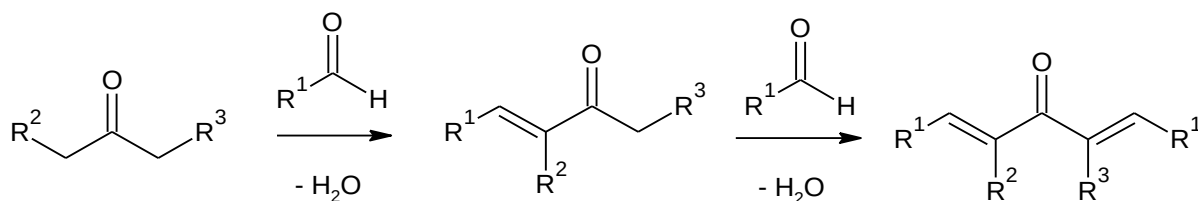


**Figura 17.** Estereoisómeros formados en una reacción de adición aldólica cruzada

Existen distintas estrategias químicas tradicionales para que la adición aldólica transcurra diastereoselectivamente, es decir, para que alguno(s) de los 4 productos anteriores se forme(n) mayoritariamente. A modo de ejemplo, cabe mencionar que el uso de enolatos metálicos preformados (litio, magnesio, etc.) suelen dar el par *syn*. En la actualidad, el uso de organocatalizadores permite obtener productos de adición aldólica con altas estereoselectividades (Heravi, M. M. y Asadi, S., 2012). Las reacciones aldólicas también pueden llevarse a cabo vía catálisis ácida, medio en el cual luego suele ocurrir la deshidratación (Figura 18), al igual que lo que ocurre en medio básico. Una reacción secundaria que suele ocurrir es la condensación aldólica posterior de los productos de condensación aldólica, ya que dichos productos siguen siendo aldehídos o cetonas, formándose *bis* enonas (Figura 19).



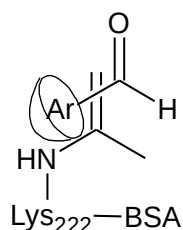
**Figura 18.** Mecanismo de las reacciones aldólicas vía catálisis ácida.



**Figura 19.** Formación de *bis* enona a partir de la condensación aldólica de un equivalente de cetona con dos equivalentes de aldehído.

### 1.4.2. Antecedentes de reacciones aldólicas catalizadas por BSA

Antes de la realización de este trabajo de tesis existían muy pocos antecedentes de la catálisis de BSA en reacciones aldólicas. Uno de ellos es un estudio de la **adición aldólica** de acetona a aldehídos aromáticos sustituidos, catalizada por albúmina en soluciones acuosas a pH 7,5 (Benedetti *et al.*, 2011). En la página 29 se comentó que esta reacción catalizada por BSA responde a una cinética de Michaelis-Menten, como si la proteína fuese una enzima. Adicionalmente, los autores comprobaron que la BSA se inhibe con warfarina (se sabe que esta molécula se liga al subdominio IIA) y que no hubo actividad catalítica al ensayar la reacción con BSA tratada con isotiocianato de fluoresceína, compuesto que reacciona con la Lis-222, según se describió en la página 29. En conjunto, el trabajo presenta evidencias a favor de un mecanismo catalítico específico. Los autores proponen que la Lis-222 en la BSA (y la Lis-199 en HSA) puede estar involucrada en el ciclo catalítico a través de la unión covalente con la acetona para formar un intermediario *N*-metiletenamina (Figura 20). Por otra parte, y en relación con la adición aldólica, cabe señalar que la BSA también acelera la reacción retroaldólica del metodol (pág. 29). (Schmidt *et al.*, 2013).



**Figura 20.** Lis-222 de la BSA actuando en el ciclo catalítico a través de la unión covalente con la acetona para formar un intermediario *N*-metiletenamina

Las estructuras polipeptídicas, intermedias entre enzimas y organocatalizadores pequeños, han sido propuestas como catalizadores hechos a medida para catalizar reacciones orgánicas (Revell y Wennemers, 2007). Sin embargo, en la mayoría de los casos exitosos se trata de oligopéptidos cortos en los cuales la secuencia de aminoácidos no forma un verdadero sitio de reconocimiento selectivo de sustrato. A partir de esto, surge el interés en desarrollar péptidos artificiales que puedan combinar la unión de sustratos con la catálisis, comenzando por secuencias *wild-type* que puedan reconocer un amplio espectro de moléculas pequeñas y catalizar una gran variedad de reacciones con una eficiencia aceptable.

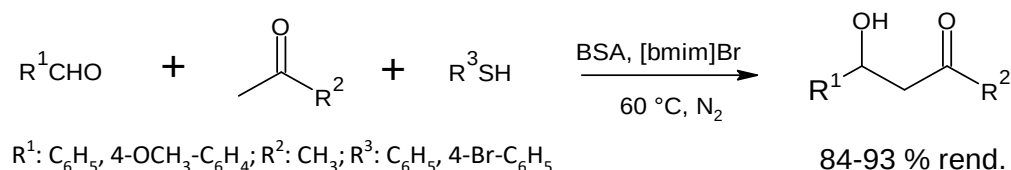
En relación con lo anterior, los autores del trabajo sobre la adición aldólica catalizada por BSA que se comentó en las líneas anteriores identificaron una secuencia de 103 aminoácidos correspondientes a los residuos 191-294 del sitio de unión del subdominio IIA de la HSA (asociado con la actividad catalítica de la albúmina, como se discutió en la pág. 29) y la sobreexpresaron en *E. coli* fusionada con la proteína de unión a maltosa (MBP) (Benedetti *et al.*, 2011). Este polipéptido mostró una actividad catalítica para la adición aldólica comparable a la de la albúmina original, mientras que la MBP sola resultó inactiva. Este es el primer ejemplo de un fragmento de albúmina que retiene la capacidad catalítica de la albúmina completa. Más aún, este resultado también refuerza las evidencias de que la actividad aldolasa no se debe a las impurezas de las preparaciones comerciales de albúminas.

Luisi *et al.* (2013) identificaron y sobreexpresaron en *E. coli* un polipéptido de 101 aminoácidos, que resultó ser el péptido funcional más corto derivado de la secuencia de la HSA, y el primero expresado exitosamente en *E. coli* fusionado con una glutatión S-transferasa. Los resultados indican que dicho polipéptido retiene la capacidad de la HSA de enlazar ligandos típicos como warfarina y efavirenz, y de catalizar reacciones como la adición aldólica o la reducción de dicetonas. El péptido identificado fue de A194 a E294 y se lo denominó HSA100. Abarca aproximadamente la mitad del subdominio IIA de la HSA. El sitio de unión está formado por una secuencia continua de aminoácidos sin contribución de residuos de otros subdominios. El fragmento HSA100 mostró un comportamiento similar a la proteína madre, acelerando la adición aldólica más de 1100 veces y permitiendo un reuso de más de 100 ciclos y una conversión cuantitativa. El intermediario propuesto para este tipo de reacción es la formación de una enamina entre la Lis-199 de la HSA y la acetona. La conservación de esta actividad aldolasa en el péptido sugiere que la  $pK_a$  peculiar de dicha lisina no se ve afectada considerablemente en la cadena proteica acortada.

En cuanto a antecedentes de **condensaciones aldólicas** catalizadas por BSA, existe un trabajo en el que estas reacciones se ensayaron en líquido iónico como solvente, a 60 °C (Sharma *et al.*, 2011). Se ensayó una amplia gama de aldehídos aromáticos que dieron la condensación aldólica cruzada con acetona en bromuro de 1-butil-3-metilimidazolio (líquido iónico), obteniéndose las enonas correspondientes con conversiones en el rango 52-94 %. Es destacable que también se puedan obtener enonas que contengan un grupo fenol libre, cuya síntesis química es más compleja, con pasos de protección-desprotección. El mecanismo catalítico que proponen los autores involucra la acción conjunta del líquido iónico y un grupo amino básico de una cadena lateral de la BSA.

La combinación sinérgica de dos catalizadores es una estrategia en auge para la formación de moléculas complejas. Un buen ejemplo es la combinación de la BSA con bromuro de 1-butil-3-metilimidazolio para

catalizar la formación de compuestos  $\beta$ -aril- $\beta$ -tioalcoxycarbonílicos a partir de cetonas alifáticas, aldehídos aromáticos y tioles (Thopate *et al.*, 2016). Esto se logra combinando dos reacciones clásicas, la **condensación aldólica** y la **adición de tio-Michael** (Figura 21), en un proceso *one-pot* en cascada, sin metales, ácidos ni bases. La utilización de líquidos iónicos en lugar de solventes orgánicos se justificó debido a su capacidad de disolver una gran variedad de compuestos, combinada con su capacidad catalítica (Isambert *et al.*, 2011).



**Figura 21.** Formación de compuestos  $\beta$ -aril- $\beta$ -tioalcoxycarbonílicos catalizada por BSA en bromuro de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim]Br).

La aplicación de BSA en solventes eutécticos profundos (DES, *deep eutectic solvents*) para catalizar las reacciones aldólicas de acetona y *p*-nitrobenzaldehído es el último antecedente a mencionar, pero en las condiciones de reacción ensayadas se obtuvieron mezclas de cetol y enona sin selectividad o con baja selectividad (Milker *et al.*, 2019).

## 1.5. Objetivos

A partir de los antecedentes discutidos en la Introducción, teniendo en cuenta las ventajas de las reacciones biocatalizadas, la necesidad de expandir el uso de biocatalizadores accesibles y ampliar el conocimiento de la promiscuidad biocatalítica, se plantearon los siguientes objetivos para el presente trabajo:

- Profundizar el campo de aplicación de la promiscuidad catalítica, centrándose en el estudio de la condensación aldólica cruzada catalizada por albúmina de suero bovino (BSA). El estudio presentado se orientó a encontrar una metodología que constituya una alternativa a los métodos químicos tradicionales, tanto por transcurrir en condiciones suaves de reacción como por emplear un catalizador sustentable y compatible con el medio ambiente.
- Este objetivo se desarrolló, en primer lugar, ensayando la BSA en la condensación aldólica cruzada entre acetona y una serie de benzaldehídos (Capítulo 2); posteriormente se varió la

estructura de la cetona ensayada (Capítulo 3) y, por último, se evaluó aplicar el biocatalizador a reacciones de condensación aldólica intramolecular (Capítulo 4).

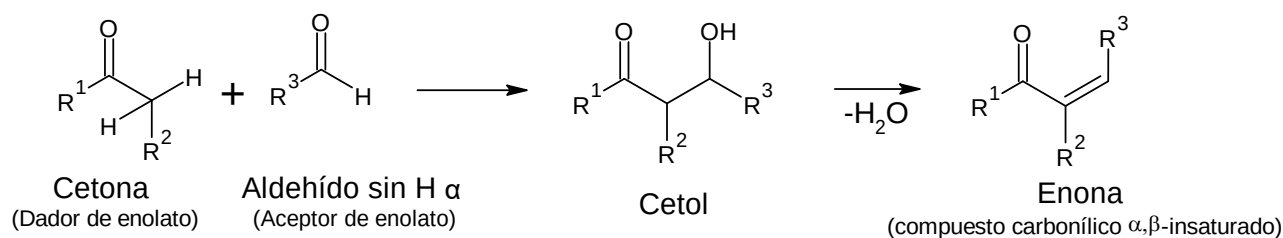
- Evaluar la conservación de la actividad catalítica de la BSA luego de su recuperación y reúso, propiedad de vital importancia para su utilización en escala industrial. Este objetivo se llevó a cabo al estudiar la reacción entre benzaldehído y acetona (Capítulo 2).
- Aportar información sobre el mecanismo de la catálisis de BSA en la condensación aldólica, para tener un conocimiento más racionalizado de esta reacción (Capítulos 2 y 3).

## Capítulo 2

Condensación aldólica de aldehídos  
aromáticos y acetona catalizada por  
albúmina de suero bovino

## 2.1. Introducción

Como ya se mencionó en el Capítulo anterior (pág. 32), la condensación aldólica cruzada entre una cetona y un aldehído sin hidrógeno  $\alpha$  (Esquema 1), también conocida como reacción de Claisen-Schmidt, es una reacción de formación de enlaces C-C que conduce a compuestos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados (enonas), formados por la deshidratación de los productos de adición intermediarios (cetoles). Mientras estos últimos son interesantes por ser quirales y poder obtenerse de forma enantioselectiva mediante biocatálisis (Busto *et al.*, 2010), existen pocos antecedentes para la obtención de enonas por vía biocatalítica. A pesar de ser una reacción muy conocida, el estudio de la condensación aldólica es relevante por la gran versatilidad estructural de los compuestos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados obtenidos. Por ejemplo, las enonas aromáticas obtenidas son precursores de diversos compuestos farmacológicamente activos (Nasir Abbas Bukhari *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2015).



**Esquema 1.** Adición/Condensación aldólica cruzada.

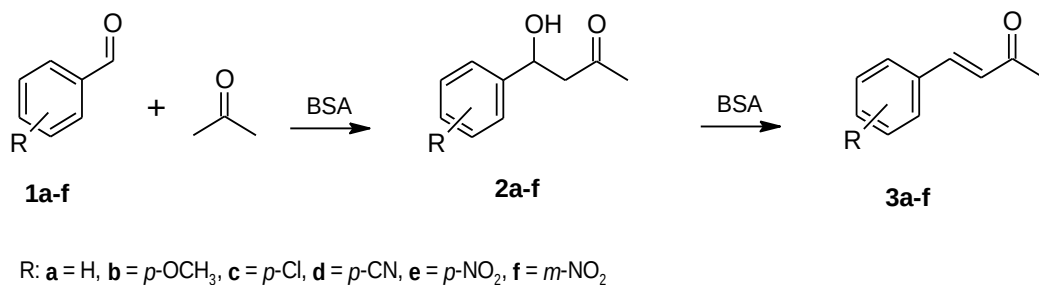
No obstante, la condensación aldólica tradicional se realiza en medio básico en caliente, lo cual conlleva la formación de subproductos como las *bis* enonas y/o productos de adición de Michael (Kreher *et al.*, 2003; Rahman *et al.*, 2012). Para evitar este problema, se han publicado distintas alternativas que utilizan, por ejemplo, irradiación con microondas o catálisis con iones metálicos, pero muchas de estas estrategias involucran reactivos y solventes caros o ambientalmente incompatibles (Rayar *et al.*, 2015).

En el Capítulo 1 también se describió que existen alternativas que transcurren en condiciones más suaves de reacción, como las que brinda la biocatálisis y que se integran en síntesis orgánica por ser transformaciones sustentables y ecocompatibles. Las aldolasas son útiles para obtener el producto de adición (cetol/aldol) con una elevada estereoselectividad, pero no el  $\alpha,\beta$ -insaturado. Además, usualmente presentan una limitada aceptación de sustratos dadores, que puede ser ampliada por ingeniería genética (Clapés, 2015). Gracias a la promiscuidad enzimática, surgen alternativas a las aldolasas que permiten expandir el espectro de sustratos para las reacciones aldólicas. Diversas hidrolasas, principalmente lipasas y proteasas comerciales, han sido reportadas como catalizadores



promiscuos de la adición aldólica cruzada (Busto *et al.*, 2011; Guan *et al.*, 2015; López-Iglesias and Gotor-Fernández, 2015; González-Martínez *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha reportado que una enzima extraída de *Daucus carota* cataliza enantioselectivamente la adición aldólica cruzada de acetona con una serie de benzaldehídos (Acharya *et al.*, 2016).

Como se discutió en la Introducción, una proteína no enzimática como la albúmina, que no tiene un sitio catalítico tradicional, también puede catalizar reacciones orgánicas. En particular, como se presentó en el capítulo anterior (sección 1.4.2), se ha informado que la BSA cataliza con moderada enantioselectividad la adición de acetona a 6-metoxi-2-naftaldehído en solución acuosa neutra (Benedetti *et al.*, 2011). Sin embargo, el benzaldehído y otros benzaldehídos sustituidos no fueron reconocidos eficientemente por el biocatalizador. Por otra parte, la BSA catalizó la condensación aldólica de acetona con una serie de benzaldehídos sustituidos, en el líquido iónico bromuro de 1-butil-3-metilimidazolio como medio de reacción y dando los correspondientes compuestos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados con rendimientos buenos a elevados (Sharma *et al.*, 2011). Estos dos antecedentes citados son los únicos de reacciones aldólicas catalizadas por BSA previos al trabajo presentado en esta tesis y es pertinente resaltar que los líquidos iónicos suelen ser caros y dificultan la purificación de los productos obtenidos. Por otra parte, la mayoría de los antecedentes con otros catalizadores promiscuos, como las hidrolasas (Busto *et al.*, 2010), conducen a la formación de cetoes y pocos a enonas (Chen *et al.*, 2011). En los experimentos preliminares que se realizaron con el fin de encontrar un biocatalizador adecuado para la reacción de Mannich entre benzaldehído, acetona y diversas aminas (ciclohexilamina, butilamina, hexilamina) observamos, en lugar del producto de Mannich, el producto de la condensación aldólica entre el benzaldehído y la acetona. Este resultado, junto con los escasos antecedentes de obtención de enonas con estos sustratos, nos llevaría al estudio de la actividad de la BSA como catalizador de la condensación aldólica, utilizando benzaldehído y otros benzaldehídos sustituidos como sustratos aceptores y acetona, como dador (Esquema 2).



**Esquema 2.** Condensación aldólica de benzaldehídos sustituidos y acetona catalizada por BSA.

## 2.2. Materiales y métodos

### 2.2.1. General

La albúmina de suero bovino (BSA) se compró a Sigma-Aldrich (fracción V) y se utilizó directamente sin purificación, excepto para los experimentos de control. Para el ensayo de control con BSA desnaturalizada, se agitó BSA (100 mg) en una solución acuosa de urea 8 M (2 ml) durante 24 h a 100 °C, luego se evaporó a presión reducida. La urea se removió por lavados con acetona/agua 1:1 (3x 5 ml) y finalmente, la proteína se secó.

Todos los reactivos y solventes fueron de grado analítico y obtenidos de proveedores comerciales. El benzaldehído se purificó por filtración sobre óxido de aluminio básico, seguida de destilación. Se utilizó etanol absoluto y la acetona se secó y destiló sobre carbonato de potasio.

Para el seguimiento de las reacciones en escala analítica se utilizó cromatografía en placa delgada (CCD) mediante placas de Silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck). El solvente de desarrollo fue hexano:acetato de etilo 70:30 v/v y las placas se revelaron con luz UV. A escala preparativa, para las purificaciones por cromatografía en columna se empleó Silicagel 60 de 0,04 – 0.063 mm (Merck), las concentraciones de las mezclas de solventes de elución empleadas se expresan en % v/v (sección 2.2.3).

Los análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se hicieron usando una columna de fase reversa C18 (150 mm de largo, 5,6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula) y un volumen de inyección de 20 µl. Se utilizaron equipos de HPLC modelos Beckman System Gold 125-166 y Gilson Pump 321 Autosampler 234. El análisis de las alícuotas de las biotransformaciones **1a–c,e,f** se hizo aplicando un gradiente de 4 min desde una proporción metanol/agua 60:40 v/v (2 min) a 75:25 v/v (1 min) a un flujo de 0,9 ml min<sup>-1</sup> y detección a 274 nm. Los tiempos de retención fueron: **1a**: 3,9 min; **3a**: 5,6 min; **1b**: 4,6 min; **3b**: 6,3 min; **1c**: 7,1 min; **3c**: 9,1 min; **1e**: 3,8 min; **2e**: 2,9 min; **3e**: 4,9 min; **1f**: 3,6 min; **2f**: 3,0 min; **3f**: 5,1 min. Las muestras en las que se utilizó **1d** fueron analizadas con un gradiente de 3 min de los mismos solventes desde 60:40 v/v (2 min) a 70:30 v/v (1 min), al mismo flujo y detección a 254 nm. Los tiempos de retención fueron: **1d**: 2,9 min; **2d**: 2,4 min; **3d**: 3,7 min.

Para determinar el exceso enantiomérico se utilizó un cromatógrafo gaseoso (GC) Thermo modelo Trace 1300 con una columna capilar CP-Chirasil-Dex (25 m de largo, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de film). Las condiciones de análisis fueron: 100 °C de temperatura inicial del horno (1 min), luego se incrementó hasta 185 °C (5 min) manteniéndose por 25 min; volumen de inyección: 2 µl.

Los espectros de  $^1\text{H}$ -NMR y  $^{13}\text{C}$ -NMR se obtuvieron con un espectrómetro Bruker Avance II a 500 y 125 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en partes por millón (ppm) utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia y cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como solvente. Las abreviaturas utilizadas para indicar la multiplicidad son: s, singulete; d, doblete; t, triplete; m, multiplete; br, señal ancha. En los casos necesarios, los espectros 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC permitieron la asignación de las señales.

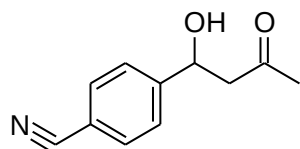
### 2.2.2. Condensación aldólica de **1a-f** catalizada por BSA

Los experimentos reportados utilizando **1a-f** consistieron en una solución del aldehído (0,05 mmol, 50 mM) en el solvente o mezcla de solventes indicado (1 ml) y BSA (27-81 mg, se indica en cada caso). Las mezclas fueron colocadas en un agitador orbital a una velocidad de 200 rpm, a la temperatura indicada en cada caso. Se tomaron a distintos tiempos alícuotas de las reacciones y para el análisis por HPLC se centrifugaron a 6000 rpm y diluyeron en metanol.

### 2.2.3. Preparación de los productos **2d-f** y **3a-f** catalizada por BSA

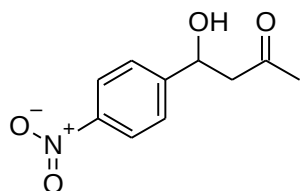
Los escalados preparativos para la obtención de los productos **2d-f** y **3a-c**, **e-f** consistieron en una solución del correspondiente aldehído **1a-f** (0,5 mmol) en acetona/agua 1:1 v/v (10 ml) y 540 mg de BSA (relación de masa BSA/**1a-f** = 10,4). Para obtener **3d** a partir de **1d**, se utilizó acetona/etanol 1:1 v/v en lugar de acetona/agua 1:1 v/v. Las mezclas se agitaron a 45°C y 200 rpm durante el tiempo indicado y luego la BSA se filtró y lavó con acetona (5 ml). Los filtrados fueron concentrados al vacío (rotavapor) para remover la acetona y el residuo obtenido se extrajo con 4 alícuotas de 5 ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas colectadas se secaron sobre carbonato de sodio, se filtraron y el solvente se eliminó al vacío. La purificación por columna de silicagel del remanente, utilizando los solventes indicados a continuación, proporcionó los productos **2d-f** y **3a-f**:

#### 4-(1-Hidroxi-3-oxobutil)benzonitrilo(**2d**)



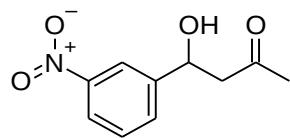
Tiempo de reacción: 72 h; solvente de elución: hexano/acetato de etilo 80:20; rendimiento: 54%;  $R_f = 0,39$  (hexano/acetato de etilo 70:30).  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  7,63 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H, Ar-H); 7,48 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H, Ar-H); 5,21 (t,  $J = 6,2$  Hz, 1H, H1); 3,68 (br, 1H, OH); 2,84 (d,  $J = 6,2$  Hz, 2H, H2); 2,21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  208,50 (CO); 148,14; 132,35; 126,35 (Ar-C); 118,73 (CN); 111,29 (Ar-C); 69,05 (C4); 51,56 (C3); 30,74 (CH<sub>3</sub>).

**4-Hidroxi-4-(4'-nitrofenil)-2-butanona (2e)**



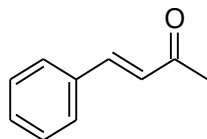
Tiempo de reacción: 48 h; solvente de elución hexano/acetato de etilo 80:20 v/v, rendimiento: 41%;  $R_f = 0,17$  (hexano/acetato de etilo 70:30).  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  8,18 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H, Ar-H); 7,54 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H, Ar-H); 5,26 (t,  $J = 6,3$  Hz, 1H, H4); 3,63 (br, 1H, OH); 2,87 (d,  $J = 6,1$  Hz, 2H, H2); 2,22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  208,53 (CO); 150,15; 147,27; 126,45; 123,74 (Ar-C); 68,90 (C4); 51,53 (C3); 30,72 (CH<sub>3</sub>).

**4-Hidroxi-4-(3'-nitrofenil)-2-butanona (2f)**



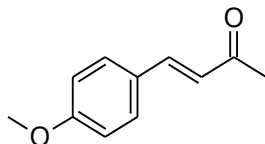
Tiempo de reacción: 96 h; solvente de elución hexano/acetato de etilo 80:20 v/v, rendimiento: 44%;  $R_f = 0,17$  (hexano/acetato de etilo 70:30).  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  8,24 (m, 1H, Ar-H); 8,13 (ddd,  $J = 8,2$  Hz, 2,3 Hz, 1,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,72 (m, 1H, Ar-H); 7,53 (t,  $J = 7,9$  Hz, 1H, Ar-H); 5,27 (t,  $J = 6,2$  Hz, 1H, H4); 2,90 (d,  $J = 6,2$  Hz, 2H, H3); 2,24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  208,63 (CO); 148,36; 144,96; 131,86; 129,51; 122,55; 120,72 (Ar-C); 68,77 (C4); 51,56 (C3); 30,72 (CH<sub>3</sub>).

**(E)-4-fenil-3-buten-2-ona (3a)**



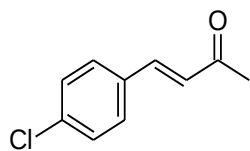
Tiempo de reacción: 48 h; solvente de elución hexano/acetato de etilo 97:3 v/v, rendimiento: 93%;  $R_f$  = 0,57 (hexano/acetato de etilo 70:30).  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  7,56 (m, 3H, 2 Ar-H, H4); 7,42 (m, 3H, Ar-H); 6,75 (d,  $J$  = 16,3 Hz, 1H, H3); 2,41 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  200,22 (CO); 146,97 (C4); 135,88; 129,46; 129,02; 128,06 (Ar-C); 126,52 (C3); 26,78 ( $\text{CH}_3$ ).

*(E)-4-(4'-Metoxifenil)-3-buten-2-ona (3b)*



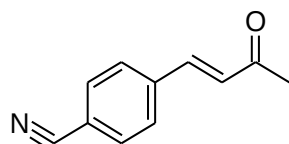
Tiempo de reacción: 120 h; solvente de elución diclorometano, rendimiento: 87%;  $R_f$  = 0,50 (hexano/acetato de etilo 70:30).  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  7,51 (m, 3H, 2 Ar-H, H4); 6,94 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 2H, Ar-H); 6,63 (d,  $J$  = 16,2 Hz, 1H, H3); 3,87 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 2,38 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  198,41 (CO); 161,61 (Ar-C); 143,25 (C4); 129,96; 127,06 (Ar-C); 125,03 (C3); 114,44 (Ar-C); 55,41 ( $\text{OCH}_3$ ); 27,41 ( $\text{CH}_3$ ).

*(E)-4-(4'-Clorofenil)-3-buten-2-ona (3c)*



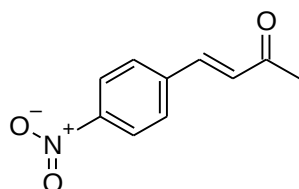
Tiempo de reacción: 72 h; solvente de elución hexano/acetato de etilo 95:5 v/v, rendimiento: 65%;  $R_f$  = 0,57 (hexano/acetato de etilo 70:30).  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  7,47 (m, 3H, 2 Ar-H, H4); 7,37 (d,  $J$  = 8,5 Hz, 2H, Ar-H); 6,69 (d,  $J$  = 16,3 Hz, 1H, H3); 2,38 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  198,06 (CO); 141,86 (C4); 136,43; 132,92; 129,39; 129,26 (Ar-C); 127,48 (C3); 27,69 ( $\text{CH}_3$ ).

*4-[(1E)-3-Oxo-1-butenil]benzonitrilo(3d)*



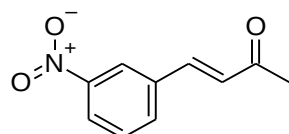
Tiempo de reacción: 72 h; solvente de elución hexano/acetato de etilo 80:20 v/v, rendimiento: 84%;  $R_f$  = 0,50 (hexano/acetato de etilo 70:30).  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  7,71 (d,  $J$  = 8,5 Hz, 2H, Ar-H); 7,64 (d,  $J$  = 8,2 Hz, 2H, Ar-H); 7,50 (d,  $J$  = 16,3 Hz, 1H, H1); 6,80 (d,  $J$  = 16,3 Hz, 1H, H2); 2,42 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  197,62 (CO); 140,63; 138,82; 132,68; 129,79; 128,56 (Ar-C; C3; C4); 118,31 (CN); 113,54 (Ar-C); 27,98 ( $\text{CH}_3$ ).

*(E)-4-(4'-Nitrofenil)-3-buten-2-ona (3e)*



Tiempo de reacción: 72 h; solvente de elución hexano/acetato de etilo 80:20 v/v, rendimiento: 18%;  $R_f$  = 0,50 (hexano/acetato de etilo 70:30).  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  8,26 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 2H, Ar-H); 7,71 (d,  $J$  = 8,6 Hz, 2H, Ar-H); 7,55 (d,  $J$  = 16,3 Hz, 1H, H4); 6,83 (d,  $J$  = 16,3 Hz, 1H, H3); 2,43 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  197,53 (CO); 148,58; 140,67; 140,06 (Ar-C; C4); 130,38 (C3); 128,81; 124,20 (Ar-C); 28,05 ( $\text{CH}_3$ ).

*(E)-4-(3'-Nitrofenil)-3-buten-2-ona (3f)*



Tiempo de reacción: 96 h; solvente de elución hexano/acetato de etilo 80:20 v/v, rendimiento: 34%;  $R_f$  = 0,42 (hexano/acetato de etilo 70:30).  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  8,41 (t,  $J$  = 1,9 Hz, 1H, Ar-H); 8,25 (ddd,  $J$  = 8,2 Hz; 2,2 Hz, 1,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,87 (d,  $J$  = 7,7 Hz, 1H; Ar-H); 7,62 (t,  $J$  = 8,0 Hz, 1H, Ar-H); 7,56 (d,  $J$  = 16,3 Hz, 1H, H4); 6,85 (d,  $J$  = 16,3 Hz, 1H, H3); 2,43 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  197,58 (CO); 148,72 (Ar-C); 140,18 (C4); 136,28; 133,77; 130,06 (Ar-C); 129,39 (C3); 124,69; 122,60 (Ar-C); 28,05 ( $\text{CH}_3$ ).

#### 2.2.4. Deshidratación de **2d** y **2e** catalizada por BSA

Se agregaron 54 mg de BSA a una solución de 4-hidroxi-4-(4'-nitrofenil)-2-butanona (**2e**, 0,05 mmol) en acetona/agua 1:1 (1 ml) y se agitó a 45°C y 200 rpm por 48 h. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y luego de centrifugar, se analizaron por HPLC. Para la deshidratación de **2d** se utilizó el mismo procedimiento, utilizando como solvente en este caso acetona/etanol 1:1 (1 ml).

#### 2.2.5. Ensayos de hidratación de **3d** y **3e** catalizada por BSA

Se agregaron 54 mg de BSA a una solución de (*E*)-4-(4'-nitrofenil)-3-buten-2-ona (**3e**, 0,05 mmol) en acetona/agua 1:1 (1 ml) y se agitó a 45°C y 200 rpm por 48 h. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y luego de centrifugar, se analizaron por HPLC. Se utilizó el mismo procedimiento para ensayar **3d**.

#### 2.2.6. Ensayos de reutilización de BSA

Para estudiar el potencial de reúso de la BSA, se desarrollaron experimentos utilizando dos sustratos. En el primer ensayo, 540 mg de BSA se agregaron a una solución de benzaldehído (**1a**, 0,5 mmol) en acetona/agua 1:1 (10 ml) y se agitó a 45°C y 200 rpm por 48 h. Se filtró la mezcla para recuperar el biocatalizador y se analizó por HPLC una alícuota del filtrado. Se lavó la BSA con acetona (3 x 5 ml), luego se secó y reusó en tandas consecutivas utilizando un protocolo similar. En el segundo ensayo, 540 mg de BSA se agregaron a una solución de *p*-formilbenzonitrilo (**1d**, 0,5 mmol) en acetona/etanol 1:1 (10 ml) y se colocaron en agitador orbital a 45°C y 200 rpm por 72 h. Para recuperar la BSA para su reúso, se siguió el mismo protocolo descripto anteriormente.

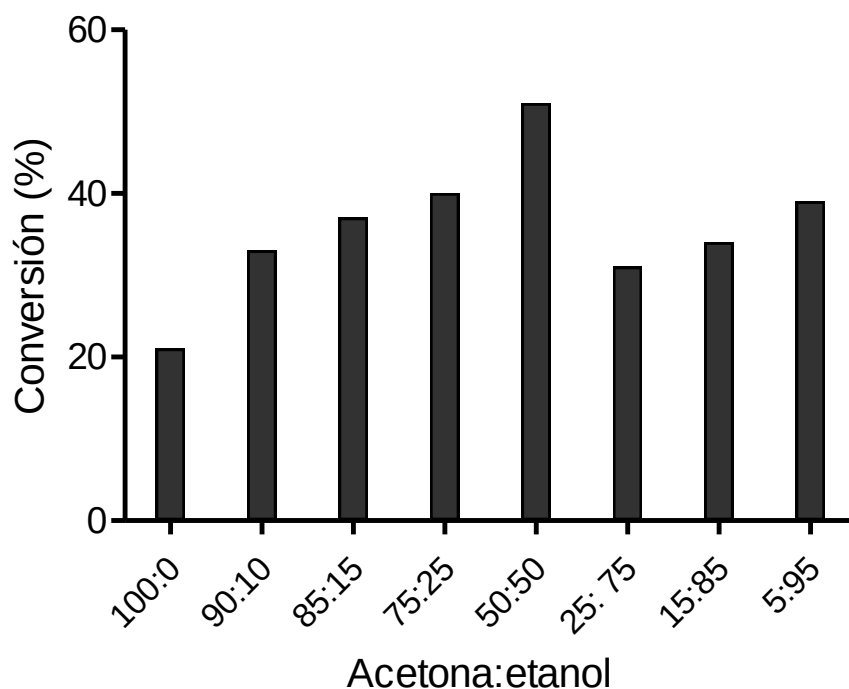
### 2.3. Resultados y discusión

#### 2.3.1. Ensayos de control

Los estudios iniciales se realizaron utilizando benzaldehído (**1a**, Esquema 2, Figura 5) como sustrato modelo e involucraron un *screening* de parámetros experimentales. Con el fin de poder evaluar fehacientemente los resultados, se llevaron a cabo experimentos de control en ausencia de BSA y con BSA tratada previamente. En ausencia de BSA, no se observó la formación de benzalacetona (**3a**), lo que permitió descartar la reacción espontánea de condensación aldólica. Comparada con la BSA sin tratar, la BSA tratada con urea a 100°C por 24 horas perdió su actividad catalítica (1% de conversión a **3a**). Estos controles confirman que la BSA promueve la formación de benzalacetona e indican, como se verá a continuación, que la estructura terciaria de la proteína es necesaria para la actividad catalítica.

### 2.3.2. Optimización de parámetros de reacción para la condensación aldólica de acetona con benzaldehído catalizada por BSA

El medio de reacción es un parámetro clave en una biotransformación y, como se mencionó previamente (sección 1.3.4), es deseable elegir un solvente económico y ambientalmente compatible como agua o etanol cuando se planea una reacción. Por ello, se comenzó estudiando el efecto del solvente en la conversión a benzalacetona (**3a**). Como puede verse en la Figura 1, el etanol como cosolvente mejora la conversión a benzalacetona, obteniéndose el mejor valor (51% de conversión) con un 50 % de etanol.

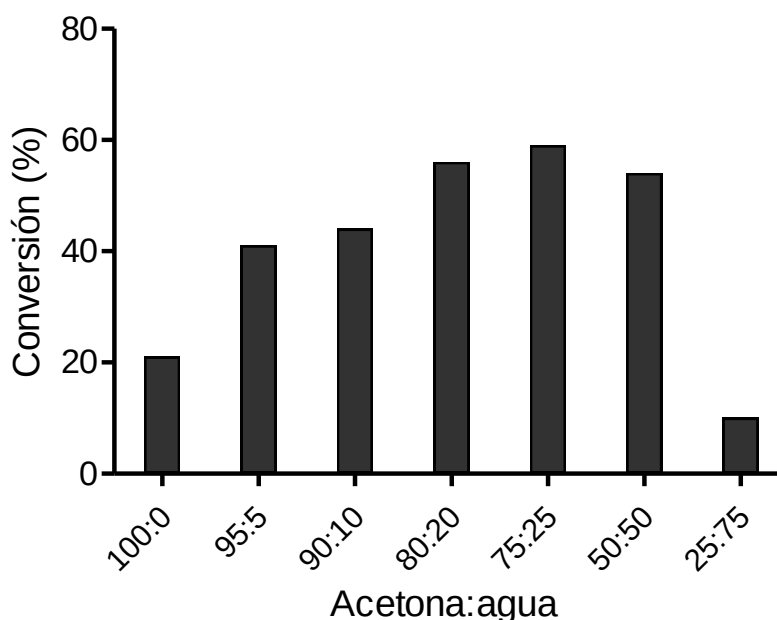


**Figura 1.** Efecto del contenido de etanol en la formación de benzalacetona (**3a**) a 30°C con 27 mg de BSA (sección 2.2.2). Valores de conversión a 120 h de reacción, determinados por HPLC.

Los resultados también muestran que la adición de agua incrementa la conversión (Figura 2), con la excepción de la proporción de agua más alta ensayada. Es importante tener en cuenta que todas las proporciones de cosolvente/acetona ensayadas implican un alto exceso molar acetona/benzaldehído (A/B), lo que favorece la formación de benzalacetona (A/B=278 a 100% de acetona y A/B = 69 para 75% de cosolvente). Además, a pesar de que en el paso de deshidratación se produce agua, la caída en la



conversión a benzalacetona (10%) al utilizar 75% de agua [relación molar agua/benzaldehído (W/B) = 850] no se debería a la inhibición de la formación de la enona por el exceso de agua, ya que los valores más altos de conversión (54, 56 y 59 %) también se obtienen con altas proporciones de agua (20, 25 y 50% de agua, respectivamente: W/B=227-567). Adicionalmente, se verificó que el benzaldehído era soluble en todas las proporciones de agua ensayadas. En consecuencia, el efecto del contenido de agua en la conversión a benzalacetona no se explicaría en base a la solubilidad o a razones estequiométricas, sino por el efecto del agua en la actividad catalítica de la BSA.



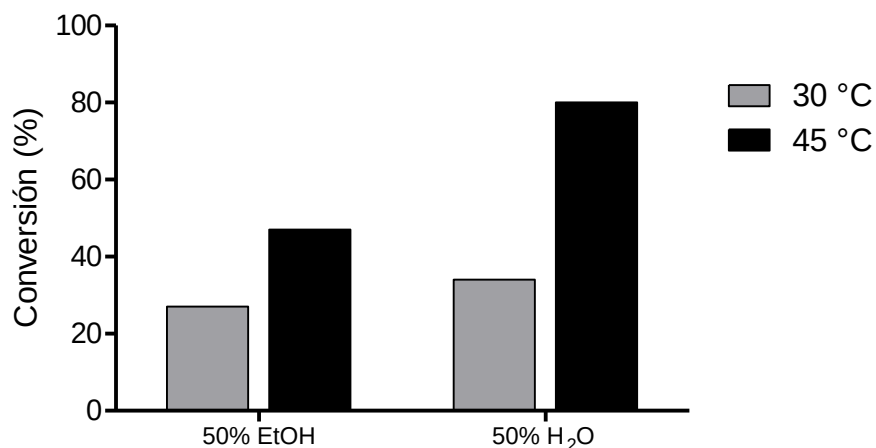
**Figura 2.** Efecto del contenido de agua en la formación de benzalacetona (**3a**) a 30°C con 27 mg de BSA (sección 2.2.2). Valores de conversión a 120 h de reacción, determinados por HPLC.

El contenido de agua óptimo para la máxima conversión a producto de un sustrato determinado, dada una biotransformación determinada, usualmente depende en gran medida del solvente (Guan *et al.*, 2015; Bommarius y Riebel 2004). Esto también ha sido reportado en biotransformaciones mediante BSA. Por ejemplo, en la reacción de Henry se alcanzaron valores elevados de conversión al producto de adición en mezclas de nitrometano-agua con 5-95% agua, pero no se obtuvo conversión en nitrometano anhidro (Busto *et al.*, 2011). En una reacción en cascada de adición de Michael y posterior ciclado intramolecular catalizada por BSA en etanol, para obtener ciertos derivados de cromenos (Li *et al.*, 2015), se obtuvieron rendimientos elevados únicamente con 0, 10 y 20% de agua, mientras que con

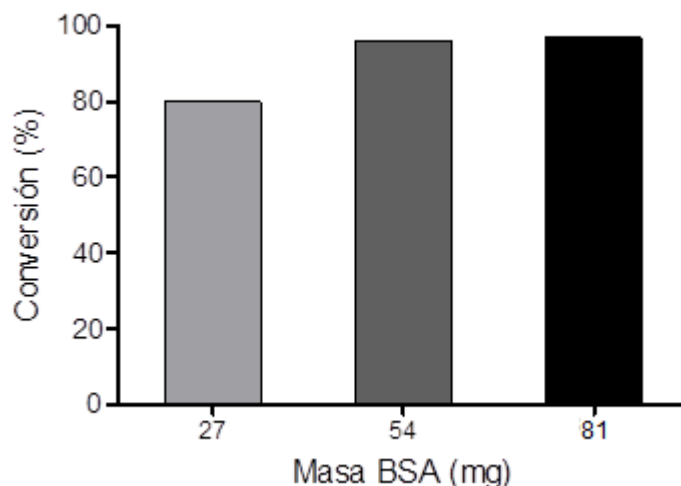
contenidos mayores de agua se lograron rendimientos menores. En cambio, en una síntesis de derivados de pirazoles que también incluye una ciclación intramolecular, se lograron altos rendimientos únicamente en etanol/agua 3:7, mientras que no se observó conversión en etanol absoluto (Dalal *et al.*, 2016). Por otra parte, dado un solvente, los sustratos y la reacción ensayada también influyen sobre el contenido de agua óptimo. En conjunto, aunque este parámetro suele ser muy importante en una biotransformación, es muy difícil de predecir y debe determinarse mediante experimentos, como lo muestran los resultados discutidos y los mostrados en la Figura 2.

En nuestro caso, si bien se obtuvieron conversiones similares a 20, 25 y 50% de agua, se escogió la última proporción para minimizar el uso de acetona, en línea con la tendencia actual de reemplazar solventes orgánicos por agua en los procesos quimio- y quimio-enzimáticos (Simon y Li, 2012; Gröger y Hummel, 2014). Por lo tanto, los experimentos posteriores se hicieron con acetona/agua 1:1.

En cuanto al efecto de la temperatura (Figura 3) en la formación de benzalacetona, es más notable en las reacciones en acetona/agua que en acetona/etanol. En el primer medio de reacción, se obtuvo una conversión mayor al 80%. Se ensayó también la influencia de la masa de BSA; duplicando y triplicando la masa se alcanzaron conversiones prácticamente cuantitativas (Figura 4).



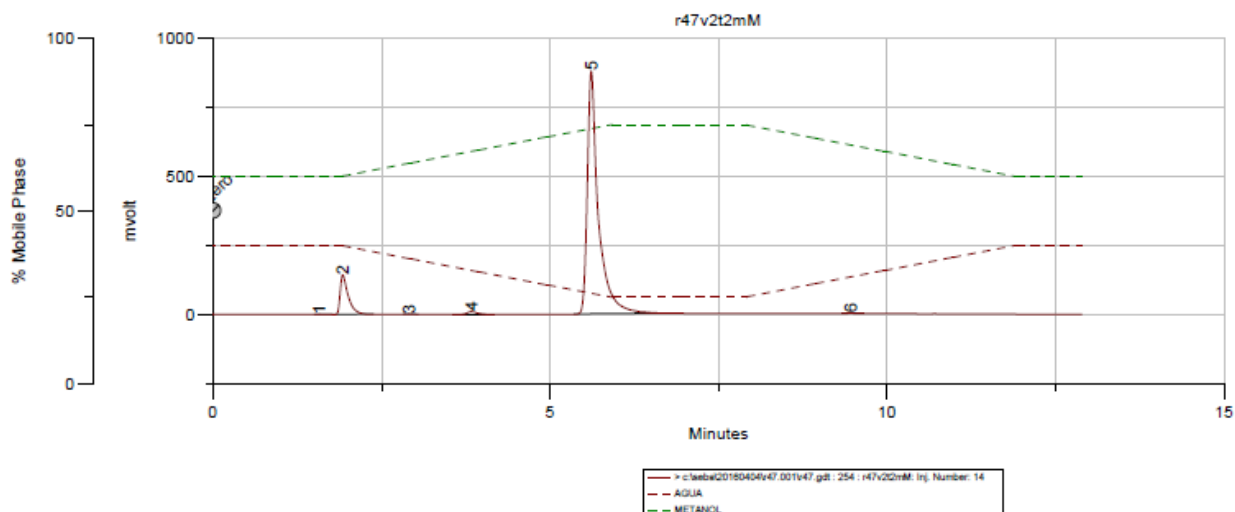
**Figura 3.** Efecto de la temperatura (masa de BSA: 27 mg, Sección 2.2.2) en la formación de benzalacetona (**3a**) para dos medios de reacción diferentes: acetona/etanol 1:1 y acetona/agua 1:1. Valores de conversión a 48 h de reacción determinados por HPLC.



**Figura 4.** Efecto de la masa de BSA en la formación de benzalacetona (**3a**) a 45°C en acetona/agua 1:1 (Sección 2.2.2). Valores de conversión a 48 h de reacción, determinados por HPLC.

### 2.3.3. Condensación aldólica catalizada por BSA de acetona con benzaldehídos sustituidos

Con el fin de expandir el rango de sustratos de la biotransformación, se ensayó un conjunto de benzaldehídos sustituidos (**1b-f**, Esquema 2, Tabla 1) utilizando las condiciones experimentales más favorables determinadas en el *screening* descrito anteriormente: 45°C, relación de masa BSA/**1a** = 10,4 (54 mg BSA). Se obtuvieron altas conversiones, en el rango de 88 a 97%, para tres de los sustratos ensayados (**1a-c**). El cambio de acetona/agua 1:1 a acetona/etanol 1:1 modificó drásticamente el perfil de productos obtenidos a partir de **1d** y permitió alcanzar una alta conversión al producto **3d** (97%, Figura 6). Sin embargo, los nitrobenzaldehídos **1e** y **1f** dieron mezclas de los correspondientes cetos y enonas. Debe mencionarse que los cetos **2d** y **2f** se analizaron por GC quiral y se confirmó que son mezclas racémicas.



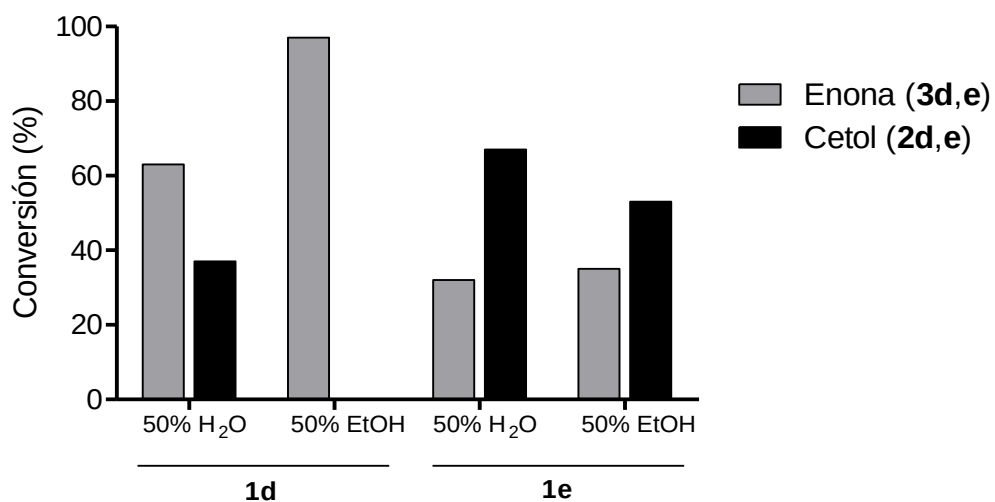
**Figura 5.** Cromatograma (HPLC) ilustrativo de alícuota tomada a las 24 h de la reacción de benzaldehído (**1a**) y acetona catalizada por BSA utilizando agua como cosolvente. La señal mayoritaria (5) corresponde al producto benzalacetona (**3a**).

Se redimensionaron las biotransformaciones para aislar los productos y caracterizarlos por espectroscopía de RMN, a la vez que se demostró la posibilidad de utilizar esta metodología en escala preparativa. En cuanto a la elucidación estructural de las enonas, se utilizaron primero señales características de determinados grupos funcionales presentes, como el desplazamiento químico del carbonilo (197-208 ppm por RMN-<sup>13</sup>C), el desplazamiento químico de uno de los hidrógenos del alqueno (a aproximadamente 6,6-6,8 ppm en RMN-<sup>1</sup>H) y la constante de acoplamiento de los hidrógenos del alqueno ( $J = 16,3$  Hz), que indica estereoquímica *E*. Luego se confirmó la correcta asignación del resto de las señales utilizando tablas y por comparación con los datos espectroscópicos ya publicados para estos compuestos.

**Tabla 1** – Condensación aldólica catalizada por BSA de los benzaldehídos **1a-f** con acetona<sup>a</sup>.

| Entrada | Substrato             | T (°C) | t (h) | Conversión a<br>enona <b>3a-f</b> (%) <sup>b</sup> | Conversión a<br>cetol <b>2a-f</b> (%) <sup>b</sup> | Rendimiento en<br>Enona (%) <sup>c</sup> | Rendimiento en<br>Cetol (%) <sup>c</sup> |
|---------|-----------------------|--------|-------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| 1       | <b>1a</b>             | 45     | 48    | 96                                                 | -                                                  | 93                                       | -                                        |
| 2       | <b>1b</b>             | 45     | 120   | 96                                                 | -                                                  | 87                                       | -                                        |
| 3       | <b>1c</b>             | 45     | 72    | 88                                                 | -                                                  | 65                                       | -                                        |
| 4       | <b>1d</b>             | 45     | 72    | 33                                                 | 66                                                 | 25                                       | 54                                       |
| 5       | <b>1d</b>             | 60     | 96    | 63                                                 | 37                                                 | 53                                       | 25                                       |
| 6       | <b>1d<sup>d</sup></b> | 45     | 96    | 97                                                 | -                                                  | 84                                       | -                                        |
| 7       | <b>1e</b>             | 45     | 48    | 24                                                 | 47                                                 | 18                                       | 41                                       |
| 8       | <b>1e</b>             | 60     | 72    | 32                                                 | 67                                                 | 24                                       | 58                                       |
| 9       | <b>1e<sup>d</sup></b> | 45     | 168   | 35                                                 | 53                                                 | 26                                       | 45                                       |
| 10      | <b>1f</b>             | 45     | 96    | 37                                                 | 61                                                 | 34                                       | 44                                       |

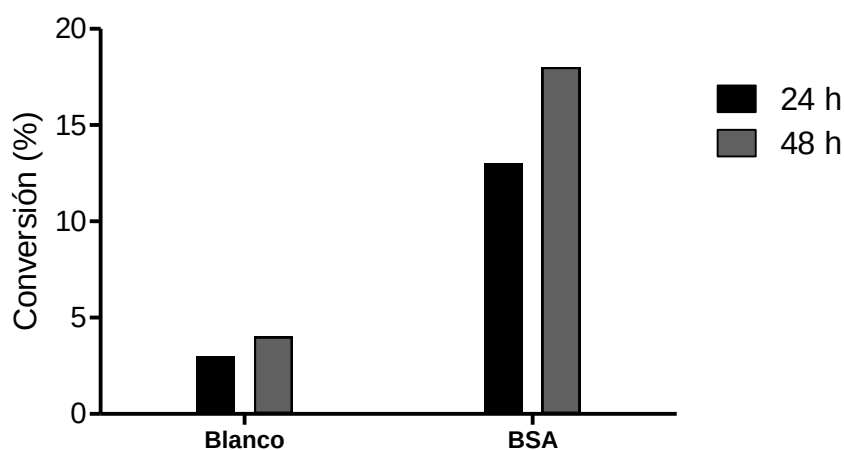
<sup>a</sup>Las reacciones se llevaron a cabo en acetona/agua 1:1 según se detalla en la sección 2.2.2. <sup>b</sup> Determinado por HPLC. <sup>c</sup> Luego de purificación por columna preparativa (sección 2.2.3). <sup>d</sup> En acetona/etanol 1:1.



**Figura 6.** Comparación del efecto del cosolvente para la conversión de los aldehídos **1d** y **1e** a las respectivas enonas (en mezclas 1:1 con acetona). Conversiones a 72 h, determinadas por HPLC.

#### 2.3.4. Deshidratación catalizada por BSA

Adicionalmente, con el fin de demostrar que el paso de la deshidratación del cetol a enona también es catalizado por la BSA, se realizaron experimentos con el cetol **2e** (Figura 7). A pesar de que hay antecedentes de actividad de la BSA en algunas  $\beta$ -eliminaciones (Klein y Reymond 1998; Boucher *et al.* 2005), al momento de realizar este trabajo no había en bibliografía trabajos previos que reportaran el rol de la BSA en la deshidratación de compuestos  $\beta$ -hidroxicarbonílicos. Los resultados presentados en la Figura 7 sugieren que la BSA también cataliza la deshidratación de **2e** para dar la enona **3e**, además de la formación del cetol.

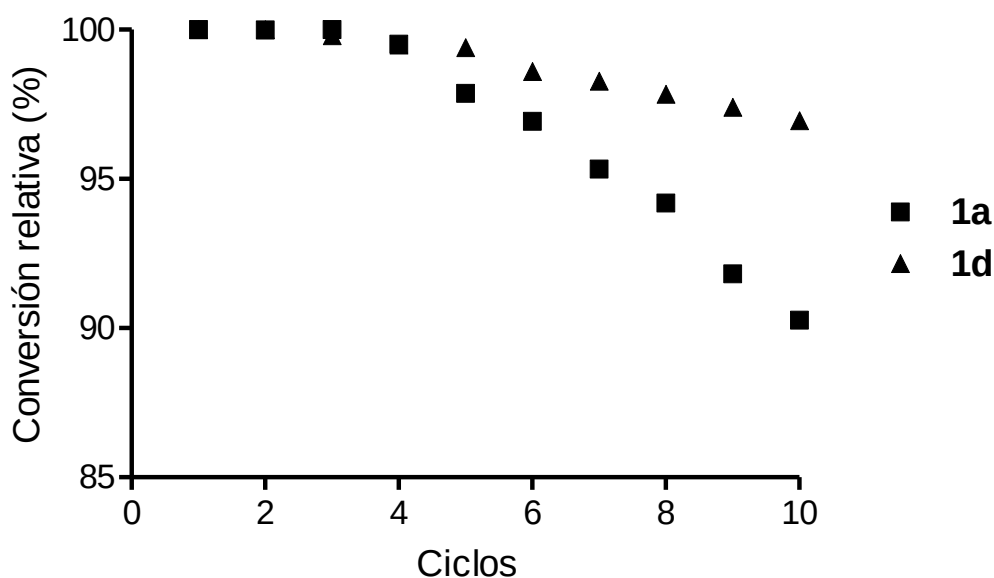


**Figura 7.** Deshidratación del cetol **2e** catalizada por BSA en acetona/agua 1:1 a 45°C. Conversiones determinadas por HPLC.

Por otra parte, también se hicieron ensayos evaluar la capacidad de la BSA de hidratar enonas, para lo cual se probaron las enonas **3d** y **3e**. Se incluyeron distintas combinaciones de solventes: agua, agua/acetona 1:1, agua/etanol 1:1, agua/acetonitrilo 1:1. En todos los ensayos realizados, el análisis por CCD mostró únicamente el sustrato sin reaccionar, por lo que se puede afirmar que en estas condiciones la BSA no cataliza la hidratación de las enonas **3d** y **3e**.

### 2.3.5. Reutilización de la BSA

Finalmente, se consideró la reutilización del biocatalizador, estudiando el reúso de la BSA en la condensación aldólica de benzaldehído (**1a**) y *p*-cianobenzaldehído (**1d**) según se detalla en la sección **2.6**. La BSA demostró un buen potencial de reciclabilidad ya que no se observó en ninguno de los casos una caída considerable en la conversión a los respectivos productos incluso después de 10 reúsos consecutivos (Figura 8).



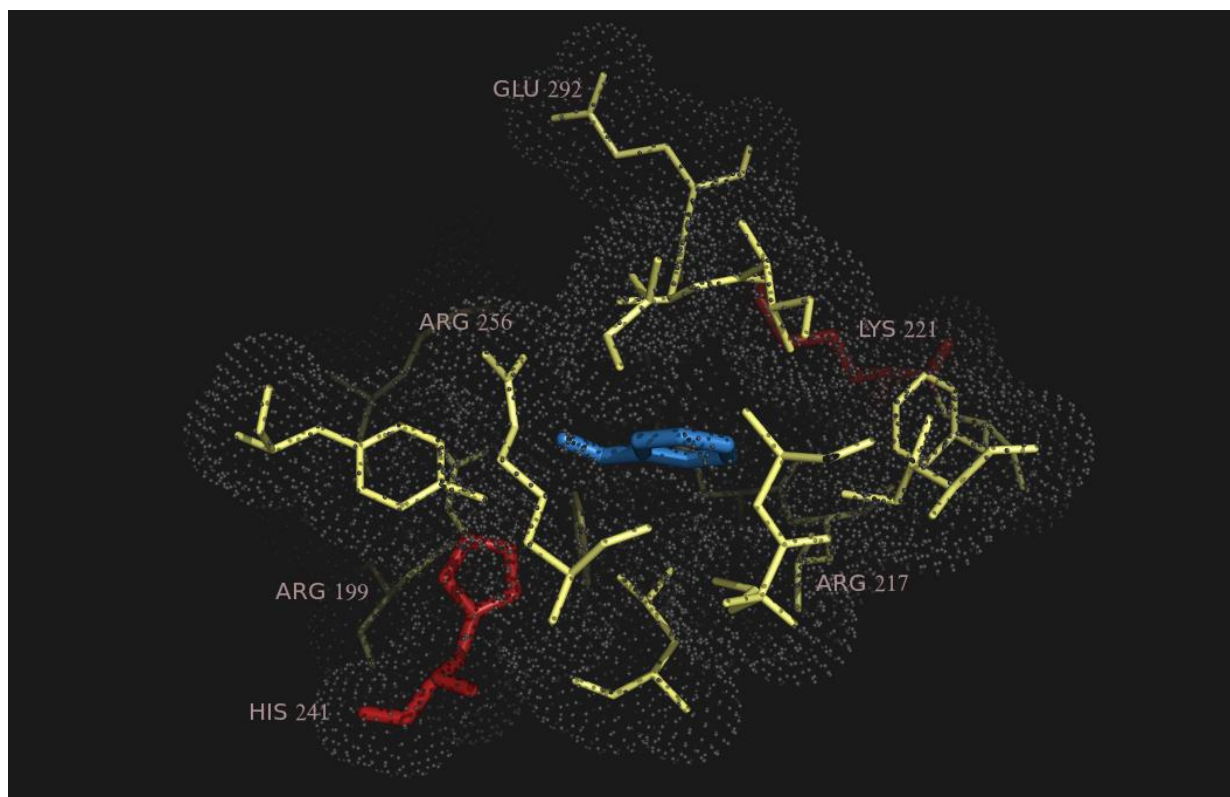
**Figura 8.** Reutilización de BSA utilizando dos sustratos distintos (**1a** y **1d**) a 45°C, para la obtención de las correspondientes enonas (**3a**, **3d**). Para el sustrato **1a** el medio de reacción es acetona/agua 1:1 y el tiempo de reacción, 48 h, mientras que para **1d** es acetona/etanol 1:1 y el tiempo de reacción, 72 h. Conversiones determinadas por HPLC.

### 2.3.6. Mecanismo de la condensación aldólica catalizada por BSA

Haciendo foco en el mecanismo de la reacción, y como se discutió en el Capítulo 1 (Sección 1.3.5), la actividad catalítica de la BSA es atribuida usualmente a la lisina de la posición 222 (221 según datos PDB), un residuo con una  $pK_a$  anormalmente baja y localizado en un bolsillo hidrofóbico del subdominio IIA de la proteína (Albanese y Gaggero 2015; Hollfelder *et al.*, 2000). Para estudiar en mayor

profundidad las características estructurales que posibilitan la catálisis y explorar el entorno del sitio del subdominio IIA, se han llevado a cabo experimentos computacionales en colaboración con el Grupo de Bioinformática Estructural de la Universidad Nacional de Quilmes, dirigido por el Dr. Gustavo Parisi. Se utilizó una estructura de BSA de referencia (PDB ID:40r0) y el software Fpocket (Schmidtke *et al.*, 2010) para explorar las propiedades bioquímicas de las cavidades de la albúmina. Se encontró una cavidad de gran tamaño (de un volumen de 2849,9 Å<sup>3</sup>) que a la vez muestra una polaridad elevada y contiene un residuo de lisina y otro de histidina anormalmente ácidos (Lis-221, pK<sub>a</sub>=7,8; His-241 pK<sub>a</sub>=1,4). Hasta el presente trabajo no se encuentra en bibliografía referencia a la existencia de esta histidina de pK<sub>a</sub> anómalo en BSA y se sabe que el comportamiento ácido-base anómalo de los residuos contribuye a los mecanismos catalíticos de diversas enzimas (Gutteridge y Thornton, 2005). La cavidad mencionada se une a la vez con otra más pequeña (1127,1 Å<sup>3</sup>) de mayor hidrofobicidad y conectada con la superficie de la proteína mediante un largo túnel que probablemente facilita el tránsito de los sustratos entre la superficie y las cavidades. Tomando en consideración los trabajos previos sobre promiscuidad de la BSA, el trabajo desarrollado en este capítulo y las características estructurales de la BSA mencionadas previamente, se realizó un ensayo de *docking* molecular exploratorio enfocado en estas cavidades. Los sustratos ensayados mostraron un promedio de 28 interacciones interatómicas y de Van der Waals con los residuos Arg-256, Arg-217, Lis-221, Glu-292 y Arg-199 (Figura 9). Llamativamente, únicamente los nitrobenzaldehídos **1e** y **1f**, que dieron lugar a una mezcla de cetoles y enonas en las reacciones ensayadas, mostraron ausencia de contactos con los residuos de las cavidades estudiadas. En síntesis, la existencia de cavidades y un túnel, así como también de aminoácidos con valores de pK<sub>a</sub> anormales, sugieren que esta zona del subdominio IIA de la BSA posee características para actuar como un sitio activo.





**Figura 9.** Benzaldehído (en azul) en la cavidad mayor del sitio de unión del subdominio IIA de BSA. En amarillo, los residuos Arg-256, Arg-217, Glu-292 y Arg-199. En rojo, la lisina anormalmente ácida Lis-221 ( $pK_a$  7,8) y la histidina anormalmente ácida His-241 ( $pK_a$  1,4).

## 2.4. Conclusiones

Los resultados descritos en este capítulo son la base de un procedimiento simple y suave para obtener cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas a partir de aldehídos aromáticos y acetona con valores elevados de conversión (88-97%), a excepción de las enonas obtenidas a partir del *m*- y *p*-nitrobenzaldehído (32-37%). Este procedimiento contrasta con las condiciones básicas del método tradicional por catálisis química y es una alternativa ventajosa a los escasos antecedentes de catálisis de condensación aldólica por BSA, comentados en este capítulo. Se observaron diferencias en los rendimientos dependiendo del sustituyente del aldehído, pero sólo se evidenció una caída en el rendimiento en los benzaldehídos sustituidos con un grupo nitro. Esto abre la puerta a ensayar diferentes cetonas en la condensación aldólica cruzada, que se describirá en el Capítulo 3 de la presente tesis. Como se describió en la introducción, los biocatalizadores requieren una optimización de las condiciones de reacción y en este

trabajo se logró hacerlo de manera satisfactoria. Se determinó que para la mayoría de los sustratos ensayados es preferible usar agua como cosolvente mientras que para el *p*-cianobenzaldehído el etanol da mejores resultados. Al utilizar *p*-nitrobenzaldehído no se observa diferencia de selectividad entre el uso de agua o etanol como cosolvente. Las condiciones suaves de reacción del procedimiento presentado en este capítulo contrastan con las de la condensación aldólica clásica: medio básico y temperaturas elevadas. Estas características tienen potencial para aplicar este procedimiento a la condensación aldólica de reactivos lábiles en medio básico o a altas temperaturas. Además, este método evita el uso de reactivos costosos y contaminantes como los que se utilizan en estrategias sintéticas ya reportadas. También es destacable el gran potencial de reúso del biocatalizador, por su elevada estabilidad.

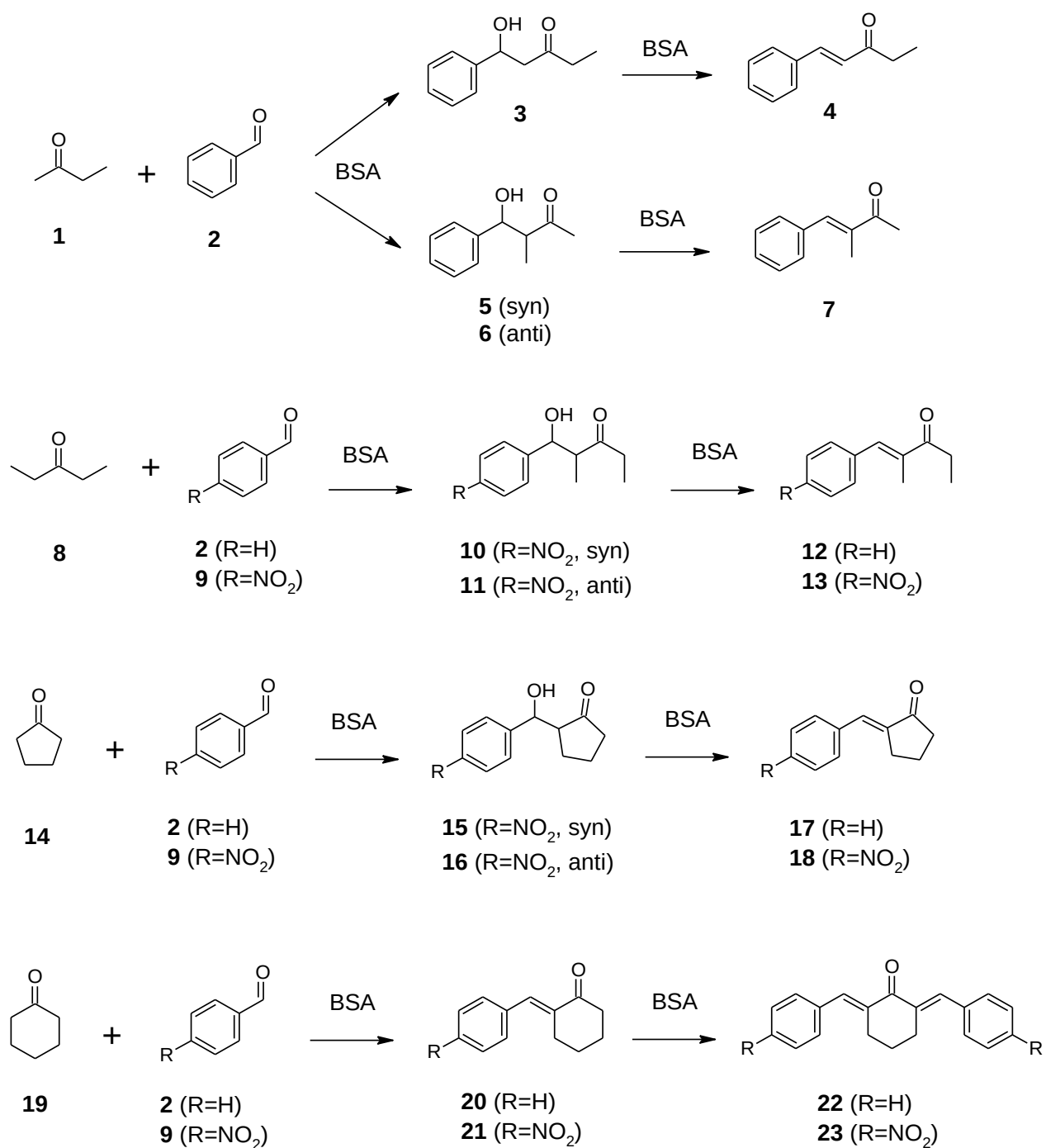
## Capítulo 3

Extensión de la condensación aldólica  
cruzada catalizada por BSA a otras  
cetonas

### 3.1. Introducción

En el Capítulo 2 se reportó la preparación de cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas catalizada por BSA a partir de acetona y benzaldehídos sustituidos, utilizando solventes económicos y compatibles con el medio ambiente, como agua y etanol. Se obtuvieron elevados rendimientos en enonas (88 a 97%) con la excepción de los nitrobenzaldehídos ensayados, los cuales dieron una mezcla de enonas y cetoles. Además, se mostró que la BSA también cataliza el paso de deshidratación de la condensación aldólica. La búsqueda bibliográfica reveló que únicamente la acetona fue reportada como dadora en la condensación aldólica catalizada por BSA, lo que nos impulsó a estudiar esta reacción con otras cetonas y así, adquirir un mayor conocimiento sobre el alcance estructural de esta reacción biocatalizada. Actualmente, predecir el comportamiento de un sustrato en una reacción biocatalizada es muy limitado. Esto puede ilustrarse con este ejemplo: en la aplicación de lipasa de páncreas porcino (PPL) como catalizador promiscuo de reacciones aldólicas, empleando solventes eutécticos profundos (DES, *deep eutectic solvents*), para un determinado aldehído la reacción produce mayoritariamente el cetol pero la proporción de enona que se forma depende de la cetona ensayada (González-Martínez *et al.*, 2016). Además, la predicción de la selección del biocatalizador y los solventes más adecuados para una determinada biotransformación también es limitada. Por ejemplo, y como ya se mencionó en el Capítulo 1 (sección 1.4.2), se ha informado que la reacción de acetona y *p*-nitrobenzaldehído en DES catalizada por BSA produce una mezcla de cetol y enona sin selectividad o con baja selectividad (Milker *et al.*, 2019), lo que contrasta con los resultados obtenidos con PPL como catalizador, ya comentados (González-Martínez *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta las limitaciones para predecir el desempeño de un sustrato, el potencial de la promiscuidad enzimática de brindar un procedimiento suave para obtener cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas y la importancia de desarrollar procedimientos que utilicen medios de reacción económicos y ambientalmente compatibles, en el presente capítulo se presenta el estudio de la condensación aldólica catalizada por BSA, extendida a un conjunto de cetonas (Esquema 1).



**Esquema 1.** Condensación aldólica cruzada de un conjunto de cetonas catalizada por BSA.

## 3.2. Materiales y métodos

### 3.2.1. General

Todos los reactivos y solventes fueron de grado analítico y obtenidos de proveedores comerciales. La albúmina de suero bovino (BSA) se compró a Sigma-Aldrich (fracción V) y se utilizó directamente sin purificación, excepto para los experimentos de control. Para el ensayo de control con BSA desnaturalizada, se agitó BSA (100 mg) en una solución acuosa de urea 8 M (2 ml) durante 24 h a 100 °C, luego se evaporó a presión reducida. La urea se removió por lavados con acetona/agua 1:1 (3 x 5 ml) y finalmente, la proteína se secó.

El benzaldehído se purificó por filtración sobre óxido de aluminio básico seguido de destilación. Se utilizó etanol absoluto y la acetona se secó y destiló sobre carbonato de potasio. La butanona y la 3-pentanona fueron destiladas antes de usar.

Para el seguimiento de las reacciones en escala analítica se utilizó cromatografía en placa delgada (CCD) mediante placas de Silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck). El solvente de desarrollo fue hexano:acetato de etilo 70:30 v/v y las placas se revelaron con luz UV. Las purificaciones a escala preparativa se realizaron por cromatografía en columna mediante el uso de Silicagel 60 de 0,04 – 0,063 mm (Merck). Las concentraciones de las mezclas de solventes de elución empleadas se expresan en % v/v (Sección 3.2.2). Los análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se hicieron mediante una columna de fase reversa C18 (150 mm de largo, 5,6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula) y un volumen de inyección de 20 µl. Se utilizaron equipos de HPLC modelos Beckman System Gold 125-166 y Gilson Pump 321 Autosampler 234. El análisis de las alícuotas de las biotransformaciones de **1** y **2** se hizo aplicando un gradiente de 5 min desde una proporción metanol/agua 30:70 v/v (5 min) a 50:50 v/v (5 min), seguido de un gradiente de 7 min hasta metanol puro (2min) a un flujo de 0,9 ml min<sup>-1</sup> y detección a 274 nm. Los tiempos de retención fueron: **3**: 16,3 min; **4**: 22,1 min; **5**: 14,8 min; **7**: 22,3 min. Las muestras provenientes de los sustratos **8**, **14** y **19** fueron analizadas por un gradiente de 8 min de los mismos solventes desde 50:50 v/v (2 min) a metanol puro (3 min), al mismo flujo y detección a 254 nm. Los tiempos de retención fueron: **10+11**: 13,3 min; **12**: 15,3 min; **13**: 14,5 min; **15+16**: 6,1 min; **17**: 13,1 min; **18**: 13,5 min; **20**: 7,6 min; **21**: 14,5 min; **22**: 9,0 min; **23**: 16,1 min.

Para determinar el exceso enantiomérico se utilizó un cromatógrafo gaseoso (GC) Thermo modelo Trace 1300 con una columna capilar CP-Chirasil-Dex (25 m de largo, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de film). Las condiciones de análisis fueron: 100 °C de temperatura inicial del horno (1 min), luego un incremento hasta 185 °C (5 min) manteniéndose por 25 min; volumen de inyección: 2 µl.

Los espectros de  $^1\text{H}$ -NMR y  $^{13}\text{C}$ -NMR se obtuvieron con un espectrómetro Bruker Avance II a 500 y 125 MHz respectivamente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en partes por millón (ppm) utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia y cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como solvente. Las abreviaturas utilizadas para indicar la multiplicidad son: s, singulete; d, doblete; ddd, doble doblete; dt, doble triplete; t, triplete; td, triple doblete; q, cuádruplete, qd, cuádruple doblete; p, pentuplete; m, multiplete; br, señal ancha. En los casos en que fue necesario se hicieron espectros bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, que permitieron la asignación de las señales.

Los ensayos cinéticos presentados en este Capítulo se llevaron a cabo por medición de absorción a 330 nm en un lector de placas Cytation 5.

### 3.2.2. Procedimiento general para la condensación aldólica catalizada por BSA en escala analítica

Para los experimentos en escala analítica se usaron 0,05 mmol de aldehído y la cantidad de cetona indicada en cada caso, en un volumen de 1 ml de solvente o mezclas de solventes; a partir de los resultados obtenidos presentados en el Capítulo 2, se decidió utilizar en todos los ensayos 54 mg de BSA. Las mezclas se agitaron a 200 rpm a la temperatura que se indica en cada caso. El seguimiento del avance de las reacciones se hizo mediante la toma de alícuotas a distintos tiempos de reacción y tras su centrifugado, analizando por CCD y HPLC.

### 3.2.3. Procedimiento a escala preparativa para las condensaciones aldólicas biocatalizadas de butanona (**1**) y 3-pentanona (**8**)

De acuerdo con el procedimiento en escala analítica, las biotransformaciones en escala preparativa se realizaron con mezclas formadas por una solución del aldehído (**2**, **9**; 0,5 mmol) y la cetona (**1**, **8**; según la concentración indicada en las secciones 3.2.4 a 3.2.6) en el solvente o mezclas de solventes (volumen final: 10 ml) y BSA (540 mg). Las mezclas se agitaron a 45°C y 200 rpm durante los tiempos indicados en cada caso, luego se filtraron y la BSA se lavó con etanol (5 ml). Se eliminaron los solventes por evaporación a presión reducida y los evaporados se purificaron por cromatografía en columna de silicagel. Los productos resultantes, que se listan a continuación, fueron aislados por elución con los solventes indicados, obteniéndose los rendimientos presentados en cada caso. Se detallan además los datos de RMN utilizados para la elucidación estructural de los productos.

### 3.2.4. A partir de butanona y benzaldehído

Para obtener las enonas (*E*)-1-fenil-1-penten-3-ona (**4**, Esquema 1) y (*E*)-3-metil-4-fenil-3-buten-2-ona (**7**) se emplearon las siguientes condiciones:

- Solvente y tiempo de reacción: butanona/agua 50:50, 168 h.  $R_f = 0,52$  (hexano/acetato de etilo 80:20)
- Solvente de elución en cromatografía en columna: tolueno. Rendimiento en enonas **4** + **7** (relación **4/7** = 3,7; ver sección 3.3.1) = 33%

Caracterización espectral:

$^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  1,20 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H, H5, **4**), 2,08 (d,  $J = 1,1$  Hz, 3H,  $\text{C}=\text{CCH}_3$ , **7**), 2,49 (s, 3H, H1, **7**), 2,73 (q,  $J = 7,3$  Hz, 2H, H4, **4**), 6,78 (d,  $J = 16,2$  Hz, 1H, H2, **4**), 7,44 (m, 12H, Ar-Hs **4,7**; H1, **4**; H4, **7**).

Los cetoes 1-hidroxi-1-fenil-3-pentanona (**3**) y *syn*-4-hidroxi-3-metil-4-fenil-2-butanona (**5**) se obtuvieron bajo las siguientes condiciones:

- Solvente y tiempo de reacción: butanona/agua 50:50, 168 h.  $R_f = 0,21$  (hexano/acetato de etilo 80:20)
- Solvente de elución: tolueno. Rendimiento: 9% de cetoes **5** + **3** (relación **5/3** = 2,1; ver sección 3.3.1)

Caracterización espectral:

$^1\text{H}$  NMR: 1,09 (d,  $J = 7,3$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ , **5**), 1,12 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H, H5, **3**), 2,18 (s, 3H, H1, **5**), 2,49 (q,  $J = 7,3$  Hz, 2H, H4, **3**), 2,86 (m, 3H; H2, **3** + H3, **5**), 3,23 (2  $s_{br}$ , 2H, -OHs **3, 5**), 5,14 (d,  $J = 3,8$  Hz, 1H, H4, **5**), 5,19 (dd,  $J_1 = 9,0$ ,  $J_2 = 3,4$  Hz, 1H, H1, **3**), 7,38 (m, 10H, Ar-Hs **3, 5**).

Finalmente, bajo las mismas condiciones utilizadas para eluir los cetoes **3** y **5**, por posterior elución se obtuvo el cetol *anti*-4-hidroxi-3-metil-4-fenil-2-butanona (**6**) (Rendimiento: 3%.  $R_f = 0,20$  (hexano/acetato de etilo 80:20)

Caracterización espectral:

$^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  0,97 (d,  $J = 7,2$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1,28 (s, 1H, OH), 2,25 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2,96 (m, 1H, H3), 4,78 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H, H4), 7,35 (m, 5H, Ar-H).  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  14,13 ( $\text{CHCH}_3$ ), 30,07 ( $\text{COCH}_3$ ), 53,67 (C3), 76,56 (C4), 126,64, 128,04, 128,53 (C2', C3', C4'), 141,90 (C1'), 213,43 (CO).



### 3.2.5. A partir de 3-pentanona y benzaldehído

Para obtener (*E*)-2-metil-1-fenil-1-penten-3-ona (**12**) se utilizaron las siguientes condiciones:

- Solvente de reacción y tiempo: 3-pentanona/etanol 20:80, 48 h.  $R_f$ : 0,60 (hexano/acetato de etilo 70:30)
- Solvente de elución en cromatografía en columna: hexano/acetato de etilo 95:5. Rendimiento: 31%.

Caracterización espectral:

$^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  1,21 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H, H5), 2,10 (d,  $J = 1,4$  Hz, 3H,  $\text{C}=\text{CCH}_3$ ), 2,87 (q,  $J = 7,3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,36 (m, 1H, H4'), 7,44 (d,  $J = 4,5$  Hz, 4H, H2', H3'), 7,56 (d,  $J = 1,2$  Hz, 1H,  $\text{C}=\text{CHPh}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  8,86 (C5), 13,22 ( $\text{C}=\text{CCH}_3$ ), 30,79 (C4), 128,40, 128,42, 129,67 (C2', C3', C4'), 136,05 (C1'), 137,21 (C2), 138,17 (C1), 202,96 (CO).

### 3.2.6. A partir de 3-pentanona y *p*-nitrobenzaldehído

Para obtener (*E*)-2-metil-1-(4-nitrofenil)-1-penten-3-ona (**13**) se utilizaron las siguientes condiciones:

- Solvente y tiempo de reacción: 3-pentanona/etanol 20:80, 96 h.  $R_f$ : 0,31 (hexano/acetato de etilo 80:20)
- Solvente de elución: hexano/acetato de etilo 95:5. Rendimiento: 19%.

Caracterización espectral:

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  1,19 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H, H5), 2,07 (d,  $J = 1,4$  Hz, 3H,  $\text{C}=\text{CCH}_3$ ), 2,86 (q,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,52 (s, 1H, H1), 7,55 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H, H2'), 8,27 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H, H3').  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  8,58 (C5), 13,49 ( $\text{C}=\text{CCH}_3$ ), 31,10 (C4), 123,68 (C3'), 130,23 (C2'), 135,07 (C1), 140,15, 142,68 (C2, C1'), 147,23 (C4'), 202,33 (CO).

Por posterior elución, bajo las mismas condiciones, se obtuvo la mezcla de los siguientes cetoles: *syn*-1-hidroxi-2-metil-1-(4-nitrofenil)-3-pentanona (**10**) y *anti*-1-hidroxi-2-metil-1-(4-nitrofenil)-3-pentanona (**11**). Se registraron los siguientes resultados:

- Rendimiento: 32% (relación **10/11** = 2,3, ver sección 3.3.3.  $R_f$  = 0,14 (hexano/acetato de etilo 80:20)

Caracterización espectral:

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  1,05 (m, 12H, H5,  $\text{CHCH}_3$ , **10**, **11**), 2,45 (m, 2H, H4, **10**, **11**), 2,60 (m, 2H, H4, **10**, **11**), 2,84 (qd, J = 7,3, 3,1 Hz, 1H, H2, **10**), 2,93 (p, J = 7,3 Hz, 1H, H2, **11**), 4,89 (d, J = 7,6 Hz, 1H, H1, **11**), 5,24 (d, J = 3,1 Hz, 1H, H1, **10**), 7,51 (d, J = 8,9 Hz, 4H, H2', **10**, **11**), 8,21 (2d, J = 8,8, 3,3 Hz, 4H, H3', **10**, **11**).

### 3.2.7. Procedimiento a escala preparativa para las condensaciones aldólicas biocatalizadas de ciclohexanona (**14**) y ciclopentanona (**19**)

En base al procedimiento en escala analítica, se realizaron biotransformaciones en escala preparativa que consistieron en mezclas de BSA (540 mg) y una solución de aldehído (**2**, **9**; 0,5 mmol) y cetona (**14**, **19**, 1,0 mmol) en etanol (volumen total de reacción: 10 ml). Estas mezclas fueron agitadas a 45°C y 200 rpm durante el tiempo indicado en cada caso, luego se trataron de manera análoga a la descrita en la sección 3.2.3. Los productos siguientes fueron aislados por cromatografía en columna de silicagel, eluyéndose con los solventes indicados y obteniéndose los rendimientos que se informan junto con la elucidación por RMN de dichos productos.

### 3.2.8. A partir de ciclohexanona y benzaldehído

Para obtener (*E*)-2-bencilidenciclohexanona (**20**) se utilizaron las siguientes condiciones:

- Tiempo de reacción: 120 h, solvente de elución: hexano/acetato de etilo 98:2
- Rendimiento: 26%,  $R_f$  = 0,58 (hexano/acetato de etilo 70:30)

Caracterización espectral:

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  1,79 (m, 2H, H4), 1,96 (m, 2H, H5), 2,56 (t, J = 6,7 Hz, 2H, H6), 2,87 (td, J = 6,5, 2,2 Hz, 2H, H3), 7,41 (m, 5H, H2'', H3'', H4''), 7,52 (t, J = 2,2 Hz, 1H, H1').

$^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  23,40, 23,90 (C4, C5), 28,96 (C3), 40,36 (C6), 128,35, 128,54 (C2'', C4''), 130,31 (C3''), 135,60 (C1''), 135,63 (C1'), 136,70 (C2), 201,81 (C1).

Por posterior elución se obtuvo la *bis*-enona (2*E*, 6*E*)-2,6-dibencilidenciclohexanona (**22**) con 11% de rendimiento,  $R_f$  = 0,62 (hexano/acetato de etilo 70:30).

Caracterización espectral:

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  1,83 (m, 2H, H4), 2,96 (m, 4H, H3), 7,43 (m, 10H, H2'', H3'', H4''), 7,83 (s, 2H, H1).

$^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  23,04 (C4), 28,48 (C3), 128,60 (C4''), 128,40, 130,38 (C2'', C3''), 136,00 (C1'), 136,21 (C1''), 136,97 (C2), 190,43 (C1).

### 3.2.9. A partir de ciclohexanona y *p*-nitrobenzaldehído

Para obtener (*E*)-2-(4-nitrobenciliden)ciclohexanona (**21**) se utilizaron las siguientes condiciones:

- Tiempo de reacción: 96 h, solvente de elución: tolueno, rendimiento: 74%,  $R_f = 0,26$  (tolueno)

Caracterización espectral:

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  1,83 (m, 2H, H4), 1,98 (m, 2H, H5), 2,60 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H, H6), 2,84 (td,  $J = 6,5, 2,2$  Hz, 2H, H3), 7,48 (t,  $J = 2,1$  Hz, 1H, H1'), 7,54 (d,  $J = 5,4$  Hz, 2H, H2''), 8,26 (dt,  $J = 8,8, 2,4$  Hz, 2H, H3'').

$^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  23,32 (C5), 23,76 (C4), 29,06 (C3), 40,45 (C6), 123,58 (C3''), 130,69 (C2''), 132,00 (C1'), 139,94 (C1''), 142,19 (C2), 147,19 (C4''), 201,34 (C1).

Por posterior elución se obtuvo la *bis*-enona (2*E*, 6*E*)-2,6-*bis*(4-nitrobenciliden)ciclohexanona (**23**) con 12% de rendimiento ( $R_f = 0,30$  (hexano/acetato de etilo 70:30)).

Caracterización espectral:

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  1,88 (m, 2H, H4), 2,96 (m, 4H, H3), 7,62 (d,  $J = 8,7$  Hz, 4H, H2''), 7,82 (s, 2H, H1'), 8,28 (m, 4H, H3'').

$^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  22,53 (C4), 28,36 (C3), 123,67 (C3''), 130,9 (C2''), 134,87 (C1'), 138,67 (C1''), 142,13 (C2), 147,35 (C4''), 189,21 (C1).

### 3.2.10. A partir de ciclopentanona y benzaldehído

Para obtener (*E*)-2-bencilidenciclopentanona (**17**) se utilizaron las siguientes condiciones:

- Tiempo de reacción: 144 h, solvente de elución: hexano/acetato de etilo 98:2
- Rendimiento: 28%,  $R_f = 0,62$  (hexano/acetato de etilo 80:20)

Caracterización espectral:

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  2,06 (m, 2H, H4), 2,44 (t,  $J = 7,9$  Hz, 2H, H5), 3,01 (td,  $J = 7,2, 2,7$  Hz, 2H, H3), 7,41 (m, 4H, H2'', H3''), 7,56 (m, 2H, H1', H4'')

$^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  20,20 (C4), 29,36 (C5), 37,80 (C3), 128,69, 129,31, 130,50 (C2'', C3'', C4''), 132,31 (C1'), 135,54 (C1''), 136,06 (C2), 208,13 (C1).

### 3.2.11. A partir de ciclopentanona y *p*-nitrobenzaldehído

Para obtener (*E*)-2-(4-nitrobenciliden)ciclopentanona (**18**) se utilizaron las siguientes condiciones:

- Tiempo de reacción: 48 h, solvente de elución: hexano/acetato de etilo 94:6

- Rendimiento: 22%,  $R_f = 0,48$  (hexano/acetato de etilo 70:30)

Caracterización espectral:

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  2,11 (m, 2H, H4), 2,48 (t,  $J = 7,9$  Hz, 2H, H5), 3,03 (td,  $J = 7,2, 2,8$  Hz, 2H, H3), 7,41 (t,  $J = 2,8$  Hz, 1H, H1'), 7,69 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H, H3''), 8,29 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H, H2'')

$^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  20,08 (C4), 29,42 (C5), 37,68 (C3), 123,89 (C2''), 129,32 (C1'), 130,81 (C3''), 139,88 (C1''), 141,94 (C4''), 147,55 (C2), 207,35 (C1).

Por posterior elución se obtuvo la mezcla de los cetoles: *syn*-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil]ciclopentanona (**15**) y *anti*-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil]ciclopentanona (**16**) con los siguiente resultados:

- Rendimiento: 31% (relación **15/16** = 1,9; ver sección 3.3.3,  $R_f = 0,26$  (hexano/acetato de etilo 70:30).

Caracterización espectral:

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  1,66 (m, 2H, H3, **16**), 1,75 (m, 2H, H3, **15**), 2,02 (m, 4H, H4, **15, 16**), 2,18 (m, 4H, H5, **15, 16**), 2,37 (m, 1H, H2, **16**), 2,51 (m, 1H, H2, **15**), 4,87 (d,  $J = 9,1$  Hz, 1H, H1', **16**), 5,45 (d,  $J = 2,9$  Hz, 1 H, H1', **15**), 7,55 (m, 4H, H2'', **15, 16**), 8,26 (m, 4H, H3'', **15, 16**).

### 3.2.12. Cinética de la condensación catalizada por BSA de ciclohexanona y *p*-nitrobenzaldehído

Para el estudio de la cinética de reacción se agregaron 54 mg de BSA a una solución de ciclohexanona y *p*-nitrobenzaldehído en etanol (1 ml volumen total). La concentración de ciclohexanona se mantuvo fija en cuatro valores: 0,3; 0,6; 1 y 5 M, mientras que en cada caso se ensayaron ocho concentraciones de *p*-nitrobenzaldehído: 1, 5, 25, 50, 75, 100, 150 y 300 mM. Los sistemas se agitaron a 45°C y se obtuvieron las velocidades iniciales por medición de la conversión a enona durante las primeras 10 h de reacción. Para ello se tomaron muestras a distintos tiempos de reacción y se diluyeron con etanol en relaciones 1:10, 1:20 o 1:40 dependiendo de la concentración obtenida, previamente a la lectura de absorción a 330 nm en un lector de placas Cytation 5. Los experimentos de control se llevaron a cabo con las correspondientes mezclas de reacción sin BSA. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se muestran en las Figuras 6 y 7.

### 3.3. Resultados y discusión

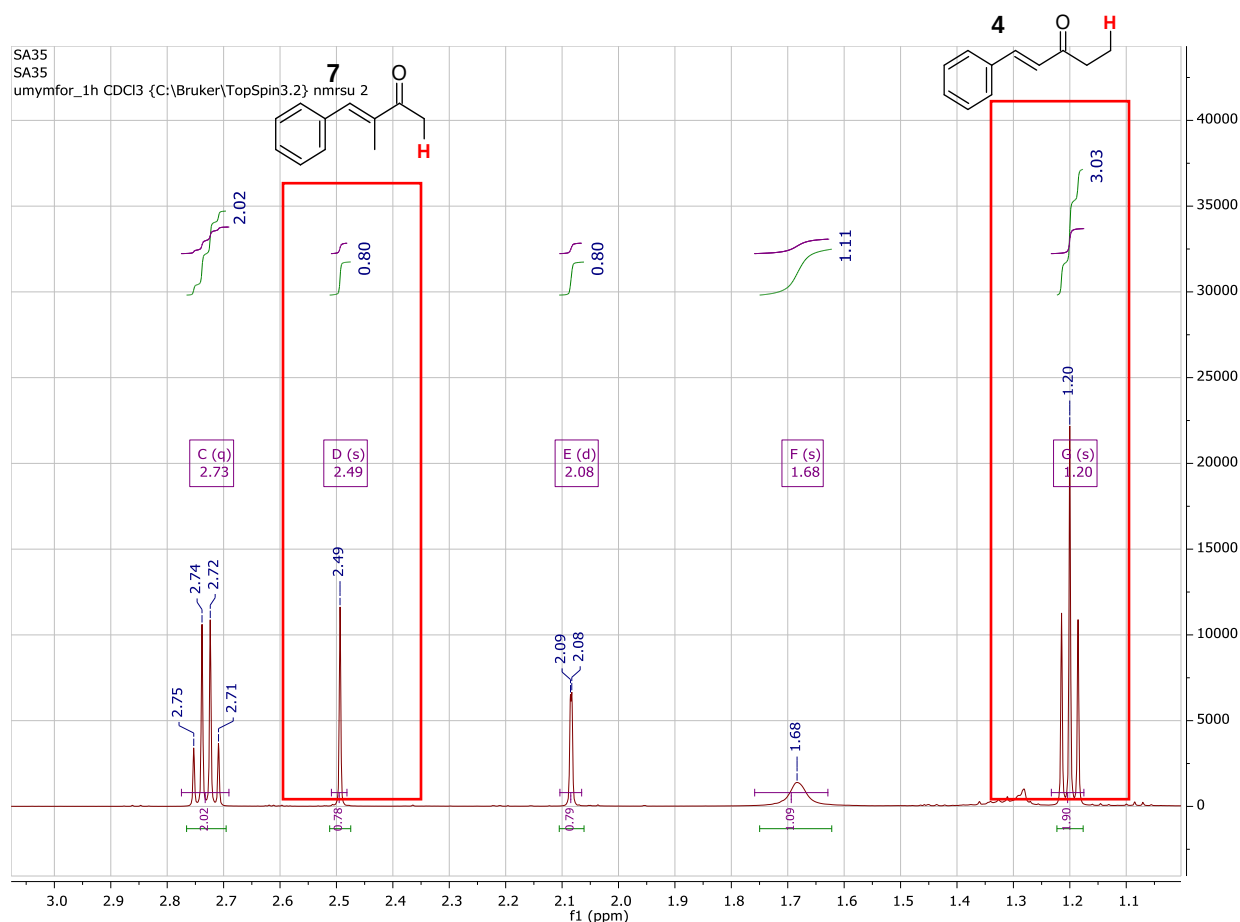
#### 3.3.1. Condensación aldólica cruzada de butanona (**1**) catalizada por BSA

Debido a la presencia de dos tipos de hidrógenos  $\alpha$  al carbonilo en la butanona (**1**), en la condensación aldólica de esta cetona generalmente se obtiene una mezcla compleja de enonas y cetoles regioisoméricos y, a su vez, mezclas de diasterómeros (Müller *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2013). Por esta razón, encontrar metodologías y condiciones de reacción alternativas al medio básico en que habitualmente se lleva a cabo esta reacción es de interés para mejorar su selectividad. En cuanto a la promiscuidad enzimática, los dos únicos trabajos publicados con butanona como sustrato reportan la condensación aldólica cruzada con *p*-nitrobenzaldehído. En uno de estos trabajos se usa como catalizador pepsina, que conduce a la formación de un cetol (4-hidroxi-3-metil-4-(4-nitrofenil)-2-butanona) con un 25 % de rendimiento (Li *et al.*, 2010). En el otro trabajo se utiliza una esterasa termofílica (de *Aeropyrum pernix*) en heptano, dando un 69% de conversión al cetol isómero 1-hidroxi-1-(4-nitrofenil)-3-pentanona, con un exceso enantiomérico del 71% (Haoran *et al.*, 2014).

En base a los antecedentes discutidos en las líneas anteriores, se decidió ensayar la condensación aldólica cruzada de butanona y benzaldehído (Esquema 1, Tabla 1). En butanona pura no se observó aparición de producto (Tabla 1, Entrada 1, pág. 52). Como en el Capítulo 2 se mostró que la conversión de la condensación aldólica entre acetona y benzaldehído depende en gran medida del contenido de alcohol y agua en el medio de reacción, se decidió realizar un *screening* de mezclas binarias y ternarias de solventes para la reacción de benzaldehído y butanona presentada en el Esquema 1. En el estudio presentado en el Capítulo 2 la mejor conversión a enona se alcanzó a una temperatura de 45°C y esta fue la temperatura de los ensayos presentados en este Capítulo.

De las mezclas butanona/agua ensayadas (Entradas 2-10) únicamente la proporción butanona/agua 1:1 fue bifásica, y en todos los casos se observaron conversiones bajas o muy bajas, a mezclas de cetoles (**3**, **5** y **6**) y enonas (**4** y **7**), cuyo componente mayoritario fue la enona **4**. En las mezclas butanona/etanol (Entradas 11-17 y 21) la conversión dependió notablemente del contenido de etanol. Las mezclas con menores proporciones de etanol (Entradas 11 y 12) dieron bajas conversiones mientras que en las mezclas con 50-90% se obtuvo conversión cuantitativa (Entradas 14-17 y 22). El producto principal fue la enona **4** (81-88% conversión), con una regioselectividad moderada (relación enona **4**/ enona **7** = 5-8). Además, cabe señalar que se realizaron ensayos de control sin biocatalizador y con el biocatalizador tratado previamente con urea a 100 °C y los resultados se muestran en las Entradas 19 y 20. La reacción no ocurre en ausencia de BSA (Entrada 19) y el tratamiento con urea a 100°C disminuye

considerablemente la actividad catalítica de la proteína (Entrada 20), lo que indica que la estructura terciaria es necesaria para la biocatálisis, en concordancia con los resultados de los ensayos de control presentados en el Capítulo 2 (pág. 46). Por otra parte, las mezclas terciarias butanona/agua/etanol (Entradas 23-30) dieron mezclas de cetoles y enonas.



**Figura 1.** Región de campos altos del espectro RMN-<sup>1</sup>H de la mezcla de enonas **4** y **7**. Se resaltan las señales correspondientes a los hidrógenos del carbono 1 de la enona **7** y los hidrógenos del carbono 5 de la enona **4**, utilizadas para calcular la proporción de las enonas de dicha muestra.

Dado que las enonas **4** y **7** (provenientes de la condensación aldólica preparativa llevada a cabo en butanona/agua 50:50 a 168 h (pág. 63) coeluyeron en la separación por cromatografía en columna de silicagel, se recurrió a los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de esta mezcla (Figura 1) para hallar la relación molar entre ambas. Se utilizaron las integraciones de la señal de los hidrógenos del carbono 5 de la enona **4** (3 hidrógenos) y de los hidrógenos del carbono 1 de la enona **7** (3 hidrógenos), obteniéndose una relación **4/7** = 3,8. Luego se analizó por HPLC la misma mezcla de enonas, confirmándose que la relación entre las

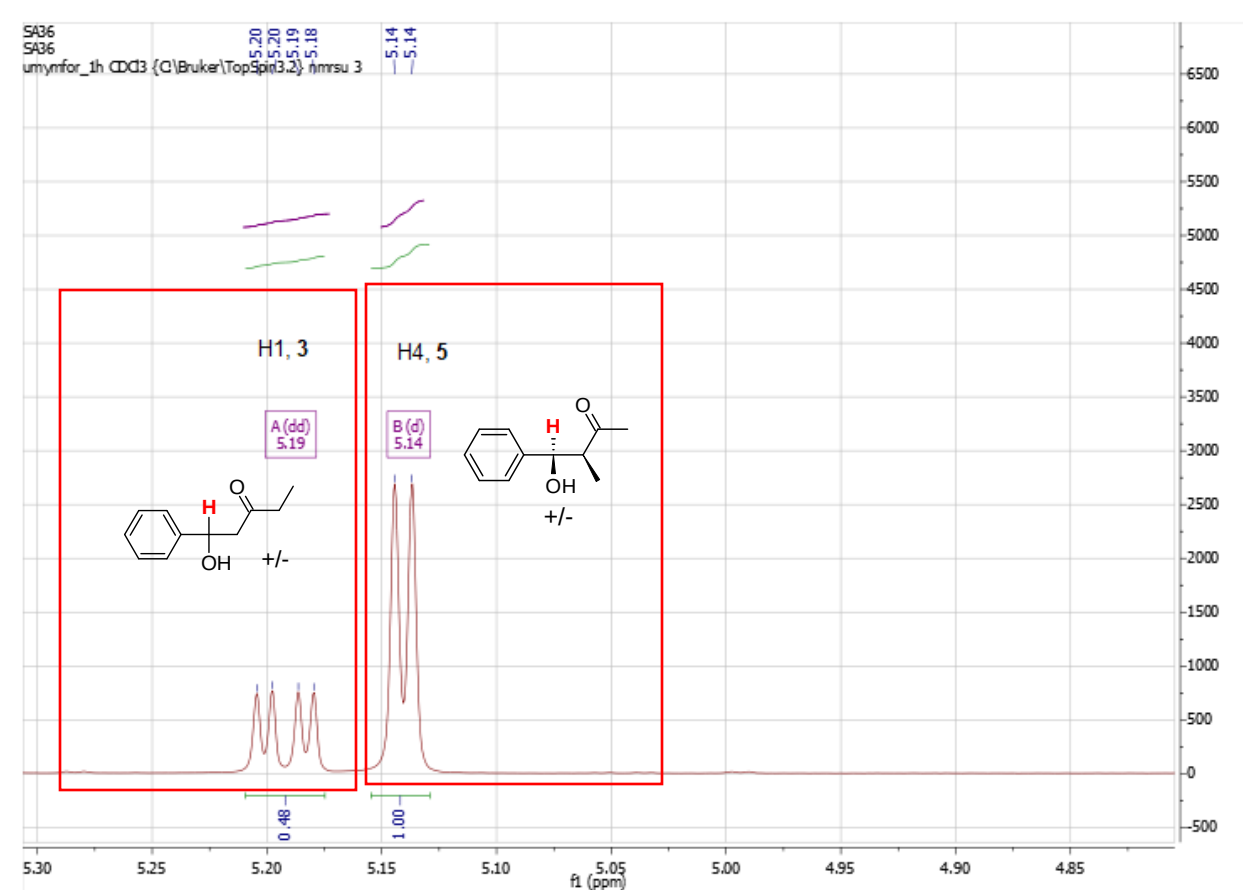
áreas de los picos más intensos (Figura 2) coincide con la relación de masas entre ambos compuestos obtenida a partir del análisis del espectro RMN de dicha mezcla.

**Det 166 Results**

| Time   | Area    | Area % | Height | Height % |
|--------|---------|--------|--------|----------|
| 21.917 | 168497  | 2.43   | 24865  | 2.49     |
| 22.125 | 5383186 | 77.61  | 767174 | 76.76    |
| 22.325 | 1384534 | 19.96  | 207347 | 20.75    |

**Figura 2.** Áreas obtenidas por HPLC de la mezcla de las enonas **4** y **7**, obtenida según sección 3.2.4. La relación entre las áreas de las señales obtenidas a los 22,1 y 22,3 min da un valor (3,7) concordante con el obtenido a partir de las integraciones de áreas de RMN (Figura 1).

Al igual que en el caso de las enonas, los cetoles **3** y **5** (también provenientes de la condensación aldólica preparativa descrita en la sección 3.2.4) coeluyeron luego de las enonas y para su cuantificación se utilizaron las integraciones de las señales en  $^1\text{H}$ -RMN del hidrógeno del carbono 4 del compuesto **5** y del hidrógeno del carbono 1 del compuesto **3** (Figura 3). Se obtuvo una relación  $5/3 = 2,1$ . Por último eluyó el cetol **6**; los datos espectroscópicos de los cetoles se detallaron en la página 63 y concuerdan con los valores de bibliografía (Müller *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Región del espectro RMN-<sup>1</sup>H de la mezcla de cetos 3 y 5. Se resaltan las señales correspondientes al hidrógeno del carbono 1 del cetol 3 y al hidrógeno del carbono 4 del cetol 5, utilizadas para calcular la proporción de los cetos de dicha muestra.

La obtención en mayor proporción de la enona termodinámicamente menos estable (4), obtenida a partir del carbono  $\alpha$  al carbonilo de la butanona menos impedido, podría explicarse por factores estéricos en el sitio catalítico de la BSA. Por otra parte, al utilizar lipasa de páncreas porcino (PPL) como biocatalizador (Entrada 21) se alcanzaron valores altos de conversión a cetos, pero baja conversión a enona. Este resultado muestra que los resultados obtenidos con BSA y PPL son complementarios y pone en evidencia la difícil predicción del comportamiento catalítico de un biocatalizador (pág. 26), lo que suele obligar a realizar *screenings* para poder identificar su actividad catalítica.

Los resultados mostrados en la Tabla 1 indican que el agua no favorece la conversión ni la selectividad de la biotransformación y esto contrasta con lo obtenido en la condensación aldólica catalizada por BSA de acetona y benzaldehído presentada en el Capítulo 2. Es importante mencionar que acortar los tiempos de reacción o disminuir a 30 °C la temperatura no condujo a la producción selectiva de cetos



(Entrada 18). Además, se ensayaron otros solventes: hexano, acetonitrilo, isopropanol y 1-butanol, en mezclas butanona/solvente 20:80). Los resultados con butanona/acetonitrilo 20:80 dieron baja conversión: 27% de enona **4** y 4% de enona **7** a 45°C y 48 h de reacción. No se observó reacción con el resto de los solventes; esto demuestra la influencia crucial del solvente en las reacciones biocatalizadas, como ya se discutió previamente en este trabajo (pág. 26 y 47). En base a los resultados presentados y a su bajo costo e impacto ambiental se eligió al etanol para los experimentos subsiguientes con otras cetonas.

**Tabla 1.** Efecto del solvente en la reacción catalizada por BSA de butanona (**1**) y benzaldehído (**2**) (Esquema 1).

| Entrada <sup>a</sup> | Proporción<br>Butanona/agua/etanol | Conversión a<br>cetol <b>5</b> (%) <sup>b</sup> | Conversión a<br>cetoles <b>3+6</b><br>(%) <sup>b</sup> | Conversión a<br>enona <b>4</b> (%) <sup>b</sup> | Conversión a<br>enona <b>7</b> (%) <sup>b</sup> |
|----------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 1                    | 100:0:0                            | 0                                               | 0                                                      | 0                                               | 0                                               |
| 2                    | 98:2:0                             | 3                                               | 5                                                      | 20                                              | 7                                               |
| 3                    | 96:4:0                             | 1                                               | 3                                                      | 11                                              | 3                                               |
| 4                    | 94:6:0                             | 2                                               | 3                                                      | 11                                              | 3                                               |
| 5                    | 92:8:0                             | 2                                               | 3                                                      | 11                                              | 3                                               |
| 6                    | 90:10:0                            | 1                                               | 2                                                      | 6                                               | 2                                               |
| 7                    | 50:50:0                            | 1                                               | 2                                                      | 4                                               | 1                                               |
| 8                    | 25:75:0                            | 3                                               | 5                                                      | 19                                              | 7                                               |
| 9                    | 10:90:0                            | 2                                               | 4                                                      | 4                                               | 1                                               |
| 10                   | 5:95:0                             | 1                                               | 2                                                      | 2                                               | 0                                               |
| 11                   | 90:0:10                            | 0                                               | 1                                                      | 4                                               | 1                                               |
| 12                   | 80:0:20                            | 1                                               | 2                                                      | 22                                              | 3                                               |
| 13                   | 70:0:30                            | 2                                               | 2                                                      | 41                                              | 43                                              |
| 14                   | 50:0:50                            | 1                                               | 2                                                      | 81                                              | 16                                              |
| 15                   | 40:0:60                            | 1                                               | 1                                                      | 82                                              | 16                                              |
| 16                   | 30:0:70                            | 1                                               | 1                                                      | 82                                              | 15                                              |
| 17                   | 20:0:80                            | 1                                               | 2                                                      | 85                                              | 12                                              |
| 18                   | 20:0:80 <sup>c</sup>               | 1                                               | 3                                                      | 51                                              | 4                                               |
| 19                   | 20:0:80 <sup>d</sup>               | 0                                               | 0                                                      | 0                                               | 0                                               |
| 20                   | 20:0:80 <sup>e</sup>               | 0                                               | 0                                                      | 4                                               | 0                                               |

| Entrada <sup>a</sup> | Proporción<br>Butanona/agua/etanol | Conversión a<br>cetol <b>5</b> (%) <sup>b</sup> | Conversión a<br>cetoles <b>3+6</b><br>(%) <sup>b</sup> | Conversión a<br>enona <b>4</b> (%) <sup>b</sup> | Conversión a<br>enona <b>7</b> (%) <sup>b</sup> |
|----------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 21                   | 20:0:80 <sup>f</sup>               | 0                                               | 61                                                     | 18                                              | 3                                               |
| 22                   | 10:0:90                            | 0                                               | 1                                                      | 88                                              | 11                                              |
| 23                   | 25:5:70                            | 4                                               | 6                                                      | 58                                              | 10                                              |
| 24                   | 25:25:50                           | 3                                               | 5                                                      | 20                                              | 5                                               |
| 25                   | 25:37:37                           | 4                                               | 7                                                      | 17                                              | 5                                               |
| 26                   | 25:50:25                           | 4                                               | 8                                                      | 16                                              | 6                                               |
| 27                   | 25:70:5                            | 7                                               | 10                                                     | 22                                              | 7                                               |
| 28                   | 10:30:60                           | 2                                               | 3                                                      | 10                                              | 3                                               |
| 29                   | 10:45:45                           | 2                                               | 4                                                      | 10                                              | 3                                               |
| 30                   | 10:60:30                           | 4                                               | 8                                                      | 10                                              | 4                                               |

<sup>a</sup> Las reacciones fueron llevadas a cabo a 45°C y 200 rpm, en la mezcla y proporción de solventes indicada (ver Sección 3.2.2). <sup>b</sup> Determinada por HPLC a 48 h, luego de dicho tiempo no se observa variación significativa de la conversión. <sup>c</sup> A 30°C. <sup>d</sup> Sin BSA. <sup>e</sup> Se utilizó BSA tratada previamente con urea, según se detalla en la sección 3.2.1 <sup>f</sup> Se utilizó lipasa de páncreas porcino (PPL) como biocatalizador.

### 3.3.2. Condensación aldólica cruzada de ciclohexanona (**19**) catalizada por BSA

Una vez ensayada la condensación aldólica de butanona que se presentó en el punto anterior, se decidió proseguir el estudio probando ciclohexanona. Con respecto a las reacciones aldólicas de esta cetona catalizadas por enzimas promiscuas, la bibliografía registra reportes previos de la adición cruzada de ciclohexanona con una serie de benzaldehídos, para dar los correspondientes cetoles con rendimientos, diastereo- y enantioselectividad variables (Li *et al.*, 2015). Se utilizaron diferentes biocatalizadores: proteasas tales como quimiopapaína (He *et al.*, 2012), tripsina (Chen *et al.*, 2013) y la proteasa ácida de *Aspergillus usamii* (Xie *et al.*, 2012); también se empleó una nucleasa (Li *et al.*, 2011) y la lipasa de páncreas porcino (Xie *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; González-Martínez *et al.*, 2016). Más recientemente, los resultados obtenidos en la adición aldólica de ciclohexanona catalizada por la lipasa de *Rhizopus niveus* se interpretaron como un caso de catálisis inespecífica (Birolli *et al.*, 2017), como se detalló en la introducción (pág. 30).

La baja volatilidad de la ciclohexanona dificulta la purificación de los productos y por esta razón fue necesario ensayar distintas proporciones molares de los sustratos en la reacción catalizada por BSA de

ciclohexanona y benzaldehído (Esquema 1), con el fin de encontrar la menor concentración de cetona que brinde los resultados más satisfactorios (Tabla 2). Los datos presentados en las Entradas 1-5 muestran que se obtuvo una alta conversión a enona **20** (82-95%) incluso con un bajo exceso de ciclohexanona (82%, Entrada 1). Un resultado inesperado fue la ausencia de producto en la reacción llevada a cabo sin etanol (Entrada 6), que muestra de modo significativo la influencia decisiva del solvente en estas biotransformaciones. También se llevaron a cabo experimentos adicionales para determinar si una inversión en las proporciones de los sustratos podía favorecer la formación de compuestos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -bis-insaturados (*bis*-enonas). Al invertir la proporción y empleando un exceso de benzaldehído (**2**), las entradas 7-9 muestran que la enona **20** sigue siendo el producto mayoritario, lo que podría explicarse teniendo en cuenta que la conversión de enona a *bis* enona podría verse afectada por el impedimento estérico en el sitio catalítico de la BSA.

**Tabla 2.** Efecto de la relación molar de los sustratos en la condensación aldólica catalizada por BSA de ciclohexanona (**19**) y benzaldehído (**2**) (Esquema 1).

| Entrada <sup>a</sup> | Relación molar<br>benzaldehído:ciclohexanona | Conversión a<br>enona <b>20</b> <sup>b</sup> (%) | Conversión a <i>bis</i> -<br>enona <b>22</b> <sup>b</sup> (%) |
|----------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 1                    | 1:2                                          | 82                                               | 15                                                            |
| 2                    | 1:5                                          | 90                                               | 9                                                             |
| 3                    | 1:10                                         | 92                                               | 5                                                             |
| 4                    | 1:20                                         | 95                                               | 3                                                             |
| 5                    | 1:40                                         | 76                                               | 15                                                            |
| 6                    | 1:40 <sup>c</sup>                            | 0                                                | 0                                                             |
| 7                    | 2:1                                          | 82                                               | 18                                                            |
| 8                    | 10:1                                         | 49                                               | 24                                                            |
| 9                    | 20:1                                         | 42                                               | 31                                                            |

<sup>a</sup> Reacciones llevadas a cabo en etanol a 45 °C y 200 rpm (Ver Sección 3.2.2). <sup>b</sup> Determinada por HPLC a 48 h de reacción; no se observa aumento en la conversión a tiempos mayores. <sup>c</sup> Sin etanol.

### 3.3.3. Condensación aldólica catalizada por BSA de ciclopentanona (**14**) y 3-pentanona (**8**)

La ciclopentanona (**14**) también dio los cetoles correspondientes, con estereoselectividad variable, cuando se ensayó en reacciones aldólicas cruzadas utilizando biocatalizadores promiscuos (Li *et al.*, 2011; He *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012, 2013; Chen *et al.*, 2013; González-Martínez *et al.*, 2016). Es importante mencionar que solo una de las publicaciones mencionadas previamente (González-Martínez *et al.*, 2016) reportó la formación de las cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, que se formaron en bajas proporciones. Cabe aclarar que en los trabajos mencionados (Li *et al.*, 2011; He *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012, 2013; Chen *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Birolli *et al.*, 2017) se utilizó BSA como ensayo control de las enzimas promiscuas ensayadas. En la mayoría de los casos este control se realizó con ciclohexanona y *p*-nitrobenzaldehído y se obtuvieron los correspondientes cetoles con rendimientos variables (5-68%) y diastereoselectividad también variable, pero sin enantioselectividad. No se reportó la presencia de enonas en dichos trabajos, hecho que estimuló el estudio de la catálisis de BSA en la condensación aldólica de estas cetonas.

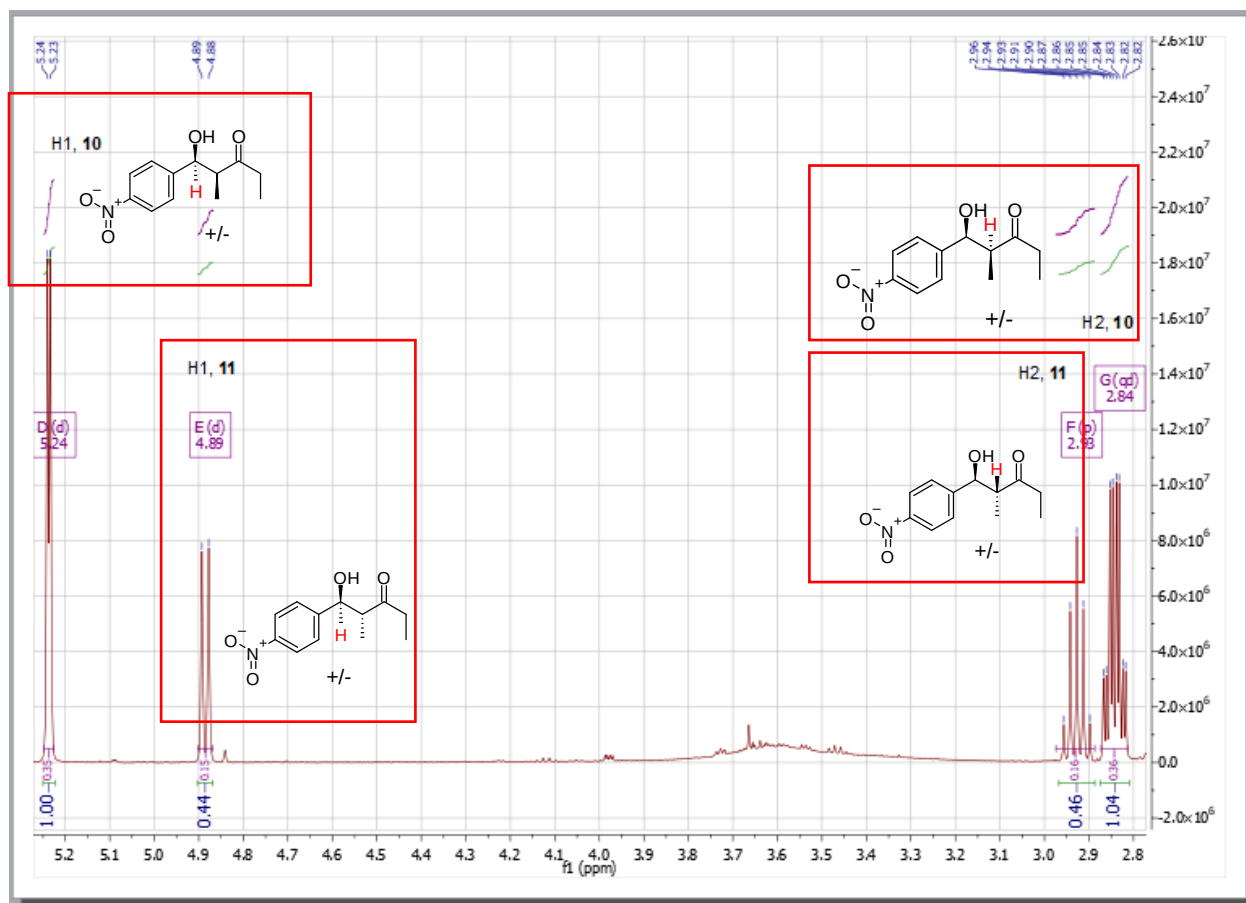
En base a los resultados presentados con ciclohexanona, se decidió ensayar ciclopentanona utilizando etanol como solvente y un exceso molar cetona/aldehído = 2. Estas condiciones experimentales permitieron obtener la correspondiente enona **17** con alta conversión (84%, Tabla 3, Entrada 1). Sin embargo, en este caso no se observó la formación de *bis*-enona, a diferencia del comportamiento de la ciclohexanona (15% de *bis*-enona **22**, Entrada 3). En cuanto a 3-pentanona, hasta el presente trabajo esta cetona no había sido ensayada como sustrato en reacciones aldólicas catalizadas por biocatalizadores promiscuos. Se ensayó empleando las mejores condiciones de reacción encontradas para butanona (Entrada 4) y se obtuvo una alta conversión a la enona **12** (87%, Entrada 2). Nuevamente, no se detectaron *bis*-enonas; por lo tanto, la formación de productos secundarios parece depender de la estructura de la cetona utilizada. Esta suposición se reforzó a partir a los resultados obtenidos con *p*-nitrobenzaldehído (**9**, Entradas 5-7), en los que la *bis*-enona se obtuvo nuevamente sólo con ciclohexanona (10% de la *bis*-enona **23**, Entrada 7). Además, mientras que las enonas obtenidas a partir de 3-pentanona (**13**) y ciclohexanona (**21**) se obtuvieron con altos valores de conversión (77% y 88% respectivamente, Entradas 6 y 7 respectivamente), la ciclopentanona dio una mezcla de los cetoles diastereoméricos **15** y **16**, en mayor proporción que la enona **18** (Entrada 5). Cabe recordar que en la reacción de acetona con *p*-nitrobenzaldehído (Capítulo 2) también se obtuvo cetol en mayor proporción que enona.

**Tabla 3.** Reacción aldólica catalizada por BSA de las cetonas **1**, **8**, **14** y **19** con los aldehídos **2** y **9** (Esquema 1).

| Entrada <sup>a</sup> | Cetona                       | Aldehído                                 | Enona     | Conversión (%) <sup>b</sup> | Conversión a cetol (%) <sup>b</sup> | Conversión a dienona (%) <sup>b</sup> |
|----------------------|------------------------------|------------------------------------------|-----------|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| 1                    | Ciclopentanona ( <b>14</b> ) | Benzaldehído ( <b>2</b> )                | <b>17</b> | 84                          | 0                                   | 0                                     |
| 2                    | 3-Pentanona ( <b>8</b> )     | <b>2</b>                                 | <b>12</b> | 87                          | 0                                   | 0                                     |
| 3                    | Ciclohexanona ( <b>19</b> )  | <b>2</b>                                 | <b>20</b> | 82                          | 0                                   | 15                                    |
| 4                    | Butanona ( <b>1</b> )        | <b>2</b>                                 | <b>4</b>  | 85                          | 3 <sup>c</sup>                      | 0                                     |
| 5                    | Ciclopentanona ( <b>14</b> ) | <i>p</i> -Nitrobenzaldehído ( <b>9</b> ) | <b>18</b> | 35                          | 48 <sup>d</sup>                     | 0                                     |
| 6                    | 3-Pentanona ( <b>8</b> )     | <b>9</b>                                 | <b>13</b> | 77                          | 13 <sup>e</sup>                     | 0                                     |
| 7                    | Ciclohexanona ( <b>19</b> )  | <b>9</b>                                 | <b>21</b> | 88                          | 0                                   | 10                                    |

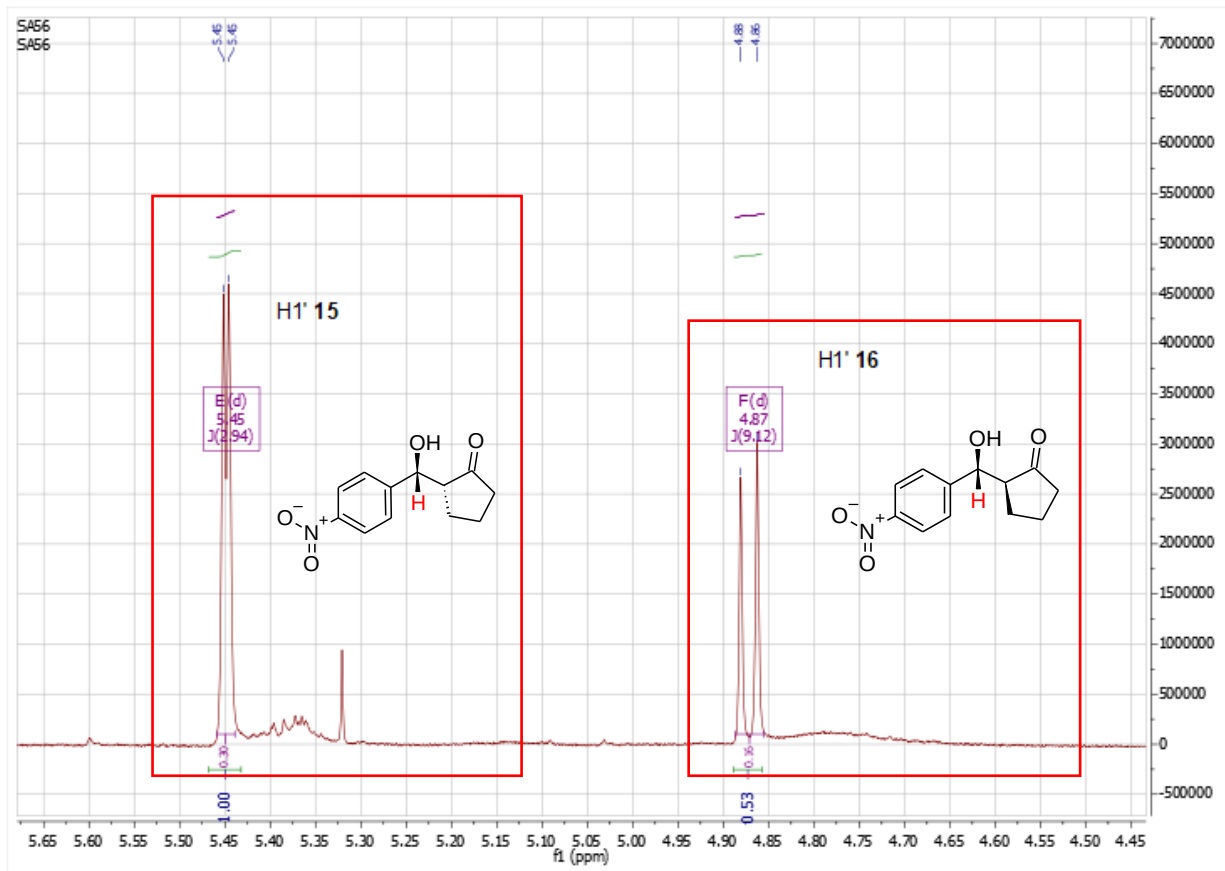
<sup>a</sup> Reacciones llevadas a cabo a 45 °C y 200 rpm, empleando una relación cetona:etanol 20:80 para **1** y **8**, y a 100 mM en etanol para las cetonas **14** y **19** (Ver sección 3.2.2). Los ensayos de control llevados a cabo con BSA pretratada con urea (ver Sección 3.2.1) dieron conversiones < 8%. <sup>b</sup> Determinada por HPLC a 48 h de reacción; no se observa aumento de la conversión a mayores tiempos. <sup>c</sup> Mezcla de **3**, **5** y **6**. <sup>d</sup> Mezcla de **15** y **16**. <sup>e</sup> Mezcla de **10** y **11**.

En la purificación por cromatografía en columna de silicagel de los productos de la reacción de 3-pentanona con *p*-nitrobenzaldehído (pág. 64) y, al igual que en otras mezclas cuyos componentes coeluyeron, se observó la coelución de la mezcla de los cetoles *syn*-1-hidroxi-2-metil-1-(4-nitrofenil)-3-pentanona (**10**) y *anti*-1-hidroxi-2-metil-1-(4-nitrofenil)-3-pentanona (**11**). Esta mezcla se cuantificó por la relación de los valores de integración de las señales en RMN-<sup>1</sup>H del hidrógeno del carbono 1 del compuesto **10** y del compuesto **11** (Figura 4). Se obtuvo una relación **10/11** = 2,3.



**Figura 4.** Región del espectro RMN- $^1\text{H}$  de la mezcla de cetoles **10** y **11**. Se resaltan las señales del hidrógeno del carbono 1 del cetol **10** y del cetol **11**, utilizadas para calcular la proporción de los cetoles de dicha muestra, así como las señales correspondientes al hidrógeno del carbono 2 del cetol **10** y del cetol **11**, que confirman dicha proporción.

De forma similar, y a partir de la biotransformación correspondiente (pág. 66), se cuantificó la mezcla de los cetoles *syn*-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil]ciclopentanona (**15**) y *anti*-2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil]ciclopentanona (**16**), a partir de la relación de las señales de RMN $^1\text{H}$  del hidrógeno del carbono 1' de **15** y de **16** (Figura 5).



**Figura 5.** Región del espectro RMN-<sup>1</sup>H de la mezcla de cetoles **15** y **16**. Se resaltan las señales del hidrógeno del carbono 1' del cetol **15** y del cetol **16**, utilizadas para calcular la proporción de los cetoles de dicha muestra.

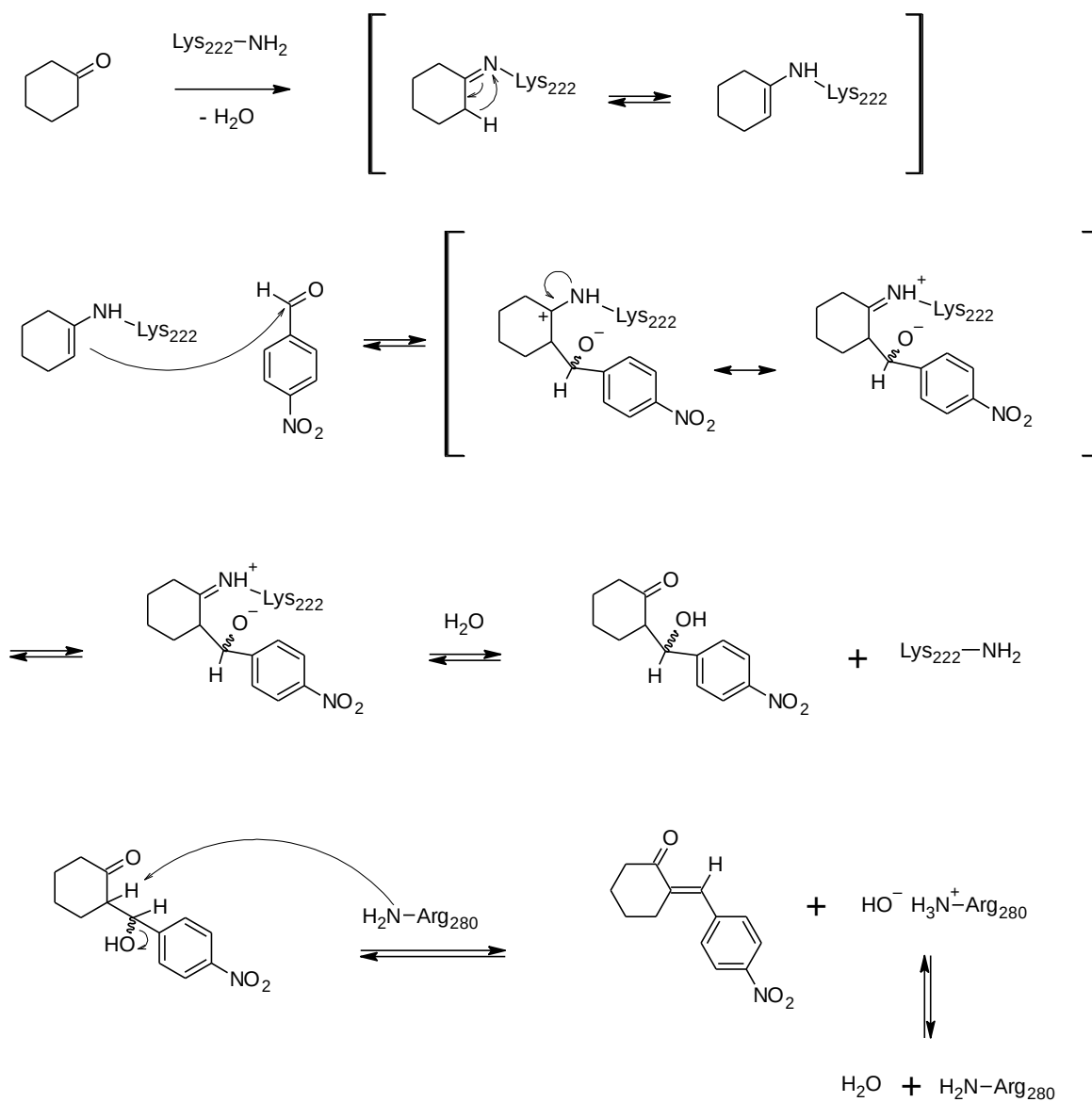
A partir del análisis por CG con columna quiral (página 61), se pudo determinar que todos los cetoles quirales presentados en este capítulo se obtuvieron como mezclas racémicas.

Finalmente, se realizaron ensayos para establecer si la BSA cataliza el paso de deshidratación del cetol. Para ello, se agitó una mezcla de los cetoles **15** y **16** en etanol en presencia de BSA (siguiendo el protocolo en escala analítica general descrito en la sección 2.2.2) y en paralelo, se realizaron dos controles: uno en ausencia de BSA, el otro utilizando BSA tratada previamente con urea a 100°C. Luego de 48 horas de reacción, no se observó reacción en los controles mientras que en la reacción con BSA se obtuvo un 31% de conversión a enona **18**, alcanzando 91% luego de 144 h. Estos resultados muestran que la BSA también cataliza el paso de deshidratación de la condensación aldólica, en concordancia con los resultados descritos en el capítulo anterior, obtenidos en la deshidratación catalizada por BSA del cetol formado a partir de acetona y *p*-nitrobenzaldehído (pág. 53).

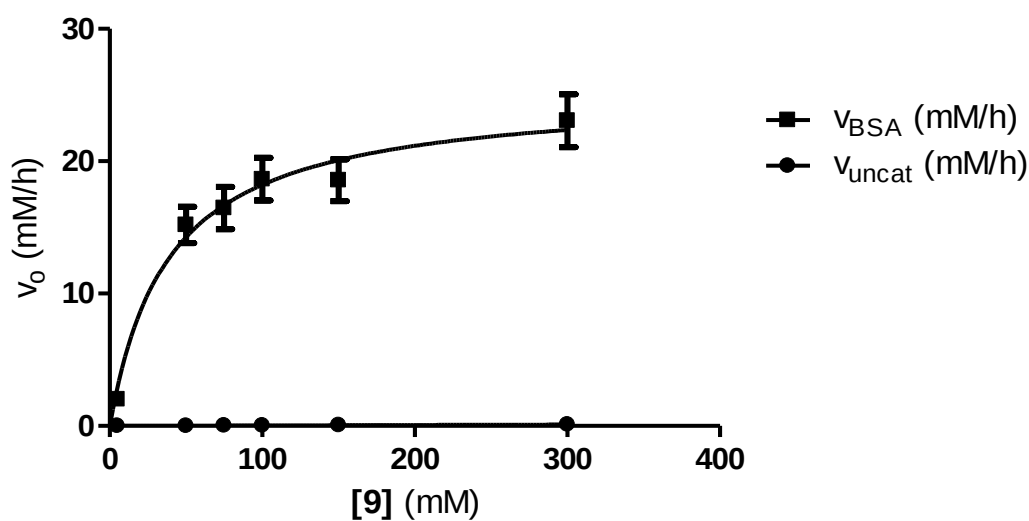
### 3.3.4. Cinética de la condensación aldólica catalizada por BSA de ciclohexanona con *p*-nitrobenzaldehído

Con el fin de obtener un acercamiento mecanístico a las biotransformaciones ensayadas, se realizó un estudio cinético de la reacción aldólica entre ciclohexanona y *p*-nitrobenzaldehído en etanol, con catálisis de BSA, descrita en la Sección 3.2.12. En la Figura 6 se muestra cómo se acelera la producción de enona por la BSA, con cinética de saturación. Se obtuvo una  $V_{\text{máx}} = 25,44 \pm 1,55$  mM/h y una  $K_m = 38,53 \pm 8,53$  mM. Se pudieron realizar experimentos cinéticos a saturación de ciclohexanona, pero debido a la limitada solubilidad del *p*-nitrobenzaldehído no se logró alcanzar la saturación de dicho sustrato. Dado que las rectas de  $1/v_0$  en función de  $1/[9]$  de la Figura 7 no son paralelas, se descarta un mecanismo del tipo ping pong bi-bi y los datos obtenidos son compatibles tanto con un mecanismo del tipo aleatorio secuencial o con uno secuencial ordenado bi-bi (Rudolph y Fromm, 1979). Teniendo en cuenta que para la adición aldólica de acetona y aldehídos aromáticos catalizada por BSA en medio acuoso se propuso un mecanismo vía enamina (Benedetti *et al.*, 2011), para la reacción estudiada en esta tesis se propone un mecanismo secuencial ordenado tipo bi-bi (Esquema 2). En el mecanismo propuesto a continuación, la lisina anormalmente ácida Lis-222, mencionada en la Introducción (Kikuchi *et al.*, 1996; Benedetti *et al.*, 2011; Albanese and Gaggero, 2015) y en la sección 2.3.6. (Capítulo 2), podría actuar como nucleófilo para la formación del cetol (mezcla racémica), cuya deshidratación subsiguiente a enona podría estar favorecida por el residuo Arg-280. En colaboración con el grupo de Bioinformática Estructural de la Universidad Nacional de Quilmes, y como parte de la tesis doctoral de Ana Julia Velez Rueda, se estudiaron las variaciones de  $pK_a$  de los residuos que podrían explicar su participación en el mecanismo de la catálisis. Para ello se realizó una titulación teórica por medio del software Propka, empleando los confórmeros disponibles de la proteína (Ver sección 2.3.6). Los  $pK_a$  determinados para la Lis-222 y Arg-280 fueron  $7,78 \pm 0,83$  y  $14,07 \pm 0,19$ , respectivamente. La proximidad y la localización en la misma cavidad de una arginina anormalmente básica y una lisina anormalmente ácida podrían explicar el mecanismo propuesto.

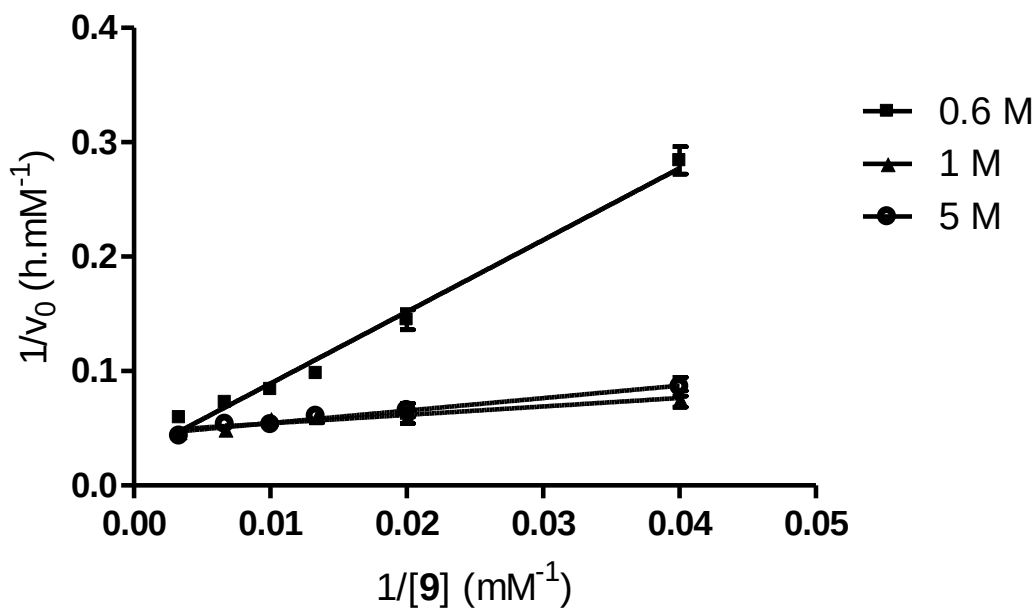




**Esquema 2.** Mecanismo propuesto la condensación aldólica catalizada por BSA de ciclohexanona (19) y *p*-nitrobenzaldehído (9).



**Figura 6.** Velocidad inicial ( $v_0$ ) versus concentración de  $p$ -nitrobenzaldehído ( $[9]$ ) para la condensación aldólica catalizada por BSA de **9** y ciclohexanona 5 M en etanol a 45 °C y 200 rpm. Las conversiones fueron determinadas por absorción a 330 nm en un lector de placas Cytation 5 (ver sección 3.2.12).



**Figura 7.** Inversa de la velocidad inicial ( $1/v_0$ ) versus la inversa de la concentración de  $p$ -nitrobenzaldehído ( $1/[9]$ ) para la condensación aldólica catalizada por BSA de **9** y ciclohexanona en etanol, llevada a cabo a 45 °C y 200 rpm. Las concentraciones de ciclohexanona fueron 5 M, 1 M y 0,6 M.

Las conversiones fueron determinadas por absorción a 330 nm en un lector de placas Cytation 5 (ver sección 3.2.12).

### 3.4. Conclusiones

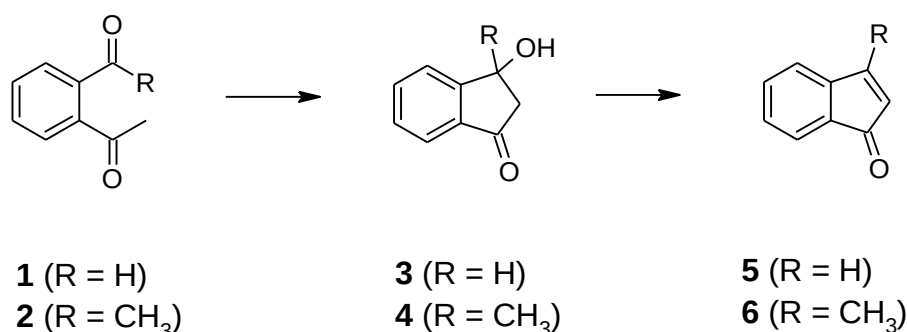
El trabajo presentado en este capítulo amplía las aplicaciones de la BSA como catalizador promiscuo de la condensación aldólica cruzada, al extender esta reacción a un conjunto de cetonas. Se alcanzaron valores elevados de conversión a enonas (77-95%) y con la excepción de la reacción de ciclopentanona con *p*-nitrobenzaldehído se observó poca o nula presencia de cetoles (0-13%). Las *bis*-enonas, subproductos de la condensación aldólica convencional, se observaron únicamente (en bajas proporciones) al utilizar ciclohexanona, incluso con un exceso molar benzaldehído/ciclohexanona elevado. En comparación con las condiciones de la condensación aldólica tradicional, la BSA proporciona un procedimiento en condiciones suaves de reacción. Además, al ser activa en etanol, un solvente económico y eco-compatible, permite evitar el uso de solventes y catalizadores tóxicos o costosos, empleados en otras estrategias catalíticas. Por otra parte, los experimentos cinéticos sugieren un mecanismo bi-bi ordenado para la formación de enonas catalizada por BSA y a partir de ellos se propone un posible mecanismo que involucra residuos del sitio catalítico de la proteína que muestran valores de  $pK_a$  anormales.

## Capítulo 4

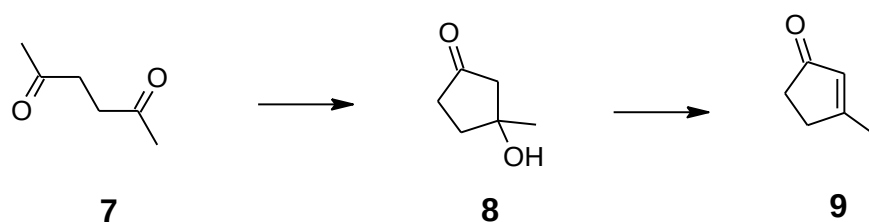
# Ensayos de ciclación aldólica intramolecular catalizada por albúmina de suero bovino

## 4.1. Introducción

En los Capítulos 2 y 3 se presentó la reacción de condensación aldólica cruzada catalizada por BSA, a partir de una variedad de cetonas alifáticas y cíclicas y aldehídos aromáticos, con muy buenos resultados. Con el fin de expandir más el espectro de sustratos reconocibles por la BSA frente a dicha reacción, se decidió ensayar compuestos que tengan tanto un grupo dador como un aceptor de dicha reacción. De esta forma puede ocurrir una reacción aldólica intramolecular, que forma un ciclo. Para ello se eligieron tres sustratos: 2-acetilbenzaldehído, 1,2-diacetilbenceno y 2,5-hexanodiona (**1**, **2** y **7** respectivamente, Esquemas 1 y 2).



**Esquema 1.** Condensación aldólica intramolecular de 2-acetilbenzaldehído (**1**) y 1,2-diacetilbenceno (**2**).



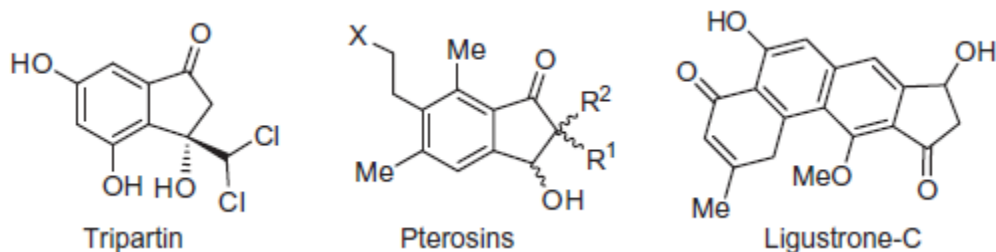
**Esquema 2.** Condensación aldólica intramolecular de 2,5-hexanodiona (**7**).

Centrándonos en 2-acetilbenzaldehído (**1**), el producto de la adición aldólica intramolecular que se espera obtener es 3-hidroxi-1-indanona (**3**), estructura que forma parte de diversos compuestos naturales y cuyos derivados poseen actividad biológica (Figura 1). Estos compuestos también son intermediarios versátiles en la síntesis de productos naturales, en reacciones dominó y reacciones organocatalizadas (Chanda *et al.*, 2015). Algunos ejemplos de compuestos derivados de la 3-hidroxi-1-indanona relevantes (Figura 1) son: tripartina, un inhibidor de histona demetilasa (Kim *et al.*, 2013);

pterosinas (sesquiterpenos citotóxicos), con actividad antibacterial (Ng y McMorris, 1984; Uddin *et al.*, 2011); ligustrona-C, un metabolito secundario de *Cercospora ligustina* (Assante *et al.*, 1977); 3-metoxi-1-indanona, aislada de la cianobacteria *Lyngbya majuscula*, que inhibe la activación del promotor de crecimiento vascular en células tumorales (Nagle *et al.*, 2000).

A pesar de su extensa presencia tanto natural como en compuestos farmacológicamente activos, los métodos para construir estructuras derivadas de 3-hidroxi-1-indanona son limitados. Los derivados de 3-hidroxi-1-indanona han sido sintetizados a través de la anelación modificada de Heck-Larock (Ruan *et al.*, 2011) y por isomerización intramolecular-aldolización de alcoholes alílicos, catalizada por un complejo metálico (Petrignet *et al.*, 2007). Otros métodos comunes para la construcción de 3-hidroxi-1-indanonas son la desimetrización de indano-1,3-dioles por complejos metálicos (Murahashi *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2009) y por vía enzimática, utilizando lipasa B de *Candida antarctica*, que permite la resolución enantio- y diastereoselectiva seguida de una posterior oxidación regioselectiva (Krumlinde *et al.*, 2010); en otro ejemplo, mediante otra resolución cinética utilizando lipasa PS de Amano (Joly y Nair, 2001).

Por otra parte, Moser y coautores desarrollaron la anelación de complejos de cromo de *o*-trimetilsililbenzaldehído con enolatos de litio de ésteres para la síntesis de anillos de indanona espirocíclicos (Moser *et al.*, 2002). Sin embargo, también se han realizado esfuerzos para reemplazar los catalizadores de metales de transición con alternativas biocompatibles (List, 2007). En esta línea cabe mencionar que se han utilizado aminoácidos naturales y sus derivados como organocatalizadores en reacciones aldólicas intramoleculares, desde el primer reporte de la reacción de Hajos – Parrish – Eder–Sauer–Wiechert catalizada por prolina a principios de 1970 (Eder *et al.*, 1971; Hajos y Parrish, 1974). De ello surge el método de síntesis de 3-hidroxi-1-indanonas a partir de la reacción aldólica intramolecular de *o*-diacilbencenos catalizada por sales potásicas de aminoácidos en DMSO (Chanda *et al.*, 2015), principal antecedente de la reacción presentada en este capítulo. Como principal desventaja de este tipo de catálisis puede mencionarse su baja estereoselectividad y el uso de DMSO como solvente.



**Figura 1.** Compuestos naturales que presentan una subestructura de 3-hidroxi-1-indanona

En este capítulo se presentarán los resultados obtenidos a partir de una alternativa biocatalizada por albúmina de suero bovino (BSA) para la síntesis de 3-hidroxi-1-indanona (**3**) a partir de 2-acetilbenzaldehído (**1**). Además, se mostrarán los resultados de otros sustratos ensayados: 1,2-diacetilbenceno (**2**) y 2,5-hexanodiona (**7**), a pesar de que no se logró obtener los correspondientes productos de adición o de condensación aldólica (**4**, **6**, **8** y **9**).

## 4.2. Materiales y métodos

### 4.2.1. General

La albúmina de suero bovino (BSA) se compró a Sigma-Aldrich (fracción V) y se utilizó directamente, excepto para los experimentos de control. Las enzimas mencionadas en la sección 4.3 de este capítulo también fueron comerciales y adquiridas a Sigma-Aldrich. Todos los reactivos y solventes fueron de grado analítico y obtenidos de proveedores comerciales. El 2-acetilbenzaldehído (**1**) se purificó por columna de silicagel utilizando hexano:acetato de etilo 90:10 como solvente de elución y se conservó en heladera.

Para el seguimiento de las reacciones en escala analítica se utilizó cromatografía en placa delgada (CCD) mediante placas de Silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck). El solvente de desarrollo fue hexano:acetato de etilo 70:30 v/v y las placas se revelaron con luz UV. A escala preparativa, para las purificaciones por cromatografía en columna se empleó Silicagel 60 de 0,04 – 0,063 mm (Merck), las concentraciones de las mezclas de solventes de elución empleadas se expresan en % v/v (sección 4.2.3).

Los análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se hicieron usando una columna de fase reversa C18 (150 mm de largo, 5,6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula) y un volumen de inyección de 20 µl. Se utilizaron equipos de HPLC modelos Beckman System Gold 125-166 y Gilson Pump 321 Autosampler 234. El tiempo de retención para el cetol **3** fue 14 min.



Para determinar el exceso enantiomérico se utilizó un cromatógrafo gaseoso (GC) Thermo modelo Trace 1300 con una columna capilar CP-Chirasil-Dex (25 m de largo, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu$ m de espesor de film). Las condiciones de análisis fueron: 100 °C de temperatura inicial del horno (1 min), luego rampa hasta 185 °C (5 min) manteniéndose por 25 min, volumen de inyección: 2  $\mu$ l. Los tiempos de retención para los enantiómeros del cetol **3** fueron 22,6 min y 23,1 min.

Los espectros de  $^1\text{H}$ -NMR y  $^{13}\text{C}$ -NMR se obtuvieron con un espectrómetro Bruker Avance II a 500 y 125 MHz respectivamente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en partes por millón (ppm) utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia y cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como solvente. Las abreviaturas utilizadas para indicar la multiplicidad son: d, doblete; dd, doble doblete; m, multiplete.

#### 4.2.2. Ensayos cualitativos con 2-acetilbenzaldehído, 1,2-diacetilbenzaldehído y 2,5-hexanodiona

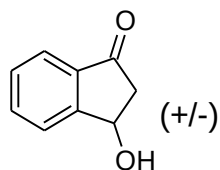
Para el *screening* con los sustratos **1**, **2** y **7**, el protocolo general implica la utilización de 0,05 mmol de sustrato y 54 mg del biocatalizador en 1 ml del solvente indicado. Excepto se indique lo contrario, las reacciones se llevaron a cabo a 30°C y 200 rpm.

Además de BSA, también se ensayaron enzimas comerciales; debido a que en la inmovilización de enzimas comerciales como la CALB se utilizan aditivos que pueden actuar como catalizadores, previo a su utilización, se agitó la enzima en acetona por 4 horas, se filtró y secó.

#### 4.2.3. Ensayo de adición aldólica de 2-acetilbenzaldehído con BSA en escala preparativa

Se colocaron 74 mg de 2-acetilbenzaldehído, 10 ml de DMF y 540 mg de BSA y se agitaron a 30°C durante 7 días. Luego se filtró para la recuperar la BSA, se lavó con etanol (5 ml) y se secó el filtrado. La purificación del producto se hizo mediante una columna de silicagel armada en hexano 100%, luego de la siembra se cambió a hexano:acetato de etilo 90:10 v/v hasta elución del sustrato y por último, a una proporción 70:30 v/v hasta eluir la 3-hidroxi-1-indanona (**3**). El rendimiento fue del 6%. Se verificó por cromatografía gaseosa con columna quiral que el cetol obtenido es una mezcla racémica.

#### 3-Hidroxi-1-indanona (**3**)



$^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  2,66 (dd,  $J$  = 18,8, 3,0 Hz, 1H, H2a); 3,15 (dd,  $J$  = 18,8, 6,8 Hz, 1H, H2b); 5,46 (dd,  $J$  = 6,8, 2,9 Hz, 1H, H3); 7,52 (m, 1H, Ar-H);  $\delta$  7,74 (m; 3H, Ar-Hs).  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  47,20 (C2); 68,49 (C3); 123,20 (C4); 125,86 (C7); 129,39 (C6); 135,18 (C5); 136,44 (C8); 155,20 (C9); 203,15 (C1).

#### 4.2.4. Análisis por MALDI-MS de adición aldólica de 2-acetilbenzaldehído con BSA

Para conocer con mayor detalle la interacción entre la BSA y el sustrato 2-acetilbenzaldehído (2-AB) se realizó un análisis por MALDI-MS. Se realizaron 5 ensayos con BSA en DMF con distintas proporciones de sustrato y biocatalizador. En todos los casos el medio de reacción fue DMF (1 ml), el tiempo de reacción fue 7 días y la BSA se recuperó por filtración y posterior lavado con etanol (3 x 1 ml) primero y luego, con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 1 ml). La BSA seca recuperada se digirió con tripsina (digestión realizada en el CEQUIBIEM, FCEN, UBA) y los péptidos obtenidos se analizaron por MALDI-MS (espectrometría de masas con ionización por desorción con láser asistida por una matriz) y un analizador TOF (tiempo de vuelo)

### 4.3. Resultados y discusión

#### 4.3.1. Ensayos de ciclación aldólica intramolecular biocatalizada de los sustratos **1**, **2** y **7**

Al igual que en los experimentos reportados en los capítulos anteriores, se realizaron controles en ausencia de biocatalizador para las reacciones con resultados positivos. En ausencia de BSA, no se observó formación apreciable de productos.

En primer lugar, se ensayó la ciclación aldólica intramolecular de **2,5-hexanodiona (7)**, Esquema 2) con BSA y con las siguientes enzimas comerciales: lipasas B de *Candida antarctica*, de *Candida rugosa*, de *Pseudomonas cepacea*, de páncreas porcino y de germen de trigo, quimiotripsina de páncreas bovino, acilasa I de páncreas porcino, acilasa de *Aspergillus melleus* y proteasas de *Aspergillus oryzae* y de *Aspergillus sojae*. Ya se ha comentado que el medio de reacción es un parámetro clave en una biotransformación (sección 1.3.4) y como medio de reacción se probaron agua, etanol y hexano a 30, 45 y 60 °C. En las condiciones ensayadas no hubo formación de cetol ni enona.

Luego de los ensayos con 2,5-hexanodiona, se realizaron estudios utilizando **1,2-diacetilbenceno (2**, Esquema 1) como sustrato, lo que también involucró un *screening* de parámetros experimentales. Al utilizar BSA como biocatalizador, se obtuvieron soluciones coloreadas con todos los solventes ensayados: agua, etanol, acetonitrilo, DMF. No se logró obtener el cetol (**4**) producto de la adición aldólica ni tampoco la enona (**6**) que se obtiene por deshidratación. De todas las reacciones ensayadas con BSA, la efectuada en DMF se eligió para analizar por HPLC dado que en este solvente se observó un mayor consumo de sustrato por CCD. Al analizar una muestra a 24 h de reacción sólo se cuantificó un pequeño consumo de sustrato (18%). La nula formación de los productos de ciclación podría explicarse por la formación de una base de Schiff entre el sustrato y las lisinas de la BSA, y a la posterior formación de isoindoles, que otorgan una coloración azul-violácea (Zhan *et al.*, 2003) que fue observada en los ensayos realizados. Por otra parte, se ensayaron con etanol y luego con acetonitrilo los mismos biocatalizadores ensayados con 2,5-hexanodiona, no observándose en estos ensayos consumo de sustrato.

Posteriormente se estudió la ciclación de **2-acetilbenzaldehído (1**, Esquema 1) y en los primeros ensayos se evaluó el efecto del solvente. Se hicieron ensayos de control con 2-acetilbenzaldehído en agua, acetonitrilo, etanol, 2-metiltetrahidrofurano y hexano a 30 °C, sin biocatalizador. En todos se conservó el sustrato y no hubo reacción observable por CCD, mientras que con BSA como catalizador, tanto en agua como en etanol se observó consumo total de sustrato. En agua el consumo fue instantáneo (incluso a  $t = 0$ ) y la solución tomó una tonalidad azulada (similar a lo observado con 1,2-diacetilbenceno), mientras que en etanol la reacción progresó hasta 2 días sin coloración. Se decidió continuar estudiando la reacción en etanol, en la que se observó un producto de  $R_f$  bajo. Luego se hizo bajo las mismas condiciones (etanol a 30°C) un *screening* de las siguientes enzimas comerciales: lipasas B de *Candida antarctica*, de *Candida rugosa*, de *Pseudomonas cepacea*, de páncreas porcino y de germen de trigo, quimiotripsina de páncreas bovino, acilasa I de páncreas porcino, acilasa de *Aspergillus melleus*, proteasas de *Aspergillus oryzae* y de *Aspergillus sojae*, y una prueba adicional con BSA en etanol a 50°C. En el caso de BSA a 50°C, a un día de reacción se confirmó la aparición de un producto de  $R_f$  bajo, mientras que no se obtuvieron resultados satisfactorios con el resto de los biocatalizadores, al igual que lo sucedido con 2,5-hexanodiona y 1,2-diacetilbenceno. Se eligió utilizar BSA en etanol a 50°C como condiciones para escalar y purificar por columna el producto de  $R_f$  bajo, identificado por RMN como el cetol 3-hidroxiindanona (**3**, descrito en la sección 4.2.3).

Posteriormente se ensayó la reacción con BSA en dimetilsulfóxido (DMSO) y en mezclas etanol/agua 95:5 y 90:10, y se repitió el *screening* de enzimas pero en acetonitrilo en lugar de etanol, manteniendo la temperatura en 30°C. La reacción con BSA en DMSO tuvo un rendimiento en el cetol **3** algo mayor (7%, contra 1-2% en etanol a 30°C y 50°C, respectivamente). En las mezclas etanol/agua y con acetonitrilo como solvente no se observó aparición de cetol o enona.

Se varió la cantidad de BSA, disminuyéndola a la mitad y luego también aumentándola un 30%, manteniendo el DMSO como medio de reacción y la temperatura a 30°C. Por otra parte, la biotransformación también se ensayó a 40 y 60°C utilizando la cantidad habitual de BSA (Sección 4.2.2). Al aumentar la temperatura la conversión cayó. También disminuyó la conversión al reducir la masa de BSA a la mitad o al aumentarla un 30%.

Siendo hasta ese momento el DMSO el solvente que diera los mejores resultados, se decidió ensayar con otro solvente de características similares (polar aprótico) pero de menor punto de ebullición, la *N,N*-dimetilformamida (DMF). Se observó que las conversiones determinadas por HPLC eran similares, por lo que se optó por continuar los experimentos utilizando este solvente en lugar del DMSO. En ambos casos el consumo de 2-acetilbenzaldehído fue total.

En la preparación de 3-hidroxi-1-indanona (**3**) a partir de 2-acetilbenzaldehído con BSA en DMF (sección 4.2.3) se observó que la masa de BSA recuperada (filtrada, lavada y llevada a peso constante) era 11% mayor a la inicial (Peso inicial: 540 mg, peso final: 599 mg). Dicho resultado es un indicio de que gran parte de la masa inicial de 2-acetilbenzaldehído quedó fijada a la BSA de forma tal que no se libera con lavados con etanol, diclorometano o tolueno. A partir de esta observación de aparente reacción irreversible del sustrato con el biocatalizador, se decidió reutilizar la BSA recuperada de dicha reacción en DMF, ensayándola en una nueva biotransformación llevada a cabo según condiciones detalladas en la sección 4.2.2, comparando simultáneamente con otra biotransformación utilizando BSA cruda y en iguales condiciones de reacción. Al usar BSA recuperada se observó un aumento considerable en el porcentaje de conversión a 3-hidroxi-1-indanona (Tabla 1, Entrada 2).

**Tabla 1.** Conversión de 2-acetilbenzaldehído a cetol **3** según masa de BSA utilizada y al reutilizar el biocatalizador<sup>a</sup>

| Biocatalizador    | % Cetol <b>3</b> <sup>b</sup> |
|-------------------|-------------------------------|
| BSA cruda (54 mg) | 6                             |

|                         |    |
|-------------------------|----|
| BSA reutilizada (54 mg) | 56 |
| BSA cruda (11 mg)       | 31 |

<sup>a</sup> Reacciones llevadas a cabo según protocolo en sección 4.2.2. <sup>b</sup> Valores determinados por HPLC a 7 días de reacción en DMF.

En otro ensayo, se utilizó una masa de BSA cruda 5 veces menor a la inicial (11 mg/0,05 mmol de 2-acetilbenzaldehído en lugar de 54 mg). Se detectó un aumento considerable en la conversión al utilizar una menor cantidad de BSA (Entrada 3). Como conclusión preliminar podría suponerse que el reactivo se une de forma irreversible a la BSA, pero dicho proceso no inactiva al biocatalizador.

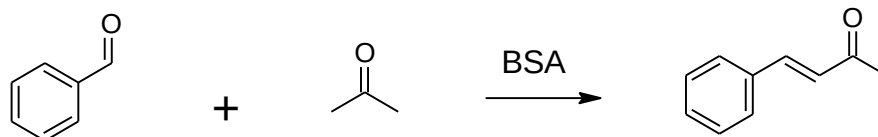
A partir de lo observado en la Tabla 1, se decidió ensayar el reúso de BSA en otras condiciones. Se utilizó DMF nuevamente como solvente de reacción y se lo comparó con etanol. Se observó un aumento en la conversión a cetol únicamente en DMF y sólo entre el primer y segundo uso de la BSA. Al comparar los resultados obtenidos (Tabla 2) debe tenerse en cuenta que en este caso los tiempos de reacción fueron más cortos, para poder realizar varios ciclos en el menor tiempo posible.

**Tabla 2.** Conversión de 2-acetilbenzaldehído a cetol **3** (%) para reúsos de BSA.

|        | Ciclos |    |    |   |
|--------|--------|----|----|---|
|        | 1      | 2  | 3  | 4 |
| Etanol | 1      | 1  | 1  | 2 |
| DMF    | 2      | 10 | 13 | 9 |

<sup>a</sup> Valores determinados por HPLC a 2 días de reacción utilizando 0,05 mmoles de sustrato y 54 mg BSA en 1 ml de volumen final (Sección 4.2.2).

Por otra parte, se decidió estudiar si la unión de 2-acetilbenzaldehído a la BSA afecta la capacidad catalítica de dicho biocatalizador frente a la condensación aldólica de benzaldehído y acetona descrita en el Capítulo 2 (Esquema 3). Para ello se utilizó BSA recuperada de la reacción de 2-acetilbenzaldehído con BSA cruda en DMF (Tabla 1), aplicándola en la reacción de benzaldehído y acetona según las condiciones más satisfactorias descritas en el Capítulo 2 (0,05 mmol benzaldehído, 500 µl acetona, 500 µl agua, 54 mg BSA, 45° C). Se observó una caída considerable en la conversión a benzalacetona, a 9 % (96 % para BSA cruda; Capítulo 2, pág. 52).



**Esquema 3.** Condensación aldólica cruzada catalizada por BSA de benzaldehído y acetona.

A partir de este ensayo puede concluirse que la reacción de BSA con 2-acetilbenzaldehído disminuye la actividad catalítica de la proteína frente a la condensación aldólica entre benzaldehído y acetona.

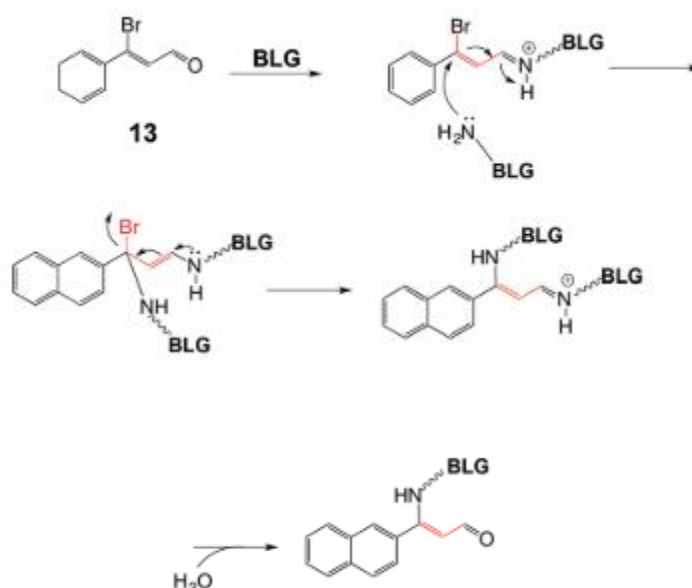
Posteriormente se amplió el ensayo de la BSA recuperada de la reacción de 2-acetilbenzaldehído con BSA cruda en DMF a otros solventes como agua y etanol, no observándose una mejora en su efectividad al reutilizarla en dichos solventes. A su vez, se repitió el ensayo en DMF utilizando otra porción de la BSA recuperada de la reacción con 2-acetilbenzaldehído en DMF, con el fin de determinar fehacientemente el *plateau* de la reacción, determinándose que se alcanzaba a los 7 días pese a quedar sustrato sin reaccionar.

#### 4.3.2. Análisis por MALDI-TOF de BSA ligada a 2-acetilbenzaldehído

En base a los resultados presentados en la sección anterior, cabe postular que los bajos rendimientos obtenidos para la ciclación biocatalizada de 2-acetilbenzaldehído pueden deberse a una interacción entre la proteína y el sustrato, que no resulta en formación de producto. Por otra parte, podría conjeturarse que en la misma proteína puede haber más de un sitio de reacción. En dos trabajos con  $\beta$ -lactoglobulina (Gowda *et al.*, 2017, 2018) se encontró que para esta proteína puede haber más de un sitio de unión a sustratos y que dentro de un mismo sitio, para una determinada reacción (retroaldólica) se requieren una sola lisina (Lis-60 o Lis-69 en un sitio, y Lis-77 o Lis-91 en otro sitio) y su correspondiente bolsillo lipofílico, mientras que para catalizar otra reacción (ciclodimerización) se requieren dos lisinas en el mismo sitio activo (Lis 60 + Lis-69 en un sitio o Lis-77 + Lis-91 en el otro sitio activo) (Gowda *et al.*, 2017). Esto se demostró mutando las lisinas ubicadas en los sitios de unión a sustratos, reemplazándolas por alaninas y observando su efecto en la conversión a los productos respectivos. Al reemplazar las dos lisinas del mismo sitio se conserva la capacidad catalítica en el otro sitio, mientras que, al reemplazar una lisina de cada sitio, se pierde la capacidad catalítica frente a la reacción de ciclodimerización, lo que demuestra que se necesita un par de lisinas en un mismo sitio para el mecanismo de catálisis. Considerando entonces la conjetura de que una proteína puede tener más de un sitio de reacción, esta hipótesis podría explicar nuestros resultados al tratar 2-acetilbenzaldehído con

BSA reutilizada: el 56 % de conversión al cetol **3**, frente al 9 % de conversión a benzalacetona, podrían ser indicio de que ambas reacciones no se catalizan en el mismo sitio de la proteína.

En los trabajos mencionados (Gowda *et al.*, 2017, 2018), se determinaron los residuos específicos de unión del inhibidor (3-bromocinamaldehído) a la proteína, mediante su digestión utilizando tripsina y el análisis posterior de los péptidos obtenidos, por espectrometría de masas mediante MALDI-TOF. Se muestra en el Esquema 4 el mecanismo de inhibición por el compuesto 3-bromocinamaldehído, donde primero se forma una imina con una lisina y luego se produce la alquilación con otro residuo de lisina.



**Esquema 4.** Mecanismo de inhibición de β-lactoglobulina por acción del compuesto 3-bromocinamaldehído sobre residuos de lisina.

En nuestros experimentos con BSA, al observar el consumo de sustrato en las reacciones con 2-acetilbenzaldehído con BSA en DMF, primero se intentó recuperar tanto el sustrato como los potenciales productos por extracción con solventes de diferentes polaridades (etanol, diclorometano, tolueno). Dichos lavados no lograron liberar ni sustrato ni productos de la BSA, pero la proteína mostró una coloración naranja intensa, característica de la formación de bases de Schiff entre el sustrato y la proteína, como también se describió para el caso de la β-lactoglobulina (Gowda *et al.*, 2017).

Se prepararon muestras de BSA para tratar de obtener mayor información sobre los posibles sitios de unión de 2-acetilbenzaldehído a BSA. En este estudio preliminar se ensayaron distintas proporciones de

reactivo:catalizador y distintas opciones de lavado de la BSA recuperada post reacción, así como un blanco de proteína para utilizar de referencia; el solvente de reacción fue DMF. Debido a que se presume el 2-acetilbenzaldehído se estaría ligando a una lisina de la BSA (que podría ser Lis-222, según se discutió en la Introducción y en los capítulos anteriores) y como se sabe que del total de aminoácidos de la BSA un 10% son lisinas (Reeder y Schaffer, 1977), las distintas relaciones reactivo:catalizador se expresan como relaciones molares 2-AB:lisinas de BSA (Tabla 3).

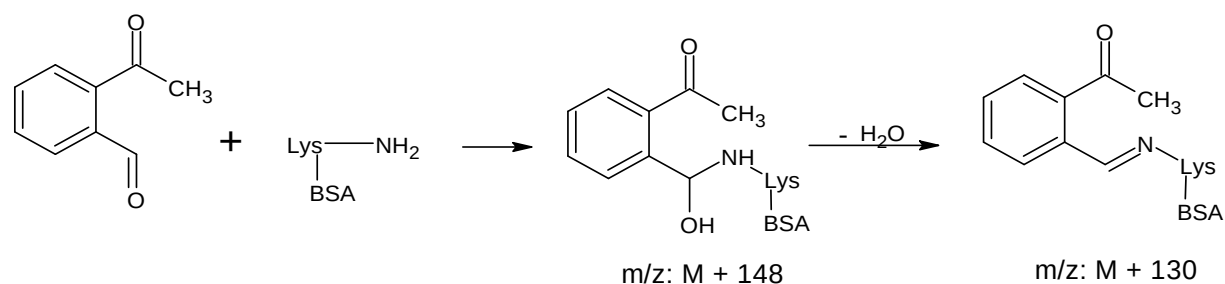
**Tabla 3.** Proporciones 2-acetilbenzaldehído:lisinas de BSA ensayadas en la reacción de 2-acetilbenzaldehído en DMF.

| Relación molar 2-AB/lisinas de BSA | Masa de 2-AB (mg) | Masa de BSA empleada (mg) |
|------------------------------------|-------------------|---------------------------|
| 0:1                                | 0                 | 54                        |
| 1:20                               | 0,38              | 54                        |
| 1:20                               | 0,38 <sup>1</sup> | 54                        |
| 1:1                                | 7,6               | 54                        |
| 5:1                                | 7,6               | 11                        |

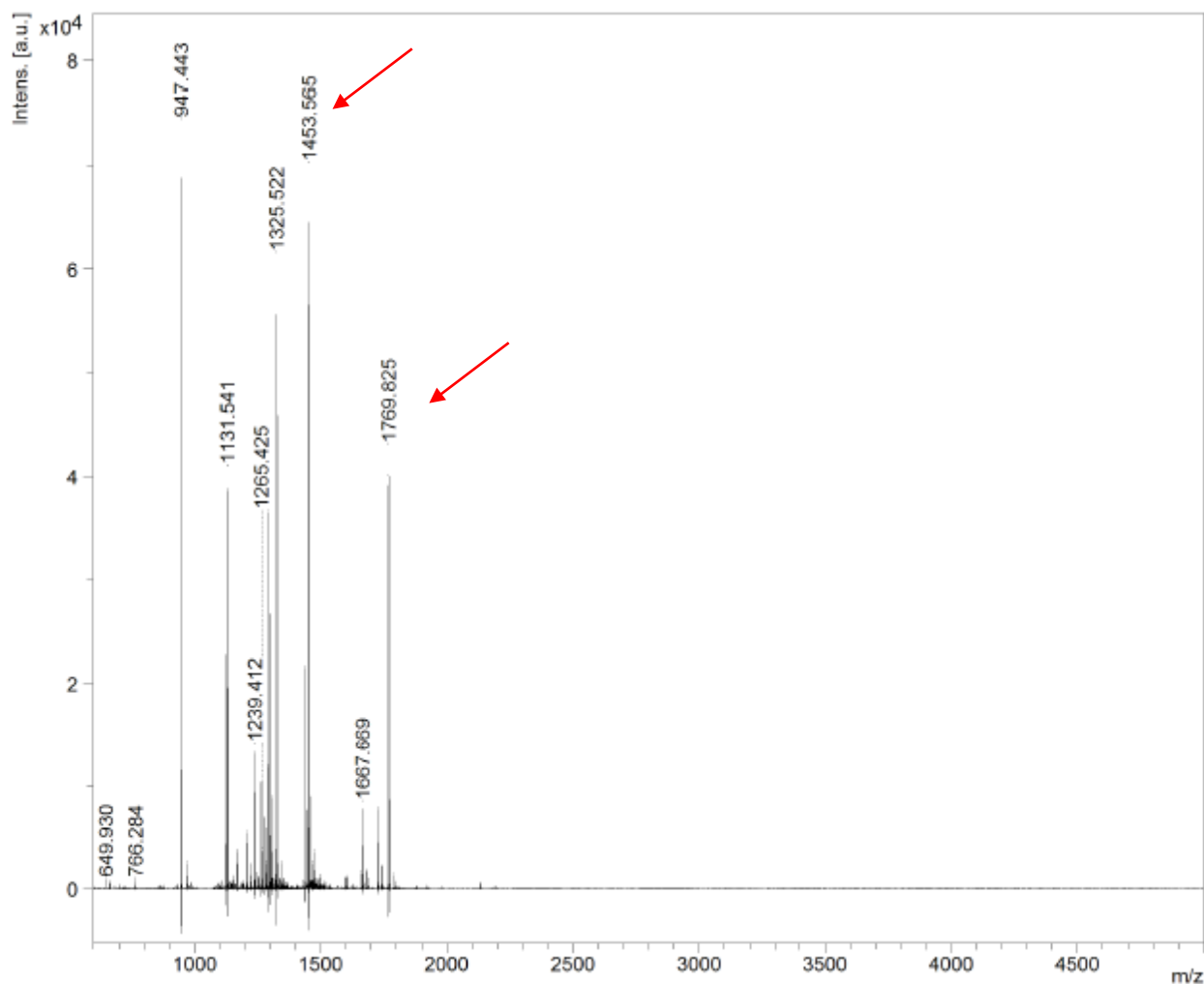
<sup>1</sup> El sustrato se incorporó en 5 fracciones, con intervalos de 24 h entre cada adición.

Las muestras de BSA recuperadas luego de la reacción con 2-AB en DMF se digirieron con tripsina y los péptidos obtenidos se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF. Al comparar estos espectros con la digestión *in silico* de la BSA, se identificaron señales asignables a posibles péptidos correspondientes al sitio de unión de 2-acetilbenzaldehído a la BSA. En las muestras tratadas (Figura 2) desaparecen determinadas señales presentes en las muestras de BSA cruda y a la vez aparecen señales ausentes en la BSA cruda. Esta diferencia en los espectros se aprecia mejor cuando se utiliza una proporción 2-AB:lisinas de BSA igual o mayor a 1:1. En la Tabla 4 se presentan dos claros ejemplos de cambios en señales cuya diferencia es compatible con la adición de una molécula de 2-acetilbenzaldehído ( $m/z$  +148) o con la adición seguida de eliminación de una molécula de agua ( $m/z$  +130) (Esquema 5). Tanto el agregado secuencial de sustrato como el agregado en una sola porción dieron los mismos resultados. Así mismo no se observó diferencia significativa entre los espectros de masa de la BSA de la muestra que se lavó con tolueno y los de la muestra lavada únicamente con etanol y diclorometano.





**Esquema 5.** Formación de un producto de adición (M +148) y de una imina (M +130) a partir 2-acetilbenzaldehído.



**Figura 2.** Espectro de masas obtenido por MALDI-MS del péptido seleccionado luego de la digestión de la muestra de BSA recuperada después de su incubación con 2-acetilbenzaldehído, en una relación molar 1:1 con respecto a las lisinas de BSA.

**Tabla 4.** Comparación de señales obtenidas por espectrometría de masa para dos péptidos seleccionados, a partir de distintas proporciones 2-acetilbenzaldehído:lisinas de BSA<sup>a</sup>

| Relación            | 0:1      | 1:20     | 1:1                               | 5:1                               |
|---------------------|----------|----------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 2-AB:lisinas de BSA |          |          |                                   |                                   |
| m/z                 | 1639,824 | 1639,753 | <b>1769,765</b>                   | <b>1769,825</b>                   |
|                     | Péptido  | Péptido  | Péptido + 2-AB – H O <sub>2</sub> | Péptido + 2-AB – H O <sub>2</sub> |
| m/z                 | 1305,621 | 1305,563 | <b>1453,521</b>                   | <b>1453,565</b>                   |
|                     | Péptido  | Péptido  | Péptido + 2-AB                    | Péptido + 2-AB                    |

<sup>a</sup> Las muestras de BSA recuperadas luego de la reacción con 2-AB en DMF se digirieron con tripsina y los péptidos obtenidos se analizaron por espectrometría de masa MALDI-TOF.

Por otro lado, se hicieron ensayos con el fin de determinar si la BSA puede catalizar la condensación aldólica cruzada entre 2-acetilbenzaldehído y acetona. Se utilizaron como cosolventes (en proporción 1:1 con acetona): etanol, agua y DMF; las reacciones se hicieron según el protocolo descrito en la sección 2.2.2. En ninguno de los casos se observó aparición del producto de la condensación aldólica cruzada (Tiempo de reacción: 2 días). Únicamente se observó consumo de sustrato (**1**) y aparición del producto de la adición aldólica intramolecular (**3**) identificado previamente, con valores de conversión bajos.

#### 4.4. Conclusiones

Se presentaron los resultados de los intentos de ciclación aldólica intramolecular catalizada por BSA de una serie de compuestos que contienen un grupo dador y otro aceptor de dicha reacción. A diferencia de lo observado en los Capítulos 2 y 3, en esta reacción intramolecular las conversiones resultaron bajas o nulas; el mejor resultado se obtuvo cuando el reactivo utilizado fue 2-acetilbenzaldehído y DMF el medio de reacción (56% de conversión a cetol **3**, al ensayar BSA reutilizada). En la mayoría de las

reacciones no se observó consumo de sustrato y en algunos casos el consumo de sustrato se debió a una interacción entre la proteína y el sustrato que no resulta en formación de producto.

En cuanto a los sustratos 2,5-hexanodiona y 1,2-diacetilbenceno, con ninguno de ellos se obtuvo conversión a los correspondientes cetoles o enonas, productos de la adición o condensación aldólica intramolecular. En el primer caso, puede deberse a que el bolsillo hidrofóbico de la BSA no reconozca a sustratos alifáticos, como se observó en la reducción de dicetonas catalizada por BSA (Berti *et al.*, 2011) y en la adición aldólica de aldehídos alifáticos (Benedetti *et al.*, 2011). En cuanto al 1,2-diacetilbenceno, la nula formación de producto puede llegar a explicarse por la formación de una base de Schiff entre el sustrato y la BSA, con a la posterior formación de isoindoles (Zhan *et al.*, 2003).

En el caso del 2-acetilbenzaldehído se observó la unión irreversible entre el sustrato y el biocatalizador BSA. Es notable la mejora en los valores de conversión al cetol, al reutilizar BSA (56%), o al utilizar una menor proporción de biocatalizador con respecto al sustrato (31%). Se postuló la reacción entre 2-acetilbenzaldehído y la BSA, para dar un producto de adición y una imina, como se describió en la sección 4.3.2. Dicha reacción irreversible puede ocurrir con los grupos aminos libres de lisinas, como el de la Lis-222, que se asocia con la actividad catalítica de BSA. El aumento en la conversión tanto al reutilizar BSA recuperada de la reacción con 2-acetilbenzaldehído o al utilizar una menor cantidad de BSA cruda podría deberse a una saturación de los sitios de unión irreversible del sustrato a la BSA, quedando sustrato disponible para reaccionar por la vía que permite la formación del cetol **3**. Se mostró que la unión de 2-acetilbenzaldehído a la BSA no afecta totalmente la capacidad de la proteína para catalizar la adición aldólica intramolecular de dicho compuesto, pero sí provoca una caída abrupta en la actividad catalítica de la BSA frente a la reacción aldólica de benzaldehído y acetona descrita en el Capítulo 2. Esto permite suponer que estas dos reacciones ocurrirían en sitios de unión distintos de la proteína. Mediante estudios preliminares de espectrometría de masa de la BSA recuperada luego de la reacción con 2-acetilbenzaldehído y digerida con tripsina, se identificaron señales de péptidos consistentes con la formación de un producto de adición y una imina entre el 2-acetilbenzaldehído y la proteína.

# Referencias

- Acharya, C. *et al.* (2016) «Enzyme from *Daucus carota* root catalyzed asymmetric cross aldol reaction», *Tetrahedron Letters*. Elsevier Ltd, 57, pp. 4382-4385. doi: 10.1016/j.tetlet.2016.08.056.
- Albanese, D. C. M. y Gaggero, N. (2015) «Albumin as a promiscuous biocatalyst in organic synthesis», *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry, 5, pp. 10588-10598. doi: 10.1039/c4ra11206g.
- Allenmark, S. (1986) «Optical resolution by liquid chromatography on immobilized bovine serum albumin», *Journal of Liquid Chromatography*, 9, pp. 425-442. doi: 10.1080/01483918608076645.
- Allenmark, S. y Andersson, S. (1989) «Optical resolution of some biologically active compounds by chiral liquid chromatography on BSA-silica (resolvosil) columns», *Chirality*, 1, pp. 154-160. doi: 10.1002/chir.530010209.
- Allenmark, S., Bomgren, B. y Borén, H. (1983) «Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases», *Journal of Chromatography*, 264, pp. 63-68.
- Allenmark, S., Bomgren, B. y Borén, H. (1984) «Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases : IV. Molecular interaction forces and retention behaviour in chromatography on bovine serum albumin as a stationary phase», *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 316, pp. 617-624. doi: 10.1016/S0021-9673(00)96187-9.
- Anandarajah, K. *et al.* (2000) «Recruitment of a double bond isomerase to serve as a reductive dehalogenase during biodegradation of pentachlorophenol», *Biochemistry*, 39, pp. 5303-5311. doi: 10.1021/bi9923813.
- Andersson, L. -O, Rehnström, A. y Eaker, D. L. (1971) «Studies on "Nonspecific" Binding: The Nature of the Binding of Fluorescein to Bovine Serum Albumin», *European Journal of Biochemistry*, 20, pp. 371-380. doi: 10.1111/j.1432-1033.1971.tb01403.x.
- Assante, G. *et al.* (1977) «Screening of the genus *Cercospora* for secondary metabolites», *Phytochemistry*, 16, pp. 243-247. doi: 10.1016/S0031-9422(00)86794-1.
- Babbitt, P. C. *et al.* (1996) «The enolase superfamily: A general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the  $\alpha$ -protons of carboxylic acids», *Biochemistry*, 35, pp. 16489-16501. doi: 10.1021/bi9616413.
- Babtie, A., Tokuriki, N. y Hollfelder, F. (2010) «What makes an enzyme promiscuous?», *Current Opinion*

in *Chemical Biology*. Elsevier Current Trends, 14, pp. 200-207. doi: 10.1016/J.CBPA.2009.11.028.

Benedetti, F., Berti, F. y Bidoggia, S. (2011) «Aldolase activity of serum albumins», *Organic and Biomolecular Chemistry*, 9, pp. 4417-4420. doi: 10.1039/c0ob01219j.

Berti, F. *et al.* (2011) «Albumin-directed stereoselective reduction of 1,3-diketones and  $\beta$ -hydroxyketones to anti diols», *Organic and Biomolecular Chemistry*, 9(6), pp. 1987-1999. doi: 10.1039/c0ob00648c.

Bhattacharya, A. A., Grüne, T. y Curry, S. (2000) «Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin», *Journal of Molecular Biology*, 303(5), pp. 721-732. doi: 10.1006/jmbi.2000.4158.

Birilli, W. G., Fonseca, L. P. y Porto, A. L. M. (2017) «Aldol Reactions by Lipase From *Rhizopus niveus*, an Example of Unspecific Protein Catalysis», *Catalysis Letters*. Springer US, 147(8), pp. 1977-1987. doi: 10.1007/s10562-017-2121-6.

Bornscheuer, U. T. y Kazlauskas, R. J. (2004) «Catalytic promiscuity in biocatalysis: Using old enzymes to form new bonds and follow new pathways», *Angewandte Chemie - International Edition*, 43, pp. 6032-6040. doi: 10.1002/anie.200460416.

Branneby, C. *et al.* (2003) «Carbon-carbon bonds by hydrolytic enzymes», *Journal of the American Chemical Society*, 125, pp. 874-875. doi: 10.1021/ja028056b.

Busto, E., Gotor-Fernández, V. y Gotor, V. (2010) «Hydrolases: Catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis», *Chemical Society Reviews*, 39, pp. 4504-4523. doi: 10.1039/c003811c.

Busto, E., Gotor-Fernández, V. y Gotor, V. (2011) «Protein-mediated nitroaldol addition in aqueous media. Catalytic promiscuity or unspecific catalysis?», *Organic Process Research and Development*, 15, pp. 236-240. doi: 10.1021/op100130c.

Carrea, G. y Riva, S. (2000) «Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents», *Angewandte Chemie - International Edition*, 39, pp. 2226-2254. doi: 10.1002/1521-3773(20000703)39:13<2226::aid-anie2226>3.3.co;2-c.

Chanda, T. *et al.* (2015) «Synthesis of 3-hydroxyindanones via potassium salt of amino acid catalyzed regioselective intramolecular aldolization of ortho-diacylbenzenes», *Tetrahedron Letters*. Elsevier Ltd, 56, pp. 981-985. doi: 10.1016/j.tetlet.2015.01.077.

- Chen, X. *et al.* (2011) «A tandem Aldol condensation/dehydration co-catalyzed by acylase and N-heterocyclic compounds in organic media», *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, pp. 71-76. doi: 10.1016/j.molcatb.2010.09.014.
- Chen, Y. L. *et al.* (2013) «Trypsin-catalyzed direct asymmetric aldol reaction», *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 87, pp. 83-87. doi: 10.1016/j.molcatb.2012.10.014.
- Cistola, D. P., Small, D. M. y Hamilton, J. A. (1987) «Carbon 13 NMR studies of saturated fatty acids bound to bovine serum albumin. I. The filling of individual fatty acid binding sites», *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier Inc, 262, pp. 10971-10979. doi: 10.1016/s0021-9258(18)60913-5.
- Clapés, P. (2015) «Enzymatic C--C Bond Formation», en *Organic Synthesis Using Biocatalysis*. Elsevier Inc., pp. 285-337. doi: 10.1016/B978-0-12-411518-7.00010-X.
- Concia, A., Lozano, C., Castillo, J., Parella, T., Joglar, J. and Clapés, P. (2009) «D-Fructose-6-phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Cascade Chemical-Enzymatic Preparation of Sugar-Related Polyhydroxylated Compounds», *Chem. Eur. J.*, 15: 3808-3816.
- Copley, S. D. (2003) «Enzymes with extra talents: Moonlighting functions and catalytic promiscuity», *Current Opinion in Chemical Biology*, 7, pp. 265-272. doi: 10.1016/S1367-5931(03)00032-2.
- Copley, S. D. (2015) «An evolutionary biochemist's perspective on promiscuity», *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd, pp. 72-78. doi: 10.1016/j.tibs.2014.12.004.
- Copley, S. D. (2017) «Shining a light on enzyme promiscuity», *Current Opinion in Structural Biology*. Elsevier Ltd, 47, pp. 167-175. doi: 10.1016/j.sbi.2017.11.001.
- Dalal, K. S. *et al.* (2016) «Bovine serum albumin catalyzed one-pot, three-component synthesis of dihydropyrano[2,3-c]pyrazole derivatives in aqueous ethanol», *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry, 6, pp. 14868-14879. doi: 10.1039/c5ra13014j.
- Danchin, A. (2009) «Myopic selection of novel information drives evolution», *Current Opinion in Biotechnology*, 20, pp. 504-508. doi: 10.1016/j.copbio.2009.07.004.
- Darbre, T. y Machuqueiro, M. (2003) «Zn-Proline catalyzed direct aldol reaction in aqueous media», *Chemical Communications*, 1, pp. 1090-1091.
- Dwivedee, B. P. *et al.* (2018) «Promiscuity of Lipase-Catalyzed Reactions for Organic Synthesis: A Recent Update», *ChemistrySelect*, 3, pp. 2441-2466. doi: 10.1002/slct.201702954.
- Eder, U., Sauer, G. y Wiechert, R. (1971) «New Type of Asymmetric Cyclization to Optically Active Steroid

CD Partial Structures», *Angewandte Chemie International Edition in English*, 10, pp. 496-497. doi:10.1002/anie.197104961.

Elias, M. y Tawfik, D. S. (2012) «Divergence and Convergence in Enzyme Evolution: Parallel Evolution of Paraoxonases from Quorum-quenching Lactonases», *The journal of biological chemistry*, 287, pp. 11-20. doi: 10.1074/jbc.R111.257329.

Fernandez-Lopez, R. *et al.* (2005) «A selective direct aldol reaction in aqueous media catalyzed by zinc-proline», *European Journal of Organic Chemistry*, 24, pp. 5268-5276. doi: 10.1002/ejoc.200500352.

Garrabou, X. *et al.* (2009) «Asymmetric self- and cross-aldol reactions of glycolaldehyde catalyzed by d-fructose-6-phosphate aldolase», *Angewandte Chemie - International Edition*, 48, pp. 5521-5525. doi: 10.1002/anie.200902065.

González-Martínez, D., Gotor, V. y Gotor-Fernández, V. (2016) «Application of Deep Eutectic Solvents in Promiscuous Lipase-Catalysed Aldol Reactions», *European Journal of Organic Chemistry*, 2016, pp. 1513-1519. doi: 10.1002/ejoc.201501553.

Gowda, V. *et al.* (2017) «Lipofuscin Formation Catalyzed by the Milk Protein  $\beta$ -Lactoglobulin: Lysine Residues in Cycloretinal Synthesis», *Biochemistry*, 56, pp. 5715-5719. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00709.

Gowda, V. *et al.* (2018) «Biocatalysis with the milk protein  $\beta$ -lactoglobulin: Promoting retroaldol cleavage of  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes», *Organic and Biomolecular Chemistry*. Royal Society of Chemistry, 16, pp. 2210-2213. doi: 10.1039/c8ob00139a.

Guan, Z., Li, L. Y. y He, Y. H. (2015) «Hydrolase-catalyzed asymmetric carbon-carbon bond formation in organic synthesis», *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry, 5, pp. 16801-16814. doi: 10.1039/c4ra11462k.

Hajos, Z. G. y Parrish, D. R. (1974) «Asymmetric Synthesis of Bicyclic Intermediates of Natural product chemistry», *Journal of Organic Chemistry*, 39, pp. 1615-1621. doi: 10.1021/jo00925a003.

Haoran, W. *et al.* (2014) «Enzyme catalytic promiscuity: asymmetric aldol addition reaction catalyzed by a novel thermophilic esterase in organic solvent», *Green Chemistry Letters and Reviews*, 7, pp. 145-149. doi: 10.1080/17518253.2014.902507.

He, Y. H. *et al.* (2012) «Chymopapain-catalyzed direct asymmetric aldol reaction», *Advanced Synthesis and Catalysis*, 354, pp. 712-719. doi: 10.1002/adsc.201100555.

- Heravi, M. M., & Asadi, S. (2012) «Recent applications of organocatalysts in asymmetric aldol reactions», *Tetrahedron: Asymmetry*, 23(20-21), 1431-1465.
- HO, J. X. *et al.* (1993) «X-ray and primary structure of horse serum albumin (*Equus caballus*) at 0.27-nm resolution», *European Journal of Biochemistry*, 215, pp. 205-212. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18024.x.
- Hollfelder, F. *et al.* (2000) «Characterization of proton-transfer catalysis by serum albumins», *Journal of the American Chemical Society*, 122, pp. 1022-1029. doi: 10.1021/ja993471y.
- Hollfelder, F., Kirby, A. J. y Tawfik, D. S. (1996) «Off-the-shelf proteins that rival tailor-made antibodies as catalysts», *Nature*, 383, pp. 60-63. doi: 10.1038/383060a0.
- Hult, K. y Berglund, P. (2007) «Enzyme promiscuity: mechanism and applications», *Trends in Biotechnology*, 25, pp. 231-238. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.03.002.
- Humble, M. S. y Berglund, P. (2011) «Biocatalytic promiscuity», *European Journal of Organic Chemistry*, pp. 3391-3401. doi: 10.1002/ejoc.201001664.
- Isambert, N. *et al.* (2011) «Multicomponent reactions and ionic liquids: A perfect synergy for eco-compatible heterocyclic synthesis», *Chemical Society Reviews*, 40, pp. 1347-1357. doi: 10.1039/c0cs00013b.
- Joly, S. y Nair, M. S. (2001) «Efficient enzymatic kinetic resolution of 4-hydroxytetralone and 3-hydroxyindanone», *Tetrahedron Asymmetry*, 12, pp. 2283-2287. doi: 10.1016/S0957-4166(01)00404-9.
- Kang, G. *et al.* (2013) «Amino acid salts catalyzed asymmetric aldol reaction of tryptanthrin: A straightforward synthesis of Phaitanthrin A and its derivatives», *Organic Letters*, 15, pp. 4738-4741. doi: 10.1021/ol402104p.
- Kazlauskas, R. J. (2005) «Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis», *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(2), pp. 195-201. doi: 10.1016/j.cbpa.2005.02.008.
- Khersonsky, O., Roodveldt, C. y Tawfik, D. S. (2006) «Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects», *Current Opinion in Chemical Biology*, 10, pp. 498-508. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.08.011.
- Khersonsky, O. y Tawfik, D. S. (2010) «Enzyme Promiscuity: A Mechanistic and Evolutionary Perspective», *Annual Review of Biochemistry*, 79, pp. 471-505. doi: 10.1146/annurev-biochem-030409-143718.
- Kikuchi, K., Thorn, S. N. y Hilvert, D. (1996) «Albumin-catalyzed proton transfer», *Journal of the American*



*Chemical Society*, 118, pp. 8184-8185. doi: 10.1021/ja9617395.

Kim, P. M. *et al.* (2008) «The role of disorder in interaction networks: A structural analysis», *Molecular Systems Biology*, 4, p. 179. doi: 10.1038/msb.2008.16.

Kim, S. H. *et al.* (2013) «Tripartin, a histone demethylase inhibitor from a bacterium associated with a dung beetle larva», *Organic Letters*, 15, pp. 1834-1837. doi: 10.1021/ol4004417.

Kreher, U. P. *et al.* (2003) «Direct preparation of monoarylidene derivatives of aldehydes and enolizable ketones with DIMCARB», *Organic Letters*, 5, pp. 3107-3110. doi: 10.1021/ol0351145.

Krumlinde, P., Bogár, K. y Bäckvall, J. E. (2010) «Asymmetric synthesis of bicyclic diol derivatives through metal and enzyme catalysis: Application to the formal synthesis of sertraline», *Chemistry - A European Journal*, 16, pp. 4031-4036. doi: 10.1002/chem.200903114.

Kulkarni, M. A. *et al.* (2013) «Diethylamine: A smart organocatalyst in eco-safe and diastereoselective synthesis of medicinally privileged 2-amino-4H-chromenes at ambient temperature», *Comptes Rendus Chimie*. Elsevier Masson, 16, pp. 689-695. doi: 10.1016/J.CRCI.2013.02.016.

Li, C. *et al.* (2008) «Biocatalytic promiscuity: The first lipase-catalysed asymmetric aldol reaction», *Green Chemistry*, 10, pp. 616-61. doi: 10.1039/b803406k.

Li, C. *et al.* (2010) «Promiscuous protease-catalyzed aldol reactions: A facile biocatalytic protocol for carbon-carbon bond formation in aqueous media», *Journal of Biotechnology*, 150, pp. 539-545. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.10.004.

Li, G. *et al.* (2013) «Preparation and antioxidant activity of albumin binding Salen Schiff-base metal complexes», *Chinese Science Bulletin*, 58, pp. 2956-2963. doi: 10.1007/s11434-013-5787-1.

Li, H. H. *et al.* (2011) «Nuclease p1: A new biocatalyst for direct asymmetric aldol reaction under solvent-free conditions», *Green Chemistry*, 13, pp. 185-189. doi: 10.1039/c0gc00486c.

Li, K. *et al.* (2009) «Lipase-catalysed direct Mannich reaction in water: Utilization of biocatalytic promiscuity for C-C bond formation in a “one-pot” synthesis», *Green Chemistry*, 11, pp. 777-779. doi: 10.1039/b817524a.

Li, L. Y. *et al.* (2015) «A domino reaction for the synthesis of 2-amino-4H-chromene derivatives using bovine serum albumin as a catalyst», *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Elsevier, 122, pp. 1-7. doi: 10.1016/j.molcatb.2015.08.005.

Li, W. *et al.* (2015) «Lipase-catalyzed Knoevenagel condensation in water-ethanol solvent system. Does

the enzyme possess the substrate promiscuity?», *Biochemical Engineering Journal*. Elsevier B.V., 101, pp. 99-107. doi: 10.1016/j.bej.2015.04.021.

List, B. (2007) «Introduction : Organocatalysis», *Chemical reviews*, 107, pp. 5413-5415.

López-Iglesias, M. y Gotor-Fernández, V. (2015) «Recent Advances in Biocatalytic Promiscuity: Hydrolase-Catalyzed Reactions for Nonconventional Transformations», *Chemical Record*, 15, pp. 743-759. doi: 10.1002/tcr.201500008.

Luisi, I. *et al.* (2013) «An Albumin-Derived Peptide Scaffold Capable of Binding and Catalysis», *PLoS ONE*, 8. doi: 10.1371/journal.pone.0056469.

March, J. (1992) «Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms, and Structure», *Journal of Chemical Information and Modeling*.

Matos, M. J. *et al.* (2015) «Potential pharmacological uses of chalcones: A patent review (from June 2011-2014)», *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 25, pp. 351-366. doi: 10.1517/13543776.2014.995627.

Miao, Y. *et al.* (2015) «Recent developments in enzyme promiscuity for carbon-carbon bond-forming reactions», *Current Opinion in Chemical Biology*. Elsevier Ltd, 25, pp. 115-123. doi: 10.1016/j.cbpa.2014.12.020.

Milker, S. *et al.* (2019) «Comparison of deep eutectic solvents and solvent-free reaction conditions for aldol production», *Molecular Catalysis*. Elsevier B.V., pp. 70-74. doi: 10.1016/j.mcat.2019.01.012.

Moser, W. H. *et al.* (2002) «Stereocontrolled [3 + 2] Annulations with Arene Chromium Tricarbonyl Complexes: Construction of Spirocyclic Compounds Related to Fredericamycin A», *Organic Letters*, 4, pp. 1981-1984. doi: 10.1021/ol025729m.

Müller, T. *et al.* (2015) «Tetrahedral boronates as basic catalysts in the aldol reaction», *Zeitschrift für Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences*, 70, pp. 587-595. doi: 10.1515/znb-2015-0029.

Murahashi, S. I. *et al.* (2004) «Manganese-catalyzed oxidative transformation of silyl ethers to ketones: Enantioselective synthesis of optically active  $\beta$ - and  $\gamma$ -siloxyketones», *Synlett*, 10, pp. 1739-1742. doi: 10.1055/s-2004-829577.

Nagle, D. G. *et al.* (2000) «A new indanone from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula* that inhibits hypoxia-induced activation of the VEGF promoter in HEP3B cells», *Journal of Natural Products*, 63, pp. 1431-1433. doi: 10.1021/np000216e.

- Nakamura, Y. *et al.* (2007) «Aerobic oxidative kinetic resolution of racemic alcohols with bidentate ligand-binding Ru(salen) complex as catalyst», *Tetrahedron*, 63, pp. 6383-6387. doi: 10.1016/j.tet.2007.03.105.
- Nasir Abbas Bukhari, S., Jasamai, M. y Jantan, I. (2012) «Synthesis and Biological Evaluation of Chalcone Derivatives (Mini Review)», *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12, pp. 1394-1403. doi: 10.2174/13895575112091394.
- Ng, K. M. E. y McMorris, T. C. (1984) «An efficient synthesis of pteroin C and other pterosins», *Canadian Journal of Chemistry*, 62, pp. 1945-1953. doi: 10.1139/v84-334.
- Ortiz de Montellano, P. R. (2005) «Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry: Third edition», Springer.
- Panjehshahin, M. R., Yates, M. S. y Bowmer, C. J. (1992) «A comparison of drug binding sites on mammalian albumins», *Biochemical Pharmacology*, 44, pp. 873-879. doi: 10.1016/0006-2952(92)90118-3.
- Peters, T. J. (1995) «All about Albumin Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications», *Academic Press*.
- Petrignet, J., Roisnel, T. y Grée, R. (2007) «Application of the intramolecular isomerisation - Aldolisation from allylic alcohols and allylic silyl ethers to the synthesis of indanones and indenones», *Chemistry - A European Journal*, 13(26), pp. 7374-7384. doi: 10.1002/chem.200700613.
- De Raadt, A. *et al.* (1992) «Chemoselective enzymatic hydrolysis of aliphatic and alicyclic nitriles», *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, pp. 137-140. doi: 10.1039/p19920000137.
- Rahman, A. F. M. M. *et al.* (2012) «A facile solvent free claisen-schmidt reaction: Synthesis of  $\alpha,\alpha'$ -bis-(Substituted-benzylidene)cycloalkanones and  $\alpha,\alpha'$ -bis-(Substituted-alkylidene)cycloalkanones», *Molecules*, 17, pp. 571-583. doi: 10.3390/molecules17010571.
- Ramesh, P., Shalini, B. y Fadnavis, N. W. (2014) «Knoevenagel condensation of diethylmalonate with aldehydes catalyzed by immobilized bovine serum albumin (BSA)», *RSC Advances*, 4, pp. 7368-7373. doi: 10.1039/c3ra45273e.
- Rayar, A., Veitía, M. S. I. y Ferroud, C. (2015) «An efficient and selective microwave-assisted Claisen-Schmidt reaction for the synthesis of functionalized benzalacetones», *SpringerPlus*, 4, pp. 8-12. doi: 10.1186/s40064-015-0985-8.

Reeder, D. J. y Schaffer, R. (1977) «Bovine Serum Albumin Standard reference material 926», *National Bureau of standards*.

Reetz, M. T., Mondière, R. y Carballeira, J. D. (2007) «Enzyme promiscuity: first protein-catalyzed Morita-Baylis-Hillman reaction», *Tetrahedron Letters*, 48, pp. 1679-1681. doi: 10.1016/j.tetlet.2007.01.063.

Revell, J. D. y Wennemers, H. (2007) «Peptidic catalysts developed by combinatorial screening methods», *Current Opinion in Chemical Biology*, 11, pp. 269-278. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.05.015.

Ruan, J., Iggo, J. A. y Xiao, J. (2011) «Direct synthesis of 1-indanones via pd-catalyzed olefination and ethylene glycol-promoted aldol-type annulation cascade», *Organic Letters*, 13, pp. 268-271. doi: 10.1021/ol102756m.

Rudolph, F. B. y Fromm, H. J. (1979) «[7] Plotting Methods for Analyzing Enzyme Rate Data», *Methods in Enzymology*, 63, pp. 138-159. doi: 10.1016/0076-6879(79)63009-4.

Sabín, J. G., Ramallal, R. M. y Rebolledo, F. (2011) «Regioselective enzymatic acylation of complex natural products: Expanding molecular diversity». *Chemical Society Reviews*, 40, 5321–5335. <https://doi.org/10.1039/c1cs15081b>

Saima *et al.* (2015) «Bovine serum albumin triggered waste-free aerobic oxidative coupling of thiols into disulphides on water: An extended synthesis of bioactive dithiobis(phenylene)bis(benzylideneimine) via sequential oxidative coupling-condensation reactions in one pot from», *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Elsevier B.V., 116, pp. 113-123. doi: 10.1016/j.molcatb.2015.03.008.

Schmidt, J. *et al.* (2013) «The effect of the hydrophobic environment on the retro-aldol reaction: Comparison to a computationally-designed enzyme», *Organic and Biomolecular Chemistry*, 11, pp. 8419-8425. doi: 10.1039/c3ob41898g.

Sharma, N. *et al.* (2011) «First bovine serum albumin-promoted synthesis of enones, cinnamic acids and coumarins in ionic liquid: An insight into the role of protein impurities in porcine pancreas lipase for olefinic bond formation», *Advanced Synthesis and Catalysis*, 353, pp. 871-878. doi: 10.1002/adsc.201000870.

Sharma, U. K. *et al.* (2012) «Biocatalysts for multicomponent Biginelli reaction: bovine serum albumin triggered waste-free synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-ones», *Amino Acids*, 44, pp. 1031-1037. doi: 10.1007/s00726-012-1437-1.

Singh, S. S. y Mehta, J. (2006) «Measurement of drug–protein binding by immobilized human serum albumin-HPLC and comparison with ultrafiltration», *Journal of Chromatography B*. Elsevier, 834, pp. 108-

116. doi: 10.1016/J.JCHROMB.2006.02.053.

Spector, A. A., John, K. y Fletcher, J. E. (1969) «Binding of long-chain fatty acids to bovine serum albumin», *Journal of Lipid Research*. *Journal of Lipid Research*, 10, pp. 56-67. doi: 10.1016/s0022-2275(20)42649-5.

Strohmeier, G. A. *et al.* (2009) «Investigation of lipase-catalyzed Michael-type carbon-carbon bond formations», *Tetrahedron*. Elsevier Ltd, 65, pp. 5663-5668. doi: 10.1016/j.tet.2009.05.042.

Sugimoto, T. *et al.* (1978) «Asymmetric reduction of aromatic ketones by sodium borohydride in the presence of bovine serum albumin», *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 21, pp. 926-927. doi: 10.1039/C39780000926.

Sułkowska, A. (2002) «Interaction of drugs with bovine and human serum albumin», *Journal of Molecular Structure*, 614, pp. 227-232.

Suzuki, T. *et al.* (2009) «Ir-catalyzed oxidative desymmetrization of meso-diols», *Organic Letters*, 11(19), pp. 4286-4288. doi: 10.1021/ol9016436.

Svedendahl, M., Hult, K. y Berglund, P. (2005) «Fast carbon-carbon bond formation by a promiscuous lipase», *Journal of the American Chemical Society*, 127, pp. 17988-17989. doi: 10.1021/ja056660r.

Taylor, R. P. (1976) «Bovine Serum Albumin as a Catalyst. 4. Identification of the Active Site», *Journal of the American Chemical Society*, 98, pp. 2684-2686. doi: 10.1021/ja00425a058.

Thopate, Y. *et al.* (2016) «NMR and DFT Insight into the Synergistic Role of Bovine Serum Albumin–Ionic Liquid for Multicomponent Cascade Aldol/Knoevenagel–thia-Michael/Michael Reactions in One Pot», *ChemCatChem*, 8, pp. 3050-3056. doi: 10.1002/cctc.201600637.

Thorn, S. N. *et al.* (1995) «Large rate accelerations in antibody catalysis by strategic use of haptenic charge», *Nature*, pp. 228-230. doi: 10.1038/373228a0.

Torre, O., Alfonso, I. y Gotor, V. (2004) «Lipase catalysed Michael addition of secondary amines to acrylonitrile», *Chemical Communications*, 4, pp. 1724-1725. doi: 10.1039/b402244k.

Tyagi, M. *et al.* (2009) «Exploring functional roles of multibinding protein interfaces», *Protein Science*, 18, pp. 1674-1683. doi: 10.1002/pro.181.

Uddin, S. J. *et al.* (2011) «(2 S,3 S)-sulfated pterosin C, a cytotoxic sesquiterpene from the Bangladeshi mangrove fern *Acrostichum aureum*», *Journal of Natural Products*, 74, pp. 2010-2013. doi: 10.1021/np2004598.

Velez Rueda, A. J. (2020) «Desarrollo de herramientas bioinformáticas para el estudio y predicción de la promiscuidad y multiplicidad de sustrato en enzimas», Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina.

Wang, C. H., Guan, Z. y He, Y. H. (2011) «Biocatalytic domino reaction: Synthesis of 2H-1-benzopyran-2-one derivatives using alkaline protease from *Bacillus licheniformis*», *Green Chemistry*, 13, pp. 2048-2054. doi: 10.1039/c0gc00799d.

Wang, J. L. *et al.* (2011) «*Candida antarctica* lipase B-catalyzed the unprecedented three-component Hantzsch-type reaction of aldehyde with acetamide and 1,3-dicarbonyl compounds in non-aqueous solvent», *Tetrahedron*, 67, pp. 2689-2692. doi: 10.1016/j.tet.2011.01.045.

Wang, Yuanyuan *et al.* (2012) «Experimental and Theoretical Investigation of One-pot Synthesis of 2-Amino-4H-chromenes Catalyzed by Basic-functionalized Ionic Liquids», *Chinese Journal of Chemistry*, 30, pp. 1709-1714. doi: 10.1002/cjoc.201200181.

Xie, B. H. *et al.* (2012) «The enzymatic asymmetric aldol reaction using acidic protease from *Aspergillus usamii*», *Tetrahedron*. Elsevier Ltd, 68, pp. 3160-3164. doi: 10.1016/j.tet.2012.02.056.

Xie, Z. B. *et al.* (2013) «Lipase-catalyzed stereoselective cross-aldol reaction promoted by water», *ChemCatChem*, 5, pp. 1935-1940. doi: 10.1002/cctc.201200890.

Yang, G. *et al.* (2012) «Highly efficient enantioselective three-component synthesis of 2-amino-4H-chromenes catalysed by chiral tertiary amine-thioureas», *Chemical Communications*. The Royal Society of Chemistry, 48, pp. 5880-5882. doi: 10.1039/C2CC30731F.

Yasohara, Y. *et al.* (2001) «Enzymatically Enantioselective Hydrolysis of Prochiral 1,3-Diacloxyglycerol Derivatives», *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, pp. 2044-2049. doi: 10.1271/bbb.65.2044.

Yoshikuni, Y., Ferrin, T. E. y Keasling, J. D. (2006) «Designed divergent evolution of enzyme function», *Nature*, 440, pp. 1078-1082. doi: 10.1038/nature04607.

Yousefi, M., Mohammadi, M. y Habibi, Z. (2014) «Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose», «*Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*». Elsevier B.V., 104, pp. 87-94. doi: 10.1016/j.molcatb.2014.03.005.

Zhan, C. G., Spencer, P. y Dixon, D. A. (2003) «Computational insights into the chemical structures and mechanisms of the chromogenic and neurotoxic effects of aromatic  $\gamma$ -diketones», *Journal of Physical Chemistry B*, 107(12), pp. 2853-2861. doi: 10.1021/jp0221486.

Zhang, F., Li, C. y Qi, C. (2013) «Highly diastereo- and enantioselective direct aldol reaction under solvent-free conditions», *Tetrahedron Asymmetry*. Elsevier Ltd, 24, pp. 380-388. doi: 10.1016/j.tetasy.2013.02.013.

Zhang, Y. *et al.* (2014) «Ionic liquid as a recyclable and efficient medium for lipase-catalyzed asymmetric cross aldol reaction», *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Elsevier B.V., 110, pp. 100-110. doi: 10.1016/j.molcatb.2014.10.008.

Zhao, D. D. *et al.* (2013) «Bovine serum albumin-catalyzed one-pot synthesis of 2-aminothiophenes via Gewald reaction», *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 95, pp. 29-35. doi: 10.1016/j.molcatb.2013.05.014.

Zhu, W. *et al.* (2002) «Evidence That the pre-mRNA Splicing Factor Clf1p Plays a Role in DNA Replication in *Saccharomyces cerevisiae*», 1333, pp. 1319-1333.

# Conclusiones



Tal como se desarrolló en el Capítulo 1, la biocatálisis, que utiliza enzimas y microorganismos en química orgánica sintética, actualmente se encuentra consolidada como una metodología práctica, eficiente y ambientalmente compatible, que brinda una alternativa a métodos tradicionales utilizados a escala industrial. A lo largo de las últimas décadas se ha publicado que numerosas enzimas poseen actividades catalíticas inesperadas, mostrando así que un mismo sitio activo es capaz de catalizar reacciones químicas diferentes, en lo que se conoce como promiscuidad catalítica; además, la promiscuidad no se limita a enzimas y es un fenómeno más general de las proteínas. En este contexto, en el presente trabajo se logró ampliar las aplicaciones de la promiscuidad, centrándose en el estudio de la condensación aldólica cruzada catalizada por albúmina de suero bovino (BSA). El estudio presentado se orientó a encontrar una metodología que constituya una alternativa a los métodos químicos clásicos de formación de cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas (enonas), tanto por transcurrir en condiciones suaves de reacción como por emplear un catalizador sustentable y compatible con el medio ambiente.

En el Capítulo 2 se presentó el estudio de la reacción de condensación aldólica cruzada entre acetona y una serie de benzaldehídos, con catálisis de BSA. Los resultados mostraron que los sustituyentes del sustrato aldehídico aromático evidencian escaso impacto en los valores de conversión a enona (88-97 %) con la excepción de *m*- y *p*-nitrobenzaldehído (32-37%), en cuyos casos se obtuvieron mezclas de enona y cetol, predominando los cetoles correspondientes.

Por el contrario, se observó un notorio efecto del solvente de reacción y de su proporción en la mezcla de solventes en los porcentajes de conversión a enona. Los resultados muestran que la adición de agua en mayores proporciones incrementa la conversión, aunque por encima de la proporción 50:50 (agua/acetona), se observa una marcada caída de la misma. En el caso del *p*-cianobenzaldehído se logró una conversión elevada (97 %) utilizando etanol en vez de agua. De esta forma los resultados confirmaron que la predictibilidad de los resultados es muy limitada y por eso es necesario hacer un *screening* de las condiciones experimentales.

Posteriormente, se presentaron los resultados de la condensación aldólica cruzada entre benzaldehído, *p*-nitro-benzaldehído y cuatro cetonas alifáticas, catalizada por BSA (Capítulo 3). Tanto las cetonas cíclicas (ciclopentanona y ciclohexanona) como las acíclicas (butanona y 3-pentanona) ensayadas permitieron obtener elevados porcentajes de conversión a las enonas correspondientes (77-95%). Esto evidencia una aceptable tolerancia de sustratos tanto en el grupo dador como aceptor frente a la reacción de condensación aldólica. Por otra parte, solo se observó la formación de cetoles en la reacción de *p*-nitrobenzaldehído con ciclopentanona y, en menor medida, con 3-pentanona. De todos los sustratos utilizados, se obtuvieron *bis*-enonas únicamente al utilizar ciclohexanona. Dicho producto se

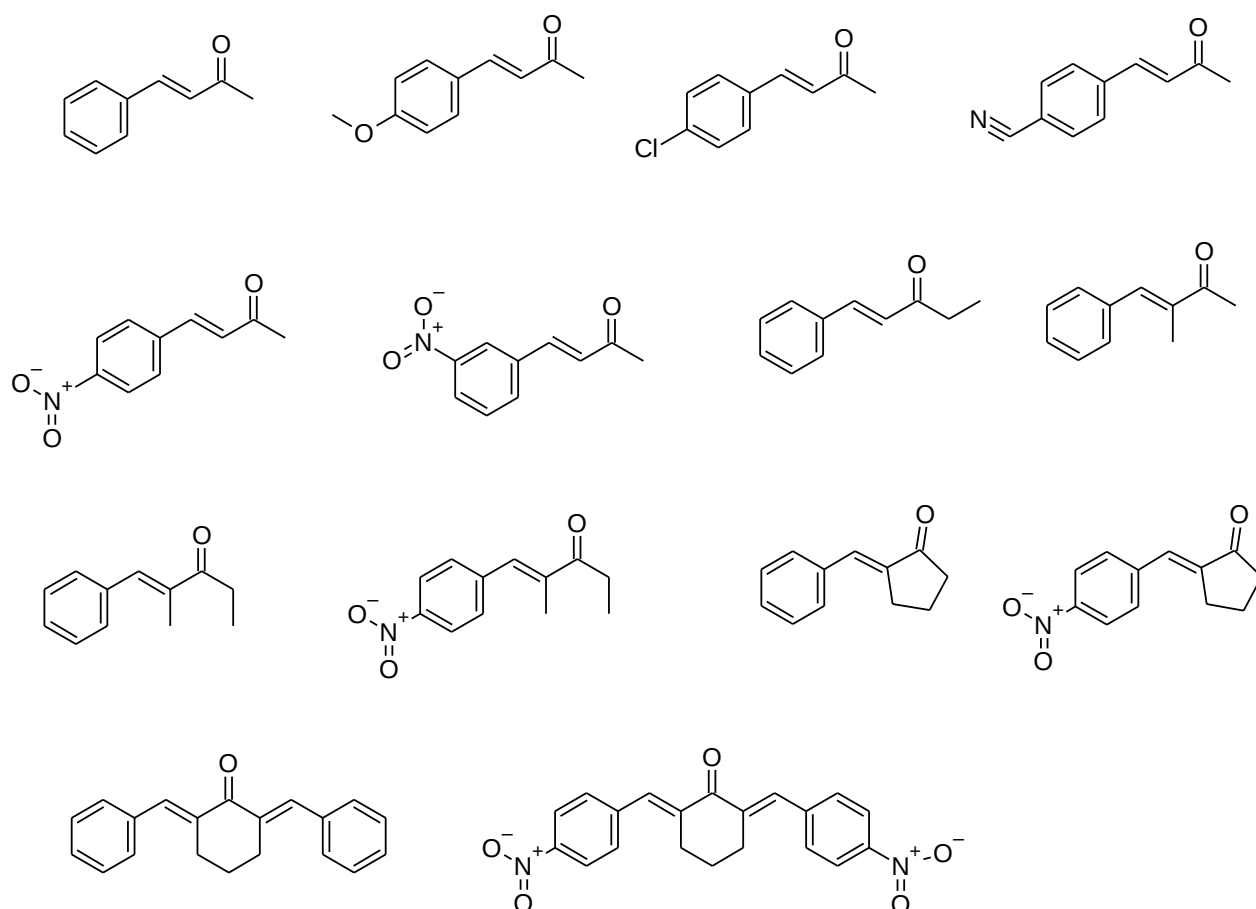
formó en bajas proporciones incluso con un exceso molar benzaldehído/ciclohexanona elevado y a tiempos prolongados de reacción. Por una parte, este resultado sugiere que la conversión de enona a *bis* enona podría verse afectada por el impedimento estérico en el sitio catalítico de la BSA y por otra parte, que la mayoría de las enonas formadas estarían impedidas para seguir reaccionando a *bis* enonas en el sitio de la catálisis.

Para obtener información sobre el mecanismo involucrado en la reacción de formación de enonas catalizada por BSA se estudió la reacción entre ciclohexanona y *p*-nitrobenzaldehído. Tomando en consideración que para la adición aldólica de acetona y aldehídos aromáticos catalizada por BSA en medio acuoso se había propuesto en bibliografía un mecanismo vía enamina, y a partir de los experimentos cinéticos llevados a cabo en esta tesis, se postuló un mecanismo bi-bi ordenado que incluye residuos del sitio catalítico de la proteína que presentan valores de  $pK_a$  anormales. En el mecanismo propuesto, la lisina anormalmente ácida Lis-222 ( $pK_a$  7,8), mencionada en la introducción y en el Capítulo 2 (pág. 54), podría actuar como nucleófilo para la formación del cetol, cuya deshidratación subsiguiente a enona podría estar favorecida por el residuo Arg-280 ( $pK_a$  14,1). Los resultados de los experimentos cinéticos, como también los ensayos de control realizados con BSA desnaturalizada (presentados en los capítulos 2 y 3) sostienen la idea de que la albúmina no es un catalizador inespecífico.

Finalmente, se ensayaron reacciones de ciclación aldólica intramolecular catalizadas por BSA (Capítulo 4). Se presentaron los resultados obtenidos en la formación de 3-hidroxi-1-indanona catalizada por esta proteína, a partir de 2-acetilbenzaldehído. Además, se mostraron los resultados de otros sustratos ensayados: 1,2-diacetilbenceno y 2,5-hexanodiona, a pesar de que no se logró obtener los correspondientes productos de adición o de condensación aldólica. Como se discutió en el Capítulo 4, los resultados obtenidos con 2,5-hexanodiona podrían interpretarse considerando la menor versatilidad de BSA frente a sustratos alifáticos; para el 1,2-diacetilbenceno, podría suponerse la unión covalente del sustrato a la proteína. Esta se observó entre el sustrato 2-acetilbenzaldehído y el biocatalizador, lo que pudo comprobarse mediante el análisis por MALDI-TOF de diversos péptidos obtenidos luego de la digestión con tripsina de la BSA utilizada previamente con dicho sustrato. Se logró identificar péptidos en los cuales hay señales cuya diferencia de masa con respecto a los péptidos de la BSA de control corresponden a la masa del 2-acetilbenzaldehído o a la masa de dicho compuesto menos una molécula de agua, sugiriendo la formación de una imina entre la proteína y el sustrato. Además, los resultados obtenidos al ensayar la ciclación de 2-acetilbenzaldehído con BSA recuperada de una reacción previa

con este sustrato sugieren que la ciclación no ocurre en el mismo sitio que la condensación cruzada de acetona y benzaldehído.

En conclusión, en este trabajo se logró ampliar las aplicaciones de la promiscuidad y avanzar en su comprensión, centrándose en el estudio de la reacción de condensación aldólica cruzada catalizada por BSA. La tesis desarrolla un procedimiento suave y simple para obtener cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas a partir de aldehídos aromáticos y cetonas alifáticas lineales y cíclicas, aplicando la catálisis promiscua de dicho biocatalizador. Mediante esta metodología se obtuvo a escala preparativa un conjunto de 14 cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas (Figura 4), caracterizadas espectroscópicamente.



**Figura 4.** Cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas obtenidas, aisladas e identificadas durante en este trabajo.

Las condiciones experimentales aplicadas en este procedimiento biocatalítico contrastan con las condiciones básicas de los métodos químicos habituales y también brindan una alternativa ventajosa a los escasos antecedentes de la catálisis de BSA para la formación de enonas, comentados en el Capítulo

1. Cabe resaltar que la proteína pudo ser reutilizada numerosas veces sin pérdida considerable de rendimiento. Además, los solventes de reacción empleados en este trabajo fueron de bajo costo y compatibles con el medio ambiente; en todos los casos las temperaturas fueron suaves. Este último factor, en conjunción con la ausencia de bases fuertes, confiere a este procedimiento potencialidad para la condensación aldólica de compuestos lábiles en medio fuertemente básico.

Parte del presente trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

*Bovine serum albumin-catalysed cross aldol condensation: Influence of ketone structure.* **Sebastián M. Ardanaz**, Estefanía L. Borucki, Ana J. Velez Rueda, Gustavo Parisi, Adolfo M. Iribarren and Luis E. Iglesias. *Process Biochemistry* (2019) 86:50–57. DOI 10.1016/j.procbio.2019.08.003

*A mild procedure for enone preparation catalysed by bovine serum albumin in a green and easily available médium.* **Sebastián M. Ardanaz**, Ana J. Velez Rueda, Gustavo Parisi, Adolfo M. Iribarren & Luis E. Iglesias. *Catalysis Letters* (2018) 148:1750-1757. DOI 10.1007/s10562-018-2386-4