

*Exploración de metodologías
quimioenzimáticas aplicables a la síntesis
de feromonas de agregación de
coleópteros plaga. Síntesis de sitofilato.*

Trabajo presentado por

Silvana Ravía

para aspirar al título de Magister en Química.

Integración del Tribunal:

Dra. Elizabeth Lewkowicz

Dra. Pilar Menéndez

Dr. Andrés González

Dra. Daniela Gamenara

Dra. Silvana Vero

Directoras de Tesis

Departamento de Química Orgánica

Facultad de Química

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

Mayo de 2014

A mis padres, Nestor y Alicia, por todo su esfuerzo y amor.

En lo ideal todo depende del impulso; en lo real, de la perseverancia.

Goethe.

Agradecimientos

Esta tesis me llevó a crecer a nivel académico pero más que nada a crecer a nivel personal. Durante este camino donde hubo sonrisas, rabietas, cariño, llanto y amistad me permitieron, al finalizar, entender y aprender de cada una de las personas que en algún momento cruzaron o caminaron junto a mí. A todas ellas muchas gracias, ya que de una forma u otra, me guiaron a quien soy hoy.

A mi madre, Alicia, quien ha estado siempre y de manera incondicional junto a mí. Hoy al estar Mateo confirmo lo maravillosa madre que es.

A mi padre, Nestor, quien me ha enseñando a seguir luchando pese a las circunstancias y a valorar, en primer lugar, el vínculo con la familia y los seres queridos.

A Federico y Mateo, mi familia. Fede mi compañero, con quien aprendo día a día a construir esta familia y superar mediante comprensión y amor cualquier diferencia que pueda existir. Gracias por acompañar este proyecto y saber comprenderme.

Mateo, la única persona en el mundo que me permite abrirme sin reparos. Gracias por tu hermosa sonrisa de todas las mañanas. Los amo.

A mis hermanos, Mariela y Eduardo, por estar siempre sin importar razón, día ni hora.

A Ceci y Nadia, compañeras y amigas desde hace un largo tiempo. En las malas y en las buenas, siempre.

A Nacho, por explicarme y responderme todas mis consultas académicas. Pero por sobre todo, enseñarme a entender a los demás y comprenderme a mí misma. Gracias lindo.

A Vicky y Viro, por saber escuchar, dar un consejo y poner el hombro en aquellas rabietas fuera de control.

A mis amigos Ana, Fer, Vivi, Mai, Pich, Pati, Nia, Ire, Z, Mari, Pao y Lucía, por cada sonrisa, consejo y ayuda cuando lo precise.

A todos mis compañeros y amigos del LSO: Pipo, Chuck, Leti, Mel, Mari, GaSa, Vale, Mariela, Marga, Quique, Gustavo, David.

A Silvana, por guiarme en este proyecto.

A Daniela, por guiarme en este proyecto, por la paciencia y comprensión en esta última etapa. En el transcurso de este camino logramos conocernos, entendernos y aceptarnos tal cual somos.

Agradezco a:

Horacio por los RMN.

Sonia Rodríguez por las cepas de *E. coli*.

OPCW (Organization for the Prohibition of Chemical Weapons).

PDT (Programa de Desarrollo Tecnológico).

PEDECIBA.

CSIC.

Facultad de Química.

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN	18
2. ANTECEDENTES	27
1. Utilización de feromonas en el manejo integrado de plagas (MIP).	28
2. Biocatálisis en síntesis.	33
2.1 Introducción.	33
2.2 Biocatalizadores.	34
2.3 Biotransformaciones aplicadas.	36
2.3.1 Reducciones.	36
2.3.1.1 Fuentes de enzimas redox.	38
2.3.2 Desracemizaciones.	44
2.3.3 Transesterificación.	45
3. Sitofilato.	49
3.1 Síntesis de sitofilato mediante estrategias de síntesis orgánica clásica.	50
3.1.1 Epoxidación asimétrica de Sharpless.	51
3.1.1.1 Estrategia I.	53
3.1.2 Reacción aldólica.	55
3.1.2.1 Estrategia II.	56
3.1.2.2 Estrategia III.	59
3.1.2.3 Estrategia IV.	61
3.1.3 Hidrogenación asimétrica.	62
3.1.3.1 Estrategia V.	64
3.1.3.2 Estrategia VI.	65
3.2 Síntesis de sitofilato mediante el uso de biocatalizadores.	66
3.2.1 Estrategia VII.	67
3.2.2 Estrategia VIII.	68
3.2.3 Estrategia IX.	69
4. Referencias bibliográficas.	71

3. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA	83
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
1. Síntesis de precursores quirales de feromonas. Evaluación de biocatalizadores y metodologías.	87
1.1 Desarrollo de un procedimiento para el seguimiento de las biotransformaciones.	87
1.1.1 Obtención de 3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (3).	87
1.1.2 Asignación del (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (3a).	93
1.1.3 Asignación del (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo(3d).	93
1.1.4 Asignación de los estereoisómeros (3b) y (3c).	94
1.1.5 Asignación de los 4 estereoisómeros de 3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo.	95
1.2 Screening de hongos y levaduras.	97
1.2.1 Reducciones.	97
1.2.1.1 Células en crecimiento.	97
1.2.1.2 Células en reposo.	100
1.2.1.3 Determinación de la temperatura óptima de la cepa seleccionada como biocatalizador.	102
1.2.1.4 Escalado de la producción de biomasa de la cepa seleccionada como biocatalizador.	103
1.2.1.5 Escalado de la reducción con <i>A. pullulans</i> .	103
1.2.2 Desracemizaciones.	103
2. Síntesis de sitofilato.	107
2.1 Identificación de los estereoisómeros del compuesto (6).	108
2.2 Síntesis de sitofilato.	114
2.2.1 Reducción de (5).	114
2.2.2 Acetilación de la mezcla (6c) y (6d).	118
2.2.3 Síntesis de sitofilato.	119
3. Referencias bibliográficas.	132

5. CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO	134
1. Conclusiones.	135
1.1 Evaluación de biocatalizadores y metodologías.	135
1.2 Síntesis de sitofilato.	135
2. Trabajo a Futuro.	135
3. Referencias bibliográficas.	137
6. PARTE EXPERIMENTAL	138
1. Materiales y métodos.	139
2. Descripción de los experimentos.	140
2.1 2-metil-3-oxobutanoato de etilo (2).	140
2.1.1 Método I.	140
2.1.2 Método II.	141
2.1.3 Método III.	141
2.1.4 Método IV.	141
2.2 2-metil-3-oxopentanoato de etilo (5).	142
2.3 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo, (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (3 <i>c</i> ,3 <i>d</i>).	142
2.4 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo (6 <i>d</i>).	143
2.5 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>) 3- <i>p</i> -nitrobenzoiloxi-2-metilpentanoato de etilo (11).	144
2.6 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo (6 <i>b</i>).	144
2.7 3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (3 <i>a</i> , 3 <i>b</i> , 3 <i>c</i> , 3 <i>d</i>). Reducción química.	145
2.8 3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo (6 <i>a</i> , 6 <i>b</i> , 6 <i>c</i> , 6 <i>d</i>). Reducción química.	145
2.9 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (3 <i>a</i>). Reducción enzimática con <i>E. coli</i> JM105.	146
2.10 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (3 <i>d</i>). Reducción enzimática con <i>E. coli</i> BL21.	146
2.11 (3 <i>S</i>)-hidroxipentanoato de etilo (8). Reducción enzimática con <i>E. coli</i> BL21.	147
2.12 Procedimiento para la reducción enzimática con hongos y levaduras.	147

2.12.1	Células en crecimiento.	147
2.12.2	Células en reposo.	148
2.12.3	Caracterización del crecimiento de <i>A. pullulans</i> en las condiciones de cultivo.	148
2.12.3.1	Determinación de la temperatura óptima de cultivo.	148
2.12.3.2	Escalado de la producción de biomasa.	149
2.13	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (3d). Procedimiento para la reducción en escala preparativa con <i>A. pullulans</i> .	149
2.14	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo y (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo (6c, 6d). Procedimiento para la reducción en escala preparativa con <i>A. pullulans</i> .	150
2.15	Procedimiento para la estereoinversión enzimática (desracemización) catalizada por hongos.	150
2.16	Procedimiento para el estudio de la inhibición de la desracemización con <i>G. candidum</i> .	151
2.17	Acetilación catalizada con Cal B de la mezcla diastereomérica (3a, 3b, 3c, 3d).	151
2.18	Acetilación catalizada con Cal B de la mezcla (6c, 6d).	152
2.19	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-sitofilato (7).	152
2.20	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-sitofilato (12).	153
3.	Referencias bibliográficas.	154

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Sitophilus granarius</i> y su feromona de agregación sitofilato.	21
Figura 2. Ejemplos de trampas de monitoreo para coleópteros.	22
Figura 3. Feromonas de las especies <i>S. orizae</i> y <i>M. hemipterus</i> .	24
Figura 4. Daños causados por insectos en granos almacenados.	28
Figura 5. <i>Sitophilus granarius</i> “gorgojo del trigo”.	33
Figura 6. Transferencia del hidruro de la coenzima NAD(P)H, al grupo carbonilo.	37
Figura 7. Reducción estereoselectiva de cetonas. Regla de Prelog.	38
Figura 8. Modelo del sitio activo, que explica la enantioselectividad de lipasas.	49
Figura 9. Conformación <i>pseudo</i> -silla del estado de transición.	61
Figura 10. Estados de transición en la transferencia del hidruro del complejo B.	63
Figura 11. Estados de transición de la hidrogenación catalítica heterogénea.	64
Figura 12. Racionalización para la diastereoselectividad observada.	66
Figura 13. Diastereoselectividad en los aductos con grupos hidroxilo y ácido carboxílico libres.	66
Figura 14. Esquema de trabajo de esta tesis para la síntesis de sitofilato.	87
Figura 15. Proyecciones de Newman para los esteroisómeros <i>syn</i> y <i>anti</i> de 3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (3).	90
Figura 16. Espectro de ¹ H-RMN del 3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo.	91
Figura 17. Cromatografía gaseosa quiral de la mezcla racémica 3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (3) mediante Programa 1.	92
Figura 18. Biotransformación de (2) con <i>E. coli</i> JM105.	93
Figura 19. Biotransformación de (2) con <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ΔyqhE (pPP4).	94
Figura 20. Acetilación de la mezcla racémica (3) con Cal B.	95
Figura 21. Cromatograma Programa 1 mezcla (3).	96
Figura 22. Espectro de ¹ H-RMN de la mezcla (5).	109
Figura 23. Cromatograma de la mezcla (6) mediante Programa 2.	111

Figura 24. Espectro de 1H-RMN del compuesto (6d).	113
Figura 25. Cromatograma de reducción de (5) con <i>A. pullulans</i> .	114
Figura 26. Espectro de 1H-RMN a t = 0 h	116
Figura 27. Espectro de 1H-RMN a t = 24 h.	117
Figura 28. Cromatograma de la acetilación con Cal B.	119
Figura 29. Espectro de 1H-RMN de (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-sitofilato.	121
Figura 30. Espectro de 1H-RMN de (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-sitofilato, ampliación en la señal del protón carbinol (3.57 ppm).	122
Figura 31. Espectro de 1H-RMN de (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-sitofilato, ampliación en las señales del grupo etilpropilo (0.89 y 1.58 ppm).	123
Figura 32. Espectro de 1H-RMN de (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-sitofilato, ampliación en la señal del protón metínico del grupo etilpropilo (4.80 ppm).	124
Figura 33. Cromatograma del compuesto (6d) mediante Programa 2.	125
Figura 34. Espectro de 1H-RMN de (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-sitofilato.	128
Figura 35. Espectro de 1H-RMN de (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-sitofilato. Ampliación en las señales	

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1. Reducción asimétrica de cetonas proquirales.	36
Esquema 2. Síntesis de (S)-4-cloro-3-hidroxi-butanoato de metilo mediante <i>G. candidum</i> .	42
Esquema 3. Aumento en la tolerancia de sustratos por medio de una mutación racional de la TeSADH	44
Esquema 4. Desracemización de alcoholes secundarios.	44
Esquema 5. Desracemización de 1-D-feniletanol con <i>G. candidum</i> .	45
Esquema 6. 1) Esterificación y 2) Transesterificación.	46
Esquema 7. Mecanismo de acción de serina-hidrolasas.	48
Esquema 8. Formación del fragmento m/z 74 a través del rearrreglo de Mc Lafferty.	50
Esquema 9. Epoxidación asimétrica de Sharpless.	52
Esquema 10. Mecanismo de la reacción (1) y complejo Ti-tartrato (2).	53
Esquema 11. Etapa clave en el esquema de la síntesis diseñada por Chong para la obtención de (2R,3S)- y (2S,3R)-sitofilato.	54
Esquema 12. Estereoquímica de la reacción aldólica.	55
Esquema 13. La geometría del enolato determina la diastereoselectividad de la reacción.	56
Esquema 14. Síntesis de Di Battista y Webster del enantiómero inactivo de sitofilato.	56
Esquema 15. Síntesis del aducto aldólico 2 mediante procedimiento de Evans.	57
Esquema 16. Geometría de los enolatos.	57
Esquema 17. Diastereoselectividad en la reacción, modelo de Zimmerman-Traxler.	58
Esquema 18. Enantioselectividad en la condensación aldólica	59
Esquema 19. Síntesis de (2R,3S)-stifilato por Badía y Vicario.	60
Esquema 20. Pseudoefedrina como auxiliar quiral en una adición aldólica. Síntesis de Badía.	60
Esquema 21. Síntesis de sitofilato por Gil <i>et al.</i> .	61
Esquema 22. Ciclo catalítico del BINAP-Ru para la hidrogenación de β -cetoésteres.	63
Esquema 23. Reducción asimétrica. Síntesis de Razkin.	65
Esquema 24. Hidrogenación catalítica heterogénea. Síntesis de Mateus.	65

Esquema 25. Síntesis planteada por Sugai <i>et al.</i> en 1991.	67
Esquema 26. Screening de cetoreductasas como etapa clave en la síntesis de sitofilato.	69
Esquema 27. Síntesis planteada por Kalaitzakis en 2007.	70
Esquema 28. Reducción biocatalítica de 2-metil-3-oxobutanoato de etilo.	84
Esquema 29. Transesterificación catalizada por lipasas, de (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo con 3-propanol para la obtención de (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-sitofilato.	85
Esquema 30. Síntesis de 2-metil-3-oxobutanoato de etilo.	88
Esquema 31. Reducción química de la mezcla racémica (2).	89
Esquema 32. Acetilación de la mezcla racémica (3) con Cal B.	95
Esquema 33. α -metilación de 3-hidroxibutanoato de etilo (4).	96
Esquema 34. Reducción del compuesto (2).	99
Esquema 35. Desracemización del 1-D-feniletanol.	105
Esquema 36. Mecanismo propuesto para la desracemización de la mezcla racémica (3) con <i>G. candidum</i> .	105
Esquema 37. Mecanismo propuesto para la desracemización con <i>A. terreus</i> .	107
Esquema 38. Ruta quimioenzimática propuesta para la síntesis de 7.	108
Esquema 39. Reducción química de la mezcla (5).	110
Esquema 40. Síntesis del esteroisómero (6d).	111
Esquema 41. Nueva ruta sintética para la síntesis de sitofilato.	118
Esquema 42. Reacción de Mitsunobu sobre el compuesto (6d).	126

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Condiciones de metilación de (1).	88
Tabla 2. Tiempos de retención y áreas en GC quiral del producto 3 mediante Programa 1.	92
Tabla 3. Reducción de (2) mediante biotransformación con células en crecimiento.	98
Tabla 4. Reducción de (2) mediante biotransformación con células en reposo (resting cells).	101
Tabla 5. Resultados del escalado de la producción de biomasa a distintas condiciones.	103
Tabla 6. Desracemización de la mezcla racémica (3).	104
Tabla 7. Relación de áreas CH/CH ₂ en espectro de ¹ H-RMN.	115
Tabla 8. Condiciones de reacción. Reacción de Mitsunobu.	126

TABLA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKR	Aldo-ceto-reductasa
BINAP	2,2'-bis(difenilfosfina)-1,1'-binaftil
d	doblete
DABCO	1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano
DCC	<i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida
dd	Doblete de doblete
ddd	Doblete de doblete de doblete
ddq	Doblete de doblete de cuartetos
ddt	Doblete de doblete de triplete
DEAD	Azodicarboxilato de dietilo
DIAD	Azodicarboxilato de diisopropilo
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMAP	4-dimetilaminopiridina
3,5-DNB	Ácido 3,5-dinitrobenzoico
<i>ed</i>	Exceso diastereomérico
<i>ee</i>	Exceso enantiomérico
EM	Espectro de masas
Et ₃ N	Trietilamina
EtCHO	Propionaldehido
EtOH	Alcohol etílico
FAD	Flavina Adenina Dinucleótido
GC	Cromatografía gaseosa
Hz	Hertz
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LDA	Diisopropilamiduro de litio

m	multiplete
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
Me ₂ CuLi	Dimetilcuprato de litio
MeI	Ioduro de metilo
MeOH	Alcohol metílico
OD ₆₀₀	Densidad óptica medida a 600nm
PPh ₃	Trifenilfosfina
PNB	Ácido <i>p</i> -nitrobenzoico
2-PrOH	2-propanol
q	Cuarteto
s	Singulete
t	Triplete
TA	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBSCI	Cloruro de <i>tert</i> -butildimetilsilano
THF	Tetrahidrofurano
tt	Triplete de tripletes
ZrCp ₂ Cl ₂	Dicloruro de bis(ciclopentadienil)zirconio

Introducción

1. **INTRODUCCIÓN**

Los organismos vivos utilizan varios canales de comunicación (visual, acústico, eléctrico, etc.) siendo el mediado por sustancias químicas el más antiguo y compartido por una gran variedad de géneros.¹ Tanto las especies del Reino Animal como del Reino Vegetal secretan o liberan estas sustancias de forma voluntaria o involuntaria y son responsables de generar respuestas durante los procesos de comunicación emisor-receptor, modificando así el comportamiento de ambos. Las sustancias químicas involucradas en esta comunicación se denominan semioquímicos, y pueden actuar entre individuos de diferentes especies (aleloquímicos) o entre individuos de una misma especie (feromonas). Los aleloquímicos son clasificados de acuerdo al costo y beneficio del emisor y/o receptor, encontrándose las kairomonas (el beneficiario es el emisor), alomonas (beneficiario es el receptor) y sinomonas (emisor y receptor son beneficiados).¹

Las feromonas son sustancias secretadas hacia el exterior del cuerpo del animal/insecto, a diferencia de las hormonas, y participan en la comunicación dentro de una misma especie. En función de la interacción en la cual están participando se pueden clasificar en diferentes categorías: territoriales, de alarma, de camino, de agregación, sexuales, de ovoposición, de estratificación social, etc.²

Las sustancias utilizadas por los insectos para comunicarse pueden manipularse por el ser humano con la finalidad de interferir en el éxito de esta comunicación. Es por esto que las feromonas sexuales y de agregación han sido estudiadas en muchas especies por su potencial como herramienta para el manejo de plagas agrícolas. Las tecnologías de control por medio de feromonas tienen la ventaja de no dejar residuos y de afectar únicamente la especie objetivo. Entre los métodos de control, los más comunes involucran la liberación de feromonas en cantidades suficientes para producir el fenómeno de confusión sexual, por el cual se desensibilizan los receptores en las antenas de los machos y éstos no son capaces de localizar a las hembras. Sin embargo, su mayor utilidad en el manejo de plagas ha sido como una potente herramienta de monitoreo.² Debido a su alta especificidad y poder de atracción, las feromonas de un número importante de plagas agrícolas se utilizan en trampas de monitoreo, donde la captura de machos permite una evaluación precisa y temprana de las variaciones poblacionales de la plaga, posibilitando a técnicos y productores una planificación adecuada para la aplicación de insecticidas o liberación de agentes de control biológico.³ Esta estrategia de monitoreo y control se denomina Manejo Integrado de Plagas (MIP) y tiene como objetivo evitar el uso innecesario de insecticidas,

los cuales son altamente tóxicos, a la vez que aumentan la eficacia y diversidad de los métodos de control disponibles.

Por lo expuesto anteriormente, es que la síntesis de feromonas sexuales o de agregación de especies locales de importancia económica en los sectores agrícola, hortícola y/o forestal de la región, es de suma importancia para su uso en el control y/o monitoreo de dichas especies, permitiendo así el desarrollo de un MIP que apunte a minimizar el uso abusivo de pesticidas de amplio espectro.⁴

Los granos de cereales, junto a las oleaginosas y legumbres son la mayor fuente de alimento para humanos y para la mayoría de los animales domésticos. Las producciones anuales de granos de cereales en el mundo son de 530 (arroz), 508 (maíz) y 162 (cebada) millones de toneladas.⁵ En Uruguay, la producción de cereales representa aproximadamente el 47% (2.026 millones de dólares) de su actividad agropecuaria (4.324 millones de dólares).⁶ Este tipo de productos requiere el almacenamiento post cosecha, entre otras razones porque el volumen de producción no coincide con su consumo, y en algunos casos porque los tiempos pueden estar desfasados. En esta etapa de almacenamiento puede haber pérdidas en cantidad y calidad debido al ataque de insectos, roedores, pájaros y microorganismos. En el caso de los insectos, generan pérdidas en ambos aspectos, ya que consumen los granos y/o pueden contaminarlos debido a su actividad metabólica. Asimismo esta actividad genera calor y humedad dando lugar al crecimiento de microflora sobre los granos. Todo esto puede generar granos totalmente incomedibles.⁵ Por esta razón, es que se establecen como prioritaria la detección y remoción de insectos de los granos para asegurar su durabilidad, seguridad y calidad del alimento.

El orden Coleóptera cuenta con unas 350.000 especies conocidas, son el orden más numeroso de insectos, conformando uno de los grupos de mayor importancia económica por los perjuicios que causan en la actividad agrícola.⁴

Una de las especies relevantes en la región es *Sitophilus granarius*, **Figura 1**, siendo una de las principales plagas que afectan a los granos almacenados, y por consiguiente requiere la adopción de constantes medidas de prevención y control. El hábitat de esta especie son silos, depósitos y almacenes. Si bien de los granos afectados, el más común es el trigo, también ataca arroz, cebada, avena, maíz y otros cereales. El gorgojo del trigo (denominación común) pertenece a la familia Curculionidae, mide de 3 a 4.5 mm de longitud y muestra una coloración parda uniforme oscura y brillante. Los adultos se alimentan externamente de cereales sin causar daños mayores, mientras

que las larvas viven en el interior de los granos donde destruyen gradualmente tanto el endosperma como el embrión, volviéndolos inviables para el consumo humano y afectando su poder germinativo. Las hembras generalmente copulan al día siguiente de haber abandonado los granos e inician las puestas tres o cuatro días después. En general, depositan 200 huevos, dejándolos individualmente y por lo común no más de uno por grano. Como requisito para la puesta los granos deben tener un contenido de humedad superior al 10% a fin de permitir el normal desarrollo de las larvas. Éstas últimas emergen entre cinco días y dos semanas después, según la temperatura. Cumplen toda su vida dentro de los granos y pasan por cuatro estadios. La etapa pupal se cumple dentro del grano y los adultos aparecen entre una y tres semanas después.⁴

En 1982, Phillips y Burkholder describieron por primera vez la feromona de agregación producida por los machos de *S. granarius*, la cual atrae a ambos sexos.⁷ Más tarde fue identificada como (2*S*,3*R*)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de 1-etilpropilo y llamada sitofilato.^{8,9}

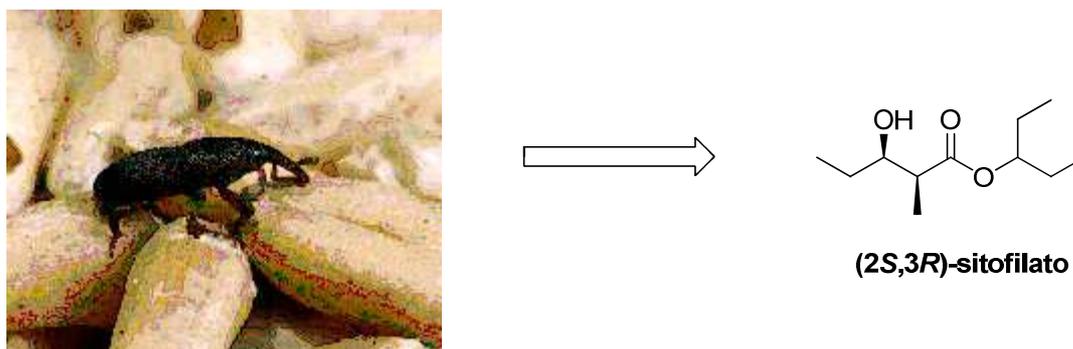


Figura 1. *Sitophilus granarius* y su feromona de agregación sitofilato.

Esta feromona puede ser utilizada para la detección temprana de la plaga mediante trampas de monitoreo, las cuales deben ser diseñadas teniendo en cuenta las características de esta especie y el ambiente afectado, en nuestro caso silos/almacenes. Los cebos utilizados en las trampas son diseñados para liberar la feromona de forma constante y mantenida, la cual en algunos diseños pueden durar semanas o meses. Esta liberación sostenida se logra a través de la incorporación de compuestos que permiten enlentecer la dispensación en la goma del cebo o a través del pasaje de la feromona por un reservorio con una membrana semipermeable. Esta velocidad es dependiente de la composición química del reservorio o goma y de las condiciones ambientales (ej. temperatura).¹⁰

Para coleópteros, donde tanto larvas como adultos caminan sobre el sustrato o por el suelo, se han desarrollado comercialmente trampas específicas para capturarlos en la superficie del producto en

trampas de caída (“pitfall cone trap”) o incluso en su interior, (entre los granos almacenados) en trampas de sonda de granos (“grain probe trap”). En la **Figura 2** se muestran algunos de estos diseños.¹¹ Los dispositivos A y C, de tipo trampa de caída y trampa de sonda de granos respectivamente, se colocan en la superficie de los granos y los escarabajos son atrapados simplemente al caminar por encima de ellos. Estos dispositivos son de material plástico o metálico, siendo los primeros más baratos y sin riesgo de contaminar los granos. Su mecanismo de acción es debido a que los insectos caminan sobre los orificios de la trampa y caen al interior de la misma, quedando atrapados. El escape desde el interior de la trampa se dificulta por el diseño de las paredes con ángulos. Si bien este tipo de dispositivo puede ser utilizado sin feromona, el agregado de un cebo con feromona de agregación significaría un aumento en la actividad de la trampa a diferencia del mecanismo pasivo.^{12,13} El diseño B, es una trampa comercial, “dome”, que consta de dos recipientes circulares plásticos en donde el cebo con la feromona se ubica en el plato exterior, mientras que en el módulo interior se encuentra una sustancia adherente capaz de retener los escarabajos que ingresan.¹⁴ Como último ejemplo (D), se muestra la trampa desarrollada por Likhayo y Hodges para estudiar el comportamiento de dos especies del género *Sitophilus* tanto en campo como en laboratorio.¹⁵ La trampa está construida en cartón y asegurada con pegamento; consta de 2 paredes intersectadas cubiertas en sus superficies internas con pegamento y en su extremo superior un dispensador de la feromona de agregación y alimentos. A diferencia de los otros dispositivos, este diseño es utilizado para capturar al insecto en vuelo.

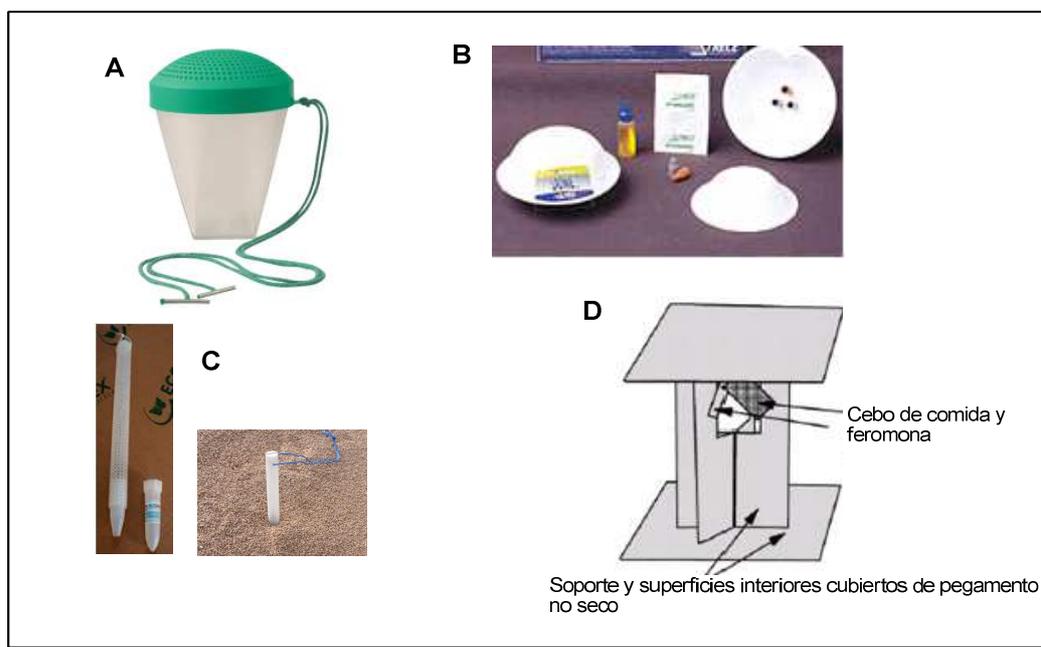


Figura 2. Ejemplos de trampas de monitoreo para coleópteros.

En Uruguay, aún no existen antecedentes de la utilización de feromonas de *Sitophilus* para su monitoreo o control.

Las feromonas se caracterizan por su alta bioactividad y por su estricto reconocimiento químico y estereoquímico por parte de los insectos.¹⁶ Esto les permite a los organismos utilizar la quiralidad como forma de diversificar su sistema de comunicación. Solamente un enantiómero de sitofilato es activo, mientras que el otro inhibe la actividad de feromona del compuesto.¹⁷ Esta dependencia de la efectividad y selectividad de las feromonas con su grado de pureza estereoquímica requiere diseñar esquemas sintéticos que involucran muchos pasos, que son muy costosos, y que utilizan reactivos contaminantes del ambiente.

La biotecnología ofrece una alternativa para enfrentar estos problemas, y mediante el uso de biocatalizadores obtener funcionalizaciones regio- y estereoselectivas, reduciendo o eliminando el uso o la generación de sustancias peligrosas. Esta estrategia es en extremo relevante en la química orgánica actual, y en especial de lo que hoy se conoce como “química verde”.

En este sentido, en las últimas décadas se comenzó a hacer uso de biotransformaciones altamente estereoselectivas para la preparación de bloques de construcción enantioméricamente puros, a partir de los cuales se puede sintetizar con altos grados de pureza óptica, una gran variedad de compuestos de interés tanto académico como industrial.¹⁸ Collado *et al.* realizaron en 2007 una revisión bibliográfica en la que se describe extensamente el uso de estas metodologías en la funcionalización de precursores en la síntesis de feromonas.¹⁹

Las feromonas de agregación de coleópteros, a diferencia de las de lepidópteros, son fundamentalmente compuestos altamente funcionalizados, generalmente oxigenados (β -cetoésteres, β -hidroxiésteres, cetonas, β -hidroxicetonas y β -dicetonas) con uno o varios centros asimétricos.¹⁷ En particular, (2*S*,3*R*)-sitofilato, presenta una estructura α -alquil- β -hidroxiéster. Dentro del orden Coleóptera podemos encontrar otros ejemplos de feromonas donde se reiteran algunas de estas funcionalizaciones, por ejemplo en las especie *Sitophilus orizae* (gorgojo del arroz) y *Metamasius hemipterus* (gorgojo de la caña de azúcar del Oeste de la India) cuyas feromonas presentan un grupo hidroxilo en la posición β con respecto a una cetona, en vez de un éster, **Figura 3**. En el caso de la feromona del gorgojo de la caña de azúcar (3-hidroxi-4-metilnonan-5-ona) no se ha podido determinar aún la estereoquímica de la molécula.²⁰

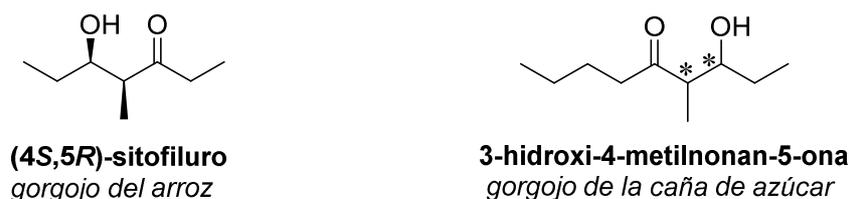


Figura 3. Feromonas de las especies *S. orizae* y *M. hemipterus*.

La utilización de las biotransformaciones para la síntesis de este tipo de sintones se ha ido incrementando a lo largo de estos últimos años, mostrándolas como metodologías eficientes para la obtención estereoselectiva de feromonas.¹⁹ Actualmente son ampliamente reconocidas como alternativas eficientes a la síntesis orgánica tradicional y pueden llevarse a cabo mediante la utilización de enzimas aisladas o de células enteras, presentando ambas prácticas diferencias significativas.²¹ Si bien el uso de células enteras presenta como desventaja la generación de productos secundarios debido a la actividad de otras enzimas presentes, este tipo de metodologías suelen ser menos costosas debido a la mejor estabilidad de las enzimas en el interior de la célula frente a las condiciones ambientales. Asimismo, a diferencia de las enzimas aisladas, no existe la necesidad de incorporar cofactores, tales como NADH o NADPH en el caso de deshidrogenasas, dado que la célula los recicla de su propia maquinaria (incluso sin estar en etapa de crecimiento). Es por estas razones que el uso de células enteras sería en principio la técnica de elección al momento de diseñar las biotransformaciones a llevar a cabo en este trabajo.

La optimización de estas metodologías biocatalíticas será un aporte fundamental para la síntesis de compuestos de interés para el control de plagas agrícolas en nuestro país. La utilización en el proceso de una ruta sintética eficiente, económica y no contaminante viabiliza la producción a escala nacional del compuesto de interés, así como de otros compuestos estructuralmente relacionados, para el control de otras plagas que afectan la producción agrícola nacional.

Esta tesis plantea la evaluación de procedimientos quimioenzimáticos, para la obtención de α -alquil- β -hidroxiesteres con alta pureza óptica. Las reacciones enzimáticas a estudiar son reducciones y desracemizaciones, y se llevará a cabo un screening de hongos y levaduras para seleccionar biocatalizadores eficientes. La metodología y biocatalizador seleccionados serán una de las herramientas a utilizar en el siguiente objetivo de este trabajo, que es la síntesis de sitofilato, compuesto de interés para el manejo integrado de *Sitophilus granarius* en nuestro país.

Referencias bibliográficas

1. Wyatt, T. D. *Pheromones and animal behaviour communication by smell and taste*; Cambridge: New York, 2003.
2. Nandagopal, N.; Prakash, A.; Rao, J. J. *Biopest.* **2008**, *1* (2), 210-215.
3. Moreira, M. A. C., M. D.; Zarbin, P. *Quim. Nova* **2005**, *28*, 472-477.
4. Bentancourt, C. M.; Scatoni, I. B. *Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay*; Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur S. R. L.: Buenos Aires, 1999.
5. Neethirajan, S.; Karunakaran, C.; Jayas, D.; White, N. *Food Control* **2007**, *18* (2), 157-162.
6. Ferrari, J. M.; Freiría, G. Ed.; MGAP, 2010.
7. Faustini, D. L.; Giese, W. L.; Phillips, J. K.; Burkholder, W. E. *J. Chem. Ecol.* **1982**, *8* (4), 679-687.
8. Phillips, J. K.; Chong, J. M.; Andersen, J. F.; Burkholder, W. E. *Entomol. Exp. Appl.* **1989**, *51* (2), 149-153.
9. Phillips, J. K.; Miller, P. F.; Andersen, J. F.; Burkholder, W. E. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (49), 6145-6146.
10. Subramanyam, B. *Alternatives to pesticides in stored-product IPM*; Springer: Boston, 2000.
11. De los Mozos Pascual, M. *Bol. S.E.A* **1997**, *20* (1), 93-109.
12. Wakefield, M. E.; Bryning, G. P.; Chambers, J. J. *Stored Prod. Res.* **2005**, *41*, 145-161.
13. Fargo, W.; Cuperus, W.; Bonjour, E.; Burkholder, W.; Clary, B.; Payton, M. J. *Stored. Prod. Res.* **1994**, *30* (3), 237-241.
14. Pacavira, R.; Mata, O.; Manuel, A. In *9th International Working Conference on stored Product Protection* Campinas, Brasil, 2006.
15. Likhayo, P.; Hodges, R. J. *Stored Prod. Res.* **2000**, *36* (4), 341-353.
16. Guo-qiang, L. *Pure & Appl. Chem.* **1993**, *65* (6), 1233-1240.
17. Mori, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (24), 7505-7523.
18. Anthonsen, T. *Synthesis of chemicals using enzymes* In *Basic Biotechnology*; Ratledge, C.; Kristiansen, B. Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, 2001; pp. 409-428.
19. Aleu, J.; Bustillo, A. J.; Hernández-Galán, R. *Curr. Org. Chem.* **2007**, *11* (8), 693-705.
20. Ramirez-Lucas, P.; Malosse, C.; Ducrot, P.; Lettere, M. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4* (3).

21. Zymanczyk-Duda, E.; Kafarski, P. *Application of whole-cell biocatalysis in chemoenzymatic, asymmetric synthesis of medically important compounds* In *Biocatalysis Research Progress*; Romano, F.; Russo, A. Eds.; Nova Science Publishers Inc.: New York 2008; pp. 307-365.

Antecedentes

2. ANTECEDENTES

1. UTILIZACION DE FEROMONAS EN EL MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS (MIP)

A través de la historia, los insectos han sido un gran problema en el almacenamiento de granos de uso alimentario, estimándose pérdidas en las cosechas por encima del 9% en países desarrollados y más del 20% en países en desarrollo.¹ Estos granos son susceptibles al ataque de insectos generando así la ruptura del grano. Esto, junto a la elevación de su temperatura y humedad lleva a que también otros patógenos puedan infectarlos, **Figura 4**. Es por estas razones que es necesaria su protección ya que pueden contaminarse grandes cantidades de producto durante los largos períodos de almacenamiento, llevando a importantes pérdidas económicas.²⁻⁴ Asimismo, se han descrito reacciones alérgicas a lo excretado por los artrópodos de alimentos almacenados.²



Figura 4. Daños causados por insectos en granos almacenados.

Habitualmente los cereales se almacenan en contenedores o se empaquetan durante un período de tiempo variable, pero en general suficiente para que en caso de infestación, las plagas se multipliquen hasta niveles intolerables, dada la elevada tasa intrínseca de crecimiento de la mayoría de las especies. Por este motivo, al margen de las medidas preventivas que se adopten, es conveniente establecer sistemas para la detección precoz de la infestación.^{1,5} Algunas veces la producción puede ir infectada inadvertidamente con huevos, ácaros, o incluso larvas que completan su desarrollo dentro del grano (por ej. algunas especies de las familias Curculionidae y Bruquidae, etc.).⁶

Las metodologías disponibles para la detección de plagas incluyen sistemas de visualización basados en la espectroscopia de infrarrojo cercano,^{7,8} termosondas que permiten detectar el aumento de temperatura provocado por la actividad de la plaga en el producto,⁶ o detectores electrónicos de sonido.⁹ En el presente, estas técnicas necesitan aún ser perfeccionadas para ser prácticas y económicas.

El control de plagas en granos almacenados históricamente se ha realizado mediante el uso de agroquímicos, práctica que se mantiene hasta el día de hoy. Sin embargo, si bien los insecticidas químicos son efectivos, también son nocivos para la salud humana y para el ambiente, y son tóxicos también para los enemigos naturales de la plaga, aumentando a su vez el número de especies que se hacen resistentes a los mismos.^{10,11} Por lo tanto, el objetivo es reducir a corto plazo el uso de pesticidas sobre todo cuando ellos entran en contacto directamente con el producto. En respuesta a estos problemas es que se desarrolla el concepto de Manejo Integrado de Plagas (MIP), que combina estrategias químicas, biológicas y agrotécnicas de control con costos razonables y minimizando el daño ambiental.¹²

Los organismos vivos utilizan sustancias químicas para comunicarse entre ellos, así como con su entorno. Tanto las especies del reino animal como vegetal secretan y liberan estas sustancias, generando una respuesta en la relación emisor-receptor, desarrollando cambios en ambas especies. Estas sustancias químicas son conocidas como semioquímicos y son clasificadas en dos categorías: aleloquímicos y feromonas. Los aleloquímicos son sustancias involucradas en la comunicación interespecífica y son clasificados de acuerdo al beneficio generado: kairomonas (emisor es beneficiado), alomonas (receptor beneficiado), sinomonas (emisor y receptor beneficiados).¹³

Las feromonas son compuestos secretados hacia el exterior del cuerpo del animal/insecto, a diferencia de las hormonas, y participan en la comunicación dentro de una misma especie.¹⁴ En función de la interacción en la cual están participando se pueden clasificar entre otras categorías en: territoriales, de alarma, de camino, de agregación, sexuales, de ovoposición o de estratificación social.¹⁴ La primera feromona en ser identificada fue la feromona sexual del gusano de seda *Bombyx mori*, en 1959.¹⁵ Desde entonces se han identificado este tipo de feromonas para varias especies de Lepidoptera y otros órdenes,¹⁶⁻¹⁹ mientras que han sido identificadas feromonas de agregación para varias especies de Coleoptera, Dictyoptera, Hemiptera, Homoptera y Ortoptera.^{2,20-}

22

Las feromonas de agregación son emitidas por uno de los sexos y atrae a ambos sexos hacia la fuente de comida o para el apareamiento, promoviendo así el movimiento desde grandes distancias (bajas concentraciones de feromona) hasta el emisor (altas concentraciones) en cuyas cercanías se detienen. Durante los últimos 40 años se han identificado las feromonas de más de 40 especies de insectos que afectan a los granos almacenados,^{3,23,24} describiéndose para éstas dos tipos de ciclos vitales diferentes. En polillas y algunos coleópteros (anóbidos, brúquidos, derméstidos), los adultos

son de corta vida y no se alimentan. Sin embargo, en la mayoría de los coleópteros más típicos de almacén (*Cryptolestes* spp., *Oryzaephilus* spp., *Rhyzopertha* spp., *Sitophilus* spp., *Tribolium* spp., etc.), los adultos son muy longevos, y se alimentan activamente del grano. Estos mecanismos se corresponden con dos sistemas de comunicación química totalmente diferentes.²⁵ En el primer grupo, existe una feromona sexual producida por la hembra, que garantiza el encuentro de los sexos y posterior cópula. Por el contrario, en las especies del segundo grupo son los machos los que producen una feromona de agregación que atrae tanto a hembras como a machos a una zona determinada.⁶ Este tipo de semioquímicos ha sido descrito para plagas de productos almacenados pertenecientes a las familias de Bostrichidae,^{26,27} Curculionidae,^{28,29} Tenebrionidae,³⁰ Cucujidae y Silvanidae.³¹

Estos compuestos son volátiles, altamente activos biológicamente y efectivos a bajas concentraciones. Dado que no son tóxicas para plantas ni animales, el uso de feromonas sintéticas podría ser una herramienta efectiva en el manejo de plagas, tendiente a disminuir el uso indiscriminado de plaguicidas.^{13,32} Estas podrían utilizarse para el monitoreo de la población o para su control (trampas de captura masiva, confusión sexual, etc.)¹³ y en combinación con entomopatógenos podrían proveer un control efectivo, sostenible y eco-amigable.²³

El modo de aplicación más utilizado y exitoso de feromonas en manejo de plagas ha sido en trampas de monitoreo, que consisten de un dispositivo plástico que contiene un emisor de feromona y una superficie impregnada con pegamento. El individuo sigue el rastro de la feromona hasta el dispositivo quedando atrapado en su superficie o interior.^{23,33,34} Esta técnica constituye una manera eficiente, fácil y extremadamente sensible para detectar los insectos en las instalaciones del depósito, y un mecanismo para el control de la plaga. Esta metodología de monitoreo ha sido extensamente explorada y se han modificado algunos factores a los efectos de mejorar su eficiencia: combinación de feromona y alimento para mejorar la atracción,^{29,35} o diseños que permitan atrapar más de una especie simultáneamente.^{36,37}

Dentro de las metodologías para el control de una población de insectos se encuentra la captura masiva (mass trapping), que es una proyección lógica de las trampas de monitoreo e involucra la localización de un gran número de trampas en varias posiciones estratégicas para remover una gran proporción de individuos de una población plaga y conseguir así un control efectivo.¹⁵ En general, este método funciona bien cuando los umbrales de tolerancia no son muy restrictivos y la densidad poblacional de la plaga no es muy alta.⁶ Una variante en esta metodología es utilizar un cebo impregnado con feromona y un insecticida (attract and kill).³⁸

Algunos estudios de laboratorio de la década del 80, han concluido que la técnica de captura masiva no es efectiva para plagas de granos almacenados.^{15,39} Comúnmente en esta metodología, se utiliza una feromona sexual producida por las hembras, atrayendo únicamente machos. Esto es una limitante importante, ya que las hembras que han sido copuladas no son atrapadas y por lo que la siguiente generación de larvas tampoco. Para atraer ambos sexos de una población lo más efectivo es usar una feromona de agregación. La aplicación de trampas con feromona de agregación para captura masiva ha sido utilizada con buenos resultados en el control de plagas en coleópteros.^{1,40,41}

La técnica de confusión sexual (mating disruption) se utiliza para el control de la población y consiste en saturar el ambiente con la feromona mediante la distribución en campo de numerosos microdifusores. En este ambiente los insectos tienen grandes dificultades para localizar a las hembras y el número de cópulas se reduce considerablemente.⁶

El diseño de las trampas con feromonas es muy variado en función de la especie a atraer y el objetivo (monitoreo o control de la población). En coleópteros, donde tanto larvas como adultos caminan sobre el sustrato o por el suelo, se han desarrollado comercialmente trampas específicas para capturarlos en la superficie del producto (trampas de caída o foso) o incluso entre los granos (trampa sonda de granos).^{6,42} Las trampas de caída (pitfall) y trampa sonda de granos (grain probe trap), son colocadas en la superficie de los granos y los escarabajos son atrapados simplemente al caminar por encima de ellos.

Otra metodología alternativa para la sustitución o disminución del uso de pesticidas convencionales, es la integración de semioquímicos con entomopatógenos. Los entomopatógenos presentan como ventajas la seguridad para los humanos y el ambiente dada su especificidad, el uso en muy pocas cantidades y que a menudo se degradan rápidamente. Existen más de 800 formulaciones registradas en Estados Unidos, encontrándose especies de bacterias, virus, hongos y protozoarios.³² Uno de los primeros ejemplos de esta metodología fue el descrito por Burkholder y Boush,⁴³ utilizando una feromona para atraer *Trogoderma glabrum* hacia la fuente donde se encontraba el protozooario patógeno *Mattesia spp.* El problema de este tipo de prácticas es que los patógenos muchas veces son específicos para una especie determinada dificultando así el diseño de sistemas que controlen varias especies a la vez. Recientemente, se utilizaron pellets impregnados de grasa vegetal con una feromona de agregación y con el hongo entomopatógeno

Beauveria bassiana, para atraer y matar *Prostephans truncatus*.⁴⁴ Los resultados obtenidos mostraron esta metodología como promisoría para el control de esta plaga en almacenes de maíz.

Una de las especies de importancia económica en nuestra región, es *Sitophilus granarius*, **Figura 5**, dado que es una de las principales plagas que afectan a los granos almacenados, y por consiguiente requiere la adopción de constantes medidas de prevención y control.⁴ Su hábitat es en silos, depósitos y almacenes. Si bien de los granos afectados, el más común es el trigo, también ataca arroz, cebada, avena, maíz y otros cereales.⁴ El gorgojo del trigo (denominación común) pertenece a la familia Curculionidae, mide de 3 a 4.5 mm de longitud y muestra una coloración parda uniforme, oscura y brillante. Los adultos se alimentan desde el exterior del grano sin causar daños mayores, mientras que las larvas viven en el interior donde destruyen gradualmente tanto el endosperma como el embrión, volviéndolos inviables para el consumo humano y afectando su poder germinativo. Asimismo, el ataque frecuentemente provoca el calentamiento de los granos almacenados, produciendo condensación de humedad y enmohecimiento. Las hembras generalmente copulan al día siguiente de haber abandonado los granos e inician las puestas tres o cuatro días después.⁴

En 1982, Phillips y Burkholder describieron por primera vez la feromona de agregación producida por los machos, que atrae a ambos sexos.⁴⁵ Esta feromona fue luego identificada como (2*S*,3*R*)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de 1-etilpropilo y llamada sitofilato.^{46,47}

En 1994, Plarre estudió el efecto de sitofilato sobre la dispersión y agregación de los individuos de *Sitophilus granarius*.⁴⁸ Este trabajo confirmó el resultado obtenido por Phillips *et al.* en 1989,⁴⁶ en cuanto a la atracción de *S. granarius* por (2*S*,3*R*)-sitofilato en su hábitat natural. Ambos sexos, tanto en sus estados vírgenes como copulados, respondieron de forma positiva a la feromona, pudiendo identificarse claramente los sexos en el grupo de insectos.



Figura 5. *Sitophilus granarius* "gorgojo del trigo".

En los años siguientes, se continuó estudiando la distribución y comportamiento de esta especie al contacto con la feromona sitofilato,^{49,50} mostrando a este método como prometedor para fines de monitoreo.

2. BIOCATALISIS EN SINTESIS

2.1- Introducción

Históricamente, la biotecnología involucraba algunos procesos de elaboración de alimentos, por ejemplo la fabricación de vinos, cervezas, quesos, etc., de los cuales se conocía la técnica a desarrollar sin tener claramente identificados los mecanismos moleculares involucrados. En las décadas siguientes, el avance en el conocimiento de la microbiología y la bioquímica trajo como resultado una mayor comprensión de estos procesos.⁵¹

Dentro de la Biotecnología, el área de las biotransformaciones ofrece, a través del uso de catalizadores biológicos, la posibilidad de convertir un sustrato en producto por medio de pasos enzimáticos, generalmente en forma quimio-, regio- y estereoselectiva. Esto ha llevado a que durante los pasados 50 años el uso de enzimas como biocatalizadores, para la obtención de compuestos enantioméricamente puros, se haya establecido como una metodología recurrente dentro de los procesos de manufactura, especialmente en la industria agroquímica y farmacéutica.⁵²⁻⁵⁷

Es importante diferenciar los términos *Biotransformación* y *Biocatálisis*. Una biotransformación involucra reacciones en las que un compuesto químico es modificado dentro de un sistema vivo sin necesidad de que ese proceso sea parte del metabolismo del organismo, y sin utilizar al sustrato como fuente de carbono. La biocatálisis en cambio, es un término más amplio que involucra todas las reacciones en las que un compuesto químico es modificado con intervención de un catalizador biológico.⁵⁸

La utilización de la biocatálisis en síntesis orgánica es atractiva debido a su capacidad de introducir quiralidad de forma selectiva.^{59,60} En la actualidad, se dispone de una batería de herramientas biocatalíticas que permiten diseñar rutas de síntesis quimioenzimáticas cuyas premisas sean eficiencia (máxima economía atómica, bajo consumo energético) y mínima generación de residuos, ambas bases de la *Química Verde*.^{61,62}

2.2- Biocatalizadores

La incorporación de metodologías biocatalíticas en la industria del medicamento se da habitualmente en procesos que involucran varias etapas, sustituyendo en general a métodos de producción tradicionales. Así es que la asistencia por parte de la biocatálisis en síntesis complejas ha ido incrementándose, dando lugar al desarrollo de rutas quimioenzimáticas de producción.⁶³ Estas biotransformaciones son reacciones químicas catalizadas por estructuras proteicas denominadas enzimas, que pueden ser utilizadas tanto de forma aislada como en células enteras.

Si bien el uso de enzimas aisladas o células enteras comparten varias ventajas frente a la química orgánica convencional, como son la alta regio- y estereoselectividad, condiciones de reacción “suaves”, posibilidad de modificación de la eficiencia y especificidad de las enzimas mediante ingeniería genética, etc., existen algunos factores en los cuales se diferencian y que determinan la elección de una u otra al momento de diseñar un proceso. Las enzimas aisladas pueden presentar inestabilidad por encontrarse expuestas al medio de reacción, y algunas requieren el uso de cofactores (enzimas redox), dependiendo de la implementación de un sistema de regeneración de los mismos.⁶⁴ Por otro lado, el uso de células enteras presenta en muchas ocasiones la ocurrencia de transformaciones no deseadas en paralelo, debido a la presencia de otras enzimas, disminuyendo así el rendimiento de la biotransformación. Asimismo, pueden ocurrir problemas en el transporte del sustrato o producto al interior y exterior de la célula, como también dificultades en el caso de que el producto formado resulte tóxico para la célula, lo cual resulta en baja de los rendimientos.^{58,63} El desarrollo de tecnologías de ADN recombinante ha permitido sortear o

disminuir muchos de estos inconvenientes por medio de la sobreproducción de una enzima, modificación de las vías metabólicas del organismo huésped, etc., brindando al área de la ingeniería de los bioprocesos una alternativa de mejoramiento de la eficiencia.^{65,66}

Los sistemas de célula entera pueden ser desarrollados mediante dos procedimientos: células en crecimiento y células en reposo (resting cells). Las células en crecimiento tienen mayor actividad, pudiendo dar además mayor número de reacciones secundarias. Asimismo, el aislamiento de los productos es más dificultoso.⁶⁷

En la actualidad se conocen más de 3000 enzimas, de las cuales cientos están disponibles comercialmente.⁵⁸ Estas enzimas se clasifican en seis clases:

1. Oxidoreductasas (EC 1.-)
2. Transferasas (EC 2.-)
3. Hidrolasas (EC 3.-)
4. Liasas (EC 4.-)
5. Isomerasas (EC 5.-)
6. Ligasas (EC 6.-)

De las clases de enzimas descritas, las más comúnmente empleadas para fines sintéticos son las hidrolasas, útiles entre otras cosas para la resolución de racematos y desimetrización de compuestos meso con la consiguiente generación de estereoisómeros puros. El grupo que le sigue en cuanto a su utilización en síntesis es el de las oxidoreductasas, frecuentemente empleadas en reacciones con células enteras, especialmente sobreexpresadas en microorganismos recombinantes.⁵⁸

La obtención de compuestos enantioméricamente puros puede darse a través de una síntesis asimétrica, o de una resolución cinética. El proceso en el cual uno de los enantiómeros de una mezcla racémica es transformado más rápidamente que el otro, se denomina resolución cinética de racematos, y ocurre debido a que las constantes de velocidad para la transformación de uno y otro enantiómero son diferentes. En los casos en que existe una marcada diferencia entre las constantes de velocidad de ambas reacciones, puede modificarse uno solo de los enantiómeros y obtenerse, en el mejor de los casos, un producto ópticamente puro con 50% de conversión. La síntesis asimétrica en cambio, presenta como ventaja valores de conversión teóricos de hasta 100%.⁵⁸

En los últimos años el desarrollo de la resolución cinética dinámica (RCD) ha subsanado esta limitación fundamental de la resolución cinética clásica. A través de reacciones de racemización es posible disminuir el porcentaje del enantiómero no deseado, por medio de su racemización *in situ* desplazando el equilibrio hacia la obtención del producto de interés.⁶⁸⁻⁷⁰

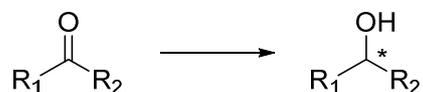
2.3- Biotransformaciones aplicadas

Como se describió en los párrafos anteriores, en la actualidad existen varias alternativas enzimáticas a algunas reacciones de química orgánica convencional. Es por esta razón que en este trabajo de tesis se propone la síntesis de sitofilato, feromona de agregación de *S. granarius*, mediante una ruta sintética quimioenzimática.

A continuación se describen brevemente los aspectos más importantes de la reducción, desracemización y transesterificación enzimáticas:

2.3.1- Reducciones:

La reducción asimétrica de cetonas proquirales es una transformación esencial en síntesis orgánica, dada la prevalencia de alcoholes secundarios quirales en compuestos naturales y biológicamente activos, **Esquema 1**.



Esquema 1. Reducción asimétrica de cetonas proquirales.

La reducción asimétrica mediante procesos catalizados enzimáticamente se ha vuelto una metodología de uso común durante la última década para la preparación, entre otros, de intermedios hidroxilados quirales de productos farmacéuticos.^{64,71} Las reducciones enzimáticas de compuestos carbonílicos son catalizadas principalmente por alcohol deshidrogenasas (ADHs), denominadas según la clasificación como EC 1.1.1.1, siendo el hidruro donado por los cofactores NADH, NADPH o FADH₂.^{54,72} La enzima y el cofactor trabajan juntos para catalizar la reacción. Por ej. en la reducción con NADH la primera etapa es la unión entre el cofactor y el sustrato a la enzima, luego el sustrato es reducido mientras que el cofactor es oxidado. Al finalizar, el cofactor y el producto se disocian de la enzima. El mecanismo de reacción de las deshidrogenasas dependientes de NAD(P)H ha sido estudiado en detalle.⁷¹ La transferencia del átomo de hidrogeno ocurre por la cara *Si* o *Re* del grupo carbonilo, resultando en el alcohol (*R*) o (*S*), respectivamente. Tanto el NADH como el NADPH tienen dos átomos de hidrógeno diastereotópicos (*pro-R* y *pro-S*), que pueden

transferir el hidruro a un sustrato oxidado (aldehído, cetona o imina). Estos sustratos tienen dos caras diastereotópicas o enantiotópicas (*cara-Re* o *cara-Si*) en el carbono sp^2 que será reducido.

Teóricamente, cualquier reacción redox dependiente de NAD(P)H puede ocurrir estereoespecíficamente vía uno de los cuatro posibles caminos para generar cada uno de los isómeros del producto, **Figura 6**. En la práctica, la mayoría de las alcohol deshidrogenasas catalizan la transferencia del átomo de hidrógeno *pro-R* desde el C-4 del cofactor de nicotinamida a la *cara-Re* del grupo carbonilo del sustrato, generando el correspondiente alcohol (*S*). Dependiendo del sitio de unión del cofactor a la enzima, se transferirá el hidrógeno *pro-R* o *pro-S* desde el C-4 de la nicotinamida.⁷³

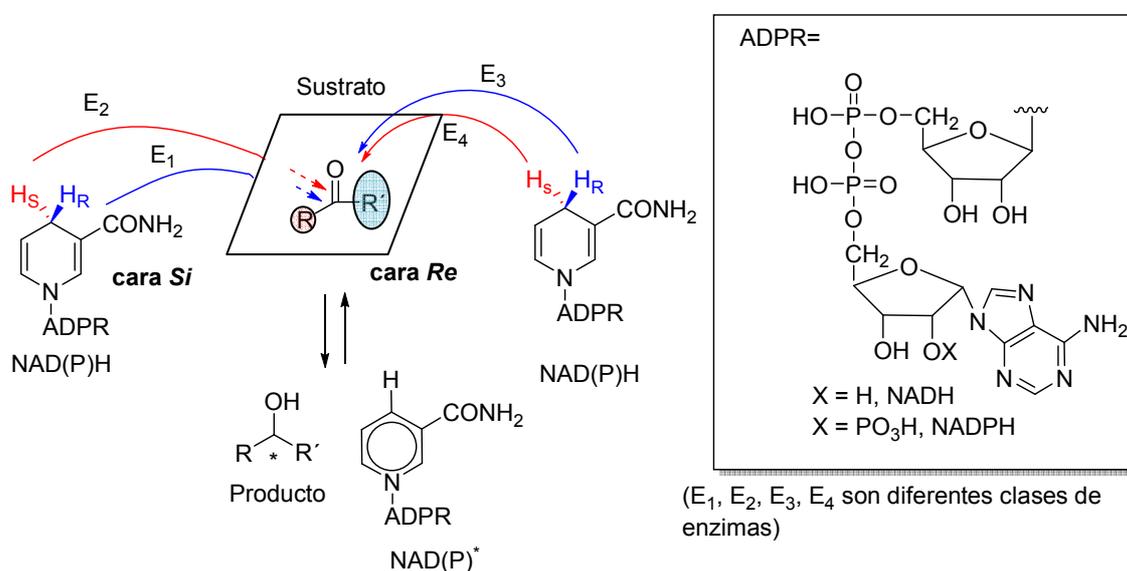


Figura 6. Transferencia del hidruro de la coenzima, NAD(P)H, al grupo carbonilo.

Los cofactores NADH y NADPH son costosos, por lo tanto es necesario contar con la transformación del estado reducido al estado oxidado de los mismos, acoplado a un sistema de regeneración del cofactor reducido, de modo de promover la biotransformación. Esta regeneración requiere de fuentes de electrones para que pueda llevarse a cabo la reducción de estos cofactores. Existen varios métodos descritos para la regeneración de cofactores (enzimáticos, químicos, electroquímicos o fotoquímicos), entre los cuales, los enzimáticos se destacan como los más eficientes y frecuentemente utilizados.⁷³ En los métodos enzimáticos, se utiliza un sustrato de sacrificio que puede ser un alcohol, como etanol o 2-propanol,⁷⁴ o azúcares y derivados (ej. glucosa, glucosa-6-fosfato),⁷⁵ amino-ácidos,⁷⁶ etc. que, a través de su oxidación enzimática catalizada por la

misma deshidrogenasa que cataliza la reacción, o por otra, utiliza el cofactor oxidado, regenerando su forma reducida y permitiendo el avance de la reacción.

Actualmente existen al menos 150 alcohol deshidrogenasas diferentes disponibles en el mercado, lo cual permite seleccionar la más apropiada para la reacción que se está diseñando.⁷⁹ Incluso, seleccionando una enzima adecuada, este resultado estereoquímico de la reacción no es incierto sino que puede predecirse adecuadamente mediante la Regla de Prelog.⁸⁰ Formalmente, la regla de Prelog es una regla empírica, que establece que el hidruro se adiciona sobre la cara *re* de la cetona originando el producto *S*, **Figura 7**. Algunas enzimas o sistemas enzimáticos originan el producto con configuración opuesta pero la mayoría sigue esta regla con mayor o menor grado de selectividad. La selectividad se determina por la diferencia relativa de tamaño entre los sustituyentes a ambos lados del grupo carbonilo. Dados los resultados experimentales se sugiere que la selectividad de la enzima se debe a una forma preferencial de acomodar el sustituyente más voluminoso y el de menor tamaño en su sitio activo. Cuando los sustituyentes son de tamaño similar el compuesto puede encajar en el mismo de dos maneras y por lo tanto la estereoselectividad de la reacción disminuye.⁸⁰

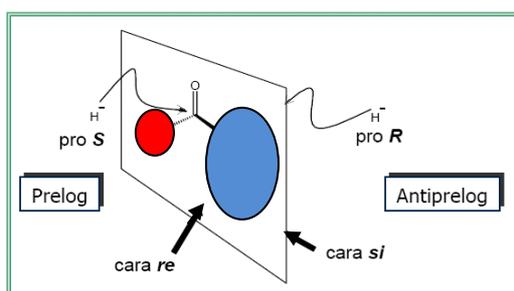


Figura 7. Reducción estereoselectiva de cetonas. Regla de Prelog.

2.3.1.1- Fuentes de enzimas redox:

El origen de las enzimas redox utilizadas en biocatálisis es muy diverso, pudiéndose obtener de la mayoría de los organismos vivos. A continuación, se describen brevemente algunas de las fuentes de los biocatalizadores más frecuentemente utilizados en reducciones enzimáticas.

1. Plantas:

Existen varios trabajos en los que se ha descrito el uso de cultivos celulares u órganos de plantas para la reducción de cetonas y aldehídos a sus correspondientes alcoholes.^{64,81-83} Estas reducciones ocurren, por lo general, de acuerdo a la regla de Prelog.

Baldasarre *et al.* describieron por primera vez el uso de raíces de zanahoria (*Daucus carota*) para la reducción de cetonas proquirales.⁸⁴ Posteriormente, Yadav estudió la bio-reducción de cetonas alifáticas, aromáticas y cíclicas, así como de β -cetoésteres con este biocatalizador.^{85,86} Al momento, se han publicado muchos trabajos estudiando la capacidad de *D. carota* como agente bio-reductor de diferentes compuestos carbonílicos,^{81,87} y si bien se han descrito buenos resultados en cuanto a los valores de conversión y enantioselectividad, también se ha descrito el problema de contaminación microbiológica asociada al uso de fragmentos de vegetales como biocatalizadores.⁷¹ Actualmente se han aislado cientos de microorganismos endofíticos de la raíz de zanahoria capaces de llevar a cabo la reducción de grupos carbonilos con diferente enantio- y diastereoselectividad.⁸⁸ En el año 2007, Rodríguez *et al.* estudiaron el comportamiento de la reducción con *D. carota* del α -propargilacetato de etilo en presencia de un inhibidor bacteriano y fúngico. Los resultados mostraron una disminución en los valores de conversión y exceso diastereomérico, bajando de un 85% (conversión) a 4% y de un 48.7% de (*anti*) a 20% de (*anti*).⁸⁹ Este trabajo presenta como hipótesis que en la reducción de cetonas y cetoésteres con fragmentos frescos de zanahoria podrían estar involucrados algunos de los microorganismos endofíticos de dicha raíz.⁷¹

Si bien las células de *D. carota* han sido las más utilizadas en la reducción de compuestos carbonílicos, células de *Raphanus sativus*,⁹⁰ *Passiflora edulis*,⁹¹ *Cocos nucifera*,⁹² *Apium graveolens*,⁹³ *A Armoracia lapatifolia*⁹³ y legumbres tales como *Pisum sativum*,⁹⁴ *Phaseolus angularis*⁹⁵ y *Phaseolus aureus*,⁹⁶ entre otros, han sido también utilizadas como biocatalizadores en reducciones u oxidaciones catalizadas por deshidrogenasas.

En los últimos años, se han utilizado también cultivos de raíces peludas de diversas plantas, más allá de la ya descrita *D. carota*, como sistemas de biocatalizadores altamente efectivos.⁹⁷ Los mismos presentan actividad en distintas clases de biotransformaciones (glicosilación/gluco-silación, reducción, hidroxilación, oxidación, esterificación, etc.), representando las reducciones aproximadamente un 20%. Se han utilizados, entre otros, cultivos celulares de *Cyanotis arachnoidea*,⁹⁸ *Pharbitis nil*,⁹⁹ *Brassica napus*,¹⁰⁰ *Raphanus sativus*,⁹⁰ mostrando todos ellos buena regio- y estereoselectividad.

2. Bacterias:

Las bacterias utilizadas en biocatálisis pertenecen a una amplia variedad de géneros, incluyendo *Escherichia*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Synechococcus*, entre otras.^{64,65}

En reacciones catalizadas por células enteras, la primera opción a considerar es el procedimiento clásico de cultivo del microorganismo nativo. Este procedimiento tradicional presenta problemas en cuanto a la purificación de los productos y a las posibles reacciones secundarias. Algunos de estos problemas pueden ser subsanados mediante la manipulación genética del microorganismo nativo para evitar la degradación enzimática de los productos o las reacciones paralelas, mediante el bloqueo de los genes responsables de las vías metabólicas no deseadas. De esta forma la cepa salvaje del microorganismo puede ser modificada con el objetivo de optimizar la expresión de la enzima y mejorar los resultados de la biotransformación.¹⁰¹ Sin embargo, lo más frecuente es optimizar la expresión de la enzima en huéspedes recombinantes, por ej. en *E. coli*, de la que se conoce el genoma completo desde 1997 y es una muy buena célula huésped para la manipulación genética.^{102,103} Una vez que la enzima se ha expresado adecuadamente en un huésped recombinante, la ingeniería de los procesos biocatalíticos debe evaluar todos los parámetros del proceso para conseguir escalarlos con buenos resultados en rendimientos y costos. Hay numerosos antecedentes en el uso de células recombinantes, no sólo con bacterias como células huésped sino también con levaduras.¹⁰¹⁻¹⁰⁶

Dentro de los antecedentes de procesos industriales utilizando estas “células de diseño” bacterianas se encuentra el proceso desarrollado por la empresa alemana Degussa, en el cual se consigue la reducción asimétrica de cetonas a altas concentraciones de sustratos (210 gL^{-1}) y sin necesidad de agregado externo de cofactores.¹⁰⁷ Este proceso de reducción, estudiado y descrito por Gröger en 2006,¹⁰⁸ permite obtener un amplio rango de alcoholes con estereoquímica (*R*) y (*S*) con buenos valores de conversión (>95 %) y excesos enantioméricos (>99.8 %). Para la obtención de alcoholes (*R*), se seleccionó una alcohol deshidrogenasa (*R*)-específica de *Lactobacillus kefir*, clonada y expresada en *E. coli* DSM14459 y una glucosa deshidrogenasa de *Thermoplasma acidophilum* para la regeneración del cofactor. Para la síntesis de alcoholes (*S*), se eligió una deshidrogenasa de *Rhodococcus erythropolis* y una glucosa deshidrogenasa del *B. subtilis* para regenerar los cofactores. Ambas fueron clonadas y expresadas en la misma *E. coli* DSM14459.¹⁰⁸

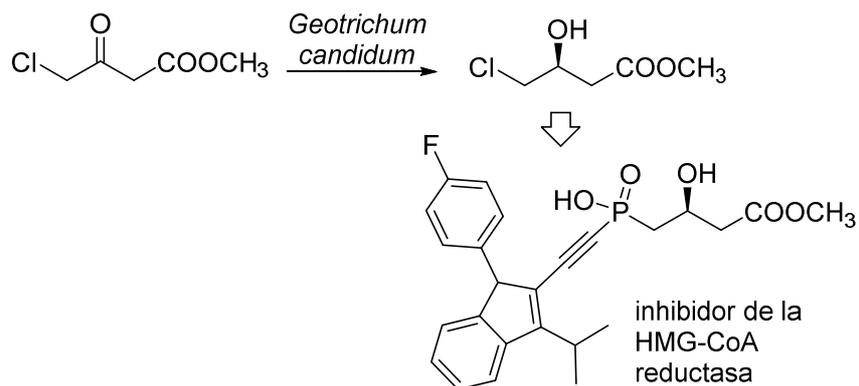
Otro ejemplo de utilización de bacterias recombinantes en procesos biocatalíticos es el desarrollado por la empresa Lonza para la reducción de β -cetoésteres, utilizando una cepa de *E. coli* como célula huésped. En este caso la enzima responsable de la reducción de la cetona fue aislada de *Sporobolomyces salmonicolor*, y la glucosa deshidrogenasa utilizada para regenerar el cofactor proviene de *Bacillus megaterium*.¹⁰⁹ La biotransformación se lleva a cabo en un sistema bifásico

agua/acetato de butilo para evitar la inhibición de la reductasa por el sustrato o el producto, consiguiéndose un rendimiento de 50% y un exceso enantiomérico mayor a 99%.

3. Hongos y Levaduras:

Tradicionalmente estos microorganismos han sido muy estudiados para la obtención de productos provenientes de procesos biocatalíticos (ej. bebidas fermentadas, panificados, lácteos). En particular, el auge en las reacciones enzimáticas de reducción comenzó con uso de la levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) para la fabricación de bebidas y productos panificados, siendo actualmente muchos los trabajos en los que se ha explorado su capacidad reductiva de compuestos carbonílicos.¹¹⁰⁻¹¹³ Las reducciones catalizadas por *S. cerevisiae* por lo general siguen la regla de Prelog,⁸⁰ y toleran una diversidad amplia de sustratos monocarbonílicos (aldehídos o cetonas) con sustituyentes alquilo o arilo, así como compuestos dicarbonílicos (cíclicos y acíclicos α - y β -dicetonas, α - y β -cetoésteres).¹¹⁴⁻¹²⁴ Una de las razones de este comportamiento se debe a la presencia de numerosas reductasas que actúan simultáneamente. Algunas de ellas presentan enantioselectividades opuestas, lo cual en muchos casos disminuye la pureza óptica del producto obtenido.^{57,125}

Una alternativa a la levadura de panificación es el hongo filamentoso *Geotrichum candidum*, que posee una gran cantidad y variedad de alcohol deshidrogenasas, lo que le permite desarrollar una alta actividad de oxidación y reducción en sustratos no naturales.¹²⁶⁻¹²⁸ Este hongo reduce cetonas aromáticas,^{129,130} β -cetoésteres,^{131,132} cetonas α,β -insaturadas,¹³³ y cetonas alifáticas,¹³⁴⁻¹³⁶ a los correspondientes alcoholes con estereoquímica (*S*) con excelentes resultados ($> 99\%$ *ee*).¹³⁷ Un ejemplo, es el uso de células enteras de *G. candidum* en la preparación de (*S*)-4-cloro-3-hidroxi-butanoato de metilo, un intermedio clave en la síntesis del fármaco inhibidor de la hidroxil-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA), que regula la síntesis de colesterol en el organismo. El rendimiento y enantioselectividad de esta bioconversión son excelentes ($\geq 98\%$), **Esquema 2**.⁶³



Esquema 2. Síntesis del (S)-4-cloro-3-hidroxi-butanoato de metilo mediante *G. candidum*.

En la literatura ha sido extensamente descrito el uso de hongos y levaduras para la reducción de cetonas proquirales, especialmente en los procesos de la industria farmacéutica en donde la pureza óptica es un requerimiento imprescindible.^{52,54,63} Un ejemplo representativo es la reducción estereoselectiva de aril oxihalo-2-propanonas, siendo éste un paso clave en la síntesis del β -bloqueante (S)-propanolol.¹³⁸ Otros ejemplos son la obtención de los precursores (S)-2-cloro-(3,4-diclorofenil)etanol y (R)-2-cloro-(4-nitrofenil)etanol, importantes en la preparación de (1S,4S)-(+)-*cis*-sertralina (un inhibidor de la recaptación de serotonina),¹³⁹ y de benzoinas homoquirales (posibles precursores del bupropion, indinavir, etc.) respectivamente.¹⁴⁰

La reducción asimétrica de cetonas proquirales catalizadas por hongos ha sido una herramienta estudiada durante varias décadas. Esto ha permitido en la actualidad contar con un espectro de biocatalizadores capaces de reducir un amplio rango de compuestos carbonílicos con estereoespecificidad determinada, con buenos resultados en cuanto a pureza óptica y rendimiento global.^{57,105,141-143}

4. Enzimas aisladas:

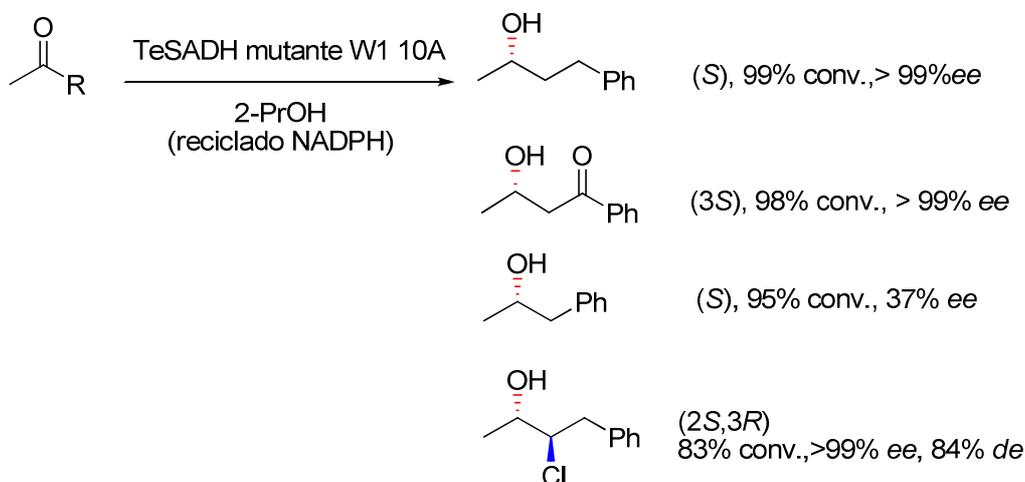
Si bien en la naturaleza existe una gran cantidad de “fabricas celulares” para la reducción asimétrica de cetonas proquirales, en muchas ocasiones éstas no fueron consideradas una alternativa real que compitiera con los métodos químicos tradicionales.¹⁴⁴ A pesar de las condiciones suaves en las que se puede trabajar en biotransformaciones, otros parámetros industriales relevantes como el costo del proceso, productividad, concentración del producto final, y/o complejidad de los procesos determinan que aún no sean una alternativa atractiva para la industria. La causa principal de estas limitaciones fue desde el inicio el uso de cultivos celulares en crecimiento o en reposo, que son por lo general lentos, y posibilitan el desarrollo de otras reacciones secundarias. Asimismo, el

equipamiento específico y el conocimiento de procesos microbiológicos no habituales en las industrias, limita aún más el uso de procesos bio reductivos. Utilizando enzimas aisladas, y con la consiguiente optimización de sistemas de regeneración de cofactores, muchos de estos problemas podrían ser evitados.¹⁴⁵

El número de enzimas redox fácilmente manipulables y accesibles comercialmente se ha incrementado notoriamente en los últimos años.¹⁴⁴ Actualmente se conocen una gran variedad de enzimas diferentes y muchas de ellas se encuentran disponibles comercialmente. Algunas de las deshidrogenasas más relevantes a nivel industrial son las provenientes de *Rhodococcus sp.*,¹⁴⁶ *Lactobacillus sp.*,¹⁴⁷ *Pseudomonas sp.*,¹⁴⁷ y *Thermoanaerobium brockii*.¹⁴⁸ Sin embargo, si bien este incremento en el número de enzimas disponibles ha hecho más fácil el desarrollo de la biocatálisis, la potencialidad de estos procesos como herramienta en síntesis orgánica no ha sido desarrollada aún en su máxima capacidad. En muchas ocasiones las modificaciones en los parámetros del proceso no son suficientes para obtener los resultados buscados, lo que lleva a la necesidad de modificar la performance de los biocatalizadores de otro modo. Esto a menudo se consigue por medio de estrategias de ingeniería genética, que permiten mejorar los resultados de eficiencia globales de los procesos. Durante las últimas décadas se han aislado, purificado, caracterizado y clonado una gran variedad de aldo-ceto-reductasas microbianas,¹⁴⁹⁻¹⁵¹ a la vez que se han diseñado muchos mutantes a través de procedimientos de ingeniería genética.^{152,153}

Los métodos de modificación genética de enzimas pueden clasificarse en dos categorías: mutación racional (a través de una mutación puntual sitio-dirigida) o por medio de una mutación al azar (cambio de un amino ácido al azar para crear una gran biblioteca de proteínas mutantes, seguida de una selección de la proteína con la actividad buscada). Cuando no se conoce la estructura tridimensional de la enzima, por lo general el método elegido es producir mutaciones al azar. Un ejemplo de diseño racional en la modificación de una deshidrogenasa, es el descrito por el grupo de Ziegelman-Field.¹⁵⁴ La enzima modificada fue una alcohol deshidrogenasa de *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E (TeSADH) estable a temperaturas altas y en disolventes orgánicos. Si bien esta enzima actúa sobre un amplio rango de sustratos, no permite obtener (S)-1-fenil-2-propanol, un precursor de la mayoría de los insumos farmacéuticos que contienen alcoholes secundarios. Al investigar el modelo estructural de la enzima, se encontró que un residuo de triptofano era el responsable de obstruir la unión 1-fenil-2-propanona al sitio activo de la enzima. El reemplazo de este aminoácido por alanina, llevó a que la enzima mutante cambiara

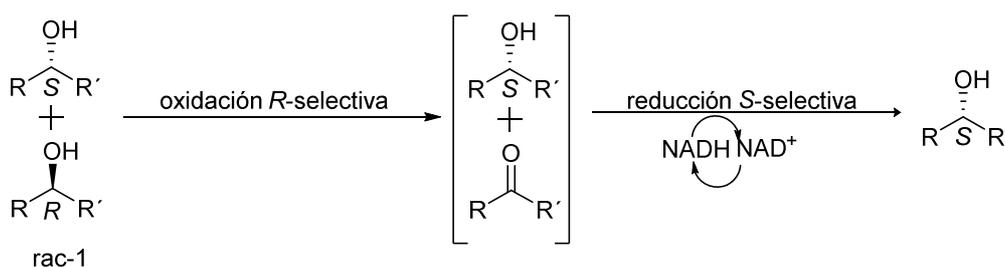
significativamente su especificidad de sustratos, siendo ahora activa para la obtención de (S)-1-fenil-2-propanol, así como sobre derivados arílicos de fenil- y bencilcetonas, **Esquema 3**.



Esquema 3. Aumento en la tolerancia de sustratos por medio de una mutación racional de la TeSADH.

2.3.2 Desracemizaciones

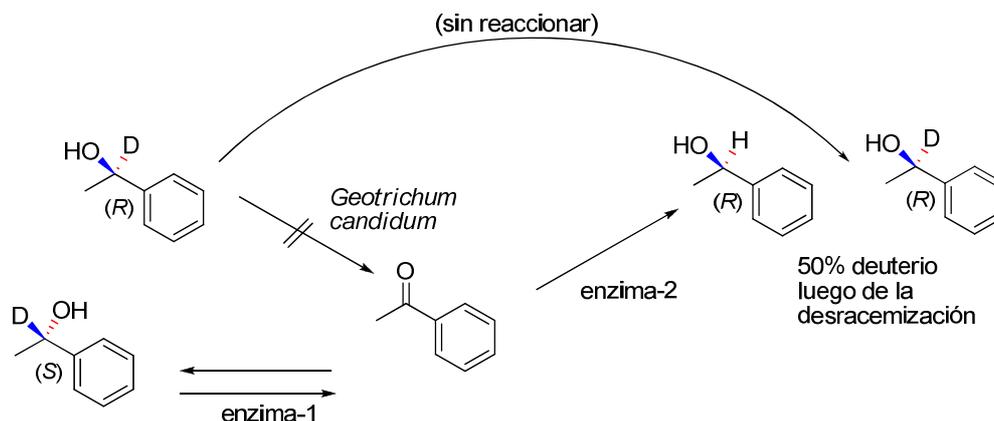
Las desracemizaciones pueden ser llevadas a cabo a través de métodos diferentes, como ser resolución cinética, resolución cinética dinámica o estereoinversión. Este último método, será el único descrito brevemente en este punto. Su mecanismo se explica como dos procesos redox involucrando dos enzimas con diferentes estereoespecificidades. Una enzima cataliza en forma reversible la oxidación de sólo uno de los enantiómeros, mientras que otra enzima reduce la cetona al otro enantiómero del alcohol, que se acumula en el medio de reacción, **Esquema 4**.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷



Esquema 4. Desracemización de alcoholes secundarios.

Algunos ejemplos de estereoinversión se describen en los trabajos de Nakamura *et al.*, en que utilizan β -hidroxiésteres alifáticos (3-hidroxi-butanoato y 3-hidroxi-pentanoato de metilo) como sustratos, utilizando células enteras de *G. candidum* IFO 5767. La mezcla se enriquece en el enantiómero (R), obteniéndolo con un 97-99% ee y 26-48% de rendimiento global.¹²⁸ Otro ejemplo es la desracemización de derivados de feniletanol, usando *G. candidum* bajo condiciones aerobias,

en las que se obtiene el alcohol (*R*) a partir del racemato correspondiente.^{158,159} En este trabajo se utilizó alcohol marcado con deuterio en el centro quiral (la mezcla racémica 1-*D*-feniletanol), mostrando que en la desracemización microbiológica el deuterio del enantiómero que invertía su configuración se intercambiaba con el hidrogeno del disolvente, mientras que el deuterio en el otro enantiómero permanecía incambiado, **Esquema 5**.



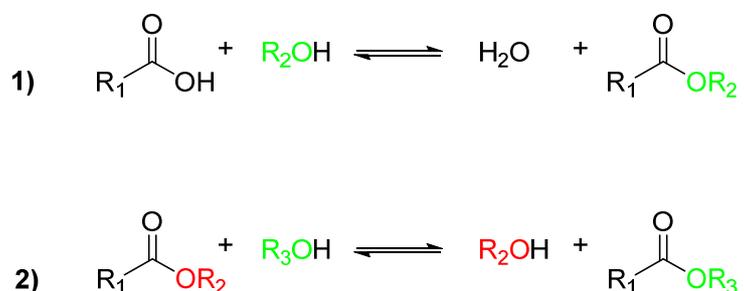
Esquema 5. Desracemización de 1-*D*-feniletanol con *G. candidum*.

Se ha descrito el uso de varios microorganismos para la desracemización de alcoholes secundarios tanto alifáticos como aromáticos, a saber: *Sphingomonas paucimobilis*,^{160,161} *Aspergillus terreus*,¹⁶²⁻¹⁶⁴ *Catharanthus roseus*,¹⁶⁵ *Rhizopus oryzae*,¹⁶⁶ *Candida rugosa*,¹⁶⁷ *Candida parapsilosis*,^{156,168,169} *Candida albicans*,¹⁷⁰ *Pichia methanolica*,¹⁷¹ o *Nocardia diaphanozonaria*.¹⁷² En cuanto a los posibles productos, pueden obtenerse dioles quirales,^{171,173-175} hidroxicetonas,^{166,176} derivados de hidroxiácidos,^{169,177} alcoholes alifáticos^{178,179} y aromáticos^{128,158,160,180} con altos valores de pureza enantiomérica.

2.3.3- Transesterificación:

La transesterificación -transformación de un éster en otro a través del intercambio de los alcoholes- ocupa una posición central en síntesis orgánica, tan importante como la esterificación directa entre un ácido carboxílico y un alcohol. Ambas reacciones son procesos en equilibrio, por lo que es necesario desplazar el sistema de reacción hacia la formación de los productos. En el caso de la esterificación, el agua generada como producto es separada rápidamente del medio de reacción por su incompatibilidad con el disolvente orgánico utilizado, mientras que en las transesterificaciones es necesario remover el alcohol producido para desplazar el equilibrio. Dado que existen mecanismos para desplazar esta reacción, la transesterificación es la mejor opción al

momento de sintetizar ésteres, ya que de esta forma podría trabajarse con materiales sensibles al agua, **Esquema 6.**¹⁸¹



Esquema 6. 1) Esterificación y 2) Transesterificación.

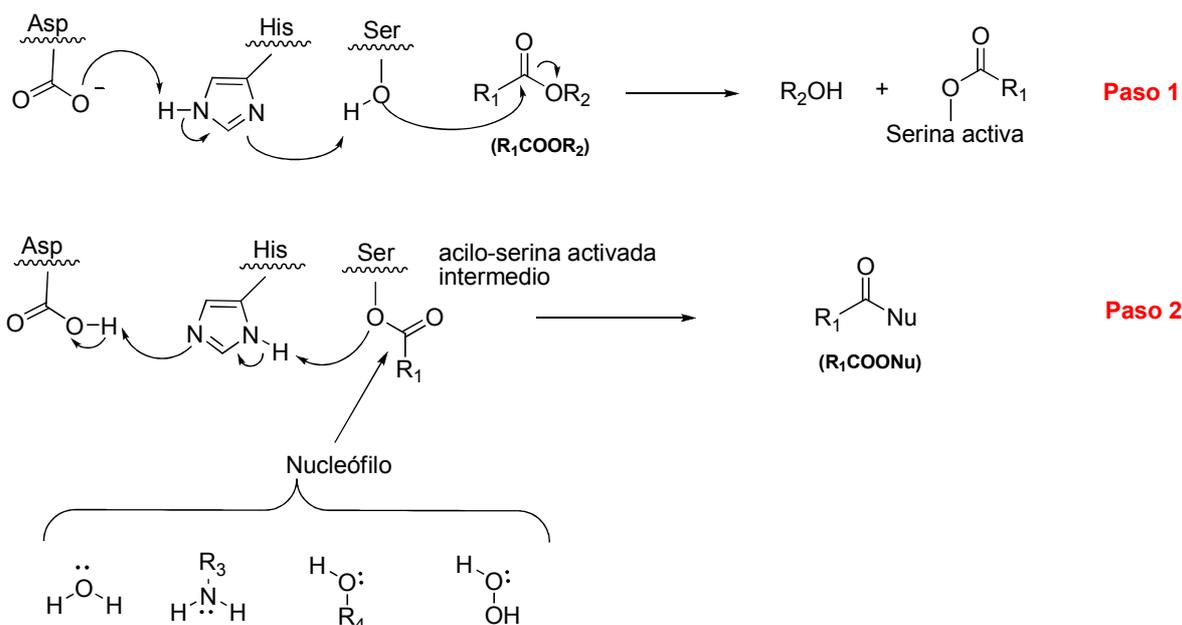
Las enzimas hidrolíticas, entre ellas las lipasas, son las enzimas que por excelencia catalizan reacciones de hidrólisis de ésteres, de esterificación y de transesterificación. Las lipasas (EC 3.1.1.3) han sido ampliamente utilizadas, por ejemplo, para la resolución de alcoholes racémicos y ácidos carboxílicos a través de la hidrólisis asimétrica del éster correspondiente.¹⁸¹ Estas son enzimas ubicuas que pertenecen a la familia de las serina-hidrolasas y se encuentran tanto en animales, plantas y hongos como en bacterias.^{79,182}

Las hidrolasas no requieren cofactores, muchas se encuentran disponibles comercialmente y son estables en disolventes orgánicos no polares. Estas características les confieren varias ventajas desde el punto de vista sintético, como por ejemplo un mejor rendimiento y recuperación del producto al trabajar con disolventes orgánicos de bajo punto de ebullición, minimización de la inactivación por sustrato o producto, y que en medios no acuosos no se favorece la que sería la principal reacción secundaria: la hidrólisis. Asimismo, si se trabaja con células vivas, se evita la contaminación microbiana y se minimiza la desnaturalización de la enzima, etc..¹⁸³

Las aplicaciones sintéticas de las lipasas son clasificadas en dos grupos: resolución cinética de racematos, y desimetrización de compuestos proquirales o meso. Como se discutió anteriormente, en el caso de resoluciones cinéticas dinámicas es posible obtener un rendimiento teórico del 100%, mientras que en la resolución cinética clásica, solamente la mitad del material de partida se convierte en producto. Esto hace que la resolución cinética no sea eficiente, salvo en los casos en que pueda incorporarse una etapa de racemización *in situ* (resolución cinética dinámica).¹⁸³ En el caso de la resolución cinética, la pureza óptica de los productos y del sustrato remanente disminuye a medida que ocurre la reacción inversa, debido a la naturaleza reversible de la esterificación y a la

transesterificación. Por esta razón, se utilizan diferentes estrategias con el objetivo de evitar estos inconvenientes, asegurando la irreversibilidad de la biotransformación. El uso de enolésteres como dadores de acilo en transesterificaciones, (vinil- o isopropenil- ésteres, etc.), es frecuente para desplazar el equilibrio hacia la formación de los productos. El alcohol vinílico formado se transforma en un compuesto carbonílico (acetaldehído o acetona), por medio de una tautomerización ceto-enol, haciendo a la reacción prácticamente irreversible. De esta forma la biotransformación es mucho más rápida, comparada con reacciones utilizando los ácidos carboxílicos libres o ésteres no activados.¹⁸³

La levadura *Candida antarctica* fue aislada originariamente en la Antártida (con el objetivo de encontrar enzimas con propiedades extremas) y dos de sus lipasas, denominadas lipasas A y B (conocidas como Cal A y Cal B respectivamente), han sido purificadas y caracterizadas, mostrando características muy diferentes entre sí. La lipasa A es dependiente de calcio y estable térmicamente, mientras que la lipasa B es menos termoestable e independiente de calcio.¹⁸⁴ Ambas son serina-hidrolasas, que se caracterizan por poseer en su sitio activo un residuo de serina nucleófilo, activado por dos residuos de histidina y aspartato. Este sitio activo es denominado tríada catalítica Ser-His-Asp y es allí donde tiene lugar la reacción, **Esquema 7**. El arreglo espacial de estos tres grupos causa una disminución en el valor de pK del grupo hidroxilo del residuo de serina, provocando un ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo del sustrato R_1COOR_2 (paso 1). De esta forma el grupo acilo del sustrato se une covalentemente a la enzima, formando el complejo acilo-enzima y liberando el alcohol R_2OH . En la segunda etapa (paso 2) el nucleófilo (Nu) ataca al complejo acilo-enzima intermedio, regenerando la enzima y liberando el ester R_1COONu .¹⁸²



Esquema 7. Mecanismo de acción de la serina-hidrolasas

Los factores más importantes que determinan la selectividad en relación a los sustratos son las restricciones físicas, la naturaleza hidrofóbica del sitio activo, y la forma en que se estabiliza el intermedio tetraédrico. La estructura de rayos X de Cal B muestra que el sitio activo está compuesto por dos canales, uno que aloja al grupo acilo y el otro al alcohol, siendo el primero de ellos el más espacioso.¹⁸⁵ En función de esto, sería de esperar un amplio rango de especificidad para los dadores de acilo y un más alto nivel de selectividad hacia los alcoholes. La alta estereoselectividad de la Cal B, en especial para alcoholes secundarios, se explica por el estrecho bolsillo enlazante, formado por los residuos Thr42, Ser47 y Trp104. Esto puede racionalizarse mediante la regla de Kazlauskas que predice cual enantiómero reaccionará más rápido en la esterificación de alcoholes secundarios racémicos.¹⁸⁶ El modelo representado en la **Figura 8**, muestra que el grupo de mayor tamaño (L) tiene prioridad sobre el mediano (M), lo cual determina que la reacción sea más rápida en el caso de que el enantiómero se enlace al sitio activo de la enzima como se observa en la figura de la izquierda. Por lo general, esta prioridad coincide con la regla de Cahn, Ingold y Prelog,^{187,188} y el alcohol (*R*) reacciona preferentemente para dar el éster correspondiente. Esta misma estereopreferencia se observa para la hidrólisis de ésteres, obteniendo los correspondientes alcoholes (*R*).^{182,189}



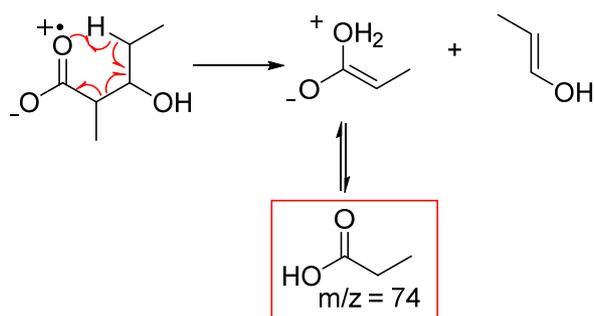
Figura 8. Modelo del sitio activo, que explica la enantioselectividad de lipasas. (Extraído de Gotor-Fernández, *et al*).¹⁸⁹

El grado de pureza enantiomérica de los productos obtenidos por resolución cinética enzimática son a menudo difíciles de obtener por otro método, por lo tanto su uso resulta de gran valor sintético. Dado que la enzima presenta una gran preferencia catalítica sobre los enantiómeros (*R*) de alcoholes secundarios, puede ser utilizada para producir tanto enantiómeros *R* o *S*, dependiendo de cuál sea el producto de interés.¹⁸⁴ La resolución de alcoholes secundarios ha sido estudiada tanto para compuestos con grupos voluminosos como para compuestos alifáticos simples.¹⁹⁰⁻¹⁹⁴

3. SITOFILATO

En 1982, Burkholder y colaboradores describieron la existencia de una feromona producida por el macho de esta especie y responsable del comportamiento de agregación.⁴⁵ Sin embargo, recién en 1987 Phillips *et al.* aislaron, purificaron e identificaron la feromona denominándola sitofilato.⁴⁷ La elucidación de su estructura fue realizada mediante técnicas de espectrometría de masas por impacto electrónico (EI-MS) e ionización química (CI-MS), cromatografía líquida con espectrometría de masa (HPLC-MS) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (¹H RMN, 400 MHz), a partir de muestras extraídas de machos vírgenes y purificadas mediante cromatografía gaseosa preparativa (GC). En el espectro de CI-MS (CH₄) se observó un intenso ión ($M^+ + H^+$) a $m/z = 203$ y la presencia de un grupo hidroxilo a través de la pérdida de agua del fragmento $m/z = 115$, así como la formación de un acetato.

Al identificarse tres grupos etilo en el espectro de ¹H RMN pudo explicarse el fragmento base ($m/z = 74$) detectado en el espectro de EI-MS como una combinación del rearrreglo de Mc Lafferty¹⁹⁵ y una pérdida de propionaldehído de acuerdo con una reacción retro-aldólica con la formación del ión ácido propiónico, **Esquema 8**.



Esquema 8. Formación del fragmento m/z 74 a través del rearreglo de Mc Lafferty.

En este trabajo también se determinó la estereoquímica relativa de la feromona natural mediante la síntesis de los 4 estereoisómeros, separación de los diastereómeros y determinación de su actividad biológica, evidenciándose que solamente la mezcla racémica *syn* poseía actividad feromona de agregación. Esta estereoselectividad en la respuesta de *S. granarius* fue confirmada en 1989 por Phillips donde también se determinó la configuración absoluta del isómero activo, (2*S*,3*R*)-sitofilato, y la falta de respuesta de *S. oryzae* y *S. zeamais* ante la presencia de dicha feromona.⁴⁶ Para poder correlacionar la configuración de los estereoisómeros con su actividad biológica fue necesario sintetizarlos con una alta pureza óptica, por lo tanto fueron preparados de acuerdo a lo descrito por Chong en 1989,¹⁹⁶ (primer antecedente en la síntesis enantioselectiva del sitofilato) a través de una epoxidación asimétrica de Sharpless (ver **3.1.1**).

Durante los años siguientes se publicaron varias síntesis de sitofilato, tanto de su isómero activo como de su enantiómero o sus diastereómeros. La complejidad en la síntesis, y por lo tanto la diferencia más relevante entre los trabajos publicados hasta el momento, radica en conseguir la estereoquímica adecuada con altos valores de pureza óptica y rendimiento global. De acuerdo a la estrategia sintética utilizada podríamos dividir las diferentes síntesis de sitofilato descritas en dos grandes grupos: aquellas en las que la síntesis orgánica clásica comprende el 100% de la ruta, y aquellas en las que la quiralidad es introducida mediante catálisis enzimática.

A continuación se presentan los diferentes trabajos publicados hasta el momento para la obtención de sitofilato, tomando en cuenta la categorización mencionada.

3.1 Síntesis de sitofilato mediante estrategias de síntesis orgánica clásica

Si bien existen varias metodologías para la preparación de compuestos enantioméricamente puros, como la utilización de un “pool quiral” (derivatización o conversión de un producto quiral disponible en la naturaleza),¹⁹⁷ resolución de racematos,^{69,70} etc., los antecedentes descritos a

continuación para la síntesis de sitofilato, se encuentran dentro de las metodologías de síntesis asimétrica que implican la conversión de un producto aquiral en uno enantioméricamente enriquecido utilizando un ambiente quiral. Dependiendo de la influencia que tenga este ambiente para inducir asimetría en el material de partida, podemos clasificar las metodologías de síntesis asimétrica en tres tipos.¹⁹⁸

1. *Uso de auxiliares quirales:* Se adiciona un grupo quiral (auxiliar quiral) al material de partida, que pueda ser fácilmente removible, y las reacciones se llevan a cabo utilizando reactivos aquirales. Como la molécula adquiere asimetría debido al auxiliar quiral, las nuevas funcionalizaciones originarán preferentemente uno de los isómeros posibles. Luego de la remoción del auxiliar, un enantiómero se habrá formado en mayor proporción con respecto al otro. La gran desventaja de esta metodología radica en la necesidad de agregar dos pasos a la secuencia sintética: la incorporación y remoción del auxiliar quiral.¹⁹⁹

2. *Uso de un reactivo quiral:* En este caso la inducción de asimetría se realiza intermolecularmente. La interacción con el reactivo quiral genera estados de transición diastereoméricos que al poseer diferente energía determinan la formación preferencial de uno de los enantiómeros frente al otro. Un ejemplo de esta estrategia lo constituye la epoxidación asimétrica de Sharpless (se describirá más adelante).^{200,201}

3. *Uso de catalizadores quirales:* Este método presenta como ventaja que no requiere utilizar reactivos quirales en cantidades estequiométricas. Los métodos de catálisis asimétrica pueden dividirse en químicos y enzimáticos, según la naturaleza del agente quiral. En este capítulo se presentarán la utilización de catalizadores químicos en hidrogenaciones catalíticas heterogéneas^{202,203} y el uso de enzimas como biocatalizadores.^{204,205}

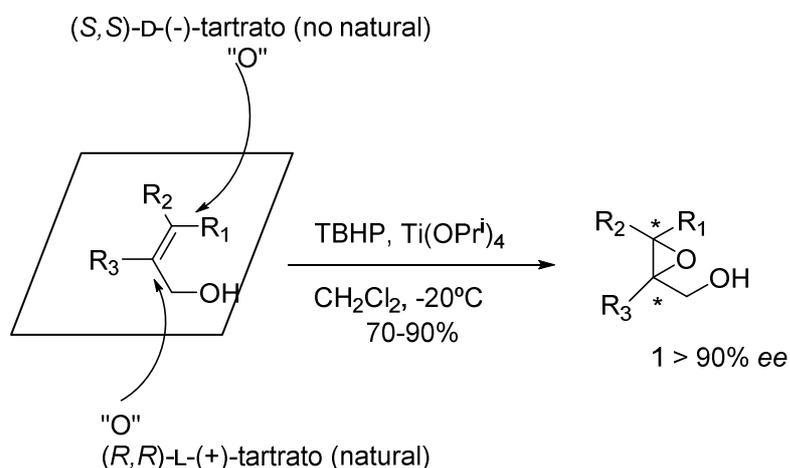
Dentro de estas herramientas de síntesis orgánica convencional, los métodos utilizados para la síntesis de sitofilato han sido la epoxidación asimétrica de Sharpless (síntesis de Chong, 1989)¹⁹⁶, reacción aldólica (síntesis de Di Battista, 1996;²⁰⁶ Badía, 2000;²⁰⁷ y Gil, 2005²⁰⁸) y la hidrogenación catalítica heterogénea (síntesis de Gil, 1996;²⁰⁹ y Mateus, 2001²¹⁰).

A continuación se presentan las diferentes estrategias sintéticas mencionadas.

3.1.1-Epoxidación asimétrica de Sharpless

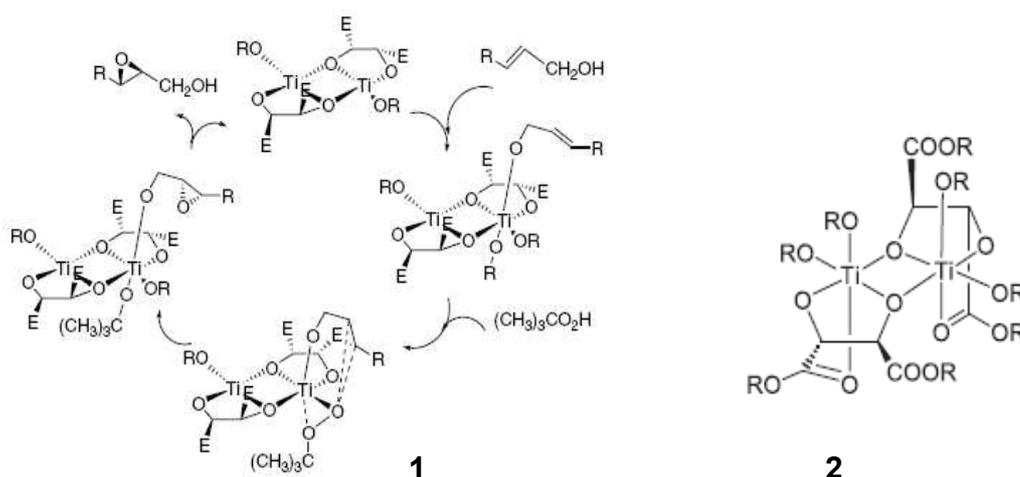
Algunos complejos de metales de transición pueden catalizar la oxidación de alcoholes alílicos al epóxido correspondiente. La mayoría de los procedimientos involucran *t*-butilhidroperóxido (TBHP)

como agente oxidante que se utiliza en cantidades estequiométricas y en combinación con un catalizador de titanio. Cuando se incluye en el sistema un éster de tartrato enantioméricamente puro la reacción es enantioselectiva y se conoce como la epoxidación asimétrica de Sharpless, **Esquema 9**.²¹¹



Esquema 9. Epoxidación asimétrica de Sharpless.

Si bien existen varios complejos Ti-tartrato, el más activo es el que tiene la misma cantidad de moles de Ti y de tartrato. Como se observa en el **Esquema 10 (1)**, la reacción procede *vía* un complejo de Ti (IV) y tartrato **(2)**, donde el alcóxido alílico y los aniones de TBHP, se intercambian con otros ligandos de Ti (IV). El alquilperóxido es activado electrofílicamente *vía* coordinación bidentada al centro de Ti (IV). La transferencia del oxígeno al enlace olefínico procede del peróxido, y el ciclo se completa al ser sustituido el epoxialcóxido por otro alcohol alílico y por el TBHP para regenerar el complejo e iniciar nuevamente. La enantioselectividad de esta reacción es controlada por los ligandos quirales (tartratos) unidos al Ti (IV), que determinan la conformación de la coordinación del alcohol alílico.^{198,200,211,212}

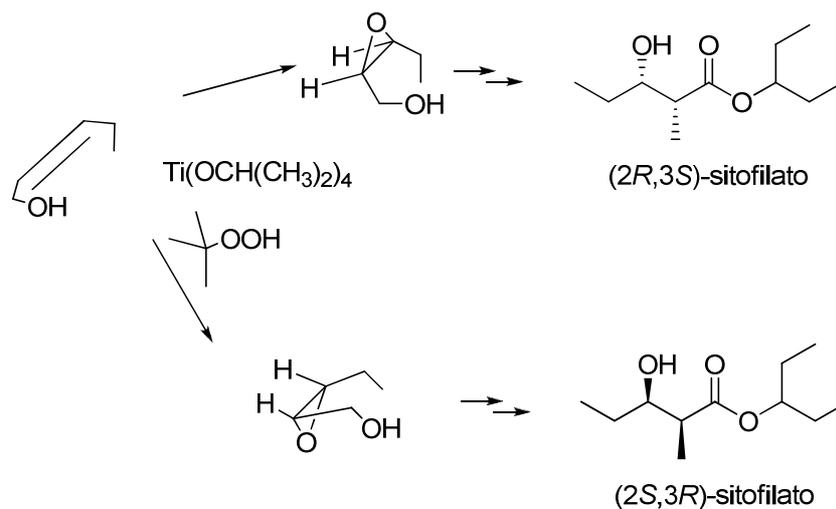


Esquema 10. Mecanismo de la reacción (1) y complejo Ti-tartrato (2) (Extraído de Carey, F. y Sundberg, R.: *Advanced Organic Chemistry*.)²¹¹

La epoxidación asimétrica de Sharpless de alcoholes alílicos ha sido un área de investigación importante en síntesis orgánica, debido a la alta inducción de enantioselectividad que puede utilizarse en un amplio rango de sustratos.^{198,201,213}

3.1.1.1-Estrategia I

En 1989, Chong propuso una ruta sintética para la obtención de los estereoisómeros *syn* de sitofilato, en la que se planteaba como primer paso una epoxidación catalítica y asimétrica de acuerdo a la estereoquímica del reactivo quiral utilizado, uno u otro enantiómero de diisopropiltartrato (DIPT), **Esquema 11**.¹⁹⁶ La obtención de cada uno de los estereoisómeros *syn* de sitofilato se llevó a cabo partiendo del alcohol alílico *cis*-2-penten-1-ol, Ti(OPr)₄ (tetraisopropóxido de titanio) como catalizador, TBHP como agente oxidante y (-)-DIPT o (+)-DIPT como ligando asimétrico.

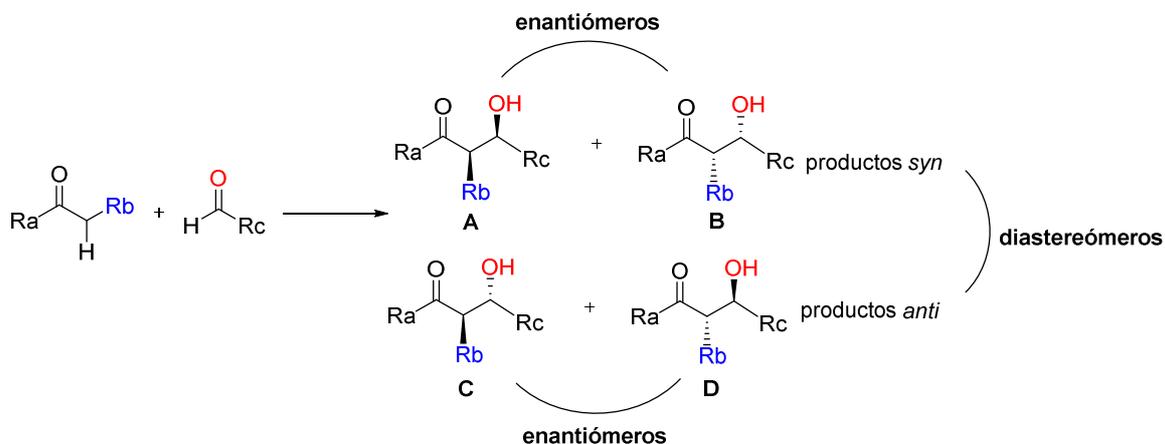


Esquema 11. Etapa clave en el esquema de la síntesis diseñado por Chong para la obtención de $(2R,3S)$ - y $(2S,3R)$ -sitofilato.

En este primer paso se obtuvo el epoxialcohol correspondiente con un exceso enantiomérico $>98\%$ y un rendimiento de 88% . Los siguientes pasos de oxidación del alcohol a ácido y esterificación con 3-pentanol no generaron pérdida en la pureza óptica.

En cuanto a la apertura regioselectiva del epóxido, se tuvieron en cuenta trabajos previos en cuanto a la reacción de organocupratos con ésteres glicídicos sustituidos en posición 3. En función de esos antecedentes, se llevó a cabo la apertura selectiva del epóxido con Me_2Cu dando a lugar a $(2S,3R)$ -sitofilato (rendimiento 69% , rendimiento global 22%), como producto de metilación en C-2.

3.1.2-Reacción Aldólica

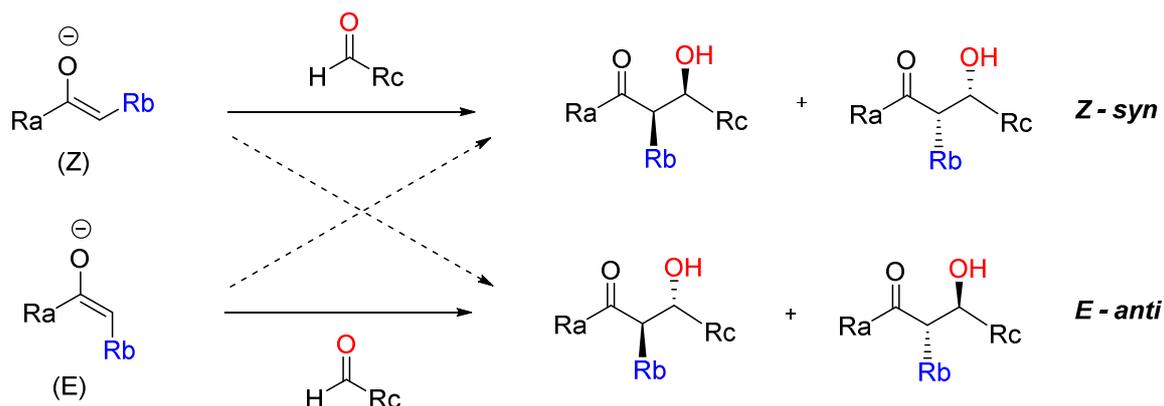


Esquema 12. Estereoquímica de la reacción aldólica.

La reacción aldólica es una de las herramientas sintéticas más importantes a la hora de generar enlaces carbono-carbono, **Esquema 12**. En este proceso pueden generarse dos nuevos centros quirales y la estereoquímica de los mismos depende de la información estereoquímica aportada por los dos componentes involucrados en esta reacción: enolato y aldehído. En una adición aldólica la *diastereoselectividad* está determinada por la geometría del enolato, mientras que la *enantioselectividad* se debe a que uno de los dos componentes sea quiral.²¹⁴

Este estereocontrol de la reacción requiere que los reactivos actúen exclusivamente, uno como electrófilo y el otro como nucleófilo. Esto último se consigue generando previamente el nucleófilo (enolato) y asegurando que su adición sea más rápida que el intercambio de protón entre el nucleófilo y el electrófilo. Estas reacciones están bajo *control cinético*, tanto en el paso de formación del enolato como en el paso de adición. La estructura del producto de reacción estará determinada por 2 factores: 1) la configuración *E* o *Z* inicial del enolato, **Esquema 13**, y 2) la estructura del estado de transición en la adición del grupo electrófilo (carbonilo).

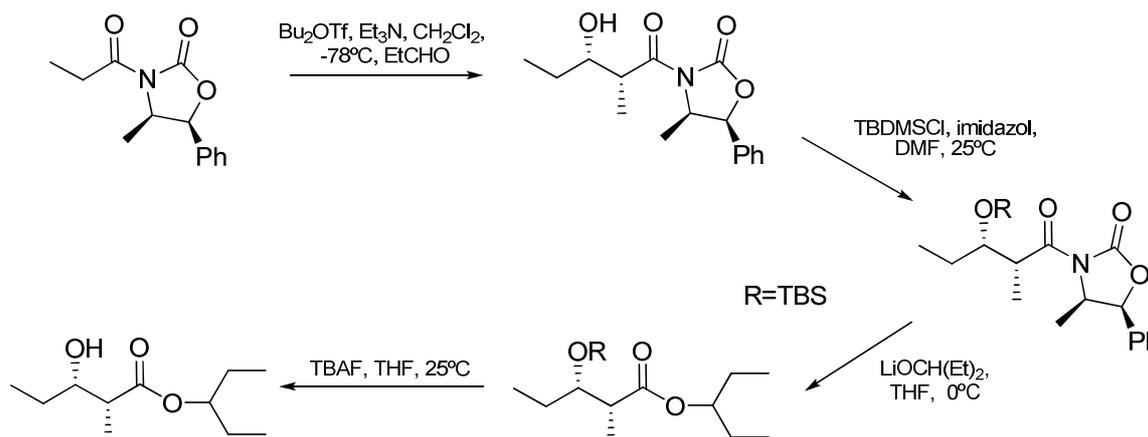
En otras condiciones de reacción, el producto final puede resultar del *control termodinámico*, que puede lograrse utilizando cantidades de base menores a la estequiométrica, disolventes próticos y altas temperaturas, resultando en una reacción aldólica reversible y con una relación de productos determinada por la estabilidad relativa de todos los productos posibles. Cuando una reacción aldólica se lleva a cabo bajo estas condiciones, la diferencia en la estabilidad de los estereoisómeros *anti* y *syn* determina la composición del producto final.



Esquema 13. La geometría del enolato determina la diastereoselectividad de la reacción.

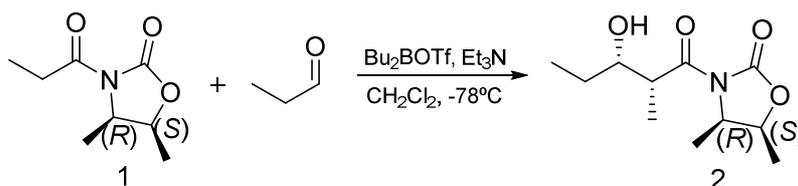
3.1.2.1- Estrategia II

En 1996 Di Battista y Webster publicaron la utilización de esta metodología en la síntesis de feromonas como (2*R*,3*S*)-sitofilato (enantiómero inactivo), sitofiluro y serricornina, **Esquema 14**.²⁰⁶



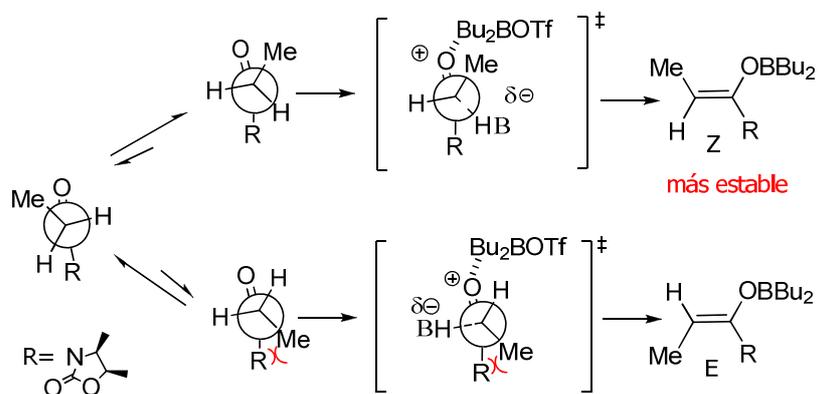
Esquema 14. Síntesis de Di Battista y Webster del enantiómero inactivo de sitofilato.

En este trabajo se hizo uso del procedimiento de Evans en donde por medio de auxiliares quirales (oxazolidinonas), que transfieren quiralidad al enolato intermedio posibilitando una reacción aldólica diastereo- y enantioselectiva, **Esquema 15**. En el caso particular de la síntesis de (2*R*,3*S*)-sitofilato, el auxiliar quiral (4*R*,5*S*)-4,5-dimetil-3-propionil-2-oxazolidinona utilizado reacciona con triflato de dibutilboro y trietilamina para generar el enolato de boro *Z* que favorecerá la formación del intermedio **2** al reaccionar con propionaldehído. Las etapas siguientes de la ruta planteada involucran la protección del grupo hidroxilo con cloruro de *t*-butildimetilsililo (TBDMSCl) y la transesterificación de la imida intermedia con 3-pentanol, para obtener (2*R*,3*S*)-sitofilato con un 64% de rendimiento global y 94% *ee*.

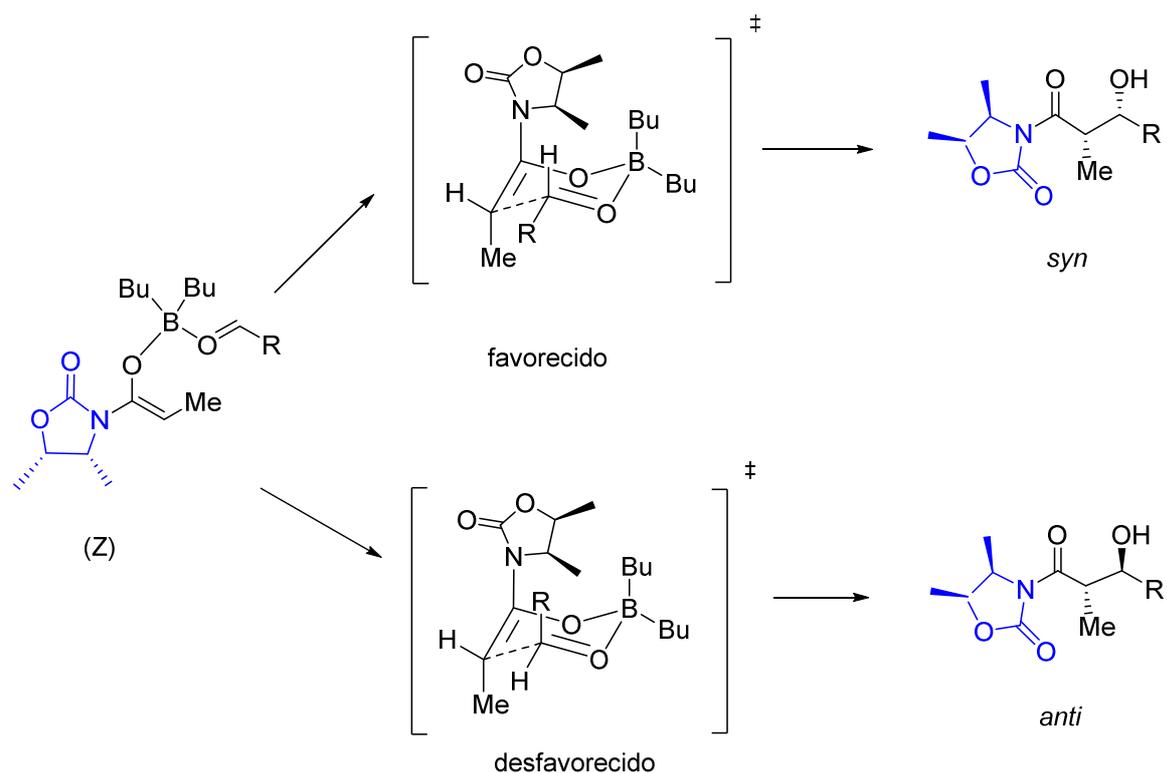


Esquema 15. Síntesis del aducto aldólico 2 mediante procedimiento de Evans.

En esta reacción, la geometría del enolato juega un rol muy importante determinando la diastereoselectividad de la reacción vía un estado de transición cíclico (modelo Zimmerman-Traxler)¹⁹⁹. El enolato Z (que se forma mayoritariamente por la ausencia de impedimento estérico entre el auxiliar y los otros sustituyentes), **Esquema 16**, reacciona con el aldehído para formar productos 1,2-*syn* debido a que el grupo R del aldehído adopta la posición ecuatorial en el anillo de 6 miembros, **Esquema 17**.

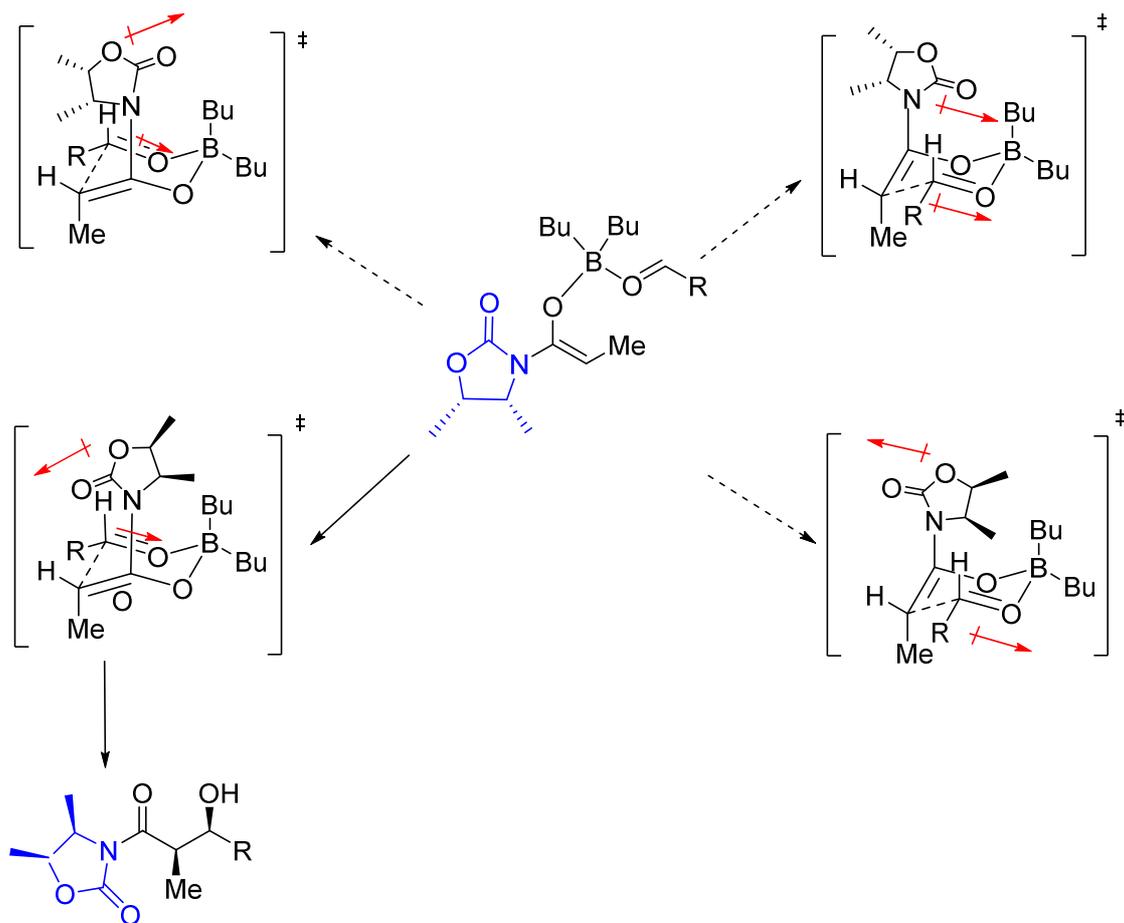


Esquema 16. Geometría de los enolatos.



Esquema 17. Diastereoselectividad en la reacción, modelo de Zimmerman-Traxler.

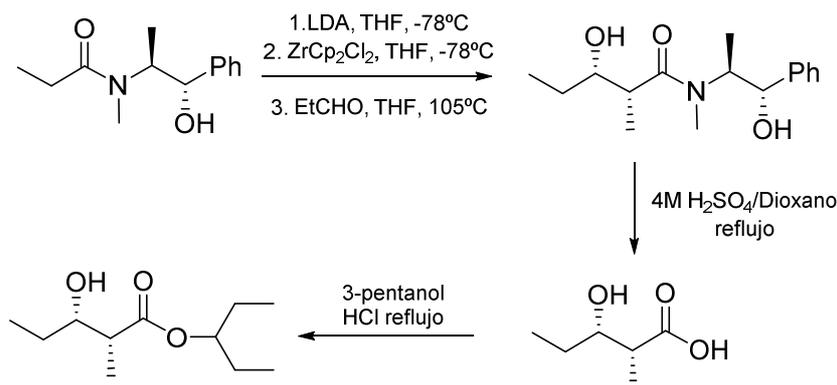
Este enolato tiene dos caras diastereotópicas debido a la oxazolidinona, lo cual genera un ataque al electrófilo de forma preferencial por una de ellas. En el **Esquema 18** se muestra, mediante el modelo de Zimmerman-Traxler, la formación del producto **2** a través del estado de transición con menor impedimento estérico en las caras del enolato y repulsión dipolo-dipolo entre ambos carbonilos.



Esquema 18. Enantioselectividad en la condensación aldólica.

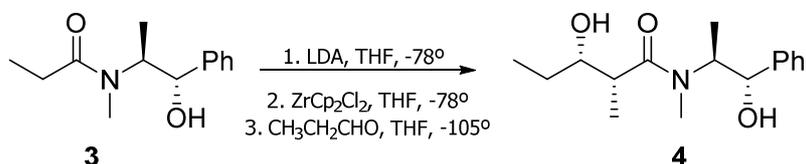
3.1.2.2-Estrategia III

Badía y Vicarío en el año 2000 presentaron una metodología para la obtención estereocontrolada de bloques de construcción quirales 1,3-dioxigenados. El producto de la adición fue hidrolizado y luego esterificado con 3-pentanol, sin racemización, obteniendo así (2*R*,3*S*)-sitofilato con un 89% de rendimiento global y un exceso enantiomérico >99%, **Esquema 19**.²⁰⁷



Esquema 19. Síntesis de (2R,3S)-sitofilato por Badía y Vicario.

Lo novedoso de este trabajo es la utilización de (*S,S*)-(+)-pseudoefedrina comercial, como material de partida, que actúa como auxiliar quiral en la formación del enolato, **Esquema 20**. En esta metodología el paso estereoselectivo involucra la formación del enolato de litio para luego someterlo a una transmetalación utilizando una sal de zirconio (II). Los resultados encontrados (producto *syn*) provienen de un ataque del enolato *Z* por el lado menos impedido (cara *si*) del intermedio. El mecanismo no ha sido claramente dilucidado aún, si bien se cree en la formación interna de un quelato entre el metal con el oxígeno del alcóxido del auxiliar quiral y el nitrógeno de la amida.¹⁹⁹



Esquema 20. Pseudoefedrina como auxiliar quiral en una adición aldólica. Síntesis de Badía et al.

Con respecto a la diastereoselectividad, el uso de enolatos de metales de transición permite al metal utilizar sus orbitales libres ejerciendo una fuerte influencia sobre los ángulos $RCHO\cdots M\cdots O_{\text{enolato}}$ de acuerdo a lo postulado en el estado de transición Zimmerman-Traxler. Esto resulta en la conformación *pseudo*-silla en la que el sustituyente R del aldehído ocupa la posición ecuatorial a los efectos de evitar los impedimentos estéricos con el auxiliar quiral, resultando en la formación del diastereómero *syn*, **Figura 9**.

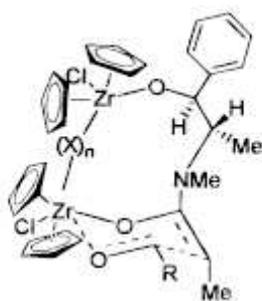
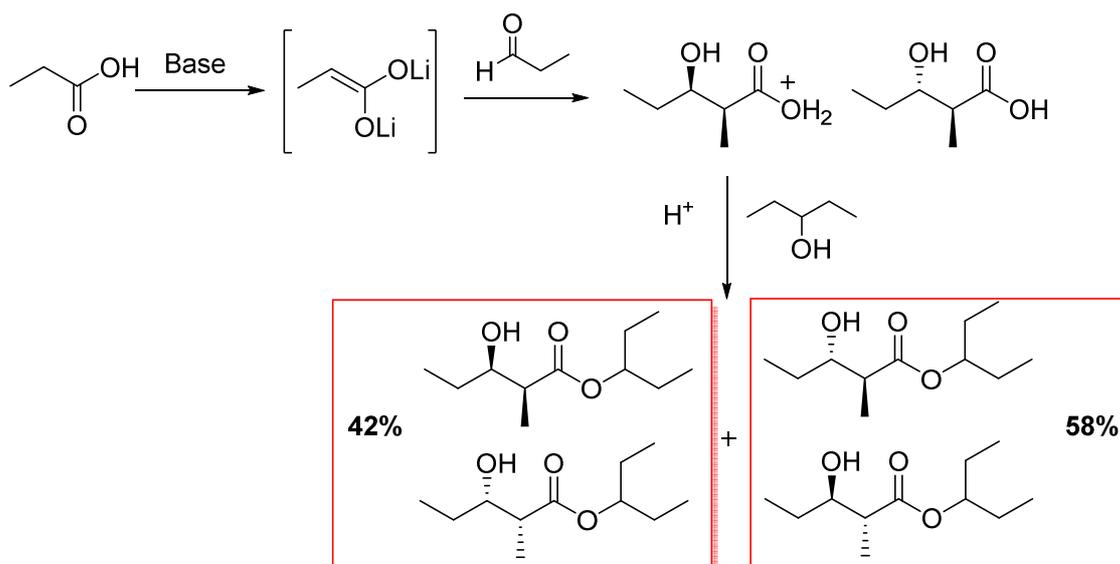


Figura 9. Conformación *pseudo-silla* del estado de transición (Extraído de Badía, D. *et al.*²⁰⁷).

3.1.2.3-Estrategia IV

En 2005, Gil *et al.* planteó la síntesis del par de enantiómeros *anti* de sitofilato a través de dos pasos, la adición de propanal al enolato de litio del ácido propiónico, y por último la esterificación con 3-pentanol, ver **Esquema 21**.²⁰⁸

Se ensayaron diferentes condiciones en cuanto a la amina utilizada, los equivalentes de base, de propanal y tiempo de reacción, con el propósito de controlar la estereoquímica de la reacción hacia la formación de los estereoisómeros *syn*. Sin embargo la diastereoselectividad de la reacción siempre favoreció la formación de los isómeros *anti*, sin conseguir buenos excesos diastereoméricos (42:58 *syn/anti*). La esterificación con 3-pentanol y posterior separación de los diastereómeros por columna cromatográfica dio lugar a (2*R**,3*S**)-sitofilato con un 52% de rendimiento global y 13% *ee*.



Esquema 21. Síntesis de sitofilato por Gil *et al.*.

3.1.3-Hidrogenación asimétrica

Los procesos de reducción de grupos funcionales pueden desarrollarse por varios métodos incluyendo la adición de hidrogeno y/o electrones a una molécula o la remoción de oxígeno u otro sustituyente electronegativo. La metodología más usada para incorporar hidrógenos a un doble enlace es la hidrogenación catalítica, en general rápida y limpia (salvo en alquenos impedidos estéricamente). La catálisis se lleva a cabo utilizando generalmente metales de transición como platino, paladio, rodio, rutenio o níquel. Estos complejos pueden solubilizarse (catálisis homogénea) o ser adsorbidos sobre soportes inertes como carbón o alúmina (catálisis heterogénea).²¹⁵

A través de una hidrogenación catalítica asimétrica de enlaces C=C, C=O y C=N, puede obtenerse una amplia variedad de compuestos quirales con altos niveles de eficiencia y enantioselectividad. Tanto el rendimiento como el exceso enantiomérico de la reacción están influenciados no sólo por los ligandos quirales utilizados sino también por los contraiones, la relación sustrato/catalizador, el disolvente, las condiciones de temperatura y tiempo de reacción.

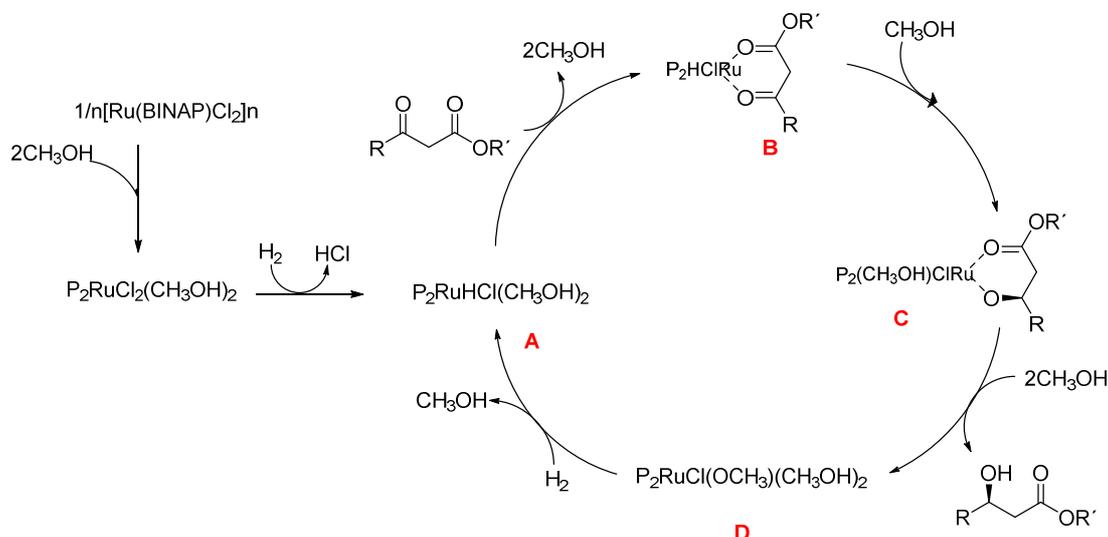
En el párrafo siguiente se describen brevemente dos tipos de hidrogenaciones asimétricas que han sido empleadas en la síntesis de sitofilato:

- *Hidrogenación catalítica homogénea de cetonas:*

La hidrogenación asimétrica de cetonas a través de complejos con metales de transición es un método muy eficiente para producir alcoholes quirales.²¹⁶ El catalizador BINAP-Ru tiene una gran eficiencia en la hidrogenación asimétrica de cetonas funcionalizadas.^{217,218}

En el caso de la hidrogenación utilizando $[\text{Ru}(\text{BINAP})\text{Cl}_2]_n$ como catalizador, la reacción ocurre de acuerdo al mecanismo que se ilustra en el **Esquema 22**. En la exposición a hidrógeno, el RuCl_2 pierde un cloruro para formar la especie **A** (RuHCl). Esta especie **A** forma de manera reversible el complejo **B** con el cetóester, en donde ocurre la transferencia de un hidruro desde el centro de Ru a la cetona coordinada formando así la especie **C**. Este paso de adición de hidruro es el determinante en la estereoquímica del producto, y viene dado por las características quirales del ligando BINAP, quien determina que la entrega del hidruro sea por medio de un estado de transición de 4 miembros, **Figura 10**. El complejo **B** del (*R*)-BINAP-Ru y el β -cetoéster tiene dos posibles diastereómeros, y dependiendo de la disposición estereoquímica del átomo de hidrógeno. Estos diastereómeros se convertirán estereoespecíficamente en el respectivo enantiómero del

hidroxiéster. El estado de transición que da lugar al alcohol (*R*)- es mucho más estable que la estructura diastereomérica que forma el alcohol (*S*)- debido a las repulsiones fenilo-alquilo.^{219,220}



Esquema 22. Ciclo catalítico del BINAP-Ru para la hidrogenación de β -cetoésteres.

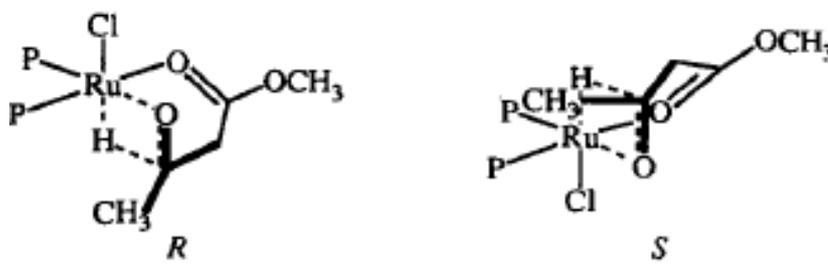


Figura 10. Estados de transición en la transferencia del hidruro del complejo B (Extraído del Libro *Asymmetric catalysis in organic synthesis*, R. Noyori.²¹⁹).

- Hidrogenación catalítica heterogénea de alquenos*: El mecanismo de este tipo de hidrogenación catalítica de alquenos no está totalmente establecido debido a que los sitios reactivos sobre la superficie del metal no están bien descritos. Sin embargo, es sabido que el hidrógeno está adsorbido sobre la superficie del metal, formando un enlace hidrógeno-metal. El alqueno también es adsorbido sobre la superficie catalítica y hay implicados al menos tres tipos de intermedios en la hidrogenación, **Figura 11**. El primero de ellos corresponde a la conexión de ambos carbonos del doble enlace por un enlace tipo π (**A**). Un hidruro puede agregarse al grupo adsorbido, dando lugar al intermedio (**B**) que involucra un enlace carbono-metal del tipo σ . Esta especie puede reaccionar con otro hidrógeno para dar lugar al alcano, que es desorbido desde la

superficie. Un tercer estado de transición (**C**) es conocido y refiere a la isomerización de un doble enlace y el intercambio de hidrógeno que a veces acompaña a las hidrogenaciones. Si bien cada uno de los estados de transición son conocidos y están descritos, resta conocer si existe una cooperación entre los átomos metálicos adyacentes o si la reacción ocurre en un único centro metálico, tal cual sucede en la catálisis homogénea.²¹⁵

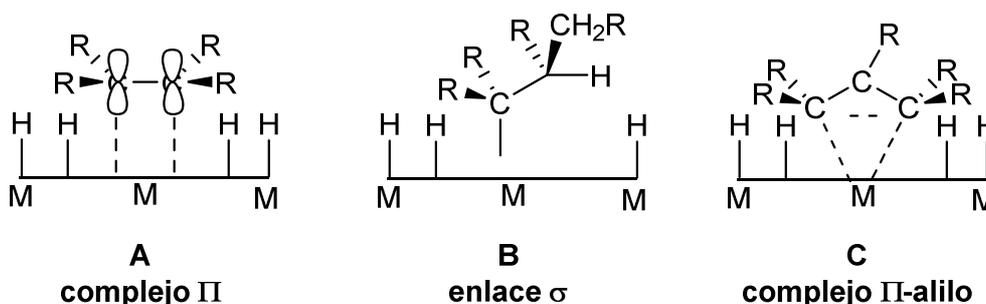
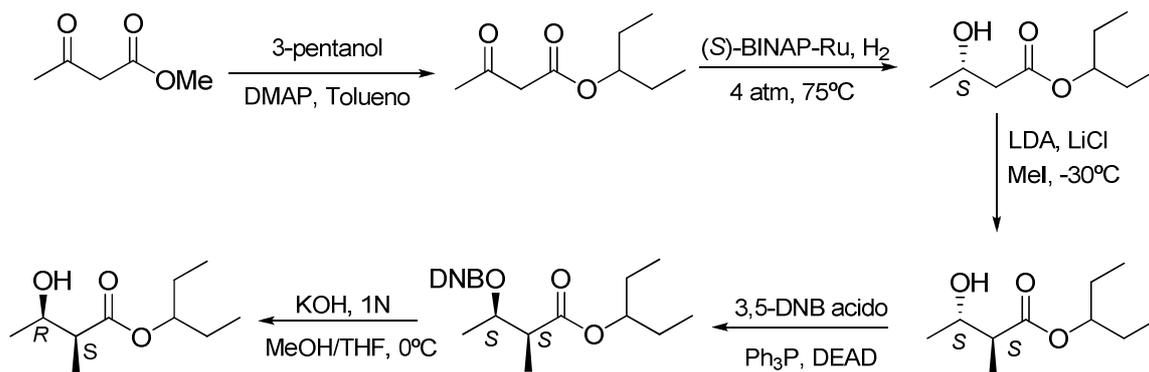


Figura 11. Estados de transición de la hidrogenación catalítica heterogénea.

En la mayoría de los casos, ambos hidrógenos son adicionados por la misma cara del doble enlace (adición *syn*). Si la hidrogenación ocurriese por la adición del hidrógeno en dos pasos, ocurriendo el mecanismo descrito anteriormente, el intermediario debería mantenerse enlazado a la superficie metálica de tal forma que la estereoquímica se conservara. La adsorción a la superficie catalítica normalmente está relacionada con los impedimentos estéricos del doble enlace. Por lo tanto, el hidrógeno se adiciona por la cara del doble enlace que se encuentra menos impedida.^{215,220}

3.1.3.1-Estrategia V

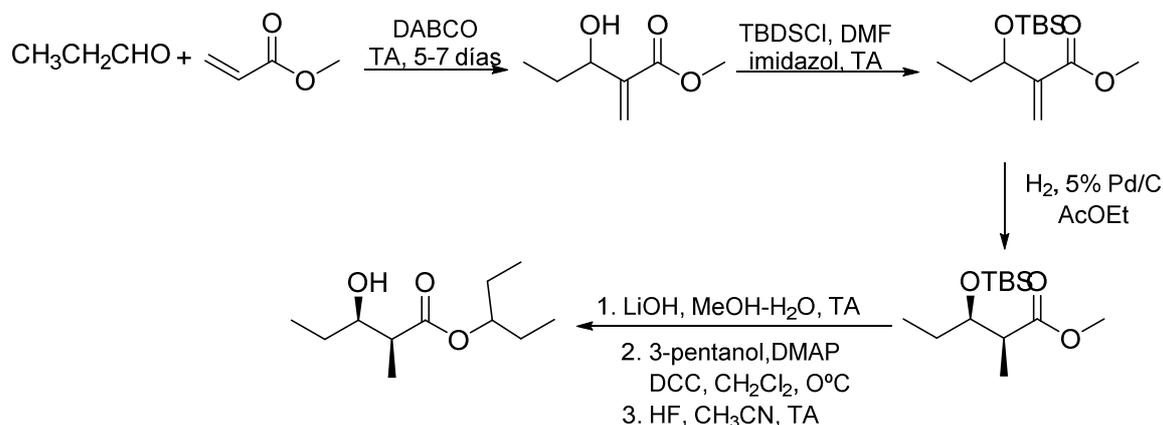
En la síntesis propuesta por Razkin *et al.* en 1996,²⁰⁹ la reducción asimétrica con un complejo de BiNAP-Ru era la etapa clave para dirigir la síntesis hacia la formación de uno de los 4 isómeros posibles, **Esquema 23**. La reacción tuvo altos rendimientos y excesos enantioméricos (98%, >99% *ee*). Sin embargo, la configuración absoluta del grupo hidroxilo no corresponde a la de la feromona activa, por lo que uno de los pasos posteriores corresponde a la estereoinversión en el carbono 3 mediante una reacción de Mitsunobu.



Esquema 23. Reducción asimétrica. Síntesis de Razkin.

3.1.3.2- Estrategia VI

En el año 2001, Mateus propuso la síntesis del (±)-sitofilato por medio de una hidrogenación catalítica heterogénea y diastereoselectiva de un aducto de Baylis-Hillman originado a partir de un aldehído alifático, **Esquema 24**.²¹⁰ El punto clave en esta ruta sintética fue la hidrogenación catalítica, buscando obtener los dos isómeros *syn* con alto grado de diastereoselectividad. Tomando en cuenta el trabajo previo del grupo en la preparación de compuestos *syn* a partir de la hidrogenación heterogénea de aductos derivados de aldehídos aromáticos,²²¹ se estudiaron las condiciones necesarias para obtener esta estereoselectividad a partir de aductos originados de aldehídos alifáticos.



Esquema 24. Hidrogenación catalítica heterogénea. Síntesis de Mateus.

Los mejores valores de diastereoselectividad (95:5 y 100:0 *syn/anti*) se obtuvieron con los aductos en los que el grupo hidroxilo se encontraba protegido (R = TBS), **Figura 12**. Estos resultados se deben al bloqueo de la cara *re* del doble enlace por el grupo sililo direccionando la adición del hidrogeno por la cara *si*. En la reacción con el grupo hidroxilo libre se observó una baja o casi nula

diastereoselectividad, debido a la posibilidad de acceder a ambas caras del doble enlace. Una leve estereoselectividad hacia la formación del producto *syn* se encontró en aductos con el ácido carboxílico libre, probablemente debido a la formación de un enlace de hidrógeno interno entre el grupo ácido y el hidroxilo, **Figura 13**.

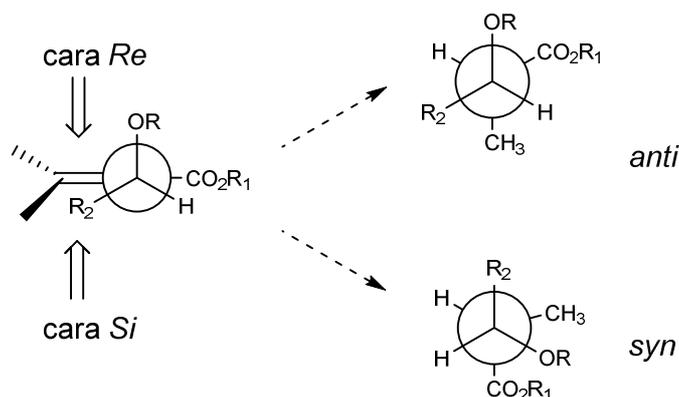


Figura 12. Racionalización para la diastereoselectividad observada.

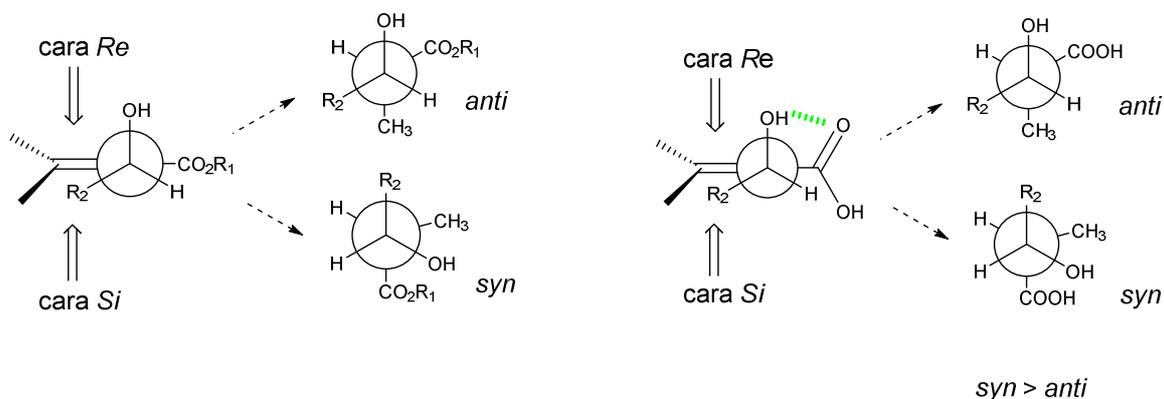


Figura 13. Diastereoselectividad en los aductos con grupo hidroxilo y ácido carboxílico libre.

La etapa final de la ruta sintética fue la hidrólisis del éster, esterificación con 3-pentanol y desprotección del grupo hidroxilo, obteniendo (±)-sitofilato con un 22% de rendimiento global.

3.2 Síntesis del sitofilato mediante el uso de biocatalizadores

Como se describió en el punto 2 de este capítulo, la biocatálisis es atractiva para la química orgánica sintética debido a su capacidad de introducir quiralidad de forma regio- y estereoselectiva.^{59,60} Esto ha llevado a que esta herramienta sea considerada de gran utilidad en síntesis de feromonas de coleópteros, ya que siendo muchas de ellas compuestos quirales su

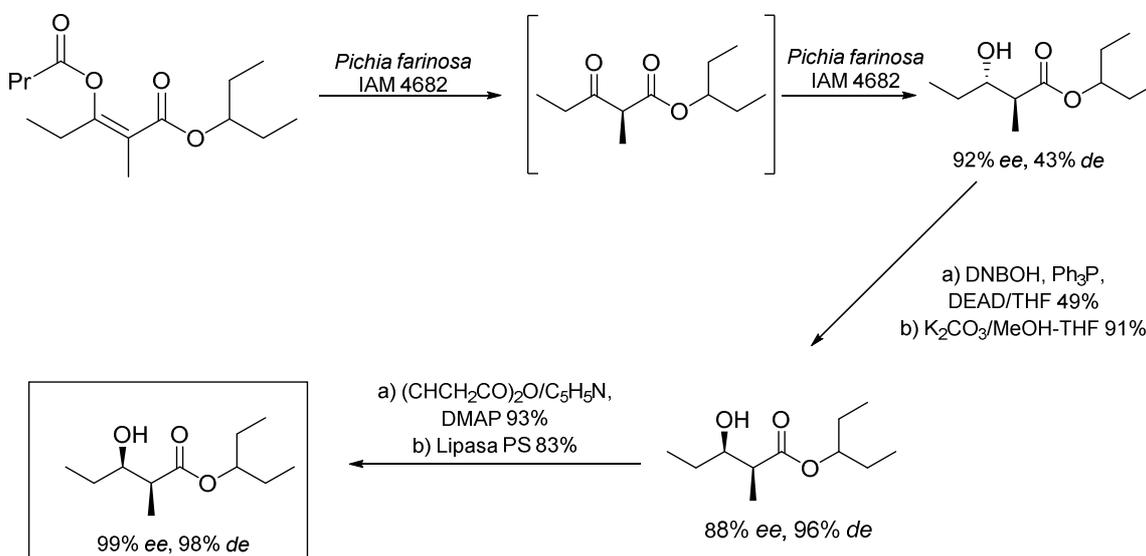
actividad biológica se encuentra directamente vinculada a la pureza óptica del mismo.^{17,222-229} Los trabajos sobre síntesis de sitofilato descritos a continuación plantean rutas quimioenzimáticas en las que se utilizan pasos de síntesis convencional combinadas con reacciones enzimáticas. Las estrategias descritas comprenden el uso de enzimas aisladas (Kalaitzakis en el 2007)²³⁰ y células enteras (Sugai *et al.* en 1991)²³¹ y Puntambekar *et al.* en 1998.²³²

3.2.1-Estrategia VII

En 1989 Mori e Ishikura sintetizaron el isómero activo de la feromona a partir de (3S)-hidroxipentanoato de metilo ópticamente puro de origen microbiano,²³³ con un rendimiento total de 10% y en 7 pasos, siendo la inversión de Mitsunobu el paso clave para la obtención de la estereoquímica requerida (98% *ee*).²³⁴

Asimismo, Miyazawa y Yoshida estudiaron previamente la utilización de lipasas para la esterificación enantioselectiva en la síntesis de (2S,3R)-sitofilato.²³¹

Estos antecedentes fueron utilizados en 1991 por Sugai *et al.* en una estrategia sintética en donde se utilizaron reducciones microbianas y transesterificaciones catalizadas por lipasas como pasos claves para obtener compuestos enantioméricamente puros, **Esquema 25**.²³¹



Esquema 25. Síntesis planteada por Sugai *et al.* en 1991.

En una primera etapa Sugai *et al.* planteó la reducción asimétrica de 2-metil-3-oxopentanoato de 1-etilpropilo con la levadura *Pichia farinosa* IAM 4682 utilizando células en reposo (resting cells). Si bien en referencias anteriores se describía un comportamiento *anti*-Prelog para esta cepa, no se

obtuvieron los resultados esperados en cuanto a excesos diastereo- y enantioméricos: (2*S*,3*S*)-sitofilato, 55% *ee* y 69% *de*. Dada la falta de selectividad del proceso, los autores propusieron cambiar de sustrato y utilizar un enoléster en vez de un cetoéster tomando en cuenta los datos de la literatura.²³⁵ De esta manera, si la velocidad de reducción fuese lo suficientemente más rápida que la velocidad de racemización del β-cetoéster (obtenido ópticamente puro mediante hidrólisis) se mejorarían los valores de exceso diastereomérico.

Cuando se repitió la reacción en las mismas condiciones partiendo del enoléster, el exceso diastereomérico mejoró en un 10%, pero el exceso enantiomérico disminuyó levemente, probablemente debido a la alta velocidad de hidrólisis del enoléster, por lo que no significó una diferencia sustantiva partir de uno u otro sustrato. Utilizando células en crecimiento la reacción resultó ser más lenta, siendo la conversión tanto del enoléster como del cetoéster del 5-10% por día. Sin embargo, este enlentecimiento en el proceso mejoró sustancialmente el exceso enantiomérico en el caso de la biotransformación partiendo del enoléster (92% *ee*, 43% *de*). Esto, sumado a una disminución en el exceso diastereomérico, supone una mayor actividad de las enzimas reductivas y un descenso en la actividad de las hidrolíticas, mejorando como consecuencia los resultados finales.

Como se observa en el **Esquema 25**, los pasos siguientes a la obtención del β-hidroxiéster fueron la estereoinversión de Mitsunobu (que mejoró el exceso diastereomérico debido a la descomposición del intermedio en la reacción del isómero no deseado), y la purificación de (2*S*,3*R*)-sitofilato mediante una hidrólisis estereoselectiva del cloroacetato de la feromona, utilizando una lipasa comercial, con un 83% rendimiento y 99% *ee* en esta última etapa.

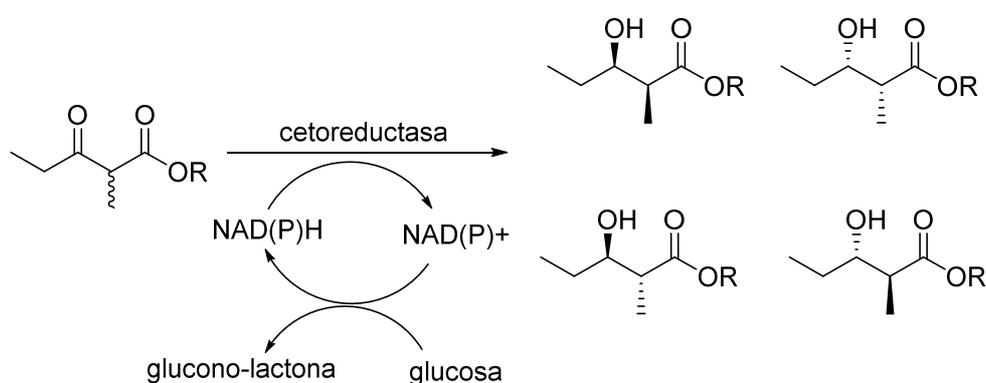
3.2.2-Estrategia VIII

En el trabajo publicado por Puntambekar *et al.* en 1998, se planteó como primer paso la obtención enantioselectiva del (2*S*,3*S*)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo a través de una reducción biocatalítica.²³² Para ello se realizó un screening de microorganismos, resultando *Geotrichum candidum*, en condiciones aerobias y resting cells, el más efectivo en cuanto al rendimiento en la extracción del crudo (53%) y a la formación de solamente el diastereómero *anti*. La configuración de (2*S*,3*S*)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo fue confirmada sintetizando (2*S*,3*S*)-sitofilato (por hidrólisis del éster etílico y esterificación no enzimática) y comparando las propiedades físicas y los datos espectroscópicos de éste con los provenientes del compuesto obtenido en la síntesis de Mori.²³⁴

El isómero activo de sitofilato se obtuvo a través de la inversión de la configuración del carbono que soporta al grupo hidroxilo por medio de la reacción de Mitsunobu, partiendo de (2*S*,3*S*)-sitofilato. El rendimiento de esta etapa de la síntesis fue del 20%. La estereoquímica del producto fue confirmada tomando en cuenta los datos espectroscópicos y rotación específica descritos por Chong.¹⁹⁶

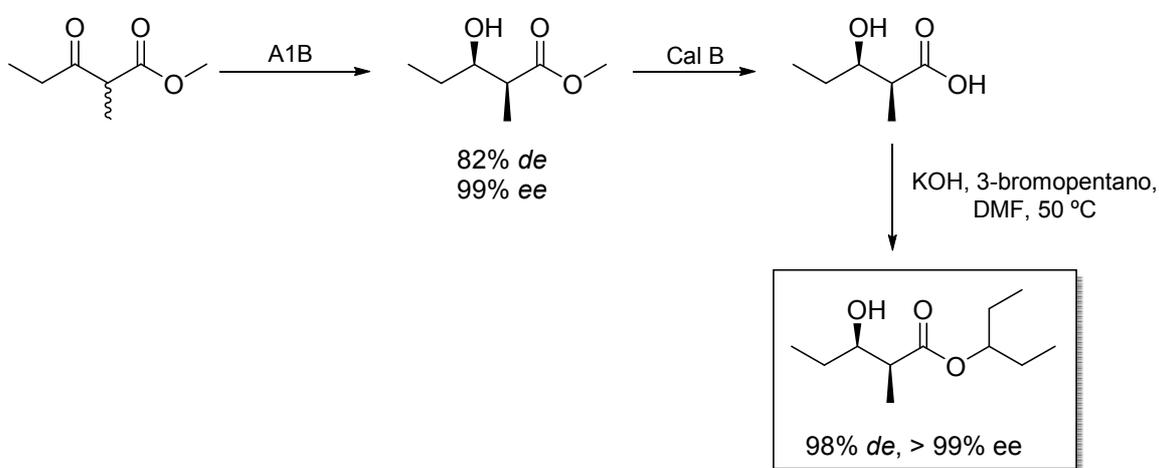
3.2.3-Estrategia IX

El grupo de trabajo de Smonou describió la utilización de deshidrogenasas comerciales para la reducción enantioselectiva de α -alquil-1,3-dicetonas²³⁶ y α -alquil- β -cetoesteres,²³⁷ basándose en el antecedente de sus síntesis de sitofiluro, feromona de agregación de *Sitophilus orizae*, también plaga de los granos almacenados.²³⁸ El mismo concepto de síntesis quimioenzimática lo utilizaron posteriormente en la preparación de sitofilato.²³⁰ En este trabajo, se realizó el screening de 100 cetoreductasas dependientes de NADH o NADPH, todas ellas disponibles comercialmente, sobre tres ésteres diferentes de 2-metil-3-oxopentanoato (etilo, metilo y propilo). Para el reciclaje *in situ* de los cofactores de nicotinamida se utilizó el sistema de glucosa/glucosa deshidrogenasa, **Esquema 26**. En los resultados obtenidos se observó que para la mayoría de las enzimas y para los 3 sustratos estudiados, el esteroisómero formado con mayores valores en conversión y diastereoselectividad fue el (2*S*,3*S*). Solamente las enzimas A1B, A1C y A1D daban como mayoritario el esteroisómero (2*S*,3*R*) para los ésteres de metilo y etilo, y (2*R*,3*R*) para 2-metil-3-oxopentanonato de propilo. Esto parecería explicarse por el efecto del grupo éster sobre la estereoselectividad, dado que se encontró como decrecía el porcentaje de (2*S*,3*R*) conforme aumentaba el tamaño del grupo éster (metilo, etilo y propilo).



Esquema 26. Screening de cetoreductasas como etapa clave en la síntesis de sitofilato.

Una vez identificada la enzima y el sustrato, se buscó mejorar los porcentajes de diastereoselectividad, conversión y tiempo de reacción por medio de cambios en la temperatura y pH del medio. Este estudio determinó los parámetros óptimos de la biotransformación para obtener los mejores resultados: 82% *de*, 95% de rendimiento global, 99% *ee* y 24 horas de reacción. Los pasos siguientes en la síntesis del sitofilato fueron la hidrólisis selectiva del hidroxíéster a través de una hidrolasa (se utilizó la Cal B luego de un screening) y la esterificación por métodos químicos. Se obtuvo así el (2*S*,3*R*)-sitofilato con un rendimiento global de 63 % (a partir del 3-oxopentanoato de metilo), 98% *de* y >99% *ee*, **Esquema 27**.



Esquema 27. Síntesis planteada por Kalaitzakis en 2007.

Referencias bibliográficas

1. Cox, P. J. *Stored Prod. Res.* **2004**, *40* (1), 1-25.
2. Barbosa Moreira, M. A.; Araújo Coracini, M. D.; Zarbin, P. H. G. *Quim. Nova* **2005**, *28* (3), 472-477.
3. Phillips, T.; Throne, J. *Annu. Rev. Entomol.* **2010**, *55* (1), 375-397.
4. Bentancourt, C. M.; Scatoni, I. B. *Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay*; Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur S. R. L.: Buenos Aires, 1999.
5. Van Lynden-Van Nes, A.; Koren, L.; Snijders, M.; Van Bronswijk, J. "Medical impact of arthropod allergens"; Proceedings of the second international conference on Urban Pests, 1996, 17-30.
6. De los Mozos Pascual, M. *Bol. S.E.A* **1997**, *20* (1), 93-109.
7. Ridgway, C.; Chambers, J. J. *Near Infrared Spectrosc.* **1996**, *6*, 115-119.
8. Neethirajan, S.; Karunakaran, C.; Jayas, D.; White, N. *Food Control* **2007**, *18* (2), 157-162.
9. Manking, R.; Shuman, D.; Coffelt, J. J. *Econ. Entomol.* **1996**, *89* (5), 1301-1308.
10. Fields, P.; White, D. *Annu. Rev. Entomol.* **2002**, *47*, 331-359.
11. Matteson, P. *ESA* **1995**, *41* (4), 210-220.
12. Zarbin, P. H. G.; Villar, J. A. F. P.; Correa, A. G. J. *Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18* (6), 1100-1124.
13. Nandagopal, N.; Prakash, A.; Rao, J. J. *Biopest.* **2008**, *1* (2), 210-215.
14. Wyatt, T. D. *Pheromones and animal behaviour communication by smell and taste*; Cambridge: New York, 2003.
15. Hassan, M.; Al-Zaidi, S. *International Pest Control* **2008**, *50* (2), 83-86.
16. Bentancourt, C. M.; Scatoni, I. B. *Lepidópteros de importancia económica. Reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales.*; Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur S. R. L.: Montevideo, Uruguay, 1995; Vol. 2.
17. Tillmann, J. A.; Seybold, S. J.; Jurenka, R. A.; Blomquist, G. J. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1999**, *29* (6), 481-514.
18. Ando, T.; Kuroko, H.; Nakagaki, S.; Saito, O.; Oku, T.; Takahashi, N. *Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45* (2), 487-495.
19. Arn, H.; Toth, M.; Priesner, E. *Bulletin IOBC/WPRS* **1986**.
20. Tóth, M. J. *Pest. Sci.* **2013**, *86* (1), 3-17.

21. Yamanaka, T.; Teshiba, M.; Tuda, M.; Tsutsumi, T. *Agric. For. Entomol.* **2011**, *13* (3), 321-331.
22. Zhang, Q.; Ma, J.; Zhao, F.; Song, L.; Sun, J.; Cognato, A. *Agric. Forest Entomol.* **2011**, *13* (1), 67-75.
23. Phillips, T. J. *Stored Prod. Res.* **1997**, *33* (1), 17-30.
24. Burkholder, W.; Ma, M. *Annu. Rev. Entomol.* **1985**, *30* (1), 257-272.
25. Burkholder, W. *Journal of the Georgia Entomological Society* **1982**, *17* (4), 1-10.
26. Cork, A.; Hall, D. R.; Hodges, R. J.; Pickett, J. A. *J. Chem. Ecol.* **1991**, *17* (4), 789-803.
27. Edde, P.; Phillips, T.; Robertson, J.; Dillwith, J. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2007**, *100* (1), 83-90.
28. Walgenbach, C.; Phillips, J.; Faustini, D. *J. Chem. Ecol.* **1983**, *9* (7), 831-841.
29. Phillips, T. W.; Jiang, X. L.; Burkholder, W. E.; Phillips, J. K.; Tran, H. Q. *J. Chem. Ecol.* **1993**, *19* (4), 723-734.
30. Suzuki, T. *J. Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45*, 1357-1363.
31. Oehlschlager, A.; Pierce, A.; Pierce, H.; Borden, J. *J. Chem. Ecol.* **1988**, *14* (11), 2071-2098.
32. Rosell, G.; Quero, C.; Coll, J.; Guerrero, A. *J. Pest. Sci.* **2008**, *33* (2), 103-121.
33. Pinnering, D. "Sampling and trapping insect populations, the importance of environment insect and trade"; Fifth international working conference on stored product protection, 1990, 1297-1307, London Road, UK.
34. Mullen, M. *J. Stored Prod. Res.* **1992**, *28* (4), 245-249.
35. Likhayo, P.; Hodges, R. *J. Stored Prod. Res.* **2000**, *36* (4), 341-353.
36. Dowdy, A.; Mullen, M. *J. Stored Prod. Res.* **1998**, *34* (1), 75-80.
37. Cox, P.; Collins, L. *J. Stored Prod. Res.* **2002**, *38* (2), 95-115.
38. Trematerra, P. *Pheromone use in integrated pest management of stored products* In *Encyclopedia of Pest Management*; Pimentel, D. Ed., 2007; pp. 507-510.
39. Barak, A.; Lie, R. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **1989**, *12* (1), 217-218.
40. Suzuki, T.; Sugawara, R. *Agric. Biol. Chem.* **1979**, *44* (1), 2519-2520.
41. Suzuki, T.; Nakakita, H.; Kuwara, Y. *Appl. Entomol. Zool.* **1987**, *22* (1), 340-347.
42. Pacavira, R.; Mata, O.; Manuel, A. In *9th International Working Conference on stored Product Protection* Campinas, Brasil, 2006.
43. Burkholder, W.; Boush, G. *EPPO Bull.* **1974**, *4* (4), 455-461.
44. Smith, S.; Moore, D.; Karanja, L.; Chandi, E. *Pesticide Science* **1999**, *55* (7), 711-718.

45. Faustini, D. L.; Giese, W. L.; Phillips, J. K.; Burkholder, W. E. *J. Chem. Ecol.* **1982**, *8* (4), 679-687.
46. Phillips, J. K.; Chong, J. M.; Andersen, J. F.; Burkholder, W. E. *Entomol. Exp. Appl.* **1989**, *51* (2), 149-153.
47. Phillips, J. K.; Miller, P. F.; Andersen, J. F.; Burkholder, W. E. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (49), 6145-6146.
48. Plarre, R. "Influence of synthetic Sitophilate, the aggregation pheromone of *S. granarius* (L) (Col., Curculionidae) on dispersion and aggregation behavior of the granary weevil." International Working Conference on stored Product Protection., 1994, 570-582, Canberra, Australia.
49. Plarre, R. *J. Stored Prod. Res.* **1996**, *32* (3), 275-283.
50. Chambers, J.; Van Wyk, C.; White, P.; Gerrard, C.; Mori, K. *J. Chem. Ecol.* **1996**, *22* (9), 16.
51. Smith, J. *Fundamentals and principles In Basic Biotechnology*; Ratledge, C.; Kristiansen, B. Eds.; Cambridge University Press: New York, 2001; pp. 1-16.
52. Gotor, V. *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6* (4), 420-426.
53. Liese, A.; Villela Filho, M. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10* (6), 595-603.
54. Patel, R. N. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252* (5-7), 659-701.
55. Zaks, A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5* (2), 130-136.
56. Carey, J.; Laffan, D.; Thomson, C.; Williams, M. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2337-2347.
57. Pscheidt, B.; Glieder, A. *Microb. Cell Fact.* **2008**, *7* (25), 1-36.
58. Hudlicky, T.; Reed, J. W. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3117-3132.
59. Loughlin, W. A. *Bioresour. Technol.* **2000**, *74* (1), 49-62.
60. Nestl, B.; Nebel, B.; Hauer, B. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15* (2), 187-193.
61. Tao, J.; Xu, J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13* (1), 43-50.
62. Faber, K.; Kroutil, W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9* (2), 181-187.
63. Zymanczyk-Duda, E.; Kafarski, P. *Application of whole-cell biocatalysis in chemoenzymatic, asymmetric synthesis of medically important compounds In Biocatalysis Research Progress*; Romano, F.; Russo, A. Eds.; Nova Science Publishers Inc.: New York 2008; pp. 307-365.
64. Gamenara, D.; Seoane, G.; Saenz Mendez, P.; Domínguez de María, P. *Enzymes Involved in Redox Reactions: Natural Sources and Mechanistic Overview In Redox Biocatalysis Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons: Hoboken, N J, 2012; pp. 1-64.

65. Ishige, T.; Honda, K.; Shimizu, S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9* (2), 174-180.
66. Rodríguez, S.; Schroeder, K. T.; Kayser, M.; Stewart, J. D. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (8), 2586-2587.
67. Faber, K. *Biotransformation in Organic Chemistry*, 6th ed.; Springer-Verlag: Berlin, 2011.
68. Martín Matute, B.; Backvall, J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11* (2), 226-232.
69. Pellissier, H. *Tetrahedron* **2011**, *67* (21), 3769-3802.
70. Kamal, A.; Azhar, M. A.; Krishnaji, T.; Malik, M. S.; Azeeda, S. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252* (5-7), 569-592.
71. Matsuda, T.; Yamanaka, R.; Nakamura, K. *Tetrahedron Asymmetry* **2009**, *20* (5), 513-557.
72. Kroutil, W.; Mang, H.; Edegger, K.; Faber, K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8* (2), 120-126.
73. Gaménara, D.; Seoane, G.; Saenz Méndez, P.; Domínguez de María, P. *Natural Cofactors and Their Regeneration Strategies In Redox Biocatalysis. Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons: Hoboken, N J, 2012; pp. 86-98.
74. Matsuda, T.; Yamagishi, Y.; Koguchi, S. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (27), 4619-4622.
75. Zhu, D.; Yang, Y.; Hua, L. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (11), 4202-4205.
76. El-Zahab, B.; Donnelly, D.; Wang, P. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99* (3), 508-514.
77. Ellis, E. M. *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, *216* (2), 123-131.
78. Kosma, E.; Brown, E.; Ellis, E.; Laphorn, A. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (18), 16285-16293.
79. Kroutil, W.; Rajagopalan, A. *Material Today* **2011**, *14* (4), 144-152.
80. Prelog, V. *Pure & Appl. Chem.* **1964**, *9* (1), 119-130.
81. Cordell, G.; Lemos, T.; Monte, F.; Mattos, C. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70* (3), 478-492.
82. Ishihara, K.; Hamada, H.; Hirata, T.; Nakajima, N. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *23* (2-6), 145-170.
83. Andrade, L.; Utsunomiya, R.; Omori, A.; Porto, A.; Comasseto, J. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *38* (2), 84-90.
84. Baldassarre, F.; Bertoni, G.; Chiappe, C.; Marioni, F. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *11* (1), 55-58.
85. Yadav, J. S.; Nanda, S.; Thirupathi Reddy, P.; Bhaskar Rao, A. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (11), 3900-3903.
86. Yadav, J. S.; Reddy, G. S. K. K.; Sabitha, G.; Krishna, A. D.; Prasad, A. R.; Rahaman, H.-U.-R.; Rao, K. V.; Rao, A. V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18* (6), 717-723.

87. Blanchard, N.; van de Weghe, P. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *2006* (4), 2348-2353.
88. Surette, M.; Sturz, A.; Rajasekaran, L.; Nowak, J. *Plant and soil* **2003**, *253* (2), 381-390.
89. Rodríguez, P.; Barton, M.; Aldabalde, V.; Onetto, S.; Panizza, P.; Menéndez, P.; González, D.; Rodríguez, S. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *49* (1-4), 8-11.
90. Orden, A. A.; Magallanes Noguera, C.; Agostini, E.; Kurina Sanz, M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *61* (3-4), 216-220.
91. Machado, L.; Monte, F.; de Oliveira, M.; Mattosa, M.; Lemos, T.; Gotor Fernandez, V.; Gotor, V. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54* (3-5), 130-133.
92. Fonseca, A.; Monte, F.; de Oliveira, M.; de Mattos, M.; Cordell, G.; Braz Filho, R.; Lemos, T. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *57* (1-4), 78-82.
93. Maczka, W. K.; Mironowicz, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13* (21), 2299-2302.
94. Yadav, J.; Reddy, B.; Sreelakshmi, C.; Rao, A. *Synthesis* **2009**, *11*, 1881-1885.
95. Xie, Y.; Xu, J.; Lu, W.; Lin, G. Q. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100* (9), 2436-2468.
96. Kumaraswamy, G.; Ramesh, S. *Green Chem.* **2003**, *5* (3), 306-308.
97. Banerjee, S.; Singh, S.; Rahman, L. U. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 461-468.
98. Zhou, Y.; Shan, Z. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (25), 9510-9512.
99. Kanho, H.; Yaoya, S.; Kawahara, N.; Nakane, T.; Takase, T.; K, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 361-365.
100. Orden, A.; Bisogno, F.; Cifuentes, D.; Giordano, O.; Sanz, M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *42*, 71-77.
101. Carballeira, J. D.; Quezada, M. A.; Hoyos, P.; Simeó, Y.; Hernáiz, M. J.; Alcántara, A.; Sinisterra, J. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27* (6), 686-714
102. Kayser, M. *Tetrahedron* **2009**, *65* (5), 947-974.
103. Bode, B.; Müller, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (42), 6828-6846.
104. Bommarius, A.; Riebel, B. *Applications of recombinant DNA Technology: Directed evolution In Biocatalysis. Fundamentals and applications.*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2004; pp. 309-333.
105. Nakamura, K.; Matsuda, T. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10* (11), 1217-1246.
106. Wu, X.; Liu, N.; He, Y.; Chen, Y. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2009**, *41* (2), 163-170.
107. Goldberg, K.; Schroer, K.; Lütz, S.; Liese, A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76* (2), 249-255.

108. Gröger, H.; Chamouleau, F.; Orogas, N.; Rollmann, C.; Drauz, K.; Waldmann, H.; Hummel, W.; Weckbecker, A.; May, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (34), 5677-5681.
109. Shaw, N.; Robins, K.; Kiener, A. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *4* (345), 425-436.
110. Kometani, T.; Yoshii, H.; Matsuno, R. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1996**, *1* (2), 45-52.
111. Stewart, J. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **1998**, *1* (3), 278-289.
112. Servi, S. *Synthesis* **1990**, *1* (1), 1-25.
113. Csuk, R.; Glänzer, B. *Chem. Rev.* **1991**, *91* (1), 49-97.
114. Matshushita, K.; Toyama, H.; Yamada, M.; Adachi, O. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58* (1), 13-22.
115. Furukawa, H.; Wieser, M.; Morita, H.; Sugio, T.; Nagasawa, T. *Arch. Microbiol.* **1998**, *171* (1), 37-43.
116. Brzezinska-Rodak, M.; Zymanczyk-Duda, E.; Kafarski, P.; Lejczak, B. *Biotechnol. Progr.* **2002**, *18* (6), 1287-1291.
117. Howarth, J.; James, P.; Dai, J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (42), 7517-7519.
118. Nakamura, K.; Inoue, K.; Ushio, K.; Oka, S.; Ohno, A. *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (11), 2589-2593.
119. Nakamura, K.; Kawai, Y.; Nakajima, N.; Ohno, A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (15), 4778-4783.
120. Rodrigues, J. A. R.; Morán, P. J. S. *Quim. Nova* **2001**, *24* (6), 893-897.
121. Yadav, J. S.; Thirupathi Reddy, P.; Nanda, S.; Rao, A. B. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12* (1), 63-67.
122. Liu, X.; Zhu, T. S.; Sun, P. D.; Xu, J. H. *Synth. Commun.* **2001**, *31* (10), 1521-1526.
123. Perrone, M. G.; Santandrea, E.; Scilimati, A.; Tortorella, V.; Capitelli, F.; Bertolasi, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15* (22), 3501-3510.
124. Bertau, M.; Burli, M. *Chimia* **2000**, *54* (9), 503-507.
125. García-Urdiales, E.; Alfonso, I.; Gotor, V. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (1), 313-354.
126. Nakamura, K.; Matsuda, T.; Harada, T. *Chirality* **2002**, *14* (9), 703-708.
127. Nakamura, K. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998**, *5* (1-4), 129-132.
128. Nakamura, K.; Fujii, M.; Ida, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12* (22), 3147-3153.
129. Matsuda, T.; Marukado, R.; Mukouyama, M.; Harada, T.; Nakamura, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19* (19), 2272-2275.

130. Carballeira, J. D.; Alvarez, E.; Sinisterra, J. V. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *28* (1), 25-32.
131. Patel, R.; McNamee, C.; Benerjee, A.; Howell, J.; Robinson, R.; Szarka, L. *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14* (9), 731-738.
132. Buisson, D.; Azerad, R.; Sanner, C.; Larcheveque, M. *Biocatalysis* **1990**, *3* (1-2), 85-93.
133. Zagozda, M.; Plenkiewicz, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17* (13), 1958-1962.
134. Tanaka, T.; Iwai, N.; Matsuda, T. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *57* (1-4), 317-320.
135. Jian-Xin, G.; Zu-Yi, L.; Guo-Qiang, L. *Tetrahedron* **1993**, *49* (26), 5805-5816.
136. Matsuda, T.; Nakajima, Y.; Harada, T.; Nakamura, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13* (9), 971-974.
137. Nakamura, K.; Inoue, Y.; Matsuda, T.; Misawa, I. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, *16*, 2397-2402.
138. Martínez-Lagos, F.; Carballeira, J.; Bermúdez, J.; Alvarez, E.; Sinisterra, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15* (5), 763-770.
139. Barbieri, C.; Bossi, L.; D'Arrigo, P.; Pedrocchi, G.; Servi, S. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11* (4-6), 415-421.
140. Hoyos, P.; Sansottera, G.; Fernandez, M.; Molinari, F.; Sinisterra, J.; Alcántara, A. *Tetrahedron* **2008**, *64* (34), 7929-7936.
141. Bastos Borges, K.; de Souza Borges, W.; Durán Patrón, R.; Tallarico Pupo, M.; Sueli Bonato, P.; González Collado, I. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20* (4), 385-397
142. Schaur, F.; Borriss, R. *Biocatalysis and biotransformation In Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine*; Tkacz, J.; Lange, L. Eds.; Springer US, 2004; pp. 237-306.
143. Hüttel, W.; Hoffmeister, D. *Fungal biotransformations in pharmaceutical sciences In Industrial applications*; Hofrichter, M. Ed.; Springer Berlin Heidelberg, 2010; p. 485.
144. Wildeman, S.; Sonke, T.; Schoemaker, H.; May, O. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40* (12), 1260-1266.
145. Monti, D.; Ottolina, G.; Carrea, G.; Riva, S. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (1), 4111-4140.
146. Zelinski, T.; Kula, M. *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2* (1), 421-428.
147. Bradshaw, C.; Fu, H.; Shen, G.; Wong, C. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (5), 1526-1532.
148. Keinan, E.; Hafeli, E.; Seth, K.; Lamed, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (1), 162-169.
149. Soni, P.; Kansal, H.; Banerjee, U. *Process Biochem.* **2007**, *42* (12), 1632-1640.
150. Nie, Y.; Xu, J.; Yang, Y.; Mu, X. *Letts. Appl. Microbiol.* **2007**, *44* (5), 555-562.

151. Hanson, R. L.; Goldberg, S.; Goswami, A.; Tully, T. P.; Patel, R. N. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347* (7-8), 1073-1080.
152. Yang, Y.; Zhu, D.; Piegat, T. J.; Hua, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1799-1803.
153. Kaluzna, I. A.; Rozzell, J. D.; Kambourakis, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16* (22), 3682-3689.
154. Ziegelmann-Field, K.; Musa, M.; Zeikus, J. *Protein Eng. Des. Sel.* **2007**, *20* (2), 47-55.
155. Turner, N. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14* (2), 115-121.
156. Padhi, S. K.; Titu, D.; Pandian, N. G.; Chadha, A. *Tetrahedron* **2006**, *62* (21), 5133-5140.
157. Gruber, C. C.; Lavandera, I.; Faber, K.; Kroutil, W. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348* (14), 1789-1805.
158. Nakamura, K.; Inoue, Y.; Matsuda, T.; Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (35), 6263-6266.
159. Nakamura, K.; Fujii, M.; Ida, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 3147-3153.
160. Allan, G. R.; Carnell, A. J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (19), 6495-6497.
161. Graham, R. A.; Carnell, A. J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (19), 6495-6497.
162. Comasseto, J. V.; Helgueira Andrade, L.; Omori, A. T.; Fernandes Assis, L.; Meleiro Porto, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *29* (1-6), 55-61.
163. Comasseto, J. V.; Fernandes Assis, L.; Andrade, L. H.; Schoenlein-Crusius, I. H.; Meleiro Porto, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *39* (1-4), 24-30.
164. Fernandes Assis, L.; Kagohara, E.; Omori, A. T.; Comasseto, J. V.; Helgueira Andrade, L.; Meleiro Porto, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *45* (4), 415-419.
165. Takemoto, M.; Achiva, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6* (12), 2925-2928.
166. Demir, A.; Hamamci, H.; Sesenoglu, O.; Neslihanoglu, R.; Asikoglu, B.; Capanoglu, D. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6447-6449.
167. Nie, Y.; Xu, Y.; Quing Mu, X.; Tang, Y.; Jiang, J.; Hao Sun, Z. *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27* (1), 23-26.
168. Titu, D.; Chadha, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19* (14), 1698-1701.
169. Chadha, A.; Baskar, B. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13* (14), 1461-1464.
170. Chen, L.; Mantovani, S.; Oliveira, L.; Duarte, M.; Marsaioli, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54* (1-2), 50-54.
171. Goswami, A.; Mirfakhrae, K. D.; Patel, R. N. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10* (21), 4239-4244.

172. Kato, D.; Mitsuda, S.; Ohta, H. *Org. Lett.* **2002**, *4* (3), 371-373.
173. Nie, Y.; Xu, J.; Lv, T.; Xiao, R. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2009**, *84* (3), 468-472.
174. Matsumura, S.; Kawai, Y.; Takahashi, K.; Toshima, K. *Biotechnol. Lett.* **1994**, *16* (5), 485-490.
175. Hasegawa, J.; Ogura, M.; Tsuda, S.; Maemoto, S.; Kutsuki, H.; Ohashi, T. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 1819-1827.
176. Demir, A. S.; Hamamci, H.; Ayhan, P.; Duygu, N.; Cigdem Igdirdir, A.; Capanoglu, D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15* (16), 2579-2582.
177. Padhi, S. K.; Chadha, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16* (16), 2790-2798.
178. Xie, S. X.; Ogawa, J.; Shimizu, S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *52* (3), 327-331.
179. Voss, C.; Gruber, C.; Faber, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13969-13972.
180. Comasseto, J. V.; Omori, Á. T.; Andrade, L. H.; Porto, A. L. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14* (6), 711-715.
181. Otera, J.; Nishikido, J. *Reaction of alcohols with carboxylic acids and their derivatives In Esterification. Methods, Reactions, and Applications*; John Wiley & Sons, I. Ed.; Wiley-VCH, 2010; pp. 5-158.
182. Ghanem, A. *Tetrahedron* **2007**, *63* (8), 1721-1754.
183. Bornscheuer, U.; Kazlauskas, R. *Lipases and Esterases In Hydrolases in Organic Synthesis. Regio- and Stereoselective Biotransformations*; Wiley-Blackwell, 2006.
184. Anderson, E. M.; Larsson, K. M.; Kirk, O. *Biocatal. Biotransform.* **1998**, *16* (3), 181-204.
185. Uppenberg, J.; Ohrner, N.; Norin, M. *Biochemistry* **1995**, *34* (51), 16838-16851.
186. Kazlauskas, R.; Weissfloch, A.; Rappaport, A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (8), 2656-2665.
187. Cahn, R. S.; Ingold, C. K.; Prelog, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1966**, *5* (4), 385-415.
188. Cahn, R. S.; Ingold, C. K. *J. Chem. Soc.* **1951**, *1*, 612-622.
189. Gotor-Fernandez, V.; Brieva, R.; Gotor, V. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40* (3-4), 111-120.
190. Ema, T.; Sakai, T.; Miki, Y.; Nakatani, M.; Uneyama, K.; Utaka, M. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (29), 6311-6314.
191. Bidjou, C.; Aribi-Zouiouche, L. *J. Soc. Alger. Chim.* **1999**, *9* (1), 261-268.
192. Salazar, L.; Bermudez, C.; Ramirez, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10* (18), 3507-3514.
193. Patel, R. N.; Banerjee, A.; Nanduri, V.; Goswami, A.; Comezoglu, F. T. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2000**, *77* (10), 1015-1019.

194. Chojnacka, A.; Obara, R.; Wawrzenczyk, C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18* (1), 101-107.
195. Mc.Lafferty, F. *Anal. Chem.* **1959**, *31* (1), 82-87.
196. Chong, J. M. *Tetrahedron* **1989**, *45* (3), 623-628.
197. Nugent, W.; RajanBabu, T.; Burk, M. *Science* **1993**, *259* (5094), 479-483.
198. Lin, G. Q.; Li, Y. M.; Chan, A. *Principles and applications of asymmetric synthesis*: New York, 2001.
199. Arya, P.; Qin, H. *Tetrahedron* **2000**, *54*, 917-947.
200. Sharpless, B.; Finn, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (1), 113-126.
201. Sharpless, B.; Katsuki, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (18), 5974-5976.
202. Studer, M.; Blaser, H.; Exner, C. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345* (1-2), 45-65.
203. Baiker, A. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2000**, *163* (1-2), 205-220.
204. Roberts, S.; Turner, N.; Willetts, A. *Introduction to Biocatalysis using enzymes and microorganism*: New York, 1995.
205. Romano, F.; Russo, A. *Biocatalysis Research Progress*; Nova Science Publishers, Inc.: New York, 2008.
206. DiBattista, J.; Webster, F. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4* (3), 423-428.
207. Badia, D.; Vicario, J.; Dominguez, M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (12), 3754-3760.
208. Gil, S.; Parra, M.; Rodríguez, P.; Sotoca, E. *Synthesis* **2005**, *2005* (19), 3451-3455.
209. Razkin, J.; González, A.; Gil, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7* (12), 3479-3484.
210. Mateus, C.; Feltrin, M.; Coelho, F. *Tetrahedron* **2001**, *57* (32), 6901-6908.
211. Carey, F.; Sundberg, R. *Stereochemistry, conformation, and stereoselectivity* In *Advanced Organic Chemistry*; Springer: Virginia, 2007; pp. 119-240.
212. Pfenninger, A. *Synthesis* **1986**, 89-116.
213. Corey, E. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (6), 1693-1694.
214. Carey, F. *Enols and enolates* In *Organic Chemistry*; Hill, M. G. Ed.; McGraw-Hill Science: Virginia, 2001; pp. 701-726.
215. Carey, F.; Sundberg, R. *Reduction of Carbon-Carbon, Multiple Bonds, Carbonyl Groups, and other functional groups* In *Advanced Organic Chemistry*; Springer Science: New York, 2007; pp. 367-462.

216. Lin, G.-Q.; Li, Y.-M.; Chan, A. S. C. *Asymmetric Catalytic Hydrogenation and Other Reduction Reactions In Principles and Applications of Asymmetric Synthesis*; John Wiley & Sons, Inc, 2001.
217. Pini, D.; Mastantuono, A.; Salvadori, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5* (10), 1875-1876.
218. Mi, A.; Wang, Z.; Chen, Z.; Jiang, Y.; Chan, A.; Yang, T.-K. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6* (11), 2641-2642.
219. Noyori, R. *Homogeneous Asymmetric Hydrogenation In Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*; Wiley-Interscience, 1994; pp. 16-86.
220. Guo-qiang, L.; Li, Y. M.; Chan, A. *Asymmetric catalytic hydrogenation and other reduction reactions In Principles and applications of asymmetric synthesis*; Wiley-Interscience: New York, 2001; pp. 331-356.
221. Almeida, W.; Mateus, C.; Coelho, F. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*.
222. Henrick, C. A. *Tetrahedron* **1977**, *33* (15), 1845-1889.
223. Mori, K. *Molecules* **2005**, *10* (9), 1023-1047.
224. Mori, K. *Tetrahedron* **1989**, *45* (11), 3233-3298.
225. Mori, K. *Chem. Commun.* **1997**, *1997* (13), 1153-1158.
226. Mori, K. *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66* (10-11), 1991-1998.
227. Mori, K. *Chirality* **1998**, *10* (7), 578-586.
228. Aleu, J.; Bustillo, A. J.; Hernández-Galán, R. *Curr. Org. Chem.* **2007**, *11* (8), 693-705.
229. Hoegberg, H.-E.; Berglund, P.; Edlund, H.; Faegerhag, J.; Hedenstroem, E.; Lundh, M.; Nordin, O.; Servi, S.; Voerde, C. *Catal. Today* **1994**, *22* (3), 591-606.
230. Kalaitzakis, D.; Kambourakis, S.; Rozzell, J. D.; Smonou, I. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18* (20), 2418-2426.
231. Sugai, T.; Sakuma, D.; Kobayashi, N.; Ohta, H. *Tetrahedron* **1991**, *47* (35), 7237-7244.
232. Puntambekar, H.; Naik, D. *Synth. Commun.* **1998**, *28* (13), 2399-2406.
233. Hasegawa, J.; Hamaguchi, S.; Ogura, M.; Watanabe, K. *J. Ferment. Technol.* **1981**, *59* (4), 257-262.
234. Mori, K.; Ishikura, M. *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 1263-1265.
235. Matsumoto, K.; Tsutsumi, S.; Ihori, T.; Ohta, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (26), 9614-9619.
236. Kalaitzakis, D.; Rozzell, J. D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. *Org. Lett.* **2005**, *7* (22), 4799-4801.

237. Kalaitzakis, D.; Rozzell, J. D.; Smonou, I.; Kambourakis, S. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348* (14), 1958-1969.
238. Kalaitzakis, D.; Rozzell, J. D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006* (10), 2309-2313.

Objetivos y Metodología

3. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA

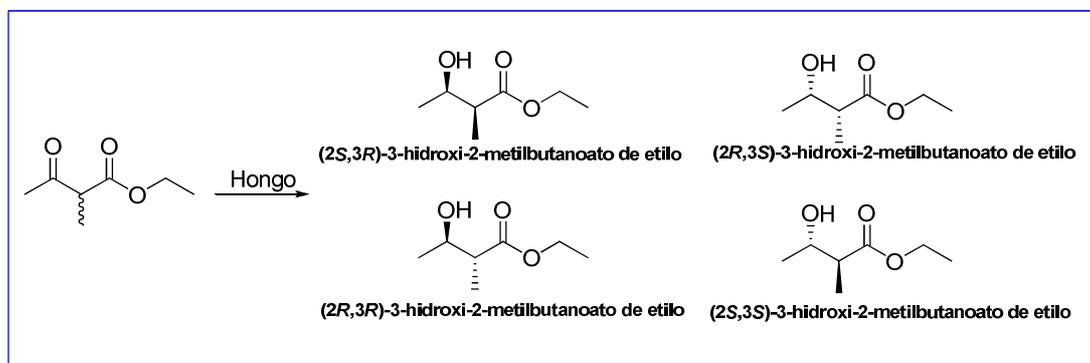
El objetivo de este trabajo de tesis es la búsqueda de metodologías quimioenzimáticas de aplicación en la síntesis de feromonas de agregación de coleópteros plagas. Para ello se plantean dos objetivos específicos y a la vez complementarios:

I. El primero de ellos es la búsqueda de una metodología adecuada para obtener enantioselectivamente un intermedio α -metil- β -hidroxiéster, precursor quiral en la síntesis de varias feromonas de coleópteros.

En esta primera etapa se plantea como metodología de trabajo la evaluación de dos procedimientos de biotransformación diferentes: reducción de β -cetoésteres proquirales (**Esquema 28**) y desracemización de β -hidroxiésteres mediante estereoinversión. En la evaluación de ambas biotransformaciones se trabajará con las técnicas de células en crecimiento (la biotransformación se realiza a la vez que ocurre el crecimiento del cultivo en un medio adecuado) y células en reposo (la biotransformación se realiza con células privadas de fuente de nutrientes, para evitar la división celular).

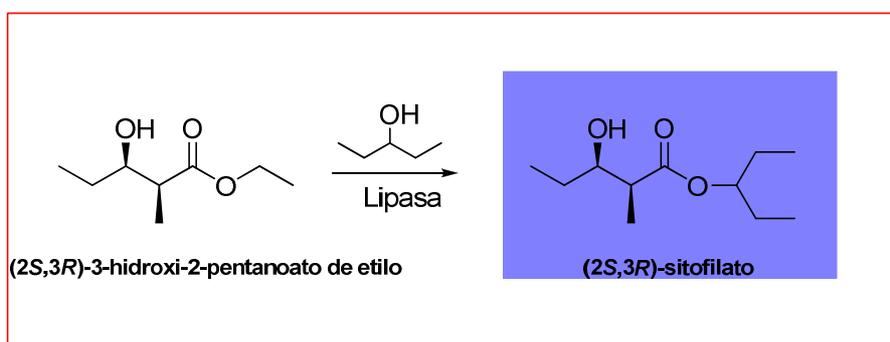
La evaluación de estas biotransformaciones irá asociada a la búsqueda de un biocatalizador que permita obtener los mejores resultados en cuanto a diastereo- y enantioselectividad. Para ello se trabajará con 15 cepas provenientes de la colección de hongos y levaduras del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biociencias (Facultad de Química, UDELAR).

Con el fin de minimizar los costos en la etapa de evaluación de los biocatalizadores, se trabajará con la molécula modelo (2-metil-3-oxobutanoato de etilo) como modelo de β -cetoéster- α -sustituido, para evaluar la enantioselectividad de las biotransformaciones, ya que es económicamente accesible.



Esquema 28. Reducción biocatalítica de 2-metil-3-oxobutanoato de etilo.

II. El cumplimiento de la etapa anterior da inicio al segundo objetivo específico, que es la síntesis de sitofilato, feromona de agregación de *Sitophilus granarius*, a partir del intermedio sintético enantioméricamente puro obtenido previamente. La ruta de síntesis será diseñada en función de la enantioselectividad de la etapa anterior, pudiendo limitarse, en el mejor de los casos, a una transesterificación con catalizada por lipasas (**Esquema 29**).



Esquema 29. Transesterificación catalizada por lipasas, de (2S,3R)-3-hidroxi-2-pentanoato de etilo con 3-propanol para la obtención del (2S,3R)-sitofilato.

Resultados y Discusión

4. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Este capítulo será dividido en dos partes, siendo la primera de ellas el estudio de metodologías enzimáticas y biocatalizadores para la preparación de precursores α -metil- β -hidroxiéster quirales, necesarios en la síntesis de feromonas sexuales de coleópteros; en la segunda parte se discutirán los resultados obtenidos en la síntesis de sitofilato, feromona de agregación de *Sitophilus granarius*, utilizando la técnica y biocatalizador seleccionados en la primera etapa, **Figura 14**.

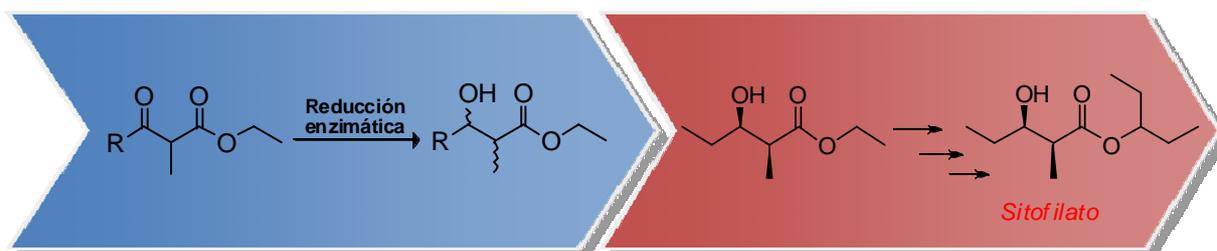


Figura 14. Esquema de trabajo de esta tesis para la síntesis de sitofilato.

1. Síntesis de precursores quirales de feromonas. Evaluación de biocatalizadores y metodologías

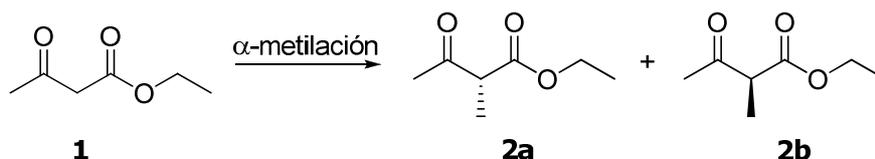
En esta primera etapa se realizó un screening de hongos y levaduras para la reducción de la molécula modelo 2-metil-3-oxobutanoato de etilo (**2**). Luego de seleccionar el biocatalizador más apropiado, se compararon los resultados obtenidos con respecto a otra metodología enzimática útil en la obtención de α -alquil- β -hidroxiésteres: la desracemización. La determinación del grado de avance de las biotransformaciones y su estereoselectividad se realizó mediante cromatografía gaseosa quiral (GC quiral). Por esta razón fue fundamental identificar cada uno de los estereoisómeros posibles y asignarles los tiempos de retención correspondientes.

1.1- Desarrollo de un procedimiento para el seguimiento de las biotransformaciones

En este punto se describe el trabajo realizado para obtener, identificar y asignar la estereoquímica de los cuatro posibles estereoisómeros a formarse en los dos procedimientos biocatalíticos evaluados. Los distintos estereoisómeros fueron obtenidos por reducción química del 2-metil-3-oxobutanoato de etilo (**2**), y asignados por comparación con productos de biotransformación ya descritos en la literatura.

1.1.1- Obtención de 3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (3)

El sustrato de las biotransformaciones es la mezcla racémica de 2-metil-3-oxobutanoato de etilo (**2a y 2b**), sintetizado a partir de 3-oxobutanoato de etilo (**1**). Se probaron distintas condiciones para la reacción de metilación de (**1**) las cuales se describen en la **Tabla 1** junto con los resultados obtenidos.



Esquema 30. Síntesis de 2-metil-3-oxobutanoato de etilo

Entrada	Condiciones de reacción	Rendimiento
1	EtOH/Na, MeI, reflujo	18%
2	K ₂ CO ₃ , DMF, Sulfato de dimetilo, reflujo	-----
3	Al ₂ O ₃ /EtONa, MeI	25%
4	K ₂ CO ₃ , MeI, Acetona, reflujo	95%

Tabla 1. Condiciones de metilación de (1).

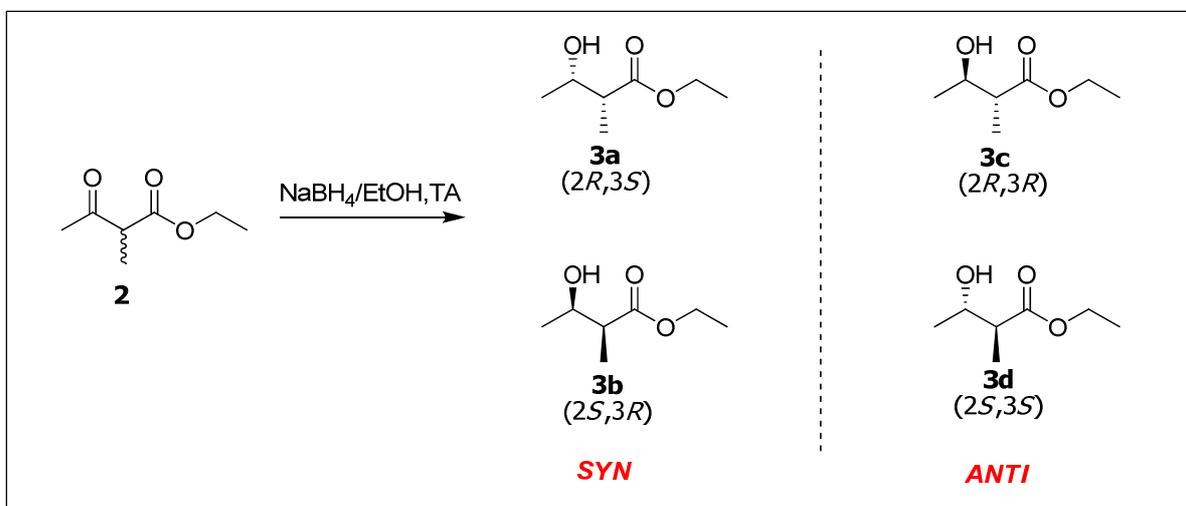
En las condiciones de la entrada 1 se observó la formación del compuesto dimetilado, por lo que se detuvo la reacción, obteniéndose (**2**) con bajo rendimiento. En contraposición, en la metilación utilizando carbonato de potasio en acetona anhidra (entrada 4), se obtuvo únicamente la mezcla racémica (**2**) con un rendimiento de 95%.

En la síntesis en fase sólida, sin disolvente, en donde la alúmina fue activada con etóxido de sodio, (entrada 3) se obtuvo mejor rendimiento que utilizando la misma base en solución. Sin embargo, la formación de los enantiómeros (**2a y 2b**) fue en menor proporción que en las condiciones de la entrada 4.

En el espectro de ¹H-RMN del compuesto (**2**), descrito en la Parte Experimental, se observa la presencia de un cuarteto a $\delta = 3.33$ ppm correspondiente al protón metínico (CH) y un doblete a $\delta = 1.10$ ppm correspondiente a los protones metílicos del grupo metilo en posición α .

Para la obtención de los cuatro estereoisómeros posibles de 3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo, se llevó a cabo la reducción de la mezcla racémica de (**2**) con borohidruro de sodio. La mezcla de los 4 estereoisómeros se resolvió por GC quiral y los tiempos de retención de cada estereoisómero fueron asignados por comparación con datos de literatura.¹⁻³

Como se observa en el **Esquema 31**, la reducción de la cetona da lugar a la formación de dos pares de diastereómeros (*syn* y *anti*), con sus respectivos enantiómeros.



Esquema 31. Reducción química de la mezcla racémica (2).

La disposición espacial de los grupos funcionales en los estereoisómeros *syn* y *anti* puede visualizarse mediante las proyecciones de Newmann, **Figura 15**. De la evaluación de las posibles interacciones entre los distintos sustituyentes, surge que los conformeros más estables para los compuestos *syn* sean aquellos donde existe la formación de un enlace de hidrógeno entre el grupo hidroxilo y el grupo éster, y donde se genere menor impedimento estérico. En esta conformación, el ángulo de solapamiento entre el protón del grupo metínico y el protón carbinol sería aproximadamente de 50-60°, lo que hace prever que la constante de acoplamiento en el espectro de ¹H-RMN esté en el entorno de 4 Hz. Este mismo razonamiento se plantea para los estereoisómeros de configuración relativa *anti*, en donde se esperaría que en el conformero más estable (menor impedimento estérico entre los sustituyentes y formación de un enlace de hidrogeno) tuviese un ángulo de solapamiento entre el protón del grupo metínico y el protón carbinol de 180° aproximadamente, equivalente a una constante de acoplamiento en el espectro de ¹H-RMN de 7 Hz.

1. Conformación *syn*2. Conformación *anti*

Figura 15. Proyecciones de Newman para los estereoisómeros *syn* y *anti* de 3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (**3**).

En el espectro de ^1H -RMN de (**3**), Figura 16, se observan constantes de acoplamiento de 4.0 y 6.5 Hz correspondientes al acoplamiento entre el protón metínico y el carbinol. Más adelante será verificado que los mismos corresponden a los estereoisómeros *syn* y *anti* respectivamente.

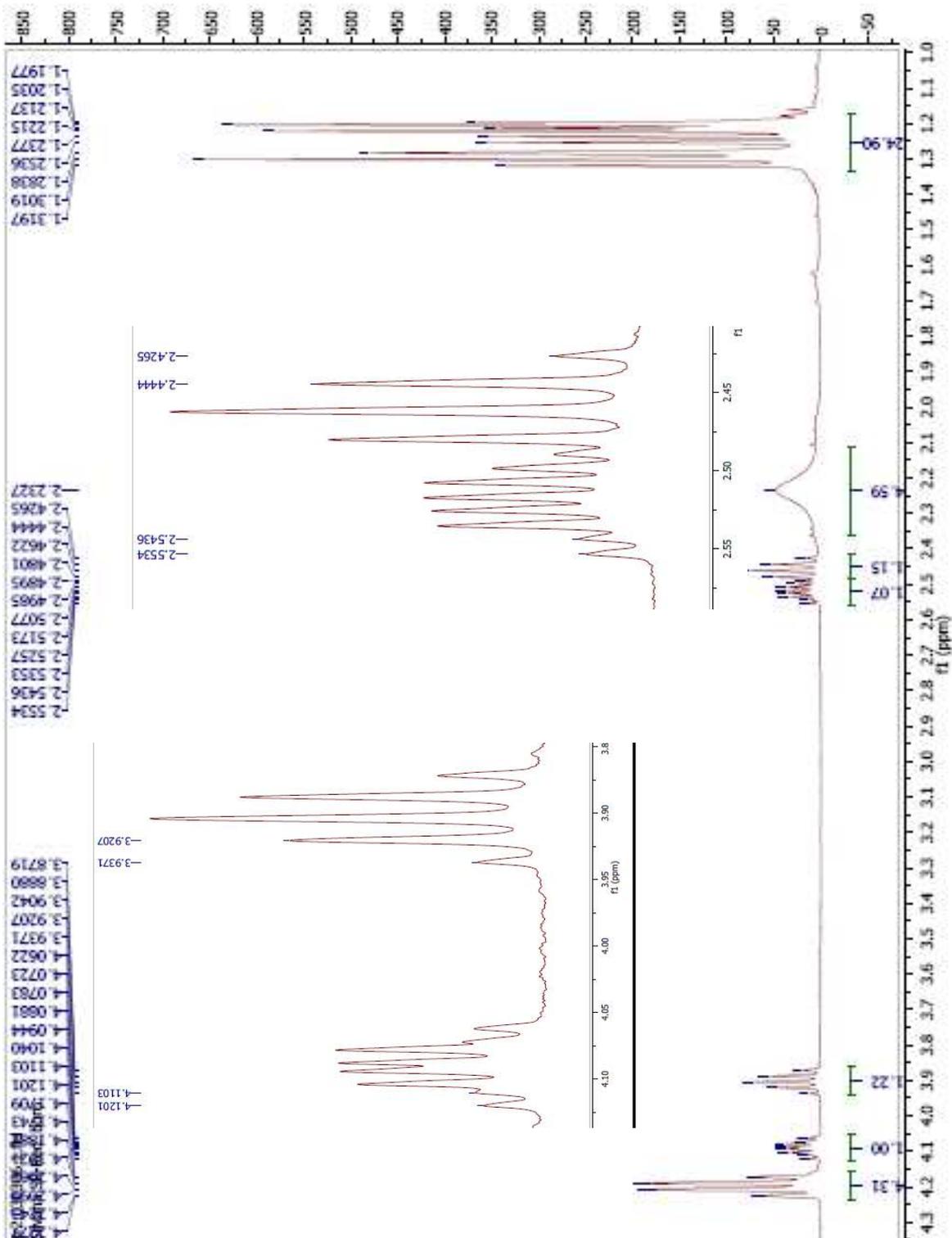


Figura 16. Espectro de ¹H-RMN del 3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo.

Los 4 estereoisómeros obtenidos en la reducción de **(2)** pueden resolverse mediante GC quiral, **Figura 17**. Se utilizaron los Programas 1 y 2 (se describen los parámetros de cada programa en la Parte Experimental) con resoluciones similares pero tiempos de duración diferentes. Durante el transcurso de este capítulo se hará mención al programa cromatográfico utilizado en cada uno de los resultados obtenidos.

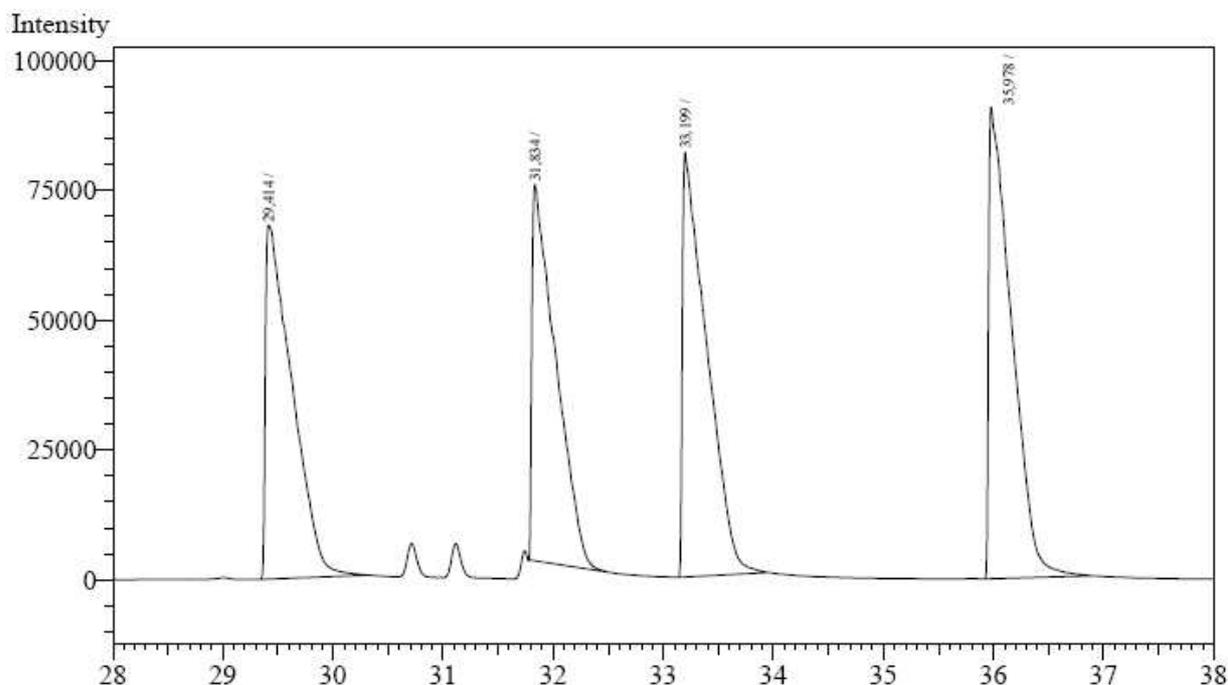


Figura 17. Cromatografía gaseosa quiral de la mezcla racémica 3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (**3**) mediante Programa 1.

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit Mark ID#	Cmpd Name	Area%
1	29,414	1146290	68082	0,000			23,9032
2	31,834	1083605	72422	0,000			22,5960
3	33,199	1251229	81590	0,000			26,0914
4	35,978	1314429	90823	0,000			27,4093
Total		4795553	312917				100,0000

Tabla 2. Tiempos de retención y áreas en GC quiral del producto **3** mediante Programa 1.

En los cromatogramas se observa la resolución de los 4 estereoisómeros, que corresponden a los 2 pares de diastereómeros (*syn* y *anti*) y sus correspondientes enantiómeros. Dada la característica diastereo- pero no enantioselectiva de la reducción química con borohidruro de sodio,⁴ podemos asignar el par de enantiómeros a aquellos picos con áreas similares, **Tabla 2**.

A continuación se describen los ensayos realizados a los efectos de identificar cada uno de los estereoisómeros.

1.1.2-Asignación del (2R,3S)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (**3a**)

De acuerdo al procedimiento descrito en el trabajo de Stewart *et al.*,¹ se obtuvo el esteroisómero (**3a**) con un exceso diastereo- y enantiomérico mayor a 99%, a través de la utilización de una *Escherichia coli* JM105 recombinante (expresando una aldo-cetoreductasa, Gcy1p).

De esta manera se pudo determinar el tiempo de retención del esteroisómero (**3a**), que corresponde a 29.67 minutos en las condiciones cromatograficas del Programa 1, (**Figura 18**) Las señales no resueltas a 26 minutos corresponden a la mezcla racémica (**2**) dado que la reacción no se completa (conversión 55%).

A partir de esto, se asignó el pico correspondiente al enantiómero (2R,3S).

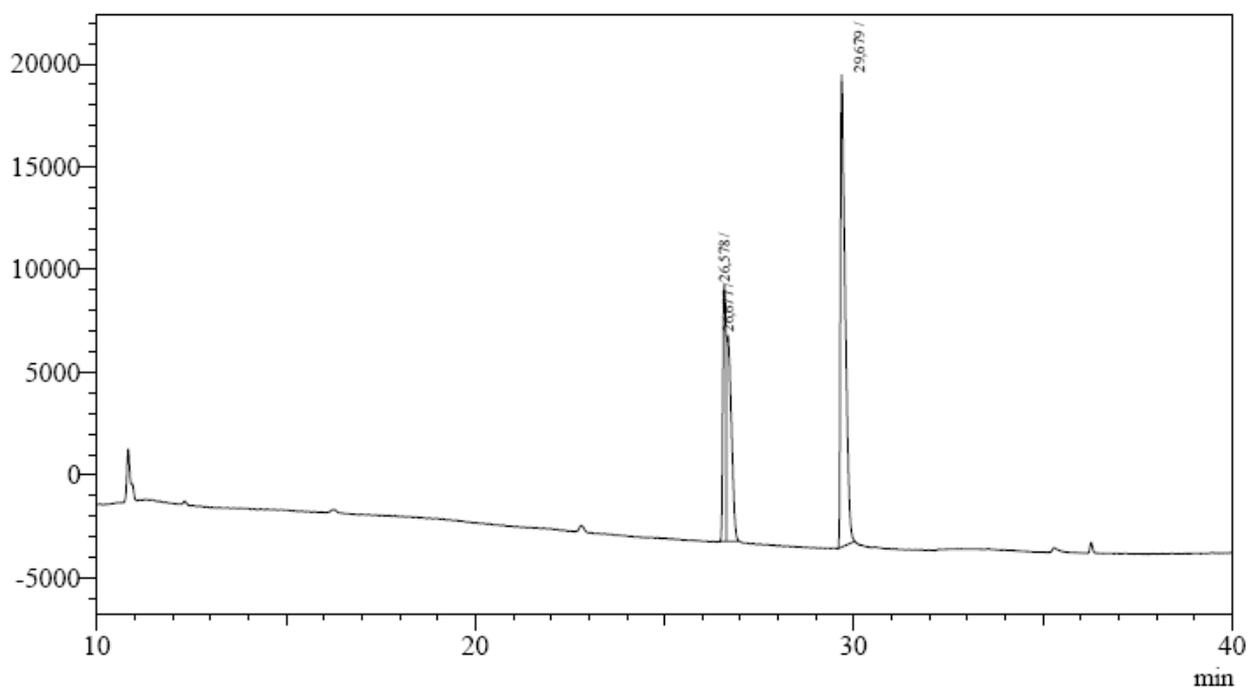


Figura 18. Biotransformación de (**2**) con *E. coli* JM105.

1.1.3-Asignación del (2S,3S)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (**3d**)

A través del procedimiento descrito por Rodríguez *et al.*,² fue posible obtener el esteroisómero (**3d**) como producto mayoritario utilizando la cepa de *Escherichia coli* recombinante BL21 (DE3) Δ yqhE (pPPP4). Como se puede observar en el cromatograma obtenido en las condiciones del Programa 1 (**Figura 19**), la biotransformación no fue tan eficiente en cuanto a la diastereo- y enantioselectividad como la obtenida con *E. coli* JM105. Sin embargo es posible identificar y asignar el tiempo de retención de 36.17 minutos correspondiente a (2S,3S)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo.

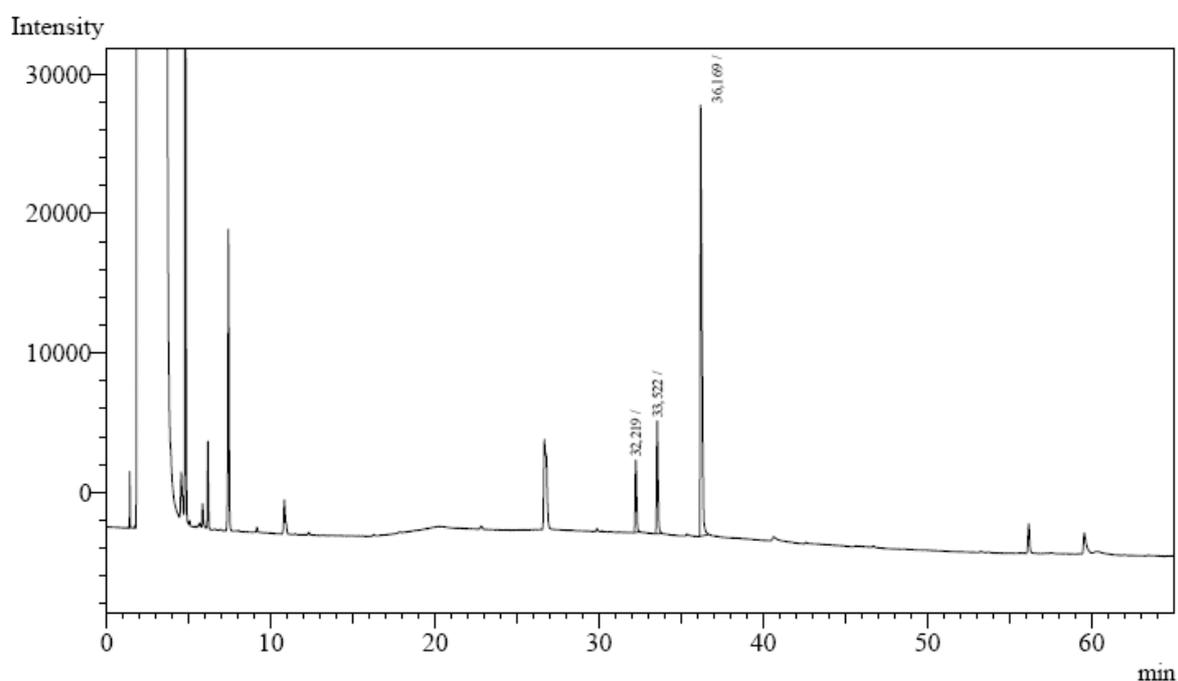
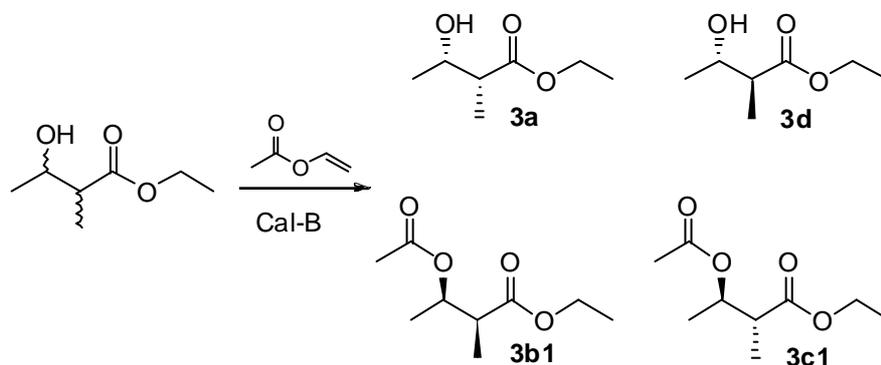


Figura 19. Biotransformación de (**2**) con *E. coli* BL21 (DE3) Δ yqhE (pPPP4).

1.1.4-Asignación de los esteroisómeros (**3b**) y (**3c**)

La asignación de los esteroisómeros (2S,3R)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (**3b**) y (2R,3R)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (**3c**) fue realizada por medio de la transesterificación estereoselectiva de la mezcla racémica (**3**) con acetato de vinilo y la lipasa B de *Candida Antártica* (Cal B, Novozym 435) como biocatalizador, **Esquema 32**.

De acuerdo a lo descrito en el capítulo de antecedentes, la regla de Kazlauskas permite predecir que enantiómero reaccionará más rápido en la acilación de alcoholes secundarios de mezclas racémicas.³ Esta regla nos permitió identificar a (**3b**) y (**3c**), esteroisómeros de configuración absoluta (R) en el carbono 3, como los sustratos de preferencia de la enzima. La asignación individual fue realizada tomando en cuenta los puntos anteriores 1.1.2 al 1.1.4.



Esquema 32. Acetilación de la mezcla racémica (3) con Cal B.

Los tiempos de retención asignados a los productos (3b) y (3c) son 31.93 y 33.26 minutos respectivamente, de acuerdo a las condiciones cromatográficas utilizadas Programa 1, **Figura 20**.

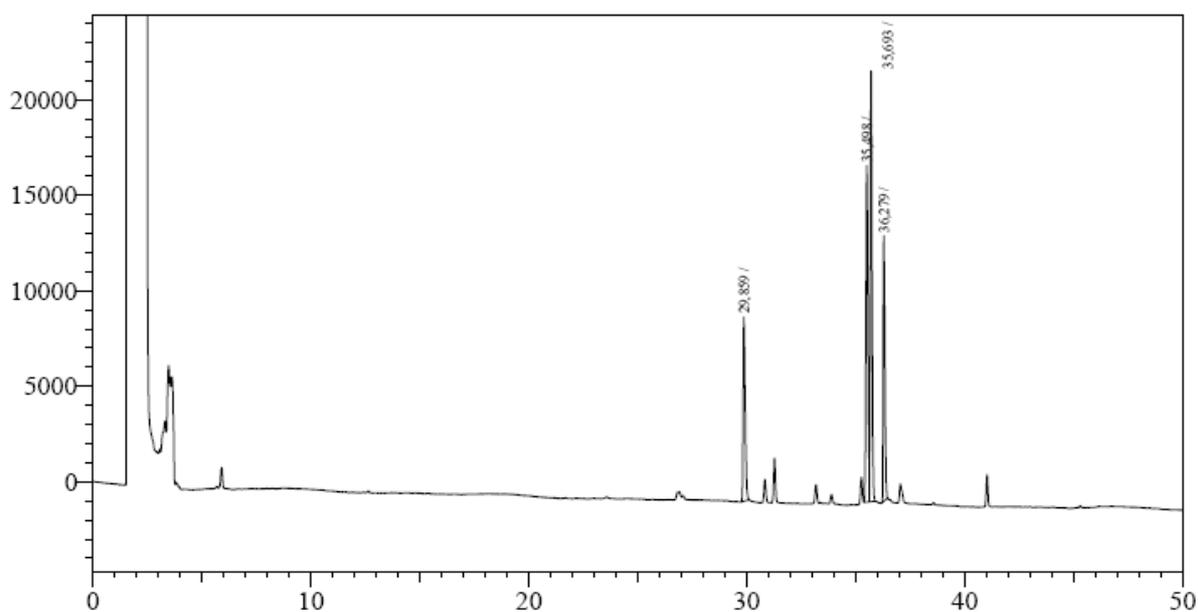


Figura 20. Acetilación de la mezcla racémica (3) con Cal B.

1.1.5-Asignación de los 4 esteroisómeros de 3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo

De acuerdo a los puntos anteriores se asignaron cada uno de los 4 esteroisómeros producto de la reducción química de 2-metil-3-oxobutanoato de etilo (2). A continuación se presenta el cromatograma correspondientes al Programa 1, **Figura 21**.

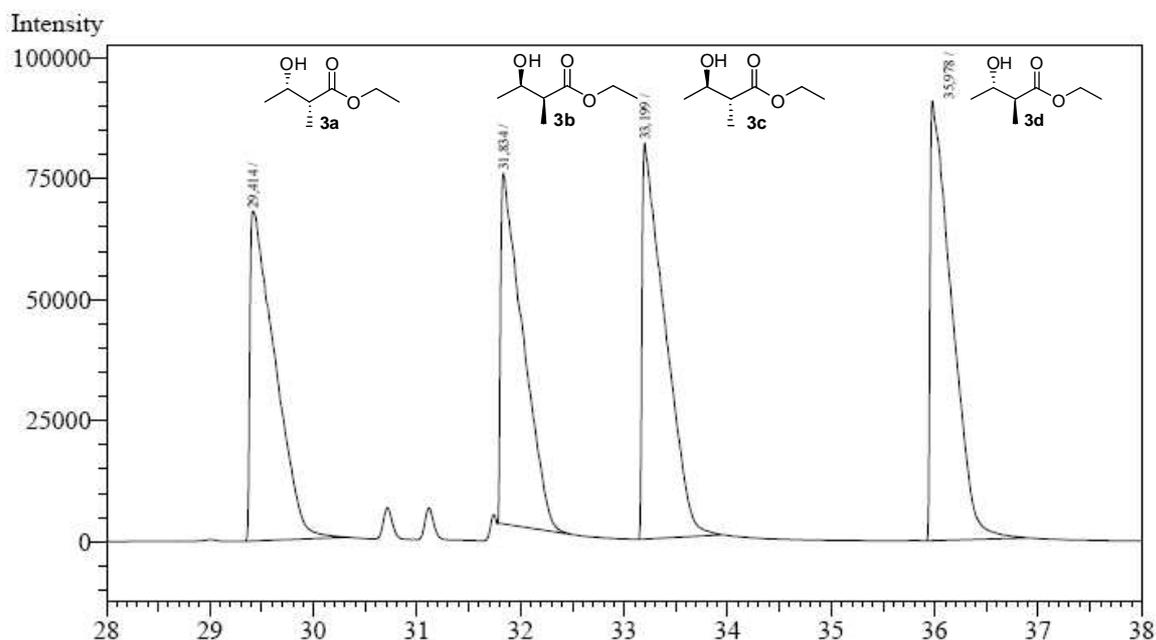
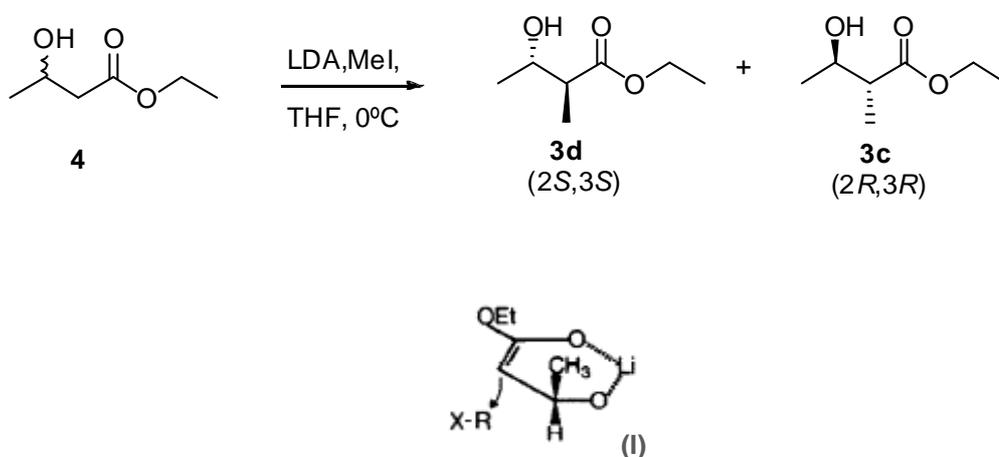


Figura 21. Cromatograma Programa 1 mezcla (3).

Esta asignación fue confirmada al realizar la α -metilación estereoselectiva de 3-hidroxi-butanoato de etilo (**4**) según el procedimiento de Fráter.⁵ La estereoselectividad de esta reacción se debe a la formación de una estructura cíclica rígida a través de la quelación con el catión Li (**I**), lo cual dirige la incorporación del grupo metilo de forma *anti* al grupo hidroxilo (menor impedimento estérico), **Esquema 33**. La reacción de α -metilación fue realizada a partir de la mezcla racémica (**4**) por lo que se obtuvieron ambos enantiómeros *anti* (**3d**) y (**3c**).



Esquema 33. α -metilación de 3-hidroxi-butanoato de etilo (**4**).

1.2- Screening de hongos y levaduras

Como se describió en el capítulo de antecedentes, existen en la actualidad alternativas enzimáticas a algunas reacciones de química orgánica convencional. En esta tesis se plantea la utilización de biotransformaciones en reacciones de reducción y desracemización, para la obtención estereoselectiva de α -metil- β -hidroxiésteres.

La reducción asimétrica de cetonas proquirales, así como la desracemización de alcoholes puede ser llevada a cabo por varios sistemas biocatalíticos, en esta tesis se realizó el screening de varias cepas de hongos y levaduras pertenecientes al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biociencias (Facultad de Química, UDELAR).

1.2.1-Reducciones

Las biotransformaciones con células enteras pueden ser llevadas a cabo mediante dos procedimientos: células en crecimiento y células en reposo (resting cells).

1.2.1.1-Células en crecimiento

Este procedimiento se basa en realizar la biotransformación en un medio adecuado que permita el crecimiento del microorganismo. Todas las operaciones fueron realizadas mediante manipulación aséptica y los detalles experimentales se encuentran descritos en el capítulo Parte experimental.

Se evaluó la capacidad reductora de 15 cepas de hongos y levaduras, pertenecientes a los filos Basidiomycota, Ascomycota y Zygomycota sobre la mezcla racémica de **(2)**. Las biotransformaciones fueron monitoreadas a 24, 48, 72 y 96 horas, presentándose en la **Tabla 3** los resultados al menor tiempo en el que se obtuvieron los mayores valores de conversión.⁶

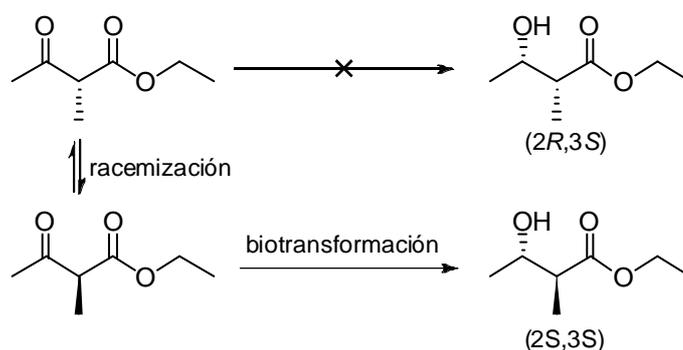
Entrada	Cepa	Tiempo (h)	Conversión (%)	syn/anti	ee (%) syn (2R,3S)	ee (%) anti (2S,3S)
1	<i>Penicillium expansum</i> (CCM P17)	96	91	12/88	90	94
2	<i>Aureobasidium pullulans</i> (CCM H1)	24	100	3/97	>99	94
3	<i>Penicillium italicum</i> (CCM L7)	72	82	30/70	64	84
4	<i>Aspergillus ochraceus</i> (CCM H22)	96	93	13/87	>99	96
5	<i>Fusarium graminearum</i> (CCM H224)	24	95	6/94	86	96
6	<i>Aspergillus terreus</i> (BFQU 121)	48	100	29/71	>99	>99
7	<i>Geotrichum candidum</i> (CCM H38)	96	96	10/90	>99	97
8	<i>Trichoderma koningii</i> (ATCC 76666)	96	100	7/93	60	96
9	<i>Botrytis cinerea</i> (CCM P18)	0	0	0	0	0
10	<i>Alternaria sp.</i> (CCM A3)	48	93	27/73	>99	97
11	<i>Trichoderma artroviride</i> (CCM M2)	24	100	25/75	98	96
12	<i>Rhizopus sp.</i> (CCM H43)	72	46	11/89	93	97
13	<i>Aspergillus niger</i> (CCM H21)	96	100	8/92	>99	96
14	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (CCM B4)	96	53	70/30	>99	96
15	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (NRRL Y-8281)	24	100	19/81	>99	97

Tabla 3. Reducción de (2) mediante biotransformación con células en crecimiento.

Si bien los valores de conversión (consumo de la mezcla **2**) fueron en la mayoría de los casos cercanos a 100%, los rendimientos en la obtención del producto fueron aproximadamente 50%. Al inicio suponíamos que este problema estaba relacionado con el procedimiento de extracción, el cual era laborioso por la emulsión formada. Sin embargo, los cambios en el procedimiento (aumento en el número de extracciones, centrifugado de las células previo a la extracción, filtrado con celite, etc.) no mejoraron los resultados obtenidos. Por lo tanto, podríamos suponer que este bajo rendimiento se debe a la degradación del sustrato y/o productos en compuestos más polares los cuales no son extraídos del medio de reacción.

El objetivo en este screening primario fue encontrar un microorganismo capaz de reducir estereoselectivamente 2-metil-3-oxobutanoato de etilo al esteroisómero (**3b**). La formación de (**3b**) significaría que la/s enzima/s responsable/s de la reducción del grupo cetona presenta una actividad del tipo *anti*-Prelog, siendo este comportamiento minoritario dentro de las deshidrogenasas.⁷ Sin embargo, contrario a lo buscado, y confirmando el comportamiento general de estas enzimas, en todas las especies estudiadas la reducción fue de tipo Prelog, obteniéndose la configuración absoluta (*S*) en el carbono 3.

En vista de que la biotransformación genera un exceso diastereomérico como resultado final y que el sustrato de la biotransformación es una mezcla racémica de 2-metil-3-oxobutanoato de etilo, es claro que existe en el medio de la biotransformación un equilibrio ceto-enol que permite convertir el isómero (*R*) en el (*S*). De esta forma, es posible obtener una conversión de 100% y uno solo de los 4 isómeros posibles, **Esquema 34**. Esta tautomerización en el medio de la biotransformación se confirmaría más adelante para 2-metil-3-oxopentanoato de etilo.



Esquema 34. Reducción del compuesto (**2**).

En el caso de la cepa ATCC 76666 *Trichoderma koningii* (entrada 8) el resultado obtenido es contrario a lo descrito por Iwamoto,⁸ en que el isómero *syn*-(2*S*,3*R*) es mayoritario, la relación *anti:syn* es 28:72 y se obtiene un exceso enantiomérico mayor a 99%.

Si bien el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* posee antecedentes en cuanto a la hidroxilación de monoterpenos,⁹ reducción de cetoésteres en compuestos acetilénicos derivados de furano,¹⁰ reducción de 4-etilciclohexanona y acetofenona,¹¹ e hidroxilación de flavonas,¹² en muchos casos debido a su capacidad de detoxificación, no mostró actividad en la reducción de **(2)**. Cabe destacar que la ausencia de actividad sobre este tipo de sustrato también fue descrita para la reacción inversa (oxidación).¹³ En 1970 Fukuda *et al.*,¹³ estudiaron la oxidación de alcoholes alifáticos, aromáticos e insaturados, con *B. cinerea*, observando que los alcoholes alifáticos primarios y secundarios estudiados no reaccionaban.

Dentro de las especies estudiadas, *Phanerochaete chrysosporium* fue con la única cepa con que se obtuvieron los isómeros *syn* en forma mayoritaria, y en particular, el enantiómero (2*R*,3*S*).

P. chrysosporium ha sido estudiado en detalle por su capacidad de catalizar la depolimerización oxidativa de lignina a través de ligninasas extracelulares.^{14,15} A raíz de su capacidad de romper la estructura tridimensional de la lignina, se han estudiado otras enzimas como son las deshidrogenasas, que colaborarían en esta actividad al reducir los productos secundarios generados en la oxidación del polímero pudiendo inhibir a las peroxidasas responsables de la oxidación.

En 1991 Muheim *et al.* purificaron y caracterizaron la arilalcohol deshidrogenasa intracelular dependiente de NADPH del *P. chrysosporium*, que reduce varios metabolitos secundarios tales como veratraldehído, *p*-anisaldehído, vainillina y 3,5-dimetoxibenzaldehído.¹⁶

No se encontraron antecedentes en cuanto a la utilización de esta especie en reducciones de alcoholes alifáticos.

Con *Aureobasidium pullulans* (CCM H1) se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a tiempo, conversión y excesos diastereo- y enantioméricos, obteniéndose mayoritariamente el estereoisómero de configuración (2*S*,3*S*). Este microorganismo cuenta con antecedentes en la reducción de varios tipos de sustratos,¹⁷⁻¹⁹ incluyendo β -cetoésteres.²⁰

1.2.1.2- Células en reposo:

En este procedimiento, a diferencia de la técnica de células en crecimiento, la biotransformación se llevó a cabo en agua estéril sin nutrientes, lo que impide el crecimiento de los microorganismos y

por lo tanto el desarrollo de reacciones secundarias debidas a sus rutas metabólicas. Todas las operaciones fueron realizadas manipulando mediante técnica aséptica y los detalles experimentales se describen en el capítulo correspondiente.

Utilizando las especies *A. terreus*, *P. chrysosporium*, *Rhizopus sp.* y *T. koningii* se realizó una evaluación preliminar de la capacidad de reducción de los filos Basidiomycota, Ascomycota y Zygomycota mediante la técnica de resting cells (células en reposo).

Entrada	Cepa	Tiempo (h)	Conversión (%)	<i>syn/anti</i>	<i>ee (%) syn (2R,3S)</i>	<i>ee (%) anti (2S,3S)</i>
1	<i>Aspergillus terreus</i> (BFQU 121)	48	100	30/70	>99	>99
2	<i>Trichoderma koningii</i> (ATCC 76666)	96	92	25/75	>99	>99
3	<i>Rhizopus sp.</i> (CCM H43)	96	6	20/80	80	95
4	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (CCM B4)	96	3	52/48	50	>99

Tabla 4. Reducción de (2) mediante biotransformación con células en reposo (resting cells).

En los resultados obtenidos, **Tabla 4**, se observó que las cuatro especies estudiadas no mostraron mejores resultados que con las células en crecimiento. En primer lugar, los valores de conversión siguen la misma tendencia que en la técnica anterior, siendo las entradas 3 y 4 los niveles de conversión más bajos. A su vez, dichos valores no superan el 10%, a diferencia de lo encontrado con el procedimiento de células en crecimiento. Esto hace pensar que quizás en estas cepas el sustrato **(2)** induce la formación de la deshidrogenasa durante el crecimiento de las células, tal como fuese descrito para algunas especies de bacterias y hongos,^{21,22} no ocurriendo lo mismo en la técnica de resting cells.

En las 4 especies estudiadas se observan valores de diastereoselectividad más bajos que lo obtenido con células en crecimiento, **Tabla 4**. Asimismo, existe una preferencia hacia la formación de los enantiómeros *anti* para las entradas 1 a 3. En el caso del *Phanerochaete chrysosporium* no existe diastereoselectividad hacia la formación del par *syn*. Asimismo, se observó una elevada disminución en el exceso enantiomérico de este par de enantiómeros.

Los excesos enantioméricos de las biotransformaciones llevadas a cabo con el resto de las especies estudiadas fueron similares a los obtenidos con el procedimiento de células en crecimiento.

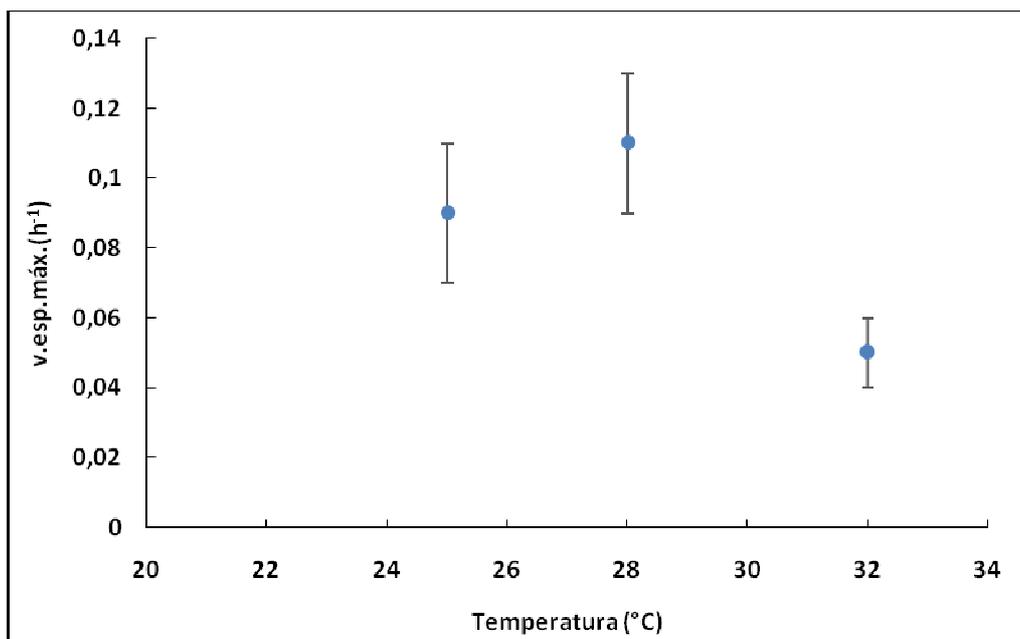
Debido a que los resultados obtenidos en esta evaluación preliminar no fueron positivos, comparados con el procedimiento de células en crecimiento, no se continuó trabajando con esta técnica.

1.2.1.3- Determinación de la temperatura óptima de cultivo de la cepa seleccionada como biocatalizador

Para determinar la temperatura óptima de cultivo para la cepa seleccionada en el screening preliminar, se realizaron los experimentos a 25, 28 y 32 °C.

En la **Gráfica 1**, se exhiben las velocidades máximas a cada temperatura, determinada según el procedimiento descrito en la Parte experimental, para el biocatalizador seleccionado en el punto 1.2.1.1, *A. pullulans*.

Se puede observar que las velocidades de crecimiento a las temperaturas de 25 y 28° C no presentan diferencias significativas, mientras que a 32 °C la velocidad específica máxima es mucho menor. Esta similitud en el crecimiento a las temperaturas de 25 y 28 °C nos permite trabajar indistintamente sin variar la tasa de crecimiento.



Gráfica 1. Curva de temperatura óptima.

1.2.1.4- Escalado de la producción de biomasa de la cepa seleccionada como biocatalizador

Con el fin de obtener un mayor volumen de producto final se decidió realizar el ensayo a mayor escala utilizando células en crecimiento de la cepa que dio mejores resultados, *A. pullulans*.

En los resultados obtenidos, **Tabla 5**, no se observa una diferencia en la concentración de biomasa final generada en el escalado de la biotransformación con *A. pullulans*. Esto sugiere, que las diferencias en la relación medio/volumen del erlenmeyer no modifica la disponibilidad de oxígeno para este aerobio estricto, y que las diferentes condiciones (temperatura y rpm) no modifican la biomasa final.

Condiciones ensayadas	Valor promedio obtenido
Matraz de 100 mL, 25 mL de medio de cultivo, 25 °C, 100 rpm	(6.5 ± 0.3) g/L
Matraz 1L, 500 mL de medio de cultivo, 28 °C, 150 rpm	(6.4 ± 0.3) g/L

Tabla 5. Resultados del escalado de la producción de biomasa a distintas condiciones.

1.2.1.5- Escalado de la reducción con *A. pullulans*

Se realizó el procedimiento de células en crecimiento, de acuerdo a lo descrito en el capítulo Parte experimental para la reducción de 1 g de la mezcla racémica **(2)**. Los valores de conversión y de excesos enantio- y diastereoméricos fueron similares a los obtenidos en la biotransformación con 50 mg de sustrato.

1.2.2- Desracemizaciones

El procedimiento se realizó en un medio sin nutrientes (agua estéril) y como sustrato se utilizó la mezcla de los 4 estereoisómeros **(3)**. Todas las operaciones fueron realizadas mediante manipulación aséptica y los detalles experimentales se describen en el capítulo Parte experimental. Se realizó el screening sobre ocho cepas de hongos y levaduras, y los resultados se presentan en la **Tabla 6**, indicando el porcentaje de cada uno de los isómeros presentes en la mezcla racémica de **(3)** al inicio de la biotransformación.

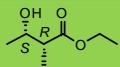
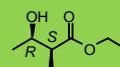
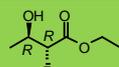
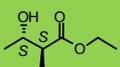
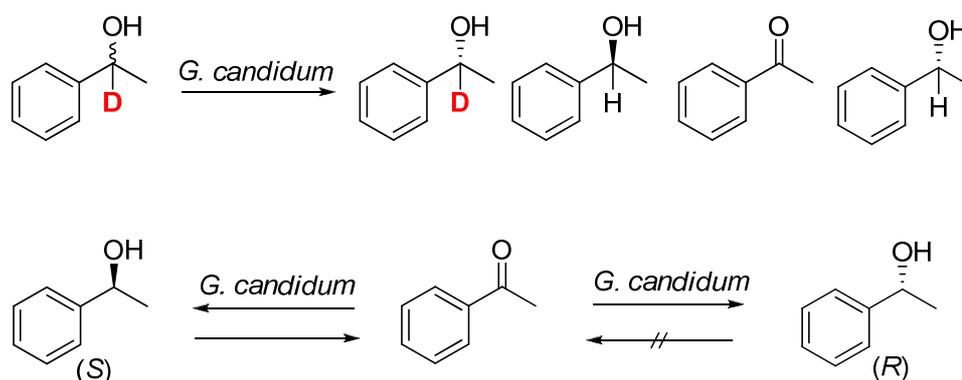
Entrada	Cepa	Tiempo (h)	 (%)	 (%)	 (%)	 (%)
	Reducción con NaBH ₄	---	24	23	26	27
1	<i>Geotrichum candidum</i> (CCM H38)	72	0	22	31	47
2	<i>Penicillium italicum</i> (CCM L7)	24	20	26	27	27
3	<i>Aspergillus terreus</i> (BFQU 121)	168	22	44	18	16
4	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (NRRL Y-8281)	120	22	22	23	23
5	<i>Aspergillus ochraceus</i> (CCM H22)	48	22	22	26	30
6	<i>Aureobasidium pullulans</i> (CCM H1)	72	25	21	27	27
7	<i>Trichoderma koningii</i> (ATCC 76666)	72	22	24	23	31
8	<i>Rhizopus sp.</i> (CCM H43)	72	23	25	24	28

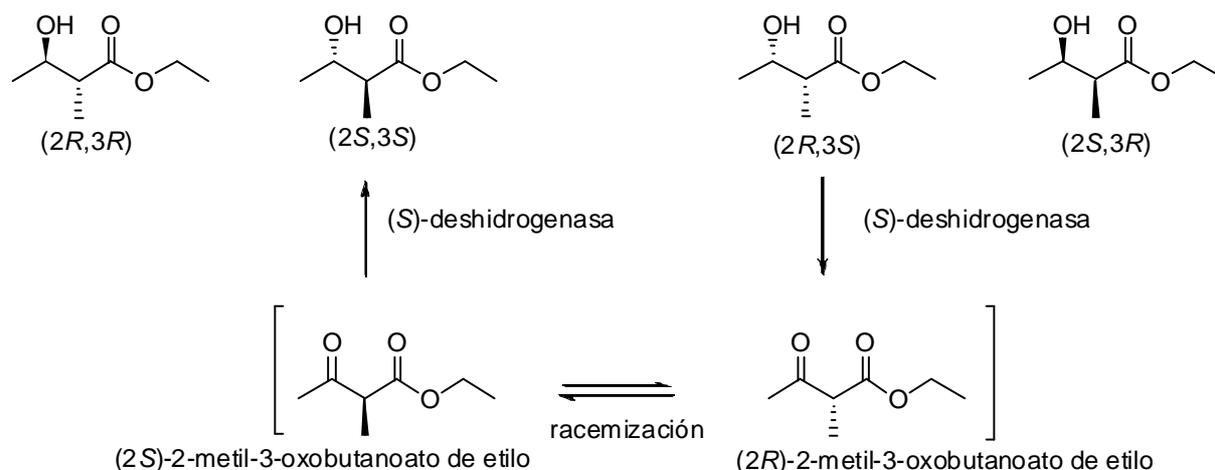
Tabla 6. Desracemización de la mezcla racémica (3).

De acuerdo a datos de literatura,^{23,24} con *Geotrichum candidum* es posible cambiar la composición de una mezcla racémica inicial de compuestos del tipo ariletanol e hidroxieésteres hacia una mayor formación de los estereoisómeros (*R*). Nakamura, K., *et al.*, explicaron el mecanismo de esta biotransformación a través de las diferencias de selectividades de las enzimas responsables en realizar la oxidación de los alcoholes y posteriormente su reducción, **Esquema 35**. En su trabajo confirmaron esta teoría al estudiar el comportamiento del compuesto 1-D-feniletanol por ¹H-RMN. Se observó que el contenido de deuterio en la mezcla racémica del 1-D-feniletanol descendía 50% pasadas las 24 h de reacción, lo cual hacía suponer que el protón metínico del estereoisómero (*R*) generado en la reacción no provenía del estereoisómero (*S*) sino de la oxidación y reducción del compuesto carbonílico. Una deshidrogenasa es la responsable en reducir la arilcetona y obtener el (*S*)-alcohol, mientras que otra deshidrogenasa produce el (*R*)-alcohol. La capacidad de la primera enzima en llevar a cabo la reacción inversa frente a la baja actividad de la segunda enzima en la oxidación desplaza la biotransformación hacia la formación del isómero (*R*), **Esquema 35**.



Esquema 35. Desracemización del 1-D-feniletanol.

Los resultados obtenidos con las reacciones de desracemización confirmaron la actividad del *G. candidum*, siendo la única especie estudiada capaz de conseguir una mayor formación de uno de los estereoisómeros a costa del consumo del isómero (2*R*,3*S*). Sin embargo, el isómero enriquecido corresponde al (2*S*,3*S*). Este resultado, y el trabajo de Nakamura, K., *et al.*,²⁵ explicado en el párrafo anterior, nos permitieron desarrollar como hipótesis el mecanismo planteado en el **Esquema 36**. El mismo involucra la oxidación selectiva del isómero (2*R*,3*S*), formando el β-cetoéster correspondiente, ocurriendo en el proceso de la biotransformación un tautomerismo ceto-enólico que tiene como resultado la racemización del carbono en la posición 2. Una mayor selectividad o velocidad de la enzima involucrada en la reducción del 2(*S*)-2-metil-3-oxobutanoato de etilo (comparado con el (2*R*)-2-metil-3-oxobutanoato de etilo) y un comportamiento tipo Prelog reflejarían los resultados obtenidos. Estas reacciones biocatalíticas en tándem ocurren simultáneamente en un único paso, dificultando así el aislamiento de la cetona intermedia.



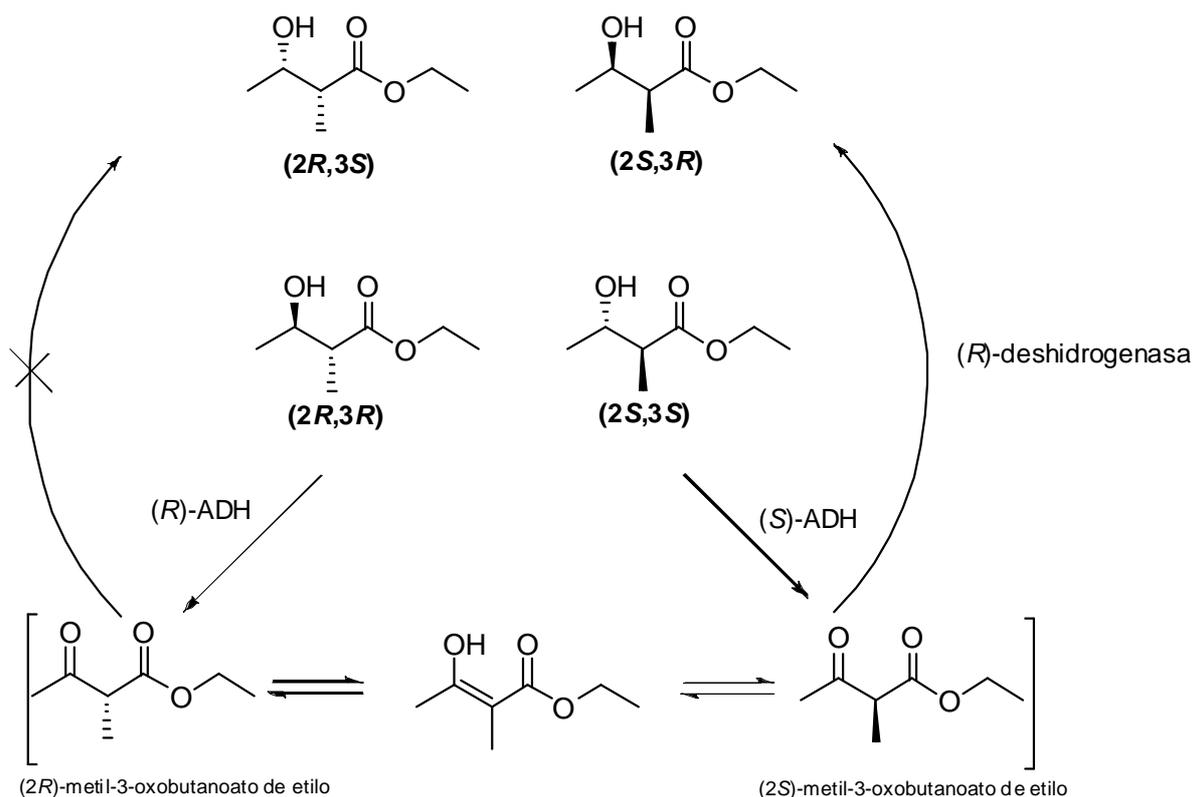
Esquema 36. Mecanismo propuesto para la desracemización de la mezcla racémica (3) con *G. candidum*.

Con el objetivo de aumentar la proporción del estereoisómero (2*S*,3*R*)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo, como precursor en la síntesis de sitofilato, se estudió el comportamiento de la desracemización ante el agregado de metilvinil cetona,^{23,26} como agente inhibidor de la (*S*) deshidrogenasa involucrada en la reducción de 2-metil-3-oxobutanoato de etilo, para aumentar la formación del alcohol (*R*).

El procedimiento seguido se describe en la parte experimental. A las 72 horas de biotransformación no se observó alteración en la proporción inicial de los estereoisómeros. Esto hace suponer que si bien ocurre una inhibición de la (*S*)-deshidrogenasa, esta inhibición podría ocurrir tanto para la reducción como oxidación. Por esa razón no se observa una mejora en el exceso enantiomérico del compuesto (**3b**) a costa del consumo de (**3a**).

La biotransformación con *A. terreus* dio como resultado un moderado porcentaje de desracemización, tal como fue descrito para compuestos aromáticos,^{27,28} siendo éste el primer trabajo referido a compuestos alifáticos. Sin embargo, contrario a lo obtenido con *G. candidum*, aumentó la proporción del estereoisómero (2*S*,3*R*) a través del consumo de los enantiómeros *anti*. Si bien el estereoisómero formado es el de nuestro interés, el bajo exceso enantiomérico generado (33%) no nos permite seleccionarlo como el biocatalizador más adecuado.

De acuerdo a la propuesta de mecanismo de Nakamura, K., *et al.*²⁵ en este caso los resultados obtenidos hacen proponer como mecanismo de reacción, la oxidación de los enantiómeros *anti* por medio de alcohol deshidrogenasas con igual velocidades de reacción, mientras que la deshidrogenasa responsable de la reducción sería más rápida o selectiva con respecto al sustrato (2*S*)-2-metil-3-oxobutanoato y su actividad *anti*-Prelog, ver **Esquema 37**. Sin embargo, los resultados en la reducción de (**2**) (Tabla 3, entrada 6), indican como única actividad de la deshidrogenasa un comportamiento tipo Prelog, contradiciendo así el mecanismo propuesto.



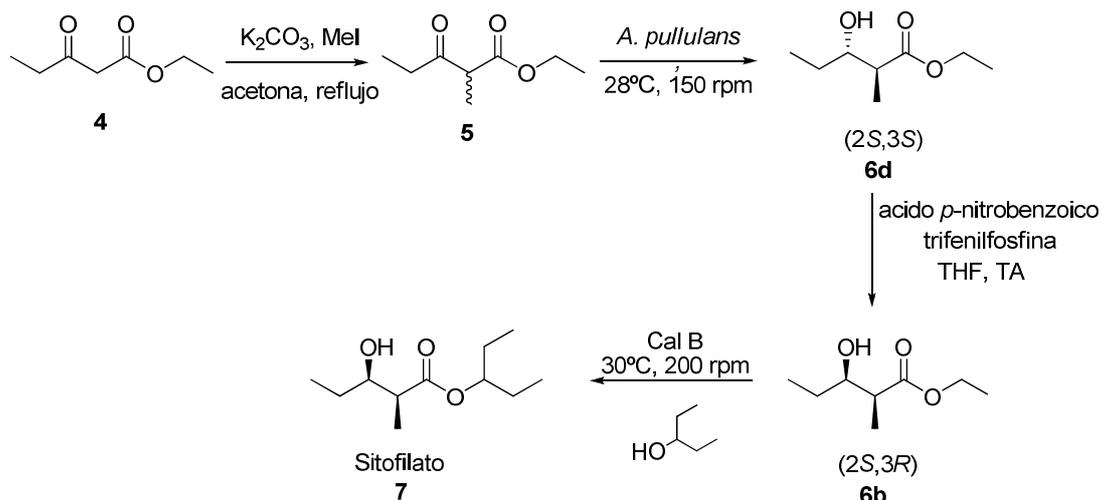
Esquema 37. Mecanismo propuesto para la desracemización con *A. terreus*.

El resto de los microorganismos estudiados no dieron lugar a desracemización. Por lo tanto, de la evaluación de esta biotransformación no surgen altos valores de excesos enantio- y diastereomericos útiles en rutas sintéticas.

2. Síntesis de sitofilato

Una vez seleccionada la biotransformación que permite obtener sintones con estructura de α -metil- β -hidroxiesteres homoquirales, el segundo objetivo de esta tesis es la síntesis de (2S,3R)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de 1-etilpropilo, feromona de agregación de la *Sitophilus granarius* plaga de granos almacenados de importancia económica en Uruguay y la región.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la síntesis de (3d), se propuso una ruta quimioenzimática en donde la reducción con *A. pullulans* (CCM H1) nos permitiría obtener (6d) ópticamente puro, para luego, mediante una reacción de Mitsunobu, invertir la configuración absoluta del carbono 3. La formación del éster de 1-etilpropilo se llevaría a cabo por medio de una transesterificación utilizando Cal B y 3-pentanol, **Esquema 38**.



Esquema 38. Ruta quimioenzimática propuesta para la síntesis de 7.

Fue necesario preparar los estándares correspondientes a los compuestos (6a), (6b), (6c) y (6d) a los efectos de monitorear la biotransformación con *A. pullulans*, previo a iniciar la síntesis de sitofilato.

2.1- Identificación de los estereoisómeros del compuesto (6)

La síntesis de (5) se llevó a cabo utilizando 3-oxopentanoato de etilo, de acuerdo a la técnica descrita en la primera parte de este capítulo, entrada 4, **Tabla 1**. Se obtuvo la mezcla racémica (5) con un rendimiento de 90% y su espectro de $^1\text{H-RMN}$ se muestra en la **Figura 22**.

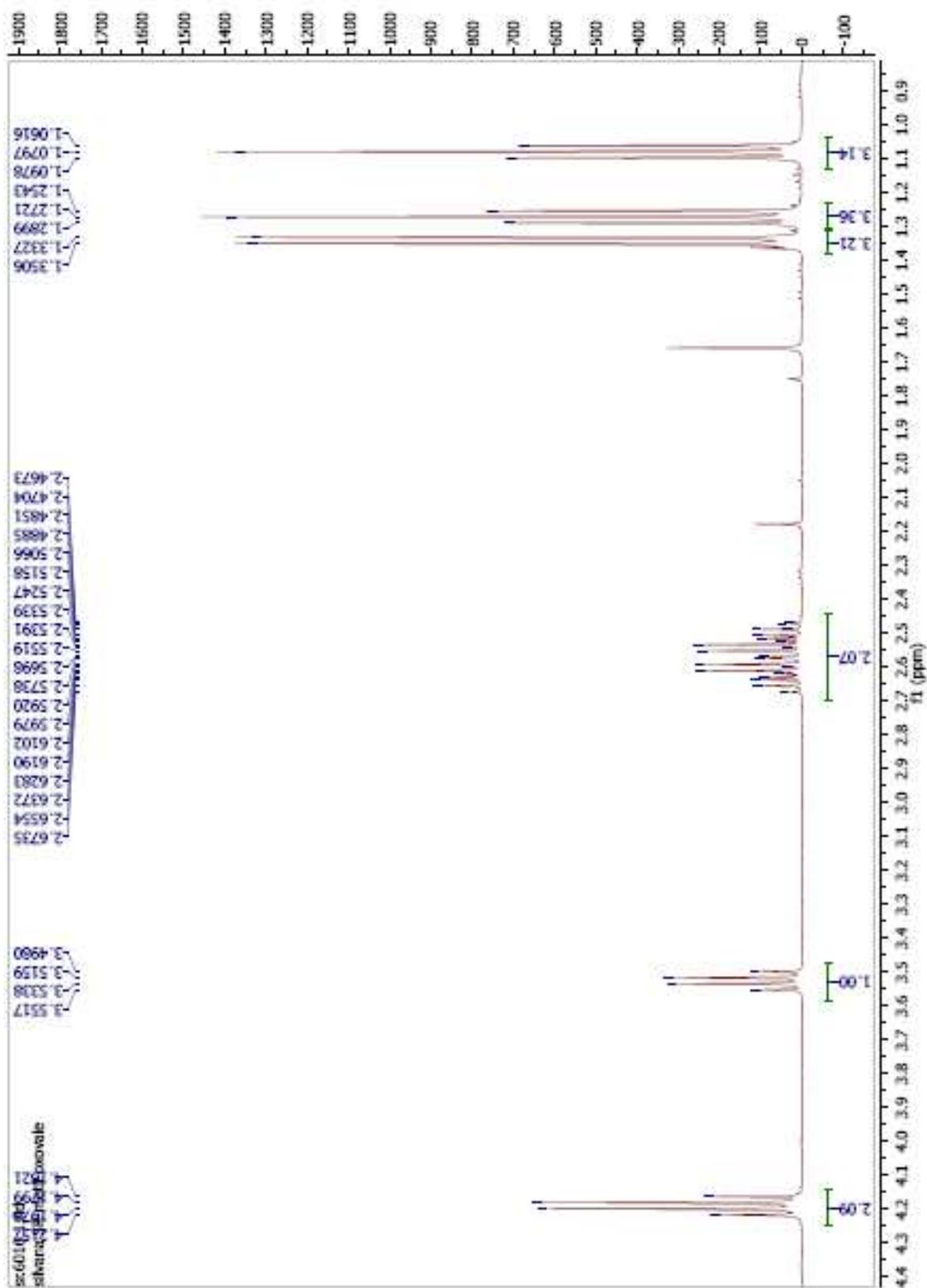
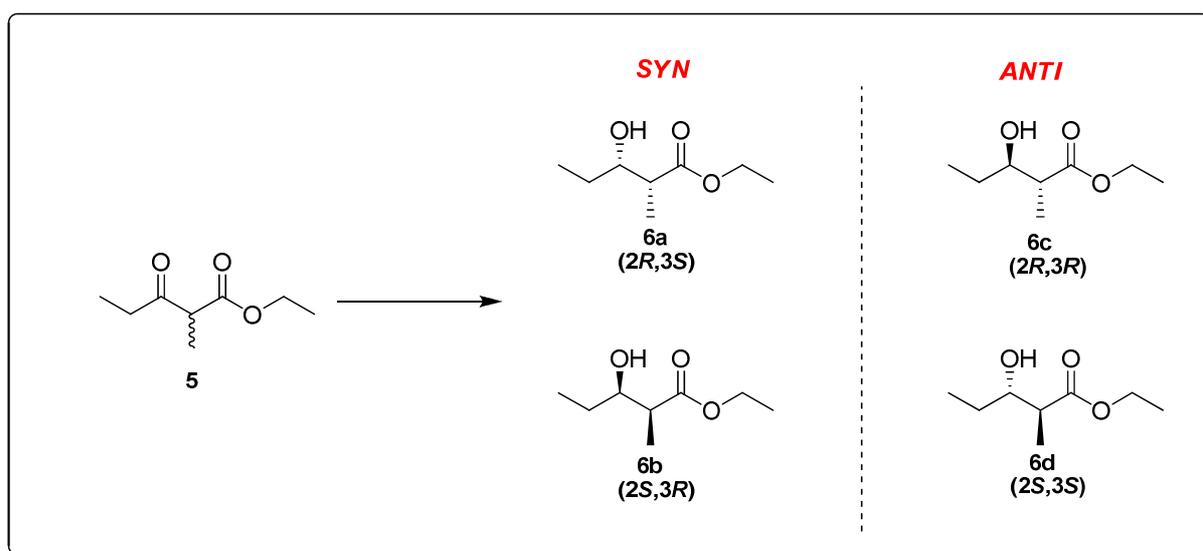


Figura 22. Espectro de ¹H-RMN de la mezcla (5).

En el espectro se observa un cuarteto a 3.52 ppm correspondiente a la señal del protón metínico en la posición 2.

La mezcla racémica **(5)** se resolvió por cromatografía gaseosa quiral utilizando el Programa 2, observándose dos señales a 18.3 y 19.4 minutos.

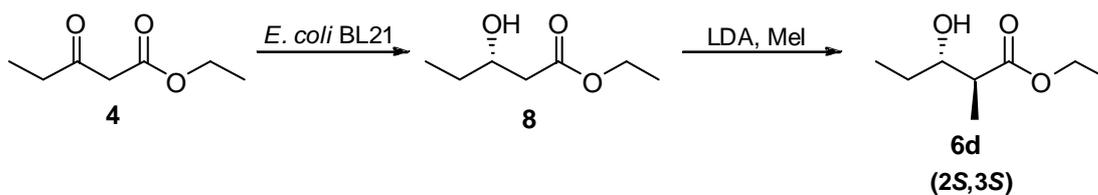
La reducción de la mezcla **(5)** con borohidruro de sodio permitió obtener los 4 estereoisómeros posibles, **Esquema 39**.



Esquema 39. Reducción química de la mezcla **(5)**.

A los efectos de identificar cada uno de ellos se utilizaron las mismas herramientas y conceptos que en la primera parte de este capítulo.

Por medio de la reducción de **(4)** con *E. coli* BL21 (DE3) ΔyqH (pPPP4) se obtuvo (3S)-3-hidroxipentanoato de etilo de forma enantioméricamente pura (>99% ee), el cual fue metilado en posición α mediante el procedimiento descrito por Fráter *et al.*,⁵ obteniendo exclusivamente el estereoisómero **(6d)**, **Esquema 40**. El enantiómero **(6c)** fue identificado, al igual que para los estereoisómeros del compuesto **(3)**, tomando en cuenta el comportamiento distereo- pero no enantioselectivo de la reducción con borohidruro de sodio. En la **Figura 23**, se presenta el cromatograma obtenido para la mezcla de estereoisómeros **(6)** mediante el Programa 2, identificando los compuestos **(6c)** y **(6d)**.



Esquema 40. Síntesis del esteroisómero (6d).

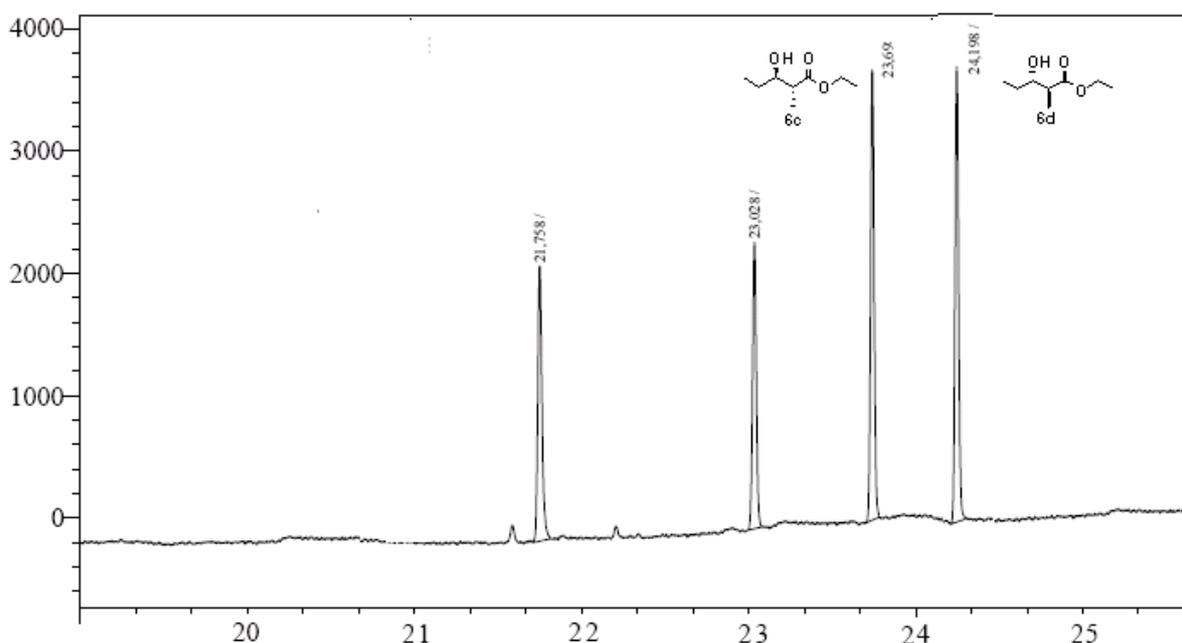
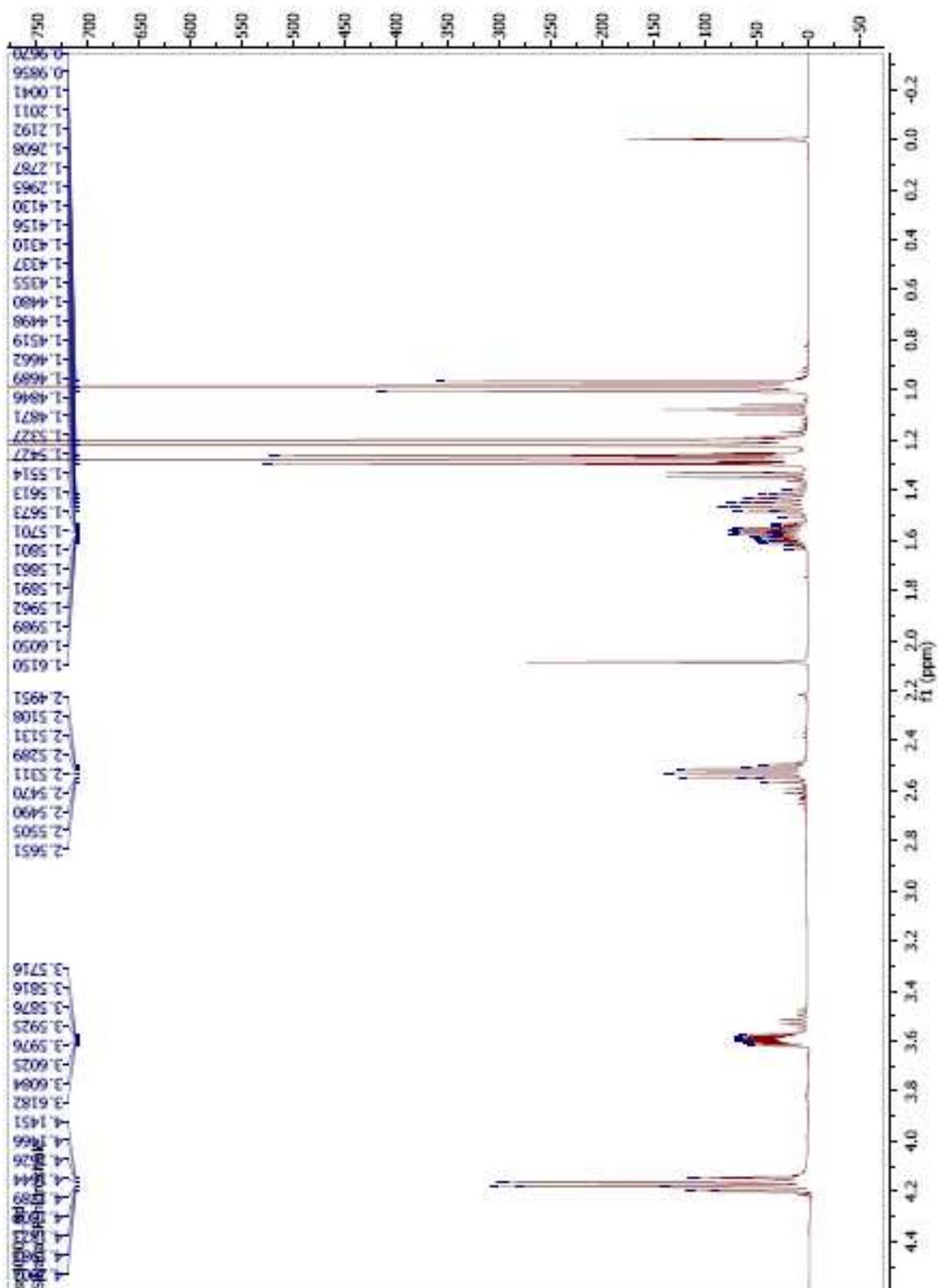


Figura 23. Cromatograma de la mezcla (6) mediante Programa 2.

Se verificó la configuración relativa del compuesto (**6d**) a través del espectro de ^1H -RMN, considerando el trabajo de Kalaitzakis *et al.*, publicado en 2008,²⁹ en donde establece los desplazamientos químicos del protón carbinol, para distintos α -alquil- β -hidroxiesteres. El protón carbinol, como se observa en la **Figura 24**, se presenta a 3.60 ppm tal como fue descrito por Kalaitzakis *et al.* para los esteroisómeros *anti* (3.583 ppm).²⁹

En este caso, puede realizarse el mismo razonamiento que para el 2-metil-3-oxobutanoato de etilo, **Figura 15**. De la visualización de los esteroisómeros *anti* mediante las proyecciones de Newmann, surge que el conformero más estable para *anti*, sea aquel donde exista menor impedimento estérico entre los sustituyentes y formación de un enlace de hidrogeno, esto genera un ángulo de solapamiento entre el protón del grupo metínico y el protón carbinol de 180° aproximadamente, equivalente a una constante de acoplamiento en el espectro de ^1H -RMN de aproximadamente 7 Hz. Se determinó una constante de acoplamiento de 8.4 Hz lo cual, junto con lo descrito en el párrafo anterior, nos permite confirmar la configuración absoluta del compuesto (**6d**).

Los esteroisómeros *syn* fueron identificados más adelante, al realizar la reacción de esteroinvertión de Mitsunobu del compuesto **(6c)**.

Figura 24. Espectro de ^1H -RMN del compuesto (6d).

2.2- Síntesis de sitofilato

2.2.1-Reducción de (5)

Se realizó la reducción de la mezcla racémica (5) utilizando *A. pullulans* (CCM H1) mediante el procedimiento de células en crecimiento descrito en la Parte experimental. Los resultados obtenidos, reflejan un comportamiento menos estereoselectivo por parte de esta cepa, que el observado en la reducción del compuesto (3). Como se observa en la **Figura 25**, si bien la reducción muestra un comportamiento diastereoselectivo hacia los isómeros *anti*, no presenta una alta enantioselectividad obteniéndose los isómeros (6c) y (6d) en una relación 28/72 respectivamente.

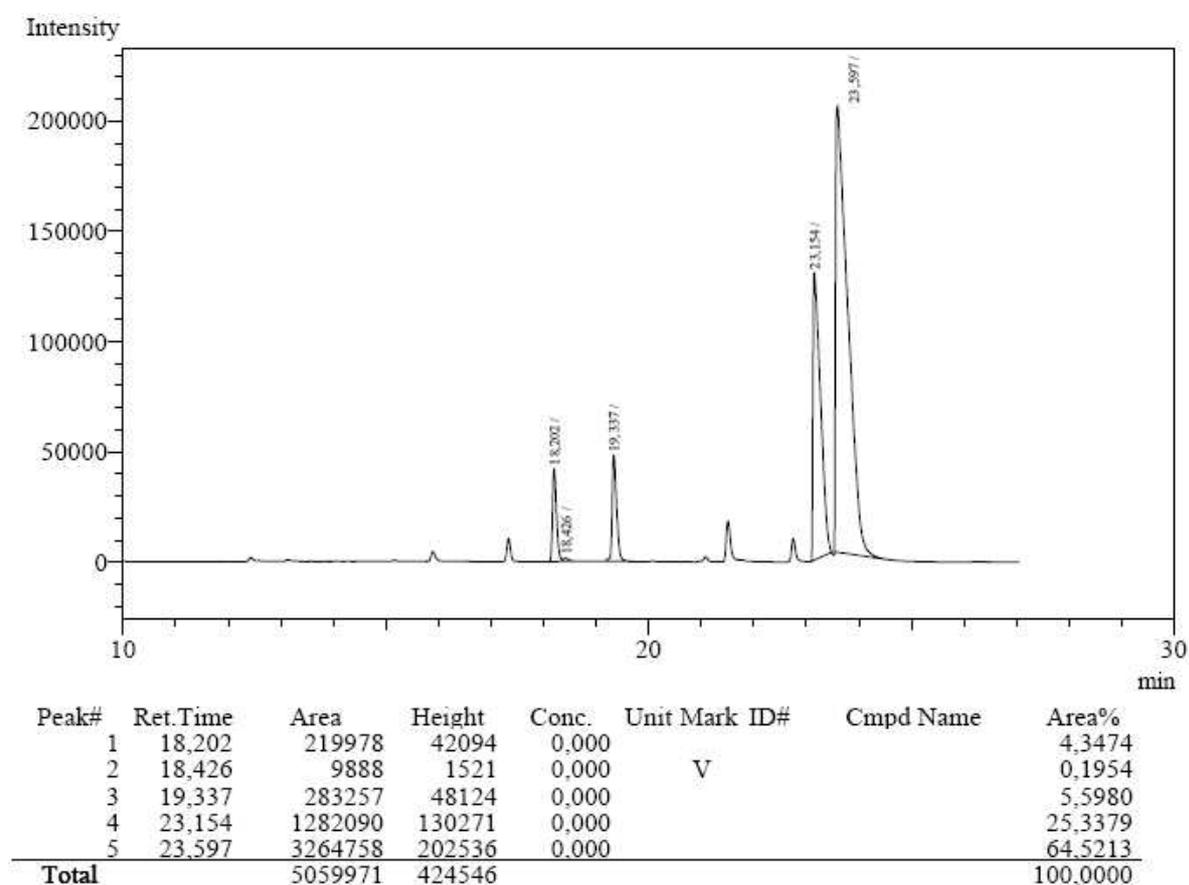


Figura 25. Cromatograma de reducción de (5) con *A. pullulans*.

De acuerdo a lo descrito en el punto A.2.1.1, una conversión del 90% en la formación de los estereoisómeros *anti* a partir de la mezcla racémica (5), nos hace pensar que en el medio de reacción el sustrato sufre un tautomerismo ceto-enol. Esto fue verificado mediante un experimento sencillo. Se determinó el espectro de ^1H -RMN de la mezcla (5) en agua deuterada al inicio. Se agregaron 3 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mg KH_2PO_4 , 1 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, al mismo

tubo y se determinó el espectro de ^1H RMN a las 24 horas de preparada la solución **Figura 26 y Figura 27**.

El equilibrio ceto-enol pudo observarse a través del intercambio entre el protón metínico (CH) y el deuterio del disolvente. Para esto se determinó la relación entre las áreas de los protones metínicos (3.72 ppm) y metilénicos (4.08 ppm), **Tabla 7**.

A las 24 horas se observó una disminución en la relación entre las áreas lo cual es debido al intercambio entre el protón metínico y el deuterio del disolvente durante el equilibrio ceto-enol.

Tiempo	Área CH/CH ₂
blanco	0.477
24 h	0.333

Tabla 7. Relación de áreas CH/CH₂ en espectro de ^1H -RMN

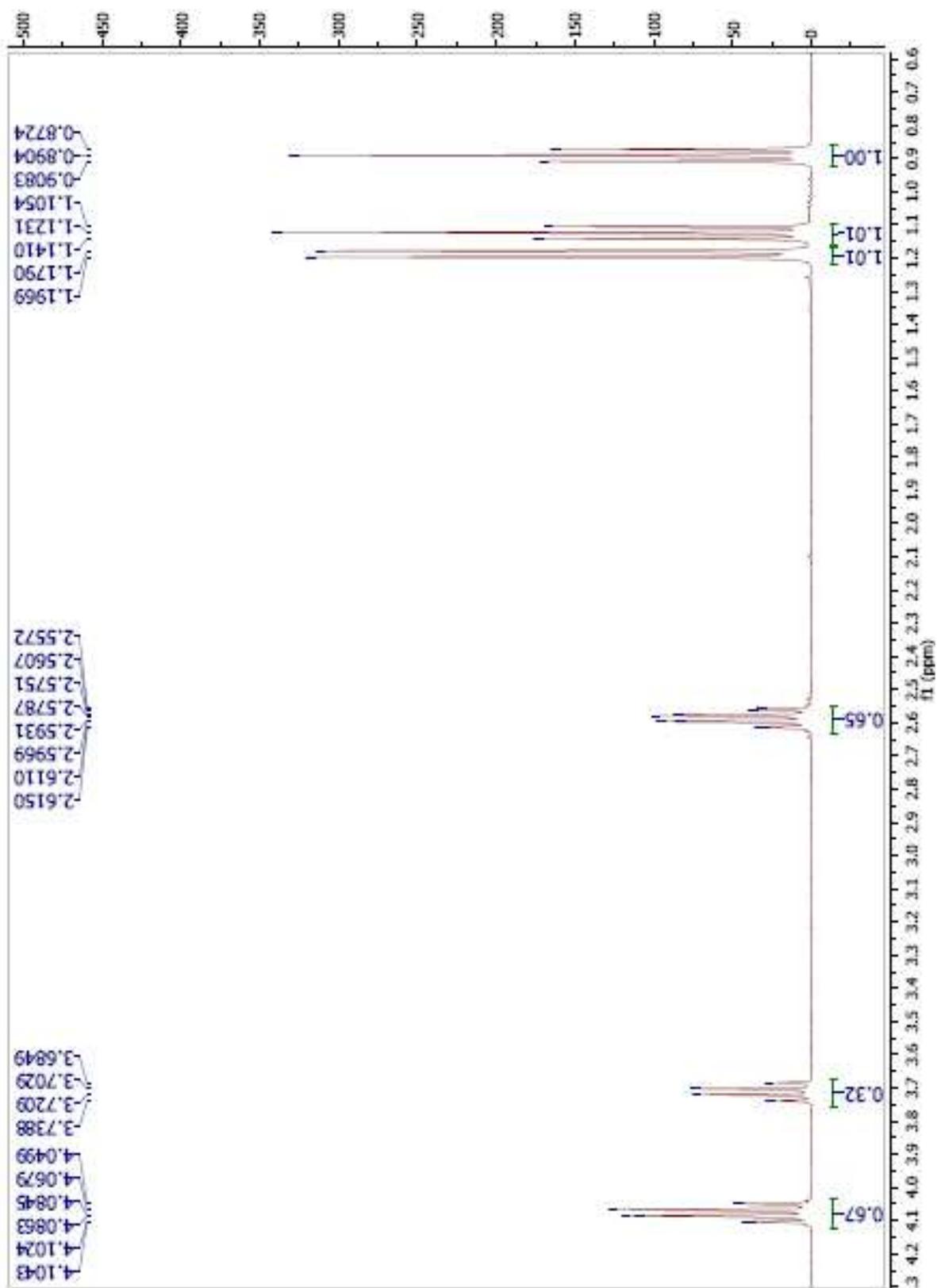


Figura 26. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ a $t = 0$ h

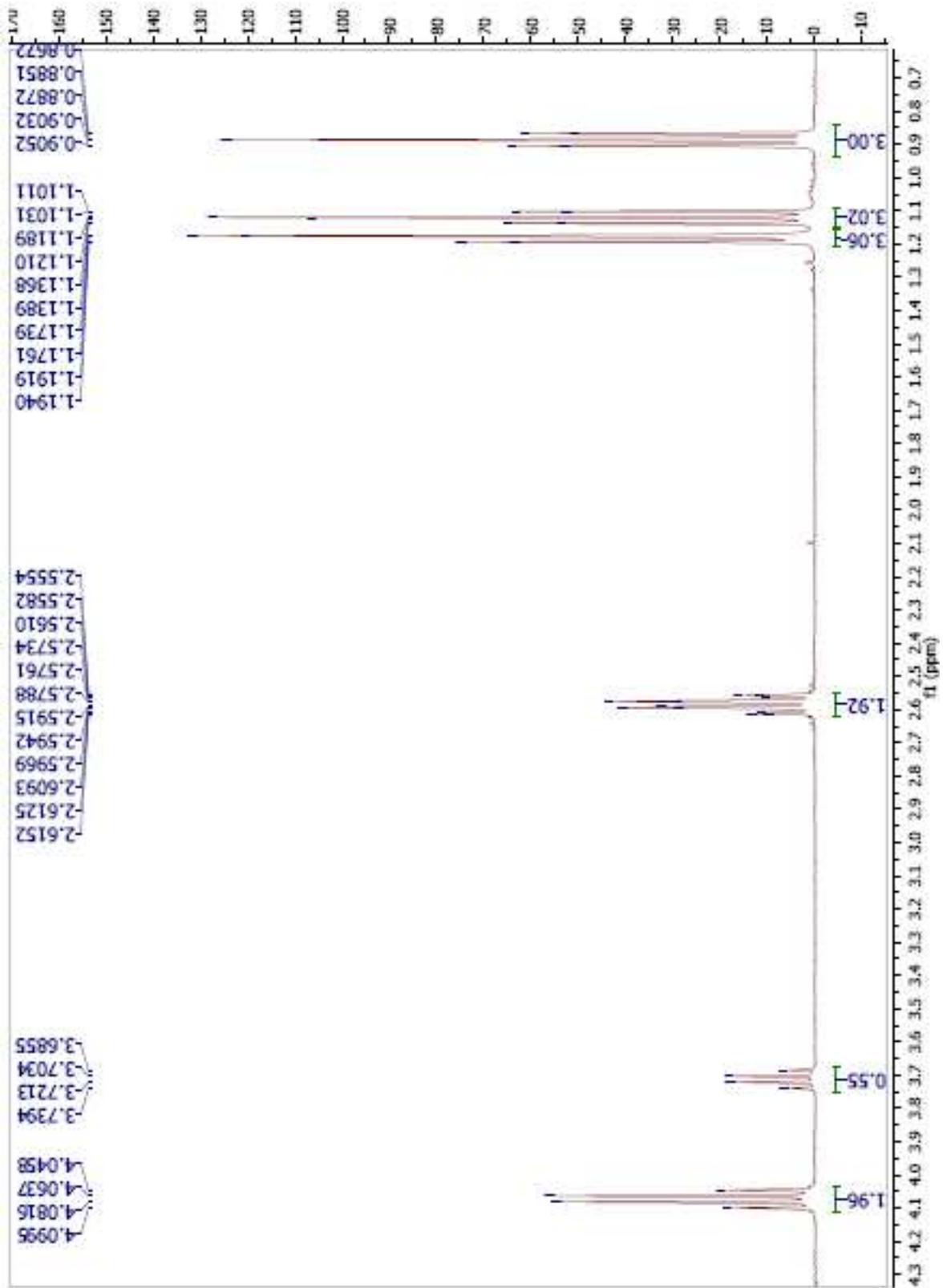
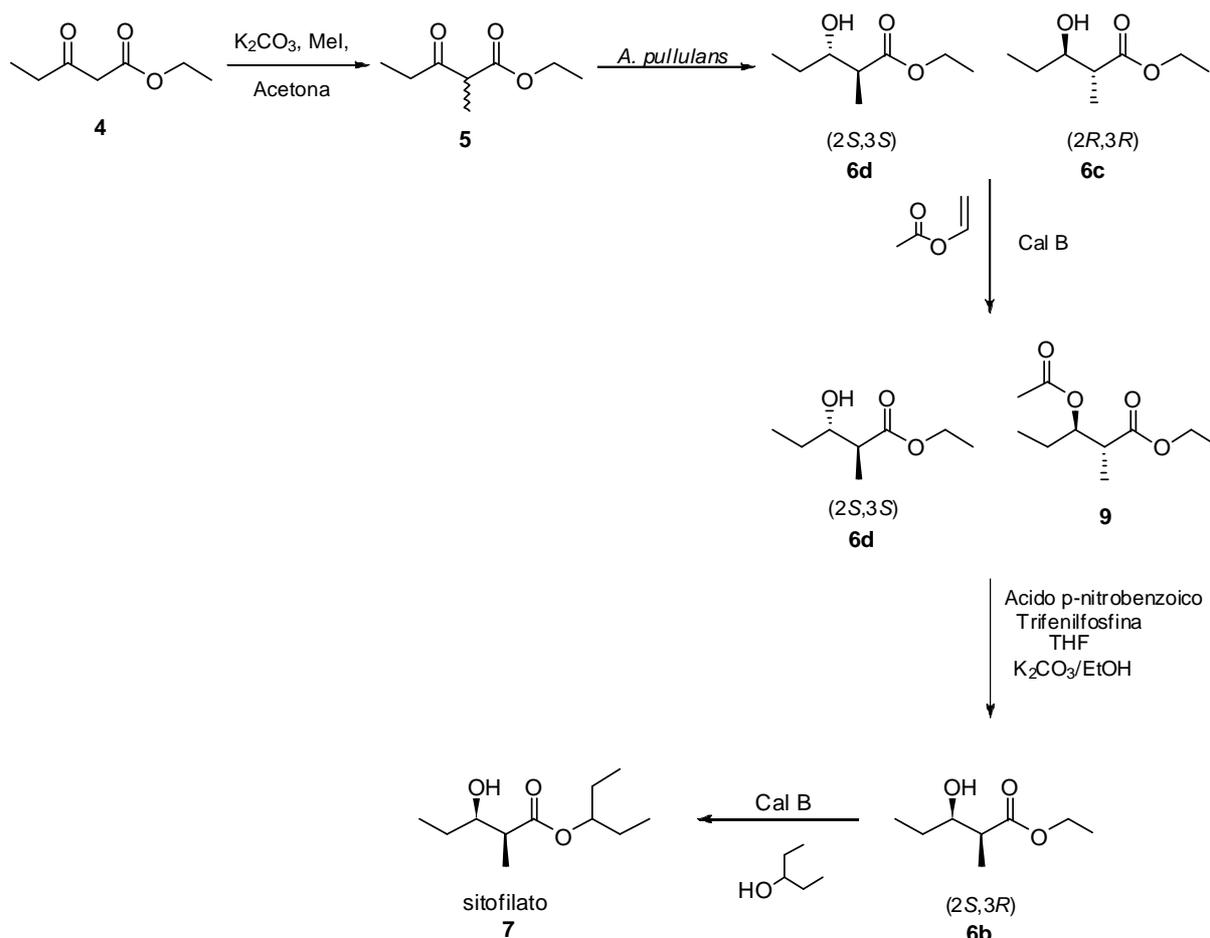


Figura 27. Espectro de 1H-RMN a t = 24 h.

El resultado obtenido en la reducción de **(5)** con *A. pullulans*, diferente al esperado, modifica la ruta sintética propuesta para sitofilato, **Esquema 38**, debiendo incorporarse una etapa de resolución de la mezcla racémica luego de la reducción enzimática. En el **Esquema 41**, se presenta la nueva ruta sintética propuesta, en donde se agrega un paso de acetilación enzimática enantioselectiva utilizando Cal B y acetato de vinilo como dador de acilo.



Esquema 41. Nueva ruta sintética para la síntesis de sitofilato.

2.2.2-Acetilación de la mezcla **(6c)** y **(6d)**

Se realizó la acetilación de **(6c)** con Cal B de acuerdo al procedimiento descrito en la parte experimental, **Esquema 41**. Al no completarse la reacción, fue necesario purificar y seguir la reacción con enzima nueva. Esto llevó a un menor rendimiento global de la reacción (40%). En el cromatograma de la reacción se observó que el rendimiento de la acetilación fue de 95.5 % lo cual nos permite obtener el compuesto **(6d)** con un exceso enantiomérico del 91%, **Figura 28**. A los tiempos de retención de 23.33 y 23.67 minutos se observan los enantiómeros **(6c)** y **(6d)**

respectivamente, mientras que a 26.04 minutos se observa el producto de la acetilación de **(6c)**, el compuesto **(9)**.

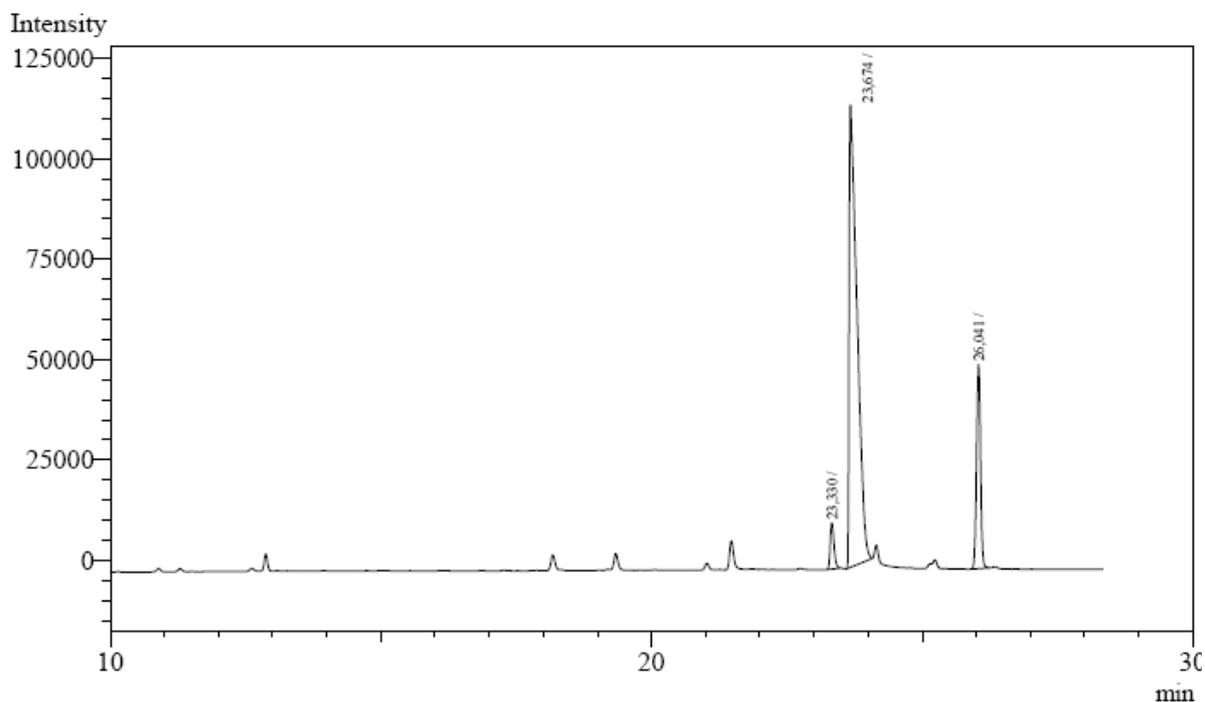


Figura 28. Cromatograma de la acetilación con Cal-B.

t =26.04 min (**9**)

t =23.67 min (**6d**)

t =23.33 min (**6c**)

El crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna aislando los compuestos **(6d)** y **(9)**.

En la **Figura 28** se observa el comportamiento enantioselectivo de Cal B al no acetilar el esteroisómero **(6d)**. Esto nos permite obtener el compuesto **(9)** con un exceso enantiomérico mayor a 99%.

Se hidrolizó el grupo acetilo en **(9)** utilizando K_2CO_3 catalítico y etanol, obteniendo **(6c)** enantioméricamente puro.

2.2.3- Síntesis de sitofilato

Síntesis de (2R,3R)-sitofilato (12)

El compuesto **(6c)** se transesterificó enzimáticamente utilizando Cal B como catalizador y 3-pentanol como nucleófilo, obteniendo (2R,3R)-sitofilato (**12**) con un rendimiento del 90% y un exceso enantiomérico mayor a 99%.

En el trabajo de Kalaiztakis *et al.* se describe un desplazamiento de 3.568 ppm para el protón carbinol del compuesto *anti*.²⁹ Esto nos permite confirmar la configuración relativa de (2*R*,3*R*)-sitofilato ya que en el espectro de ¹H-RMN, **Figura 29**, se observa un multiplete a 3.57 ppm correspondiente al protón carbinol, **Figura 30**. Las señales correspondientes a los grupos metilo del grupo etilpropilo aparecen a 0.89 ppm como un triplete que integra 6 protones (grupos metílicos), a 1.58 ppm un multiplete correspondiente a los 4 protones de los grupos metilénicos, **Figura 31**, y a 4.80 ppm un multiplete correspondiente al protón metínico, **Figura 32**.

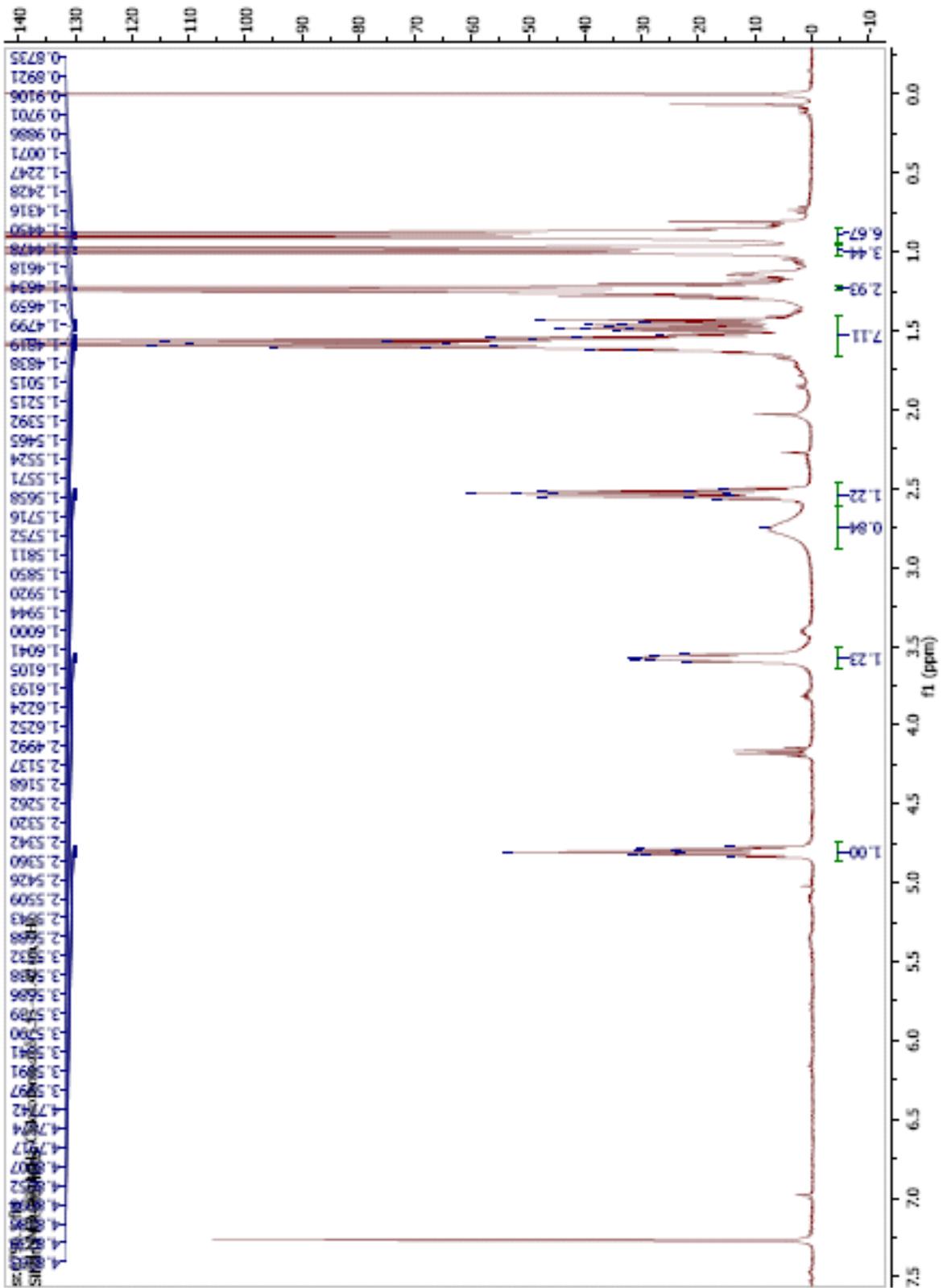


Figura 29. Espectro de ^1H -RMN de (2R,3R)-sitofilato.

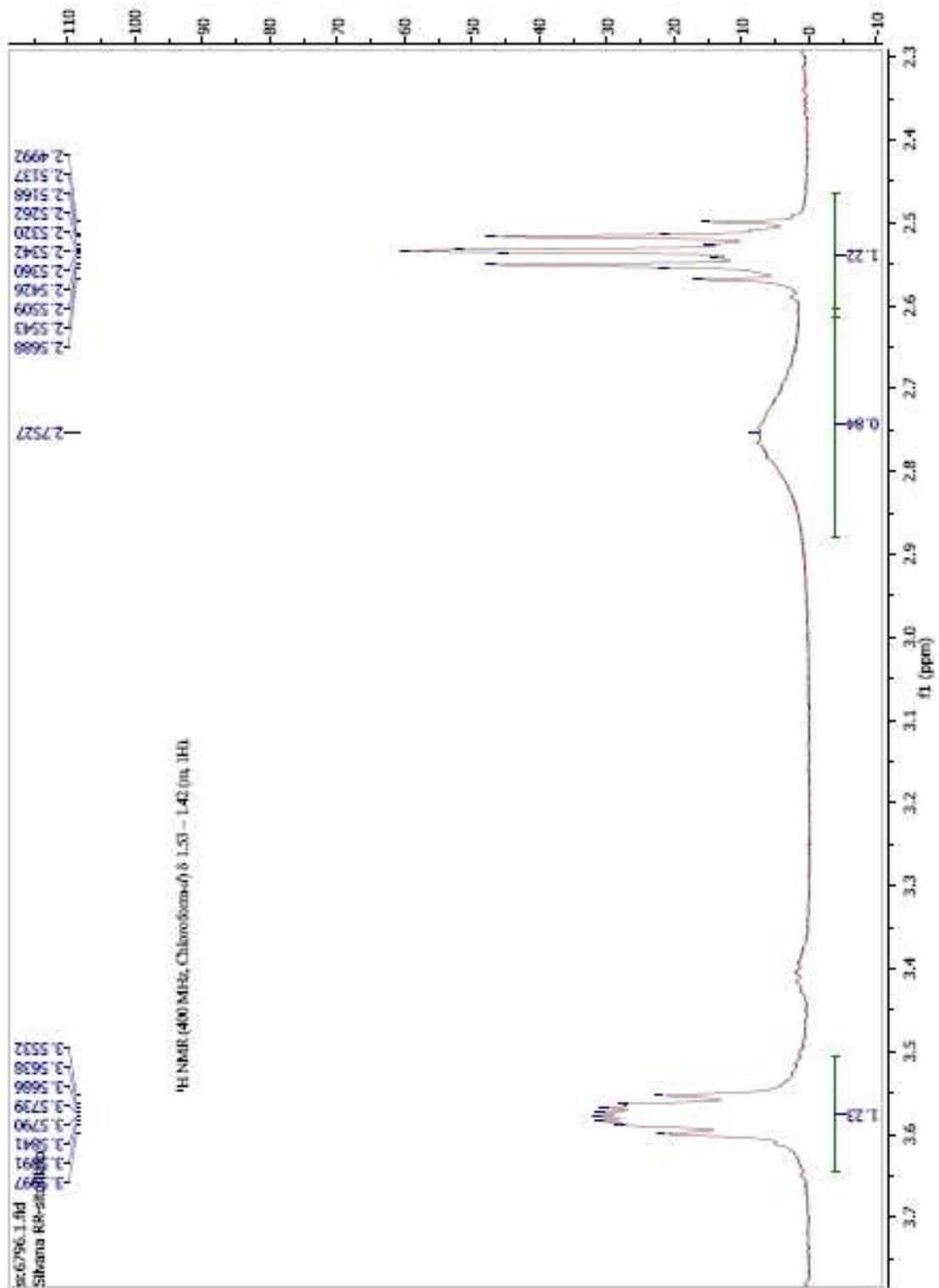


Figura 30. Espectro de ¹H-RMN de (2R,3R)-sitofilato, ampliación en la señal del protón carbinol (3.57 ppm).

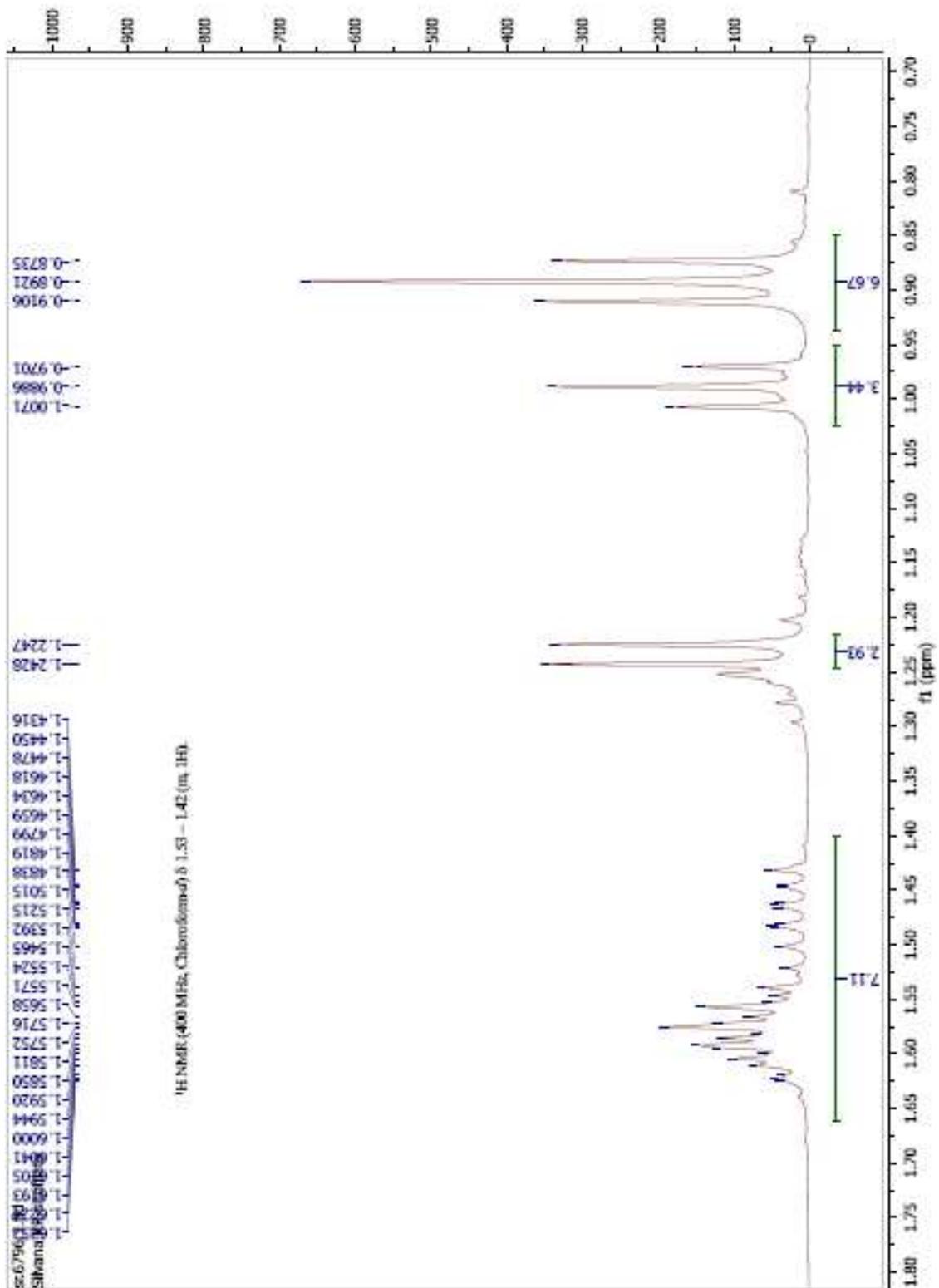


Figura 31. Espectro de ^1H -RMN de (2R,3R)-sifilato, ampliación en las señales del grupo etilpropilo (0.89 y 1.58 ppm).

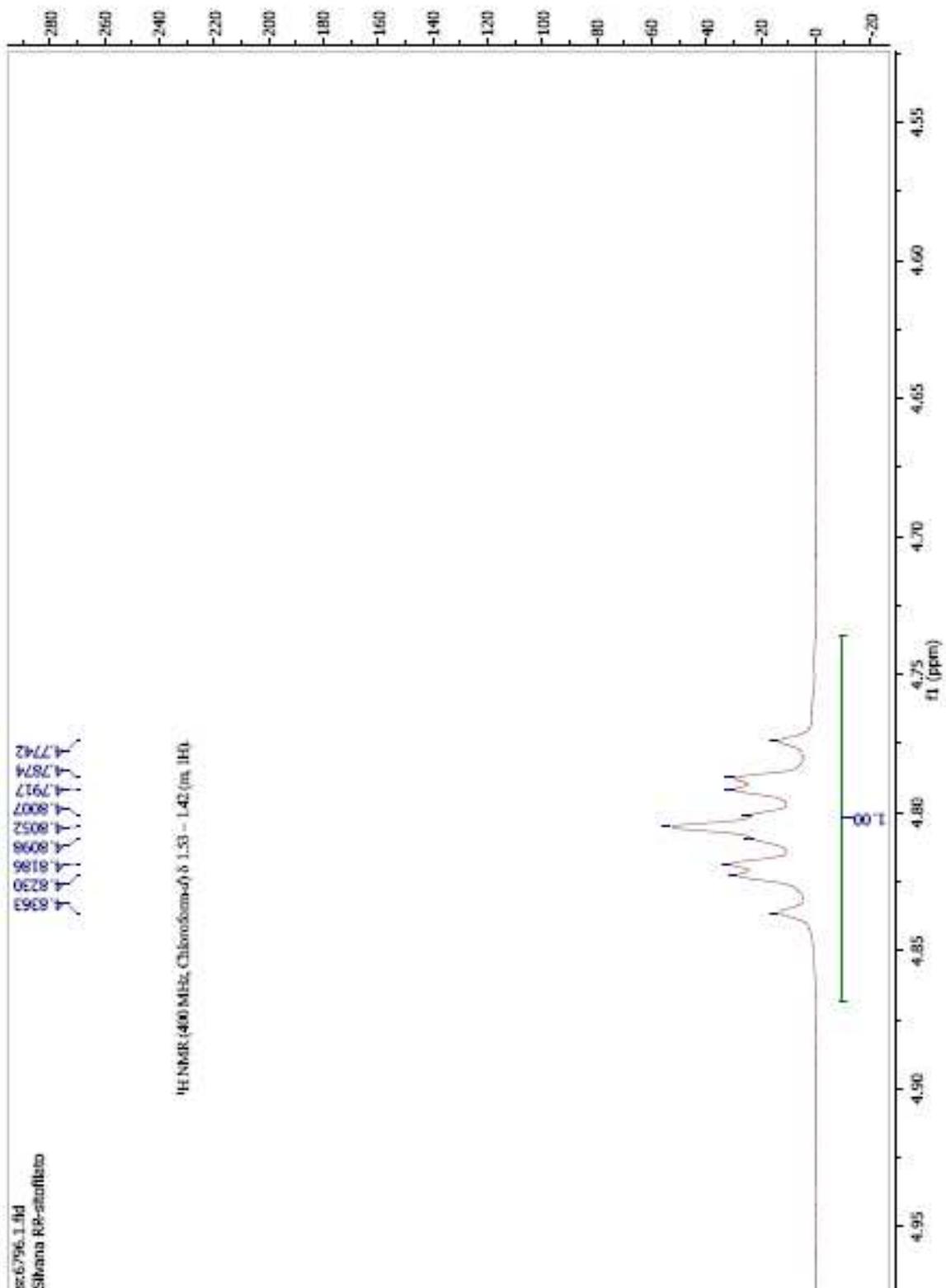


Figura 32. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ de (2R,3R)-sitofilato, ampliación en la señal del protón metínico del grupo etilpropilo (4.80 ppm).

Síntesis de (2*S*,3*R*)-sitofilato

Como se mencionó anteriormente el estereoisómero (**6d**) se obtuvo con un 91% *ee*, en relación al compuesto (**6c**). En la **Figura 33**, se puede observar el cromatograma del compuesto con trazas de su enantiómero. En los pasos siguientes, ninguna de las reacciones es enantioselectiva por lo que el nivel de pureza óptica se mantendrá hasta la obtención del producto final.

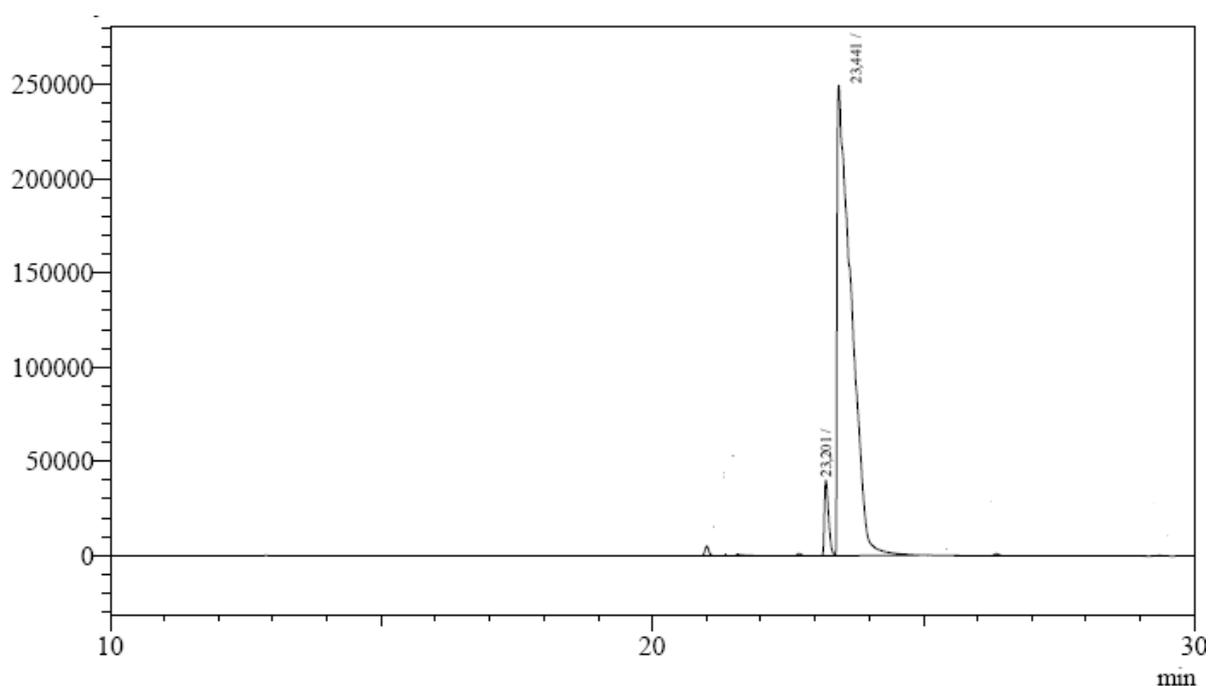
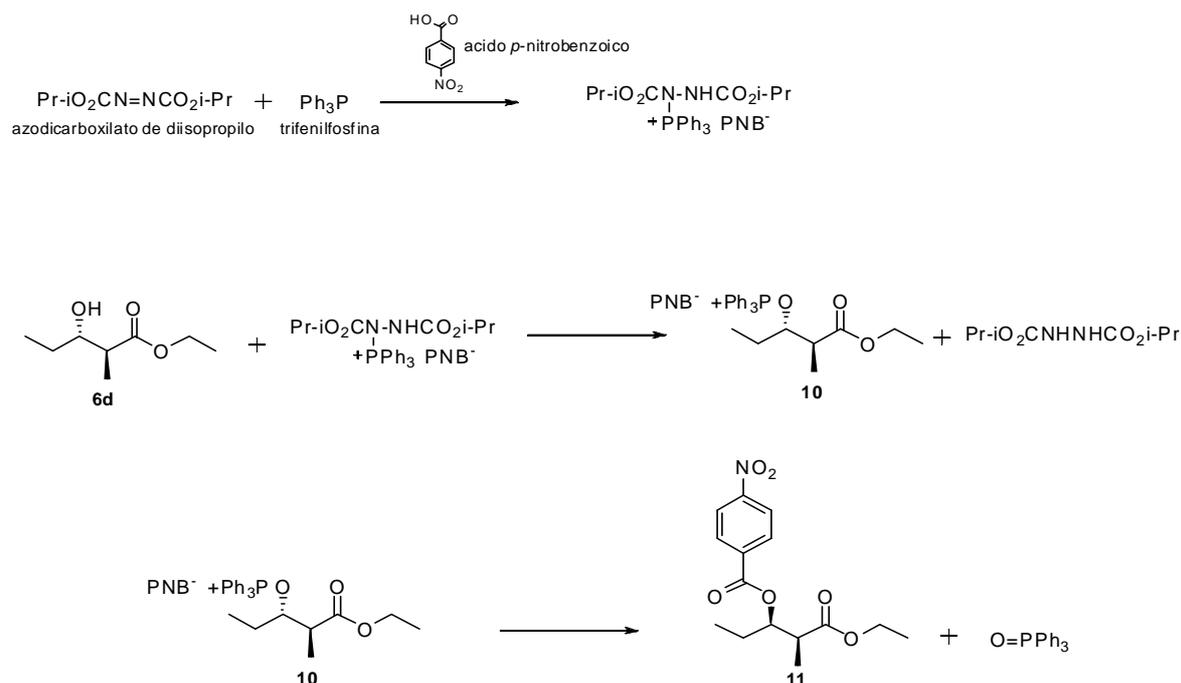


Figura 33. Cromatograma del compuesto (**6d**) mediante Programa 2.

Para la obtención del estereoisómero (2*S*,3*R*)-sitofilato fue necesario invertir la configuración absoluta en C-3 de (2*S*,3*S*)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo. Para ello se llevó a cabo la reacción de Mitsunobu en donde el alcohol (**6d**) y el ácido *p*-nitrobenzoico forman el compuesto (**11**), mientras que trifenilfosfina se oxida y el azodicarboxilato de diisopropilo se reduce a hidracina, **Esquema 42**.³⁰



Esquema 42. Reacción de Mitsunobu sobre el compuesto (6d).

Se probó la reacción con dos disolventes diferentes, obteniéndose el mejor resultado con THF,

Tabla 8.

Entrada	Condiciones de reacción	Rendimiento
1	PPh_3 , PNB, DIAD, Benceno, temperatura ambiente, 72 h.	7%
2	PPh_3 , PNB, DIAD, THF, temperatura ambiente, 72 h.	43%

Tabla 8. Condiciones de reacción. Reacción de Mitsunobu.

En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ de (**11**) se observan los dos dobletes a 8.19 y 8.29 ppm correspondientes a los protones aromáticos del grupo *p*-nitrobenzoílo. Asimismo, se observa que la constante de acoplamiento entre el C2 y C3 es 5.1 Hz, en vez de 7 Hz como era esperable y luego confirmado para los enantiómeros *anti*. Esta constante de acoplamiento cercana a 4 Hz nos permite suponer que la reacción ha sido exitosa y se ha invertido la configuración del grupo hidroxilo. Esto será confirmado en el paso siguiente.

La desprotección de (**11**) se llevó a cabo en etanol absoluto y K_2CO_3 obteniéndose el esteroisómero (**6b**) con un rendimiento de 90%.

El último paso en la síntesis de (2*S*,3*R*)-sitofilato es la transesterificación de **(6b)** con 3-pentanol y utilizando Cal B como biocatalizador. La biotransformación con Cal B sobre **(6b)** presentó un rendimiento del 90% en 10 días de biotransformación.³¹

En el espectro de ¹H-RMN, **Figura 34**, aparecen las señales corresponden al grupo etilpropilo, a 0.91 ppm como un triplete (grupos metílicos), a 1.59 ppm como un multiplete (grupos metilénicos), **Figura 35**, y a 4.81 ppm un triplete de triplete correspondiente al grupo metínico **Figura 36**.

De acuerdo al trabajo de Kalaitzakis *et al.*,²⁹ un desplazamiento de 3.83 ppm para este protón confirma la conformación *syn* de este producto (3.800 ppm), **Figura 36**.

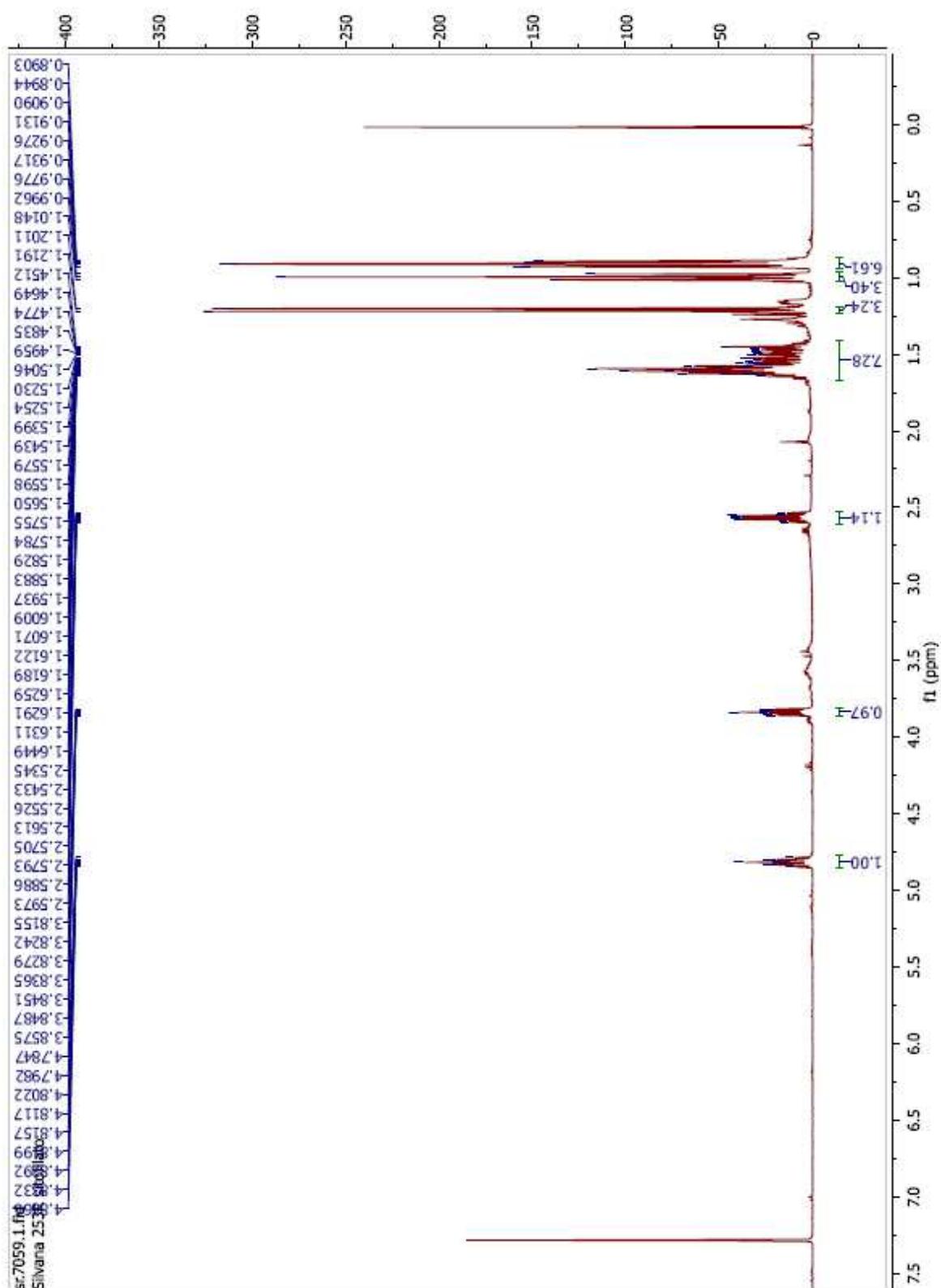


Figura 34. Espectro de ^1H -RMN de (2S,3R)-sitosifilato.

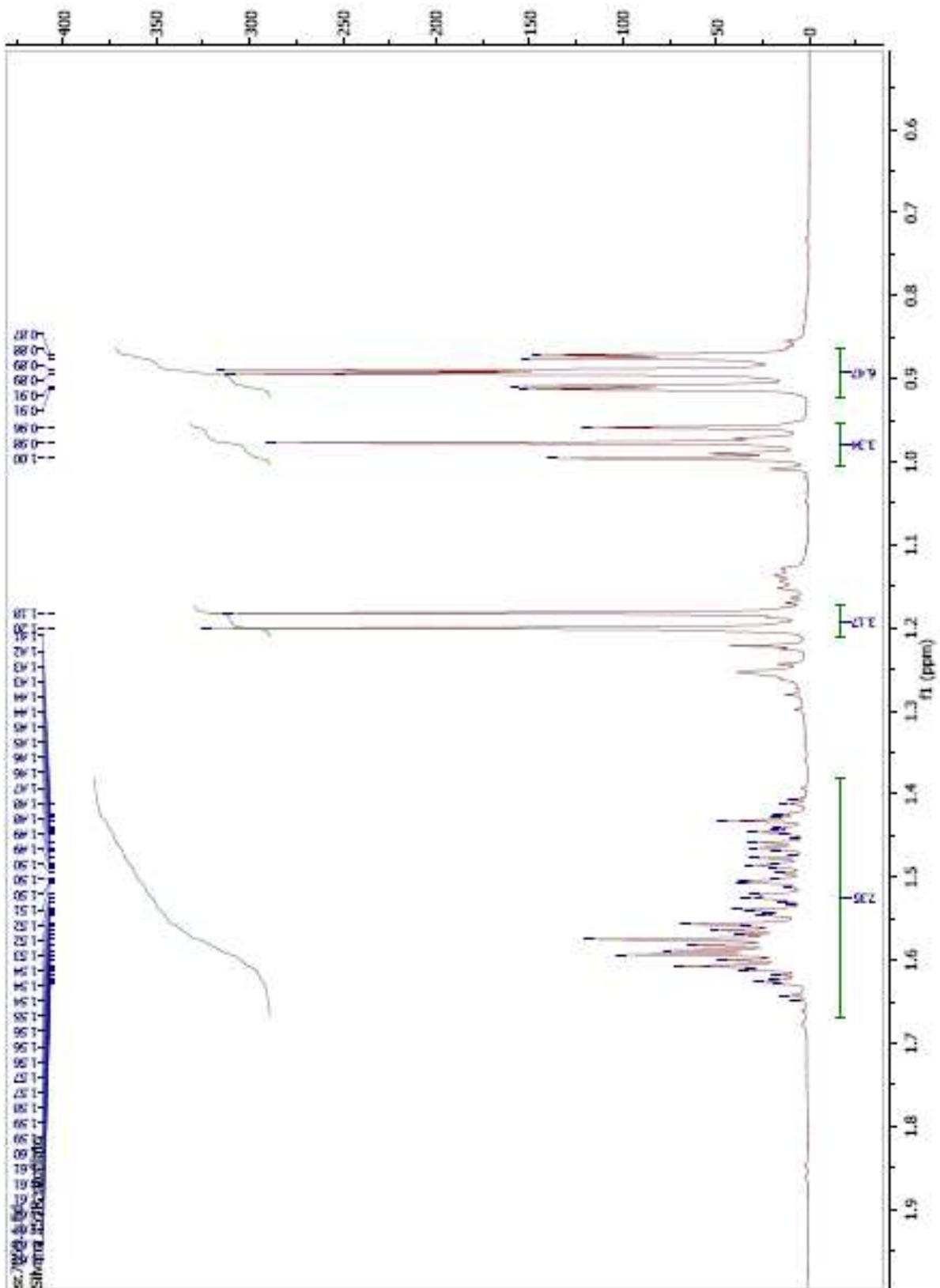


Figura 35. Espectro de ^1H -RMN de (2S,3R)-sifilato. Ampliación en las señales correspondientes al grupo etilpropilo (0.91 ppm, y 1.59 ppm).

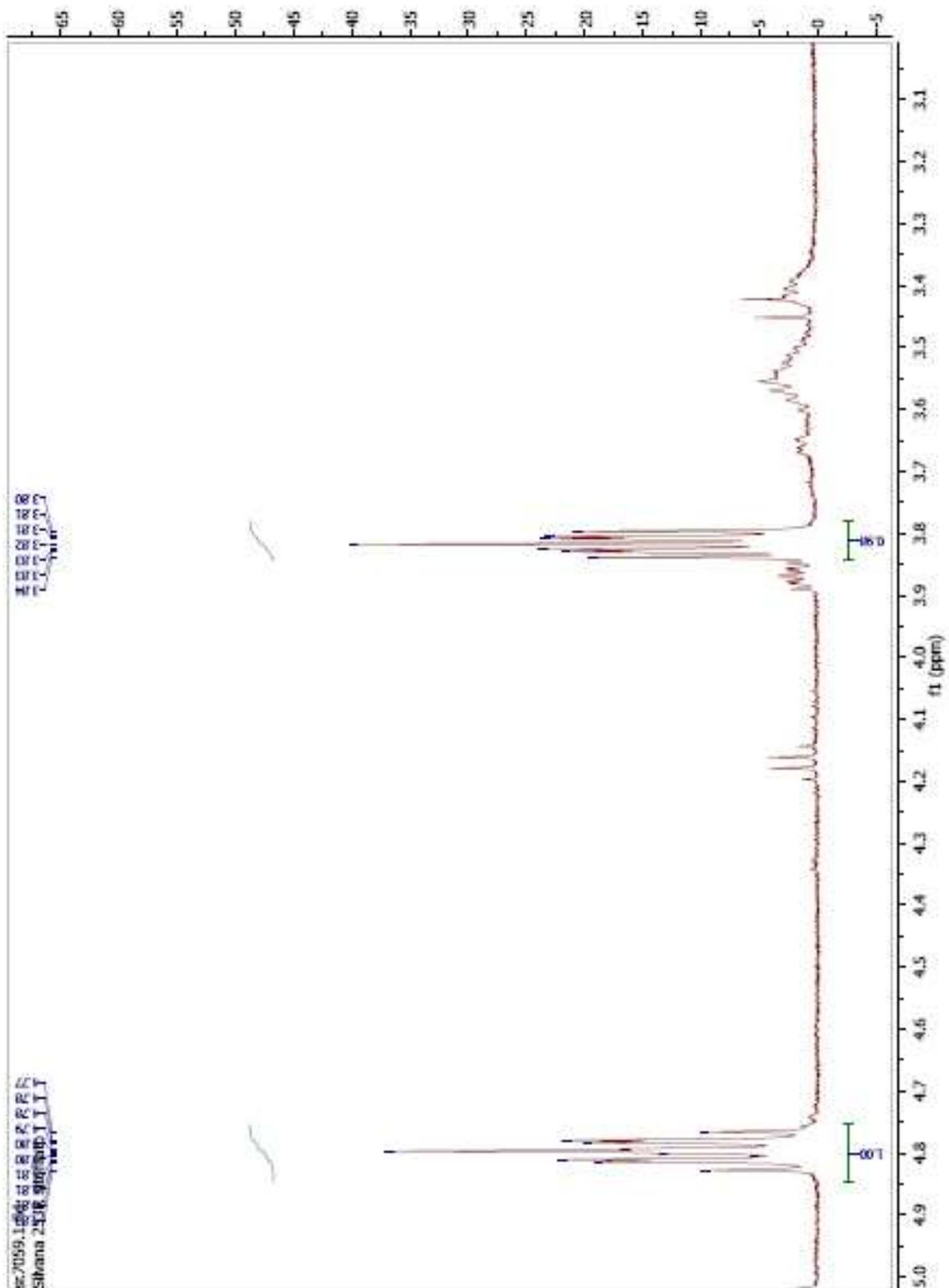
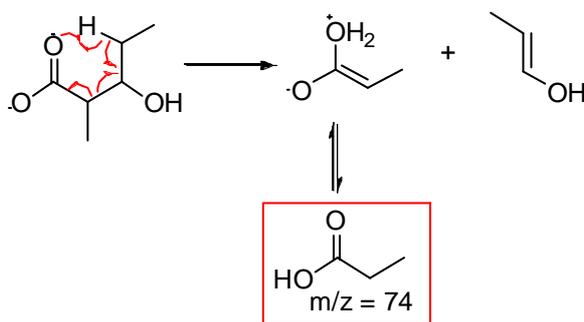


Figura 36. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de (2S,3R)-sitosifilato. Ampliación en las señales correspondientes al grupo etilpropilo (4.81 ppm) y al protón carbinol (3.83 ppm).

Los datos de espectrometría de masa coinciden con los descritos en la literatura. Se observa un pico a $m/z = 203$ que coincide con el ión molecular más un hidrogeno ($M^+ + 1$). También se observan los fragmentos $m/z = 115$ y 74 correspondientes a la ruptura en el enlace C1-O con la pérdida del fragmento $[\text{OCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2]$ y a la formación del ión ácido propiónico proveniente del rearreglo de Mc. Lafferty,³² (**Esquema 8**), respectivamente.

Se determinó la rotación óptica del producto $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -5.4$ ($c=1$ AcOEt).



Esquema 8. Formación del fragmento m/z 74 a través del rearreglo de Mc Lafferty

Referencias bibliográficas

1. Rodríguez, S.; Schroeder, K. T.; Kayser, M.; Stewart, J. D. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (8), 2586-2587.
2. Panizza, P.; Onetto, S.; Rodríguez, S. *Biocatal. Biotransform.* **2007**, *25* (5), 414-417.
3. Kazlauskas, R.; Weissfloch, A.; Rappaport, A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (8), 2656-2665.
4. Suzuki, Y.; Kaneno, D.; Tomoda, S. *J. Phys. Chem.* **2009**, *113*, 2578-2583.
5. Frater, G.; Müller, U.; Günther, W. *Tetrahedron* **1984**, *40* (8), 1269-1277.
6. Ravía, S.; Carrera, I.; Seoane, G.; Vero, S.; Gaménara, D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20* (12), 1393-1397.
7. Gaménara, D.; Seoane, G.; Saenz-Mendez, P.; Dominguez de María, P. *Reactions involving dehydrogenases In Redox Biocatalysis. Fundamentals and applications*; John Wiley & Sons. Inc., 2012; p. 102.
8. Yoshizako, F.; Kuramoto, T.; Izumi, M.; Kirihata, M.; Dohmaru, T.; Iwamoto, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64* (1), 194-197.
9. Bastos Borges, K.; de Souza Borges, W.; Durán Patrón, R.; Tallarico Pupo, M.; Sueli Bonato, P.; González Collado, I. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20* (4), 385-397
10. Hargreaves, J.; Mansfield, J.; Coxon, D. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 2.
11. Pinedo-Rivilla, C.; Carrara, M.; Aleu, J.; Regina, A.; Collado, I. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 6.
12. Aleu, J.; Gonzalez, I. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *13*, 6.
13. Fukuda, D.; Brannon, D. *Appl. Microbiol.* **1971**, 1.
14. Kirk, T.; Croan, S.; Tien, M. *Enzyme Microb. Technol.* **1986**, *8* (1), 5.
15. Singh, D.; Chen, S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81* (3), 18.
16. Muheim, A.; Waldner, R.; Sanglard, D.; Reiser, J.; Schoemaker, H.; Leisola, M. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *195*, 6.
17. Patel, R.; Chu, I.; Chidambaram, R.; Zhu, J.; Kant, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 349-355.
18. Muniruzzaman, S.; Hiroyuki, K.; Izumori, K. *J. Ferment. Bioeng.* **1994**, *78* (5), 4.
19. Bergo de Lacerda, P. S.; Ribeiro, J. B.; Leite, S. G. F.; Ferrara, M. A.; Coelho, R. B.; Bon, E. P. S.; da Silva Lima, E. L.; Antunes, O. A. C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17* (8), 1186-1188.

20. He, J. Y.; Sun, Z. H.; Ruan, W. Q.; Xu, Y. *Process Biochem.* **2006**, *41* (1), 244-249.
21. Alvarez, L.; Acevedo, F.; Illanes, A. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 7.
22. Ushio, K.; Inouye, K.; Nakamura, K.; Oka, S.; Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27* (23), 3.
23. Nakamura, K.; Fujii, M.; Ida, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 3147-3153.
24. Nakamura, K.; Inoue, Y.; Matsuda, T.; Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (35), 6263-6266.
25. Nakamura, K.; Fujii, M.; Ida, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12* (22), 3147-3153.
26. Nakamura, K.; Kawai, Y.; Nakajima, N.; Ohno, A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (15), 4778-4783.
27. Fernandes Assis, L.; Kagohara, E.; Omori, A. T.; Comasseto, J. V.; Helgueira Andrade, L.; Meleiro Porto, A. L. *Food Technol. Biotechnol.* **2007**, *45* (4), 415-419.
28. Comasseto, J. V.; Helgueira Andrade, L.; Omori, A. T.; Fernandes Assis, L.; Meleiro Porto, A. L. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *29* (1-6), 55-61.
29. Kalaitzakis, D.; Smonou, I. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3919-3921.
30. Hughes, D. *The Mitsunobu reaction* In *Organic reactions*; al., L. A. P. e. Ed.; John Wiley & Sons, Inc., 1992.
31. Ravía, S.; Risso, M.; Kröger, S.; Vero, S.; Seoane, G.; Gamenara, D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24* (19), 1207-1211.
32. Mc.Lafferty, F. *Anal. Chem.* **1959**, *31* (1), 82-87.

Conclusiones y Trabajo a Futuro

5. CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO

1. CONCLUSIONES

1.1 Evaluación de biocatalizadores y metodologías

Se realizó un screening de cepas de hongos y levaduras junto a la evaluación de dos metodologías enzimáticas diferentes (reducciones y desracemizaciones) para la preparación de precursores α -metil- β -hidroxiéster quirales, necesarios en la síntesis de feromonas sexuales de coleópteros.¹ Se seleccionó la cepa *Aureobasidium pullulans* (CCM H1) como mejor biocatalizador, al exhibir los mejores resultados: 24 h de biotransformación, conversión 99%, 92% *ed* y 94% *ee* para el (2*S*,3*S*)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo.

En el ensayo de desracemización con *A. terreus* se obtuvo como producto mayoritario el estereoisomero buscado (2*S*,3*R*)-2-hidroxi-3-metilbutanoato de etilo.

Se determinó la temperatura óptima de crecimiento para las temperaturas estudiadas y se realizó el escalado de la biotransformación a 1 g de sustrato.

1.2 Síntesis de sitofilato

Se desarrolló una ruta quimioenzimática para el (2*R*,3*R*)-sitofilato y (2*S*,3*R*)-sitofilato utilizando el biocatalizador y metodología seleccionada en la etapa anterior.

Se sintetizaron la feromona de agregación de *S. granarius* (2*S*,3*R*)-sitofilato y su estereoisomero (2*R*,3*R*)-sitofilato.²

2. TRABAJO A FUTURO

Se plantea mejorar los resultados de rendimiento y excesos diastereo- y enantioméricos en la reducción del 2-metil-3-oxobutanoato de etilo con *Aureobasidium pullulans* (CCM H1), a través de la optimización de condiciones de biotransformación, como por ejemplo relación sustrato/biocatalizador, uso de co-solventes, utilización de inhibidores enzimáticos, etc..

Si bien en la desracemización con *A. terreus* se obtuvo como producto mayoritario el estereoisomero buscado (2*S*,3*R*)-2-hidroxi-3-metilbutanoato de etilo, los bajos valores de conversión y exceso enantiomérico resultaron en desestimación de esta técnica para la síntesis de sitofilato. Por lo tanto, se plantea estudiar a futuro diferentes condiciones del ensayo (uso de

inhibidores enzimáticos, edad del cultivo, temperatura de la biotransformación, etc.) a los efectos de optimizar el proceso.

Referencias bibliográficas

1. Ravía, S.; Carrera, I.; Seoane, G.; Vero, S.; Gamenara, D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20* (12), 1393-1397.
2. Ravía, S.; Risso, M.; Kröger, S.; Vero, S.; Seoane, G.; Gamenara, D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24* (19), 1207-1211.

Parte Experimental

6. PARTE EXPERIMENTAL

1. MATERIALES Y MÉTODOS

Los disolventes utilizados fueron destilados previamente a su uso, secados y purificados según la literatura especializada.¹ Las reacciones en condiciones anhidras se llevaron a cabo bajo atmósfera de nitrógeno. Los reactivos comerciales fueron obtenidos de Sigma-Aldrich y usados sin mayor purificación.

Para el seguimiento de las reacciones se utilizó cromatografía en capa fina (TLC) de silica gel flash (Kieselgel HF254 de Macherey-Nagel) visualizadas con luz UV (254 nm) o utilizando anisaldehído o ácido fosfomolibdico como reveladores.

Las cromatografías en columna se realizaron utilizando silica gel (Kieselgel 60, 230-400 mesh) de Macherey-Nagel como fase estacionaria.

Para la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se empleó un equipo Bruker Avance DPX-400 MHz. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a 30°C, utilizando como disolvente CDCl₃ y TMS como estándar interno. Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz.

La rotación específica fue medida a 25°C en un polarímetro Zuzi 412 usando una celda de 0.5 dm. Los valores de $[\alpha]_D$ están dados en °.cm².g⁻¹ y los valores de concentración se expresan en g/100 mL.

Todos los procedimientos microbiológicos se desarrollaron utilizando técnica aséptica. Los materiales, accesorios, soluciones y medios de cultivo fueron esterilizados por calor húmedo o seco previo a su utilización.

Las biotransformaciones se llevaron a cabo en shaker orbitales termostatizados Thermoforma (modelo 420) y Sanyo (modelo IOX400.XX2.C).

El seguimiento de las biotransformaciones y de algunas de las reacciones fue realizado por cromatografía gaseosa en equipos Shimadzu Modelos 2010 y 2014 con detector FID y columnas Megadex DET-TBS (25 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) para cromatografía gaseosa quiral y Carbowax 20 MEGA (0.25 mm x 30 m x 0.25 μ m) respectivamente. Los programas de temperatura utilizados en la cromatografía gaseosa quiral fueron: Programa 1: 60°C / 1°C/min / 70°C (10 min) / 2°C/min / 150°C (5 min), Programa 2: 60 °C (0 min) / 2 °C/min / 120 °C (0 min) / 10 °C/min / 150 °C (5 min), T_{split} :

220°C, T_{FID}: 250°C. En cromatografía gaseosa no quiral se utilizó el Programa 3: 60 °C (5min) / 140 °C (0 min) / 8°C/min / 240 °C (5 min) / 25°C/ min. El exceso enantiomérico y la configuración absoluta de los productos se determinaron por cromatografía gaseosa quiral, comparando con estándares previamente descritos en la literatura.

Para los espectros de masa se utilizó un equipo GC-MS QP-2010 Shimadzu. Los espectros de EI-MS (ionización electrónica-MS) fueron obtenidos en modo scan desde *m/z* 40 a 350.

Las cepas de hongos y levaduras utilizadas pertenecen a la colección del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biociencias (Facultad de Química, UDELAR).

Se utilizaron lipasas comerciales: lipasa A (Chirazyme L5-Lyo) y B de *Candida antarctica* (Novozym 435) proporcionadas por las firmas Roche y Novo Nordisk respectivamente.

Las cepas de *Escherichia coli* recombinantes utilizadas fueron JM105 (expresando la enzima aldolceto-reductasa Gcy1p) y BPL1 (DE3) $\Delta yqhE$ (pPP4), pertenecen a la colección del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biociencias (Facultad de Química, UDELAR), y se encuentran almacenadas en freezer a -70 °C.

2. DESCRIPCIÓN DE LOS EXPERIMENTOS

2.1 2-metil-3-oxobutanoato de etilo (2)

2.1.1 Método I

En un balón bajo atmósfera de nitrógeno, se preparó una solución de etóxido de sodio en etanol, agregando sodio (0.35 g, 15 mmol) en etanol absoluto (0.70 g, 15 mmol) a reflujo. Una vez consumido el sodio se llevó la reacción a temperatura ambiente y se agregó 3-oxobutanoato de etilo (2.0 g, 15 mmol) y yoduro de metilo (2.13 g, 15 mmol) a través de un ecualizador. Una vez finalizada la reacción, se filtró y se destiló el disolvente a presión reducida. El residuo se tomó en 20 mL de acetato de etilo, se lavó con ácido clorhídrico 0.05% (3 × 5 mL), y la fase orgánica se secó con sulfato de magnesio anhidro. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla hexano:acetato de etilo 9:1, como fase móvil. Rendimiento 18%. Aceite amarillo pálido.

2.1.2 Método II

En un balón bajo atmósfera de nitrógeno, se preparó una solución de 3-oxobutanoato de etilo (2.0 g, 15 mmol) en dimetilformamida (10 mL) y se agregó carbonato de potasio (1.10 g, 8 mmol) con agitación. Por último, se agregó sulfato de dimetilo (0.97 g, 8 mmol) y se dejó llegar a reflujo. Se observó la descomposición del material de partida.

2.1.3 Método III

Se activó alúmina (19.5 g) por calentamiento a 180 °C y a vacío durante 4 horas. La alúmina recientemente activada se suspendió en una solución de etóxido de sodio en etanol (15 mmol Na, 10 mL EtOH absoluto) y se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción, se destiló el disolvente a presión reducida. En un balón de 150 mL y bajo atmósfera de nitrógeno, se adicionó 3-oxobutanoato de etilo (1.95 g, 15 mmol) al etóxido de sodio adsorbido sobre alúmina recientemente activada. La reacción se agitó durante 30 min, y se agregó yoduro de metilo (2.13 g, 15 mmol). Una vez finalizada la reacción se purificó el crudo mediante filtración con sílica gel flash (5.5 g) y se lavó con abundante diclorometano. Se destiló el disolvente a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de hexano:acetato de etilo 95:5 como fase móvil. Rendimiento: 25%. Aceite amarillo pálido.

2.1.4 Método IV

En un balón bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió 3-oxobutanoato de etilo (0.20 g, 15 mmol) en acetona anhidra (2 mL). Se agregó carbonato de potasio seco (0.199 g, 1 mmol), y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se agregó yoduro de metilo (0.12 mL, 2 mmol) y se calentó a reflujo durante 12 horas. Una vez completada la reacción, se agregó éter etílico (3 mL) y se filtró la mezcla. Se evaporó el disolvente a presión reducida, y el residuo se purificó por columna cromatográfica utilizando una mezcla hexano:acetato de etilo 95:5 como fase móvil. Se siguió la reacción mediante cromatografía gaseosa utilizando el Programa 2. Rendimiento 95 % (0.211 g). Aceite amarillo pálido, GC: Programa 2: $t_r = 26.58$ min. (no se resuelven los enantiómeros).

^1H RMN: δ (ppm) = 1.09 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3), 1.10 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 2.05 (s, 3H, CH_3), 3.33 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, CH), 4.00 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2).

^{13}C RMN: δ (ppm) = 12.3 (CH_3), 13.7 (CH_3), 28.1 (CH_3), 53.1 (CH), 60.9 (CH_2), 170.1 (C=O), 203.3 (C=O).

2.2 2-metil-3-oxopentanoato de etilo (5)

En un balón bajo atmósfera de nitrógeno se disolvió 3-oxopentanoato de etilo (0.22 g, 2 mmol) en acetona anhidra (2 mL). Se agregó carbonato de potasio seco (0.20 g, 1 mmol) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se agregó yoduro de metilo (0.12 mL, 2 mmol) y se calentó a reflujo durante 12 horas. Una vez completada la reacción, se agregó éter etílico (3 mL) y se filtró la mezcla. Se evaporó el disolvente a presión reducida, y el residuo se purificó por columna cromatográfica utilizando una mezcla hexano:acetato de etilo 95:5 como fase móvil. Se siguió la reacción mediante cromatografía gaseosa utilizando el Programa 2. Rendimiento 90 %. Aceite amarillo (pálido). GC: Programa 2: t_r = 18.27 min., 19.44 min.

^1H RMN: δ (ppm) = 1.08 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3), 1.27 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3), 1.34 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3), 2.57 (m, 2H, CH_2), 3.52 (q, J = 7.2 Hz, 1H, CH), 4.19 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2).

^{13}C RMN: δ (ppm) = 7.6 (CH_3), 12.8 (CH_3), 14.0 (CH_3), 34.6 (CH_2), 52.5 (CH), 61.2 (CH_2), 170.7 (C=O), 206.5 (C=O).

2.3 (2R,3R)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo, (2S,3S)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (3c,3d)

Sobre una solución de 3 mL de diisopropilamina destilada (0.11 g, 1.1 mmol,) en 2 mL de tetrahidrofurano a 0 °C y bajo atmósfera de nitrógeno, se agregó 0.91 mL de una solución 1.23 M de *n*-butillitio en hexano y se agitó durante 5 minutos. La solución de diisopropilamida de litio (LDA) formada se llevó a -50 °C y se agregó (0.074 g, 0.56 mmol) de la mezcla racémica de 3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo. Se aumentó la temperatura a 0 °C, se agregó yoduro de metilo (0.080 g, 0.56 mmol) y se agitó durante 30 min. Una vez finalizada la reacción, se agregó hielo picado (20 g) y se extrajo con acetato de etilo (3 × 3 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de magnesio anhidro y se destiló el disolvente a presión reducida. El crudo se purificó por columna cromatográfica de sílica gel flash utilizando una mezcla hexano:acetato de etilo 8:2 como fase móvil. El avance de la reacción se monitoreó mediante cromatografía gaseosa. Rendimiento: 87%. Aceite amarillo pálido, ee: 4% (2S,3S). GC: Programa 2: t_r = 20.00 min, 21.93 min.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1.21 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.24 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 2.23 (s, 1H, OH), 2.46 (quinteto_{anti}, $J = 7.2$ Hz, 1 H, CH), 3.90 (quinteto_{anti}, $J = 6.5$ Hz, 1 H, CH), 4.2 (m, 2H, CH_2).

^{13}C RMN: δ (ppm) = 11.39 (CH_3), 14.57 (CH_3)_{anti}, 21.15 (CH_3)_{anti}, 47.32 (CH)_{anti}, 60.97 (CH_2), 69.86 (CH)_{anti}, 176.1, (C=O).

GC: Programa 1: $t_{r1d} = 36.037$ min, $t_{r1c} = 33.265$ min, $t_{r1b} = 31.934$ min $t_{r1a} = 29.513$.

2.3 (2S,3S)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo (6d)

Sobre una solución de 3 mL de diisopropilamina destilada (0.11 g, 1.1 mmol,) en 2 mL de tetrahidrofurano a 0 °C y bajo atmósfera de nitrógeno, se agregó 0.91 mL de una solución 1.23 M de *n*-butillitio en hexano y se agitó durante 5 minutos. La solución de LDA formada se llevó a -50 °C y se agregó (3S)-hidroxipentanoato de etilo (**8**) (0.089 g, 0.56 mmol). Se aumentó la temperatura a 0 °C, se agregó yoduro de metilo (0.035 mL, 0.56 mmol) y se agitó durante 30 min. Una vez finalizada la reacción, se agregó hielo picado (20 g) y se extrajo con acetato de etilo (3 × 3 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de magnesio anhidro y se destiló el disolvente a presión reducida. El crudo se purificó por columna cromatográfica de sílica gel flash utilizando una mezcla hexano:acetato de etilo 8:2 como fase móvil. El avance de la reacción se monitoreó mediante cromatografía gaseosa. Rendimiento: 78%, *ee*: > 99%. Aceite amarillo pálido. Programa 2: $t_r = 24.11$ min.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.21 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.28 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3), 1.47 (m, 1H, CH_2), 1.59 (ddq, $J_1 = 13.9$ Hz, $J_2 = 7.5$ Hz, $J_3 = 4.0$ Hz, H, CH_2), 2.53 (dq, $J_1 = 7.2$ Hz, $J_2 = 6.4$ Hz, H, CH), 3.60 (ddd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 6.3$ Hz, $J_3 = 4.0$ Hz, H, CH), 4.17 (q, $J_1 = 7.0$ Hz, 2H, CH_2).

^{13}C RMN: δ (ppm) = 10.0(CH_3), 14.3(CH_3), 14.5 (CH_3), 27.7 (CH_2), 44.9 (CH), 60.7 (CH_2), 74.8 (CH), 176.2(C=O).

2.4 (2S,3R) 3-*p*-nitrobenzoiloxi-2-metilpentanoato de etilo (11)

En un balón bajo atmósfera de nitrógeno se agregó (2S,3S)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo (0.18 g, 1.1 mmol), trifetilfosfina (0.39 g, 1.5 mmol) y ácido *p*-nitrobenzoico (0.25 g, 1.5 mmol) en 10 mL de disolvente. Por último, se agregó gota a gota azodicarboxilato de diisopropilo (0.30 g, 1.5 mmol) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 72 horas. Luego de finalizada la

reacción se destiló el disolvente a presión reducida y el crudo se purificó por columna cromatográfica de silica gel flash utilizando una mezcla hexano:acetato de etilo 95:5 como fase móvil. Aceite incoloro. Rendimiento: 7% (Disolvente: Benceno), 43%, (Disolvente: THF).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.98 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH_3), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_3), 1.27 (d, J = 7.1 Hz, 3H, CH_3), 1.79 (m, 2H, CH_2), 2.84 (dq, J_1 = 7.1 Hz, J_2 = 5.1 Hz, H, CH), 4.13 (m, 2H, CH_2), 5.41 (dt, J_1 = 8.0 Hz, J_2 = 5.2 Hz, H, CH), 8.19 (m, 2H, ArH), 8.29 (m, 2H, ArH).

^{13}C RMN: δ (ppm): 9.9 (CH_3), 11.7 (CH_3), 14.1 (CH_3), 24.9 (CH_2), 42.7 (CH), 60.6 (CH_2), 76.7 (CH), 123.6 (CAr), 130.7 (CAr), 135.7 (CAr), 150.7 (CAr), 164.2 (C=O), 173.5 (C=O).

2.5 (2S,3R)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo (6b)

En un balón con el producto **(11)** (0.14 g, 0.47 mmol) disuelto en la mínima cantidad de etanol absoluto (3 mL), se agregó K_2CO_3 en cantidad catalítica y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 96 horas. Luego de finalizada la reacción se filtró el K_2CO_3 y se destiló el disolvente a presión reducida. El crudo se purificó por columna cromatográfica de silica gel flash utilizando una mezcla hexano:acetato de etilo 95:5 como fase móvil. Rendimiento: 90% (0.068 g, 0.42 mmol). Aceite amarillo pálido. GC: Programa 2: t_r = 22.48 min.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.99 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH_3), 1.19 (d, J = 7.3 Hz, 3H, CH_3), 1.30 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3), 1.47 (m, 1H, CH_2), 1.49 (m, H, CH_2), 2.56 (m, H, CH), 3.83 (m, 1H, CH), 4.18 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2).

^{13}C RMN: δ (ppm) = 10.4(CH_3), 14.2(CH_3), 14.2 (CH_3), 26.7 (CH_2), 43.8 (CH), 60.6 (CH_2), 73.2 (CH), 175.4(C=O).

2.6 3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (3a, 3b, 3c, 3d)

Reducción química

En un balón bajo atmósfera de nitrógeno y a temperatura ambiente se preparó una suspensión de borohidruro de sodio (0.24 g, 0.646 mmol) en 20 mL de etanol absoluto y se agregó 2-metil-3-oxobutanoato de etilo (0.20 g, 1,4 mmol). La reacción se completó luego de 3 horas, se filtró y se destiló el disolvente a presión reducida. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de silica gel flash utilizando una mezcla hexano:acetato de etilo 8:2 como fase móvil. Rendimiento: 95 %.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1.21 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.24 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 2.23 (s, 1H, OH), 2.46 (quinteto_{anti}, $J = 7.2$ Hz, 1 H, CH), 2.52 (dq_{syn}, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 3.8$ Hz, 1 H, CH), 3.90 (quinteto_{anti}, $J = 6.5$ Hz, 1 H, CH), 4.09 (dq_{syn}, $J_1 = 6.5$, $J_2 = 4.0$ Hz, 1 H, CH), 4.2 (m, 2H, CH_2).

^{13}C RMN: δ (ppm) = 11.39 (CH_3), 14.49 (CH_3)_{syn}, 14.57 (CH_3)_{anti}, 20.12 (CH_3)_{syn}, 21.15 (CH_3)_{anti}, 45.89 (CH)_{syn}, 47.32 (CH)_{anti}, 60.97 (CH_2), 68.39 (CH)_{syn}, 69.86 (CH)_{anti}, 176.1, (C=O).

GC: Programa 1: $t_{r1d} = 36.037$ min, $t_{r1c} = 33.265$ min, $t_{r1b} = 31.934$ min $t_{r1a} = 29.513$.

2.7 3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo (6a, 6b, 6c, 6d)

Reducción química

En un balón bajo atmósfera de nitrógeno y a temperatura ambiente se preparó una suspensión de borohidruro de sodio (0.24 g, 0.646 mmol) en 20 mL de etanol absoluto y se agregó 2-metil-3-oxopentanoato de etilo (0.21 g, 1.4 mmol). La reacción se completó en 3 horas, se filtró y se destiló el disolvente a presión reducida. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de silica gel flash utilizando una mezcla hexano:acetato de etilo 8:2 como fase móvil. Rendimiento: 95 %.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.99 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH_3), 1.22 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.46 (m, 1H, CH_2), 1.56 (m, 1H, CH_2), 2.54 (dq, $J_1 = 7.1$ Hz, $J_2 = 6.8$ Hz, 1H, CH), 3.60 (m_{anti}, 1H, CH), 3.83 (m_{syn}, 1H, CH), 4.18 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2).

^{13}C RMN: δ (ppm): 9.8 (CH_3), 14.2 (CH_3), 14.2 (CH_3), 27.6 (CH_2), 44.8 (CH), 60.6 (CH_2), 74.7 (CH), 176.2 (C=O).

GC: Programa 2: $t_{r3d} = 24.20$ min., $t_{r3c} = 23.70$ min., $t_{r3b} = 23.03$ min., $t_{r3a} = 21.76$ min.

2.8 (2R,3S)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (3a)

Reducción enzimática con *E. coli* JM105

Se sembró una placa de petri con medio LB-ampicilina con *E. coli* JM105 y se mantuvo en estufa a 37 °C durante 24 horas. Se tomó una colonia y se inoculó en un tubo de ensayo con 5 mL de caldo LB-ampicilina*. Este precultivo se incubó durante 24 horas en shaker orbital a 37 °C y 200 rpm. Transcurrido este tiempo, se inoculó 100 mL (en erlenmeyer de 250 mL) de caldo fresco de LB-ampicilina con 1 mL del precultivo. Este nuevo cultivo se incubó a 30 °C y 200 rpm en shaker orbital

hasta alcanzar un OD_{600} de 0.5. En ese momento se agregó IPTG (para una concentración final de 1 mM) y 2-metil-3-oxobutanoato de etilo (0.16 g, 10 mM), obteniendo (2*R*,3*S*)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (**3a**). Rendimiento: 55%, Conversión: 55%, *anti/syn*: 1/99, *ee*: > 99%.

*Caldo LB-ampicilina (g/15 mL caldo): triptona (0.15), extracto de levadura (0.075), cloruro de sodio (0.15), ampicilina (0.003).

2.9 (2*S*,3*S*)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (3d)

Reducción enzimática con *E. coli* BL21

Se sembró una placa de petri con medio LB-ampicilina con *E. coli* BL21 y se mantuvo en estufa a 37 °C durante 24 horas. Se inoculó una colonia en 5 mL de caldo LB-ampicilina y se incubó durante 24 h en shaker orbital a 37 °C y 200 rpm. Transcurrido este tiempo, se inoculó 100 mL (en erlenmeyer de 250 mL) de caldo fresco de LB-ampicilina con 1 mL del precultivo. Este cultivo se incubó a 30 °C y 200 rpm, hasta alcanzar un OD_{600} de 0.5. En ese momento se agregó IPTG (para una concentración final de 1 mM) y 2-metil-3-oxobutanoato de etilo (1.44g, 10 mM). Rendimiento: 81%, conversión: 100%, *anti/syn*: 89/11, *ee*: 68%.

2.10 (3*S*)-hidroxipentanoato de etilo (8)

Reducción enzimática con *E. coli* BL21

Se sembró una placa de petri con medio LB-ampicilina con *E. coli* BL21 y se mantuvo en estufa a 37 °C durante 24 horas. Se inoculó una colonia en 5 mL de caldo LB-ampicilina y se incubó durante 24 h en shaker orbital a 37 °C y 200 rpm. Transcurrido este tiempo, se inoculó 100 mL (en erlenmeyer de 250 mL) de caldo fresco de LB-ampicilina con 1 mL del precultivo. Este cultivo se incubó a 30 °C y 200 rpm, hasta alcanzar un OD_{600} de 0.5. En ese momento se agregó IPTG (para una concentración final de 1 mM) y el 3-oxopentanoato de etilo (1.44g, 10 mM). Rendimiento: 28%, conversión: 100%, *ee*: >99%.

2.11 Procedimiento para la reducción enzimática con hongos y levaduras

2.12.1 Células en crecimiento

Para la reducción enzimática de α -metil- β -cetoésteres se utilizaron las siguientes cepas de hongos y levaduras: *Penicillium expansum* (CCM P17), *Aureobasidium pullulans* (CCM H1), *Penicillium italicum* (CCM L7), *Aspergillus terreus* (BFQU 121), *Geotrichum candidum* (CCM H38), *Trichoderma koningii* (ATCC 76666), *Botrytis cinérea* (CCM P18), *Alternaria sp.* (CCM A3), *Trichoderma artroviride* (CCM M2), *Rhizopus sp.* (CCM H43), *Aspergillus niger* (CCM H21), *Phanerochaete chrysosporium* (CCM B4), *Kluyveromyces marxianus* (NRRL Y-8281). Las cepas fueron cultivadas en tubos de PDA (potato dextrose agar) en pico de flauta durante 3 días a 28 °C. A partir de estos cultivos se prepararon suspensiones de levaduras y de esporas (en el caso de hongos filamentosos) en suero fisiológico estéril, de concentración aproximada a 1×10^7 células/mL. En el caso de los hongos las esporas se contaron en cámara de Neubauer, ajustando luego la concentración por dilución, y en el caso de la levadura la concentración se obtuvo por comparación con el tubo N° 4 de la escala de Mac Farland.

Las suspensiones microbianas preparadas (2 mL) se agregaron en diferentes matraces erlenmeyer de 100 mL con 25 mL del medio de cultivo A. Los cultivos se incubaron en shaker orbital durante 3 días a 25 °C y 100 rpm. Pasado el tiempo de incubación se agregaron 0.05 mL (0.05 g, 0.00034 mol) del 2-metil-3-oxobutanoato de etilo, siguiendo el protocolo de Yoshizako, F. *et al.*² Se tomaron alícuotas de 0.5 mL a las 24, 48, 72 y 96 horas. Se extrajo el medio de cultivo con acetato de etilo (3 \times 5 mL), la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se destiló el disolvente a presión reducida. Las fracciones se analizaron por cromatografía gaseosa quiral, utilizando el Programa 1.

Medio de cultivo A (g/L): sacarosa (50), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5), HK_2PO_4 (2), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.25) y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.25).

2.12.2 Células en reposo

Para las biotransformaciones con células en reposo se utilizaron las siguientes cepas de hongos filamentosos: *Aspergillus terreus* (BFQU 121) *Trichoderma koningii* (ATCC 76666), *Rhizopus sp.* (CCM H43), *Phanerochaete chrysosporium* (CCM B4).

Las cepas fueron cultivadas en tubos de PDA en pico de flauta durante 3 días a 28 °C. A partir de estos cultivos se prepararon suspensiones de esporas (en el caso de hongos filamentosos) de

concentración aproximada a 1×10^7 células/mL. Las esporas se contaron en cámara de Neubauer, ajustando luego la concentración por dilución.

Las suspensiones microbianas preparadas (2 mL) se agregaron en diferentes matraces erlenmeyer de 100 mL con 25 mL del medio de cultivo A. Los cultivos se incubaron en shaker orbital durante 3 días a 25 °C y 100 rpm. Se extrajo el cultivo obtenido y la biomasa se transfirió a un erlenmeyer de 100 mL, con 25 mL de agua destilada y 2-metil-3-oxobutanoato de etilo (0.05 g, 0.34 mmol). La biotransformación se agitó en shaker orbital a 25 °C y 100 rpm y se tomaron alícuotas de 0.5 mL a las 24, 48, 72 y 96 horas. Se extrajo medio de cultivo con acetato de etilo (3×5 mL), se secó la fase orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro y se destiló el disolvente a presión reducida. La reacción se monitoreó por cromatografía gaseosa utilizando el Programa 1.

2.12.3 Caracterización del crecimiento de *A. pullulans* en las condiciones de cultivo

2.12.3.1 Determinación de la temperatura óptima de cultivo

Los experimentos se llevaron a cabo a 25, 28 y 32 °C. Se determinó la temperatura óptima de trabajo como la temperatura a la cual la velocidad de crecimiento de la levadura fue máxima. Se construyeron curvas de crecimiento y se determinó en cada caso la pendiente de la fase exponencial de crecimiento la cual representa velocidad máxima de crecimiento en dichas condiciones. Para ello se graficaron los valores de $\ln(X_t/X_0)$ en función del tiempo, siendo X_0 y X_t la biomasa inicial y la obtenida al tiempo t , respectivamente. De la pendiente correspondiente a la fase exponencial de esta última gráfica se determinó la velocidad específica máxima para cada temperatura. Las velocidades obtenidas se graficaron en función de la temperatura de crecimiento, determinándose la temperatura óptima. Se realizaron los ensayos por triplicado para obtener las curvas de crecimiento. **2.13.3.2** Los resultados se presentan en el capítulo de resultados y discusión.

2.12.3.2 Escalado de la producción de biomasa

Con el fin de obtener un mayor volumen de producto final se decidió realizar el ensayo a mayor escala utilizando células en crecimiento de la cepa seleccionada de *A. pullulans*. En primer lugar se determinó si las nuevas condiciones de ensayo modificaban el crecimiento del hongo. Para ello se realizaron dos ensayos de crecimiento utilizando el medio de cultivo A. Un ensayo se realizó en las condiciones indicadas en el ensayo de selección (matraz Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 25 mL de medio de cultivo, incubado durante tres días a 25 °C con agitación orbital de 100 rpm). El otro

ensayo se realizó en matraz de 1 litro de capacidad conteniendo 500 mL de medio de cultivo, incubado por 3 días a 28 °C en agitador orbital a 150 rpm. Al final de cada ensayo se determinó la concentración de biomasa final (medida como peso seco) en cada tratamiento. Cada ensayo se realizó por duplicado, determinándose los valores medios y los intervalos de confianza ($\alpha = 0.05$) en cada caso. Los resultados se presentan en el capítulo de resultados y discusión.

2.13 (2S,3S)-3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (3d)

Procedimiento para la reducción en escala preparativa con *A. pullulans*

Se dejó proliferar y esporular *A. pullulans* durante 3 días en tubos pico de flauta con PDA a 28 °C. Luego de crecido el cultivo, se tomó con un ansa parte del micelio y se inocularon 500 mL del mismo medio de cultivo en un erlenmeyer de 1 L. El cultivo se incubó por 3 días en shaker orbital a 28 °C y 150 rpm. Se agregó 2-metil-3-oxobutanoato de etilo (1 g, 6.9 mmol) y se incubó en shaker por 96 horas y en las mismas condiciones. Se extrajo el medio de cultivo con acetato de etilo, se secó la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro y se destiló el disolvente a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna de sílica gel flash utilizando una mezcla hexano:acetato de etilo 8:2 como fase móvil. Rendimiento: 75%, Conversión: 100%, *syn/anti*: 3/97, *ee*: > 99%, $[\alpha]_D^{20} = 22.5$ (c 1.20, CHCl₃).

2.14 (2R,3R)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo y (2S,3S)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo (6c, 6d)

Procedimiento para la reducción en escala preparativa con *A. pullulans*

Se dejó proliferar y esporular *A. pullulans* durante 3 días en tubos pico de flauta con PDA a 28 °C. Luego de crecido el cultivo, se tomó con un ansa parte del mismo y se inocularon 500 mL del mismo medio de cultivo en un erlenmeyer de 1L. El cultivo se incubó por 3 días en shaker orbital a 28 °C y 150 rpm. Se agregó 2-metil-3-oxopentanoato de etilo (1 g, 6.3 mmol) y se incubó por 96 horas y en las mismas condiciones. Se extrajo el medio de cultivo con acetato de etilo, se secó la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro y se destiló el disolvente a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna de sílica gel flash utilizando una mezcla hexano:acetato de etilo 8:2 como fase móvil. Rendimiento: 50%, conversión: 90 % (456 mg, 2.84 mmol), *syn/anti*: 1/99, *ee*: 44% (2S,3S).

2.15 Procedimiento para la estereoinversión enzimática (desracemización) catalizada por hongos

Para esta biotransformación se utilizaron las siguientes cepas de hongos y levaduras: *A. pullulans* (CCM H1), *P. italicum* (CCM L7), *A. terreus* (BFQU 121), *G. candidum* (CCM H38), *T. koningii* (ATCC 76666), *Rhizopus sp.* (CCM H43), *K. marxianus* (NRRL Y-8281) y *A. ochraceus* (CCM H22). Las cepas fueron cultivadas en tubos de PDA en pico de flauta durante 3 días a 28 °C. A partir de estos cultivos se prepararon suspensiones de esporas (en el caso de hongos filamentosos) y de levaduras en suero fisiológico estéril, de concentración aproximada a 1×10^7 células/mL. En el caso de los hongos las esporas se contaron en cámara de Neubauer, ajustando luego la concentración por dilución, y en el caso de la levadura la concentración se obtuvo por comparación con el tubo N° 4 de la escala de Mac Farland.

Las suspensiones microbianas preparadas (2 mL) se agregaron en diferentes matraces erlenmeyer de 200 mL con 50 mL del medio de cultivo B. Los cultivos se incubaron en shaker orbital durante 3 días a 30 °C y 150 rpm.

En el caso de *A. pullulans* y *K. marxianus* se tomó con un ansa parte del cultivo y se inoculó. Se incubó en shaker orbital durante 3 días a 30 °C y 150 rpm. El cultivo obtenido se extrajo, la biomasa (0.5 g de células mojadas) se transfirió a un vial con 3 mL de agua destilada, y la mezcla racémica 3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (0.015 g, 0.10 mmol) y se incubó en shaker orbital a 30°C y 150 rpm. Se tomaron alícuotas a 24, 48 y 96 horas y se extrajo medio de cultivo con acetato de etilo (3 × 1 mL). Se secó la fase orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro y se destiló el disolvente a presión reducida. La reacción se monitoreó por cromatografía gaseosa utilizando el Programa 1.

Medio de cultivo B (g/3 mL): glicerol (1.5), extracto de levadura (0.5), polipeptona (0.25).

2.16 Procedimiento para el estudio de la inhibición de la desracemización de *G. candidum*

Se dejó proliferar y esporular *G. candidum* (CCM H38) en tubos pico de flauta con PDA a 28 °C durante 3 días. A 50 mL de medio de cultivo A se agregó una suspensión de esporas (1×10^7 esporas/mL) y se dejó crecer el cultivo durante 3 días en shaker orbital a 30 °C y 150 rpm. En un vial con 3 mL de agua destilada se colocaron 0.5 g de células mojadas, la mezcla racémica 3-hidroxi-2-metilbutanoato de etilo (0.015 g, 0.10 mmol) y alcohol alílico (0,0046 g, 0.079 mmol) como agente inhibidor. La biotransformación se llevó a cabo en shaker orbital a 30 °C y 150 rpm. Se tomaron

alícuotas, a 24, 48 y 96 h, se extrajo el medio de cultivo con éter etílico (3 × 1 mL), se secó la fase orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro y destiló el disolvente a presión reducida.

2.17 Acetilación catalizada con Cal B de la mezcla diastereomérica (3a, 3b, 3c, 3d)

En un vial de 5 mL se colocó la mezcla diastereomérica (**3**) (0.050 g, 0.00034 mol), 15 mg de lipasa B de *C. antarctica* (Cal B, Novozym 435) y acetato de vinilo (0.030 g, 0,35 mmol) en hexano como disolvente. Se agitó la mezcla de reacción durante 3 horas a 200 rpm en shaker orbital a 30 °C. La reacción se monitoreó por cromatografía gaseosa y una vez finalizada se filtró la enzima y se destiló el disolvente a presión reducida. GC: Programa 1: $t_{\text{productos acetilados}} = 35.693$ y 35.498 min., $t_{1a} = 29.859$ min, $t_{1d} = 36.279$ min.

Mezcla (3b1, 3c1)

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1.21 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH_3), 1.24 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 2.05 (s, 3H, CH_3), 2.46 (m_{anti} 1 H, CH), 2.52 (m_{syn} , 1 H, CH), 3.9 (m_{anti} , 1 H, CH), 4.09 (dq_{syn} , $J_1 = 6.5$, $J_2 = 3.9$ Hz, 1 H, CH), 4.20 (m, 2H, CH_2).

^{13}C RMN: δ (ppm) = 11.39 (CH_3), 14.49 (CH_3) $_{\text{syn}}$, 14.57 (CH_3) $_{\text{anti}}$, 20.12 (CH_3) $_{\text{syn}}$, 21.15 (CH_3) $_{\text{anti}}$, 22.71 (CH_3), 45.89 (CH) $_{\text{syn}}$, 47.32 (CH) $_{\text{anti}}$, 60.97 (CH_2), 68.39 (CH) $_{\text{syn}}$, 69.86 (CH) $_{\text{anti}}$, 176.1 (C=O), 173.7 (C=O).

2.18 Acetilación catalizada con Cal B de la mezcla (6c, 6d)

En un balón de 100 mL se colocó la mezcla (3c:3d; 0.620 g, 3.9 mmol) en una proporción 72:28 respectivamente, 200 mg de lipasa B de *C. antarctica* (Novozym 435) y acetato de vinilo (1 g, 12 mmol) en hexano como disolvente y se agitó en shaker orbital a 30 °C y 200 rpm por 9 días. Transcurrido este tiempo se filtró la enzima, se destiló el disolvente a presión reducida y el crudo se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel flash utilizando una mezcla hexano:acetato de etilo 9:1 como fase móvil, obteniendo (2S,3S)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo. La reacción se monitoreó por cromatografía gaseosa utilizando el Programa 2. Rendimiento: 40% (0.25 g, 1.56 mmol) y 95.5/4.5 (SS/RR). Aceite amarillo. GC: $t_{\text{producto acetilado (9)}} = 26.05$ min, $t_{3c} = 23.00$ min, $t_{3d} = 23.27$ min.

Producto (9)

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.91 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH_3), 1.16 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 1.27 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.65 (m, 2H, CH_2), 2.06 (s, 3H, CH_3), 2.7 (dq, $J = 7.0$ Hz, H, CH), 4.15 (c, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 8.22 (d, $J = 9$ Hz, 2H, ArH), 5.09 (ddd, $J_1 = 7.7$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz, $J_3 = 7.6$ Hz, H, CH).

^{13}C RMN: δ (ppm): 9.3 (CH_3), 12.7 (CH_3), 14.3 (CH_3), 21.1 (CH_3), 23.9 (CH_2), 42.9 (CH), 60.5 (CH_2), 75.7 (CH), 170.4 (C=O), 173.7 (C=O).

2.19 (2S,3R)-sitofilato (7)

En un vial de 10 mL se colocaron (0.068 g, 0.423 mmol) de (2S,3R)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo, 3-pentanol (0.138 g, 1.6 mmol) y 0.023 g de lipasa B de *C. antarctica* (Novozym 435). Se agitó a 150 rpm en shaker orbital a 37 °C. La reacción se completó a los 10 días, se filtró la enzima y se destiló el disolvente a presión reducida. La reacción se monitoreó por cromatografía gaseosa utilizando el Programa 3. Rendimiento: 90% (0.79 g, 0.39 mmol). Aceite amarillo (pálido). GC: Programa 3: $t_{r,2S,3R}$ Sitofilato = 17.71 min, $[\alpha]_D^{22} = -5.4$ (c 1 AcOEt).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.90 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH_3), 0.91 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH_3), 1.00 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.20 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.54 (m, 2H, CH_2), 1.59 (m, 4H, CH_2), 2.56 (dq, $J_1 = 7.3$ Hz, $J_2 = 3.5$ Hz, H, CH), 3.83 (ddd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 5.0$ Hz, $J_3 = 3.5$ Hz, 1H, CH), 4.81 (tt, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, 1H, CH).

^{13}C RMN: δ (ppm): 9.6 (CH_3), 10.4 (CH_3), 10.7 (CH_3), 26.4 (CH_2), 26.6 (CH_2), 44.0 (CH), 73.2 (CH), 76.7 (CH), 176.2 (C=O).

EM (IE, 70eV) m/z (%): 203 [< 1 , $\text{M}^{++} + 1$], 115 [51, $\text{M}^+ - \text{OCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$], 103 (27), 85 [12, $\text{M}^+ - \text{OCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, CH_3, CH_3], 74 (100, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2^+$), 57 (27, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}^+$), 43 (30, $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}^+$).

2.20 (2R,3R)-sitofilato (12)

En un vial de 10 mL se colocaron (0.020 g, 0.13 mmol) de (2R,3R)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de etilo, 3-pentanol (0.040 g, 0.45 mmol) y 0.007 g de lipasa B de *C. antarctica* (Novozym 435). Se agitó a 150 rpm en shaker orbital a 37 °C. La reacción se completó a los 10 días, se filtró la enzima y se destiló el disolvente a presión reducida. La reacción se monitoreó por cromatografía gaseosa utilizando el Programa 3. Se obtuvo el (2R,3R)-sitofilato (0.023 g, 0.12 mmol). Rendimiento 90%. Aceite amarillo (pálido), GC: Programa 3: $t_{r,2R,3R}$ Sitofilato = 17.40 min.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.89 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H, CH_3), 0.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.23 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.54 (m, 2H, CH_2), 1.58 (m, 4H, CH_2), 2.53 (dq, $J_1 = 5.8$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz, 1H, CH), 3.57 (ddd, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 6.2$ Hz, $J_3 = 4.2$ Hz, 1H, CH), 4.80 (m, 1H, CH).

^{13}C RMN: δ (ppm): 9.6 (CH_3), 9.65 (CH_3), 14.2 (CH_3), 26.5 (CH_2), 29.7 (CH_2), 44.7 (CH), 74.7 (CH), 76.7 (CH), 176.2 (C=O).

3. Referencias bibliográficas

1. Perrin, D. D.; Armarengo, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd ed.; Pergamon Press Ltd.: Oxford, 1988.
2. Yoshizako, F.; Kuramoto, T.; Izumi, M.; Kirihata, M.; Dohmaru, T.; Iwamoto, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64* (1), 194-197.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Este trabajo de tesis de maestría ha dado a lugar a las siguientes publicaciones:

- “Concise and stereoselective chemoenzymatic synthesis of Sitophilate, the male-produced aggregation pheromone of *Sitophilus granarius* (L.)”. Ravía, S.; Riso, M.; Kröger, S.; Vero, S.; Seoane, G.; Gamenara, D. *Tetrahedron: Asymmetry* 24 (19), 1207-1211, **2013**. [DOI: [10.1016/j.tetasy.2013.08.004](https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2013.08.004)]
- “Novel Fungi-catalyzed reductions of α -alkyl- β -keto-esters”. Ravía, S.; Carrera, I.; Seoane, G.; Vero, S.; Gamenara, D. *Tetrahedron: Asymmetry* 20 (12), 1393-1397, **2009**. [DOI: [10.1016/j.tetasy.2009.05.031](https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2009.05.031)].

Presentaciones a congresos nacionales e internacionales:

- “Concise and stereoselective chemoenzymatic synthesis of Sitophilate, the male-produced aggregation pheromone of *Sitophilus granarius* (L)”. Ravía, S.; Vero, S.; Seoane, G.; Gamenara, D. Biotrans 2013. Manchester, Reino Unido. 2013. Congreso internacional arbitrado, realizado cada 2 años. Trabajo premiado por la revista “Catalysis Science & Technology” con un año de suscripción gratuita.
- “Síntesis quimioenzimática de Sitofilato, feromona de agregación de *Sitophilus granarius*, plaga de granos almacenados de importancia económica en Uruguay y la región”. Ravía, S.; Vero, S.; Seoane, G.; Gamenara, D. V EnReBB (Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones) La Plata, Argentina. 2012. Congreso regional arbitrado, realizado cada 2 años.
- “Síntesis quimioenzimática de (2R,3S)-Sitofilato, feromona de agregación de *Sitophilus granarius*”. Ravía, S.; Vero, S.; Seoane, G.; Gamenara, D. XVII SINAQO-Simposio Nacional de Química Orgánica. Mendoza, Argentina. 2009. Congreso nacional argentino, arbitrado, realizado cada 2 años.
- “Enzymatic approaches for the synthesis of insect pheromones”. Ravía, S.; Alves, L.; Guarnieri, I.; Riso, M.; Santos, M.; Kröger, S.; Rossini, C.; González, A.; Seoane, G.; Saenz Méndez, P.; Gamenara, D. BMOS 2009. 13th Brazilian Meeting on Organic Synthesis. S. Pedro, SP, Brasil. 2009. Congreso Nacional Brasileño, arbitrado, realizado cada 2 años.

- **“Microbial reductions and (de)racemizations as suitable strategies for the preparation of chiral synthons”.** Ravía, S.; Vero, S.; Seoane, G.; Gamenara, D. *Biotrans* 2009. 9th International Symposium on Biocatalysis. **Berna, Suiza.** 2009. **Congreso Internacional, arbitrado, realizado cada 2 años.**
- **“Preparación enzimática de β -cetoésteres α -sustituidos en forma estereoselectiva”.** Ravía, S.; Vero, S.; Gamenara, D. III EnReBB-Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones. **San Luis, Argentina.** 2008. **Congreso Regional, arbitrado, realizado cada 2 años.**
- **“Screening de lipasas para la producción de intermedios en la síntesis de feromonas sexuales de insectos plaga”.** Kröger, S.; Ravía, S.; Seoane, G.; Gamenara, D. XVI SINAQO-Simposio Nacional de Química Orgánica. **Mar del Plata, Argentina.** 2007.
- **“Screening de hongos como biocatalizadores en la reducción enantioselectiva de β -cetoésteresproquirales”.** Ravía, S.; Kröger, S.; Vero, S.; Gamenara, D. XVI SINAQO. **Mar del Plata, Argentina.** 2007.
- **“Screening of biocatalysts for the enantioselective production of intermediates in insect pheromone synthesis”.** Ravía, S.; Kröger, S.; Seoane, G.; Vero, S.; Gamenara, D. *Biotrans* 2007. 8th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations. **Oviedo, España.** 2007.
- **“Chemoenzymatic methodologies for the enantioselective synthesis of insect pheromones”.** Ravía, S.; Kröger, S.; Seoane, G.; Gamenara, D. 4th Annual ACS Summer School on Green Chemistry. **Washington DC, EEUU.** 2006.