



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Química, Universidad de la República – PEDECIBA Química

Dioxigenasas tipo Rieske: viejos biocatalizadores, nuevas reacciones

María Agustina Vila Grigorio

Noviembre 2019

Trabajo presentado para aspirar al título de:

Doctor en Química

Orientadores

Dr. Ignacio Carrera

Dra. Sonia Rodríguez

Orientador Académico:

Dr. Gustavo Seoane

*“La recompensa del trabajo no es lo
que obtenemos, sino en lo que nos
convertimos”*

Agradecimientos

Muchas personas me ayudaron a llegar a donde estoy hoy, a completar esta tesis haciendo que los logros fueran más disfrutables y los obstáculos más fáciles de superar, así que muchas gracias a todos los que de una forma u otra fueron parte de este proceso.

Quiero agradecer muy especialmente a Nacho y a Sonia, sin ustedes este trabajo no habría sido posible. Un maestro dijo *“cualquier libro puede describir una técnica, pero una actitud debe ser transmitida por una persona”* y creo yo que eso es lo más valioso del aprendizaje. Gracias infinitas a ambos por la compañía todos estos años, por permitirme aprender tanto de ustedes y combinar un poco de química orgánica con microbiología molecular para entender este fascinante mundo de la biocatálisis. Pero sobre todo gracias por todas las otras enseñanzas que me han brindado, por el apoyo diario y la confianza, por la fuerza para seguir cuando parecía que no había más energía, por hacerme saber siempre que puedo contar con ustedes cuando lo necesite.

Gracias Nacho por caminar conmigo desde el día 1, por contagiarme esa motivación para enfrentar cada desafío que se nos presentó (y si que los hubieron!!), por las noches en aquel viejo LBB, por sobrevivir al modo fuente y a la lluvia de bromobenceno.... y sobre todo, infinitas gracias por acompañarme en este camino para ser quien soy hoy.

Gracias Sonia por haber aceptado embarcarte en esta tesis con nosotros, por tantas enseñanzas de vida y de academia. Por los almuerzos, los viajes, las cervezas y por abrir la pista en los congresos!!

También quiero agradecer especialmente a Gustavo, por aquella reunión en 2011 y por aceptarme para ese proyecto que fue mi entrada al LBB. Por haber acompañado el avance de cada trabajo, por tu disponibilidad para disipar cualquier duda, resolver cualquier problema y firmar los infinitos documentos para bedelía! Gracias Seo por la confianza y el ánimo de siempre.

A la gran familia del LBB!!!! Este laboratorio donde aprendemos constantemente de los múltiples aspectos del trabajo y la vida... A Emi y Choni, por compartir el día a día de nuestros posgrados, por el mate que nos espera cada mañana, por las charlas catárticas, por la amistad que nos une. A todos, por ser una motivación para trabajar cada día: Facu, Lari, Luis, Paula, Wilson, Paola, Carlos, David, y a nuestra queridísima Directora del LBB, Pilar, por todo lo que nos enseñas cada día, por ser única y compartirte con nosotros. A mi querido Dieguin, por el trabajo realizado codo a codo para que esta tesis sea lo que es, pero sobre todo por permitirme aprender desde otro lugar, por soportarme en el camino y por las cervezas *afterlab*.

Gracias infinitas a todo el LSO por hacerme sentir parte siempre, aunque no esté ahí todos los días. Especialmente a los akiros: a Nia por nuestras escapadas europeas, a Gonza por las noches de biotransformación, a Peixoto por la Green y los cañonazos! Gracias a todos por tantas lindas anécdotas compartidas, por estar dispuestos siempre a darme una mano, por compartir sus materiales y conocimientos; a los que están hoy y a los que han pasado por ese precioso grupo en estos años, gracias por las virundelas!!

Un gracias muuuuy especial para mis amigas y compañeras de equipo, Pao y Mari, por estar en las subidas y las bajadas, por los mates en el parque, por tantos años de hermosa amistad y por todo lo aprendido juntas! y también a Bruno, por tu cariño, tu energía y la sangre joven que trajiste al equipo!!

Agradezco también a toda la gente del 12 por la buena onda cada vez que tuve que trabajar por allí, y muy especialmente a los Sonios: Ari y Gonza, por la mesada y los tips! También a los compañeros de farmacognosia, farmacia y bioquímica, por estar siempre que algo se precisa o simplemente por las conversaciones de pasillo.

A quienes fueron parte de mi estadía en Rochester e hicieron posible sobrellevar tan largo invierno: Antonio T., Yu-Gu, Daniela, David, Andy y Hannan, por su ayuda y buena onda en el laboratorio; a Melvin, Shaun, Rachel y Tiz, quienes compartieron su tiempo, paseos y cervezas; y muy especialmente a mi amiga Viki, por las blancas mañanas de mates y waffles.

Gracias también a Rudi, por abrirme las puertas de su grupo y su laboratorio, por todo lo aprendido en aquella estadía.

A aquellos amigos y amigas que me acompañan en la vida, a las incondicionales de siempre Martu, Iva, Flor y Vicky; a Ale, Guz y Val; a Pao, Gonza y Alfo por recibirme tan lindo, por las andanzas que vivimos y por las que vendrán; y a todos quienes fueron y son parte del camino dentro y fuera de facultad que harían la lista muy larga...

A mi familia. Infinitamente gracias mamá y papá por esta hermosa vida, por el estímulo, por la paciencia, por el apoyo y por tanto amor. Por Guille, mi hermano y amigo, gracias por nuestra complicidad, por estar siempre para mí como yo para ti. Gracias por la familia del corazón, porque no hay nada más lindo que compartir la vida con un grupo tan divertido y lleno de cariño!!

Y finalmente a César, porque el camino a tu lado es más fácil, por todo lo que aprendemos juntos día a día, por tu paciencia, por las imágenes del yasara, por tu amor, y por todo lo demás....

Resumen

En los últimos años las biotransformaciones se han vuelto parte importante de la química sintética dadas las grandes ventajas que se le conocen, no solo por las condiciones suaves de reacción requeridas y la gran versatilidad que presentan; sino también por su alta quimio, regio- y estereoselectividad. Esto permite realizar transformaciones específicas sobre los sustratos y obtener productos que muchas veces no son accesibles por métodos clásicos, y principalmente permite obtener compuestos enantioméricamente puros de gran interés a nivel industrial.

Entre las principales transformaciones en química orgánica se encuentran las reacciones de oxidación, lo cual ha impulsado el estudio de las oxidorreductasas como biocatalizadores de interés, y es dentro de este grupo que se encuentran las dioxigenasas tipo Rieske con las que se trabajó en esta tesis. Estas enzimas catalizan el primer paso para la degradación de compuestos aromáticos en bacterias, cuando son utilizados como fuente de carbono y energía. En 1968 el grupo del Dr. Gibson describió la actividad dioxigenasa en una cepa mutante de *Pseudomonas putida* y a partir de ese momento comenzaron los estudios de esta vasta familia de enzimas, a la cual se le reconoció un gran potencial en química sintética siendo utilizadas hasta el día de hoy para la producción de materiales de partida quirales.

De los diferentes miembros de dicha familia de enzimas, el sistema Tolueno Dioxigenasa (TDO) es uno de los más utilizados a escala preparativa, pero no el más estudiado en cuanto a estructura del sitio activo y posible alteración de su regio- o estereoselectividad. En esta tesis se abordó el estudio de tales aspectos, seleccionando por alineamiento de secuencias aquellos residuos del sitio activo identificados como claves en otras enzimas tipo Rieske, como Naftaleno - y Bifenilo Dioxigenasas (NDO y BPDO). El desarrollo de cuatro variantes de TDO (Q215A, I324F, T365N y F366V) permitió evaluar la influencia de estos residuos en las propiedades de la enzima, identificando algunos importantes para la quimio- y estereoselectividad de la reacción de dihidroxilación. A su vez, se desarrolló el primer

modelo computacional del sitio activo de TDO, lo cual constituye una herramienta de suma importancia, tanto para la comprensión de los resultados obtenidos como para el desarrollo de trabajos futuros en el área.

Por otra parte, se reportan aquí nuevas actividades para las dioxigenasas tipo Rieske. La de mayor interés se relaciona con la capacidad de descomponer azidas orgánicas a nitrenos a través del átomo de hierro que poseen en su sitio activo, y la posibilidad de que estos últimos se inserten en enlaces C-H catalizando la aminación directa de los mismos. La importancia de esta nueva actividad es destacada teniendo en cuenta el fuerte desarrollo de procedimientos para la aminación de enlace C-H en la química orgánica sintética moderna. Tras estudiar distintas dioxigenasas en reacciones de aminación intra- e intermoleculares, se encontró que NDO es el mejor biocatalizador para este tipo de reacciones obteniendo un 40 % del producto de aminación intramolecular al utilizar 2,4,6-triisopropilbencen-1-sulfonilazida como sustrato. Se desarrollaron además bibliotecas de mutantes de esta enzima las cuales se encuentran disponibles para ensayar en reacciones de funcionalización C-H intra- e intermoleculares, así como en reacciones de dihidroxilación de arenos en busca de regio- y/o estereoisómeros de los productos obtenidos con la enzima nativa.

Contenido

<i>Agradecimientos</i>	5
<i>Resumen</i>	9
<i>Índice de Figuras</i>	15
<i>Índice de Tablas</i>	21
<i>Abreviaturas</i>	23
<i>1. Introducción General</i>	25
<i>1.1 Biocatálisis como herramienta de síntesis orgánica.....</i>	<i>25</i>
1.1.1 Reacciones de oxidación mediadas por enzimas	32
<i>1.2 Dihidroxilación de anillos aromáticos.....</i>	<i>37</i>
1.2.1 Clasificación y características de dioxigenasas bacterianas	39
<i>1.3 Aplicaciones sintéticas de los cis-ciclohexadienodiolos.....</i>	<i>48</i>
<i>2. Objetivos Generales</i>	52
<i>Capítulo I: Expandiendo las herramientas biocatalíticas para la dihidroxilación de arenos</i>	55
<i>I.1. Introducción</i>	55
<i>I.1.1. Estudios del sitio activo y mutagénesis sobre dioxigenasas tipo Rieske.....</i>	<i>55</i>
I.1.1.1. Naftaleno Dioxigenasa	55
I.1.1.2. Bifenilo Dioxigenasa	64
I.1.1.3. Tolueno Dioxigenasa	66
I.1.1.4. Clorobenceno Dioxigenasa	68
<i>I.2. Objetivos específicos.</i>	71

I.3.	<i>Resultados y Discusión</i>	73
I.3.1	<i>Desarrollo de mutantes de la Tolueno Dioxigenasa</i>	73
I.3.2	<i>Construcción de un sistema de expresión para CDO y su caracterización</i>	91
I.3.3	<i>Obtención de ipso-cis-1,2-dioles utilizando BzDO</i>	94
I.3.4	<i>Biotransformación de sustratos nitrogenados por TDO</i>	97
 <i>Capítulo II: Estudio de nuevas actividades para Dioxigenasas tipo Rieske</i>		107
II.1	<i>Introducción</i>	107
II.1.1	<i>Funcionalización de enlaces C(sp³)-H</i>	107
II.1.1.1	Formación de enlaces C-N	107
	Reacciones de funcionalización C-H mediadas por citocromos P450	111
	Transferencia intramolecular de nitrenos	112
	Transferencias intermoleculares de nitrenos	117
II.1.1.2	Formación de enlaces C-C mediada por carbenos	121
II.2	<i>Objetivos específicos</i>	125
II.3	<i>Resultados y Discusión</i>	127
II.3.1	<i>Reacciones de aminación C(sp³)-H intramolecular utilizando arilsulfonilazidas trisustituidas.</i>	127
II.3.1.1	Ensayos preliminares y screening inicial	127
II.3.1.2	Optimización de la biotransformación: estudio del impacto de la biomasa, concentración del sustrato y presencia de oxígeno.	131
II.3.1.3	Desarrollo de mutantes de NDO para la aminación intramolecular de enlaces Csp ³ -H	137
II.3.1.4	Biotransformación de 2,4,6-triisopropilbencen-1-sulfonilazida utilizando <i>E. coli</i> JM109 DE3 (pDTG141) en escala de biorreactor	142
II.3.2	<i>Ensayos con las subunidades α y β de la oxigenasa de NDO purificadas</i>	149
II.3.4	<i>Otras reacciones de funcionalización C-H</i>	151
II.3.4.1	Reacciones intramoleculares: formación de oxazolidinonas	151
II.3.3.2	Reacciones intermoleculares: formación de sulfimidas.	153

II.3.3.3	Reacciones intermoleculares: formación de aziridinas.	154
II.3.3.4	Reacciones intermoleculares: formación de ciclopropanos	156
3.	<i>Conclusiones y Perspectivas</i>	159
5.	<i>Materiales y Métodos</i>	165
5.1	<i>Métodos microbiológicos y moleculares</i>	165
5.1.1	Medios de cultivo y reactivos	165
5.1.2	Vectores y cepas	167
5.1.3	Técnicas moleculares	169
5.1.4	Preparación y transformación de células competentes	171
5.1.5	Manipulación de ADN	172
5.1.6	Purificación de NDO-O	173
5.2	<i>Biotransformaciones</i>	174
5.2.1	Crecimiento y biotransformación en biorreactor utilizando TDO, TDO ^M , CDO y NDO	174
5.2.2	Ensayos con células en reposo	176
5.2.3	Reacciones de funcionalización C-H	176
5.2.4	Purificación e identificación de productos	177
5.2.5	Crecimiento y biotransformación en biorreactor utilizando <i>R. eutropha</i> B9	177
5.3	<i>Métodos analíticos</i>	178
5.3.1	Análisis de muestras por ¹ H-RMN	178
5.3.2	Análisis de muestras por HPLC	182
5.4	<i>Análisis de datos</i>	184
6.	<i>Referencias</i>	185
7.	<i>Anexo</i>	199
7.1	<i>Curvas de calibración</i>	199
7.2	<i>Cromatogramas HPLC</i>	203
8.	<i>Publicaciones</i>	207

Índice de Figuras

- Figura 1:** Ejemplos de biocatalizadores disponibles comercialmente y de los bloques de construcción generados por retrosíntesis. Adaptado de Turner, N.; O'Reilly, E. 2013.⁹ 31
- Figura 2:** Clasificación de enzimas redox. Adaptado de Gaménara *et al.* 2013.⁷ 33
- Figura 3:** Distribución de los tipos de reacción de oxidación biocatalítica a nivel industrial utilizando células enteras. Adaptado de Hollmann, F. *et al.*, 2011.¹³ 34
- Figura 4:** Primeros pasos del metabolismo de arenos. **A.** mediado por monooxigenasas en organismos eucariotas. **B.** mediado por dioxigenasas en organismos procariotas. Tomado de Boyd, D.R.; Sheldrake, G.N., 1998.¹⁶ 37
- Figura 5:** Esquema del sistema tolueno dioxigenasa. Tomado de Friemann *et al.* 2009.²² 40
- Figura 6:** Mecanismos propuestos para la dihidroxilación enzimática de arenos. **I)** Adaptado de Hudlicky, T.; Reed, J.W. 2009.³⁰ **II)** Tomado de Bugg, T. 2003.²⁵ 42
- Figura 7:** Dihidroxilación de compuestos policíclicos por BPDO. 44
- Figura 8:** Configuración absoluta preferida de *cis*-ciclodihidrodiol de diferentes sustratos: **I)** arenos monosustituídos, **II)** arenos *orto*- y *meta*- disustituídos, **III)** compuestos *para*-disustituídos, **IV)** compuestos policíclicos, **V)** heterociclos de cinco miembros. 45
- Figura 9:** Ejemplos de monohidroxilación en la posición bencílica. **I.** Biotransformación del indeno. **II.** Secuencia de reacciones para la formación de trioles en arenos con sustituyentes alquílicos. 46
- Figura 10:** **I.** Reacciones que pueden llevarse a cabo sobre *cis*-ciclohexadienodiol de origen microbiano y análisis de los planos de simetría que poseen. Adaptado de Hudlicky, T.; Reed, J. 2009.³⁰ **II.** Ejemplos de objetivos sintéticos alcanzados utilizando *cis*-ciclohexadienodiol como materiales de partida. 49
- Figura 11:** Posibles modificaciones sintéticas del diol del ácido benzoico obtenido por biotransformación con benzoato dioxigenasa. Adaptado de Griffen, *et al.* 2014.⁴⁵ 51
- Figura 12:** **A:** Biotransformación de arenos por TDO. **B:** obtención de regio- y estereoisómeros de *cis*-ciclohexadienodiol, **C:** funcionalización C-H mediada por dioxigenasas. 53
- Figura 13:** Estructura cuaternaria del hexámero $\alpha_3\beta_3$ que conforma NDO-O. Extraído y adaptado de Kauppi, B. *et al.* 1998.⁴⁶ 56

Figura 14: Representación del centro Rieske y el centro catalítico de dos subunidades α adyacentes. Extraído de Kauppi, B. <i>et al. Structure</i> 1998. ⁴⁶	57
Figura 15: Vista del centro catalítico de NDO-O. Extraído y adaptado de Kauppi, B. <i>et al.</i> 1998. ⁴⁶	58
Figura 16: Vista del sitio activo de NDO.	59
Figura 17: Canal de entrada al sitio activo de NDO. Extraído y adaptado de Escalante, D.E. <i>et al.</i> 2017. ⁴⁹	60
Figura 18: Representación del sitio activo de NDO señalando los aminoácidos identificados como importantes para: A. especificidad de reacción, B. regioselectividad, C. estereoselectividad. Adaptado de Halder, <i>et al.</i> 2018. ⁵³	63
Figura 19: I. Representación del sistema Tolueno Dioxigenasa y la transferencia de electrones entre sus componentes. II. Sitio activo de TDO-O conteniendo tolueno. Adaptado de Friemann, R. <i>et al.</i> 2009. ²²	67
Figura 20: Alineamiento de secuencias de la subunidad α de las oxigenasas de TDO, NDO y BPDO. Se señalan los residuos seleccionados para mutagénesis sitio dirigida.	74
Figura 21: Sustratos utilizados para el análisis de actividad de los mutantes de TDO (2-6) y productos obtenidos con TDO WT.	75
Figura 22: I. Representación de los distintos bolsillos del sitio activo de TDO indicando la hidrofobicidad de cada uno. II. Estructura del sitio activo de TDO previo a la entrada de oxígeno y sustrato.	79
Figura 23: I. Resultados de <i>docking</i> para el indano (amarillo) y propilbenceno (violeta). II. Resultados de <i>docking</i> para arenos monosustituídos con grupos metilo (azul), etilo (rojo), propilo (violeta), butilo (gris) y pentilo (verde). Se señala la distancia del oxígeno al carbono bencílico del propilbenceno.	80
Figura 24: Sitio activo de TDO. Se observa la ubicación de los aminoácidos objetivo para las sustituciones propuestas: Gln215, Ile324, Thr365 y Phe366.	81
Figura 25: Posicionamiento de propilbenceno (I) y estireno (II) en el sitio activo de TDO WT (verde) y TDO-I324F (gris). Se señala la distancia que toma la posición bencílica de cada sustrato en cada uno de los casos, la cual determina los productos obtenidos.	82
Figura 26: Sitio activo de TDO, se señala la posición de treonina 365.	84
Figura 27: Resultados de <i>docking</i> de bromobenceno, propilbenceno y estireno en el sitio activo de TDO (I, III, V) y TDO F366V (II, IV, VI). Se observa el cambio estructural del sitio activo y las distintas posiciones que toman los sustratos para generar los productos con diferente estereoquímica.	86

Figura 28: Resultado de cálculos computacionales del mecanismo de TDO.	87
Figura 29: Gel SDS-PAGE de las fracciones solubles e insolubles del lisado celular de <i>E. coli</i> JM109 (pKK_CDO) a las 0 y 24 horas post-inducción y <i>E. coli</i> JM109 (control) a 24 horas post-inducción con IPTG. Se señalan las bandas correspondientes a la dioxigenasa de CDO (<i>tcbAaAb</i>) y la ferredoxina <i>tcbAd</i> .	92
Figura 30: Catabolismo del ácido benzoico en <i>Ralstonia eutropha</i> B9 donde se muestran los pasos bloqueados. Adaptado de Reiner, A.B <i>et al</i> , 1971. ⁷⁹	94
Figura 31: Crecimiento y Biotransformación en biorreactor utilizando <i>Ralstonia eutropha</i> B9.	95
Figura 32: Biotransformación de bencilazida con TDO.	97
Figura 33: Mecanismo del doble rearrreglo sigmatrópico [3,3] propuesto para la formación de 11b.	98
Figura 34: I. Secuencia de biotransformación para la formación de benzonitrilo a partir de bencilazida. II. Perfil de formación de los productos 11b y 10a durante la biotransformación de bencilazida en biorreactor utilizando <i>E. coli</i> JM109 (pDTG601).	99
Figura 35: Biotransformación de feniletiazida mediada por TDO.	100
Figura 36: Docking de bencilazida (amarillo) y <i>p</i> -clorobencilazida (gris) en el sitio activo de TDO.	101
Figura 37: I. Estructura del complejo de coordinación formado por el hierro del sitio activo con el hidroxilo bencílico y el nitrógeno 1 del grupo azida II. Formación del intermediario hierro (IV)- nitreno y sus posibilidades de rearrreglo para formar benzonitrilo: A) migración del fenilo, B) migración del OH, C) migración del protón.	102
Figura 38: Biotransformación de benzamida (I) y de las benzaldoximas <i>E</i> y <i>Z</i> (II) mediadas por TDO.	103
Figura 39: Secuencia de reacciones para la formación de 12c.	104
Figura 40: Mecanismo de oxidación de bencilazida a benzonitrilo con formación de una especie Fe(IV)-nitreno.	105
Figura 41: Estrategia de aminación directa utilizando especies metal-nitreno formadas a partir de distintos precursores: iminoiodanos, azidas orgánicas y <i>N</i> -tosiloxocarbamatos.	108
Figura 42: a) Número de publicaciones que involucran el uso de catalizadores de hierro para la formación de enlaces C-N. b) variedad de reacciones catalizadas por hierro. Extraído de Ghorai, S. K. <i>et al.</i> 2017. ⁸⁶	109

Figura 43: Reacción de amidación intramolecular utilizando $\{[(2,5\text{-diisopropilfenil)sulfonil]imino\}$ feniliodano catalizada por citocromo P450.	111
Figura 44: Aminación C-H catalizada por citocromo P450.	112
Figura 45: Aminación intramolecular con diferente regioselectividad catalizada por variantes de P411 _{BM3} .	113
Figura 46: Arilsulfonilazidas trisustituidas utilizadas para el estudio de reacciones de aminación intramolecular.	114
Figura 47: Mecanismo propuesto para la aminación de enlaces C-H por P450BM3. Extraído de Singh, R., Bordeaux, M. & Fasan, R. 2014. ¹⁰⁰	115
Figura 48: Inserción de nitreno intramolecular en la síntesis enzimática de oxazolidinonas catalizada por citocromo P450.	115
Figura 49: Mecanismo propuesto para la formación de oxazolidinonas catalizadas por P450. Tomado de Sing <i>et al.</i> 2015. ¹⁰⁵	116
Figura 50: Reacción de sulfimidación catalizada por citocromo P450.	117
Figura 51: Síntesis de aminas quirales combinando sulfimidación y rearreglos sigmatrópicos. Tomado de Prier <i>et al.</i> 2016. ⁹⁷	118
Figura 52: Reacción de aziridinación mediada por variantes de P411. ¹⁰⁷	119
Figura 53: Aminación C-H intermolecular utilizando células de <i>E. coli</i> que expresan P411.	120
Figura 54: Geometrías propuestas para el posicionamiento de estireno y el intermediario metal-carbeno formado en mioglobina para la formación del (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-etil-2-fenilciclopropanocarboxilo. Extraído de Bordeaux <i>et al.</i> 2015. ¹⁰⁹	122
Figura 55: Reacciones de Wittig catalizadas por variantes de mioglobina. Adaptado de Tyagi, V., Fasan, R. 2016. ¹¹³	123
Figura 56: Mecanismo propuesto para la olefinación de aldehídos mediada por mioglobina. Tomado de Tyagi, V., Fasan, R. 2016. ¹¹³	124
Figura 57: I. Biotransformación de 2,4,6-triisopropilbencensulfonilazida mediada por TDO en condiciones anaerobias. II. Mecanismo propuesto para la transformación.	128
Figura 58: Reacciones de aminación intramolecular utilizando arilsulfonilazidas sustituidas.	129
Figura 59: Biotransformación de TISA mediada por cepas que expresan NDO, TDO y CDO con sus respectivos controles a diferentes concentraciones.	133

Figura 60: Biotransformación de TESA mediada por cepas que expresan NDO, TDO y CDO y los respectivos controles a diferentes concentraciones.	134
Figura 61: Imágenes del sitio activo de NDO. I. Se muestran en amarillo la superficie del sitio activo y los aminoácidos seleccionados para la construcción de bibliotecas de mutantes. II. Interacciones π - π entre los aminoácidos seleccionados para la construcción de bibliotecas (rojo) y el naftaleno (verde).	138
Figura 62: Biotransformación de TISA utilizando las variantes de NDO seleccionadas. A. % de conversión a sultama (42a). B. % de conversión a sulfonamida (42b)	141
Figura 63: Biotransformación de TISA 3 mM mediada por NDO WT en escala de biorreactor.	143
Figura 64: Perfil de biotransformación de TISA en balón con células crecidas en LB.	145
Figura 65: Hidrólisis de β -lactama en el sitio activo de serin- β -lactamasas. Tomado de Page M. I. <i>et al.</i> 2003. ¹¹⁷	147
Figura 66: Mecanismo de hidrólisis de β -sultamas. Adaptado de Page, M. I.; Laws, A. P. 2000. ¹¹⁸	148
Figura 67: Imagen del gel SDS-Page del proceso de purificación de subunidades α y β de la dioxigenasa de NDO.	150
Figura 68: Reacciones de aminación intramolecular utilizando carbazidas para la formación de oxazolidinonas.	151
Figura 69: Reacción de sulfimidación intermolecular	153
Figura 70: Reacción de aziridinación intermolecular.	154
Figura 71: Reacción de ciclopropanación mediante la formación de carbenos.	156
Figura 72: Cromatograma del producto 2a obtenido por biotransformación del bromobenceno con TDO nativa.	203
Figura 73: Cromatograma del producto 4a obtenido por biotransformación de propilbenceno con TDO nativa.	203
Figura 74: Cromatograma del producto 4b obtenido por biotransformación de propilbenceno utilizando TDO nativa.	204
Figura 75: Cromatograma de la mezcla racémica del producto 5a obtenido por síntesis química.	204
Figura 76: Cromatograma de la mezcla de enantiómeros del compuesto 5b obtenido por biotransformación del indeno con la TDO nativa.	205

Figura 79: Cromatograma del producto 6a obtenido por biotransformación de estireno con TDO nativa.	205
Figura 77: Cromatograma de la mezcla racémica de 6b obtenida por síntesis química.	206
Figura 78: Cromatograma del producto 6b obtenido por biotransformación de estireno con TDO nativa.	206

Índice de Tablas

Tabla 1: Resultados de biotransformación de los sustratos 2 a 6 utilizando las variantes de TDO desarrolladas.	77
Tabla 2: Energía libre de unión de los diferentes sustratos en el sitio activo de TDO nativa y la variante F366V de acuerdo con el modelo computacional.	85
Tabla 3: Resultados del screening de actividad con <i>E. coli</i> JM109 (pKK_CDO) y <i>E. coli</i> JM109 DE3 (pDTG141). Se muestran las estructuras de naftaleno y fenantreno así como los productos obtenidos por dihidroxilación enzimática. Nd: no detectado	93
Tabla 4: Resultados obtenidos para la reacción con arilsulfonilazidas trisustituidas utilizando $OD_{600}=30$, 10 mM sustrato y 400 μL de volumen de reacción bajo atmósfera de argón. Se presenta el porcentaje de conversión para cada uno de los productos obtenidos.	129
Tabla 5: Resultados obtenidos para la reacción con arilsulfonilazidas trisustituidas utilizando $OD_{600}=60$, 10 mM sustrato, 400 μL volumen de reacción bajo atmósfera de argón. Se presenta el porcentaje de conversión para cada la sultama correspondiente en cada caso.	131
Tabla 6: Resultados obtenidos para la reacción con TISA utilizando $OD_{600}=60$, 5 mM sustrato, 400 μL volumen de reacción en presencia de oxígeno. Se presenta el promedio del porcentaje de conversión para la sultama en cinco réplicas \pm desviación estándar de la media.	136
Tabla 7. Mutantes de NDO seleccionados.	140
Tabla 8: Comparación de los diferentes experimentos de escalado con TISA.	146
Tabla 9: Resultados de la reacción con carbazidas utilizando $OD_{600}=30$. Conversión calculada para la oxazolidinona obtenida.	151
Tabla 10: Resultados de la reacción de sulfimidación con $OD_{600}=30$. Conversión calculada para la sulfimida.	153
Tabla 11: Resultados de la reacción de aziridinación utilizando $OD_{600}=30$. Conversión calculada para la aziridina.	154

Tabla 12: Resultados de la reacción de ciclopropanación utilizando $OD_{600}=30$.	156
Tabla 13: Genotipos de las cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas	168
Tabla 14: Vectores utilizados	168
Tabla 15: Oligonucleótidos utilizados para mutación sitio dirigida de TDO	169
Tabla 16: Oligonucleótidos utilizados para la creación de bibliotecas de NDO	170
Tabla 17: Oligonucleótidos utilizados para mutagénesis sitio dirigida en NDO	171
Tabla 18: Tiempos de retención observados para los diferentes enantiómeros de los productos obtenidos.	183
Tabla 19: Tiempos de retención para arilsulfonilazidas trisustituidas y sus productos.	183

Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo	IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ANOVA	Análisis de varianza	LB	Luria-Bertani
AsPh₃	Trifenilarsina	MOPS	Ácido 3-(<i>N</i> -morfolin)-propansulfónico
BDO	Benceno dioxigenasa	NAD(P)	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
BPDO	Bifenilo dioxigenasa	NBDO	Nitrobenceno dioxigenasa
BzDO	Benzoato dioxigenasa	NDO	Naftaleno dioxigenasa
CDO	Clorobenceno dioxigenasa	PCR	Reacción en cadena de polimerasa
cdw	Peso seco de células	PPh₃	Trifenilfosfina
DCM	Diclorometano	rpm	Revoluciones por minuto
DFT	Teoría del funcional de la densidad	RT	Temperatura ambiente
de	Exceso diastereomérico	TDO	Tolueno dioxigenasa
ee	Exceso enantiomérico	TDO	Tolueno dioxigenasa
EDA	Etildiazoacetato	TDO^M	Mutantes de tolueno dioxigenasa
FAD	Flavin adenin dinucleótido	TESA	2,4,6-trietilbencen-1-sulfonilazida
¹H-RMN	Resonancia magnética de protón	TISA	2,4,6-triisopropilbencen-1-sulfonilazida
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión	TLC	Cromatografía en capa fina

TMSA	2,4,6-trimetilbencen-1-sulfonilazida
TON	<i>Turnover number</i>
TPP	Tetrafenilporfirina
TsN₃	Tosilazida
TsNH₂	Tosilamida
TTN	<i>Total turnover number</i>
WT	<i>Wild type</i>

1. Introducción General

1.1 Biocatálisis como herramienta de síntesis orgánica

La investigación moderna en síntesis orgánica ha puesto especial interés en las últimas décadas en la transformación de compuestos orgánicos mediante el uso de diversos agentes biológicos denominados biocatalizadores (enzimas, células procariotas o eucariotas, tejidos de origen animal o vegetal, hongos o esporas, etc.). Estos procesos son a menudo referidos como biotransformaciones o bioconversiones, y constituyen una interesante herramienta para la producción de nuevos compuestos por la gran variedad de reacciones que se pueden catalizar. En estos procesos, los biocatalizadores son utilizados para convertir un compuesto orgánico mediante una o varias reacciones enzimáticas, por lo que los procesos de biotransformación involucran a los campos tanto de microbiología, bioquímica y biología molecular así como química orgánica, en lo que respecta a comprender las condiciones para mejorar o cambiar la habilidad de transformar un compuesto en otro.¹

En este sentido, la biocatálisis surge como una alternativa a la química sintética clásica ya que supera algunas de las desventajas que esta tiene, impulsada sobre todo por la búsqueda de procesos sustentables y más amigables con el medio ambiente; y en los últimos 30 años, ha evolucionado de tal manera que, comenzando como una ciencia exploratoria inspirada en la naturaleza se ha convertido en un pilar en la síntesis de productos químicos enantioméricamente puros.²

A finales de los 80, se introdujo el concepto de Factor de Impacto Ambiental (factor E = kg residuo/kg producto) para evaluar el impacto de los procesos químicos sobre el ambiente. En 1992 se calculó el factor E para distintas industrias químicas, revelando que la industria farmacéutica era la que tenía un factor mayor y por tanto un impacto negativo en el entorno. En 1998, Anastas y Warner desarrollaron los 12 principios de la “Química Verde” para promover procesos químicos de manufactura verdes y sustentables, y a partir de allí, estos criterios han sido altamente recomendados para la industria farmacéutica de forma de resolver algunos de

los grandes problemas medioambientales generados por la misma.³ Por otra parte, el descubrimiento de que los distintos enantiómeros de un compuesto pueden tener propiedades farmacológicas, farmacocinéticas y farmacodinámicas muy diferentes, ha incrementado la demanda de productos quirales enantioméricamente puros en este sector industrial.⁴

En este sentido, la biocatálisis se presenta como una tecnología sumamente atractiva siendo ambientalmente más segura al reducir la cantidad de desechos que se generan y evitando el uso de metales preciosos como paladio, platino o rodio. Estos metales son comunes en los catalizadores quirales, los cuales además de su alto costo generan desechos de alto impacto ambiental y hacen más trabajosa la purificación de los productos. Las condiciones de reacción con biocatalizadores suelen ser suaves (medio acuoso, temperatura ambiente, presión atmosférica, pH neutro),^{1,4} lo cual acompañado de una alta estereo- y regioselectividad en las reacciones sin necesidad de protección y desprotección de grupos funcionales, así como una gran eficiencia y rendimiento hacia los productos deseados, conduce a procesos más económicos y energéticamente eficientes.¹ En algunos casos además, como por ejemplo la hidroxilación de carbonos no activados, la biocatálisis es la única herramienta que permite la obtención de determinados compuestos.⁵

Hacia 2016, el uso de biotransformaciones para la producción de intermedios químicos a nivel industrial involucraba alrededor de 150 procesos que utilizan enzimas o células enteras, con una tendencia al aumento.¹ Actualmente, la biocatálisis no sólo se aplica en la industria farmacéutica sino que se ha expandido hacia la industria química (productos a granel y química fina), industria de alimentos, cosmética, textil y la industria de pulpa de celulosa y papel.⁶

Hasta la década de los 60, el 70 % de los biocatalizadores utilizados provenían de tejido vegetal y órganos animales; veinte años después, tan solo un 10 % eran de origen animal (principalmente las hidrolasas) y un 5 % de origen vegetal por lo costoso de los procesos, en tanto que el resto de los biocatalizadores de esa época se obtenían de fuentes microbianas.

Para 2013, el uso de microorganismos recombinantes representaba más del 90 % de las fuentes de biocatalizadores utilizadas como resultado de la explotación de la gran diversidad microbiana en la búsqueda de nuevas actividades junto al diseño racional de enzimas y su sobreexpresión.⁷

En general pueden utilizarse como biocatalizadores enzimas, complejos enzimáticos, organelos celulares o células enteras (en crecimiento, en reposo, o no viables) dependiendo de la aplicación que se les vaya a dar. El proceso de obtención y elección de un buen biocatalizador implica diferentes aspectos: en general debe seleccionarse el organismo (nativo o recombinante) y/o la enzima, junto con el medio de reacción adecuado, considerando factores como la solubilidad del sustrato y producto, la capacidad de los mismos de difundir a través de la membrana celular, así como la posible inhibición por producto de la enzima, de forma de lograr un sistema compatible.¹ A su vez puede considerarse la inmovilización tanto de enzimas libres como de células, como forma de facilitar la recuperación del producto y aumentar las productividades de los procesos al permitir el re-uso de los biocatalizadores y el desarrollo de sistemas continuos de reacción.^{1,5,8}

El uso de *enzimas aisladas*, especialmente si se encuentran disponibles comercialmente, no requiere de equipamiento sofisticado y facilita mucho la purificación del producto. Es así, que las enzimas hidrolíticas han mostrado amplia aplicación a escala industrial y de laboratorio. Sin embargo, el requerimiento de cofactores asociado a otras enzimas, suele incrementar mucho el costo del proceso, por lo cual se han desarrollado sistemas de regeneración de cofactores o se utilizan células enteras.¹

Por su parte, las *células enteras* presentan diversas ventajas ya que extienden el número de reacciones que se pueden llevar a cabo con los innumerables microorganismos disponibles, donde la propia maquinaria celular regenera los cofactores necesarios, eliminando el proceso de purificación de la enzima (que puede ser muy trabajoso y costoso, además de disminuir la estabilidad de la proteína en muchos casos). A su vez se hace posible llevar a cabo reacciones complejas que implican la acción de varias enzimas de manera más simple, sea dentro de un

único microorganismo o incluso utilizando cultivos mixtos.¹ Además, la presencia de membranas celulares proporciona cierta resistencia a condiciones de reacción más drásticas (de temperatura o del medio utilizado) permitiendo el uso de sustratos puros, sistemas microacuados, líquidos iónicos o solventes eutécticos profundos (DES), siendo estos últimos una alternativa “verde” al uso de solventes orgánicos que también pueden ser utilizados. Todo esto permite además, utilizar mayores concentraciones de sustrato que resultan en una mayor cantidad de producto obtenido.⁸

Sin embargo, estos procesos también presentan ciertas dificultades. En el cultivo de células debe tenerse en cuenta la represión catabólica causada por diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para la producción de células de alta calidad para biotransformaciones eficientes, así como la posible presencia de productos secundarios y metabolitos tóxicos que dificultan tanto el desarrollo del cultivo como la purificación final del compuesto de interés. Además, es necesario asegurar que las células contengan la máxima cantidad de enzima posible, para lo cual generalmente se adicionan durante el crecimiento inductores que estimulan la producción de la enzima.¹ Otra de las limitaciones importantes ha sido la transferencia de masa a través de las membranas y para superar esto se han desarrollado diferentes métodos. Las células pueden ser tratadas con surfactantes, agentes quelantes o solventes orgánicos para aumentar su permeabilidad; en algunos casos se sobre expresan determinados transportadores de membrana tanto para la entrada de sustrato como para la salida del producto; otra opción implica el anclaje de las proteínas de interés a la membrana expresándolas como proteínas fusionadas tanto intra como extracelulares.⁸

Por otra parte, los requerimientos para la aplicación a nivel industrial muchas veces implican mejorar el biocatalizador en aspectos como la estabilidad térmica, la ampliación del rango de sustratos aceptados, la estereoselectividad, la productividad, o evitar la formación de productos secundarios.⁶ Así, se desarrollaron diferentes estrategias que han permitido obtener biocatalizadores mejorados, sobre todo relacionadas a la evolución dirigida de proteínas, ingeniería metabólica y el uso de métodos computacionales para el diseño racional de mutantes; los cuales se combinan con métodos de screening de alto rendimiento,

sensibilidad y eficiencia.^{2,6,9} El diseño de mutaciones puede dirigirse a distintos blancos, generando así mutantes regulatorios, mutantes que evadan la represión catabólica o mutantes bloqueados en las rutas de degradación de productos para la acumulación de un compuesto de interés;¹ además los métodos computacionales que permiten diseñar estrategias para optimizar distintas características de la enzima, los cuales combinados con la evolución dirigida de proteínas logran ampliar significativamente el alcance del diseño enzimático *de novo*.^{2,5}

Considerando todo lo descrito anteriormente, queda en evidencia la gran versatilidad de los métodos biocatalíticos, donde tanto enzimas aisladas como células enteras pueden utilizarse en una gran variedad de medios de reacción, y pueden ser sometidas a diversas modificaciones para adaptarse mejor al proceso de interés. Sin embargo, otros puntos de vista deben atenderse para que su uso sea más extendido.

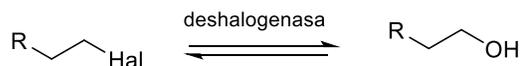
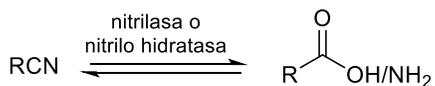
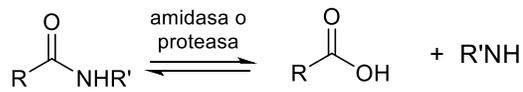
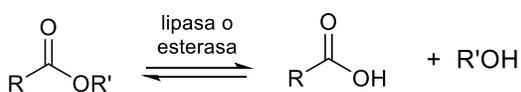
El desarrollo de la biocatálisis y las grandes posibilidades de aplicación en química sintética han llevado a reformular la manera en que se piensa la construcción de una molécula objetivo. A principio de los 60, el análisis retrosintético basado en la desconexión de enlaces hasta alcanzar los materiales de partida más simples, comenzó a revolucionar la manera de diseñar las rutas sintéticas. Cada desconexión debe representar una transformación posible en la dirección de síntesis, generando sintones a partir de la ruptura homolítica y/o heterolítica de enlaces C-C y C-X, considerando también el intercambio de grupos funcionales. Esta aproximación a los métodos sintéticos ha permitido el desarrollo de numerosas metodologías, incluyendo la catálisis homogénea y heterogénea, e incluso la organocatálisis. Sin embargo, a pesar de que todos los productos naturales deben su origen a la actividad catalítica de las enzimas, estas no se incluyen generalmente en los análisis retrosintéticos.⁹

Actualmente, más de 15 clases de enzimas diferentes se encuentran comercialmente disponibles y son capaces de generar un amplio rango de sintones útiles como materiales de partida en síntesis orgánica, sobre todo cuando se desean obtener moléculas enantioméricamente puras (Figura 1).^{2,9} En cuanto a la formación de enlaces C-C y C-X, es

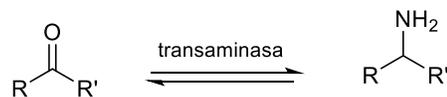
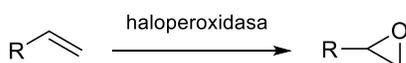
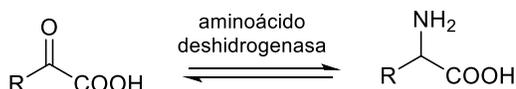
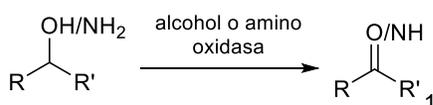
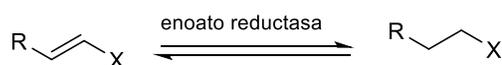
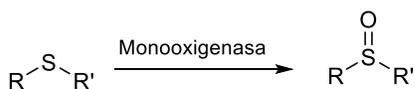
donde los biocatalizadores se encuentran subutilizados, generalmente debido al poco conocimiento de la utilidad que se le puede dar a los mismos, y en otros casos por no considerar la posibilidad de generar ciertas desconexiones o “bloques de síntesis” que sólo son posibles en un análisis retrosintético biocatalítico, lo cual lleva a una aproximación sintética totalmente diferente.⁹

Además, el descubrimiento constante de nuevas enzimas y actividades catalíticas, así como su optimización por ingeniería de proteínas abren otras posibilidades como la ingeniería metabólica, el diseño artificial de metaloenzimas, el uso de cascadas enzimáticas (tanto como enzimas libres como dentro de células enteras) y la combinación de métodos quimio- y biocatalíticos en *one-pot*, lo cual permite continuar ampliando el repertorio de transformaciones posibles.^{2-4,8-12}

Hidrólisis o hidratación



Oxidación o reducción



Formación de enlaces C-C y C-X

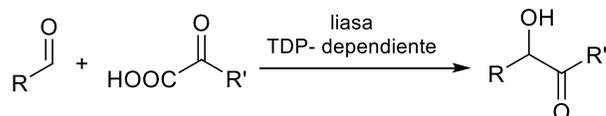
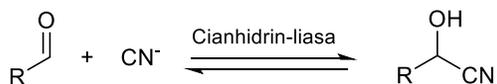
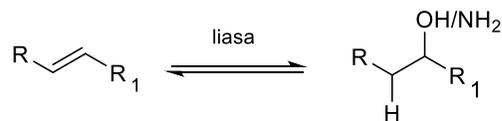
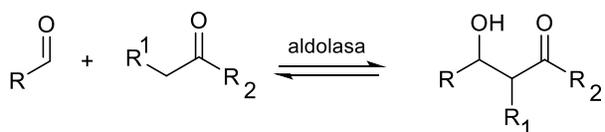


Figura 1: Ejemplos de biocatalizadores disponibles comercialmente y de los bloques de construcción generados por retrosíntesis. TDP: tiamina difosfato. Adaptado de Turner, N.; O'Reilly, E. 2013.⁹

1.1.1 *Reacciones de oxidación mediadas por enzimas*

Entre las principales transformaciones en química orgánica se encuentran las reacciones de oxidación, y desde el punto de vista de la química verde, la selectividad que ofrecen las enzimas para estas transformaciones es la mayor ventaja de los biocatalizadores sobre la catálisis química. Tal selectividad se debe al diseño único que poseen, donde metales u organocatalizadores altamente reactivos se encuentran incrustados en un marco tridimensional bien definido de la proteína, que además participa activamente en el mecanismo catalítico ubicando al sustrato en la posición adecuada y estabilizando los estados de transición.¹³

En general, las *oxidoreductasas* son enzimas que catalizan reacciones de oxidación-reducción involucrando una transferencia de electrones al actuar sobre sus sustratos y se clasifican en: deshidrogenasas, oxigenasas (mono- y di-oxigenasas), oxidasas y peroxidasas (Figura 2).⁷ Estas enzimas comprenden un tercio de las actividades enzimáticas registradas en BRENDA (BRaunschweig Enzyme DATabase) y catalizan el intercambio de electrones entre moléculas dadoras yceptoras en diversas reacciones que incluyen: transferencia de electrones, extracción de hidrógeno o protones, transferencia de hidruros, inserciones de oxígeno, entre otras. Estas transformaciones involucran dos semirreacciones, una de oxidación y una de reducción y al menos dos sustratos, siendo uno de ellos generalmente NAD(P)H o NAD(P)⁺ como dador o aceptor de electrones, cuya regeneración está acoplada al metabolismo redox dentro de la célula.¹⁴

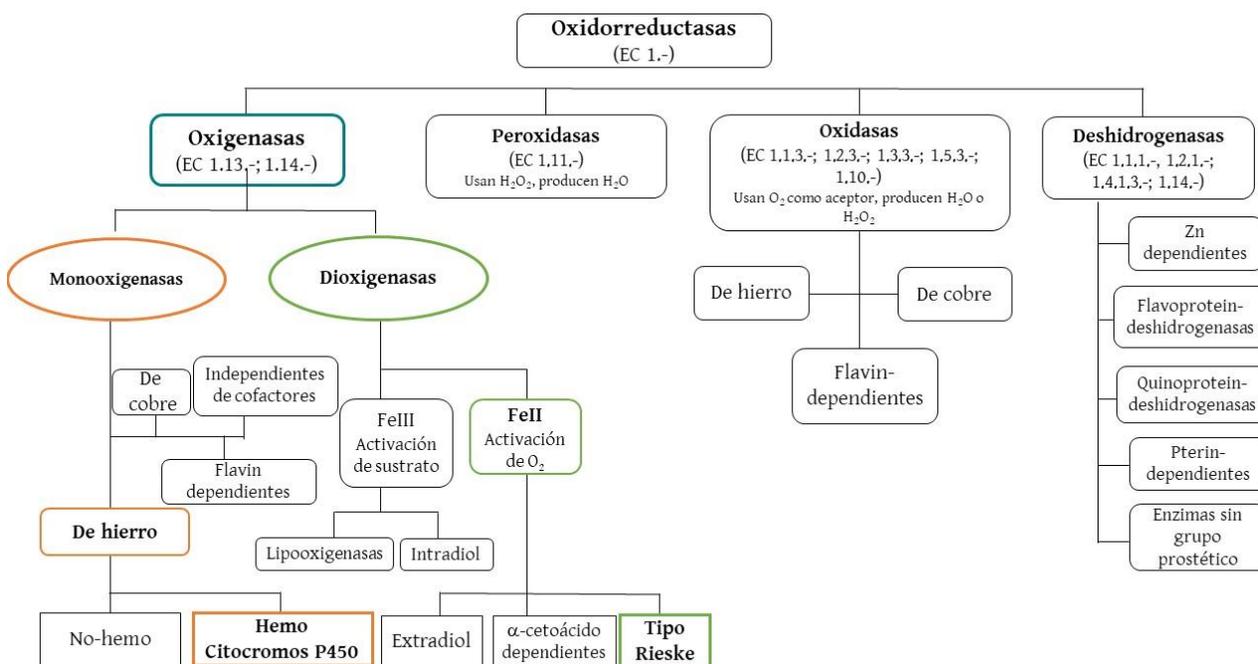


Figura 2: Clasificación de enzimas redox. Adaptado de Gamemara *et al.* 2013.⁷

El interés de la química orgánica sintética sobre estas enzimas refiere principalmente a la posibilidad de introducir regioselectivamente átomos de oxígeno en enlaces C-H no activados para dar compuestos quirales enantioméricamente puros, así como reducir estereoselectivamente compuestos carbonílicos o sintetizar y modificar polímeros. Particularmente, las **oxigenasas** se han vuelto herramientas muy valiosas en química orgánica sintética por la variedad de reacciones que catalizan (hidroxilación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, epoxidación de alquenos y arenos, *N*-, *S*- y *O*-dealquilaciones, *N*- y *S*-oxidaciones, deaminaciones, oxidaciones de Baeyer-Villiger, etc.), cuyos equivalentes en química clásica no existen o no alcanzan la selectividad deseada.^{7,14}

Históricamente, el uso de *oxidorreductasas* ha sido el más retrasado respecto de otras enzimas como por ejemplo las hidrolasas, debido a que normalmente son más difíciles de manejar. La dependencia de cofactores constituyó uno de los mayores impedimentos para su uso por lo cual comenzaron a utilizarse en forma de células enteras, lo cual representaba un

escollo para ser utilizado en un laboratorio de síntesis a escala preparativa, debido al requerimiento de manejo microbiológico. Sin embargo, en las últimas dos décadas ha habido un gran desarrollo del uso de oxidorreductasas, y como se muestra en la Figura 3 en 2011 varias reacciones de oxidación aplicaban biocatalizadores a nivel industrial.¹³

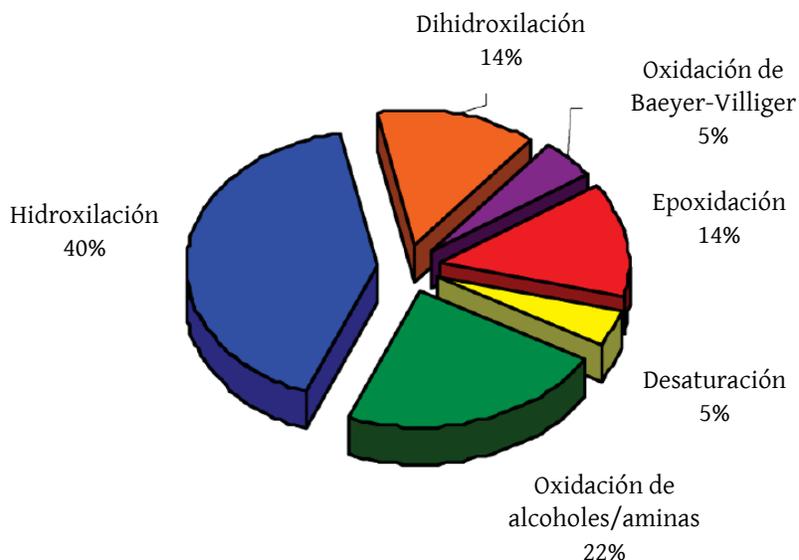


Figura 3: Distribución de los tipos de reacción de oxidación biocatalítica a nivel industrial utilizando células enteras. Adaptado de Hollmann, F. *et al.*, 2011.¹³

La utilidad de los sistemas biocatalíticos a escala preparativa depende del cumplimiento de ciertos requisitos: aceptar altas concentraciones de sustrato (al menos 50 g/L); los reactivos y cofactores deben ser económicos o regenerados por el sistema; la reacción debe ser regioselectiva, quimioselectiva y/o estereoselectiva; y el proceso debe permitir un aislamiento del producto sencillo y limpio. Actualmente, las cetoreductasas y transaminasas han demostrado ser robustas y muy activas frente a un amplio rango de sustratos sobre los que actúan con gran selectividad utilizando sistemas de regeneración de cofactores que han permitido su escalado. Sin embargo, otras enzimas redox se consideran como tecnologías en desarrollo, lo cual requiere la colaboración entre los campos de la bioquímica, ingeniería de proteínas e ingeniería de procesos.¹²

Las oxigenasas son capaces de insertar uno (monooxigenasas) o dos (dioxigenasas) átomos de oxígeno en sus sustratos utilizando oxígeno molecular. Las *monooxigenasas* son capaces de activar oxígeno molecular y oxidar una gran variedad de compuestos orgánicos como alcanos, alquenos, compuestos aromáticos y heteroátomos. Estas enzimas incorporan un único átomo de oxígeno en tanto que el segundo es reducido a agua utilizando los electrones del NAD(P)H, sin embargo su mecanismo catalítico difiere según el subtipo de enzima involucrado determinado por el metal que contenga en su sitio activo: monooxigenasas de hierro (hemo- y no-hemo), monooxigenasas de cobre, monooxigenasas flavin-dependientes, monooxigenasas multicentro (Fe-flavin-monooxigenasas y Fe-pterin-monooxigenasas) y monooxigenasas libres de cofactores. Las *dioxigenasas* por otra parte, pertenecen a una gran familia de oxigenasas de hierro mononuclear no-hemo, y son un grupo heterogéneo de enzimas que introducen dos átomos de oxígeno en dobles enlaces C-C. Estas a su vez se dividen en grupos según se encuentre el átomo de hierro en su forma Fe^{2+} (extradiol dioxigenasas y dioxigenasas tipo Rieske) o en forma Fe^{3+} (lipooxigenasas e intradiol dioxigenasas).⁷

Considerando *las oxigenasas de hierro*, las monooxigenasas que contienen grupos hemo (por ej. citocromo P450, citocromo *c* oxidasa) han sido ampliamente estudiadas en cuanto a los mecanismos de reacción, los intermediarios formados y la relación estructura-actividad. Sin embargo, el estudio de las oxigenasas de hierro no-hemo ha sido más dificultoso debido a que no presentan las transiciones espectroscópicas características de los ligandos porfirínicos. Recientemente, la obtención de las estructuras cristalinas de estas proteínas ha contribuido a profundizar en su estudio y se ha podido observar que en los sitios activos que no contienen grupos hemo, el átomo de hierro se encuentra generalmente coordinado por dos histidinas, un carboxilato monodentado y dos o tres moléculas de agua, lo cual permite diferentes posiciones de unión del oxígeno y diferentes modos de activación de este. En las enzimas que contienen grupos hemo en cambio, la porfirina macrocíclica deja una única posición axial para la unión del O_2 al hierro y su posterior activación.¹⁵ En las dioxigenasas de hierro no-hemo, la coordinación a través de His/carboxilato/agua es menos covalente y presenta interacciones

π limitadas con el hierro en comparación con el grupo hemo, lo cual puede modificar la estructura electrónica del sitio activo y por tanto la activación del oxígeno molecular. En comparación con los sistemas hemo, la ruptura heterolítica del enlace O-O en un entorno no-hemo, es energéticamente mucho menos favorable, debido en parte a la dificultad de oxidar el ligando no-hemo. En los sistemas hemo, los cofactores pueden donar dos electrones adicionales para la reducción de O_2 permitiendo la formación un intermediario $Fe^{IV}=O$, en tanto que en las dioxigenasas tipo Rieske, este centro (de tipo $2Fe_2S$) solo puede donar un electrón por lo que posiblemente se involucren especies de tipo $Fe^{III}-OOH$, $Fe^V=O$.¹⁵

Las *dioxigenasas tipo Rieske* son sistemas multicomponente que utilizan el poder reductor del NAD(P)H para la activación del oxígeno. Por su versatilidad, estas enzimas son consideradas como los análogos *no-hemo* de los citocromos P450, ya que también catalizan diversas reacciones de oxidación. Las reacciones mediadas por *monooxigenasas* incluyen epoxidaciones de alquenos y arenos, hidroxilaciones alifáticas y aromáticas, oxidación de heteroátomos, dealquilaciones y deaminaciones; en tanto que las *dioxigenasas* son capaces de catalizar la mayoría de estas reacciones salvo las epoxidaciones, y además son las únicas enzimas que catalizan la formación estereoselectiva de *cis*-dioles en un solo paso, lo cual las convierte en biocatalizadores muy prometedores para la dihidroxilación asimétrica de alquenos y arenos. En general, son utilizadas como biocatalizadores recombinantes de célula entera por su inestabilidad como enzimas aisladas además del requerimiento de cofactores que son regenerados en el metabolismo celular.¹⁴

1.2 Dihidroxilación de anillos aromáticos

El metabolismo de compuestos aromáticos en animales, plantas y hongos es conocido como un proceso de oxidación mediado por *monooxigenasas* para formar un intermediario epóxido, que a continuación es convertido por una epóxido hidrolasa en *trans*-dihidrodiol. En organismos procariotas en cambio, la oxidación de arenos es mediada por *dioxigenasas* para dar *cis*-dihidrodiol como productos iniciales, que posteriormente son sustratos de *cis*-diol deshidrogenasas produciendo los correspondientes catecoles que continuarán una vía oxidativa hacia la apertura del anillo. La diferencia entre ambos procesos se puede evidenciar por la naturaleza de los átomos de oxígeno incorporados: las dioxigenasas insertan ambos átomos de oxígeno de una misma molécula de dioxígeno atmosférico, mientras que los *trans*-diol cuentan con un átomo proveniente del aire y uno proveniente del agua (Figura 4).¹⁶

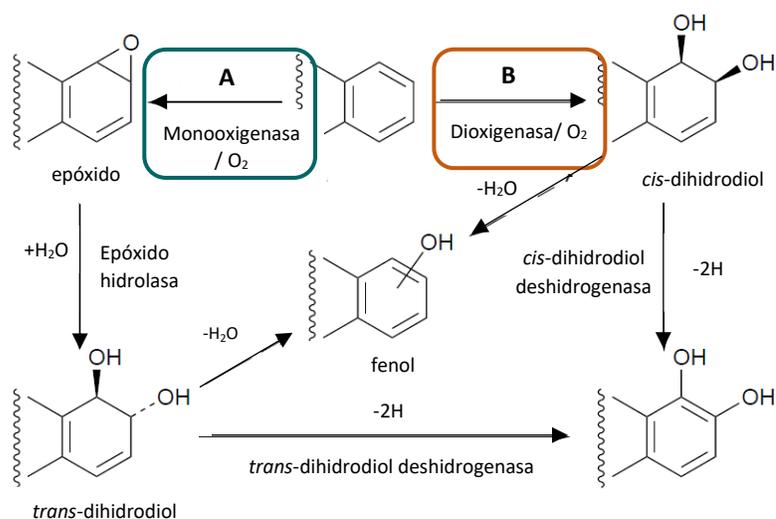


Figura 4: Primeros pasos del metabolismo de arenos. A. mediado por monooxigenasas en organismos eucariotas. B. mediado por dioxigenasas en organismos procariotas. Tomado de Boyd, D.R.; Sheldrake, G.N., 1998.¹⁶

El estudio de la oxidación microbiana de hidrocarburos por bacterias de ambiente llevó a que en 1968 Gibson reportara por primera vez el *cis*-ciclohexadienol del *p*-clorotolueno producido por una cepa de *Pseudomonas putida* (actualmente denominada F1) que crecía utilizando etilbenceno, benceno o tolueno como única fuente de carbono y energía. Los primeros experimentos mostraron que *P. putida* F1 oxidaba rápidamente benceno a *cis*-ciclohexa-3,5-dien-1,2-diol (*cis*-dihidrobencendiol) el cual era transformado a continuación en el correspondiente catecol sin acumular cantidades detectables de diol. La formación de estos intermediarios *cis*-dioles fue evidenciada en una primera instancia mediante experimentos isotópicos con extractos celulares.¹⁷ La oxidación de fluorobenceno, clorobenceno, iodobenceno y bromobenceno llevaba también a la formación de los respectivos catecoles. Estudios posteriores llevaron al aislamiento de una cepa mutante de *P. putida* F1, denominada F39/D, la cual carecía de la actividad *cis*-dioldeshidrogenasa razón por la cual los mencionados dioles se acumulaban en el medio.¹⁸

A su vez, el interés en la biodegradación de bifenilos policlorados llevó al aislamiento de *Sphingomonas yonoikuyae* B1 que crecía utilizando bifenilo como única fuente de carbono. Un mutante de esta cepa, B8/36 oxidaba bifenilo a *cis*-(1*S*, 2*R*)-3-fenil-ciclohexa-3,5-dien-1,2-diol, y también daba los dioles *cis*-(1*R*, 2*S*) del antraceno y el *cis*-(3*S*, 4*R*) del fenantreno.¹⁹ Sin embargo, estos no eran los únicos compuestos transformados en la oxidación bacteriana de hidrocarburos aromáticos, reportándose en 1971 la oxidación de ácido benzoico al ácido (1*S*,2*R*)-*cis*-ciclohexadien-1,2-diol-1-carboxílico por la cepa de *Alcaligenes eutrophus* B9 (posteriormente denominada *Ralstonia eutropha* B9).²⁰ Estudios posteriores mostraron que esta cepa es capaz de oxidar una variedad de ácidos benzoicos halogenados y metil-sustituídos a los *cis*-dioles correspondientes.²¹

Todas estas cepas mutantes tienen bloqueada la *cis*-dihidrodiol deshidrogenasa por lo que los metabolitos dihidroxilados se acumulan. En ellas la expresión enzimática se da en general en presencia del sustrato natural de las mismas que actúa como inductor, por lo cual estos compuestos deben agregarse junto con el sustrato a utilizar dificultando posteriormente la purificación del producto y reduciendo los rendimientos. Debido a esto, una vez

secuenciados los genes que codifican para estas enzimas, se construyeron microorganismos recombinantes para su expresión (por ej. *E. coli* JM109(pDTG601), *E. coli* JM109(DE3)(pDTG141), etc.), lo cual implica diferentes ventajas tanto en la manipulación y control del proceso como en el hecho de poder sobreexpresar las enzimas y aumentar así los rendimientos.

1.2.1 Clasificación y características de dioxigenasas bacterianas

Las dioxigenasas de arenos (EC.1.14.12) mencionadas, son producidas exclusivamente por bacterias y pertenecen a la super familia de *proteínas Rieske de hierro no-hemo dependientes*. Estas están formadas por tres componentes enzimáticos: i) *reductasa* que toma los electrones del NAD(P)H y los transfiere al FAD; ii) *ferredoxina* que contiene un centro Rieske [2Fe2S] a través del cual transporta los electrones del FAD de la reductasa al centro Rieske de la oxigenasa; y iii) *oxigenasa*, en general es un multímero $\alpha_n\beta_n$ que contiene un átomo de hierro mononuclear y un centro Rieske en cada subunidad α , donde el transporte de electrones se da desde el centro Rieske de una subunidad al sitio activo de la subunidad adyacente a través de un residuo de ácido aspártico conservado (Figura 5).⁷ A pesar del transporte de electrones que implican son enzimas citosólicas no asociadas a membranas.

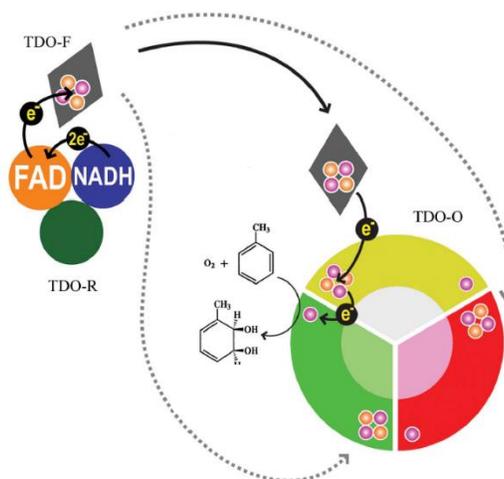
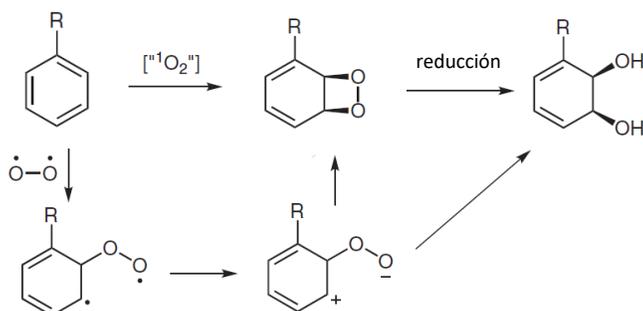


Figura 5: Esquema del sistema tolueno dioxigenasa. Se representa el rol de las tres enzimas: reductasa (TDO-R) transfiere un electrón del NADH al FAD, ferredoxina (TDO-F) conteniendo un centro Rieske acepta el electrón del FAD y lo transfiere al centro Rieske de cada subunidad α de la oxigenasa (TDO-O) los cuales alcanzan luego el Fe del sitio activo en la subunidad α contigua para la dihidroxilación del tolueno. Tomado de Friemann et al. 2009.²²

En general, su clasificación en familias se relaciona con el sustrato natural que aceptan, así como con la filogenia de la subunidad α de la oxigenasa. La familia *Tolueno/Bifenilo* incluye las enzimas que degradan tolueno, benceno, isopropilbenceno, clorobenceno y bifenilo tanto de organismos Gram-negativos como Gram-positivos. La familia *Naftaleno* consiste de enzimas de organismos Gram-negativos que degradan naftaleno y fenantreno, y contiene también las enzimas que oxidan nitrobenzeno y nitrotolueno. La familia *Benzoato* es un grupo de enzimas que oxidan ácidos aromáticos (benzoato, toluato, antranilato, 2-clorobenzoato). Finalmente, la familia *Ftalato* es el grupo más amplio de enzimas que tienen una configuración α_n , y son capaces de oxidar ácidos aromáticos como vainillato, ftalato, 3-clorobenzoato, fenoxibenzoato y *p*-toluensulfonato. En esta última se incluyen dioxigenasas y monooxigenasas y representan el grupo más diverso en cuanto a su secuencia aminoacídica y especificidad de sustrato.²³ En lo que respecta a su uso en biotransformaciones, las dioxigenasas tipo Rieske más utilizadas han sido: benceno- (BDO), tolueno- (TDO), bifenilo- (BPDO), clorobenceno- (CDO), benzoato- (BzDO), naftaleno- (NDO) y nitrobenzeno- (NBDO) dioxigenasas.⁷

En cuanto al mecanismo catalítico de dihidroxilación existen diferentes teorías, pero aún no ha sido elucidado completamente. Inicialmente, se sugirió la formación de un intermediario dioxetano tras observar que ambos átomos de una misma molécula de oxígeno ($^{18}\text{O}_2$) se incorporaban al anillo aromático (Figura 6I).²⁴ Actualmente este mecanismo parece improbable debido a la presencia de los centros Fe-S que suponen la transferencia de un electrón por vez en el mecanismo catalítico.²⁵ Además, el hecho de que las dioxigenasas presenten actividad monooxigenasa sugiere que la dihidroxilación no es un mecanismo concertado, sino que requiere de intermediarios Fe-oxo.^{26,27} Considerando que el mecanismo sea en etapas, surgen dos propuestas. Una de ellas implica la activación del oxígeno molecular por reducción a superóxido el cual reaccionaría con el arilo para generar un hidroperóxido como intermediario radicalario, que podría complejarse con el hierro para formar una especie organometálica. La ruptura del enlace O-O generaría la especie Fe(V)=O que podría efectuar la dihidroxilación en la misma cara del sustrato (Figura 6IIA).^{14,25} Por otra parte, en 1999, se observó la producción de peróxido de hidrógeno por parte de la naftaleno dioxigenasa al utilizar benceno como sustrato, concluyendo que existe un intermediario peróxido férrico similar al propuesto para otras oxigenasas y que la ruptura heterolítica del enlace O-O no sería parte de la reacción de dihidroxilación.²⁸ Considerando esto, Wolfe y colaboradores propusieron en 2001 la formación de una especie ($\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$) que podría reaccionar directamente con el sustrato arilo o derivar en una homólisis del enlace O-O para formar una especie O=Fe(V)-OH que efectuaría la dihidroxilación de manera similar a la hidroxilación de alquenos con NaIO_4 o OsO_4 , siendo esta la propuesta más aceptada (Figura 6IIB).^{7,14,29}

I) **Formación del intermediario dioxetano**



II) **Mecanismos con formación de intermediarios Fe(V)-oxo**

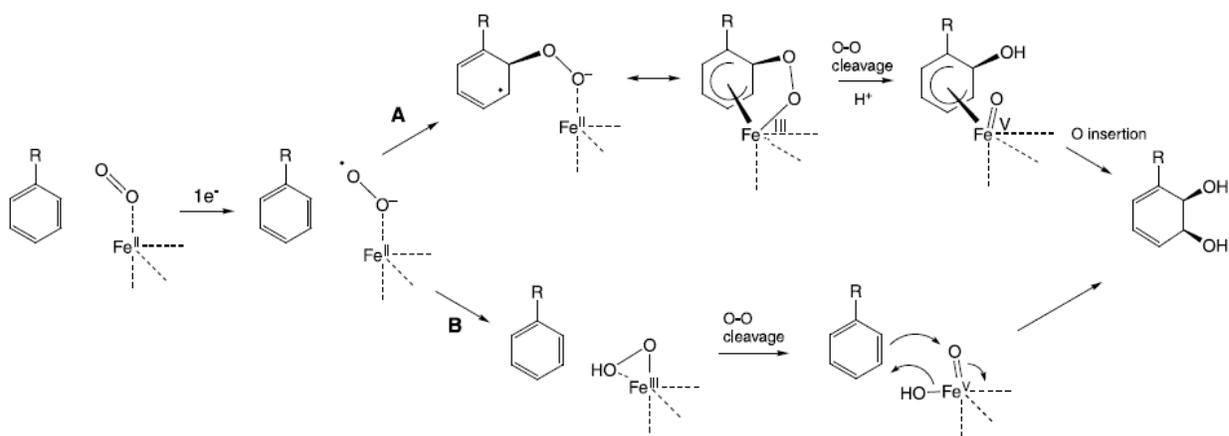


Figura 6: Mecanismos propuestos para la dihidroxilación enzimática de arenos. I) Intermediario dioxetano. Adaptado de Hudlicky, T.; Reed, J.W. 2009.³⁰ II) A. Mecanismo en etapas iniciado por reducción del dioxígeno a superóxido. B. Mecanismo con intermediario Fe(III)-OOH. Tomado de Bugg, T. 2003.²⁵

En cuanto a la **regioselectividad** de estas enzimas se puede decir que en el caso de *bencenos monosustituídos* TDO acepta la mayoría de los sustratos en tanto no contengan grupos polares como sustituyentes (NH_2 , COOH , SO_3H) y la oxidación se da en posiciones 2 y 3 del anillo aromático, salvo para el caso del fluorobenceno donde se observa una pequeña cantidad del regioisómero 3,4. La benzoato dioxigenasa requiere de sustituyentes carboxílicos e hidroxila el doble enlace 1,2 dando *ipso-cis*-dihidrodióles. Otras dioxigenasas como NDO y BPDO no son buenas transformando bencenos monosustituídos, salvo bifenilos, siendo los sustratos preferidos hidrocarburos aromáticos policíclicos.^{7,16}

Frente a *bencenos disustituídos* se han observado diferencias según el patrón de sustitución de estos y en todos los casos rendimientos menores a los obtenidos con arenos monosustituídos. En general, la sustitución en posición *meta* enlentece la reacción de dihidroxilación catalizada por TDO, realizando el efecto de otras reacciones como por ejemplo la monohidroxilación bencílica y es lo que el grupo de Boyd ha denominado como *efecto meta*.³¹ Por otra parte, en lo que refiere a los bencenos disustituídos (1,2- 1,3- y 1,4-) se ha propuesto que existe un efecto direccionador dependiente del tamaño del sustituyente donde el sustituyente más voluminoso dirige la hidroxilación hacia su doble enlace más cercano. Para determinar cuál es el sustituyente más voluminoso, se han desarrollado algunos modelos basados en el efecto estérico de los mismos determinado por diferentes parámetros (por ej. Taft, Charton, Verloop) y en algunos casos considerando el tamaño del sustituyente y su conformación. Según estos modelos, el efecto direccionador sería $CF_3 > I > Br > Cl > Me > F > H$, y la selectividad disminuiría cuanto menor sea la diferencia de tamaño entre ambos sustituyentes.³¹⁻³³

Continuando hacia los *hidrocarburos policíclicos*, principalmente transformados por NDO y BPDO, si estos son lineales (por ej. naftaleno y antraceno) la dihidroxilación ocurrirá exclusivamente la región *bay o fjord* y nunca en la *región K*, mostrando una preferencia por las regiones con menor densidad electrónica (Figura 7). Lo mismo se observa al utilizar *heteroarenos* como sustratos (dibenzotiofeno, dibenzofurano, acridina), donde la *cis*-dihidroxilación no se dirige al heterociclo.¹⁶ Sin embargo, TDO es capaz de hidroxilar heterociclos de un anillo como tiofeno, furano y pirrol, pero estos sufren una apertura espontánea para formar hidroxialdehidos acíclicos o se deshidratan dando derivados de hidroxifurano o hidroxipirrol, en tanto que derivados de la piridina no son aceptados por estas enzimas.⁷

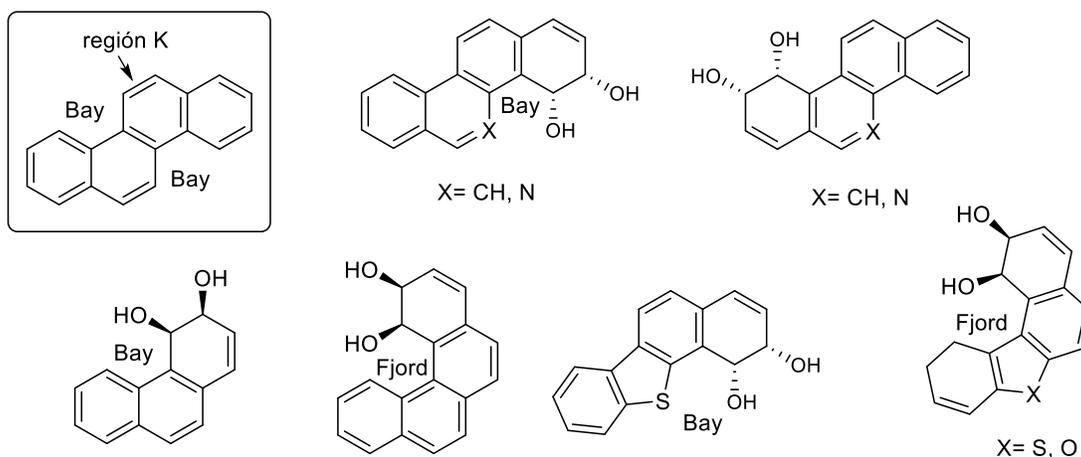


Figura 7: Dihidroxilación de compuestos policíclicos por BPDO.

Considerando lo anterior, se puede decir que las dioxigenasas son capaces de aceptar una gran variedad de sustratos que serán transformados con una marcada regioselectividad y estereoselectividad (en el caso de sustratos monosustituidos), en posiciones 1,2 para el caso de BzDO y 2,3 para TDO, NDO y BPDO.

Respecto a la **enantioselectividad** de estas enzimas, en general es muy alta y todos los dioles obtenidos con TDO, NDO y BPDO presentan la misma configuración absoluta *1S, 2R* (Figura 8I). La tolueno dioxigenasa produce un único enantiómero en la dihidroxilación de arenos monosustituidos y *orto*- y *meta*-disustituidos (Figura 8II), salvo en el caso de que los sustituyentes sean flúor donde el exceso enantiomérico disminuye al 50-70 %. Sin embargo, en el caso de los arenos *para*-disustituidos se obtienen mezclas de enantiómeros, los cuales resultan de la dioxigenación diferencial dirigida por la naturaleza de los sustituyentes (como se mencionó anteriormente el sustituyente más voluminoso será el que dirija la dioxigenación) y el posicionamiento del sustrato en el sitio activo (Figura 8III). La estereoselectividad también se mantiene frente a compuestos policíclicos y probablemente también para los compuestos heterocíclicos, solo que estos últimos epimerizan dando una mezcla de dihidrodioles *cis* y *trans* (Figura 8IV y 8V).¹⁶

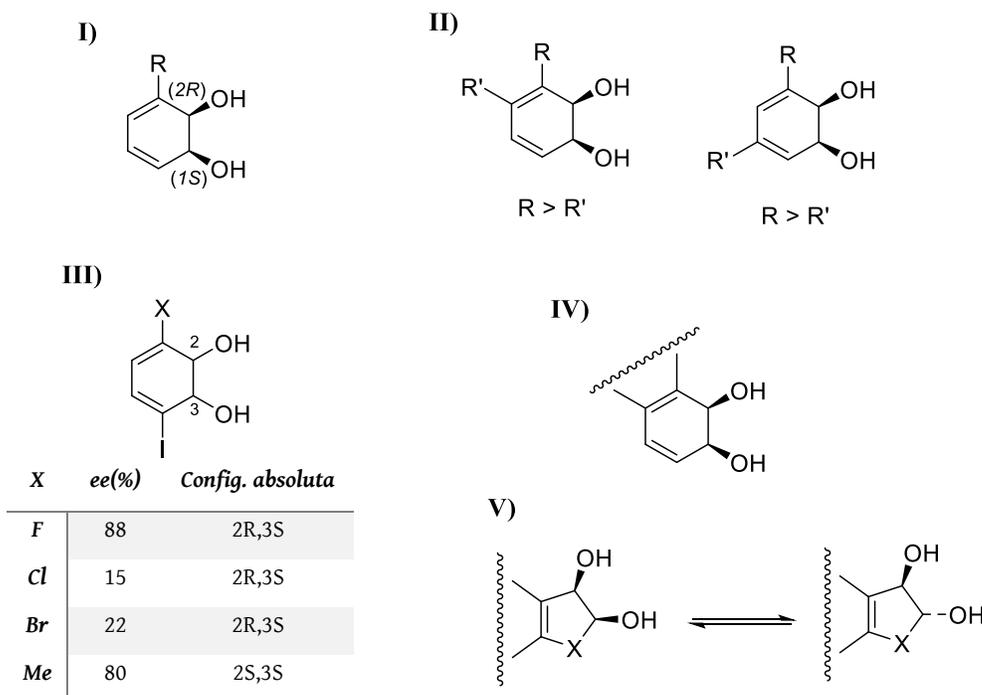


Figura 8: Configuración absoluta preferida de *cis*-ciclodihidrodoles de diferentes sustratos: I) arenos monosustituídos, II) arenos *orto*- y *meta*- disustituídos, III) compuestos *para*-disustituídos, IV) compuestos policíclicos, V) heterociclos de cinco miembros.

En cuanto a la **quimioselectividad** de estas enzimas se debe tener en cuenta que además de las dihidroxilaciones mencionadas, las dioxigenasas Rieske son capaces de catalizar otro tipo de oxidaciones como ser: *sulfoxidación* de alquilaril o diaril sulfuros, *dihidroxilación de alquenos* conjugados cíclicos y acíclicos, *monohidroxilación* de posiciones bencílicas, *desaturaciones* y *N*- y *O*- *dealquilaciones*. Estas reacciones se observan principalmente cuando la reacción de dihidroxilación se ve desfavorecida. Una de las actividades más significativas es la **sulfoxidación** de sulfuros que contengan un grupo S-arilo (diaril- o arilalquil- sulfuros) catalizada por TDO y NDO, donde la primera transforma aquellos sustratos con sustituyentes más pequeños mientras NDO oxida los sulfuros más voluminosos. Es interesante notar además que ambas enzimas son enantiocomplementarias en la sulfoxidación de un mismo sustrato, obteniéndose el (*R*)-sulfóxido con TDO y el (*S*)- con NDO; y tras la *cis*-dihidroxilación del anillo aromático es posible obtener productos con tres nuevos centros quirales.^{7,33-36}

Otra reacción de oxidación muy observada es la **monooxigenación bencílica** que se da tanto en bencenos monosustituídos como en sustratos bicíclicos.^{37,38} Esta actividad fue reportada por primera vez por Gibson y colaboradores en la biotransformación de indeno por TDO donde se identificaron tres productos: *cis*-1,2-indandiol (35 %), 1-indenol (39 %) y 1-indanona (1 %) (Figura 9I).²⁶ Posteriormente, el grupo de Boyd reportó la formación de trioles a partir de bencenos alquilsustituídos utilizando TDO, obteniendo un único diastéromero consistente con la formación del alcohol bencílico con configuración (*R*) seguida de la *cis*-dihidroxiación. Los rendimientos obtenidos para los trioles varían según el largo de la cadena alquílica siendo máximo para el propilbenceno (Figura 9II).³⁹ En el caso de bencenos disustituídos se observa un comportamiento diferente donde si la sustitución es en *orto*- o *para*- se obtiene únicamente el producto *cis*-dihidroxiado, en tanto que para los bencenos *meta*-sustituídos se observó la formación de *cis*-dihidrodiol y alcoholes bencílicos, lo cual se relaciona con el *efecto meta* previamente mencionado.^{7,31}

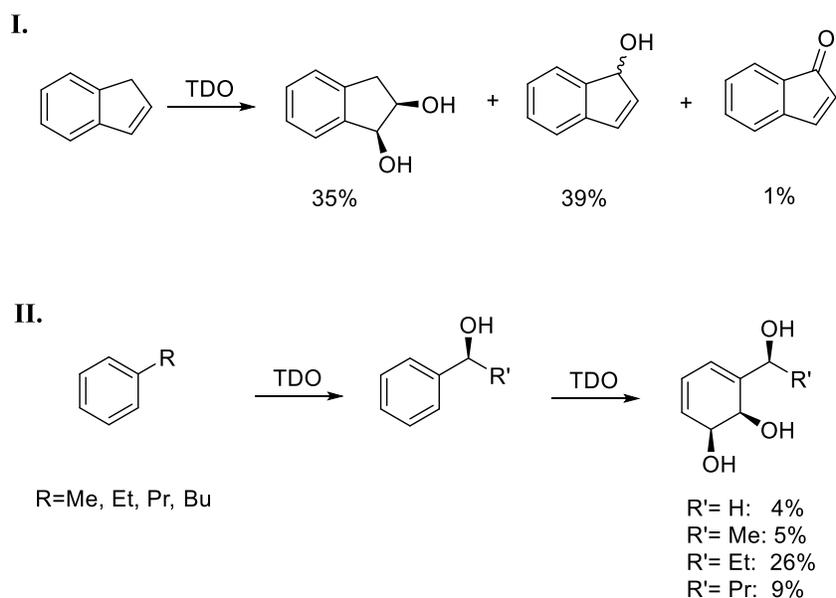


Figura 9: Ejemplos de monohidroxiación en la posición bencílica. I. Biotransformación del indeno. II. Secuencia de reacciones para la formación de trioles en arenos con sustituyentes alquílicos. Se señalan los rendimientos para cada producto.

Las tendencias observadas respecto a la prevalencia de una reacción sobre otra son: **i)** la *cis*-dihidroxiación de arenos disustituídos utilizando TDO es más lenta que cualquier otra reacción sobre arenos monosustituídos; **ii)** la *cis*-dihidroxiación de alquilbencil sulfuros usando TDO es mucho más rápida que la sulfoxidación en tanto que frente a alquilaril sulfuros prevalece la sulfoxidación; **iii)** la *cis*-dihidroxiación del areno de vinilbencenos es más rápida que la dihidroxiación del alqueno si este último se encuentra sustituido, en cambio si el anillo es disustituído se prefiere la dihidroxiación del alqueno; **iv)** la hidroxilación bencílica, sulfoxidación y dihidroxiación de alquenos utilizando benzociclo-alcanos, -alquenos y -hetero análogos como sustratos de TDO, se observan cuando la *cis*-dihidroxiación del areno no ocurre; **v)** la oxidación de dialquil sulfuros, hidroxilación alílica y dealquilación se observan en general cuando la *cis*-dihidroxiación no es posible.⁴⁰

1.3 Aplicaciones sintéticas de los *cis*-ciclohexadienodios

El interés inicial por conocer la estructura y función de las dioxigenasas era la biorremediación, ya que los hidrocarburos aromáticos son contaminantes comunes del suelo y aguas subterráneas, por lo que el uso de microorganismos para degradarlas resultaba muy atractivo.²³

Hasta 1983, tanto la industria como la academia mostraron muy poco interés en estos compuestos, pero luego de la utilización del dienodiol producido mediante la dihidroxilación enzimática del benceno como monómero en la síntesis de polifenileno a escala industrial por parte de Imperial Chemical Industries en Inglaterra, la aplicación de estos compuestos como materiales de partida en diversas síntesis se expandió ampliamente.²¹ Esto, asociado al interés de la industria química por incorporar metodologías más amigables con el ambiente en la síntesis de distintos compuestos llevó al uso de estas dioxigenasas para la obtención de compuestos enantioméricamente puros que no son obtenibles por métodos clásicos y que tienen gran utilidad en el desarrollo de compuestos de uso industrial y medicinal, cumpliendo con los principios de la química verde.²³

En el campo académico existe una gran cantidad de trabajos relacionados a las amplias posibilidades sintéticas que ofrecen estos dioles, las cuales se relacionan con las múltiples modificaciones estructurales que pueden llevarse a cabo sobre ellos, como ser funcionalización selectiva de las olefinas presentes, cicloadiciones que resulten en la formación de enlaces C-C, C-O, y C-N, deshalogenación, y ruptura oxidativa parcial o total entre otros (Figura 10I). Debido a esto se han utilizado como intermedios o como materiales de partida en la síntesis de ciclitoles, conduritoles, conduraminas, inositoles y otros derivados, así como azúcares y heteroazúcares, alcaloides y otros productos naturales (Figura 10 II).^{21,41,42}

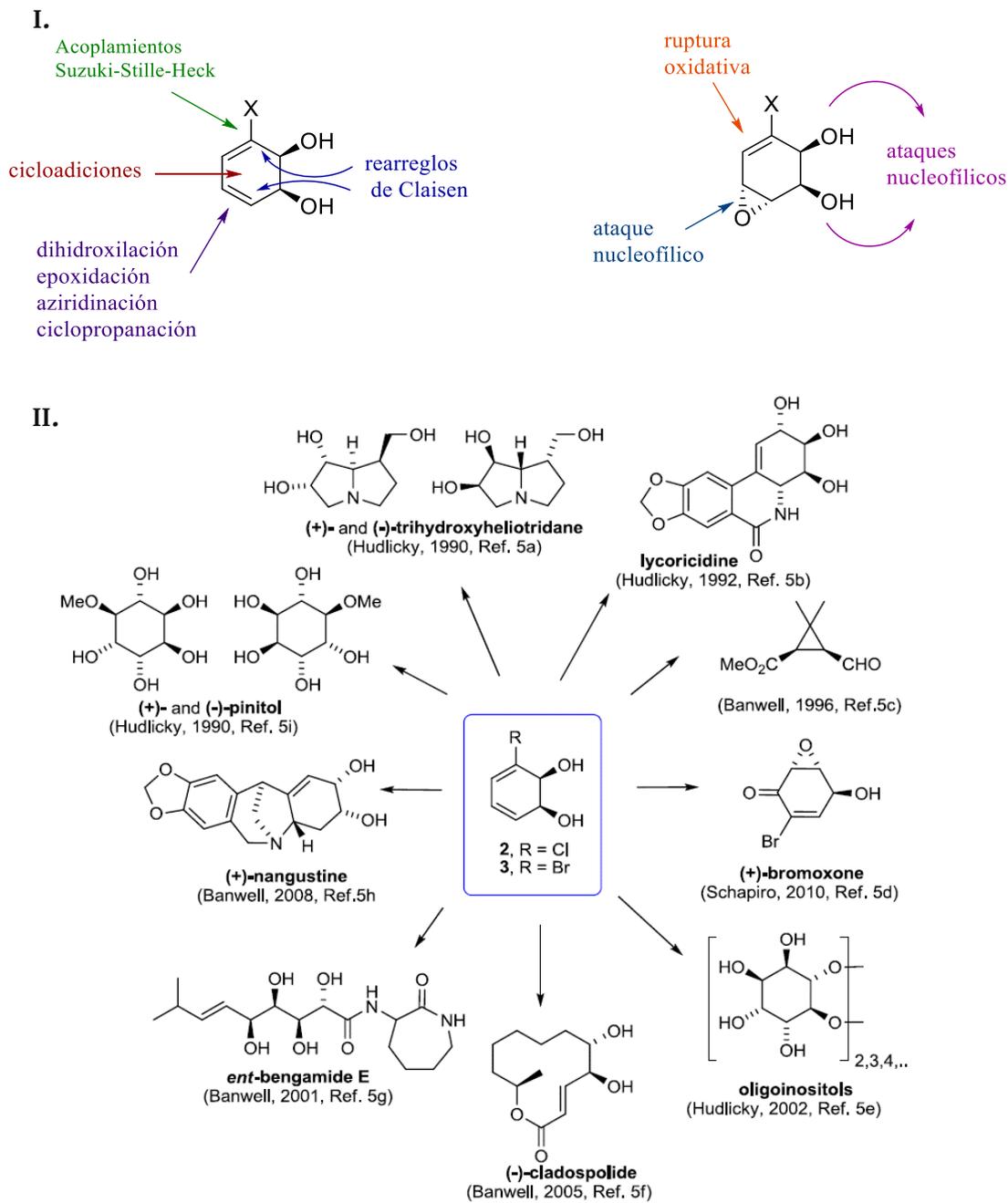


Figura 10: I. Reacciones que pueden llevarse a cabo sobre *cis*-ciclohexadienoles de origen microbiano y análisis de los planos de simetría que poseen. Adaptado de Hudlicky, T.; Reed, J. 2009.³⁰ II. Ejemplos de objetivos sintéticos alcanzados utilizando *cis*-ciclohexadienoles como materiales de partida.

Para la preparación de estos compuestos se utilizaban inicialmente cepas mutantes como *Pseudomonas putida* F39/D y *Pseudomonas putida* NCIMB 11767, y posteriormente se desarrollaron cepas recombinantes, siendo *Escherichia coli* JM109 (pDTG601) que expresa la tolueno dioxigenasa la más utilizada. Hasta 2013, existía una única publicación describiendo en forma detallada el procedimiento para utilizar este microorganismo, con foco en la tolerancia de sustratos principalmente. Dado el extendido uso de los dienodios obtenidos con este biocatalizador en las diferentes líneas de investigación del Laboratorio de Síntesis Orgánica de la Facultad de Química, nuestro grupo realizó un estudio detallado para la optimización de la biotransformación. Como resultado se determinaron las mejores condiciones de crecimiento para *E. coli* JM109 (pDTG601) en biorreactor de 5 litros obteniendo cultivos de alta densidad celular (40-60 g/L cdw), utilizando la modalidad de lote alimentado. A su vez, se analizó el impacto de diferentes factores en las productividades volumétricas y específicas del proceso de biotransformación utilizando bromobenceno como sustrato, incluyendo el uso de un sistema bifásico para la adición de éste, lo cual permitió disminuir la toxicidad del sustrato sobre las células e incrementar los rendimientos obtenidos hasta 60 g/L, superando los valores reportados hasta el momento.⁴³

A nivel industrial, luego de la preparación de polifenileno ya mencionada, el *cis*-dihidrodiol del indol producido por la naftaleno dioxigenasa fue utilizado para la síntesis “verde” de índigo, reportada en 1995. Posteriormente, Merck reportó la síntesis de indinavir (inhibidor de proteasas para el tratamiento de HIV) utilizando la *cis*-dihidroxiación del indeno para la preparación de un intermedio de síntesis, y otras múltiples aplicaciones se encuentran protegidas por patentes.¹⁶ En 1999, la síntesis de vitamina C (ácido L-ascórbico) a partir del diol del clorobenceno reportada por Banwell y colaboradores ha sido uno de los trabajos más destacados de aplicación industrial con este tipo de compuestos.⁴⁴

Por otra parte, los productos obtenidos por oxidación de ácidos benzoicos utilizando la benzoato dioxigenasa han sido mucho menos estudiados respecto a los descritos anteriormente. Esta enzima pertenece a otra familia dentro de las dioxigenasas tipo Rieske, y presenta una regioselectividad y estereoquímica diferente a NDO, BPDO y TDO, además de que

su especificidad de sustrato es mucho más acotada. A pesar de la gran versatilidad sintética que presentan los dioles obtenidos con esta enzima y las amplias posibilidades de modificación para ser utilizados como materiales de partida (Figura 11), existen pocos reportes sobre su utilización en síntesis orgánica, destacándose el trabajo realizado por Griffen, y colaboradores donde se muestran diversas secuencias sintéticas para la funcionalización de las distintas posiciones de estos sintones.^{42,45}



Figura 11: Posibles modificaciones sintéticas del diol del ácido benzoico obtenido por biotransformación con benzoato dioxigenasa. Adaptado de Griffen, *et al.* 2014.⁴⁵

2. Objetivos Generales

El objetivo central de este trabajo es **desarrollar y caracterizar novedosos biocatalizadores que expresen dioxigenasas tipo Rieske para su uso en procedimientos sintéticos de funcionalización directa de compuestos orgánicos**. Específicamente nos enfocaremos en dos tipos de transformaciones:

I) Hidroxilación en C(sp²): Dioxigenación de arenos

Dado que los *cis*-ciclohexadiendoles **1** (Figura 12A) obtenidos por funcionalización de arenos monosustituídos utilizando dioxigenasas tipo Rieske, son materiales de partida quirales de gran utilidad en procedimientos sintéticos, resulta de gran interés **obtener regio- y/o estereoisómeros de estos compuestos de forma de ampliar la diversidad estructural de los mismos** y su versatilidad como “*building blocks*” en química orgánica sintética. A su vez, nuestro grupo está especialmente interesado en obtener dienodios generados a partir de compuestos nitrogenados por su utilidad sintética y los escasos reportes sobre su uso como sustratos de estas enzimas. Para esto, se plantea desarrollar y caracterizar novedosos biocatalizadores basados en distintos sistemas enzimáticos: **TDO** (desarrollar mutantes de la enzima, Figura 12B-1 y 2), **CDO** (caracterizar el sistema frente a distintos sustratos, Figura 12B-3), **BzDO** (producir dioles *ipso-cis*-1,2, Figura 12B-4) y estudiar la actividad catalítica de **TDO** sobre arenos con sustituyentes nitrogenados.

II) Aminación directa de enlaces C(sp³)-H.

Existen varios antecedentes en la literatura que muestran la capacidad de las enzimas hierro dependientes del grupo hemo de descomponer azidas orgánicas para la formación de nitrenos reactivos, que pueden ser utilizados para reacciones inserción en enlaces C(sp³)-H o reacciones de aziridinación en olefinas. En base a esto, se propone **caracterizar la actividad de dioxigenasas tipo Rieske sobre azidas orgánicas para estudiar su potencial uso en reacciones**

de funcionalización de enlaces $C(sp^3)\text{-H}$ a través de la formación de nitrenos en el sitio activo (Figura 12C).

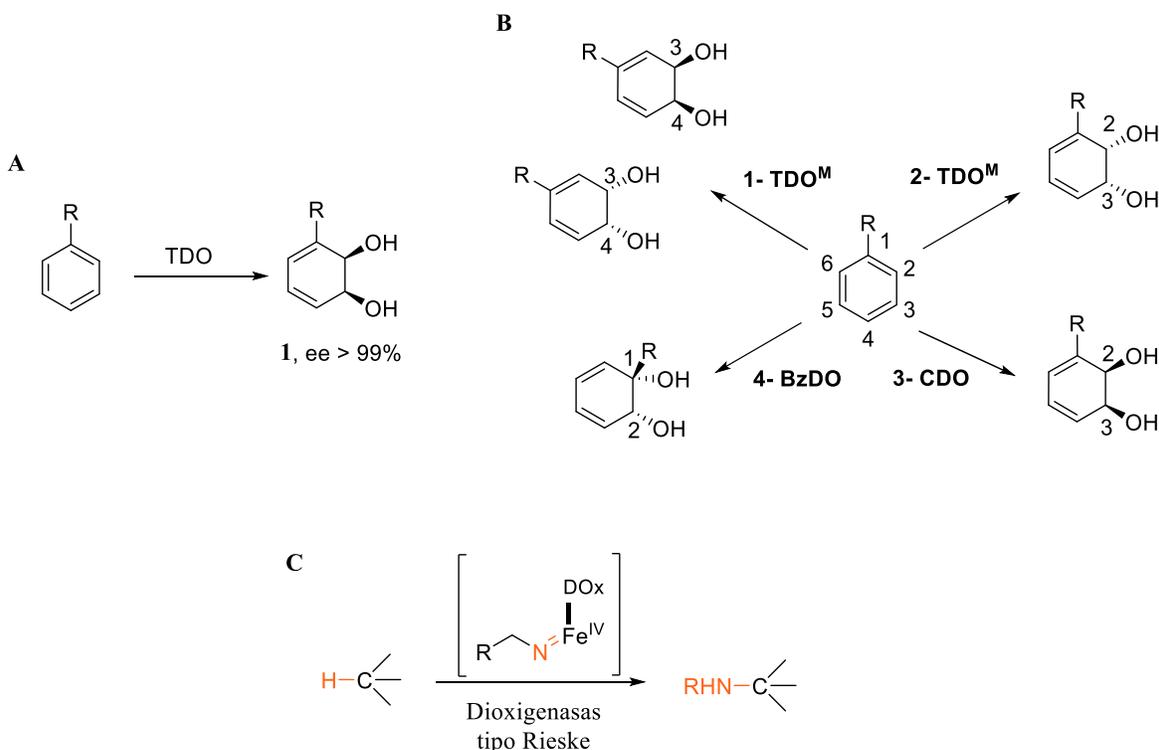


Figura 12: A: Biotransformación de arenos por TDO. B: obtención de regio- y estereoisómeros de *cis*-ciclohexadienediols, C: funcionalización C-H mediada por dioxigenasas. GF: Grupo funcional

Para una mejor comprensión de los temas desarrollados dividiré esta tesis en dos capítulos de acuerdo con los dos grandes objetivos planteados. El **Capítulo I** referirá al desarrollo de nuevos biocatalizadores que expresen dioxigenasas tipo Rieske intentando modificar la regio- y estereoquímica de la dioxigenación de arenos; en tanto que el **Capítulo II** describirá el trabajo relacionado a las nuevas actividades encontradas para estas enzimas, basadas en la descomposición de azidas para formar especies nitrenoides y su potencial aplicación en la aminación directa de enlaces $C(sp^3)\text{-H}$. Ambas secciones contarán con una introducción específica al tema, los objetivos específicos y la discusión de los resultados obtenidos.

Capítulo I: Expandiendo las herramientas biocatalíticas para la dihidroxilación de arenos

I.1. Introducción

Desde el punto de vista sintético resulta interesante contar con biocatalizadores capaces de producir *cis*-ciclohexadienodiolos con diferente regio- y estereoselectividad en la reacción de dihidroxilación; así como estudiar nuevos sustratos en busca de incrementar la versatilidad estructural de los dienodiolos disponibles, por lo cual esto fue definido como uno de los principales objetivos de la tesis. Los antecedentes existentes relacionados a estudios de mutagénesis en enzimas de la familia de dioxigenasas tipo Rieske, han permitido identificar el rol de los diferentes residuos aminoacídicos que conforman los sitios activos y su influencia en la selectividad de las reacciones, constituyendo la base del trabajo desarrollado. A continuación se desarrollan dichos antecedentes.

I.1.1. Estudios del sitio activo y mutagénesis sobre dioxigenasas tipo Rieske

I.1.1.1. *Naftaleno Dioxigenasa*

En 1998 se determinó la estructura tridimensional de NDO de *Pseudomonas sp.* NCIB9816-4, siendo el primer reporte de este tipo para la familia de dioxigenasas tipo Rieske, lo cual permitió un estudio más detallado de cada una de las enzimas que forman el complejo enzimático NDO. En cuanto a la unidad *oxigenasa*, se determinó que las distintas subunidades se encuentran dispuestas en forma de hexámero $\alpha_3\beta_3$ con tres sitios activos bien separados, donde el centro Rieske de una subunidad α se ubica muy cerca del hierro mononuclear de la subunidad α vecina, sugiriendo una cooperación funcional entre ellas (Figura 13).⁴⁶

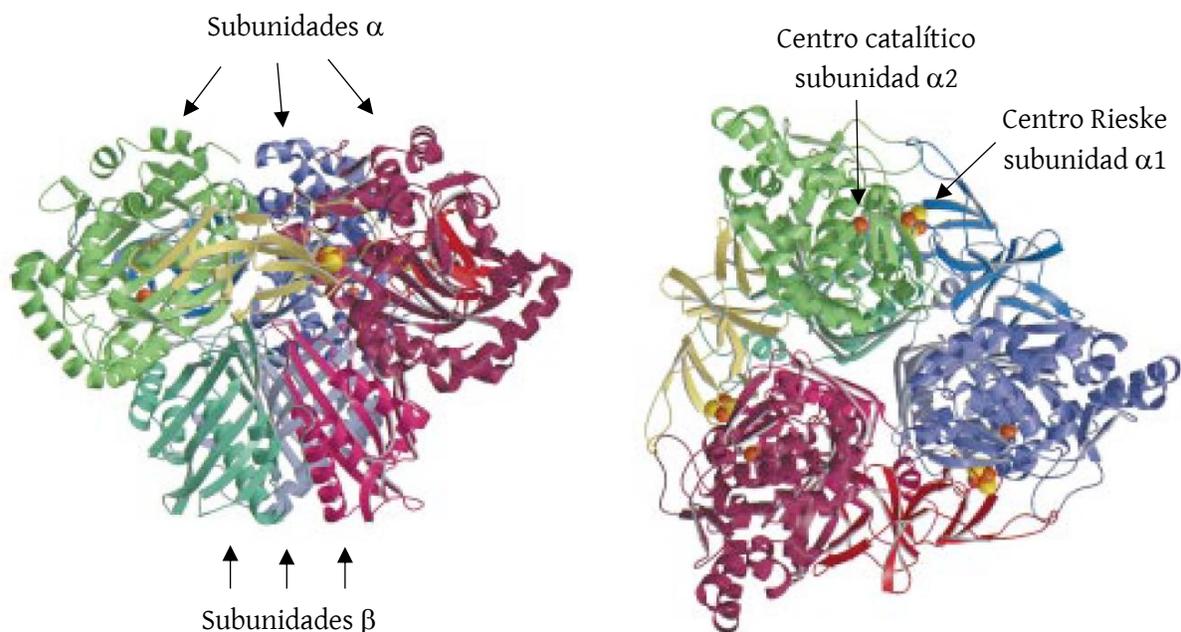


Figura 13: Estructura cuaternaria del hexámero $\alpha_3\beta_3$ que conforma NDO-O. Se observa la proximidad entre el centro Rieske de una subunidad α y el centro catalítico de la subunidad vecina. Los átomos de Fe se representan en anaranjado y los S en amarillo.
 Extraído y adaptado de Kauppi, B. *et al.* 1998.⁴⁶

Respecto al *centro Rieske* [2Fe-2S], se determinó que uno de los átomos de hierro se encuentra coordinado por Cys81 y Cys101, en tanto que el otro coordina con His83 y His104, y ambos están conectados a través de enlaces con los sulfuros formando un rombo plano. Estas histidinas a su vez están unidas por puentes de hidrógeno a los carboxilos de Glu410 y Asp205 respectivamente, ubicados en la subunidad α adyacente (Figura 14).⁴⁶

En cuanto al *dominio catalítico* se observó que el átomo de hierro se encuentra coordinado por His208, His213, una molécula de agua y de manera bidentada por Asp362 logrando una geometría de octaedro distorsionado donde un ligando parece ausente. Ambas histidinas se encuentran formando enlaces de hidrógeno con residuos de ácido aspártico, siendo uno de ellos **Asp205**, por lo que se sugiere que este residuo es importante para la transferencia de electrones desde el centro Rieske al Fe del sitio activo (Figura 14).⁴⁷ Tanto

estos residuos aspartato en la segunda esfera de coordinación como los ligandos del hierro se encuentran completamente conservados en esta familia de enzimas.⁴⁶

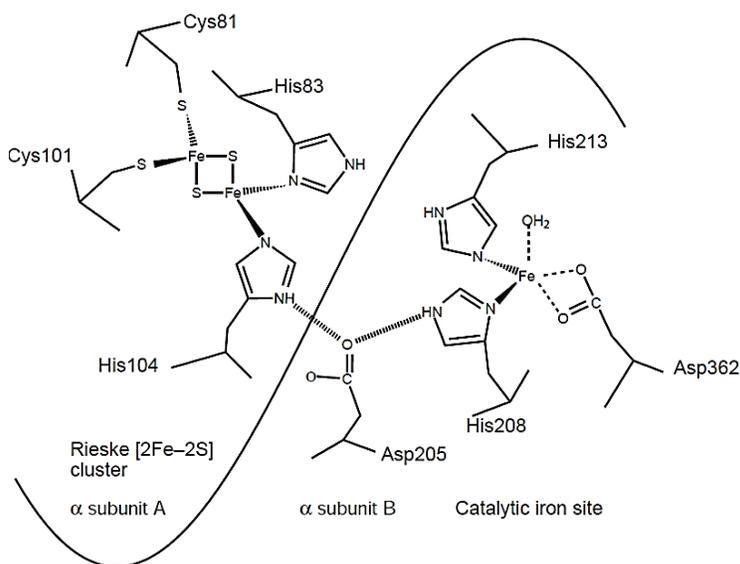


Figura 14: Representación del centro Rieske y el centro catalítico de dos subunidades α adyacentes. Se observa la conexión de ambos a través de Asp205. Extraído de Kauppi, B. *et al. Structure* 1998.⁴⁶

Por otra parte, se observó que la **asparragina 201** se ubica cercana a la posición de coordinación del Fe que queda libre, pero la distancia entre ambos parece ser demasiado grande (3.75\AA) como para ser un ligando, por lo que podría ser un ligando lábil que se reemplaza por el sustrato cuando este ingresa al sitio activo (Figura 15). Cabe destacar que este aminoácido no es totalmente conservado en la familia de las dioxigenasas, sino que se sustituye por glutamina en muchas enzimas como TDO (Gln215) y la distancia al Fe es variable.⁴⁶

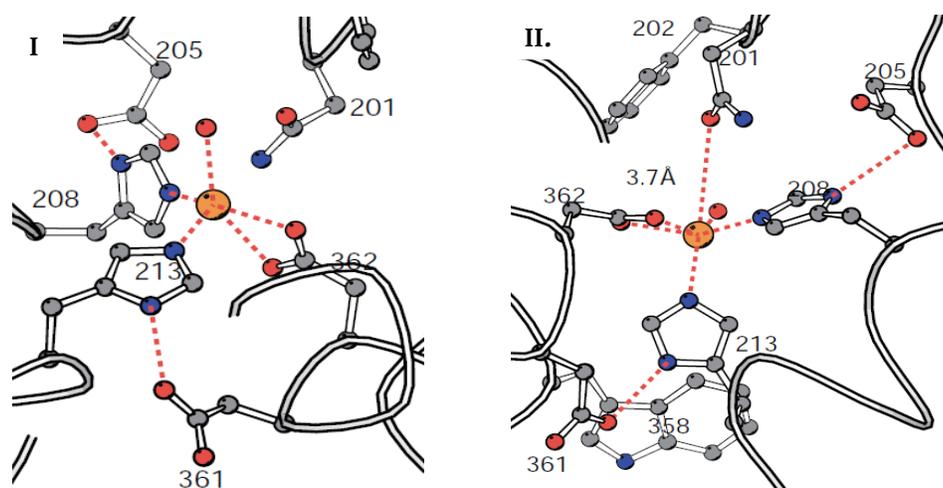


Figura 15: Vista del centro catalítico de NDO-O. El átomo de hierro se representa en anaranjado y la coordinación con His208, His213, Asp362 y una molécula de agua en líneas punteadas rojas. I. Se observa como la posición libre del octaedro se dirige hacia Asn201. II. Se representa la posible coordinación de Fe con Asn201 completando el octaedro de coordinación. Extraído y adaptado de Kauppi, B. *et al.* 1998.⁴⁶

Hacia la superficie de la proteína se observó un canal angosto que actúa como entrada de los sustratos al sitio activo, con dos *loops* formados por los residuos 253-265 y 223-240 que actúan como tapas del canal. La parte más angosta de este, con 5 Å de diámetro se ubica cerca del hierro del sitio activo y contiene al Fe y las dos histidinas que lo coordinan junto con Asn201, Phe202 y Phe352. El bolsillo debajo del Fe en el sitio activo es 7-8 Å y está rodeado por Asp362, Ile191, Pro198, Trp316, Val326, Asn363, Met366, Tyr103 (esta última de la subunidad α vecina) y un puente salino entre Lys314 y Glu359. Los residuos por encima del Fe son Ala206, Val209, Leu217, Val260, Asn297, Leu307 y Trp358. Estos residuos que rodean la cavidad no son conservados entre las distintas dioxigenasas lo cual tiene sentido por la diferencia en la especificidad de sustrato que existe entre ellas.⁴⁶ Así, las cadenas laterales de 17 aminoácidos conforman la cavidad con una superficie hidrofóbica adecuada para la interacción con sustratos aromáticos (Figura 16). Hacia el fondo de esta cavidad, por debajo del hierro mononuclear, se encuentra la única región de carácter polar formada los aminoácidos 201-205 y la cadena lateral de Asn297.⁴⁸

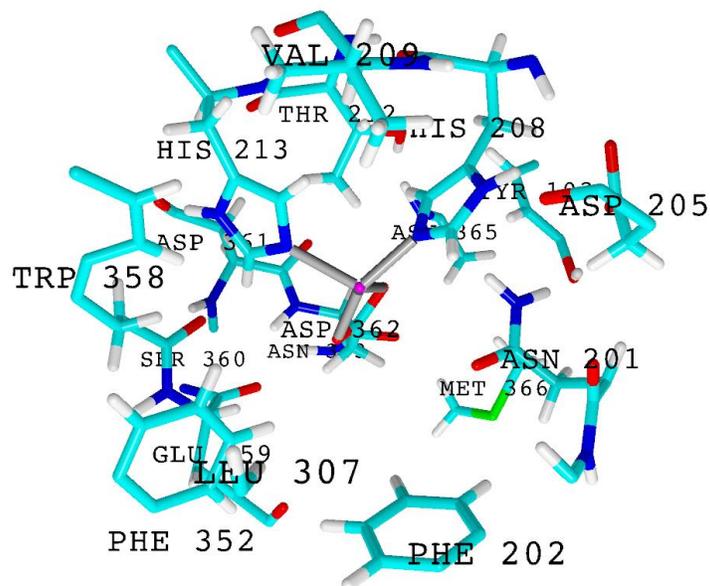


Figura 16: Vista del sitio activo de NDO. Se observa el átomo de Fe (rosado) coordinado a Asp362, His213 y His208, y los residuos que rodean la cavidad del sitio activo.

Un estudio computacional más reciente propone que el canal de entrada se encuentra formado por al menos 9 residuos con una longitud de aproximadamente 15 Å. Los aminoácidos que proveen la mayor barrera energética para la entrada de los sustratos son Phe224, Leu227, Pro234 y Leu253, siendo la *fenilalanina 224* clave por estabilizar los sustratos para la entrada a través de interacciones π - π (Figura 17). De acuerdo con este estudio, el **reconocimiento del sustrato** ocurre en dos pasos: primero en el acceso al sitio activo por el canal de entrada, y segundo por el calce adecuado del ligando en el sitio activo. La entrada del canal es ancha y se hace más angosta a unos 10 - 15 Å antes del Fe, justo donde se ubica F224, la cual es mucho más voluminosa que su equivalente en BPDO (Leu223) y podría explicar la diferencia en la aceptación de sustratos que ambas enzimas presentan. De esta forma la entrada al sitio activo no es solo un proceso de exclusión por tamaño, sino que depende además de la forma y distribución de las cargas parciales en los átomos del ligando, por lo que sustituir F224 y L227

podría ser una estrategia para que otro tipo de sustratos tengan una trayectoria más favorable de ingreso al sitio activo.⁴⁹

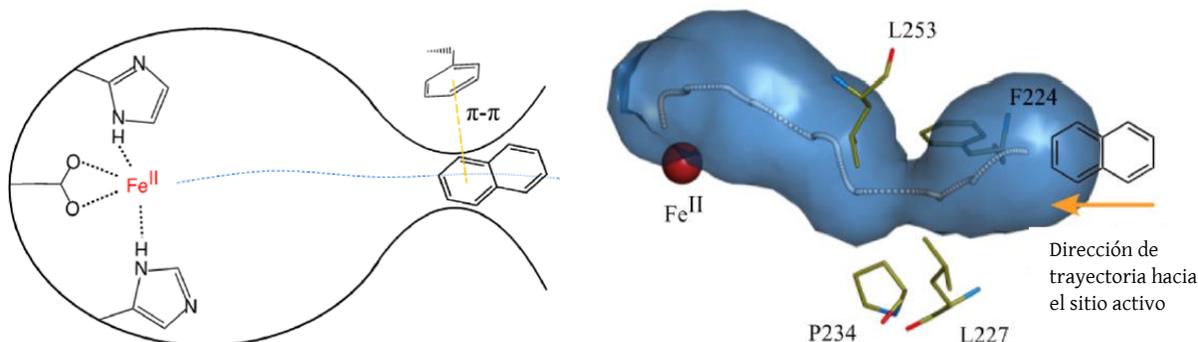


Figura 17: Canal de entrada al sitio activo de NDO. I. Se observa la interacción π - π entre F224 y naftaleno. II. Se representan los aminoácidos responsables de la principal barrera energética para la entrada de sustratos. Extraído y adaptado de Escalante, D.E. *et al.* 2017.⁴⁹

En cuanto a los trabajos de mutagénesis realizados sobre esta enzima, existen diversos reportes, inicialmente dedicados a identificar el rol de los diferentes aminoácidos del sitio activo en la actividad de NDO y posteriormente enfocados en modificar la selectividad de la enzima.

Uno de los primeros trabajos reportados por Gibson y colaboradores comprende el uso de mutagénesis sitio dirigida a residuos de la subunidad α de la oxigenasa de forma de identificar aquellos aminoácidos que controlan la regio y enantioselectividad de NDO, seleccionados en base a la estructura cristalográfica disponible. En dicho trabajo se seleccionaron Asn201, Phe202, Val260, Trp316, Phe352, Trp358, Asp362 y Met366, sustituyendo los aminoácidos pequeños por otros más grandes e hidrofóbicos y en algunos casos seleccionando la sustitución en base a alineamientos con la secuencia de otras dioxigenasas, desarrollando así 17 mutantes de la enzima. Los resultados obtenidos indicaron que las variantes F202L y D362A perdieron la actividad frente al naftaleno, bifenilo y fenantreno, indicando que los mismos son esenciales para la actividad, lo cual concuerda con la observación de que estos residuos son conservados entre distintas dioxigenasas. Las

variantes **F352V** y **F352L** llevaron a una reducción en el **exceso enantiomérico** del producto obtenido en la biotransformación del naftaleno respecto a la enzima nativa (92 y 96 % vs >99 %) lo cual resultó en la primera evidencia de que este aminoácido estaría implicado en la *enantioselectividad de NDO*. La mutación del residuo 352 tuvo un impacto mayor en la regioselectividad de esta enzima de acuerdo con lo observado al utilizar bifenilo como sustrato obteniendo como producto mayoritario el *cis*-bifenil-3,4-dihidrodiol, y no el dihidroxilado en posición 2,3 usualmente observado con la enzima nativa. El mutante W358A convirtió tan solo un 5 % de naftaleno y produjo trazas del diol del bifenilo. Al utilizar fenantreno como sustrato, V260A y W358A oxidaron únicamente las posiciones 3 y 4, en tanto que N201A, N201S, F202V, W316A, F352V, F352L y M366W produjeron mayor proporción del producto dihidroxilado en los carbonos 1 y 2. Por otra parte, la sustitución T351N tuvo un efecto mínimo en la conversión del fenantreno, sin embargo, al insertar una arginina en esta posición se observó un fuerte impacto sobre este sustrato y casi ningún cambio en la transformación del bifenilo. Aparece aquí una *dependencia del efecto de la mutación con el sustrato utilizado, observándose los cambios más significativos al utilizar el sustrato más voluminoso: fenantreno*.⁵⁰

En un trabajo posterior del mismo grupo, se determinó que la **regio- y enantioselectividad** de la enzima está afectada por la **fenilalanina en posición 352** y se observó que si se introducen aminoácidos pequeños se pierde actividad por una posible desestabilización de la proteína, mientras que si se sustituye por aminoácidos muy grandes se pierde actividad por limitar el tamaño del sitio activo. De las ocho sustituciones que se realizaron en esta posición (Ala, Gly, Ile, Leu, Thr Trp, Tyr y Val) únicamente el cambio por valina mostró *regioselectividad* diferente a la enzima nativa para la dihidroxilación de bifenilo y fenantreno y un pequeño cambio en la *estereoselectividad* para naftaleno y antraceno, en tanto que se obtuvo el enantiómero opuesto para *cis*-3,4-bifenildihidrodiol y *cis*-1,2-fenantrendihidrodiol.⁵¹ Posteriormente, los mismos autores reportaron que el cambio en la estereoselectividad para el diol del naftaleno aumentaba al combinar la variante F352I con A206I alcanzando un 30 % del enantiómero (1*S*, 2*R*) y un 37 % si se combinan estas dos mutaciones con H295I.⁵² En este

último trabajo la selección de las sustituciones fue realizada en base al alineamiento de secuencias de NDO con la 2-nitrotolueno dioxigenasa (2-NTDO), las cuales difieren en cinco aminoácidos en la región del sitio activo. Sin embargo, al combinar todas las mutaciones en NDO, la nueva variante no mostró la misma actividad que 2-NTDO ni adquirió la capacidad de dihidroxilar el 2-nitrotolueno, lo cual sugiere que existen *otras diferencias que determinan la diferente especificidad de sustrato de las enzimas*. A su vez, el triple mutante A206I-H295I-F352I llevó a la formación de un nuevo producto en la biotransformación de fenantreno dando el diol en las posiciones 9 y 10, lo cual sugiere que estos residuos son importantes para la **regioselectividad** de la enzima. La alanina en posición 206 se corresponde con la metionina 220 de TDO, identificada también como determinante en la especificidad de sustrato de la enzima.⁵²

Un estudio reciente realizado por el grupo de Hauer se enfocó en la oxidación de arenos sustituidos con cadenas de distinto largo de alcanos (tolueno, etilbenceno, pentilbenceno, *tert*-butilbenceno) y alquenos (estireno, α -metilestireno, *trans*- β -metilestireno y alilbenceno). En este trabajo se eligieron 12 aminoácidos del sitio activo ubicados a una distancia de hasta 6 Å del átomo de hierro para estudiar la influencia de estos en la especificidad de las reacciones, así como en la regio- y enantio-selectividad, introduciendo alanina, valina e isoleucina para generar 36 variantes de la enzima. Además, se estudió la expansión del espectro de sustratos aceptados utilizando (*R*)-limoneno y realizando experimentos de *docking* para evaluar los cambios de forma del sitio activo y determinar posibles combinaciones de diferentes mutaciones, desarrollando 26 nuevas variantes. De las 62 variantes construidas, siete mostraron cambios importantes en la selectividad y especificidad de la reacción frente al panel de sustratos utilizados. A modo de conclusión de los resultados obtenidos, se propuso que Phe202, Ala206, His295, Leu307 y Phe352 tienen implicancias sobre la **especificidad de reacción** (Figura 18A); Ala206, Val260 y His295 estarían relacionadas a la **regioselectividad** (Figura 18B) y Val260, His295 y Phe352 controlarían la **estereoselectividad de la reacción de dihidroxilación** (Figura 18C).⁵³

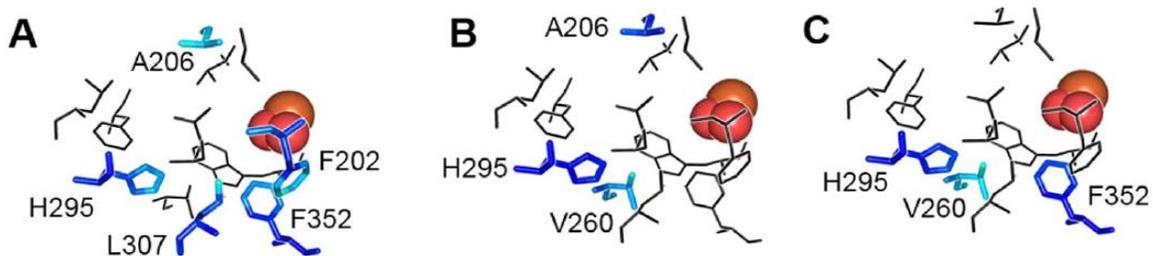


Figura 18: Representación del sitio activo de NDO señalando los aminoácidos identificados como importantes para: A. especificidad de reacción, B. regioselectividad, C. estereoselectividad. Se representa el hierro mononuclear (anaranjado) coordinado al oxígeno molecular (rojo). Adaptado de Halder, *et al.* 2018.⁵³

I.1.1.2. Bifenilo Dioxigenasa

En el caso de BPDO, se destacan los estudios sobre las enzimas provenientes de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 y de *Burkholderia cepacia* LB400, ya que ambas muestran diferencias en los compuestos policlorados que aceptan y en unos 20 aminoácidos de la subunidad α de la oxigenasa. *P. pseudoalcaligenes* KF707 es capaz de degradar varios bifenilos doblemente *para-* sustituidos, pero no los *orto-* y *meta-* sustituidos mientras que *B. cepacia* LB400 acepta mayor variedad de sustratos y tiene la capacidad de oxidar tanto en posiciones 2,3 como en 3,4 dependiendo del patrón de sustitución del sustrato.⁵⁴

Observando esto, el grupo de Furukawa publicó diferentes trabajos donde se combinan los genes de ambas enzimas.⁵⁴⁻⁵⁶ En 1998, reportaron la recombinación por *shuffling* de dichos genes, lo cual permitió identificar que la sustitución de la **treonina en posición 376** por asparragina le daba la capacidad de oxigenar en posición 3,4 y así aumentaba la capacidad de degradar compuestos policlorados.^{56,57} A su vez, observaron que modificando los aminoácidos His255, Val258, Gly268 y Phe227 mejoraba la capacidad de degradar compuestos aromáticos de un anillo como tolueno, benceno y alquilbencenos.⁵⁵ En trabajos posteriores del mismo grupo, se desarrolló un modelo computacional de BPDO basado en la estructura cristalina de NDO, y se logró confirmar que estos cuatro aminoácidos se ubican rodeando el sitio activo determinando la forma de este. Por otro lado, identificaron también **la isoleucina 335 y la fenilalanina 377** como importantes para la **regioselectividad** de la reacción y la **especificidad de sustrato** frente a diferentes patrones de sustitución.^{54,57}

Si bien los distintos mutantes mostraron actividad mejorada frente a distintos sustratos respecto a la enzima nativa (BPDO-KF707), ninguna de las variantes superó en actividad a la dioxigenasa de *B. cepacia* LB400, y *las posiciones dihidroxiladas dependieron del patrón de sustitución del sustrato*.

Una aproximación diferente y muy interesante fue la reportada por Sylvestre y colaboradores, en el cual se combinaron la subunidad α y β de diferentes bifenilo dioxigenasas con una mayor distancia filogenética: BPDO-LB400 y BPDO-B356, siendo ambas construcciones

funcionales. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que al cambiar la subunidad β , el patrón de reactividad de la enzima se veía afectado, permitiendo catalizar hidroxilaciones en 3,4 que en la enzima nativa no se observaban; e incluso, estas quimeras mostraban un patrón de selectividad distinto a ambas enzimas nativas, concluyendo que *ambas subunidades contribuyen a la selectividad de la enzima*.⁵⁸

En base a estos antecedentes, se identificaron dos regiones del gen *bphA* cuyos aminoácidos parecen influenciar las propiedades catalíticas de la dioxigenasa. La región III incluye los residuos T335, F336, N337, N338, I339, R340 e I341, y la región IV N377, F378, F384, Q255, I258, A268. Algunos de estos residuos se ubican cercanos al sitio activo y pueden interaccionar con el sustrato determinando su especificidad, en tanto que otros se encuentran más alejados, pero también afectan la actividad. Tras realizar ciertas mutaciones puntuales en varios de estos, evidenciaron que la regioselectividad no solo depende de las interacciones entre aminoácidos del sitio activo y el sustrato, sino que involucra otros residuos que podrían modular la conformación del el bolsillo catalítico.^{57,59,60}

I.1.1.3. Tolueno Dioxigenasa

Si bien TDO fue de las primeras dioxigenasas tipo Rieske reportadas y utilizadas tanto a nivel académico como industrial, fue cristalizada por primera vez en 2005⁶¹ y en 2009 Friemann y colaboradores publicaron el primer análisis de su estructura.²²

Este último trabajo permitió determinar que la **reductasa de TDO (TDO-R)** pertenece a la familia de las glutatión reductasas y en ella se distinguen tres dominios: uno de unión a FAD, otro de unión a NADH y el dominio carboxilo terminal. La **ferredoxina de TDO (TDO-F)** se divide en dos subdominios, el dominio grande y el dominio de unión que contiene un centro Rieske [2Fe-2S] coordinado por dos histidinas y dos cisteínas. A través de este último la ferredoxina recibe los electrones del NAD(P)H que a través del FAD pasan al centro Rieske de dicha enzima, y de este último son transferidos al centro Rieske de la **oxigenasa (TDO-O)** (Figura 19I). Esta última, al igual que en NDO, es un hexámero $\alpha_3\beta_3$ donde la subunidad α contiene un dominio Rieske [2Fe-2S] (coordinado por His98, His119, Cys96 y Cys116) y el dominio catalítico con el Fe mononuclear coordinado por His222, His228 y Asp376, que recibe los electrones del centro Rieske de la subunidad adyacente a través de Asp219 (análogo a Asp205 en NDO); en tanto que la subunidad β parece tener un rol principalmente estructural, aunque otros trabajos sugieren que puede tener cierta influencia en la especificidad de sustrato.^{58,62} Todas las subunidades presentan una gran homología de secuencia con BPDO de diferentes organismos, lo cual es consistente con que ambas enzimas se agrupen en la misma familia de dioxigenasas.²²

En cuanto al sitio activo, presenta una forma elipsoide y está formado por 17 residuos principalmente hidrofóbicos donde el sustrato se estabiliza mediante interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals. Los residuos **Phe366**, **Phe216** e **Ile324** delimitan un lado de la cavidad, Ala223 y el C^ε de His222 establecen interacciones para estabilización del sustrato, en tanto que His311, si bien un poco más alejada, también estaría implicada en la orientación de los compuestos dentro del sitio activo (Figura 19II).²²

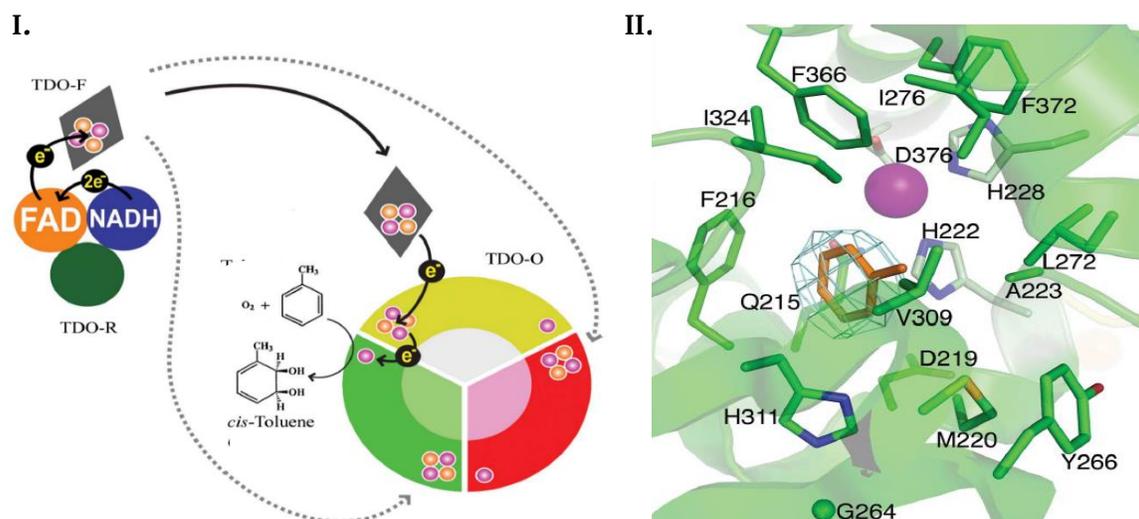


Figura 19: I. Representación del sistema Tolueno Dioxigenasa y la transferencia de electrones entre sus componentes. II. Sitio activo de TDO-O conteniendo tolueno (anaranjado). Se observa el Fe mononuclear (violeta) coordinado a H222, H228 y D376. Se representan también el resto de los aminoácidos del sitio activo. Adaptado de Friemann, R. *et al.* 2009.²²

Por fuera de la esfera de coordinación y a 3.3 Å del átomo de hierro se ubica la cadena lateral de **Gln215**, la cual corresponde a Asn201 en NDO que se cree está implicada en un canal de agua importante para la transferencia de protones hacia el sitio activo. Además, este residuo de asparragina en NDO se ha propuesto como ligando del metal en ciertas etapas de reacción, lo cual también podría ocurrir con Gln215 en TDO dado que se encuentra incluso más cerca del hierro que Asn201 en NDO.²²

En 1996, el grupo de Gibson publicó un estudio basado en la secuencia aminoacídica de la subunidad α de la oxigenasa considerando una región conservada dentro de la familia de las dioxigenasas: Glu214, Asp219, His222, His228, Tyr221 y Tyr266. Estos residuos habían sido propuestos en distintos trabajos como posibles ligandos del hierro mononuclear, por lo que para determinar la relación entre estos aminoácidos y la actividad enzimática los reemplazaron por alanina. Como resultado, el reemplazo de Glu214, Asp219, His222 y His228 llevó a una pérdida total de la actividad dioxigenasa, confirmando la importancia de los

residuos que coordinan al hierro mononuclear, en tanto que la sustitución de las tirosinas resultó en una pérdida parcial de dicha actividad.⁶³

Las investigaciones en ingeniería genética utilizando la tolueno dioxigenasa eran tan solo dos al comienzo de esta tesis, y en ambos el objetivo era generar cambios en la especificidad de sustrato. El primero de ellos, publicado en el año 2000 por Lee y colaboradores, planteaba disminuir los productos secundarios de la biotransformación del indeno y favorecer la producción del indandiol por su interés para la síntesis de indinavir mediante mutagénesis en los cuatro genes de TDO.⁶² Al año siguiente, el grupo de Arnold publicó un trabajo de evolución dirigida sobre la subunidad α de la dioxigenasa, orientado a obtener variantes de la enzima capaces de aceptar la 4-picolina como sustrato.⁶⁴ Ambos trabajos abordan el problema utilizando PCR propensa a errores (*error prone PCR - epPCR*) sobre los diferentes genes de TDO, por lo cual resulta difícil concluir el rol de los diferentes aminoácidos afectados, teniendo en cuenta además que ambos trabajos fueron publicados antes de conocer la estructura cristalográfica de la enzima.

I.1.1.4. Clorobenceno Dioxigenasa

Este sistema enzimático ha sido mucho menos explorado, no existiendo reportes sobre su estructura cristalográfica, ni estudios de mutagénesis orientados a dilucidar el rol de los diferentes aminoácidos en el sitio activo. El escaso trabajo con esta enzima ha estado orientado a la construcción de sistemas de expresión heterólogos de utilidad para su aplicación, y la evaluación de estos con diferentes sustratos.

De acuerdo con el estudio realizado por Werlen y colaboradores en 1996, la clorobenceno dioxigenasa está muy ligada evolutivamente a TDO con más de un 80 % de similitud en cada una de las secuencias aminoacídicas para las que codifican sus cuatro genes. En dicho trabajo se realizó el clonado de los genes *tcbAaAbAcAd* en vectores derivados de pET8c para su sobreexpresión en *E. coli* bajo un promotor fuertemente regulado como *T7*, no lográndose la expresión de enzima activa. Ante estos resultados, se cambió el sistema de

expresión pasando a un vector pUC19 dando lugar al plásmido pTCB144 donde los genes se encuentran bajo control del promotor *lac*. Este sistema fue utilizado para la biotransformación de 1,2-diclorobenceno, tolueno, bifenilo y naftaleno, reportándose que los dos últimos eran mejores sustratos para CDO, sin embargo no se expresan rendimientos de reacción.⁶⁵

En un trabajo posterior del mismo grupo, se utilizó dicho sistema para la biotransformación de otros compuestos, observando que frente a *bifenilos monosustituídos* la dihidroxilación ocurre en el anillo sin sustituyentes, mientras que *bifenilos di- y tri-sustituídos* no fueron oxidados. Además, al utilizar distintos *bencenos 1,4-disustituídos* se observó que el exceso enantiomérico de los productos es mayor que el obtenido con TDO. Al comparar la velocidad de formación de producto utilizando distintos *bencenos monosustituídos* se observó que era mayor cuanto más pequeño y menos electronegativo es el sustituyente, de forma que para clorobenceno y fluorobenceno las velocidades fueron similares, pero el sustrato transformado más rápidamente fue el naftaleno.⁶⁶

En 2004 y 2005, se publicó la utilización de un nuevo sistema de expresión de CDO en *E. coli* JM101 (pTEZ30) donde los genes de la dioxigenasa fueron clonados bajo el promotor *alk* de *Pseudomonas sp.*⁶⁷ Los sustratos utilizados en ambos trabajos son benzonitrilos *orto*, *para* y *meta* sustituidos, y cinamonitrilo, con conversiones que van de 3 a 50 %.^{67,68}

Todos estos resultados sugieren que existe cierta diferencia en la preferencia de sustratos de esta enzima respecto de TDO, sin embargo, estos sistemas no han sido utilizados con fines de producción de *cis*-ciclohexadienodiolos a gran escala. Por lo tanto, en este trabajo se propone caracterizar esta enzima frente a diferentes sustratos y compararlo con TDO.

I.2. Objetivos específicos.

- ◆ **Desarrollar variantes de TDO (TDO^M)** por mutagénesis sitio dirigida y caracterizar las mismas frente a tolueno, bromobenceno, propilbenceno, estireno e indeno. Identificar los productos obtenidos y determinar su estereoquímica.
- ◆ Construir un **sistema de expresión de la clorobenceno dioxigenasa** análogo al de TDO. Clonar los genes *tcbAaAbAcAd* bajo el promotor *tac* para la caracterización de CDO utilizando *Escherichia coli* JM109. Analizar la actividad catalítica de la cepa recombinante frente a los mismos sustratos que TDO.
- ◆ Producir dioles con **regioquímica 1,2** utilizando el biocatalizador *Ralstonia eutropha* B9 que expresa la **benzoato dioxigenasa** en escala de biorreactor de 5 litros.
- ◆ Estudiar la capacidad de **TDO** de aceptar **sustratos nitrogenados** con el fin de aumentar la diversidad de dienodios obtenidos.

I.3. Resultados y Discusión

I.3.1 Desarrollo de mutantes de la Tolueno Dioxigenasa

Si bien TDO es el sistema más utilizado para la producción de *cis*-ciclohexadienodiolos utilizados en síntesis orgánica, los estudios en cuanto a la posible modificación de su regio- y estereoselectividad son escasos. Por otra parte, nuestro grupo ha optimizado el proceso de crecimiento y biotransformación de diferentes arenos con este sistema, por lo cual resulta de sumo interés trabajar con él. En base a los exhaustivos estudios sobre otras enzimas de la misma familia se decidió utilizar la información disponible para determinar las sustituciones a realizar mediante el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de TDO, NDO y BPDO (Figura 20). De acuerdo con esto se seleccionaron los siguientes residuos y sustituciones:

- **I324F:** Corresponde a I335 en BPDO el cual al ser sustituido por fenilalanina favoreció el cambio en la regioselectividad de la reacción.⁵⁴
- **T365N:** análogo a T376 en BPDO-KF707 que al cambiar por asparragina (presente en BPDO-LB400) modificó la regioselectividad de la dihidroxilación hacia las posiciones 3 y 4.⁵⁶
- **F366V:** Equivalente a F352 en NDO al cual se le ha atribuido un rol fundamental en la regio- y estereoselectividad de la enzima.⁵¹
- **Q215A:** Residuo análogo a Asn201 en NDO, supuestamente implicado en el canal de agua hacia el sitio activo e indispensable por lo tanto para la transferencia de protones hacia el mismo.⁶⁹ La sustitución por alanina se propone para evidenciar el rol de este aminoácido en el mecanismo de la reacción.



Figura 20: Alineamiento de secuencias de la subunidad α de las oxigenasas de TDO, NDO y BPDO. Se señalan los residuos seleccionados para mutagénesis sitio dirigida.

La generación de los mutantes de TDO se realizó utilizando la técnica de *Quick change*. Para esto se diseñaron los oligonucleótidos necesarios incluyendo el cambio de bases correspondiente para generar las mutaciones deseadas y se amplificó el plásmido pDTG601. Tras digestión con DpnI, el ADN resultante se utilizó para transformar células electrocompetentes de *Escherichia coli* JM109 y posteriormente se confirmó la presencia de la mutación mediante el secuenciado de los plásmidos obtenidos de los clones seleccionados.

La caracterización de los biocatalizadores, y por ende la evaluación del impacto de estas mutaciones, se realizó llevando a cabo la biotransformación de sustratos que permitieran evaluar diferentes aspectos de la actividad enzimática (Figura 21). El *bromobenceno* (2) y el *tolueno* (3) son los sustratos que originan los dienodios más utilizados con fines sintéticos y permiten observar cambios respecto a la actividad enzimática a través

de los rendimientos obtenidos, así como potenciales cambios en la regio- y estereoselectividad de la biotransformación. También se incluyeron el *propilbenceno* (**4**) y el *indeno* (**5**) como forma de evaluar el impacto en la capacidad de hidroxilar posiciones bencílicas que da lugar a los productos **4b** y **5b** además de los compuestos dihidroxilados correspondientes, debido a la actividad monooxigenasa ya descrita para esta enzima.³⁹ De esta manera podemos evaluar además de la regio- y estereoselectividad de la dioxigenación, la quimioselectividad de la enzima para llevar a cabo procesos como mono- o dioxigenasa. En este sentido, también se incluyó el *estireno* (**6**) como otro indicador de cambios en la quimioselectividad de la enzima ya que este sustrato cuenta con una olefina en la cadena lateral que también puede ser dihidroxilada para dar el producto **6b** además de **6a**.

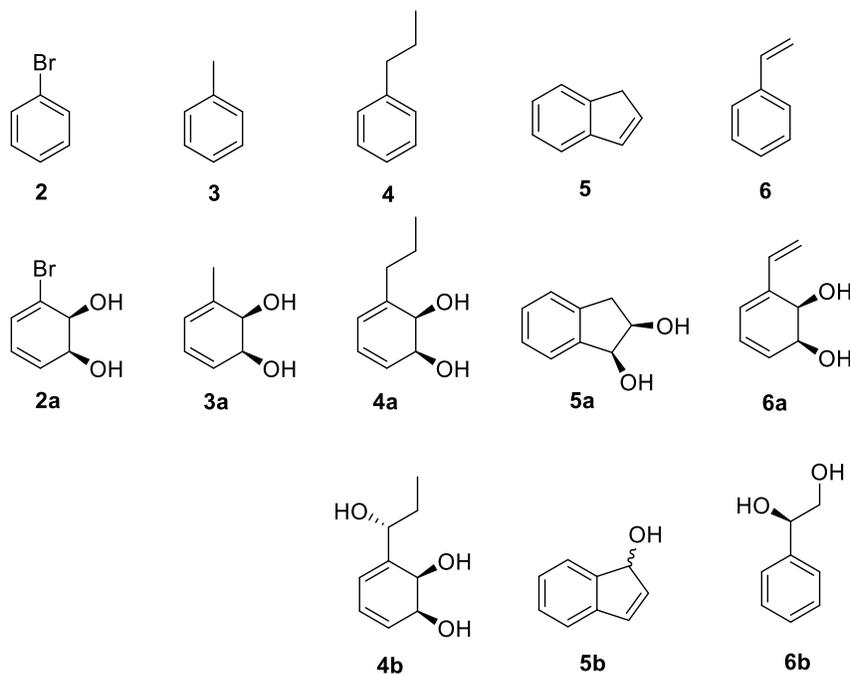


Figura 21: Sustratos utilizados para el análisis de actividad de los mutantes de TDO (2-6) y productos obtenidos con TDO WT.

Todas las biotransformaciones se llevaron a cabo en escala de 100 mL utilizando células en reposo crecidas en biorreactor y suspendidas en buffer M9, con una $OD_{600}=30$ agregando 10 mM de sustrato e incubando toda la noche a 28 °C. Posteriormente se separaron las células y se liofilizó el medio acuoso, los sólidos obtenidos fueron analizados por $^1\text{H-RMN}$ para determinar la composición de las mezclas utilizando 1,3-dinitrobenceno como estándar interno para la cuantificación de las especies presentes. El exceso enantiomérico fue determinado mediante HPLC quiral, en base a lo reportado por el grupo de Boyd,^{32,70,71} utilizando los productos purificados por columna cromatográfica o TLC preparativa y los estándares correspondientes. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Resultados de biotransformación de los sustratos 2 a 6 utilizando las variantes de TDO desarrolladas.

Sustrato	Producto	TDO (nativa)			I324F			T365N			F366V			Q215A		
		% ^a	ee% ^b	a:b ^c	% ^a	ee% ^b	a:b ^c	% ^a	ee% ^b	a:b ^c	% ^a	ee% ^b	a:b ^c	% ^a	ee% ^b	A:B ^C
2	2a	57	99	-	49	99	-	55	99	-	2	60	-	nd	-	-
3	3a	19	-	-	nd	-	-	3	-	-	nd	-	-	1	-	-
4	4a	31	>99	77:23	12	>99	100:0	18	>99	100:0	nd	-	-	nd	-	-
	4b	10	90		nd	-										
5	5a	5	33	42:58	nd	-	-	2	23	11:89	9	-9 ^d	100:0	0.6	-	75:25
	5b	7	29		nd	-		15	53		nd	-		0.2	-	
6	6a	8	>99	85:15	3	>99	37:63	3	>99	24:76	nd	-	0:100	0.1	-	92:8
	6b	1	>99		5	54		11	>99		2	17		1	-	

a. Rendimiento de biotransformación determinado por ¹H-RMN del crudo utilizando 1,3-dinitrobenceno como estándar interno.

b. Exceso enantiomérico determinado por HPLC quiral.

c. Relación de productos **a:b** determinada por ¹H-RMN en el crudo de biotransformación

d. El signo de menos indica relación invertida de enantiómeros.

nd no detectado

Observando el conjunto de resultados se ve que no hubo un cambio en la regioselectividad de la dihidroxilación en ningún caso, sin embargo, se observan interesantes resultados en cuanto a la quimio- y estereoselectividad de la enzima. Todas las determinaciones de ee % para los dioles obtenidos con la enzima nativa concordaron con los valores reportados previamente, excepto para el producto **6b**. Para este, el exceso enantiomérico reportado es de 88 % para el isómero 1*R* utilizando *P. putida* UV4,⁷² mientras que nuestros datos muestran un ee >99 %, sin embargo, esto es consistente con los mayores excesos enantioméricos encontrados por Boyd y colaboradores al utilizar *E. coli* JM109 (pDTG601) como sistema de expresión de TDO frente a *P. putida* UV4.⁷⁰

Antes de continuar con la discusión de estos resultados, describiré los esfuerzos realizados para el diseño de un modelo computacional del sitio activo de TDO que fue desarrollado en colaboración con el Dr. Nicolás Veiga, y que resultó de gran utilidad para la interpretación de los resultados obtenidos experimentalmente. Este trabajo resultó en el primer reporte de un modelo computacional del sitio activo de esta enzima con una descripción de su arquitectura e interacción con diferentes sustratos permitiendo predecir la orientación de los mismos, el cual se adjunta en el anexo.⁷³ Este modelo permitió observar el sitio activo de forma elipsoide donde se distinguen cuatro bolsillos mayoritariamente hidrofóbicos (Figura 22I): el primero (1), formado por Leu272, Val309 e Ile324; el segundo (2) y más grande de los cuatro rodeado por Ile276, Ile324, Phe366 y Phe372; los bolsillos 3 y 4, de carácter más hidrofílico, contienen a Gln215 y Phe 216, y His311 y Met220 respectivamente. Además, pudo observarse que la glutamina en posición 215 al igual que la asparragina 201 en NDO, junto con una molécula de agua estarían completando el octaedro de coordinación del hierro en el sitio activo cuando el oxígeno aún no se ha coordinado al mismo (Figura 22II).

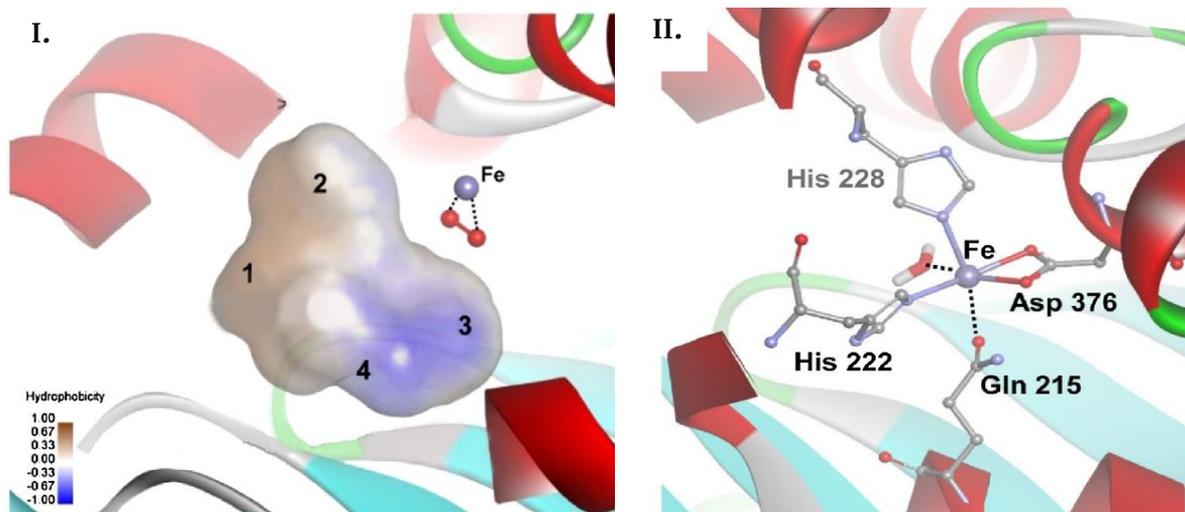


Figura 22: I. Representación de los distintos bolsillos del sitio activo de TDO indicando la hidrofobicidad de cada uno. II. Estructura del sitio activo de TDO previo a la entrada de oxígeno y sustrato. Se observa la interacción de la glutamina 215 y una molécula de agua con el átomo de Fe completando las posiciones de coordinación de este

Al realizar estudios de *docking* de diferentes sustratos, se pudo observar cómo se acomodan los distintos sustituyentes de los anillos aromáticos, los cuales se orientan principalmente hacia los bolsillos 1 y 2, maximizando las interacciones lipofílicas con los aminoácidos que los rodean y minimizando las repulsiones estéricas. Estos resultados brindaron la primer evidencia en cuanto a la monooxigenación en la posición bencílica de los sustituyentes alquílicos (mencionada en la Introducción General, pág. 40), demostrando que el propilbenceno no adopta una forma similar al indano como había sido sugerido por Boyd,³⁹ sino que la distancia del carbono bencílico al oxígeno es menor que para el resto de la serie metil – pentil (Figura 23), lo cual explica que este sustrato rinda la mayor cantidad del triol correspondiente.

Además, el análisis del modelo permitió la determinación de un parámetro para la predicción de la orientación de sustratos *para*-disustituídos y el cálculo del exceso enantiomérico para los productos obtenidos, lo cual fue validado con los resultados experimentales ya reportados. Esto permitió observar también el posicionamiento del fluorobenceno en el sitio

activo, donde el flúor prefiere ubicarse hacia los bolsillos 1 y 4, explicando por primera vez la razón de la dihidroxilación en posición 3 y 4 para este sustrato.⁷³

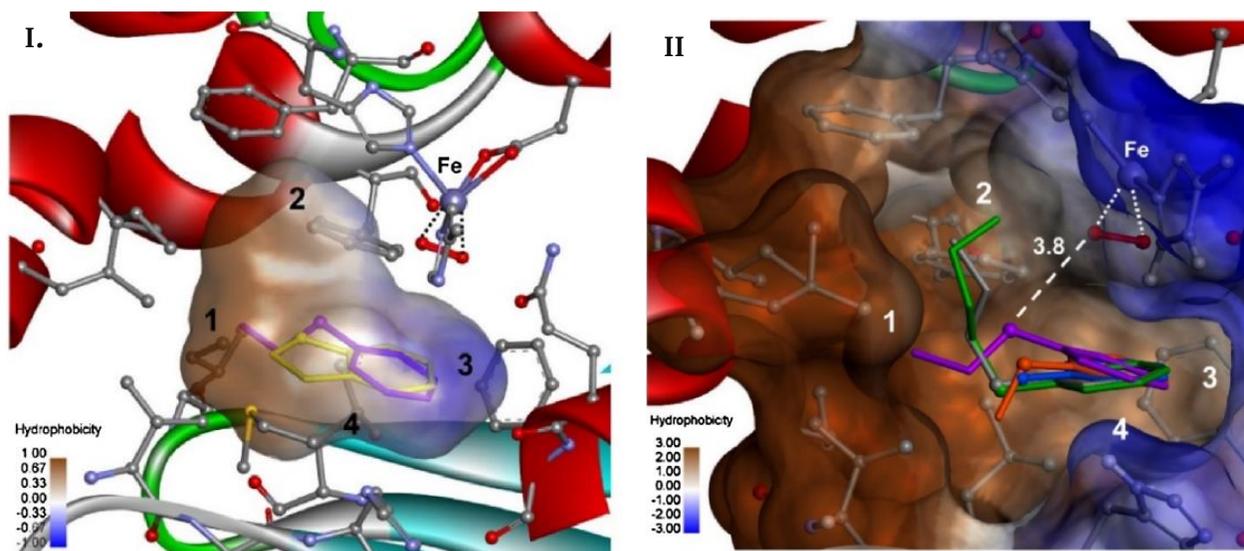


Figura 23: I. Resultados de *docking* para el indano (amarillo) y propilbenceno (violeta). II. Resultados de *docking* para arenos monosustituídos con grupos metilo (azul), etilo (rojo), propilo (violeta), butilo (gris) y pentilo (verde). Se señala la distancia del oxígeno al carbono bencílico del propilbenceno.

Si bien no contábamos con el modelo al diseñar los mutantes de TDO, este permitió visualizar la ubicación de cada uno de los residuos modificados (Figura 24) y resultó de gran utilidad para la discusión y comprensión de los resultados obtenidos en cada caso, que se presentan a continuación.

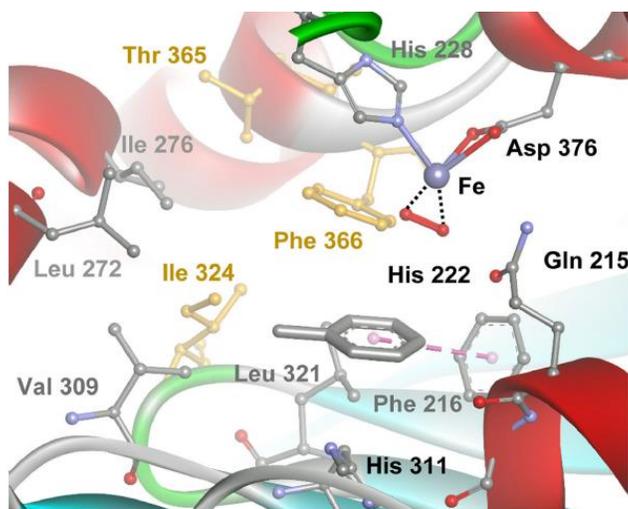


Figura 24: Sitio activo de TDO. Se observa la ubicación de los aminoácidos objetivo para las sustituciones propuestas: Gln215, Ile324, Thr365 y Phe366.

La sustitución de **isoleucina en 324** por fenilalanina mostró una reducción de la actividad frente a todos los sustratos, sin observarse formación de producto para el tolueno ni para el indeno. Por otra parte, de los dos posibles productos obtenidos con la enzima nativa para el propilbenceno, este mutante parece haber perdido la capacidad de hidroxilar la posición bencílica de este sustrato obteniéndose únicamente el diol **4a**. Frente al estireno en cambio, se invierte la relación entre productos **6a** y **6b** con respecto a la obtenida con la enzima nativa, favoreciéndose en este caso la reacción sobre la olefina de la cadena lateral **6b**, y destacándose a su vez la aparición del enantiómero del (*R*)-1-fenil-1,2-etandiol, lo cual cambia el exceso enantiomérico de >99 % a 54 %.

Utilizando el modelo computacional de TDO desarrollado,⁷³ se modeló la variante I324F y se realizó el *docking* de propilbenceno. Esto permitió observar como el efecto estérico de la fenilalanina provoca un posicionamiento de la cadena lateral del sustrato en el cual el carbono bencílico se aleja del hierro respecto a la ubicación que toma en la enzima nativa impidiendo así la monooxigenación a ese nivel (Figura 25I). De igual forma se afecta el posicionamiento del estireno, pero en este caso todo el sustrato adopta una inclinación distinta que acerca el grupo

vinilo al hierro y modifica la posición del anillo aromático por lo cual se favorecería la dihidroxilación del primero hacia el compuesto **6b** (Figura 25II).

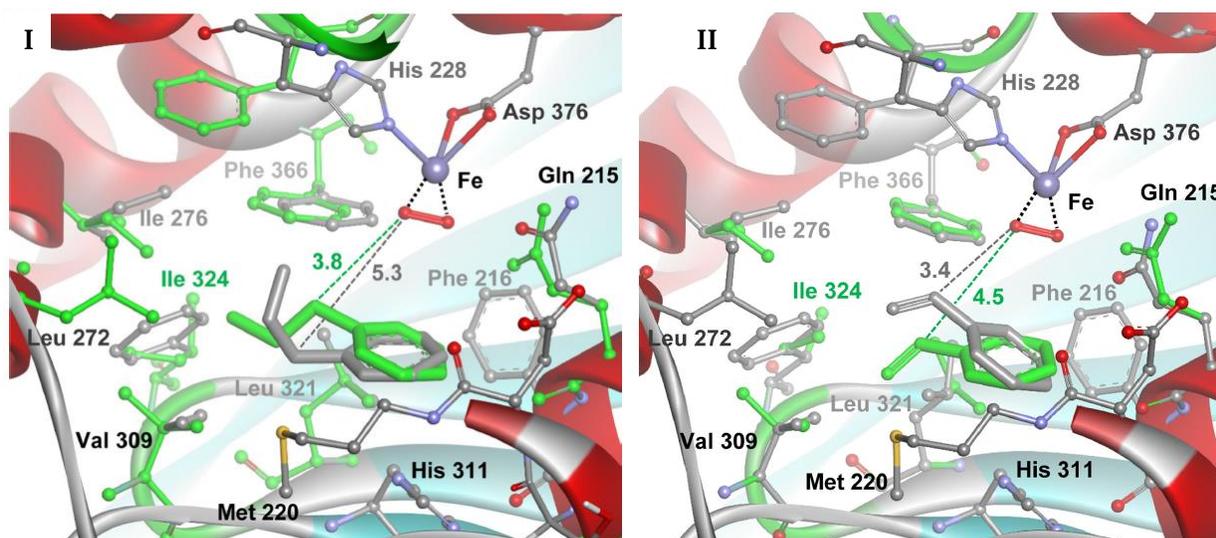


Figura 25: Posicionamiento de propilbenceno (I) y estireno (II) en el sitio activo de TDO WT (verde) y TDO-I324F (gris). Se señala la distancia que toma la posición bencénica de cada sustrato en cada uno de los casos, la cual determina los productos obtenidos.

La isoleucina en 324 de TDO se corresponde con la I335 en la subunidad α de BPDO de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 y con F335 en la subunidad α de BPDO de *Burkholderia cepacia* LB400. Reportes sobre el impacto de mutaciones puntuales en aquellas posiciones en que ambas dioxigenasas difieren, establecen que la variante de *P. pseudoalcaligenes* KF707 I335F adquirió la habilidad de degradar el 2,5,2',5'-tetraclorobifenilo y fue capaz de oxidar 2,5,2'-triclorobifenilo y 2,5,4'-triclorobifenilo tanto en posiciones 2,3 como en 3,4, por lo cual le fue atribuido a este aminoácido el rol en la regioselectividad de la enzima, sin embargo, las posiciones dihidroxiladas dependieron del patrón de sustitución del sustrato.⁵⁴ En TDO en cambio, no se observó un cambio en la regioselectividad para los sustratos estudiados, si bien es claro que los efectos observados son altamente dependientes del tipo de sustrato utilizado.

Otra de las posiciones importantes en la regioselectividad de la hidroxilación en estas bifenilo dioxigenasas es T376, la cual al sustituirse por asparragina dio lugar a una variante con capacidad de hidroxilar bifenilos policlorados en posiciones 3 y 4.^{55,56} Este aminoácido se corresponde con **treonina 365** en TDO por lo cual construimos la variante de TDO-T365N, la cual al igual que TDO-I324F mostró una marcada disminución de actividad frente al tolueno (**3**), así como la incapacidad de formar el triol del propilbenceno (**4b**) obteniendo únicamente **4a** con un rendimiento cercano a la mitad del obtenido con la enzima nativa. Para el estireno en cambio, se observa nuevamente una inversión en la relación de los productos obtenidos aumentando 10 veces la conversión hacia el (*R*)-1-fenil-1,2-etandiol (**6b**). Por otra parte, a diferencia de I324F, este mutante fue capaz de transformar el indeno a sus dos productos duplicando el rendimiento para el 1-indenol por lo cual se invierte la relación entre **5a** y **5b**, que además mostraron cambios en el exceso enantiomérico.

Al observar el sitio activo de TDO, se puede ver que la treonina en 365 no interacciona directamente con el sustrato (Figura 26). Si bien todos los aminoácidos mutados fueron dejados libres para los estudios de *docking*, T365 forma parte del esqueleto de la proteína el cual permanece fijo durante los cálculos, por lo tanto, no sería posible identificar cambios que ocurrieran a este nivel al realizar la sustitución. Podría suponerse entonces que su rol fuera estructural o incluso, que la sustitución por asparragina generara ciertas modificaciones electrónicas en esta parte del esqueleto de la enzima responsables de los cambios de actividad observados.⁷⁴ De todas formas, los resultados experimentales demuestran que este aminoácido está implicado en la actividad enzimática, sobre todo en relación a la quimio- y estereoselectividad de la hidroxilación de determinados sustratos.

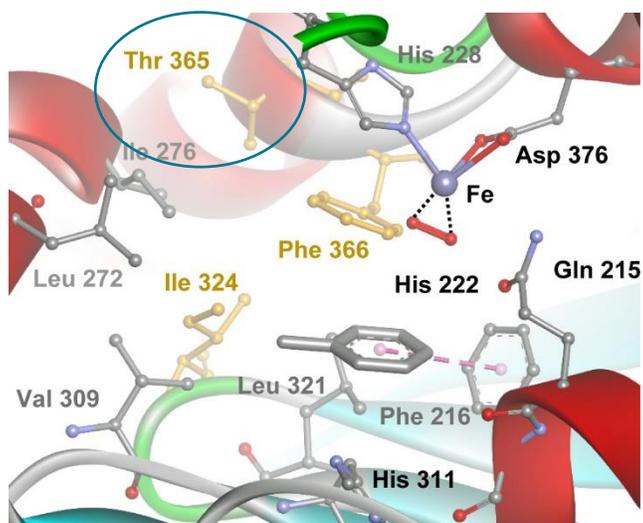


Figura 26: Sitio activo de TDO, se señala la posición de treonina 365.

En cuanto a la sustitución de la **fenilalanina 366**, generó el mutante que presenta los efectos más drásticos habiendo perdido actividad frente a la mayoría de los sustratos y mostrando a su vez los cambios más significativos en estereoselectividad.

Respecto al bromobenceno, el rendimiento fue tan solo del 2 % comparado con un 57 % obtenido con la enzima nativa, y con un exceso enantiomérico que pasó de >99 % a 60 % para el *cis*-(1*S*,2*S*)-3-bromociclohexa-3,5-dieno-1,2-diol (**2a**). Esta caída en la actividad se reflejó también en la biotransformación del tolueno y del propilbenceno para los cuales no se detectó producto. En cuanto al estireno y el indeno, se observó una preferencia hacia la oxidación de las olefinas no aromáticas, obteniendo el diol del estireno en la cadena lateral **6b** y el diol del indeno **5a** como únicos productos con cambios en la estereoquímica, determinándose un exceso enantiomérico de 17 % para **6b** y obteniéndose el enantiómero de **5a** con un 9 % de ee.

En el modelo computacional se observa que la fenilalanina en 366 forma parte del bolsillo 2, el cual tiene carácter hidrofóbico e interacciona con la mayoría de los sustituyentes de los sustratos.⁷³ Al modelar los efectos de la sustitución por valina se destaca un cambio estructural importante acompañado de un aumento en la energía libre de unión de los sustratos debido a una disminución en las interacciones lipofílicas que estabilizan el aducto enzima-sustrato (Tabla

2, Figura 27), lo cual explicaría la disminución en la actividad de la enzima. Además, los estudios de *docking* permitieron observar que tanto para el bromobenceno (Figura 27II) como para el estireno (Figura 27VI) existen numerosas poses del sustrato diferentes a las observadas en el modelo de la enzima nativa que concuerdan con la formación de los estereoisómeros obtenidos, explicando así la diferencia de estereoselectividad en los productos **2a** y **6b**. Para el propilbenceno (Figura 27IV), los resultados del *docking* indican un posicionamiento de la cadena lateral que aleja el carbono bencílico del oxígeno por lo que no se formaría el producto **4b**. En cuanto al resto de los productos, estudios más profundos (por ejemplo, análisis por DFT) serían necesarios para determinar las causas de la pérdida de actividad.

Este aminoácido se corresponde con la fenilalanina 352 en naftaleno dioxigenasa, la cual fue identificada como clave para la estereoselectividad de la enzima aunque también se observó un cambio en la regioselectividad de NDO frente a ciertos sustratos al introducir la mutación F352V.⁵¹ De acuerdo con los resultados obtenidos con TDO-F366V se puede decir que este aminoácido tiene el mismo rol que su equivalente en NDO e incluso los efectos de su sustitución en TDO son mayores en cuanto a la enantioselectividad de la enzima.

Tabla 2: Energía libre de unión de los diferentes sustratos en el sitio activo de TDO nativa y la variante F366V de acuerdo con el modelo computacional.

<i>Sustrato</i>	ΔG° (KJ/mol)	
	TDO WT	TDO F366V
Bromobenceno	-21.02	-19.54
Tolueno	-21.02	-19.45
Propilbenceno	-22.87	-20.96
Estireno	-23.60	-21.37
Indeno	-25.52	-23.24

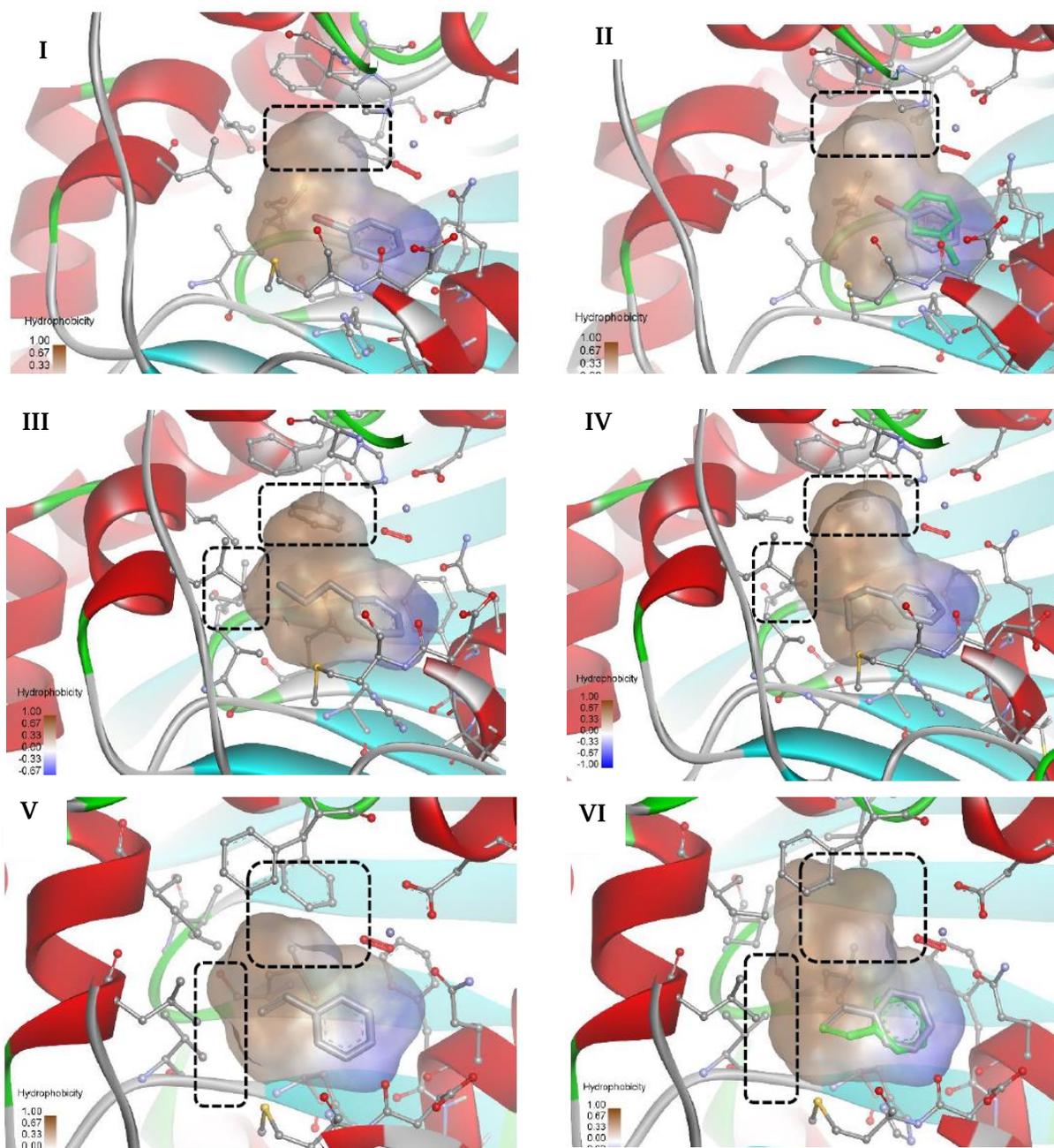


Figura 27: Resultados de *docking* de bromobenceno, propilbenceno y estireno en el sitio activo de TDO (I, III, V) y TDO F366V (II, IV, VI). Se observa el cambio estructural del sitio activo y las distintas posiciones que toman los sustratos para generar los productos con diferente estereoquímica.

En cuanto a la **variante Q215A**, se observa una pérdida de actividad casi total frente a todos los sustratos ensayados, con rendimientos menores o iguales al 1 % que no permitieron su purificación para el análisis por HPLC quiral.

Considerando los resultados obtenidos con el modelo computacional en cuanto a la coordinación con el hierro, podría suponerse un cierto rol en la estabilidad del metal y por tanto su sustitución afectaría la actividad enzimática. Por otra parte, el modelo permitió observar que Q215 forma un enlace de hidrógeno con el oxígeno una vez que este se coordina al hierro para formar la especie reactiva FeOOH sugiriendo que este aminoácido tendría un rol importante en el mecanismo de dihidroxilación lo cual se corresponde con los resultados experimentales obtenidos (Figura 28). Sin embargo, la actividad no se ve completamente anulada, indicando que existen otros aminoácidos capaces de complementar parcialmente esta interacción. El modelo permite postular al aspártico 219 cumpliendo este rol, que además está implicado en el transporte de electrones desde el centro Rieske de la subunidad alfa vecina hacia el hierro del sitio activo.

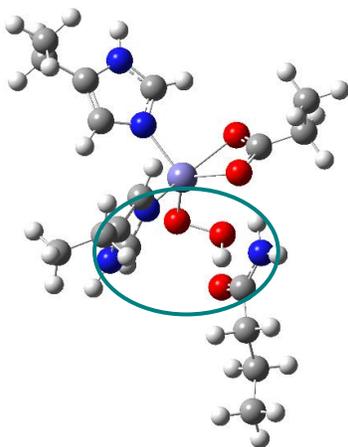


Figura 28: Resultado de cálculos computacionales del mecanismo de TDO. Se observa el átomo de Fe (violeta) coordinado a los dos residuos de histidina, el aspártico y el oxígeno molecular formando el intermediario FeOOH que establece un enlace de hidrógeno con la glutamina 215.

Los resultados obtenidos concuerdan con que la glutamina 215 facilite la transferencia de protones desde las moléculas de agua, lo cual estaría de acuerdo con lo observado por Kauppi y colaboradores en la estructura cristalina de NDO donde se determinó que no existen aminoácidos en el sitio activo involucrados en la donación de protones sino que estos deben provenir de moléculas de agua.⁴⁶ Otra observación que surge de dicho trabajo es que tanto la asparragina 201 como la fenilalanina 352 de NDO, correspondientes a Q215 y F366, se encuentran formando parte del canal de entrada del sustrato al sitio activo y probablemente contribuyan a posicionar los sustratos para que ocurra la reacción. Esto explicaría la marcada caída de actividad observada con las variantes de TDO en ambas posiciones así como los cambios en la estereoquímica de los productos.

Del conjunto de resultados obtenidos con TDO-I324F, TDO-T365N, TDO-F366V y TDO-Q215A, es interesante notar que algunas de estas variantes permiten obtener un único producto para aquellos sustratos que la TDO nativa rinde dos productos, lo cual puede ser útil a la hora de la purificación para la obtención del compuesto de interés.

El triol del propilbenceno, por ejemplo, no es utilizado en general y dado que las variantes I324F y T365N rinden únicamente el diol en el anillo (**4a**) manteniendo el ee >99 % podrían ser más adecuadas para la biotransformación de este sustrato.

En el caso del estireno, el compuesto **6a** es el mayoritario en la biotransformación con la enzima nativa, mientras que con la variante T365N se obtiene el diol **6b** en mayor proporción con un ee >99 %, mientras que es el único producto obtenido con la variante F366V como mezcla de enantiómeros.

Finalmente, frente al indeno la enzima nativa produce una mezcla casi 1:1 de **5a** y **5b** con excesos enantioméricos del 30 %. El mutante T365N produce 8 veces más de **5b** respecto a **5a** y se duplica el rendimiento respecto a la enzima nativa con un ee de 50 %, mientras que la variante F366V produce únicamente el diol **5a** con un exceso enantiomérico opuesto al del producto obtenido con la enzima nativa. Esto resulta de interés ya que el *cis*-(1*S*,2*R*)-indandiol es utilizado en la síntesis de indinavir (fármaco inhibidor de proteasas utilizado en el tratamiento de HIV)

por lo cual es deseable incrementar el rendimiento hacia este producto.⁶² En el trabajo publicado por Zhang y colaboradores, se realizaron tres rondas de mutagénesis introduciendo variaciones al azar en los distintos genes que codifican para las tres enzimas (*todC1C2*, *todA*, *todB*) y analizaron cerca de 5500 clones en busca de la variante deseada obteniendo un único mutante conteniendo siete mutaciones que rindió casi cuatro veces más de indandiol respecto al 1-indenol; sin embargo, esta enzima produce el enantiómero no deseado como mayoritario (ee= 34 %). Además, se observó una disminución tanto en la estereoselectividad como en la bioconversión muy marcada durante todo el proceso de mutagénesis. En esta tesis, con una única mutación en la fenilalanina 366 se logró producir únicamente indandiol lo cual a pesar del exceso enantiomérico de 9 % hacia el enantiómero no deseado, puede resultar un interesante punto de partida para la obtención de este intermediario.

Del análisis anterior se desprende que ***los residuos seleccionados son importantes para la actividad enzimática y podrían ser una base sustancial para nuevos estudios en busca de obtener regio- y/o estereoisómeros de los dioles naturales.*** En relación a esto, el modelo computacional desarrollado contribuyó a comprender mejor los resultados obtenidos, así como la estructura del sitio activo y las interacciones que se establecen con los sustratos, evidenciando la afinidad de los distintos sustituyentes por las diferentes zonas del sitio activo; por lo cual se convierte en una herramienta de gran utilidad para racionalizar posibles sustituciones a realizar de manera de favorecer los cambios deseados e incluso para continuar elucidando el mecanismo de acción de esta enzima.

En principio, se podría pensar que para generar un cambio en el posicionamiento del anillo de ***sustratos con sustituyentes apolares*** y así alterar la regioquímica de los productos, debería apuntarse al efecto estérico de los distintos residuos que conforman las cavidades 1 y 2 donde se ubican los sustituyentes. Para ***sustratos con sustituyentes polares***, podría incorporarse en el bolsillo 3 o 4 algún aminoácido capaz de generar enlaces de hidrógeno con el sustituyente, anclándolo en la orientación opuesta a la que se ubica habitualmente. Esto implica una dependencia de las sustituciones a realizar en base al sustrato a utilizar, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para cada uno de los mutantes aquí desarrollados frente a los distintos

compuestos ensayados. Incluso, analizando los estudios realizados hasta el momento reportados en bibliografía para las distintas dioxigenasas, se observa que el impacto de las mutaciones introducidas altamente dependiente del sustrato analizado.^{50,52,54,64,75} Por lo tanto, teniendo en cuenta que según nuestros resultados parece no haber aminoácidos generales que dominen la regio- o estereoselectividad de la TDO, y siendo esto dependiente del sustrato, el trabajo a futuro en este campo podría focalizarse en el desarrollo de mutantes que generen regio- o estereoisómeros del dienodiol obtenido por biotransformación de halobencenos que son los más utilizados con fines sintéticos.

Cabe destacar que probablemente sea útil combinar las distintas variantes ya desarrolladas o incluso incluir otras mutaciones, ya que se ha determinado que no solo los aminoácidos del sitio activo modulan la actividad de la enzima sino que otros, más lejanos como en nuestro caso T365 o incluso en otras subunidades (la subunidad β por ejemplo) pueden afectar las interacciones con el sustrato.^{54,58,64} Gran parte de estos resultados han sido publicados en *Advanced Synthesis and Catalysis*, 2017, artículo que se adjunta en el anexo.⁷⁴

I.3.2 Construcción de un sistema de expresión para CDO y su caracterización.

El uso del sistema **clorobenceno dioxigenasa** (CDO) resulta interesante ya que de acuerdo con lo reportado en bibliografía esta enzima parece presentar una especificidad de sustrato diferente a la de TDO, la cual no ha sido estudiada en detalle.⁷ En uno de los primeros estudios realizados con esta enzima se clonaron los genes *tcbAaAbAcAd* que codifican para el complejo CDO bajo el control del promotor *lac* dando lugar al plásmido pTCB144 que fue expresado en la cepa de *E. coli* DH5 α . En 2004 y 2005, se publicó el uso de un nuevo sistema de expresión de CDO: *E. coli* JM101 (pTEZ30), donde los genes de la dioxigenasa fueron clonados bajo el promotor *alk* de *Pseudomonas* sp.⁶⁷ Los sustratos utilizados en ambos trabajos son benzonitrilos *orto*, *para* y *meta* sustituidos, y cinamonitrilo, con conversiones que van de 3 a 50 %.

Diferentes intentos de utilizar ambos sistemas de expresión de CDO en nuestro laboratorio (*E. coli* DH5 α pTCB144 y *E. coli* JM101 pTEZ30) resultaron en bajas o nulas conversiones frente a distintos sustratos. Esto nos llevó a pensar que tal vez ninguno de ellos era tan eficiente como el sistema de expresión de TDO, donde los genes se expresan bajo control del promotor *tac*, y con el cual nuestro grupo ha alcanzado producciones de hasta 60 g/L para el diol del bromobenceno.⁴³ Por lo tanto, propusimos la construcción de un biocatalizador análogo a *E. coli* JM109 (pDTG601) clonando los genes de CDO bajo el promotor *tac* en el vector pKK223-3, de forma de poder utilizar el mismo con nuestro protocolo de biotransformación en biorreactor ya optimizado. De esta manera, la actividad enzimática de ambos sistemas sería comparable al expresarse en sistemas análogos y podría llevarse a cabo un estudio detallado de la especificidad de sustrato. Este trabajo fue abordado a través de diferentes estrategias de clonado: un abordaje clásico utilizando enzimas de restricción, una técnica de *Restriction Free Cloning*⁷⁶ y una modificación de ésta denominada *Simple Cloning*,⁷⁷ trabajo realizado en colaboración con el Lic. Diego Umpiérrez, y que dio lugar posteriormente a su tesis de Licenciatura en Química.

Finalmente se logró construir el biocatalizador *E. coli* JM109 (pKK_CDO) que expresa el complejo enzimático de manera soluble, pero que no ha mostrado buenas conversiones frente a múltiples sustratos ensayados. La evaluación de la expresión de la enzima en gel de poliacrilamida (Figura 29) permite identificar claramente las subunidades α y β de CDO (50 y 23 KDa), así como la ferredoxina (43 KDa), pero no la ferredoxin-reductasa (15 KDa), lo cual puede ser indicador de que esta última no se expresa adecuadamente. A partir de esto surge una nueva hipótesis que radica en la posibilidad de que la falla de este sistema se encuentre en el sistema de transporte de electrones, o sea, en la ferredoxina o en la ferredoxin-reductasa. Esto podría confirmarse combinando los genes *tcbAaAb* (dioxigenasa CDO) con *todAB* (ferredoxina y ferredoxin-reductasa de TDO), estrategia que ha sido utilizada exitosamente en el trabajo reportado por Kim y colaboradores, donde se combinaron la oxigenasa de TDO con la ferredoxina y ferredoxin-reductasa de otros sistemas enzimáticos relacionados a la degradación de alcanos obteniendo complejos funcionales.⁷⁸

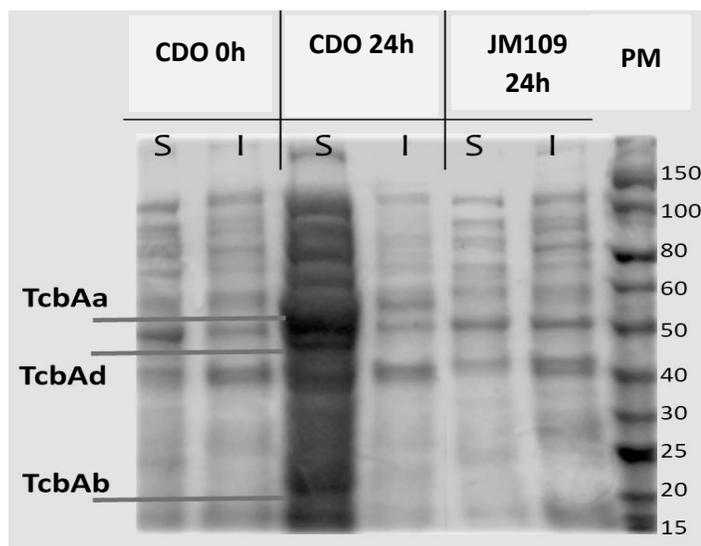
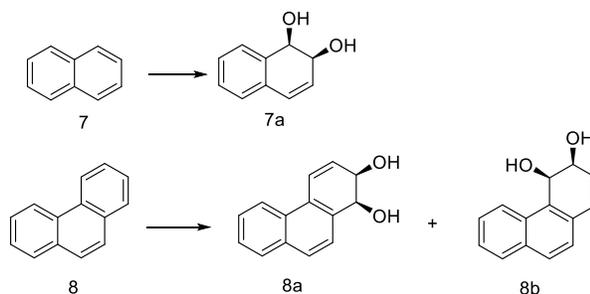


Figura 29: Gel SDS-PAGE de las fracciones solubles e insolubles del lisado celular de *E. coli* JM109 (pKK_CDO) a las 0 y 24 horas post-inducción y *E. coli* JM109 (control) a 24 horas post-inducción con IPTG. Se señalan las bandas correspondientes a la dioxigenasa de CDO (*tcbAaAb*) y la ferredoxina *tcbAd*.

Dado que también contábamos en el laboratorio con el biocatalizador en *E. coli* JM109 DE3 (pDTG141) que expresa la **naftaleno dioxigenasa**, se decidió evaluarla frente a los mismos sustratos utilizados para TDO y CDO, de modo de poder comparar la especificidad de los tres sistemas. Para CDO y NDO, debido a su diferente especificidad de sustrato, se incorporaron además naftaleno (**7**) y fenantreno (**8**), obteniendo los rendimientos que se presentan en la Tabla 3. Como era de esperar, NDO no acepta los arenos monosustituídos pero sí los policíclicos. Todas las biotransformaciones se llevaron a cabo utilizando células en reposo con OD₆₀₀= 30 y 10 mM de sustrato, y los rendimientos se calcularon en base al análisis por ¹H-RMN del crudo utilizando un estándar interno.

Tabla 3: Resultados del screening de actividad con *E. coli* JM109 (pKK_CDO) y *E. coli* JM109 DE3 (pDTG141). Se muestran las estructuras de naftaleno y fenantreno así como los productos obtenidos por dihidroxilación enzimática. Nd: no detectado

Sustrato	Producto	CDO	NDO
2		nd	nd
4	4a	nd	nd
	4b	nd	nd
6	6a	nd	nd
	6b	nd	nd
7	7a	nd	92
8	8a	nd	1
	8b	nd	8



I.3.3 Obtención de *ipso-cis*-1,2-dioles utilizando BzDO

Posteriormente, se incorporó la cepa *Ralstonia eutropha* B9, un biocatalizador que expresa la **benzoato dioxigenasa** (BzDO) y tiene bloqueada la enzima del segundo paso del catabolismo del ácido benzoico (responsable de la formación del catecol) por lo cual acumula el producto dihidroxilado en posiciones 1 y 2 (Figura 30). Este mutante fue desarrollado en el año 1971 incubando las células bacterianas con un agente mutagénico (*N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina) para generar mutantes y seleccionando aquellos incapaces de crecer con ácido benzoico como única fuente de carbono y energía.⁷⁹

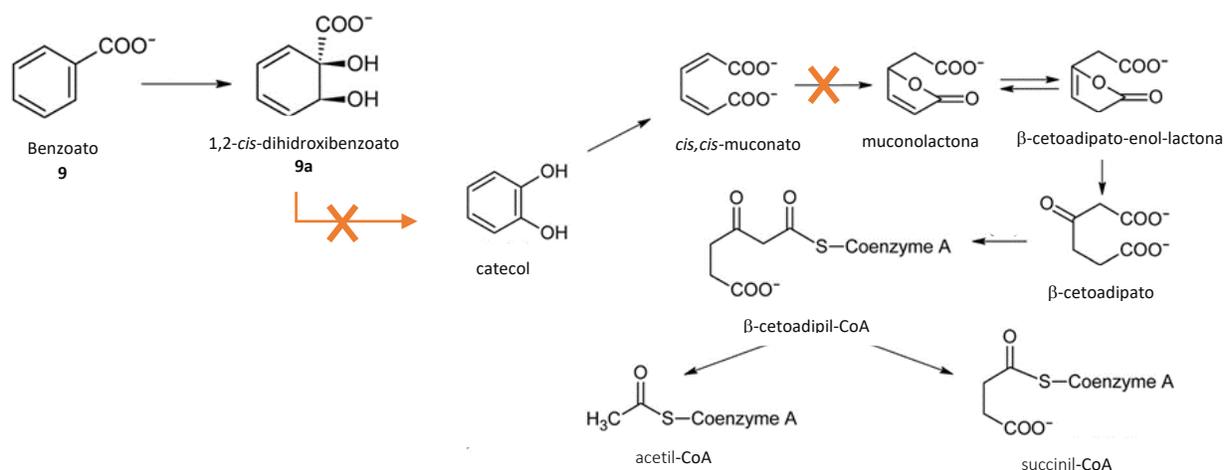


Figura 30: Catabolismo del ácido benzoico en *Ralstonia eutropha* B9 donde se muestran los pasos bloqueados. Adaptado de Reiner, A.B *et al*, 1971.⁷⁹

Al utilizar benzoato de sodio o potasio (9), se obtiene la sal correspondiente del dienodiol (9a), lo cual aumenta su estabilidad durante el almacenamiento. Si bien nuestros esfuerzos no se centraron en la optimización de este proceso como se hizo previamente para TDO, se estudió la producción de 1,2-*cis*-dihidrobenzoato de sodio en biorreactor de 5 L en base al protocolo publicado por Adams y colaboradores de modo de poder tener acceso a la producción de este tipo de dienodiol para el Laboratorio de Síntesis Orgánica de la Facultad de Química. En este protocolo, el agregado del sustrato (benzoato de sodio) y de la fuente de carbono (fructosa) se

realizan simultáneamente, en pulsos cada cuatro horas a partir de las 20 horas de crecimiento del biorreactor.⁸⁰

En una serie de tres experimentos se determinó la importancia de algunos parámetros de este proceso. Debe existir un *control del pH del proceso* agregando hidróxido de sodio. Esto no estaba detallado en el procedimiento reportado, pero se observó que las densidades ópticas alcanzadas eran muy bajas (aprox. 5 UA, Figura 31I) permaneciendo casi constante a partir de las 40 horas de cultivo, lo cual iba acompañado de una acumulación de sustrato, indicando la muerte del cultivo. Al mantener el pH constante en 7.4 se logró alcanzar un cultivo con $OD_{600} = 30$ (Figura 31II). Por otra parte, debe asegurarse el *consumo total del sustrato* entre pulsos. Una gran cantidad de sustrato resulta tóxica para las células por su naturaleza antimicrobiana, por lo que el monitoreo del consumo de este antes del agregado de un nuevo pulso resulta fundamental para el mantenimiento del cultivo y facilita además la purificación del producto.

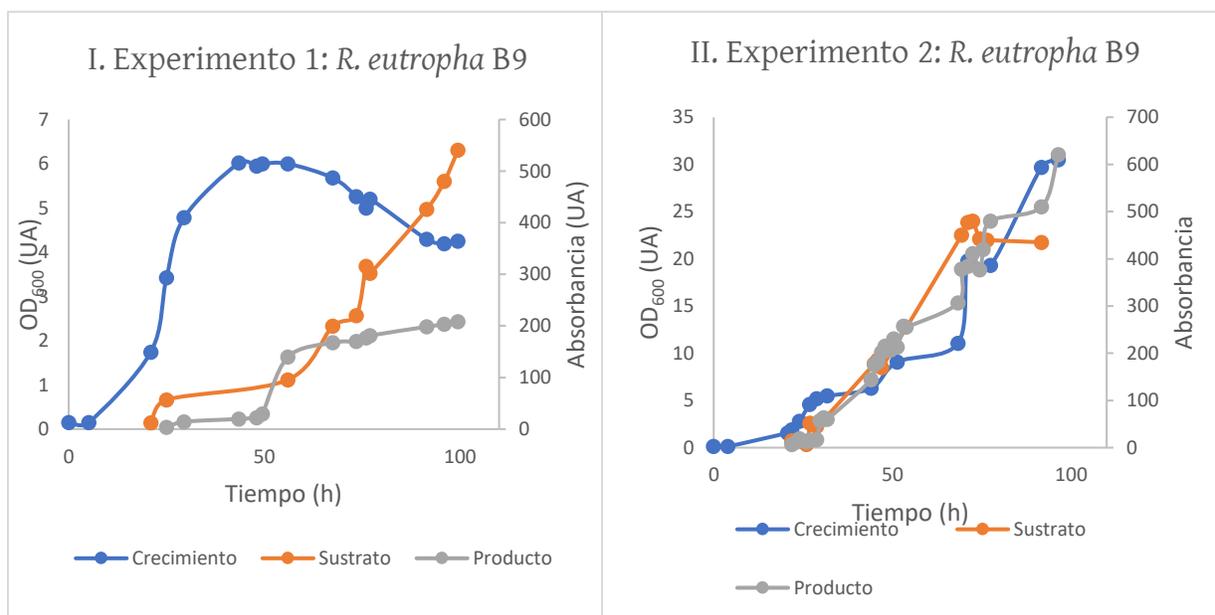


Figura 31: Crecimiento y Biotransformación en biorreactor utilizando *Ralstonia eutropha* B9. I. Experimento 1: reproducción de las condiciones reportadas.⁸⁰ II. Experimento 2: control de pH y de agregado de sustrato.

Teniendo en cuenta esto, se obtuvo un cultivo de *Ralstonia eutropha* B9 de $OD_{600}=30$ que fue capaz de convertir el benzoato de sodio agregado en pulsos cada 5 horas, para dar una concentración de producto de 27 g/L tras 80 horas de biotransformación, lo cual supera las cantidades reportadas que rondan los 17 g/L de 1,2-*cis*-dihidroxibenzoato de sodio. Como se observa en la Figura 31II, se logró un perfil de crecimiento sostenido y acompañado por el proceso de biotransformación, lo cual no ocurrió en el experimento 1.

De esta manera se logró la producción en escala preparativa de un dienodiol enantiopuro con regioquímica y propiedades diferentes de utilidad en síntesis orgánica, cuya aplicación dio lugar a la publicación de un trabajo en *Tetrahedron: Assymetry*.⁸¹ Cabe destacar que si bien esta enzima tiene una especificidad de sustrato más acotada, el producto obtenido de la biotransformación del ácido benzoico permite una gran variedad de modificaciones que permite acceder a sintones quirales con propiedades diferentes a los obtenidos con otras dioxigenasas; lo cual se evidencia además en los reportes existentes que utilizan este sistema biocatalítico con ácido benzoico o sus sales de sodio o potasio como únicos sustratos.^{45,80-82}

En resumen, gracias a estos resultados, el grupo de trabajo cuenta con biocatalizadores capaces de dihidroxilar arenos monosustituídos en posición 1,2 (**benzoato dioxigenasa**) y en 2,3 (**tolueno dioxigenasa y sus mutantes**), así como arenos policíclicos (**naftaleno dioxigenasa**), permitiendo la obtención de sintones quirales con diferentes patrones de sustitución.

I.3.4 Biotransformación de sustratos nitrogenados por TDO

La literatura mostraba escasos reportes sobre la dihidroxilación de compuestos nitrogenados, los cuales resultan interesantes por su utilidad en la síntesis de diferentes productos naturales y moléculas bioactivas; por lo tanto, se decidió realizar la biotransformación con células en reposo y a escala de matraz de: benzonitrilo, bencilazida, bencilamina acetilada, benzamida, nitrobenzono y acetanilida. Tras la extracción con acetato de etilo y análisis por TLC se observó la formación de un nuevo producto en el caso del benzonitrilo (**10**), que se identificó como el *cis*-dienodiol correspondiente **10a** (Figura 32I). En el caso de la bencilazida (**11**), se encontraron tres nuevos productos (Figura 32II), mientras que el resto de los sustratos no fueron biotransformados.

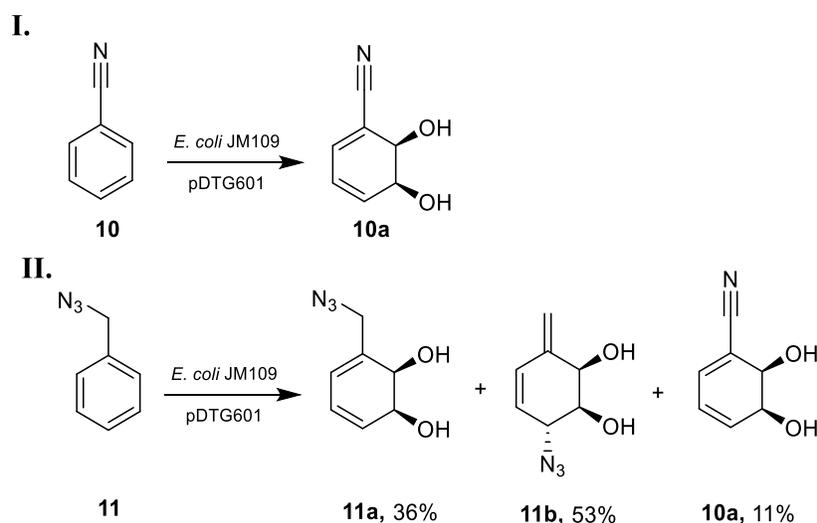


Figura 32: Biotransformación de bencilazida con TDO.

El posterior escalado de la biotransformación de bencilazida en biorreactor de 5 litros para un análisis del crudo de reacción por ^1H -RMN y el aislamiento de los compuestos presentes permitió identificar los tres productos obtenidos de esta reacción mostrados en la Figura 32, y la inesperada aparición de **11b** y **10a** nos motivó a intentar explicar su formación. Durante la purificación de los productos se observó que el compuesto **11b** se formaba espontáneamente a partir de **11a**, para lo cual se propuso un doble rearrreglo sigmatrópico [3,3] del grupo azida

(Figura 33). El estudio detallado del mecanismo de esta transformación y la determinación de las condiciones óptimas para la formación de **11b** de interés debido a su alto potencial sintético, fueron publicados por nuestro grupo en *Organic Letters*,⁸³ el cual se adjunta en el anexo.

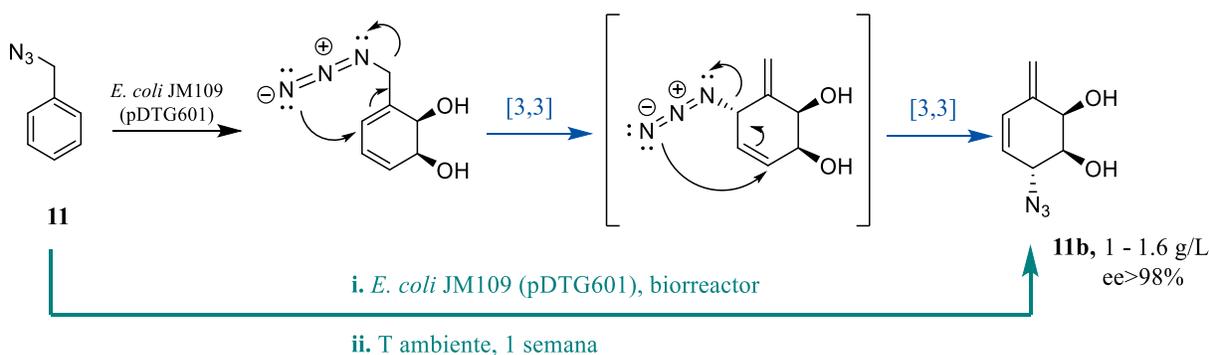


Figura 33: Mecanismo del doble rearrreglo sigmatrópico [3,3] propuesto para la formación de 11b. Se indican las condiciones óptimas de obtención de este producto a partir de benzilazida.

Por otra parte, la formación del diol del benzonitrilo resultaba más curiosa aún y su explicación menos evidente. En primer lugar, se evaluó si la reacción de oxidación del grupo azida a nitrilo era mediada químicamente por algún componente del medio o si correspondía al producto de una reacción enzimática. Al incubar benzilazida en el buffer de reacción sin biocatalizador se recuperó el material de partida concluyendo que el biocatalizador es necesario para la obtención del nitrilo. Luego se realizaron experimentos utilizando el biocatalizador conteniendo el plásmido pDTG601 y la misma cepa conteniendo el vector pKK223-3 (análogo al pDTG601 pero que no contiene los genes de la TDO) como forma de evaluar si otra enzima de *E. coli* catalizaba esta transformación, y así se determinó que la formación del nitrilo a partir de la azida ocurre únicamente en presencia de la dioxigenasa. Finalmente, para determinar los pasos de reacción se agregó como sustrato el diol de la benzilazida **11a**, al recuperar **11a** y **11b** se concluyó que la formación del nitrilo debe ocurrir en primera instancia, para que luego el benzonitrilo formado sea dihidroxilado (Figura 34I). A su vez, esto se corresponde con el perfil de formación de los diferentes productos observado durante la biotransformación de la benzilazida en biorreactor, los cuales se construyeron a través de la cuantificación por HPLC de

cada producto en muestras tomadas a diferentes tiempos de reacción. Estas muestras se almacenaron a 4°C durante una semana de manera de asegurar la total conversión de **11a** en **11b** y facilitar así el análisis y cuantificación de los compuestos. Como puede observarse en la Figura 34II, la velocidad de formación del diol del benzonitrilo es muy lenta al comienzo de la reacción y aumenta a partir de los 20 minutos de agregado el sustrato haciéndose comparable a la velocidad de formación de **11b**. Este retraso en la formación de **10a** puede asociarse a una reacción más lenta dada la necesidad de la formación del nitrilo previo a la dihidroxilación del anillo.

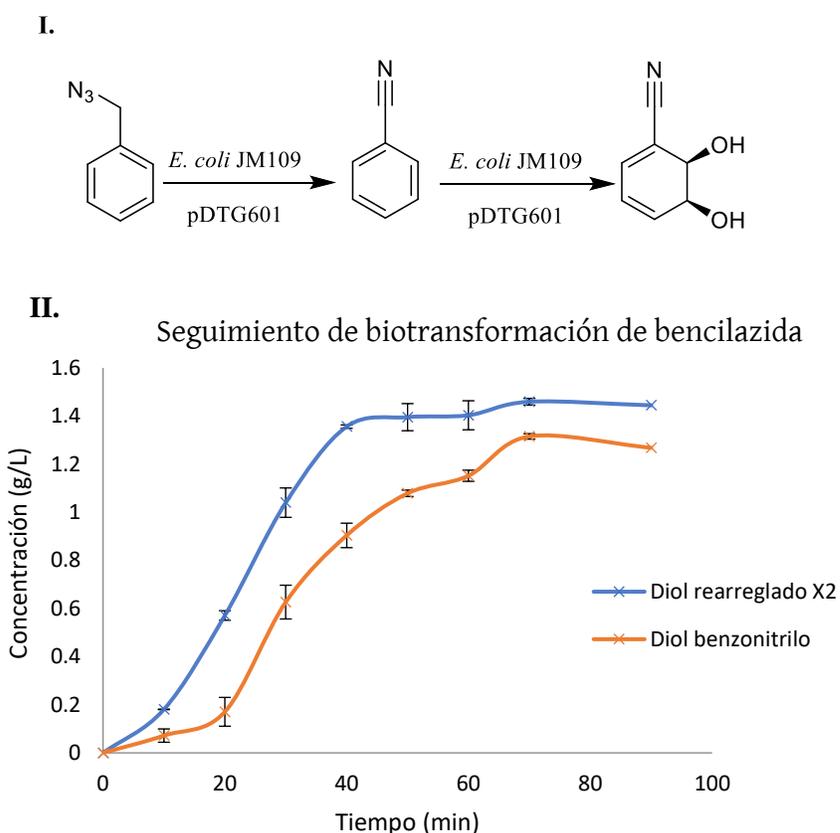


Figura 34: I. Secuencia de biotransformación para la formación de benzonitrilo a partir de benzilazida. II. Perfil de formación de los productos **11b** y **10a** durante la biotransformación de benzilazida en biorreactor utilizando *E. coli* JM109 (pDTG601).

En base a estos resultados, nos propusimos profundizar en el mecanismo de formación de **10a** para lo cual se realizó la biotransformación de otro sustrato que presentara un grupo azida como la feniletílazida **12**, la cual rindió los productos que se muestran en la Figura 35 con un rendimiento global de 40 %.

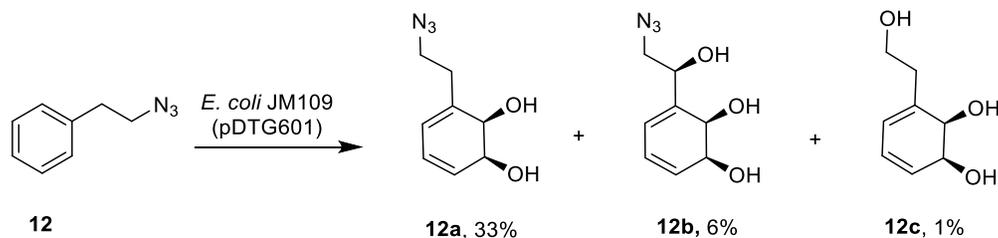


Figura 35: Biotransformación de feniletílazida mediada por TDO.

El diol **12a** es el producto de dihidroxilación esperado y por tanto es lógico que sea el mayoritario, el triol **12b** se debe a la actividad monooxigenasa en la posición bencílica ya conocida para la TDO^{31,37} y **12c** aparece como un nuevo producto inesperado, sobre el cual se discute más adelante. El hecho de no observar la formación del nitrilo para este sustrato sugiere que es necesario que el grupo azida se encuentre en la posición bencílica, y que además su oxidación podría estar relacionada con la monohidroxilación en esta posición (ya que mientras para la feniletílazida se obtiene **12b**, el correspondiente producto no es obtenido para el caso de la bencilazida). Para confirmar que el mecanismo en estudio para la generación del nitrilo podría involucrar la oxidación de la posición bencílica de la bencilazida, se probó la biotransformación de *p*-clorobencilazida (**13**). La misma, debido a su sustitución en posición *para* por un sustituyente cloro, no sería monohidroxilada en la posición bencílica de acuerdo a lo reportado por Boyd y colaboradores^{31,73} ya que esta sustitución provoca un alejamiento del carbono bencílico respecto del oxígeno. Esto fue comprobado mediante estudios de *docking* realizados por nuestro grupo (Figura 36). Como resultado se obtuvo el (1*R*,2*R*)-3-(azidometil)-6-clorociclohexa-3,5-dieno-1,2-diol (**13a**) con un 36 % de rendimiento y no se detectó la formación del nitrilo.

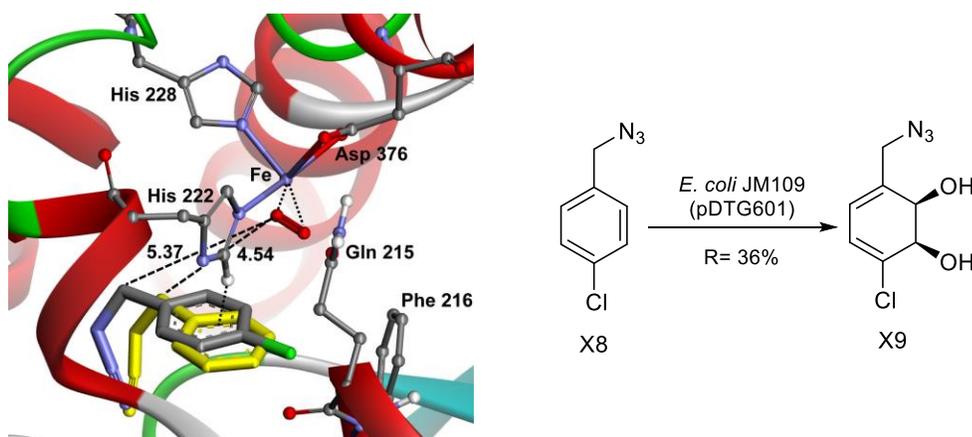


Figura 36: Docking de bencilazida (amarillo) y *p*-clorobencilazida (gris) en el sitio activo de TDO. El C bencílico de la *p*-clorobencilazida queda 5.3Å en vez de 4.54Å como se ve para bencilazida.

Observando el conjunto de estos resultados se propuso un mecanismo para la oxidación de la azida, iniciado por la monohidroxilación en la posición bencílica y la consiguiente coordinación de la azida y el hidroxilo al átomo de hierro (II) (Figura 37-I). En colaboración con el Dr. Nicolás Veiga, se realizaron cálculos computacionales que permitieron comprobar la factibilidad de la existencia de la especie propuesta.⁷³ Utilizando un nivel de teoría UB3LYP/LANL2DZ se observó que esta doble coordinación con el hierro está altamente favorecida dado que la geometría del complejo obtenido es la más estable (Figura 37-I). Las restricciones estructurales impuestas por la arquitectura del sitio activo llevan a la formación de un aducto de alto espín, para el cual el quelato de cuatro miembros es suficientemente estable como para soportar la coordinación bidentada del hierro a través del oxígeno del hidroxilo en posición bencílica y el N1 de la azida. Esta coordinación a través del N1 provoca un acortamiento del enlace N2-N3 y por tanto la elongación del enlace N1-N2, resultando en el debilitamiento de este último y promoviendo la liberación de nitrógeno que da lugar a la formación de una especie hierro(IV)-nitreno (**14**). Esta especie altamente inestable debe reorganizarse de alguna de las siguientes formas para estabilizarse (Figura 37-II): **A**) a través de la migración del fenilo, **B**) a través de la migración del OH, o **C**) por la migración del protón hacia el nitrógeno. Si el camino

fuera **A**, debería formarse *N*-fenilformamida (**15**) o su correspondiente diol como producto, lo cual no se observa y por lo tanto se descarta esta opción. Con la migración del hidroxilo (**B**) se obtendría benzaldoxima (**16**) y con la migración del protón (**C**) el iminol de la benzamida (**17**), en ambos casos por deshidratación podría formarse el benzonitrilo (Figura 37-II).

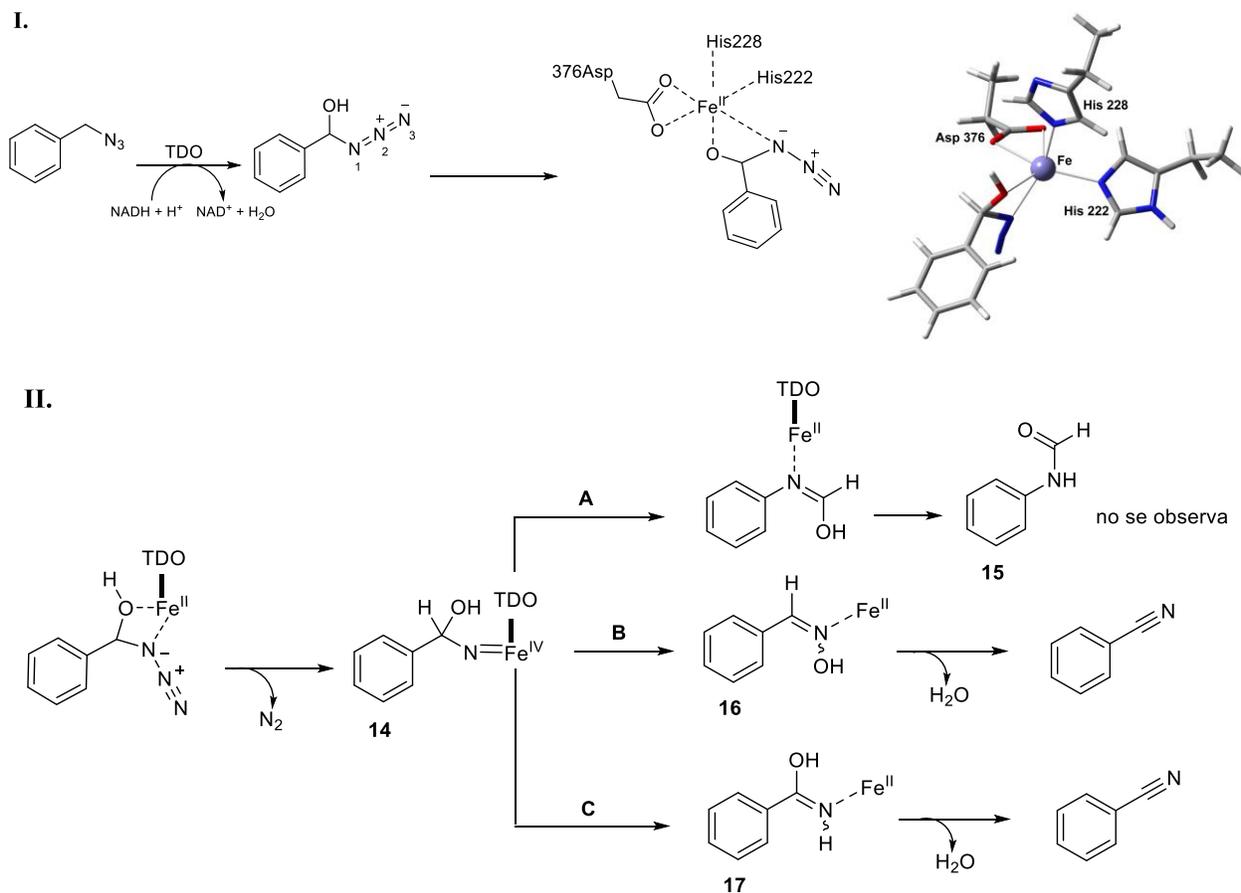


Figura 37: I. Estructura del complejo de coordinación formado por el hierro del sitio activo con el hidroxilo bencílico y el nitrógeno 1 del grupo azida II. Formación del intermediario hierro (IV)- nitreno y sus posibilidades de rearreglo para formar benzonitrilo: A) migración del fenilo, B) migración del OH, C) migración del protón.

Para discernir entre los posibles caminos **B** y **C** se realizó la biotransformación de benzamida (**18**) y de las benzaldoximas *E* y *Z* (**19**), tras lo cual se observó que la benzamida no es sustrato de la enzima, mientras que las oximas fueron transformadas al diol del benzonitrilo (Figura 38) confirmando la teoría del camino **B**. Los controles correspondientes fueron realizados en paralelo utilizando el biocatalizador *E. coli* JM109 (pKK223-3) y en todos los casos se recuperaron los sustratos intactos, lo cual indica que la actividad *oxima deshidratasa* observada es mediada por el complejo TDO y no por otras enzimas del microorganismo. El estudio en profundidad de esta nueva actividad en cuanto a su alcance se encuentra en curso, y para esto se han utilizado diferentes oximas como sustratos de biotransformación y realizando los cálculos computacionales correspondientes.

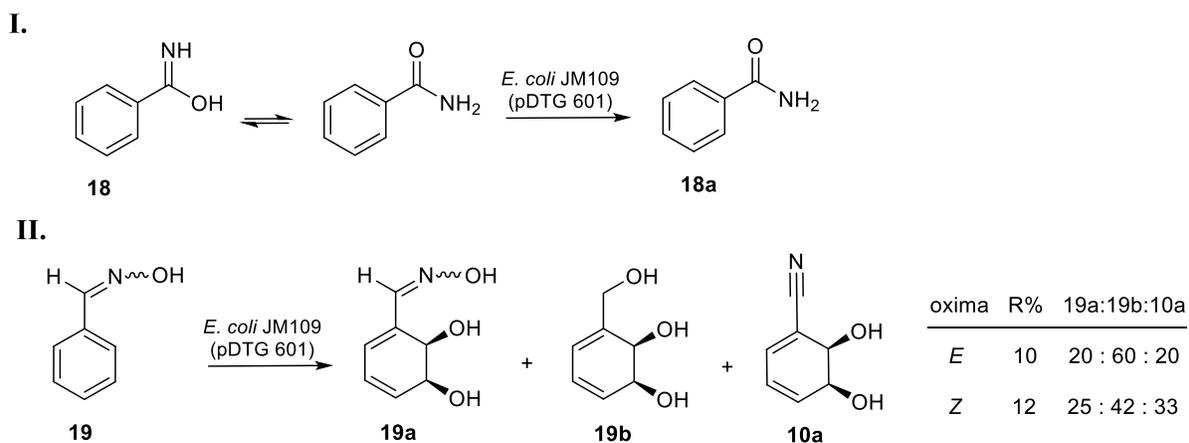


Figura 38: Biotransformación de benzamida (I) y de las benzaldoximas *E* y *Z* (II) mediadas por TDO.

A pesar del comportamiento diferencial entre ambas oximas donde el isómero *Z* parece ser el más reactivo hacia la formación del nitrilo, no es posible afirmar cuál de los dos isómeros es sustrato para esta transformación, dado que como se ha reportado previamente, ocurre una isomerización espontánea de las oximas al incubarse en lisados de *E. coli* e incluso en presencia de distintas proteínas.⁸⁴ La formación del triol **19b**, puede explicarse a través de la reducción de la oxima mediada por una alcohol deshidrogenasa del microorganismo como ha sido previamente descrito.⁸⁴

Retomando la formación del triol **12c** (obtenido para la reacción ya comentada con feniletílazida **12**), la misma podría explicarse teniendo en cuenta el mecanismo propuesto de coordinación inicial del grupo azida y la liberación de nitrógeno para formar una especie metal-nitreno que tras el único rearrreglo posible daría lugar a la imina **20**. Esta imina es inestable en solución acuosa y formaría el aldehído correspondiente (**21**) que por acción de las reductasas de *E. coli* sería transformado al alcohol feniletílico (**22**). Este compuesto es sustrato de TDO y por tanto puede ser dihidroxilado para dar el triol **12c** (Figura 39).

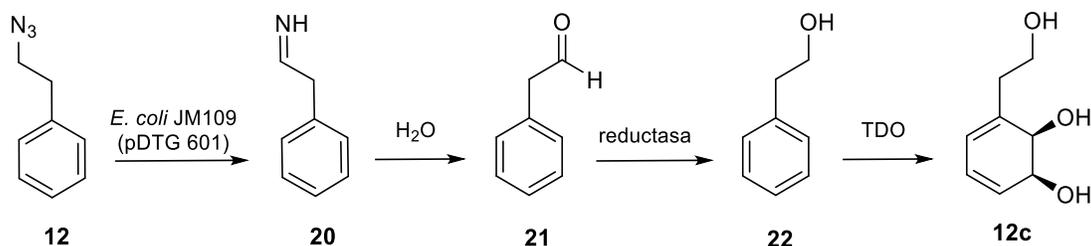


Figura 39: Secuencia de reacciones para la formación de **12c**.

Como conclusión de estos estudios, se reportó una nueva actividad para la tolueno dioxigenasa: la oxidación de bencilazida a benzonitrilo, siendo el primer reporte biocatalítico existente en la literatura para este tipo de transformación. El mismo, junto al mecanismo propuesto (Figura 40), fue publicado en *ChemBioChem*,⁸⁵ artículo que se adjunta en el anexo de esta tesis. A su vez, de este mecanismo se desprende que la tolueno dioxigenasa posee actividad *oxima deshidratasa*, lo cual no ha sido descrito hasta el momento para esta clase de enzimas. Por último, y de especial interés para los objetivos propuestos en el siguiente capítulo, este mecanismo sugiere la formación de una especie nitrenoide en el sitio activo de TDO, lo cual da lugar al estudio de nuevas reacciones que podrían llevarse a cabo con este biocatalizador.

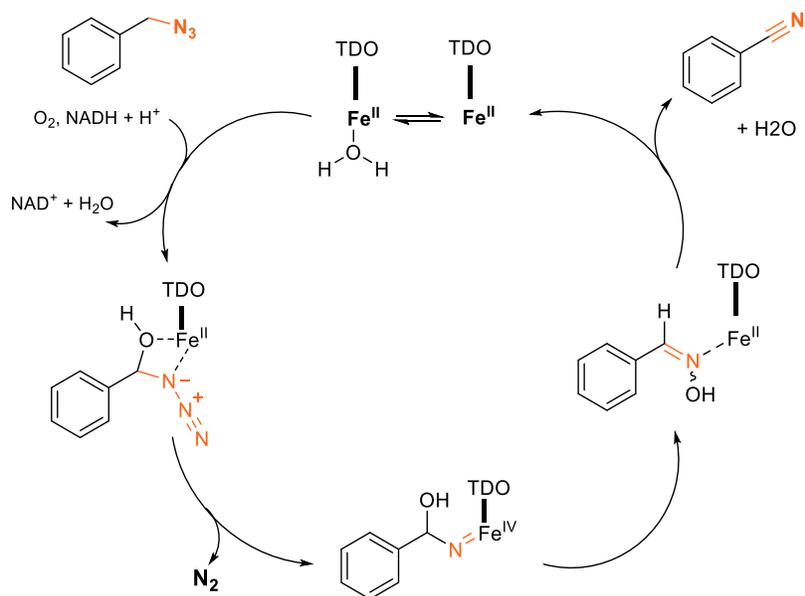


Figura 40: Mecanismo de oxidación de bencilazida a benzonitrilo con formación de una especie Fe(IV)-nitreno.

Capítulo II: Estudio de nuevas actividades para Dioxigenasas tipo Rieske

II.1 Introducción

II.1.1 Funcionalización de enlaces C(sp³)-H

II.1.1.1 Formación de enlaces C-N

La formación de enlaces C-N es una de las transformaciones con mayor importancia en química sintética en lo que refiere a la preparación de productos naturales y compuestos bioactivos de interés para varias industrias como la farmacéutica y agroquímica entre otras. Debido a esto, se han desarrollado y optimizado a lo largo de la historia de la química orgánica sintética, distintos métodos para estas transformaciones, incluyendo principalmente el uso de metales de transición como catalizadores.^{86,87} Las reacciones más utilizadas en este sentido son: la reacción de Goldberg donde el cobre cataliza el acople de una amina con haluros de arilo, reacción de Chan-Lam catalizada también por cobre para el acople de aminas con ácidos borónicos, y aminaciones de Buchwald-Hartwig catalizadas por paladio;⁸⁶ en tanto que en la síntesis de heterociclos también se incluyen catalizadores de rodio y rutenio.⁸⁷

Entre las estrategias más destacadas y de mayor importancia contemporánea se encuentran los protocolos de *aminación directa de enlaces C-H*, ya que con su uso se evitan reacciones de prefuncionalización al sustituir directamente un átomo de hidrógeno por la especie nitrogenada deseada, lo que aumenta la eficiencia y rendimientos de las transformaciones buscadas.^{88,89} Entre los métodos más destacados para la aminación C-H, encontramos la inserción directa al enlace carbono sp³ – hidrógeno, de especies tipo nitrenoides, los cuales tienden a prepararse *in situ* debido a su alta reactividad. Un problema recurrente de estos procedimientos es su baja quimio- y regioselectividad, por lo que para su aplicación en química sintética es necesario el control de la reactividad de las especies nitrenoides utilizadas. Con este objetivo se ha trabajado en dos aspectos principalmente: i) adaptar la reactividad de los

nitrenos modificando las propiedades estéricas y electrónicas de los sustituyentes que los mismos soportan, y ii) controlar la reactividad con el uso de metales de transición formando intermediarios metal-imido/nitreno.⁸⁹ Esto llevó al desarrollo de métodos de aminación C-H catalizados por distintos metales de transición (Rh, Ir, Co, Ru, Ag, Cu, Mn y Fe), utilizando azidas orgánicas, haloaminas, iminoiodanos y *N*-tosiloxocarbamatos como precursores de nitrenos (Figura 41).^{88,89}

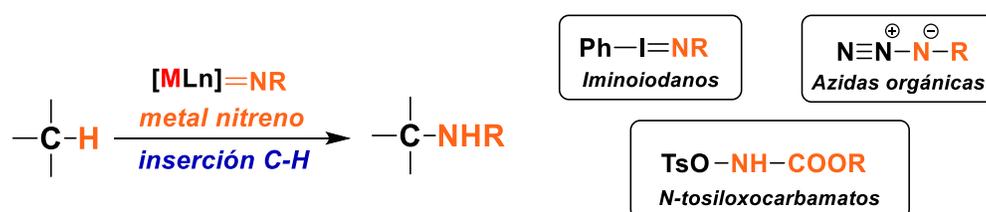


Figura 41: Estrategia de aminación directa utilizando especies metal-nitreno formadas a partir de distintos precursores: iminoiodanos, azidas orgánicas y *N*-tosiloxocarbamatos.

Las principales desventajas de estos métodos radican en el uso de catalizadores muy costosos y/o tóxicos, lo cual sumado a condiciones de reacción que implican el uso de solventes orgánicos a altas temperaturas, ha llevado a la búsqueda de alternativas más limpias, rápidas, eficientes y económicas. De forma de disminuir este impacto ambiental, en los últimos años se ha visto un creciente interés en el desarrollo de metodologías sintéticas “más verdes” que utilizan hierro como catalizador (Figura 42), debido a que es el segundo metal más abundante en la tierra (lo cual disminuye su costo) y presenta una toxicidad menor que los otros metales de transición.^{86,87} En la Figura 42 se muestra el gran número de transformaciones orgánicas para formar enlaces C-N que involucran hierro como catalizador.⁸⁶ Sin embargo, algunas de estas reacciones utilizan sales de cobre como co-catalizadores en busca de aumentar la velocidad y/o los rendimientos, y todavía implican el uso de solventes a altas temperaturas y presiones.^{86,87}

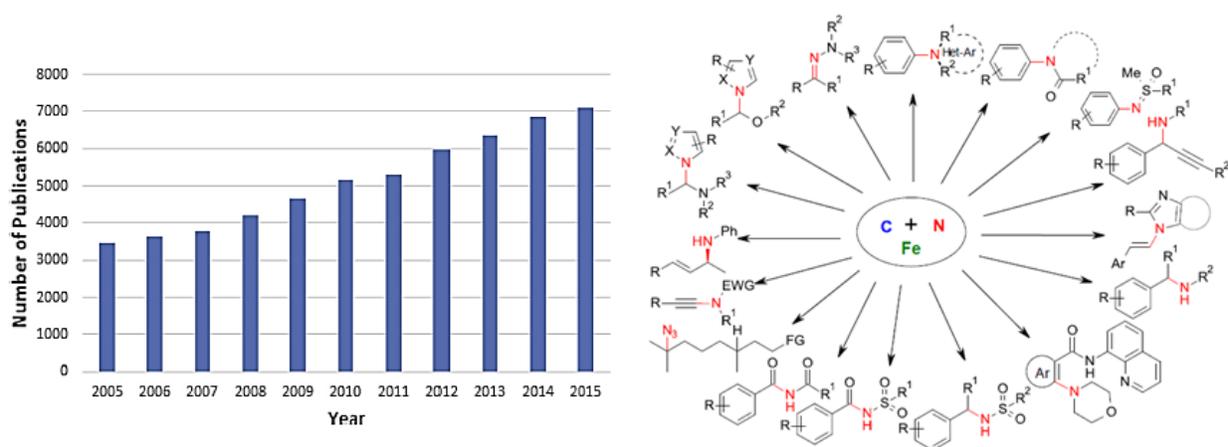


Figura 42: a) Número de publicaciones que involucran el uso de catalizadores de hierro para la formación de enlaces C-N. b) variedad de reacciones catalizadas por hierro. Extraído de Ghorai, S. K. *et al.* 2017.⁸⁶

A principios de los 80, se reportó la formación de especies hierro-oxo ($\text{Fe}=\text{O}$) en sistemas porfirínicos (citocromos P450 y sistemas biomiméticos), llevando a investigar la formación de especies análogas como las imido-hierro ($\text{Fe}=\text{NR}$), lo cual resultó en el uso de $\text{Fe}(\text{TPP})\text{Cl}$ y $\text{Mn}(\text{TPP})\text{Cl}$ (TPP: tetrafenilporfirina) para la tosilamidación de ciclohexano utilizando tosyliminoiodano como fuente de nitrógeno. Posteriormente se estudiaron otros derivados porfirínicos y diversas fuentes de nitrógeno para estas transformaciones, extendiéndose también al uso de complejos de hierro de tipo no-hemo. Estos estudios han llevado a conocer la relación estructura/reactividad de las especies imido-hierro para la aminación de enlaces C-H, la estructura electrónica de las especies $\text{Fe}=\text{NR}$ son afectadas por el estado de oxidación del centro metálico, las propiedades electrónicas y estéricas de los sustituyentes R y de los ligandos auxiliares. Se plantea que el mecanismo de aminación de enlaces $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$ se inicia con la extracción de un átomo de hidrógeno por parte de la especie imido-Fe, formando un radical al que se unirá el nitrógeno.⁸⁹

Las herramientas sintéticas mencionadas anteriormente incluyen algunas variantes enantioselectivas, usualmente incorporando costosos auxiliares quirales, lo que podría ser solucionado por una aproximación biocatalítica; sin embargo, no existen hasta el momento

reportes de enzimas capaces de catalizar naturalmente este tipo de reacciones. Las enzimas más utilizadas para la formación de enlaces C-N incluyen amonio liasas, aminomutasas y transaminasas, pero estas actúan sobre átomos de carbono con un alto estado de oxidación.^{90,91}

En los últimos años, teniendo en cuenta los reportes sobre sistemas porfirínicos anteriormente descritos, el grupo de Arnold ha sido pionero en la investigación sobre la capacidad de las hemo-proteínas para catalizar reacciones de funcionalización C-H; cambiando el foco habitual de la ingeniería de proteínas que trataba de mejorar las funciones conocidas de una enzima, hacia la búsqueda de los elementos necesarios para lograr que una proteína adquiriera una función deseada. Esta estrategia consiste en buscar en la vasta colección de proteínas disponibles y seleccionar aquellas que tienen los componentes necesarios para ensayar frente a determinada actividad, utilizando además métodos computacionales para predecir posibles modificaciones que puedan ser necesarias. Según la experiencia de Arnold, una vez que se detecta cierto nivel de actividad, por más bajo que sea, puede crearse una nueva enzima por evolución dirigida, y ha sido así que ha desarrollado enzimas conteniendo porfirinas capaces de catalizar la aminación de enlaces C-H y la formación de enlaces C-C.⁹²

Reacciones de funcionalización C-H mediadas por citocromos P450

En 1985, Svastits y colaboradores reportaron por primera vez la amidación intramolecular de iminoiodanos (Figura 43) utilizando un citocromo P450 microsomal de hígado de conejo, a través de la formación de un intermediario Fe-nitreno en el grupo hemo de la enzima,⁹³ pero no se encuentran reportes posteriores en ésta área hasta casi 30 años después.

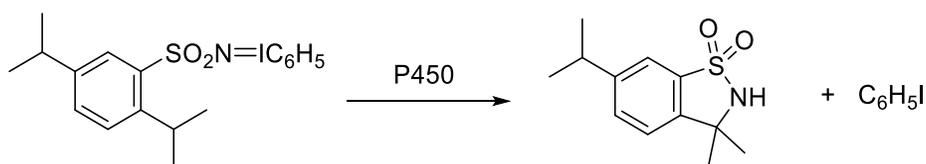


Figura 43: Reacción de amidación intramolecular utilizando {(2,5-diisopropilfenil)sulfonil]imino}feniliodano catalizada por citocromo P450.

Los citocromos P450 constituyen una gran familia de enzimas capaces de activar enlaces C-H inertes frente a un amplio espectro de transformaciones oxidativas como hidroxilaciones, desaturaciones y descarboxilaciones, lo cual junto a su gran selectividad los ha llevado a ser ampliamente utilizados con fines sintéticos. Por otra parte, los métodos computacionales como la dinámica molecular han facilitado mucho la ingeniería de estas enzimas, pudiendo revelar residuos claves e interacciones dinámicas que no pueden identificarse en base a la información estructural, logrando cambiar la regioselectividad de las reacciones o expandir el espectro de sustratos aceptados por los citocromos.⁹² Además, las hemo proteínas no están limitadas a reaccionar a través de intermediarios Fe-oxo, sino que al interactuar con ciertos sustratos nitrogenados pueden formar especies Fe-nitreno capaces de catalizar la aminación de enlaces C-H tal como fue demostrado por Svastits y colaboradores en 1985,⁹³ e incluso puede alterarse la regioselectividad de la aminación en un sistema intramolecular anulando otros patrones de reactividad del sustrato utilizando la ingeniería de proteínas, como ha sido reportado por Arnold y Fasan en los últimos años.⁹⁴⁻¹⁰¹

Por otra parte, resulta de sumo interés el desarrollo de reacciones intermoleculares, existiendo un único reporte de aminación C-H de este tipo desarrollado por el grupo de Arnold, y una aproximación posterior reportada por el grupo de Fasan.^{94,102} En estas reacciones, la inserción del nitreno en el enlace C-H compite con la descomposición del intermediario Fe-nitreno sin la ventaja de la cercanía que ofrece una reacción intramolecular, pero esta limitante puede superarse a través de la evolución dirigida de proteínas.⁹²

Transferencia intramolecular de nitrenos

En 2013, Arnold y colaboradores publicaron la aminación intramolecular enantioselectiva de enlaces C-H catalizada por citocromos P450 de *Bacillus megaterium*. El estudio comenzó con el screening *in vitro* de 24 variantes de esta enzima que habían sido desarrollados para reacciones de monooxigenación, frente a 2,4,6-trietilbencensulfonilazida (**23**) en condiciones anaerobias reductoras (Figura 44). En la mayoría de las reacciones se detectó como producto mayoritario la sulfonamida (**23b**) y pequeñas cantidades del producto de aminación (**23a**). Los mejores resultados fueron de 28 *total turnovers* (TTN) para la variante P450_{BM3} T268A.¹⁰³

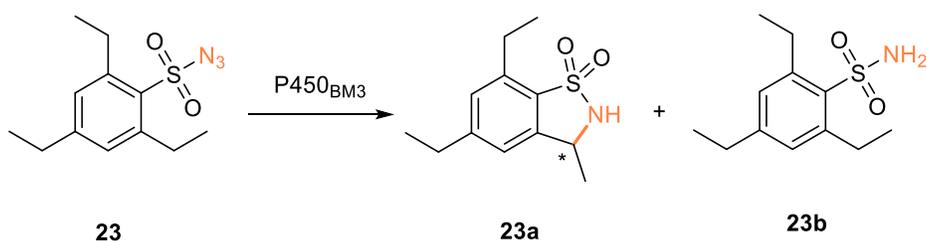


Figura 44: Aminación C-H catalizada por citocromo P450.

Luego de probar nuevas múltiples variantes encontraron que la enzima más activa fue la denominada C400S P411_{BM3}-CIS, que con 14 mutaciones respecto a la enzima nativa alcanzó 140 TTN con un 73 % de rendimiento hacia **23a** determinado por HPLC. Esto llamó la atención dado que ciertos residuos descritos como imprescindibles para la actividad monooxigenasa (como la cisteína que coordina al hierro del grupo hemo y de la treonina involucrada en la estabilización de las especies Fe-peroxo formadas durante el ciclo catalítico de la monooxigenación), no

resultaron necesarios para la aminación de enlaces C-H y por el contrario variantes en estas posiciones (C400S y T268A) potencian esta nueva actividad hacia el producto buscado **23a**. En cuanto a la enantioselectividad de esta reacción se obtuvieron excesos enantioméricos variables en el rango de 20 a 73 % para el enantiómero (S).¹⁰³

En un trabajo posterior prepararon variantes de P411_{BM3} con regioselectividades diferentes y complementarias en la aminación C-H, y estudiaron las reacciones utilizando sustratos similares a **23** pero sustituidos en 2,5 y donde R= *n*-Pr, *n*-Bu, pudiendo analizar la aminación de los carbonos α - y β - de los mismos. En todos los casos se obtuvo una mezcla de los productos **24a** y **24b** y se lograron identificar mutaciones que favorecían la formación de uno u otro producto, ambos con excesos enantioméricos >99 % (Figura45), incluso al utilizar distintos sustituyentes.⁹⁶

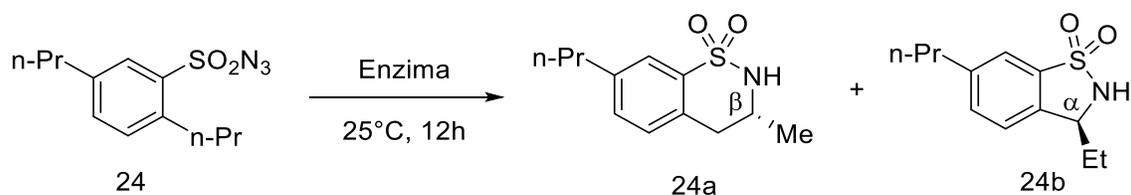


Figura 45: Aminación intramolecular con diferente regioselectividad catalizada por variantes de P411_{BM3}.

El grupo de Fasan también realizó estudios sobre mutantes de P450_{BM3}, analizando el efecto de los sustituyentes en el anillo aromático de las arilsulfonilazidas tipo **25** (Figura 46, R= Me, Et, *i*-Pr) encontrando una tendencia en su reactividad: *aquellos sustratos cuya energía de enlace C-H en la posición bencílica es menor son más reactivos frente a la inserción del nitreno.*

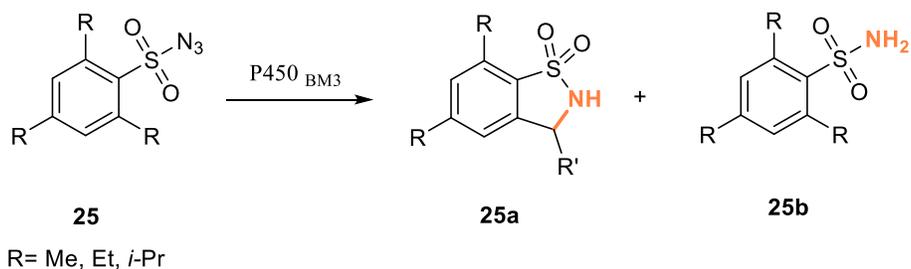


Figura 46: Arilsulfonilazidas trisustituidas utilizadas para el estudio de reacciones de aminación intramolecular.

Además, propuso un mecanismo para esta nueva actividad el cual se muestra en la Figura 47: la interacción de la azida con el Fe^{II} del sitio activo se da a través de un complejo azido-Fe, esto favorece la liberación de N_2 para dar la especie imido- Fe^{IV} . A partir de aquí surgen dos posibles caminos: la *vía productiva* donde éste intermediario reactivo deriva en la inserción del nitreno en el C-H bencílico para dar la amina cíclica; y la *vía no productiva* donde se da la hidrólisis del intermediario imido- Fe^{IV} y la posterior reducción de la especie oxo- Fe^{IV} para regenerar el estado ferroso de la enzima.¹⁰⁰ Por otra parte retomaron el estudio de la importancia del residuo T268 proponiendo que la mutación por alanina dificulta la hidrólisis de la especie nitrenoide al suprimir el mecanismo de protonación de la misma, disminuyendo la formación de la sulfonamida **25b** no deseada.¹⁰⁰

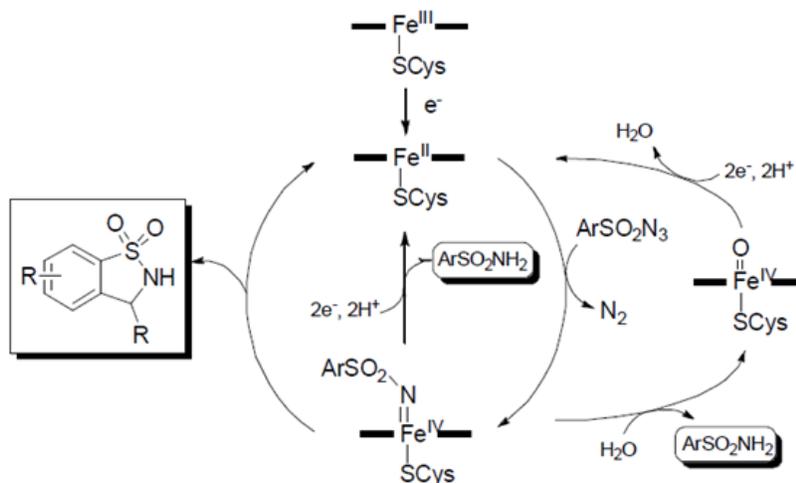


Figura 47: Mecanismo propuesto para la aminación de enlaces C-H por P450BM3. Extraído de Singh, R., Bordeaux, M. & Fasan, R. 2014.¹⁰⁰

Ambos grupos continuaron sus estudios sobre distintos sustratos utilizando distintos donores de nitrenos. Así Singh y colaboradores reportaron el estudio de variantes de P450_{BM3} en condiciones anaerobias para la **formación de oxazolidinonas (26a)** a través de una ciclación intramolecular de carbazidatos (**26**) vía inserción de nitreno en un enlace C-H (Figura 48), reacción que hasta el momento sólo se lograba con catalizadores de rodio.⁹⁹

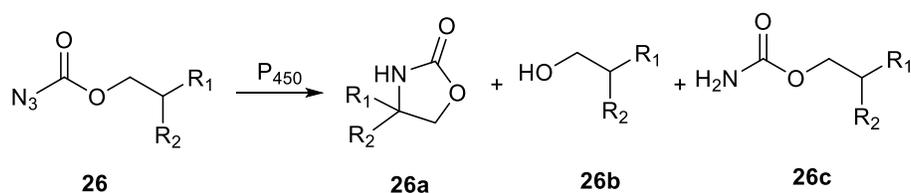


Figura 48: Inserción de nitreno intramolecular en la síntesis enzimática de oxazolidinonas catalizada por citocromo P450.

Los mejores resultados para esta transformación fueron obtenidos con la variante de P450_{BM3}, denominada FL#62 y el sustrato conteniendo R₁= Ph, R₂= Me, que bajo condiciones optimizadas alcanza 70 turnover numbers (TON) y un rendimiento de 4 %, sólo superado al utilizar el sustrato *p*-metil sustituido logrando 100TON. Se observó además que el resto del sustrato era convertido al alcohol **26b** y al carbamato **26c**, evidenciando ambos subproductos la formación

del nitreno correspondiente ya que el carbamato se obtiene debido a una sobre reducción y protonación del intermediario nitrenoide formado, en tanto que la formación del alcohol podría implicar la hidrólisis de la especie carbonilo-nitrenoide o una descarboxilación durante la catálisis.⁹⁹ Esto se desprende del estudio mecanístico presentado en ese mismo trabajo (Figura 49), donde se propone que la activación del enlace C-H a funcionalizar ocurre por la sustracción del hidrógeno llevando a la formación de un radical sobre el carbono correspondiente, como intermedio de acuerdo a un mecanismo ya reportado para la hidroxilación alifática catalizada por citocromos P450.^{99,104}

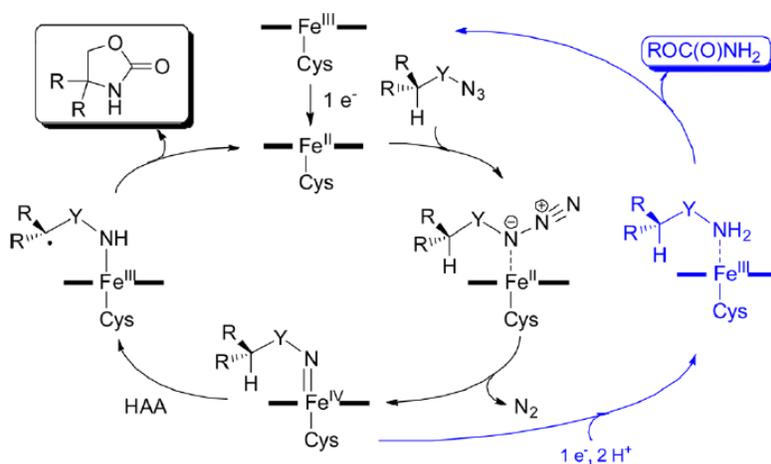


Figura 49: Mecanismo propuesto para la formación de oxazolidinonas catalizadas por P450. Tomado de Sing *et al.* 2015.¹⁰⁵

Transferencias intermoleculares de nitrenos

En 2014, Arnold y colaboradores reportaron el uso de citocromos para la transferencia intermolecular de nitrenos sobre compuestos organoazufrados para la **síntesis de sulfimidas** (Figura 50).¹⁰⁶

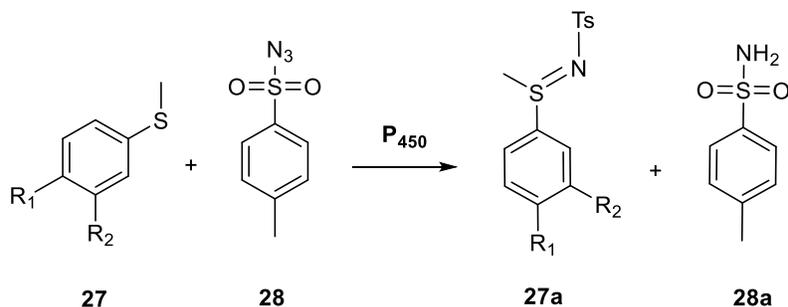


Figura 50: Reacción de sulfimidación catalizada por citocromo P450.

Según este estudio, el mecanismo de esta reacción implica el ataque nucleofílico directo del tioeter al intermediario nitrenoide formado, y no cualquier dador de nitreno será útil para esta transformación, siendo la tosilazida el único de los seis testeados inicialmente que permitió la sulfimidación. Nuevamente, se plantea que un camino no productivo lleva a la formación de la tosilamida y se observa una relación entre la cantidad obtenida de este producto y las condiciones de reacción. *Cuanto menos reactivo es el sulfuro utilizado mayor es la cantidad de tosilamida obtenida*, observándose que anillos sustituidos con grupos dadores de electrones favorecen la sulfimidación por aumentar la reactividad del azufre, siendo el *p*-metoxitioanisol el que presenta valores mayores de TTN en el entorno de 300. Por otra parte, se observó que cuanto mayor era la concentración de tosilazida mayor velocidad de formación de tosilamida, por lo que ensayaron la adición lenta de la azida observando un incremento en los *turnover numbers* totales (TTN) para la sulfimida respecto a cuando ambos reactivos se agregan simultáneamente.¹⁰⁶

Además, se resalta en este trabajo la importancia de los aminoácidos próximos al grupo hemo tanto en la orientación y unión de los sustratos como en la estereoquímica del producto obtenido. La mejor variante para catalizar estas transformaciones, P411_{BM3}-CIS-T438S, presenta

14 mutaciones respecto a la enzima nativa, y al revertir cada una de estas mutaciones por separado observaron una gran disminución de la actividad para estas reacciones. A su vez aquellas variantes de la enzima que fueron muy activas en reacciones de aminación intramolecular no lo fueron para este tipo de reacciones intermoleculares.¹⁰⁶

A raíz de este trabajo, describieron una estrategia que combina la aminación catalizada por P411 con un rearrreglo sigmatrópico para la **síntesis de aminas alílicas** quirales. El mecanismo consiste en la imidación enantioselectiva de sulfuros alílicos proquirales para generar las sulfimidias correspondientes que a través de un espontáneo rearrreglo sigmatrópico [2,3] producirá la amina alílica protegida con un nuevo centro quiral (Figura 51). En este trabajo realizado por evolución dirigida de P411_{BM3}-CIS-T438S, se obtuvo una variante capaz de producir la amina **31** con un 71 % de rendimiento incluso en condiciones aerobias.⁹⁷

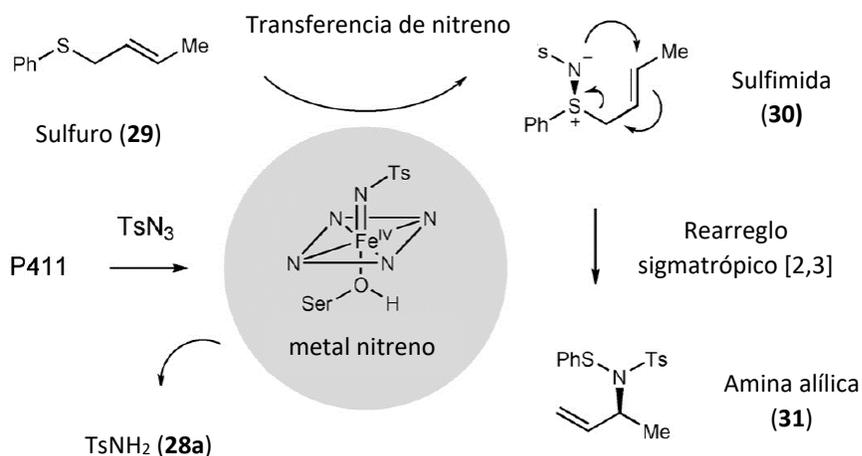


Figura 51: Síntesis de aminas quirales combinando sulfimidación y rearrreglos sigmatrópicos. Tomado de Prier *et al.* 2016.⁹⁷

En 2015, el mismo grupo reportó el estudio de estos sistemas en **reacciones de aziridinación**, resultando en una de las transformaciones más desafiantes, donde incluso el mejor biocatalizador encontrado para las reacciones de sulfimidación (P411_{BM3}-CIS-T438S) casi no mostró actividad para esta transformación. En busca de mejores resultados, dicho

biocatalizador fue sometido a un exhaustivo trabajo de evolución dirigida hasta encontrar una variante adecuada, que rindió 600 TON y un 70 % de rendimiento utilizando estireno y tosilazida como reactivos. Además, en este caso no se observó relación entre las características electrónicas del arilo y la productividad como se había determinado para la sulfimidación, pero sí un cambio en la estabilidad del producto obtenido, encontrándose el alcohol (**33**) por apertura de la aziridina (**34**) en medio acuoso únicamente al utilizar *p*-metoxiestireno como sustrato (Figura 52).¹⁰⁷

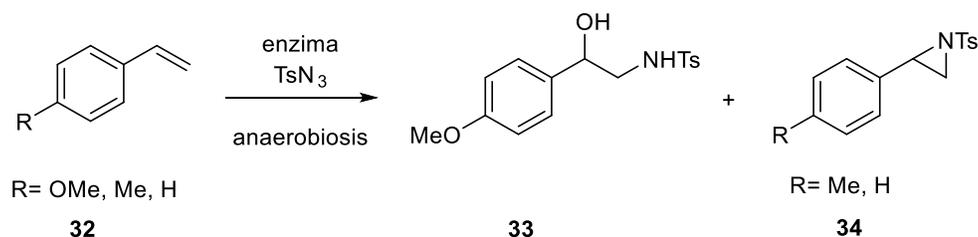


Figura 52: Reacción de aziridinación mediada por variantes de P411.¹⁰⁷

Continuando con los estudios en esta área, se utilizaron los citocromos P411 para la aminación intermolecular de alcanos con tosilazida, obteniendo únicamente la sulfonamida. Sin embargo, una de las variantes desarrolladas para la imidación de sulfuros alílicos⁹⁷ mostró actividad promiscua hacia la **aminación C-H intermolecular**: bajo condiciones anaerobias, el 4-etilanol es aminado en el carbono bencílico con un 11 % de rendimiento y 14 % de exceso enantiomérico por esta enzima, la cual difiere del P450_{BM3} nativo en 17 mutaciones. Posteriormente, se realizaron distintas rondas de mutagénesis sitio dirigida en diversos residuos, algunos identificados previamente como importantes para la actividad/selectividad de P450s, otros que eran altamente conservados, y también residuos que han sido previamente mutados. Las bibliotecas fueron ensayadas frente a diferentes sustratos: 4-etilanol, 4-etiltolueno, y etilbenceno (Figura 53) y se observó que las mutaciones A78V y F263L aumentaron la actividad y selectividad en los tres sustratos, logrando un biocatalizador capaz de producir el producto aminado en la posición bencílica como un único enantiómero (ee >99 %) utilizando células enteras de la cepa de *E. coli* que produce la enzima. Por otra parte, se observaron otras mutaciones que tenían impacto en la transformación de alguno de los sustratos, pero no sobre los otros.

Algunas limitaciones observadas refieren al espectro de sustratos, donde aparentemente el anillo aromático parece ser importante para la unión a la enzima, no pudiendo aminor carbonos bencílicos de arenos deficientes en electrones o enlaces C-H alílicos o alifáticos.⁹⁴ De todas formas, este trabajo constituyó el primer ejemplo reportado de aminación C-H intermolecular.

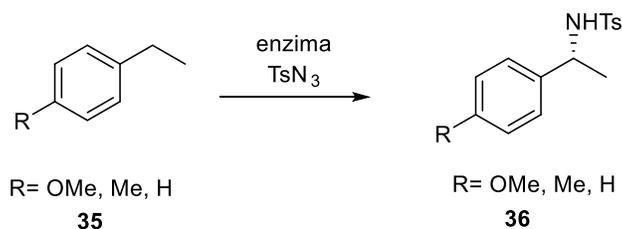


Figura 53: Aminación C-H intermolecular utilizando células de *E. coli* que expresan P411.

II.1.1.2 Formación de enlaces C-C mediada por carbenos

Otro de los métodos utilizados para la funcionalización de enlaces C=C y C-H es la transferencia de carbenos mediada por metales de transición, la cual no puede reproducirse enzimáticamente por biocatalizadores encontrados en la naturaleza. Nuevamente, la evolución dirigida de citocromos P450 mostró utilidad, obteniéndose variantes capaces de catalizar **reacciones de ciclopropanación** en condiciones anaerobias observando múltiples *turnovers* al utilizar estireno y etildiazoacetato en condiciones anaerobias y en presencia de un agente reductor ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$).¹⁰⁸

Con este antecedente, probaron 92 variantes de P450_{BM3} como lisados de *E. coli* seleccionando las 10 más relevantes, que fueron purificadas y ensayadas como enzima aislada. Cinco de estas 10 mostraron incrementos en la actividad respecto a la enzima nativa con relaciones *cis:trans* que van de 9:91 a 60:40 y excesos enantioméricos del 95 %. Posteriormente, hipotetizaron que podían alterar el potencial de reducción del hierro cambiando los ligandos axiales al mismo, y desarrollaron así la variante C400S a la que posteriormente denominaron P411 por el corrimiento de su banda de absorción típica de 450 nm a 411 nm.⁹⁵ Este biocatalizador, conteniendo 13 mutaciones más respecto de la enzima nativa y expresado en célula entera les permitió obtener 1.63 g de producto que equivale a un 78 % de rendimiento y un 99 % de exceso enantiomérico para el isómero *cis*.

Posteriormente, en 2015 el grupo de Fasan estudió estas reacciones utilizando mioglobina de cachalote y variantes de esta, reportando un estudio mecanístico para esta transformación. Según los ensayos realizados con distintas olefinas, aquellas con *sustituyentes dadores de electrones aumentan la velocidad de ciclopropanación*, mientras que los atrayentes de electrones la disminuyen, lo cual es consistente con la existencia de intermediarios metal-carbeno electrofílicos con una carga parcial positiva sobre el carbono bencílico. Así se propuso que existen cuatro posibles orientaciones que pueden tomar los sustratos: dos proyectando el grupo éster hacia el centro de la proteína (sobre N2 y N3), y dos proyectándolo hacia la cara

expuesta del grupo hemo (sobre N1 y N4); las cuales determinarían la estereoisomería favorecida (Figura 54).¹⁰⁹

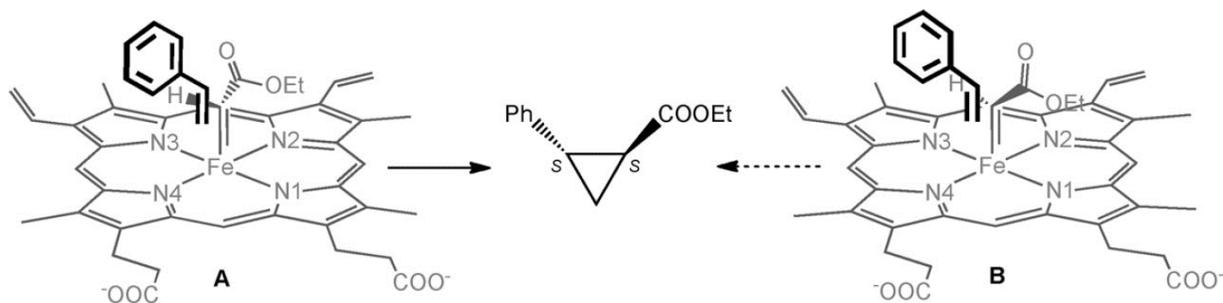


Figura 54: Geometrías propuestas para el posicionamiento de estireno y el intermediario metal-carbeno formado en mioglobina para la formación del (1*S*,2*S*)-etil-2-fenilciclopropanocarboxilo. Extraído de Bordeaux *et. al.* 2015.¹⁰⁹

En un trabajo posterior del mismo grupo se obtuvieron variantes de mioglobina, que utilizadas en sistemas de célula entera, rindieron el producto *trans* con estereoselectividades complementarias, frente a una variedad de olefinas aril-sustituídas.¹¹⁰

La formación de estas especies carbenoides puede aprovecharse además para su inserción en enlaces S-H, lo cual ha sido un gran desafío para los catalizadores sintéticos conteniendo diversos metales de transición, con los cuales no se obtiene buena enantioselectividad. Teniendo en cuenta esto, el grupo de Fasan desarrolló variantes de mioglobina capaces de catalizar estas reacciones evitando la formación de los productos secundarios que se observan al utilizar otros catalizadores o que requieren la adición lenta de los reactivos.¹¹¹ Esta actividad fue luego aprovechada para la formación de enlaces C-C a través del rearreglo sigmatrópico [2,3] del iluro de azufre formado como intermediario al utilizar sulfuros alfílicos.¹¹²

Posteriormente, la sustitución del centro metálico de la mioglobina y la modificación de la primera esfera de coordinación de este, permitió obtener metaloproteínas capaces de llevar a cabo reacciones de ciclopropanación, inserciones S-H y N-H, e incluso la transferencia

intermolecular de carbenos a enlaces C-H; las cuales no eran catalizadas por la enzima conteniendo hierro.¹⁰²

En base a estos antecedentes sobre la formación de carbenos en el sitio activo de las hemoproteínas, y en estudios realizados con metaloporfirinas, el grupo de Fasan planteó el estudio de la mioglobina en reacciones de Wittig donde además el entorno de la proteína podría influenciar la estereoselectividad de la reacción. A partir de esto se reportó el uso de variantes de mioglobina para la olefinación de aldehídos con una variedad de aldehídos y α -diazacetatos, observando una alta actividad catalítica y selectividad hacia el producto *E* (Figura 55), obteniéndose el producto **40** únicamente al utilizar trifenilfosfina y trifenilarsina, siendo mayor la diastereoselectividad en presencia de esta última. Resulta interesante destacar que aquellas variantes con mayor actividad frente a la ciclopropanación de olefinas fueron las que menores conversiones mostraron en estas reacciones, resaltando nuevamente que los requerimientos del sitio activo suelen ser diferentes para cada tipo de reacción. A pesar de los altos *turnover numbers* observados, las conversiones no excedieron el 50 % y el aumento de la relación α -diazooester : aldehído no funcionó como estrategia para incrementarlos sino que se obtuvo una mayor cantidad de producto de dimerización **41**.¹¹³

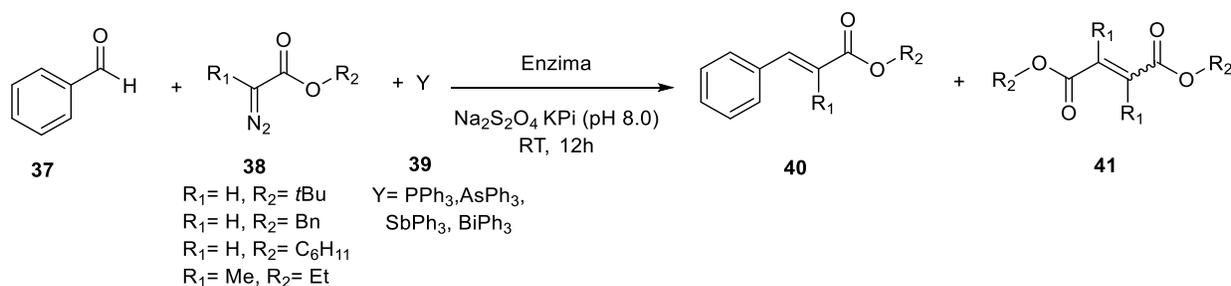


Figura 55: Reacciones de Wittig catalizadas por variantes de mioglobina. Adaptado de Tyagi, V., Fasan, R. 2016.¹¹³

El mecanismo propuesto para esta transformación se esquematiza en la Figura 56, comenzando con la forma ferrosa del hierro del sitio activo que tras la reacción con el grupo diazo forma un intermediario carbenoide (II) de carácter electrofílico. Tras el ataque nucleofílico

de PPh_3 (o AsPh_3) se formaría el iluro de fosfonio (III) que podría reaccionar con el aldehído para generar un intermediario oxafosfetano (IV) el cual tras reorganizarse liberaría el producto y óxido de trifenilfosfina como subproducto.¹¹³

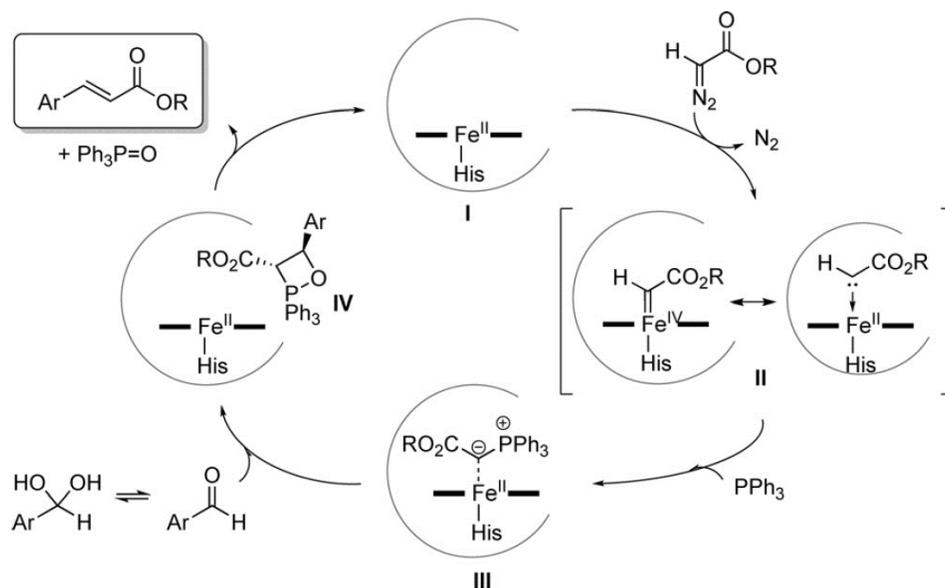


Figura 56: Mecanismo propuesto para la olefinación de aldehídos mediada por mioglobina. Tomado de Tyagi, V., Fasan, R. 2016.¹¹³

II.2 Objetivos específicos

- ◆ Estudiar la capacidad de diferentes dioxigenasas tipo Rieske para **descomponer azidas orgánicas en especies nitrenoides** reactivas que puedan insertarse en enlaces C(sp³)-H intra- e inter-moleculares.
 - i) Ensayar reacciones de **aminación C(sp³)-H intramoleculares** utilizando arilsulfonilazidas trisustituidas con TDO, TDO^M, CDO y NDO.
 - ii) Estudiar las reacciones de aminación C(sp³)-H intramoleculares utilizando arilsulfonilazidas con las subunidades α y β de la oxigenasa de NDO purificadas.
 - iii) Ensayar TDO, TDO^M, CDO y NDO en **otras reacciones de funcionalización C-H**

II.3 Resultados y Discusión

II.3.1 Reacciones de aminación C(sp³)-H intramolecular utilizando arilsulfonilazidas trisustituidas.

La elucidación del mecanismo de reacción para la formación de benzonitrilo en el Capítulo I.3.4, sugirió la existencia de especies nitrenoides en el sitio activo de TDO, lo que revela un altísimo potencial sintético sin explorar para las oxigenasas de hierro no hemo dependientes. Como se indicó en la introducción, existen reportes previos de oxigenasas conteniendo grupos hemo capaces de catalizar reacciones que involucran la formación de especies nitrenoides en el sitio activo de la enzima. La similitud entre el mecanismo propuesto para las hemoproteínas¹⁰⁰ y el propuesto por nosotros llevó a plantear la posibilidad de que las dioxigenasas de hierro no hemo dependientes pudieran catalizar reacciones de funcionalización C(sp³)-H.

Se seleccionó como sustrato 2,4,6-triisopropilbencen-1-sulfonilazida (**42**) por haber sido utilizado en la búsqueda de esta actividad en hemoproteínas como indica la revisión literaria. El hecho de que la inserción del nitreno ocurra en el enlace C-H de una misma molécula en la que además los sustituyentes del anillo estabilizan de cierta forma el intermediario formado, permiten que la reacción ocurra en este sustrato con mayor probabilidad que en otras arilsulfonilazidas trisustituidas, y mucho más aún si se compara con reacciones intermoleculares.

II.3.1.1 Ensayos preliminares y screening inicial

Un ensayo preliminar utilizando células en reposo de *E. coli* JM109 (pDTG601) bajo atmósfera de argón, permitió obtener los productos de reacción **42a** y **42b** con un 11 % de rendimiento global (Figura 57-1). La formación del producto **42a** puede explicarse mediante la inserción del nitreno formado por descomposición de la azida (mediada por el átomo de hierro de la enzima) en el enlace C(sp³)-H cercano. El producto secundario **42b** puede formarse debido a una reducción directa de la azida del sustrato por algún componente del medio, o por la

hidrólisis del intermediario nitrenoide previo a la inserción en el enlace C-H; esta propuesta mecanística se explica en la Figura 57-II. Este resultado constituyó una prueba de concepto muy prometedora que nos impulsó a profundizar en el estudio de esta nueva actividad.

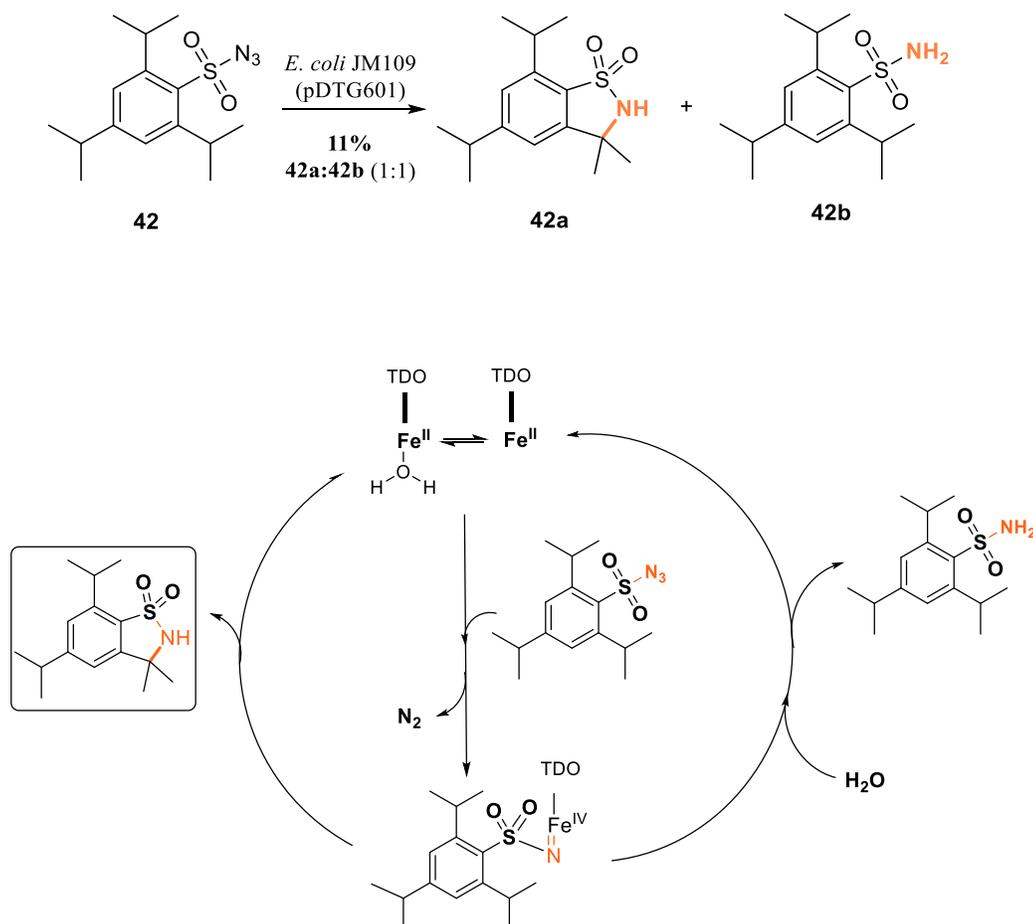


Figura 57: I. Biotransformación de 2,4,6-triisopropilbencensulfonilazida mediada por TDO en condiciones anaerobias. II. Mecanismo propuesto para la transformación.

A partir de esto, se decidió realizar un screening con las diferentes dioxigenasas disponibles en nuestro laboratorio, incluyendo TDO, TDO^M (Q215A, I324F, T365N, F366V), CDO y NDO, junto con los respectivos controles *E. coli* JM109 (pKK223-3) y *E. coli* JM109 (DE3). Para esto se utilizaron como sustratos 2,4,6-triisopropilbencen-1-sulfonilazida (TISA, 42), 2,4,6-trietilbencen-1-sulfonilazida (TESA, 23) y 2,4,6-trimetilbencen-1-sulfonilazida (TMSA, 43), permitiendo evaluar la capacidad de insertar nitrenos en carbonos con diferente patrón de

sustitución (Figura 58). Estas reacciones se llevaron a cabo en viales herméticamente cerrados conteniendo una suspensión de células en buffer pH 7.2 de OD₆₀₀ = 30, en 400 µL de volumen total con una concentración de sustrato de 10 mM, bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente y con agitación durante toda la noche. Los porcentajes de conversión fueron calculados considerando la concentración de producto obtenida (determinada por HPLC) en relación con la cantidad de sustrato utilizada y los resultados se presentan en la Tabla 4.

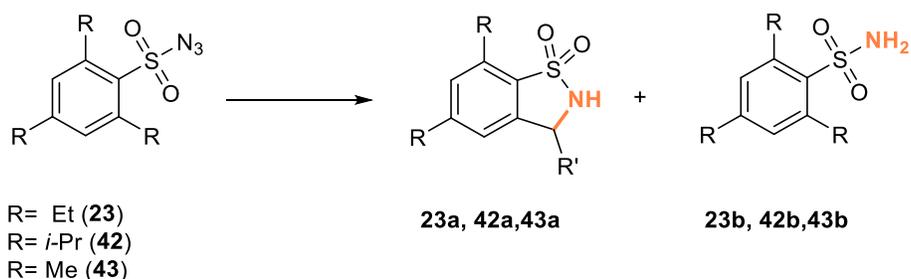


Figura 58: Reacciones de aminación intramolecular utilizando arilsulfonilazidas sustituidas.

Tabla 4: Resultados obtenidos para la reacción con arilsulfonilazidas trisustituidas utilizando OD₆₀₀ = 30, 10 mM sustrato y 400 µL de volumen de reacción bajo atmósfera de argón. Se presenta el porcentaje de conversión para cada uno de los productos obtenidos.

Biocatalizador	Conversión %					
	R= Me		R= Et		R= <i>i</i> -Pr	
	43a	43b	23a	23b	42a	42b
pKK223-3 control	ND	60	ND	20	3	7
TDO WT	ND	50	1	30	4	10
TDO I324F	ND	50	<1	30	1	NE
TDO T365N	ND	NE	<1	NE	5	NE
TDO Q215A	NE	NE	NE	NE	4	NE
TDO F366V	ND	40	ND	26	5	NE
CDO	ND	75	<1	32	3	6
NDO	ND	85	1	45	8	6

*ND: No detectado. NE: No ensayado.

En estos ensayos preliminares, se observó formación de los dos productos para 2,4,6-triisopropilbencen-1-sulfonilazida (TISA, **42**) y 2,4,6-trietilbencen-1-sulfonilazida (TESA, **23**) mientras que sólo se detectó formación de sulfonamida para la 2,4,6-trimetilbencen-1-sulfonilazida (TMSA, **43**). Los mayores rendimientos encontrados para las sultamas en TISA en comparación con TESA, y el hecho de no detectarse este producto para TMSA, concuerda con el hecho de que la ruptura del enlace C-H para llevar a cabo la inserción implique un déficit electrónico sobre el carbono, que puede ser estabilizado mejor en el caso de los carbonos terciarios (**42**) que secundarios (**23**) y que primarios (**43**). Este comportamiento también se observa en las reacciones catalizadas por el citocromo P450 de *Bacillus megaterium* (P450_{BM3}) reportadas por el grupo de Fasan observando para la enzima nativa valores de TTN de 20 para TISA, 5 para TESA y sin formación de producto para TMSA, mientras que con su mejor variante de esta enzima (FL#62) que incluye seis mutaciones en el sitio activo alcanzan valores de 388, 47 y 5 respectivamente.¹⁰⁰

A su vez, en nuestro ensayo de screening se observa que la cantidad de sulfonamida obtenida aumenta al disminuir la cantidad de sultama generada, lo cual concuerda con el mecanismo planteado, donde las especies nitrenoides generadas tienen más tendencia a hidrolizarse cuanto más lento sea el proceso de inserción C-H en los enlaces a funcionalizar, derivando en el producto secundario de la reacción (hidrólisis de la especie nitrenoide).

II.3.1.2 Optimización de la biotransformación: estudio del impacto de la biomasa, concentración del sustrato y presencia de oxígeno.

Con el objetivo de aumentar las conversiones observadas se decidió estudiar el impacto de la concentración de biocatalizador por lo cual se duplicó la densidad óptica de la suspensión de células utilizada y se reprodujo el ensayo inicial midiendo en este caso únicamente las conversiones hacia las sultamas producidas (Tabla 5).

Tabla 5: Resultados obtenidos para la reacción con arilsulfonilazidas trisustituidas utilizando $OD_{600} = 60$, 10 mM sustrato, 400 μ L volumen de reacción bajo atmósfera de argón. Se presenta el porcentaje de conversión para cada la sultama correspondiente en cada caso.

Biocatalizador	Conversión %		
	R= Me	R= Et	R= <i>i</i> -Pr
<i>p</i> KK223-3 control	ND	ND	5
TDO WT	ND	1	12
TDO I324F	ND	NC	NC
TDO T365N	ND	NC	NC
TDO Q215A	ND	<1	8
TDO F366V	ND	NC	7
CDO	ND	NC	NC
NDO	ND	2	14

Los mejores resultados se obtuvieron para la 2,4,6-triisopropilbencen-1-sulfonilazida (**42**), siendo TDO WT y NDO los que mostraron mayores conversiones hacia la sultama correspondiente al trabajar a una $OD_{600} = 60$. Cuando los sustituyentes son etilo (**23**), la reactividad del sustrato disminuye, lo cual se refleja en las conversiones obtenidas por los distintos biocatalizadores donde el control ya no muestra actividad, y la mayor conversión observada de 2 % para NDO. Por último, al utilizar la 2,4,6-trimetilbencen-1-sulfonilazida (**43**) no se detectó formación de producto en ningún caso, lo cual concuerda con la tendencia mencionada anteriormente.

Es importante destacar las conversiones observadas para *E. coli* JM109 (pKK223-3) dado que no expresa ninguna dioxigenasa, lo cual indica que alguna otra enzima del microorganismo puede estar catalizando estas reacciones, principalmente hemoproteínas como las reportadas por Hauer y colaboradores recientemente.¹¹⁴ Teniendo en cuenta esta actividad encontrada en la cepa control, se decidió proseguir con la optimización propuesta realizando quintuplicados de los experimentos de forma de llevar a cabo un análisis unifactorial de varianza (*one-way* ANOVA) de los resultados, con el fin de detectar diferencias estadísticamente significativas entre las conversiones obtenidas con los controles y con los biocatalizadores en estudio.

Se realizó un estudio del impacto de la concentración de los sustratos TISA y TESA sobre las conversiones alcanzadas. Para ello, se ensayaron concentraciones de 2.5, 5 y 10 mM en los 400 μ L de reacción con una concentración celular correspondiente a $OD_{600} = 60$ a 28 °C (Figura 59). Debido al incremento en el número de muestras a procesar, y teniendo en cuenta que los mutantes de TDO no mostraron grandes diferencias respecto a la enzima nativa, se continuó trabajando con las cepas que expresan TDO, CDO, NDO y los respectivos controles. Del ensayo con diferentes concentraciones para TISA se observó que a 2.5 mM no existe diferencia significativa respecto de los controles para ninguno de los biocatalizadores ensayados, por lo que para los ensayos con TESA se descartó este punto (Figura 60).

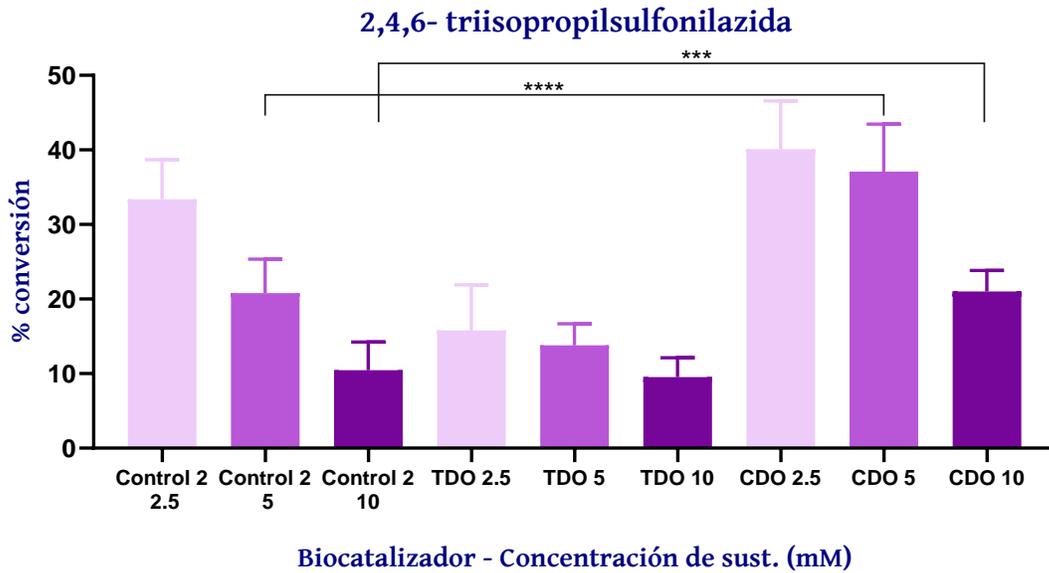
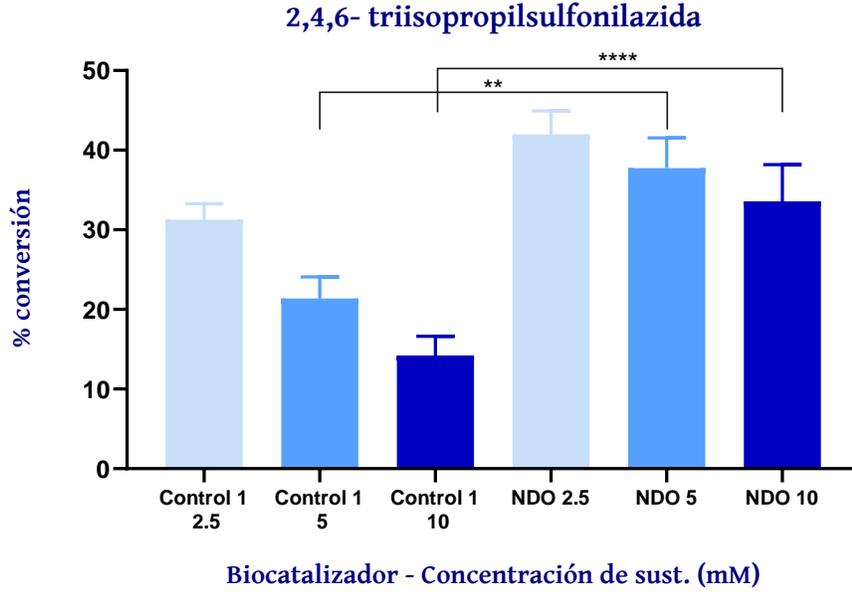


Figura 59: Biotransformación de TISA mediada por cepas que expresan NDO, TDO y CDO con sus respectivos controles a diferentes concentraciones. Control 1: *E. coli* JM109 (DE3), Control 2: *E. coli* JM109 (pKK223-3). Los asteriscos indican diferencia significativa entre la reacción y su respectivo control tras el análisis estadístico.

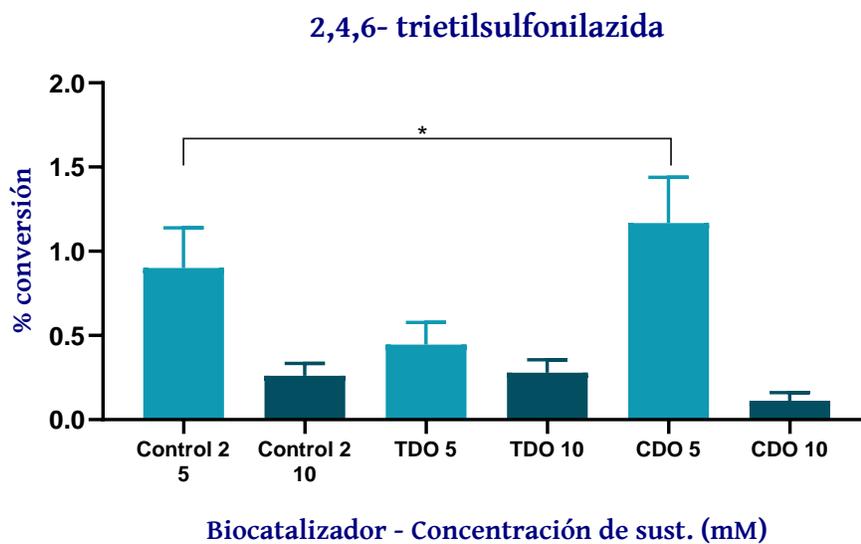
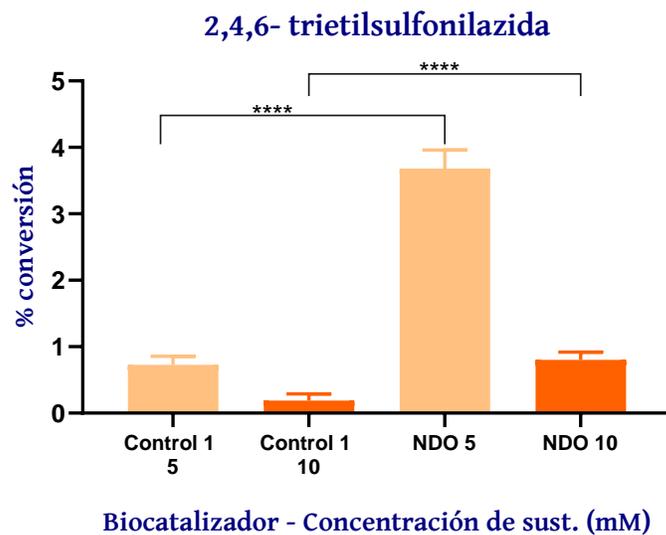


Figura 60: Biotransformación de TESA mediada por cepas que expresan NDO, TDO y CDO y los respectivos controles a diferentes concentraciones. Control 1: *E. coli* JM109 (DE3), Control 2: *E. coli* JM109 (pKK223-3). Los asteriscos indican diferencia significativa entre la reacción y su respectivo control tras el análisis estadístico.

Del análisis de estos resultados se desprende que tanto NDO como CDO convierten ambos sustratos de manera significativamente mayor que sus respectivos controles. observando una mayor diferencia al utilizar TISA como sustrato donde se alcanzaron conversiones de hasta 40 %. Al utilizar TESA también existe una diferencia significativa a 5 y 10 mM para NDO siendo las conversiones máximas cercanas al 4 %, en tanto que CDO a una concentración de 5 mM de sustrato muestra una pequeña diferencia significativa con *E. coli* JM109 (pKK223-3). Estos resultados reflejan además la reactividad de cada uno de los sustratos como se discutió anteriormente, observándose conversiones 10 veces mayores para el sustrato con isopropilo como sustituyente. Resulta interesante notar además el comportamiento de los diferentes sistemas al aumentar la concentración de sustrato. En el caso de las cepas control las conversiones disminuyen al pasar de 2.5 a 5 y a 10 mM de sustrato, pero al calcular la concentración de producto obtenida esta siempre ronda 1 mM. Sin embargo, para los biocatalizadores que expresan las dioxigenasas el comportamiento es distinto, por ejemplo, NDO y CDO frente a TISA mantienen los porcentajes de conversión en el mismo entorno para las tres concentraciones, y al calcular la cantidad de producto se observa que esta aumenta al incrementar la cantidad de sustrato agregada. Esto podría estar indicando que las enzimas de las cepas control que llevan a cabo esta reacción son más sensibles a la inhibición por sustrato que las dioxigenasas; además, estas últimas son sobre expresadas en los microorganismos recombinantes por lo cual ante mayor cantidad de biocatalizador disponible no se satura el sistema enzimático al aumentar la cantidad de sustrato.

Del análisis anterior se desprende que la naftaleno dioxigenasa es el biocatalizador con mayor actividad para este tipo de transformaciones al utilizar 2,4,6-triisopropilbencen-1-sulfonilazida como sustrato en una concentración de 10 mM. En base a esto se propone el desarrollo de variantes de esta enzima de forma de estudiar las posibilidades de optimizar el biocatalizador para llevar a cabo estas reacciones.

A su vez, se estudió el impacto de la presencia de oxígeno en las biotransformaciones catalizadas por TDO, CDO y NDO, y los respectivos controles, observando un descenso en la actividad para todos los biocatalizadores que mostraron diferencias significativas al comparar las conversiones hacia la sultama en presencia y ausencia de oxígeno (Tabla 6).

Tabla 6: Resultados obtenidos para la reacción con TISA utilizando $OD_{600} = 60$, 5 mM sustrato, 400 μ L volumen de reacción en presencia de oxígeno. Se presenta el promedio del porcentaje de conversión para la sultama en cinco réplicas \pm desviación estándar de la media.

<i>Biocatalizador</i>	<i>Conversión %</i>	
	<i>Atmósfera de argón</i>	<i>Atmósfera de aire</i>
<i>E. coli JM109 (DE3)</i>	21.4 \pm 1.2	12.5 \pm 1.6
<i>NDO</i>	37.7 \pm 1.7	23.5 \pm 1.7
<i>E. coli JM109 (pKK223-3)</i>	20.9 \pm 2.5	7.9 \pm 1.3
<i>TDO</i>	13.8 \pm 1.3	2.2 \pm 0.2
<i>CDO</i>	37.5 \pm 3.3	8.3 \pm 3.3

Si bien este comportamiento era esperable, dado que la coordinación del oxígeno al hierro competiría con la coordinación de la azida, resulta interesante destacar el nivel de actividad retenido por la naftaleno dioxigenasa, que nuevamente resultó en el mejor biocatalizador para esta transformación en estas condiciones. En base a esto se decidió continuar realizando las reacciones en atmósfera inerte de forma de optimizar los rendimientos obtenidos.

II.3.1.3 *Desarrollo de mutantes de NDO para la aminación intramolecular de enlaces Csp³-H*

Considerando los resultados obtenidos para ambos sustratos, e incluso para la formación de las bencensulfonamidas correspondientes, se decidió evaluar el efecto de mutaciones en residuos del sitio activo de la naftaleno dioxigenasa. En una primera instancia se diseñaron bibliotecas de mutantes en diferentes posiciones del sitio activo: F202, F224, H295, L307, F352 y W358 (Figura 61) las cuales fueron seleccionadas en base a los reportes previos donde se identificaron como importantes para la actividad enzimática, ya fuese por su interacción con el sustrato o por su influencia en la arquitectura del sitio activo o de la entrada al mismo. La fenilalanina en posición 224 controla la entrada de sustratos al sitio activo por lo que podría estar implicada en la aceptación de nuevos sustratos,⁴⁹ mientras el triptófano 358 y la leucina 307 estabilizan al sustrato una vez que este se enfrenta al hierro.^{48,69} Por otra parte, la fenilalanina en posición 352 fue reportada por Gibson y colaboradores como un aminoácido determinante de la estereoselectividad en la reacción de dihidroxilación catalizada por NDO y también ha sido señalada como importante para la regioselectividad, por lo que cabe suponer que tiene un rol determinantes en el posicionamiento de los sustratos.^{50,52,53} Recientemente, el estudio de mutagénesis en NDO realizado por el grupo de Hauer concluyó que la histidina en posición 295 también estaría implicada en la regioselectividad de la dihidroxilación, en tanto que la fenilalanina 202 y la leucina 307 estarían implicadas principalmente en la especificidad de la reacción catalizada por la dioxigenasa.⁵³

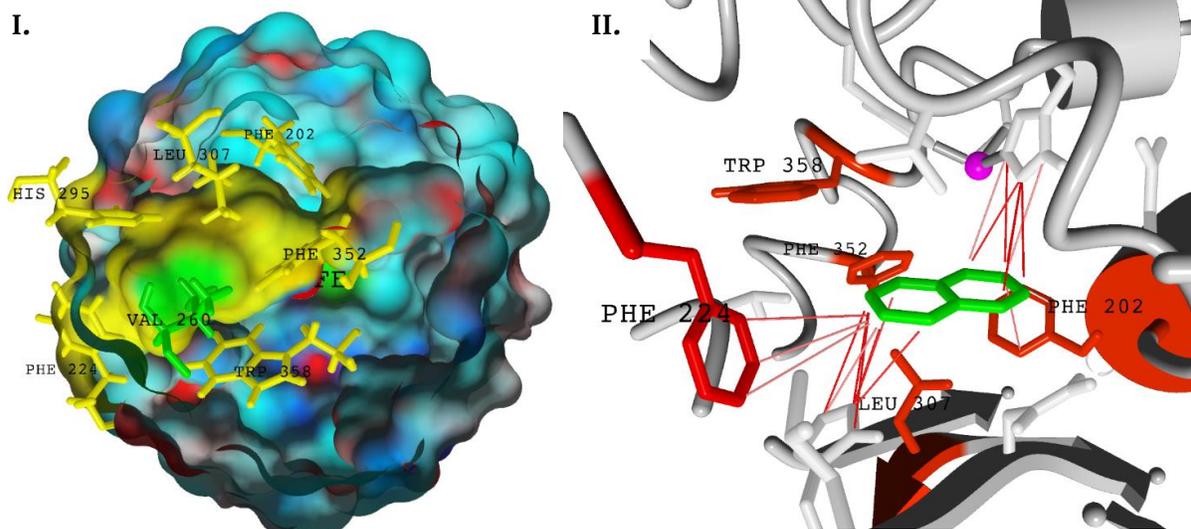


Figura 61: Imágenes del sitio activo de NDO. I. Se muestran en amarillo la superficie del sitio activo y los aminoácidos seleccionados para la construcción de bibliotecas de mutantes. II. Interacciones π - π entre los aminoácidos seleccionados para la construcción de bibliotecas (rojo) y el naftaleno (verde). El átomo de Fe se visualiza en violeta.

La estrategia propuesta se basó en sustituir estos aminoácidos voluminosos por otros más pequeños, con diferentes propiedades (ácidos, básicos, polares e hidrofóbicos), utilizando la técnica de mutagénesis por saturación. Para cinco de los residuos seleccionados se construyeron bibliotecas NHT, en la cual se incluyen 12 codones que codifican para 12 aminoácidos (Ala, Asp, Asn, Phe, Pro, His, Ile, Leu, Ser, Thr, Tyr, Val) mientras que en la posición 224 ocupada por fenilalanina se construyó una biblioteca RNC, que a través de 8 codones codifica para 8 aminoácidos (Ile, Thr, Asn, Ser, Val, Ala, Asp, Gly) ya que este residuo se ubica en la entrada al sitio activo y su sustitución por aminoácidos más pequeños podría ampliar el canal de entrada favoreciendo la entrada de sustratos voluminosos.⁴⁹ Todas las bibliotecas fueron diseñadas utilizando la herramienta CASTER v2.0 para la optimización de los codones a utilizar¹¹⁵ y se construyeron utilizando una modificación de la técnica de *Quick-Change*. La secuenciación de la región correspondiente permitió confirmar que no hubo sesgo en la distribución de codones y que todos los posibles aminoácidos estaban igualmente representados.

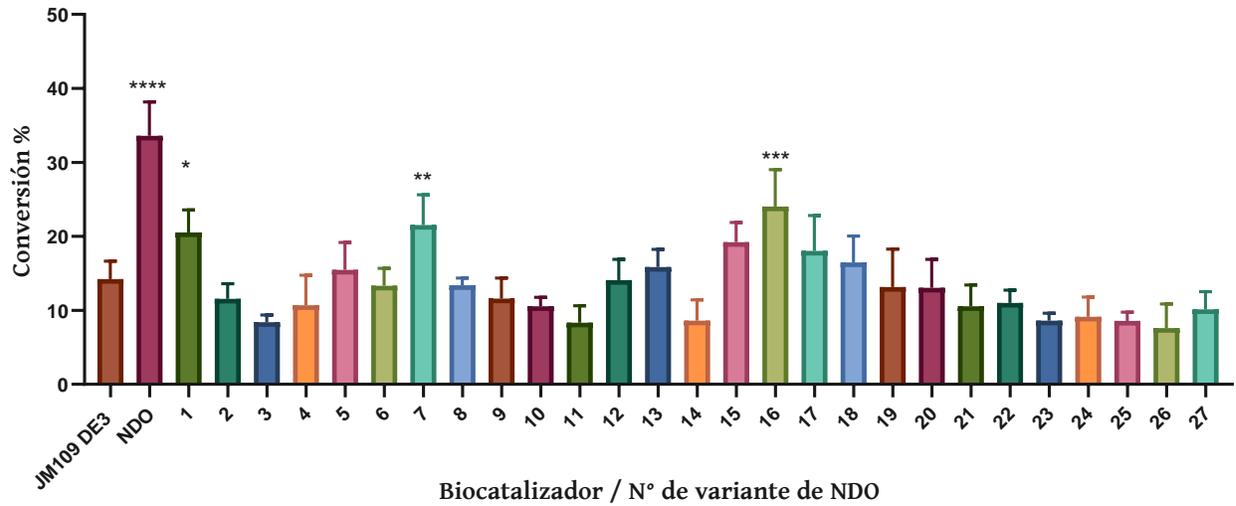
Para asegurar un 95 % de cobertura de las variantes generadas se realizó un screening de 34 colonias para cada biblioteca NHT y 22 colonias para la biblioteca RNC, utilizando TISA como sustrato en una concentración de 10 mM. Tanto el crecimiento como las reacciones se llevaron a cabo en placas de 48 pocillos de 5 mL cada uno dónde se incluyó además una columna con *E. coli* JM109 DE3 (pDTG141) como control, lo cual permitió realizar un promedio de porcentajes de conversión con un error asociado, definiendo así el margen de actividad de la enzima nativa. Tras el análisis por HPLC de cada una de las muestras se seleccionarían idealmente aquellos clones que duplicaran las conversiones de NDO WT las cuales rondaron el 30 %, pero en ningún caso se observó tal incremento por lo cual se seleccionaron todos los clones que mostraron conversiones por encima del rango control.

Las mutaciones fueron identificadas por secuenciación y estas variantes fueron combinadas en nuevas rondas de mutagénesis para la construcción de dobles y triples mutantes obteniendo finalmente 27 variantes de NDO detalladas en la Tabla 7. Dado que las condiciones de crecimiento y expresión en estas placas no son para nada óptimas, se procedió a realizar el crecimiento en LB a escala de matraz de cada uno de los mutantes para ensayar su actividad frente a TISA por quintuplicado, según protocolo habitual, y poder aplicar el análisis estadístico de los resultados obtenidos (Figura 62).

Tabla 7. Mutantes de NDO seleccionados.

<i>N° variante</i>	<i>Mutación</i>	<i>N° variante</i>	<i>Mutación</i>	<i>N° variante</i>	<i>Mutación</i>
1	F224A	10	F224A, H295T	19	W358Y
2	F224I	11	F224A, H295V	20	F224V, L307H
3	F224V	12	F224I, H295I	21	H295T, L307H
4	H295I	13	F224I, H295T	22	H295V, L307H
5	H295T	14	F224I, H295V	23	F224V, H295I, L307H
6	H295V	15	F224V, H295I	24	F224V, H295V, L307H
7	L307H	16	F224V, H295T	25	F224V, W358N
8	W358N	17	F224V, H295V	26	H295V, W358N
9	F224A, H295I	18	W358F	27	F224V, H295V, W358N

A. Conversión a sultama



B. Conversión a sulfonamida

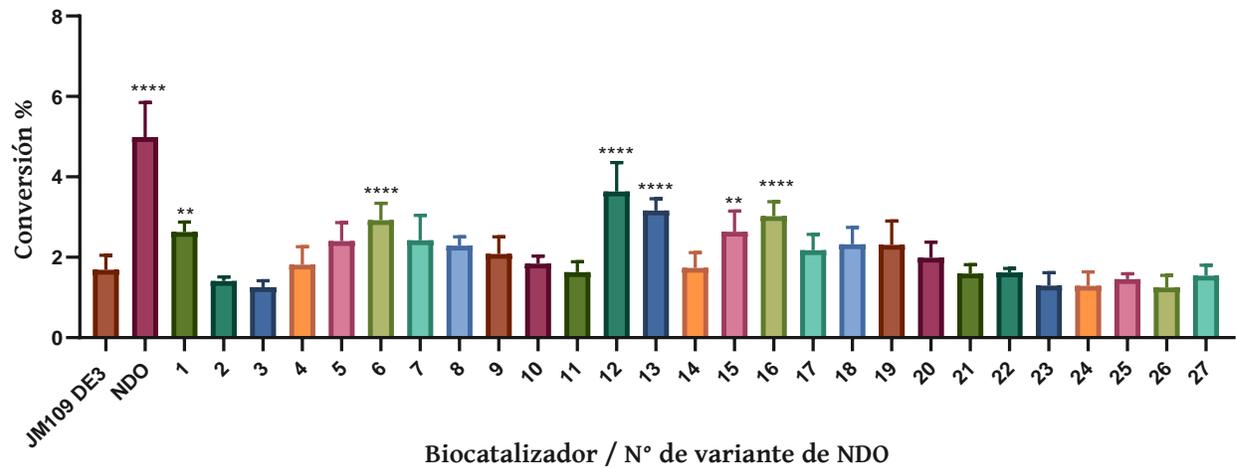


Figura 62: Biotransformación de TISA utilizando las variantes de NDO seleccionadas. A. % de conversión a sultama (42a). B. % de conversión a sulfonamida (42b) Los asteriscos muestran diferencia significativa respecto del control JM109 DE3.

Los estudios desarrollados no revelaron ninguna variante de NDO con actividad mayor que la enzima nativa, y tan solo tres de ellas presentaron un valor de conversión hacia la sultama significativamente mayor al control. Al analizar las conversiones hacia la sulfonamida correspondiente como indicador de la formación del nitreno, se observa que nuevamente es el biocatalizador expresando NDO WT el que alcanza un mayor porcentaje de conversión en tanto que seis variantes (1, 6, 12, 13, 15, y 16) presentan diferencias significativas respecto del control. De estas, la variante 7 (L307H) muestra un aumento significativo para la producción de sultama pero no para sulfonamida, por lo que esta posición podría ser interesante si se busca disminuir la producción del producto secundario no deseado.

II.3.1.4 Biotransformación de 2,4,6-triisopropilbencen-1-sulfonilazida utilizando E. coli JM109 DE3 (pDTG141) en escala de biorreactor

En base a los resultados descritos anteriormente, no se encontró un mutante más activo por lo que se continuó trabajando con *E. coli* JM109 DE3 (pDTG141) expresando la NDO nativa y se decidió escalar la reacción con la 2,4,6-triisopropilbencen-1-sulfonilazida dado que fue el sustrato que mostró mejor conversión. Para esto se realizó el crecimiento en biorreactor de 5L de acuerdo a nuestro protocolo usual,⁴³ y al alcanzar el estado estacionario a una $OD_{600} = 80$ se conectó la entrada de aire a un tanque de nitrógeno para lograr condiciones anaerobias (**experimento 1**). Una vez que el electrodo de oxígeno registró un valor de $pO_2 = 0$ estable se agregó 1 gramo de sustrato disuelto en metanol alcanzando una concentración de 3 mM y se tomaron muestras cada 15 minutos para realizar el seguimiento de la reacción cuantificando las tres especies presentes (sustrato, sultama y sulfonamida) mediante HPLC, observando el perfil que se muestra en la Figura 63.

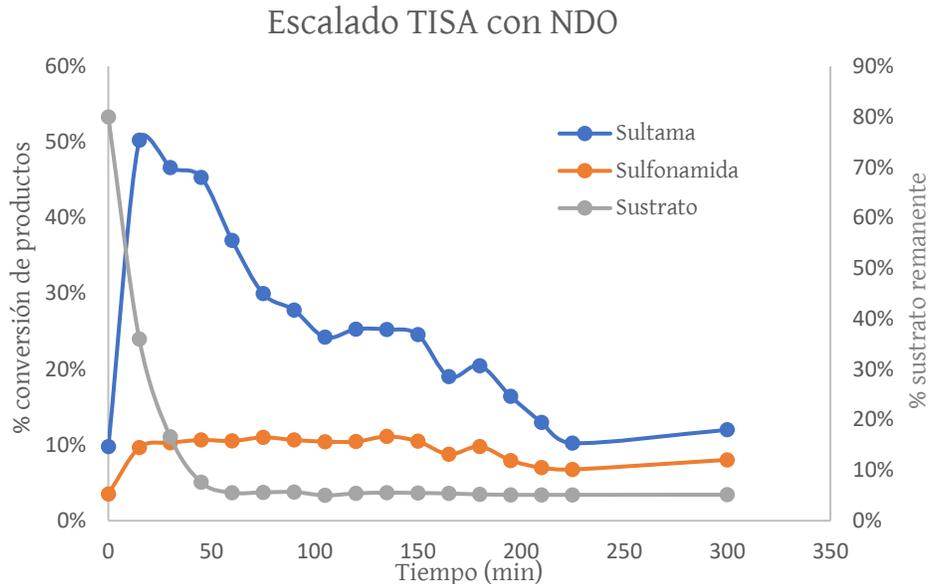


Figura 63: Biotransformación de TISA 3 mM mediada por NDO WT en escala de biorreactor.

Este perfil de reacción resultó totalmente inesperado, y fue reproducible en dos experimentos independientes. A tiempo 0 se observa un 10 % de conversión para el producto y un 4 % hacia la sulfonamida, permaneciendo en el medio de reacción un 80 % del sustrato agregado. A los 15 minutos se observa el pico máximo de conversión de sustrato que alcanza un 50 %, y se mantiene cerca de ese valor durante la siguiente media hora, para luego comenzar a bajar y finalmente mantenerse en un 12 – 15 % hacia el fin del proceso. El producto secundario sin embargo, se mantiene en torno al 10 % a partir de los primeros 15 minutos de biotransformación y hasta el final del proceso. Respecto al sustrato, se observa un consumo sostenido en los primeros 50 minutos y luego se detecta un 5 % del mismo que queda intacto durante el resto del proceso. Estos resultados obtenidos mediante análisis por HPLC, concuerdan además con lo observado tras el aislamiento final de los productos con diclorometano, donde se obtuvieron tan solo 140 mg de crudo de reacción que al analizarse por $^1\text{H-RMN}$ confirmaron esta relación entre los compuestos. Por otra parte, se liofilizó el medio acuoso luego de la extracción y el sólido obtenido se analizó también por $^1\text{H-RMN}$, pero no se detectó sustrato, productos u otras especies relacionadas.

Lo inesperado de los resultados radica principalmente en dos factores, **i)** no se logra reproducir la conversión del entorno de 40 % obtenida en los ensayos previos, sino que se obtiene un 12-15 % de conversión hacia la sultama; **ii)** se recupera tan solo un 28 % de la masa total agregada tras la extracción exhaustiva del medio de reacción y de la biomasa. En base al perfil obtenido para la sultama, donde se observa una disminución drástica de su concentración a medida que avanza la biotransformación, se propone que la misma puede estar siendo destruida por algún componente del medio de cultivo, o algún componente celular, transformándolo en un producto no aislable. Se decidió entonces, llevar a cabo otros experimentos que permitieran determinar la causa de estos fenómenos.

Dado que los experimentos previos fueron realizados en buffer fosfato con células crecidas en LB, y en el biorreactor se utiliza un medio rico en ácido cítrico y citrato férrico (a partir de ahora llamado medio citrato), se evaluó el potencial impacto de este medio sobre la biotransformación y la sultama producida. Para esto, se tomaron células crecidas en el fermentador, se lavaron con el buffer de reacción y se resuspendieron en el mismo para alcanzar una $OD_{600} = 60$. Con estas células se llevó a cabo la reacción en balón conteniendo 50 mL de volumen total con 5 mM de sustrato bajo atmósfera de argón (**experimento 2**). El análisis por HPLC tras la extracción con diclorometano indicó un 13 % de conversión hacia la sultama, 2 % de sustrato remanente y un 1 % de sulfonamida, lo cual refleja nuevamente una pérdida de masa en el proceso. Así se pudo concluir que no es el medio de reacción el que impacta negativamente en el transcurso de esta, sino que *el biocatalizador presenta un comportamiento muy diferente en la biotransformación dependiendo de si es crecido en LB a escala de matraz o en el medio citrato a escala de biorreactor.*

Para confirmar esto, se realizó el crecimiento de *E. coli* JM109 (DE3) (pDTG141) y la expresión enzimática en LB a escala de matraz, mismas condiciones utilizadas para las reacciones en pequeña escala. Se utilizaron 50 mL de suspensión celular en buffer con una densidad óptica de 60 y 5 mM de sustrato (**experimento 3A**), resultando en un 37 % de conversión hacia la sultama, 2 % hacia la sulfonamida y recuperando un 52 % de sustrato, lo cual representa más de un 90 % de recuperación de la masa agregada. En otro experimento similar se

realizó el seguimiento de la reacción en estas condiciones tomando muestras cada 10 minutos durante 3 horas (**experimento 3B**, Figura 64) lo cual permite observar una velocidad de formación de producto constante en el rango evaluado y una conversión final de 40 %. Por lo tanto, se puede afirmar que cuando las células son crecidas en estas condiciones no ocurre ningún tipo de descomposición del sustrato ni del producto durante la biotransformación llevada a cabo en buffer fosfato.

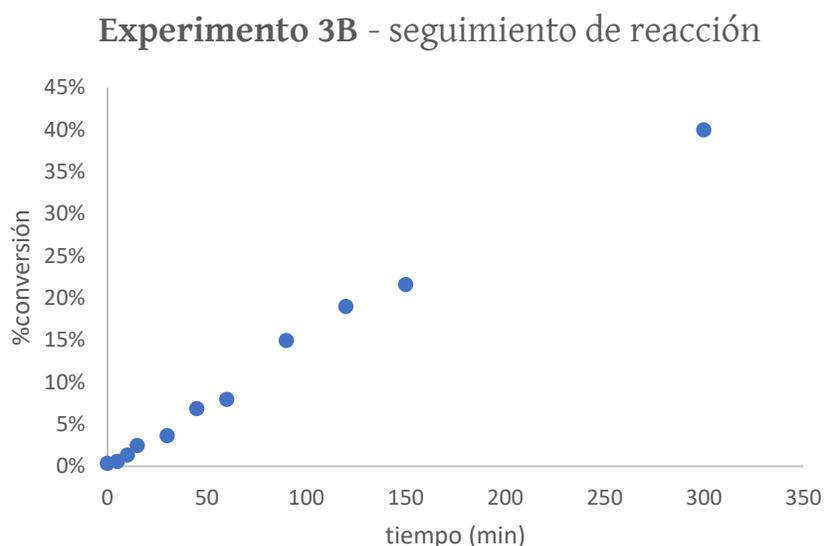


Figura 64: Perfil de biotransformación de TISA en balón con células crecidas en LB.

Los resultados obtenidos de estos experimentos se resumen en la Tabla 8 para su mejor comparación. Al comparar las conversiones obtenidas con las reportadas por Fasan se observa que son del mismo orden, salvo que en sus experimentos de escalado se utilizan 30 mg de sustrato y 400 mM de enzima FL#62,¹⁰⁰ mientras que en nuestro proceso se agrega 1 gramo de sustrato utilizando altas densidades celulares de biocatalizador.

Tabla 8: Comparación de los diferentes experimentos de escalado con TISA.

<i>Exp.</i>	<i>Medio de crecimiento</i>	<i>Medio de reacción</i>	<i>Conc. Sustrato (mM)</i>	<i>% conv. Sultama</i>	<i>% conv. Sulfonamida</i>	<i>% sustrato remanente</i>	<i>% masa recuperada</i>
1	Citrato	Citrato	3	13	10	5	28
2	Citrato	Buffer pH 7.2	5	13	1	2	16
3A	LB	Buffer pH 7.2	5	37	2	52	91
3B	LB	Buffer pH 7.2	5	40	4	50	94

Estos resultados permiten visualizar la pérdida de masa que ocurre al realizar el crecimiento de las células en biorreactor, incluso cuando se cambia el medio para la reacción. Por lo tanto, la diferencia podría radicarse en alguna enzima con preferencia por la sultama producida, que se sobreexpresa o que sea más activa durante el crecimiento en el medio del biorreactor donde se alcanzan altas densidades celulares ($OD_{600} = 80$), que en el matraz con LB donde las densidades celulares alcanzadas son mucho más bajas ($OD_{600} = 2$). Considerando la estructura de la sultama **42a** formada y las posibles enzimas que podrían aceptarla como sustrato surgió la hipótesis de que **42a** podría estar actuando como un inhibidor de β -lactamasas, presentes en nuestro biocatalizador (confiriéndole resistencia a ampicilina), las cuales además podrían ser sobreexpresadas en cultivos de alta densidad de bacterias. La resistencia a antibióticos β -lactámicos desarrollada por múltiples cepas bacterianas Gram negativas se relaciona con la producción de β -lactamasas, por lo cual se ha trabajado en el desarrollo de inhibidores de estas enzimas que en general se administran junto al antibiótico beta lactámico.¹¹⁶ Las β -lactamasas pueden clasificarse de distintas formas pero se distinguen dos grandes grupos: las *serin- β -lactamasas* y las *metalo- β -lactamasas*, según se encuentre en sus sitio catalítico un residuo de serina o un átomo de Zn^{2+} respectivamente. Las β -lactamasas codificadas en los plásmidos utilizados en este trabajo que proporcionan resistencia a ampicilina a las cepas de *E. coli*, pertenecen al primer grupo y se ubican en el espacio periplásmico de la célula con un

mecanismo de que acción involucra la formación de un intermediario acil-enzima para la hidrólisis del enlace C-N de la lactama, de acuerdo al mecanismo que se muestra en la Figura 65.¹¹⁷

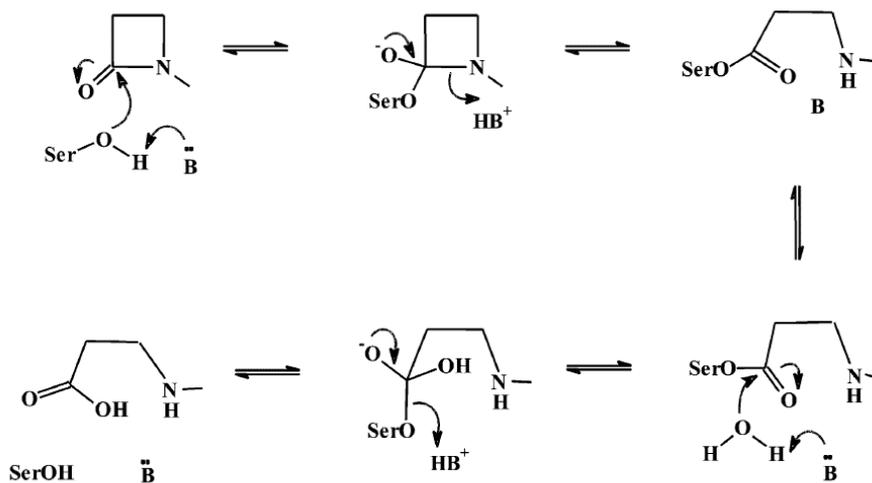


Figura 65: Hidrólisis de β-lactama en el sitio activo de serin-β-lactamasas. Tomado de Page M. I. *et al.* 2003.¹¹⁷

En la búsqueda de inhibidores de estas enzimas se han desarrollado análogos estructurales de sus sustratos naturales como son las β-sultamas y las β-fosfolactamas, los cuales a través de la sulfonylación y fosforilación respectivamente del residuo catalítico de serina inhiben irreversiblemente a la enzima.¹¹⁸⁻¹²⁰ Estudios del mecanismo de sulfonylación sugieren que este no ocurre en etapas como la hidrólisis de β-lactamas sino que se trata de un mecanismo concertado (Figura 66), siendo de especial importancia que el residuo de serina de la enzima queda covalentemente unido a la sultama.¹¹⁸

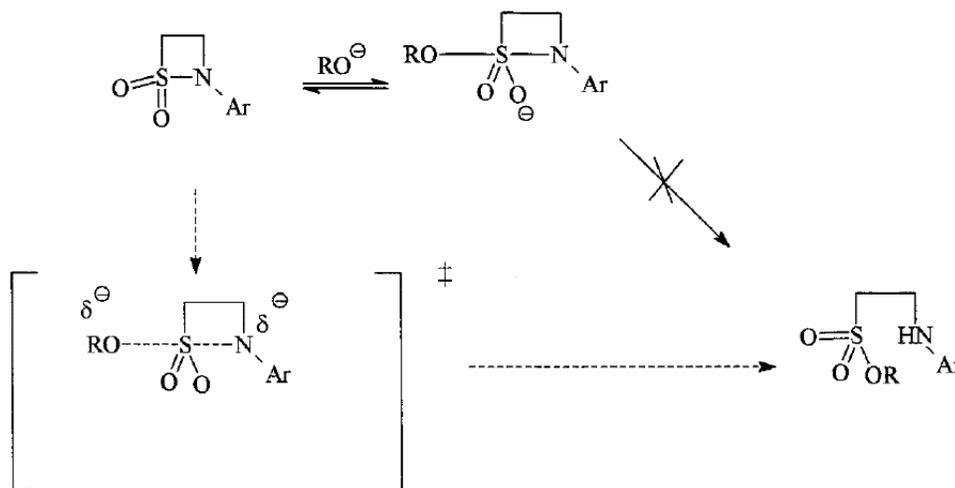


Figura 66: Mecanismo de hidrólisis de β -sultamas. Adaptado de Page, M. I.; Laws, A. P. 2000.¹¹⁸

En busca de confirmar esta teoría evaluamos añadir otro inhibidor de β -lactamasas al biorreactor justo antes del agregado de sustrato o sustituir el gen de resistencia a ampicilina por resistencia a otro tipo de antibióticos no β -lactámicos. Para esto se sustituyó el gen de resistencia a ampicilina presente en el plásmido pDTG141, por el gen de resistencia a kanamicina proveniente del vector pET28b mediante la técnica de *Restriction Free Cloning*. Resta ensayar este nuevo biocatalizador en las condiciones del biorreactor y realizar el seguimiento de la biotransformación de la misma forma que se describió anteriormente para poder concluir si efectivamente el problema de la pérdida de masa está relacionado con la concentración de β -lactamasas. Esto podría explicar la causa de que en nuestro ensayo en biorreactor no se recupere la masa en la biotransformación de TISA, ya que la sultama podría quedar unida covalentemente a estas enzimas.

II.3.2 Ensayos con las subunidades α y β de la oxigenasa de NDO purificadas

Se propuso la purificación de la oxigenasa de NDO para realizar ensayos con enzima aislada, de forma de determinar los *total turnover numbers* (TTN) para la biotransformación de TISA y compararla con las hemoproteínas reportadas. A su vez, esto también permitirá independizarse de diversos factores presentes en la biotransformación con célula entera como ser la toxicidad de sustrato y producto, fenómenos de difusión para entrada y salida de la célula, y reacciones colaterales de otras enzimas presentes.

Dado que las dioxigenasas tipo Rieske son sistemas multicomponente formados por las subunidades α y β de la dioxigenasa, una ferredoxina y una ferredoxin-reductasa, su purificación es bastante compleja y en general no ha sido muy estudiada salvo por Parales y Gibson cuando reportaron inicialmente esta enzima.^{54,121} Sin embargo, según nuestra propuesta mecanística y las características de la enzima (Figura 57), no se requeriría la reducción del hierro ya que el Fe^{II} se regenera al final del ciclo catalítico y por tanto las subunidades ferredoxina y ferredoxin-reductasa no serían necesarias. A partir de esto se decidió purificar las subunidades α y β de la dioxigenasa que se encuentran ya clonadas en el vector pDTG121¹²¹ y en base a un reciente reporte donde se purifican las subunidades de TDO⁷⁸ se procedió a insertar una cola de histidinas en dicho plásmido para posteriormente purificar la dioxigenasa por cromatografía de afinidad utilizando una resina de níquel. Mediante una modificación de la técnica de *Restriction Free Cloning* que habitualmente utilizamos, se logró insertar en el extremo N-terminal la cola de seis histidinas (*ver Materiales y Métodos*) y se realizó la purificación de la enzima siguiendo el procedimiento descrito por Yang y colaboradores.⁷⁸

En un primer intento no se logró la purificación completa de ambas subunidades (Figura 67). Posiblemente, esto mejoraría utilizando un gradiente de imidazol en la purificación, ya fuera con más pasos de lavado de la columna previo a la elución o utilizando un equipo de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). Por otra parte, la cantidad de enzima obtenida no fue

suficiente para la evaluación de la actividad, por lo cual a partir de estos resultados sería necesario realizar un nuevo experimento con mayor volumen de cultivo y nuevas condiciones de purificación que permitan alcanzar este objetivo.

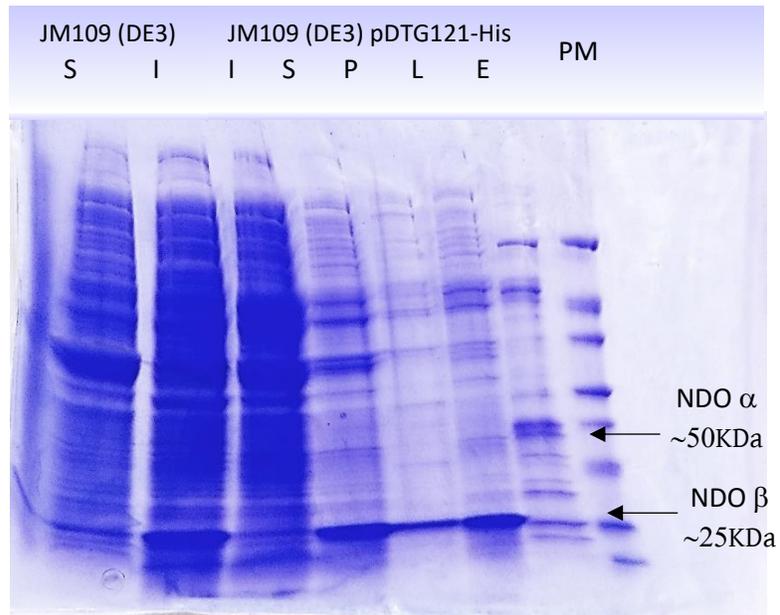


Figura 67: Imagen del gel SDS-Page del proceso de purificación de subunidades α y β de la dioxigenasa de NDO. Se incluyó además el lisado del control *E. coli* JM109 (DE3). S: fracción soluble, N: fracción insoluble, P: percolado, L: lavado, E: eluido, PM: marcador de peso molecular.

II.3.4 Otras reacciones de funcionalización C-H

Dados los resultados obtenidos con las arilsulfonilazidas, se decidió expandir el estudio a otras reacciones de funcionalización C-H. Durante la pasantía realizada en la Universidad de Rochester, bajo la dirección del Dr. Rudi Fasan, se probaron todos los biocatalizadores frente a distintos sustratos en reacciones de aminación intra- e intermoleculares, y también en la formación de enlaces C-C como forma de probar si es posible la formación de carbenos en el sitio activo de estas enzimas.

II.3.4.1 Reacciones intramoleculares: formación de oxazolidinonas

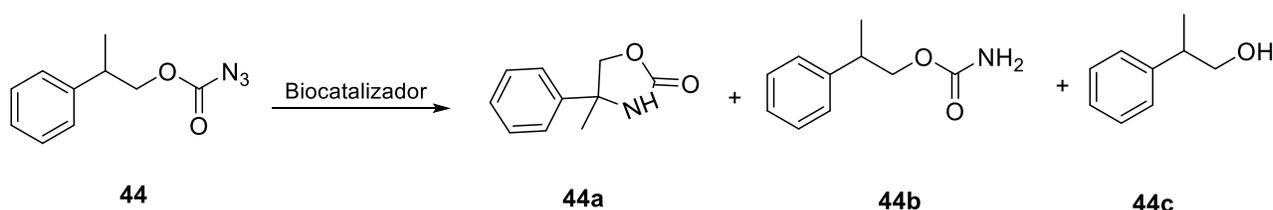


Figura 68: Reacciones de aminación intramolecular utilizando carbazidas para la formación de oxazolidinonas.

Tabla 9: Resultados de la reacción con carbazidas utilizando $OD_{600}=30$. Conversión calculada para la oxazolidinona obtenida.

Biocatalizador	Conversión %	
	$OD_{600}=30$	$OD_{600}=60$
<i>pKK223-3 control</i>	ND	<1
<i>TDO WT</i>	ND	NC
<i>TDO I324F</i>	<0.5	<1
<i>TDO T365N</i>	ND	NC
<i>TDO Q215A</i>	<0.5	<1
<i>TDO F366V</i>	<0.5	<1
<i>CDO</i>	ND	NC
<i>NDO</i>	ND	NC

*ND: No detectado. NC: No corresponde / No ensayado.

Para la obtención de **oxazolidinonas** las conversiones fueron menores al 1 % en todos los casos. En general, las conversiones reportadas por Fasan y colaboradores con P450 para estas reacciones no son demasiado altas, siendo del orden de 20 TON para el sustrato ensayado en la Figura 68 con su mejor variante de CYP102A1, FL#62, que tras un proceso de optimización alcanza 70 *turnovers* y un rendimiento de 4 % y solo es superado al utilizar el sustrato *p*-metil-sustituido alcanzando 100 TON.¹⁰⁵ Un factor determinante para esta reacción es el posicionamiento del sustrato, ya que la cadena debe plegarse de forma tal que el nitreno y el carbono a funcionalizar queden enfrentados para la formación del nuevo enlace, si esto no ocurre la reacción no tendrá lugar; esta hipótesis podría verificarse mediante estudios de *docking* para poder observar la orientación del sustrato en el sitio activo. Por otra parte, es importante resaltar que en todos los casos se observó la formación del carbamato correspondiente (**44b**), lo cual evidencia la formación del nitreno en el sitio activo.¹⁰⁵

II.3.3.2 Reacciones intermoleculares: formación de sulfimidas.

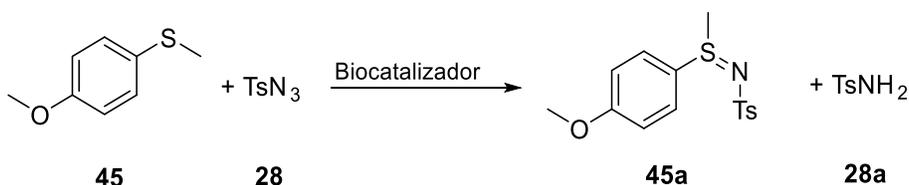


Figura 69: Reacción de sulfimidación intermolecular

Tabla 10: Resultados de la reacción de sulfimidación con OD₆₀₀= 30. Conversión calculada para la sulfimida.

Biocatalizador	Conversion %
pKK223-3 control	ND
TDO WT	ND
TDO I324F	<0.5
TDO T365N	<0.5
TDO Q215A	<1
TDO F366V	<0.5
CDO	<0.5
NDO	<1

Las reacciones de **sulfimidación** implican un desafío aún mayor por ser intermoleculares y por lo tanto es necesario que dos moléculas voluminosas accedan al sitio activo simultáneamente y se posicionen de manera adecuada, lo cual puede ser una explicación a las bajas conversiones observadas.

Según los trabajos reportados por el grupo de Arnold, no cualquier dador de nitreno es útil para esta transformación, siendo la tosilazida el único que permitió la sulfimidación con citocromos P450.¹⁰⁶ Además, un camino no productivo lleva a la formación de la tosilamida **28a**, observándose que cuanto menos reactivo es el sulfuro utilizado mayor es la cantidad obtenida de este producto secundario, y la cantidad de este último disminuye con una adición lenta de la azida.

De todo esto se desprende que si se desean utilizar las dioxigenasas tipo Rieske para catalizar reacciones de sulfimidación es necesario un estudio independiente y más profundo en cuanto a los sustratos utilizados y el compromiso entre su reactividad, cantidad utilizada y modo de agregado. El modelado de la enzima y *docking* de los sustratos sería indispensable para estudiar la disposición de ambos en el sitio activo, así como las interacciones que éstos tienen con los aminoácidos que lo rodean para diseñar variantes que permitan favorecer la reacción. Probablemente se requiera una evolución dirigida a incrementar esta actividad, recordando que en el caso de los citocromos aquellos que fueron muy activos en reacciones de aminación intramolecular no lo fueron para este tipo de reacciones intermoleculares.

II.3.3.3 Reacciones intermoleculares: formación de aziridinas.

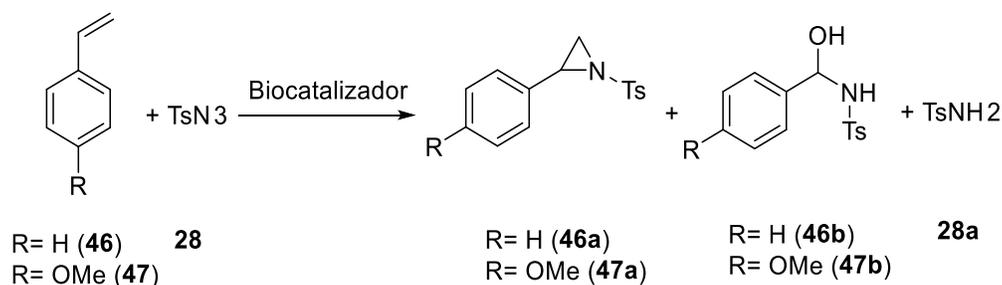


Figura 70: Reacción de aziridinación intermolecular.

Tabla 11: Resultados de la reacción de aziridinación utilizando $OD_{600} = 30$. Conversión calculada para la aziridina.

Biocatalizador	Conversión %	
	R= H	R= OMe
<i>pKK223-3 control</i>	ND	ND
<i>TDO WT</i>	<1	NC
<i>TDO I324F</i>	<0.5	NC
<i>TDO T365N</i>	2	4
<i>TDO Q215A</i>	1	1
<i>TDO F366V</i>	<1	NC
<i>CDO</i>	ND	NC
<i>NDO</i>	4	6

ND: No detectado. NC: No corresponde/No ensayado

Tras un screening inicial la formación de **aziridinas** a partir de estireno parecía promisoría, sobre todo teniendo en cuenta las conversiones observadas para la Naftaleno Dioxigenasa que alcanzaron un 4 % seguida por TDO T365N con una conversión del 2 %. Sin embargo, estos resultados no fueron reproducibles en experimentos posteriores, por lo cual se requiere un estudio en mayor profundidad.

Esta transformación resulta muy interesante teniendo en cuenta que, según lo reportado por el grupo de Arnold es una de las reacciones más desafiantes, e incluso el mejor biocatalizador desarrollado para las reacciones de sulfimidación (P411_{BM3}-CIS-T438S) casi no mostró actividad para la aziridinación, por lo cual fue sometido a un exhaustivo trabajo de evolución dirigida con diferentes rondas de mutagénesis abarcando diferentes posiciones, desarrollándose una variante adecuada para catalizar esta reacción. Además, en este caso no se observó relación entre las características electrónicas del arilo y la productividad como se había determinado para la sulfimidación, pero sí un cambio en la estabilidad del producto obtenido, encontrándose el alcohol (**47b**) por apertura de la aziridina en medio acuoso únicamente al utilizar *p*-metoxiestireno como sustrato.¹⁰⁷ Este compuesto (R= OMe) también fue ensayado con aquellos biocatalizadores que mostraron conversión para el estireno, destacándose nuevamente TDO T365N y NDO. En ambos casos se detectó nuevamente la presencia de tosilamida como producto, formado a partir del nitreno correspondiente.

Dado el alto interés en una alternativa a los métodos convencionales para esta reacción en síntesis orgánica, parece interesante continuar el estudio de estas reacciones con mayor profundidad.

II.3.3.4 Reacciones intermoleculares: formación de ciclopropanos

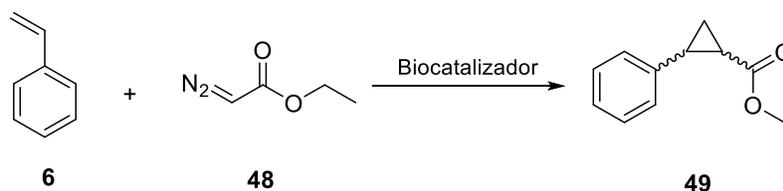


Figura 71: Reacción de ciclopropanación mediante la formación de carbenos.

Tabla 12: Resultados de la reacción de ciclopropanación utilizando $OD_{600}=30$.

Biocatalizador	Conversión %	% <i>ee</i> _{trans}	% <i>de</i>	Condiciones
pKK223-3	<0.5	18	100	OD ₆₀₀ =60 estireno 10 mM, EDA 20 mM, anaerobiosis, (overnight, RT, 60rpm)
TDO WT	1	13	60	
TDO I324F	1	11	79	
TDO T365N	<0.5	29	100	
TDO Q215A	<1	13	70	
TDO F366V	1	10	69	
CDO	1.5	13	70	
NDO	2.5	20	70	

%*ee* trans: $[(\text{trans } S,S - \text{trans } R,R)/(\text{trans } S,S + \text{trans } R,R)] * 100$ %*de* : $[(\text{trans total} - \text{cis total})/(\text{trans} + \text{cis})] * 100$

La reacción de **ciclopropanación** también intermolecular, vuelve a dar conversiones muy bajas donde NDO y CDO se destacan por mostrar valores cercanos al 2 % y podría ser interesante estudiarlas en mayor profundidad. De todas formas, teniendo en cuenta la propuesta sobre el posicionamiento de los sustratos en los sistemas conteniendo grupos hemo descrito en antecedentes,¹⁰⁹ y el posicionamiento de los anillos aromáticos en las dioxigenasas observados en nuestro modelo computacional para TDO y según lo reportado para NDO, parece difícil que la interacción carbeno – olefina se dé de manera adecuada, lo cual podría explicar los bajos rendimientos observados en el *screening*.

A modo general se puede decir que los resultados obtenidos en los diferentes tipos de reacciones demuestran que las dioxigenasas estudiadas son capaces, en principio, de catalizar la formación de enlaces C-N y C-C a través de la formación de nitrenos y carbenos en su sitio activo con rendimientos que varían según el biocatalizador y el sustrato utilizado. Estas actividades no han sido descritas hasta el momento como actividad natural de ninguna enzima, sino que se requieren diversas modificaciones para la construcción de biocatalizadores capaces de llevar a cabo estas transformaciones, por lo cual los bajos rendimientos son resultados interesantes que pueden ser mejorados mediante técnicas de mutagénesis.

3. Conclusiones y Perspectivas

El objetivo principal de este trabajo era desarrollar y caracterizar biocatalizadores que expresen dioxigenasas tipo Rieske para su uso en procedimientos sintéticos de funcionalización directa de compuestos orgánicos. En este sentido, se desarrollaron cuatro variantes de TDO: Q215A, I324F, T365N y F366V, los cuales han permitido evaluar el rol de los aminoácidos en estas posiciones, observando alteraciones principalmente en cuanto a la quimio- y estereoselectividad de la enzima para la dihidroxilación de arenos. Sin embargo, estos efectos fueron altamente dependientes del sustrato utilizado, lo cual concuerda con la literatura existente para los residuos análogos a estas posiciones en NDO y BPDO, y de los cuales se desprende además, la necesidad de combinar distintas mutaciones para generar cambios importantes.

Los cambios a nivel de la quimioselectividad de la dioxigenación en algunos de los mutantes estudiados, permitieron la obtención de un único producto de biotransformación con sustratos que al ser transformados por la enzima nativa rinden una mezcla de productos, mientras que frente a otros sustratos se ha invertido la relación en que ambos se obtienen. Por ejemplo frente al estireno, mientras que la enzima nativa produce 8 veces más de **6a** que **6b**, el mutante T365N rinde mayoritariamente el diol en la cadena lateral (casi 4 veces más de **6b** que **6a**), siendo este compuesto de interés en reacciones en cascada reportadas recientemente.¹¹

Por otra parte, la variante TDO-F366V mostró una marcada pérdida de actividad frente a la mayoría de los sustratos evaluados, acompañada de un cambio en la estereoselectividad de la enzima. Esto permitió encontrar los enantiómeros de los dienodios producidos habitualmente por la enzima nativa al utilizar bromobenceno e indeno, lo cual resulta muy interesante ya que para el bromobenceno no se ha descrito la obtención enzimática directa de este estereoisómero.

Si bien no se observaron cambios en la regioselectividad de la reacción de dihidroxilación, los resultados obtenidos durante esta tesis permiten replantear las estrategias para su obtención, considerando la posible combinación de variantes y el uso del modelo

computacional como herramienta para realizar estos cambios. Además, teniendo en cuenta la dependencia de los efectos de las mutaciones con los sustratos utilizados, sería interesante utilizar sustratos más voluminosos como el bifenilo o el naftaleno, ya que de los reportes para NDO y BPDO se desprende que los cambios más significativos se observan al utilizar sustratos de mayor tamaño.

En el transcurso de esta tesis se desarrolló el primer modelo computacional del sistema enzimático TDO, lo cual permitió comprender aún mejor los efectos observados con los mutantes, la arquitectura del sitio activo y las interacciones que se establecen con los diferentes sustratos. A pesar de que la tolueno dioxigenasa ha sido utilizada por más de treinta años para la producción de *cis*-ciclohexadienodiol que sirven como material de partida en síntesis orgánica, previo a esta tesis eran pocos los estudios en cuanto a su sitio activo y la relación de los distintos residuos que lo constituyen con la selectividad de la enzima. El modelo computacional desarrollado, constituye una herramienta fundamental para trabajos futuros en esta área. Actualmente estamos estudiando los detalles del mecanismo de acción desconocido hasta el momento, respecto al cual se obtuvo evidencia experimental de la implicancia de la glutamina en 215 en la formación de la especie reactiva del oxígeno. En base a esto, sería importante aprovechar el modelo computacional desarrollado y analizar los efectos de combinar diferentes mutaciones, ya sea en las posiciones estudiadas en este trabajo u otras, siendo de gran utilidad para la identificación de residuos que puedan ser relevantes para el posicionamiento de los sustratos en el sitio activo. Particularmente resultaría interesante a futuro la construcción de bibliotecas de mutantes en la posición 366 en busca de nuevas variantes que sean capaces de dihidroxilar bromobenceno con la enantioselectividad opuesta a la de la enzima nativa, ya que el dienodiol correspondiente constituye uno de los productos más utilizados sintéticamente, y que la variante F366V permitió la obtención de pequeñas cantidades del enantiómero de este compuesto.

Por otra parte, el trabajo con otros sistemas enzimáticos, como la benzoato dioxigenasa, permitió la obtención de dioles *ipso-cis*-1,2 en escala de biorreactor con buenos rendimientos; en tanto que se dispone también del sistema naftaleno dioxigenasa que permite la dihidroxilación

de sustratos policíclicos. En cuanto a la clorobenceno dioxigenasa, se construyó un sistema de expresión análogo al de TDO, buscando abarcar un mayor rango de sustratos. Sin embargo, este no ha mostrado buenos niveles de actividad frente a los distintos sustratos ensayados lo cual concuerda con lo reportado hasta el momento en la literatura. Dado que el análisis de las secuencias de los genes *tcbAaAb* que codifican para la dioxigenasa de CDO no muestran alteraciones, sería importante estudiar si existe algún inconveniente en los genes que codifican para la ferredoxina y la reductasa que puedan estar afectando la actividad, o podrían combinarse la dioxigenasa de CDO con la ferredoxina y la reductasa de TDO, sustituyendo los genes correspondientes en el pDTG601, asegurando así la obtención de un sistema análogo al de TDO para el cual el crecimiento y biotransformación en biorreactor fueron optimizados. De obtener un sistema funcional se podría realizar una caracterización de esta enzima frente a diferentes sustratos y ampliar así la variedad de sintones quirales asequibles por esta metodología.

En cuanto al trabajo que dio origen al segundo capítulo de esta tesis, se destaca el descubrimiento de nuevas actividades para las dioxigenasas tipo Rieske. El encontrar el diol del benzonitrilo como producto de biotransformación de la bencilazida constituyó el punto de partida para el estudio de nuevas actividades. En el mecanismo propuesto para dicha transformación se evidencia que TDO posee actividad aldoxima deshidratasa, la cual sería interesante continuar estudiando frente a otros sustratos ya que no ha sido reportada para este tipo de enzimas.

A su vez, dicho mecanismo propone la formación de especies Fe-nitreno en el sitio activo, lo cual impulsó el estudio de reacciones de aminación directa de enlaces $C(sp^3)-H$. A raíz de los resultados obtenidos, se puede decir que las dioxigenasas tipo Rieske son capaces de catalizar este tipo de reacciones al utilizar arilsulfonilazidas trisustituidas como sustratos para producir las correspondientes sultamas, lo cual constituye el primer trabajo donde se describe tal actividad para esta familia de enzimas. Particularmente se observó que el mejor sustrato es aquel con sustituyentes isopropilo, lo cual era esperable ya que la inserción del nitreno ocurre en un carbono terciario con un enlace C-H más susceptible a una ruptura homolítica que el correspondiente en carbonos secundarios o primarios. El análisis de los diferentes sistemas

enzimáticos frente a diferentes concentraciones de sustrato permite afirmar que la naftaleno dioxigenasa es capaz de catalizar estas reacciones con conversiones del orden de 40 % al utilizar 5 y 10 mM de sustrato obteniendo tan solo un 5 % del producto secundario de reacción.

Por otra parte, se estudió el escalado de la reacción observando que las condiciones de crecimiento del biocatalizador tienen un gran impacto en la reacción posterior. Tras el crecimiento en escala de matraz utilizando LB como medio de cultivo, y realizando la reacción con células en reposo ($OD_{600} = 60$) en 50 mL, se obtuvieron conversiones del mismo orden que a pequeña escala. En cambio, al producir cultivos de alta densidad en biorreactor para la producción de células y utilizarlas para la reacción en iguales condiciones, la conversión fue de sólo 13 %. A su vez, esta también fue la conversión obtenida al agregar el sustrato en el biorreactor, donde además no se recupera la masa total de sustrato agregada. Actualmente estamos trabajando para determinar la causa de este fenómeno e intentando purificar la dioxigenasa de NDO para poder evaluar su actividad catalítica y compararla con los citocromos reportados.

Resulta interesante notar además, que la CDO fue el segundo sistema que mostró buenas conversiones en este tipo de reacciones. Considerando la hipótesis de una falla en su sistema de transporte de electrones que no permite la dihidroxilación de arenos, podría suponerse que esta parte de la enzima no es necesaria para la descomposición de azidas a nitrenos y su inserción en enlaces C-H, sino que el Fe(II) se regeneraría al final del ciclo catalítico, haciendo aún más interesante su aplicación en este tipo de reacciones.

Todas las dioxigenasas incluidas en este trabajo se estudiaron también en otras reacciones de aminación intra e intermoleculares, donde se observaron trazas de algunos de los productos obteniéndose mayoritariamente los productos secundarios de las reacciones, que si bien indican la formación de los nitrenos correspondientes estos no se insertan en los enlaces C-H deseados. Una posible explicación a esto es que, en reacciones intermoleculares no sea posible que dos sustratos tan voluminosos ingresen al sitio activo, o que dentro del mismo no se posicionen de manera adecuada para que ocurra la reacción. De todas formas, dado que en esta

tesis se han construido diferentes bibliotecas de mutantes para NDO, sería importante a futuro ensayar estas variantes con los diferentes sustratos y evaluar si alguna de ellas es capaz de catalizar estas reacciones por un posicionamiento del sustrato más favorable. A su vez, sería interesante evaluarlas en reacciones de dihidroxilación y determinar si estos biocatalizadores permiten obtener regio- y/o estereoisómeros de los dioles obtenidos con la enzima nativa.

En resumen, el trabajo desarrollado durante esta tesis ha contribuido a un mejor entendimiento de los sistemas enzimáticos en estudio: TDO, NDO, CDO y BzDO. Las variantes de TDO construidas han permitido identificar posiciones importantes para alterar la quimio y estereoselectividad de la enzima y acceder a los enantiómeros de algunos compuestos producidos por la enzima nativa. A su vez, se ha desarrollado un modelo computacional para este sistema enzimático que constituye una herramienta fundamental para trabajos a futuro que busquen alcanzar los objetivos sintéticos aún no logrados. Por otra parte, se han descubierto actividades promiscuas para esta familia de dioxigenasas como la deshidratación de oximas y la posibilidad de catalizar la aminación directa de enlaces C-H a través de la descomposición de azidas a nitrenos, destacándose para esta última los resultados obtenidos con NDO. Además, se han construido bibliotecas de mutantes de esta enzima que están disponibles tanto para el estudio de nuevas reacciones, como para la evaluación de la regio- y enantioselectividad de la reacción de dihidroxilación.

5. Materiales y Métodos

5.1 Métodos microbiológicos y moleculares

5.1.1 *Medios de cultivo y reactivos*

Triptona, extracto de levadura y agar para la preparación de medios de cultivo fueron adquiridos de Difco. La ampicilina, IPTG, sales, glucosa y otros componentes de los medios de cultivo se adquirieron de Sigma-Aldrich y Droguería Industrial Uruguaya.

Todas las enzimas fueron obtenidas de Thermo Scientific™ o New England Biolabs: polimerasa de alta fidelidad Phusion™, *DpnI*, *HindIII* y sus correspondientes buffers, RNAsa, lizosima y proteinasa K; al igual que los dNTPs y los marcadores de peso molecular de proteínas. Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados por la empresa Macrogen, Korea, donde también se realizó la secuenciación de las diferentes construcciones, mientras que los utilizados para generar los mutantes de NDO fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies) y la secuenciación fue realizada en Genewiz, Rochester, USA. Se utilizó agarosa (Sigma-Aldrich) para las corridas electroforéticas y se empleó buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X. Los geles se tiñeron con gel-red. Se utilizó gene Ruler 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) como marcador de peso molecular y estándar de cuantificación de ADN.

Medio Luria Bertani (LB): triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L. Se agregó agar (15 g/L) para la preparación de medio sólido y se suplementó con ampicilina (0.1 g/L) cuando fue necesario.

Medio L-broth para competentes: triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L y agua destilada c.s.p. 1 L.

Medio SOB: triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0.5 g/L y agua destilada c.s.p. 1 L, el cual se suplementó con MgSO₄ y MgCl₂ ambos en una concentración final de 10 mM, para preparar SOC.

Medio 2xYT: triptona 16 g/L, extracto de levadura 10 g/L, NaCl 5 g/L, H₂O c.s.p 1 L, ajustar pH 7.0 con NaOH 5 N.

Medio para precultivos biorreactor: K₂HPO₄ (16 g/L), KH₂PO₄ (14 g/L), (NH₄)₂SO₄ (5 g/L), extracto de levadura (15 g/L). Luego de esterilizado el medio es suplementado con solución de glucosa estéril (0.7 g/mL) para obtener una concentración final de 30 g/L, MgSO₄·7H₂O (2 g/L) y ampicilina (0.1 g/L).

Medio citrato para biorreactor: KH₂PO₄ (7.5 g/L), ácido cítrico (2.0 g/L), MgSO₄·7H₂O (5.0 g/L), citrato férrico amoniacal (0.3 g/L), 98 % H₂SO₄ (1.4 mL/L) y solución de metales traza (1.5 mL/L). Luego de esterilizar el biorreactor con el medio, se regula el pH a 6.8 mediante la adición de NH₄OH, y se adiciona tiamina estéril (0.3 g/L) y ampicilina (0.1 g/L). La solución de metales traza contiene: ácido cítrico (40 g/L), MnSO₄·2H₂O (30 g/L), NaCl (10 g/L), FeSO₄·7H₂O (1 g/L), CoCl₂·6H₂O (1 g/L), ZnSO₄·7H₂O (1 g/L), CuSO₄·5H₂O (0.1 g/L), H₃BO₃ (0.1 g/L), NaMoO₄·2H₂O (0.1 g/L); el pH se ajustó a 3.0 con NH₄OH.

Medio LB II: triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L), CaCl₂·2H₂O (1 g/L), MgCl₂ (0.05 g/L). Para preparar medio sólido se agregó agar (15 g/L).

Medio para crecimiento en biorreactor de *R. eutropha* B9: KOH (0.4 g/L), ácido nitriloacético (0.2 g/L), MgSO₄ (0.28 g/L), CaCl₂·2H₂O (0.07 g/L), NH₄Mo₂O₂₄·6H₂O (0.2 mg/L), FeSO₄ (2 mg/L), solución de metales Hutner* (1 mL/L), NH₄SO₄ (1 g/L), KH₂PO₄ (2.72 g/L), Na₂HPO₄ (2.84 g/L). La solución de metales Hutner contiene: EDTA (5 g/L), ZnSO₄·7H₂O (22 g/L), FeSO₄·7H₂O (10 g/L), CuSO₄ (3.9 g/L), CoNO₃·6H₂O (0.5 g/L), NaBO₃·10H₂O (0.36 g/L), H₂SO₄ (1 mL/L), H₂O csp 1 L.

Solución TFB1: 30 mM Acetato de potasio, 10 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 15 % (v/v) glicerol, ajustar pH 5.8 con ácido acético.

Solución TFB2: 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % (v/v) glicerol, pH 6.5 ajustado con HCl.

Buffer de lisis: 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.3 M NaCl, 20 % v/v glicerol y 0.024 % 2-mercaptoetanol.

Buffer Wash I: 25 mM Tris pH 7.5, 0.5 M NaCl, 20 % glicerol, 15 mM imidazol.

Buffer Wash II: 25 mM Tris pH 7.5, 0.5 M NaCl, 20 % glicerol, 40 mM imidazol.

Buffer de Elución: 25 mM Tris pH 7.5, 0.3 M NaCl, 20 % glicerol, 0.3 M imidazol.

Buffer de Elución II: 25 mM Tris pH 7.5, 0.3 M NaCl, 20 % glicerol, 0.5 M imidazol.

Buffer de Diálisis: 25 mM Tris pH 7.5, 0.1 M NaCl, 20 % glicerol, 0.024 % v/v 2-mercaptoetanol.

Buffer M9: KH_2PO_4 (3 g/L), Na_2HPO_4 (12 g/L), NaCl (0.7 g/L), y suplementado con solución de glucosa 0.7 g/mL para lograr una concentración de 5.5 g/L.

Buffer *in-vivo*: Na_2HPO_4 (31 g/L), KH_2PO_4 (15 g/L), NaCl (2.5 g/L), MgSO_4 (0.24 g/L), CaCl_2 (0.01 g/L) y 1 mL/L de solución de micronutrientes, se ajusta el pH a 7.2. La solución de micronutrientes se compone de: $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{27}$ (0.19 g/L), H_3BO_3 (1.2 g/L), CoCl_2 (0.36 g/L), CuSO_4 (0.08 g/L), MnCl_2 (0.5 g/L), ZnSO_4 (0.07 g/L).

5.1.2 Vectores y cepas

La cepa de *Escherichia coli* JM09 (pDTG601) que expresa TDO fue generosamente donada a nuestro grupo por el Prof. David T. Gibson, al igual que el plásmido pDTG121 que contiene los genes de NDO-O. *Escherichia coli* JM109 (DE3) (pDTG141) expresando NDO fue amablemente cedida por la Prof. Rebecca Parales (University of California, Davis- USA) en tanto que la cepa sin transformar fue adquirida de Promega. Las cepas que expresan los genes de CDO, *Escherichia coli* DH5 α (pTCB144) y *Escherichia coli* JM101 (pTEZ30) fueron cedidas por el Prof. Andreas Schmid (University of Dortmund, Alemania). El vector pKK223-3 fue obtenido de Pharmacia. *Ralstonia eutropha* B9 fue amablemente donada por Prof. Andrew Myers (Harvard University - USA).

Tabla 13: Genotipos de las cepas de *Escherichia coli* utilizadas

Cepa	Genotipo
<i>E. coli</i> JM109	endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺), relA1, supE44, Δ (lac-proAB), [F' traD36, proAB, lacIqZΔM15]
<i>E. coli</i> JM109 DE3	endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺), relA1, supE44, λ ⁻ , Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIqZΔM15], lDE3
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rk ⁻ mk ⁺), λ ⁻
<i>E. coli</i> JM101	glnV44 thi-1 Δ(lac-proAB) F'[lacI ^q ZΔM15 traD36 proAB ⁺]

Tabla 14: Vectores utilizados

Nombre	Vector parental	Genes expresados	Referencias
pDTG601	pKK223-3	todC1C2BA	122
pDTG141	pT7-5	nahAaAbAcAd	123
pDTG121	pT7-5	nahAcAd	121
pTCB144	pUC19	tcbAaAbAcAd	66
pTEZ30	pSPZ2MA ¹²⁴	tcbAaAbAcAd	67
pKK_CDO	pKK223-3	tcbAaAbAcAd	Este trabajo

Se utilizaron técnicas estándar de microbiología para el manejo de todas las cepas. Para el crecimiento de rutina se utilizó el medio Luria Bertani (LB).

Para el mantenimiento a corto plazo se utilizaron placas de medio de cultivo sólido selladas con parafilm y se almacenaron a 4 °C. Para el mantenimiento a largo plazo las cepas se guardaron en freezer a -70 °C en medio conteniendo 15 % de glicerol.

5.1.3 Técnicas moleculares

En todos los procedimientos, salvo que se indique lo contrario, fueron utilizadas técnicas estándar de métodos moleculares descritos por Sambrook *et. al.*¹²⁵ para la manipulación de ADN y proteínas. Las digestiones con enzimas de restricción se llevaron a cabo según el protocolo indicado por el proveedor. Las amplificaciones por PCR se realizaron de acuerdo con las indicaciones del fabricante para el uso de las polimerasas termoestables y ciclos adecuados a cada caso en un termociclador GeneAMP PCR 2400 (Perkin-Elmer). Las transformaciones de células electrocompetentes se realizaron por electroporación utilizando un equipo BIORAD MicroPulser. Para la purificación de ADN obtenido por PCR se utilizó el *kit Freeze'n squeeze* (Bio-Rad, CA, USA).

Tabla 15: Oligonucleótidos utilizados para mutación sitio dirigida de TDO

<i>Sustitución</i>	<i>Secuencia primer Fw</i>	<i>Secuencia primer Rv</i>
Q215A	CGCAGAG GCG TTTTGCAGC	GCTGAAAC GC CCTCTGCG
I324F	TTCCTCCAGG TTT CAATACGGTCC	GGACCGTATTG AAA CCTGGGAGGAA
T365N	CAGACGCTGCGC AACT TCTCTGCC	CGGCAGAGAAG TTG CGCAGCGTCTG
F366V	CAGACGCTGCGCACCGT GTCT GCCG	CGGCAGACACGGT GCGCAG CGTCTG

Tabla 16: Oligonucleótidos utilizados para la creación de bibliotecas de NDO

<i>Posición</i>	<i>Primer Fw</i>	<i>Primer Rv</i>
201	CGCGGAAN H TTTTGTGGG	CCCACAAA A DNTTCCGCG
202	GCGGAAAAC N H T GTGGGAG	CTCCCAC A D N GTTTTCCGC
213	GGTTGGAC G T A GGCGTCTTCG	CGAAGAC G C C TACGTCCAACC
224	GGGAGTCTATC R N C T C GT C GC	GCGAC G A G N Y G A T A G A C T C C C
295	GGATTTATCGCAG C N H T CTCAACTGC	GCAGTT G A G A D N GCTGCGATAAA T C C
307	CAGCAT G N H TACCTGCTCGGGTG	CACCC G A G C A G G T A D N CATGCTG
352	CAGCGAAC G N H TGGGCCTGC	GCAGG C C C A D N CGTT C GCTG
358	GCTGGCT C N H T G AAAGCG	CGCTT T C A D N G A AGCCAGC

Tabla 17: Oligonucleótidos utilizados para mutagénesis sitio dirigida en NDO

Sustitución	Primer Fw	Primer Rv
F202V	GCGGAAAAC GTT GTGGGAG	CTCCCACA AAC GTTTTCCGC
F224V	GGGAGTCTATC GTCT CGTCCG	GCGACGAG AC GATAGACTCCC
F224T	GGGAGTCTATC ACCT CGTCCG	GCGACGAG GT GATAGACTCCC
F352T_ W358V	GCGAACG ACT GGGCCTGCTGGCTTC GTT GAA AGC	GCTTTC AAC GAAGCCAGCAGGCC AGTCG TTCGC
F352Y_ W358V	GCGAACG TAT GGGCCTGCTGGCTTC GTT GAA AGC	GCTTTC AAC GAAGCCAGCAGGCC CATACG TTCGC
F352T	CAGCGAACG ACT GGGCCTGC	GCAGGCC AGTC GTTCGCTG
F352Y	CAGCGAACG TAT GGGCCTGC	GCAGGCC CATAC GTTCGCTG
W358D	GCTGGCTTC GAT GAAAGCG	CGCTTTC ATC GAAGCCAGC
W358V	GCTGGCTTC GTT GAAAGCG	CGCTTTC AAC GAAGCCAGC

5.1.4 Preparación y transformación de células competentes

La preparación de **células electro-competentes** se realizó de acuerdo al protocolo de BioRad.¹²⁶

Para la transformación se descongelaron las alícuotas necesarias manteniéndolas constantemente en baño de hielo. Se agregó a cada tubo el ADN correspondiente, previamente precipitado con yeast t-RNA¹²⁷ para aumentar la eficiencia (1 µL en el caso de plásmidos puros y 5 µL en el caso de productos de PCR). La mezcla fue transferida a una celda de electroporación de 0.2 cm mantenida en hielo. La electroporación se realizó mediante un pulso de 2.5 kV durante 5 ms. Inmediatamente se agregó 1 mL de SOC a la celda resuspendiendo las células por inversión e incubando por 1 hora a 37 °C. Según la muestra utilizada se realizaron las diluciones

correspondientes para el plaqueo de las células en el medio sólido correspondiente. En todos los casos se incluyó como control positivo un vector puro con adecuada resistencia a antibiótico y un control negativo agregando agua en vez de ADN.

Para la preparación de **células químicamente competentes** se procedió como se describe a continuación. 5 ML de LB fueron inoculados con una colonia característica e incubados *overnight* a 37 °C y 150 rpm. El cultivo fue diluido 1:40 en 200 mL de medio 2xYT. Se incubó nuevamente a 37 °C y 150 rpm hasta OD₆₀₀ entre 0.3 y 0.5 UA. El cultivo se incubó en hielo durante 5 minutos y se centrifugó por 15 min a 4000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 8 mL de TFB1 frío. Se incubó en hielo por 25 minutos y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 8 mL de TFB2. Se incubó en hielo entre 30 min y 2 horas. La suspensión celular se alicuotó en tubos eppendorf colocando 50 µL/tubo y se congelaron en hielo seco. Se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Para la transformación por shock térmico, se descongelan las células en baño de hielo durante aproximadamente 30 minutos. Se agregó la cantidad de ADN necesaria (entre 1 y 5 µL) mezclando suavemente y se mantuvo la mezcla en hielo durante 15 minutos. Se incubó el tubo a 42 °C por 30 segundos, se colocó en hielo por 5 minutos y se agregaron 250 µL de LB resuspendiendo las células por inversión. Se incubó a 37 °C, 800 rpm durante 30-45 minutos. Se sembró la mezcla en medio sólido adecuado.

5.1.5 Manipulación de ADN

La extracción de los plásmidos de las distintas cepas se realizó utilizando *kits* comerciales de Mini- o Midi-prep de Thermo-Fischer, de acuerdo con el protocolo establecido por el proveedor.

Para la generación de mutantes por *Quick change*, los plásmidos fueron utilizados como moldes para su amplificación completa por PCR utilizando oligonucleótidos conteniendo las mutaciones a insertar. Posteriormente se digirió la mezcla con DpnI a 37 °C durante toda la

noche, se precipitó con yeast-tRNA y se retomó en 10 μ L. Se utilizaron 5 μ L para transformar células competentes que se seleccionaron en LB-Amp. Se seleccionaron distintos clones de cada transformación y se extrajeron los plásmidos para confirmar la inserción de la mutación por secuenciación.

Esta técnica fue utilizada para generar los mutantes de TDO, las bibliotecas de NDO y para insertar la cola de histidina en pDTG121 para la purificación de la oxigenasa de NDO.

5.1.6 Purificación de NDO-O

Para la purificación de las subunidades α y β que componen la Dioxigenasa de NDO se utilizó el método descrito por Yang y colaboradores.⁷⁸

Se realizó el crecimiento de *E. coli* JM109 (DE3) (pDTG121) en 1 litro de LB suplementado con ampicilina a 37 °C, 180 rpm y al alcanzar una $OD_{600} = 0.5$ se indujo la expresión enzimática agregando IPTG a una concentración final de 100 mM, incubando por 24 horas a 28 °C, 180 rpm. Posteriormente el medio se centrifugó a 6000 x g, 4 °C, durante media hora, y se descartó el sobrenadante. El pellet fue almacenado a -20 °C para su uso posterior.

La lisis celular se realizó resuspendiendo el pellet en buffer de lisis (10 mL/g de célula), luego se agregó lisozima (1 mg/mL) y se incubó por 30 minutos en baño de hielo mezclando periódicamente por inversión. Posteriormente se agregó RNasa y DNasa (5 μ g/mL) y se incubó por media hora más en baño de hielo invirtiendo esporádicamente. Se centrifugó a 16000 x g, 4 °C, durante 30 min y se separó el sobrenadante (fracción soluble) del pellet (fracción insoluble).

La fracción soluble se aplicó en una columna de níquel HisTrap HP (GE Healthcare) de 5 mL, previamente lavada y equilibrada, recirculando el sobrenadante por una hora. Luego se procedió al lavado con 5 volúmenes de columna de *buffer Wash I* y 5 volúmenes de columna de *buffer Wash II*. Posteriormente se realizó la elución con 3 volúmenes de columna de *buffer de Elución* y un lavado final con *buffer de Elución II*.

La fracción obtenida con el buffer de elución se dializó contra el *buffer de Diálisis* (incubando toda la noche a 4 °C con agitación. Posteriormente se realizó una nueva diálisis de 4 horas en las mismas condiciones.

Se estimó la concentración de proteína de acuerdo con la absorbancia a 280 nm correspondiendo tal valor a la concentración en mg/mL.

Se realizó la separación de proteínas por SDS-Page de acuerdo al protocolo tradicional. El gel de proteínas se corrió siguiendo las especificaciones del fabricante.

5.2 Biotransformaciones

Todos los reactivos químicos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, Alfa-Aesar o Droguería Industrial Uruguaya. Se utilizó un biorreactor Sartorius Biostat A plus de 5L para el desarrollo de cultivos de altas densidades.

Salvo que se especifique lo contrario las reacciones fueron realizadas como se describe a continuación.

5.2.1 *Crecimiento y biotransformación en biorreactor utilizando TDO, TDO^M, CDO y NDO*

El crecimiento y biotransformación utilizando los biocatalizadores que expresan TDO, TDO^M, CDO y NDO se realizó utilizando una modificación de nuestro procedimiento publicado anteriormente.⁴³

Procedimiento:

5mL de LB suplementados con ampicilina (0.1 g/L) se inocularon con una colonia de la cepa correspondiente y fueron incubados *overnight* en agitador orbital (37 °C, 150 rpm). 1,5 mL de estos tubos se utiliza para inocular los precultivos (2x150 mL) que fueron incubados en las mismas condiciones. Ambos cultivos fueron utilizados para inocular el biorreactor, conteniendo inicialmente 2.5 L de medio citrato a 30 °C, con agitación a 500 rpm y flujo de aire de 4 L/min. El

pH fue controlado automáticamente y ajustado a 6.8 por agregado de NH_4OH durante todo el proceso. Una mezcla de Antifoam 204 (Aldrich) y silicona (1:1) fue utilizada como antiespumante y se agregó cuando fue necesario.

A las 6 horas, se observó un agotamiento de la fuente de carbono remanente de los precultivos, lo cual se reflejó en un aumento del oxígeno disuelto, comenzando allí la alimentación con solución de glucosa 0.7 g/mL con una rampa que va de 0.08 mL/min a 0.54 mL/min en 20 horas. Cuando la OD_{600} alcanzó un valor cercano a 15, se indujo la expresión enzimática agregando IPTG (10 mg/L). Una vez alcanzado el estado estacionario del cultivo, se extrajo la cantidad de medio necesaria para las biotransformaciones con células en reposo (en caso de ser necesario), la velocidad de alimentación se redujo a 0.25 mL/min y se inició el agregado de sustrato en una solución al 10 % v/v en vaselina para una concentración final de 0.5 M. En el caso de las reacciones con arilsulfonilazidas trisustituídas, se conectó el biorreactor a un tanque de nitrógeno y se purgó el mismo hasta que el electrodo de oxígeno detectó una $\text{pO}_2=0$. Una vez alcanzado este valor se agregó el sustrato disuelto en MeOH y se mantuvo el cultivo en condiciones anaerobias durante toda la reacción.

Una vez finalizada la biotransformación, el medio se centrifugó para separar células, fase acuosa y vaselina.

Para el aislamiento de los dioles, se liofilizó la fase acuosa y el sólido obtenido se colocó en un matraz y se lavó con 0.5 L de acetato de etilo (previamente tratado con K_2CO_3 para eliminar trazas de ácido) agitando con pastilla magnética durante 15 minutos. Se separó el sólido con papel de filtro y se devolvió al matraz para repetir el procedimiento 5 veces. Las fases orgánicas se combinaron y evaporaron a presión reducida obteniendo un sólido blanco nacarado. Este sólido se lavó con porciones de hexanos para remover vaselina residual y se separó por decantación.

5.2.2 *Ensayos con células en reposo*

Una vez alcanzado el estado estacionario en el biorreactor se cosecharon células para ensayar los cinco sustratos: i) bromobenceno, ii) tolueno, iii) propilbenceno, iv) estireno, v) indeno. El medio extraído del biorreactor se centrifugó y se descartó el sobrenadante, las células se lavaron y resuspendieron en buffer M9, suplementado con solución de glucosa 0.7 g/mL para lograr una concentración de 5.5 g/L. Se agregó sustrato puro en una concentración de 5 mM y se incubó durante 20 horas en agitador orbital Thermo Forma (28 °C, 150 rpm). Posteriormente se centrifugó el medio a 7000 rpm por 20 minutos y se liofilizó el sobrenadante para su análisis por ¹H-RMN. El liofilizado se lavó con acetato de etilo para la extracción de los productos que luego fueron purificados por columna cromatográfica o TLC preparativa.

5.2.3 *Reacciones de funcionalización C-H*

Todas las reacciones de funcionalización C-H fueron realizadas utilizando célula entera. Las cepas utilizadas fueron crecidas en LB-Amp a 37 °C, 180 rpm. La expresión enzimática fue inducida agregando IPTG (100 mM) cuando los cultivos alcanzaron una OD₆₀₀ de 0.5 y luego fueron incubados a 28 °C, 180 rpm durante 24 horas. Posteriormente las células se cosecharon por centrifugación (15 min, 4000 rpm) y fueron lavadas y resuspendidas en buffer *in-vivo* para lograr la densidad óptica deseada en cada caso (30 o 60). Las suspensiones fueron alicuotadas y congeladas, almacenándose a -70 °C hasta su uso.

Para las reacciones, 390 µL de suspensión celular se colocaron en viales conteniendo pastillas magnéticas y fueron purgados con argón. Soluciones stock de los sustratos preparadas en MeOH fueron agregadas con micro-jeringa para obtener las concentraciones correspondientes. Las reacciones se incubaron overnight a temperatura ambiente, 60 rpm, en condiciones anaerobias. Al día siguiente se extrajeron con 400 µL de diclorometano (DCM), se agitó la mezcla en vortex por 1 minuto y se centrifugó 15 min a 14000 rpm. La capa orgánica se separó a un nuevo tubo eppendorff y se evaporó. Los residuos fueron disueltos en 300 µL de MeOH calidad HPLC y se analizaron por HPLC utilizando una columna de fase reversa C18. Las

concentraciones de los productos fueron determinadas según curvas de calibración construidas para los productos y las conversiones se calcularon en función de la concentración de sustrato agregada.

5.2.4 *Purificación e identificación de productos*

Los productos fueron purificados por TLC preparativa utilizando placas de sílica gel 60F-254, visualizando con luz ultravioleta de 254 nm, o por columna cromatográfica utilizando sílica flash Kieselgel 60, reactivo EM, malla 230-400. El compuesto **2a** se purificó por columna cromatográfica utilizando como fase móvil una mezcla de acetato de etilo : hexanos (1:1). Los productos de biotransformación del propilbenceno **4a** y **4b** se separaron por TLC preparativa utilizando como fase móvil una mezcla de acetato de etilo : hexanos (8:2), en tanto que para la purificación por columna se realizó un gradiente comenzando por una mezcla hexanos : acetato de etilo (6:4) y finalizando con acetato de etilo : hexanos (9:1). La purificación de los productos del indeno **5a** y **5b** por TLC preparativa se llevó a cabo utilizando una mezcla (7:3) de acetato de etilo : hexanos, realizando la corrida cromatográfica tres veces seguidas para una mejor separación.

5.2.5 *Crecimiento y biotransformación en biorreactor utilizando *Ralstonia eutropha* B9*

Se utilizó el medio de cultivo LBII para el crecimiento y desarrollo de precultivos de *R. eutropha* B9.

Procedimiento:

Dos matraces de 500 mL conteniendo 90 mL de LBII fueron inoculados con una colonia de *Ralstonia eutropha* B9 e incubados por 48 horas a 28 °C, 150 rpm. Ambos cultivos se utilizaron para inocular el biorreactor conteniendo 3 L de medio, con una agitación de 300 rpm, 30 °C y un flujo de aire de 3 L/min. Junto con el inóculo se agregaron 17.5 mL de una solución de fructosa de concentración 1.5 M. El pH fue controlado automáticamente y mantenido en 7.4 por adición de hidróxido de amonio durante todo el proceso. Luego de 20 horas se agregó un segundo pulso de

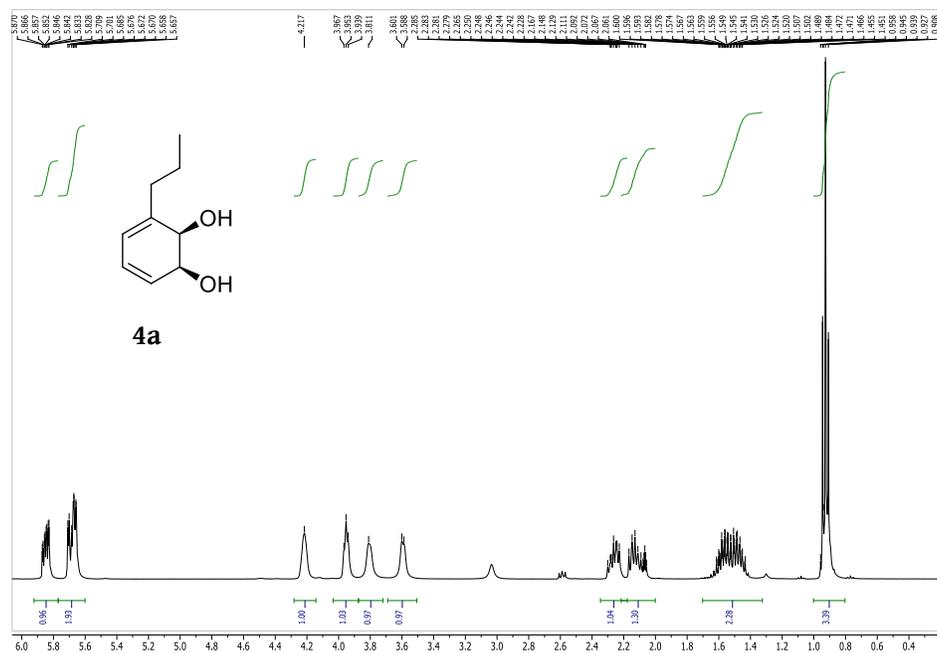
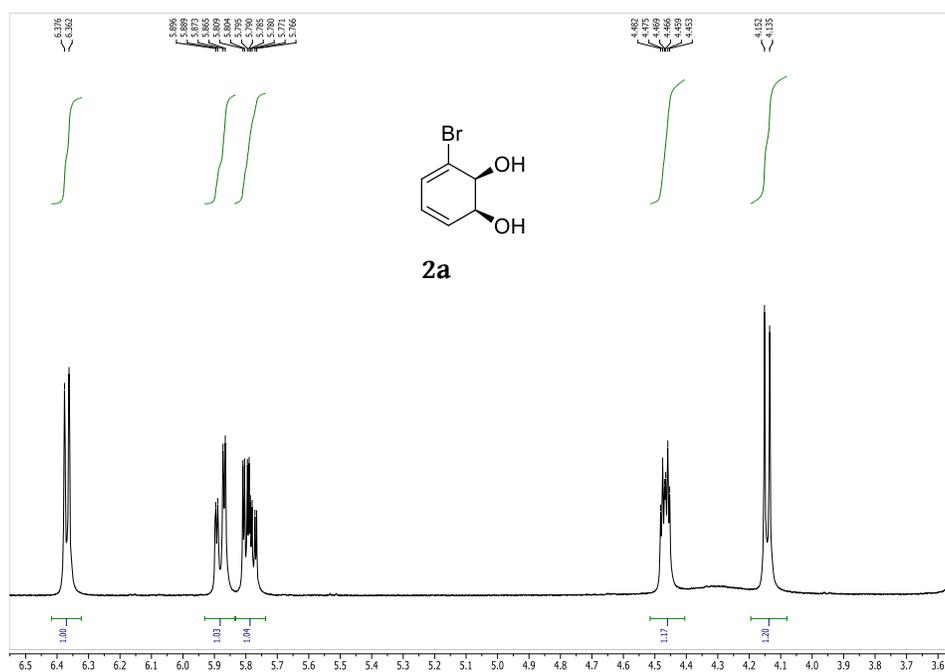
solución de fructosa (19 mL) junto con el primer pulso de benzoato de sodio 1.5 M (4.3 mL). A partir de este momento 8 mL de cada solución fueron agregados cada 4 horas durante 3.5 días. La agitación fue ajustada de acuerdo con las necesidades del cultivo para mantener los niveles de oxígeno por encima de 25 %, alcanzando 600 rpm.

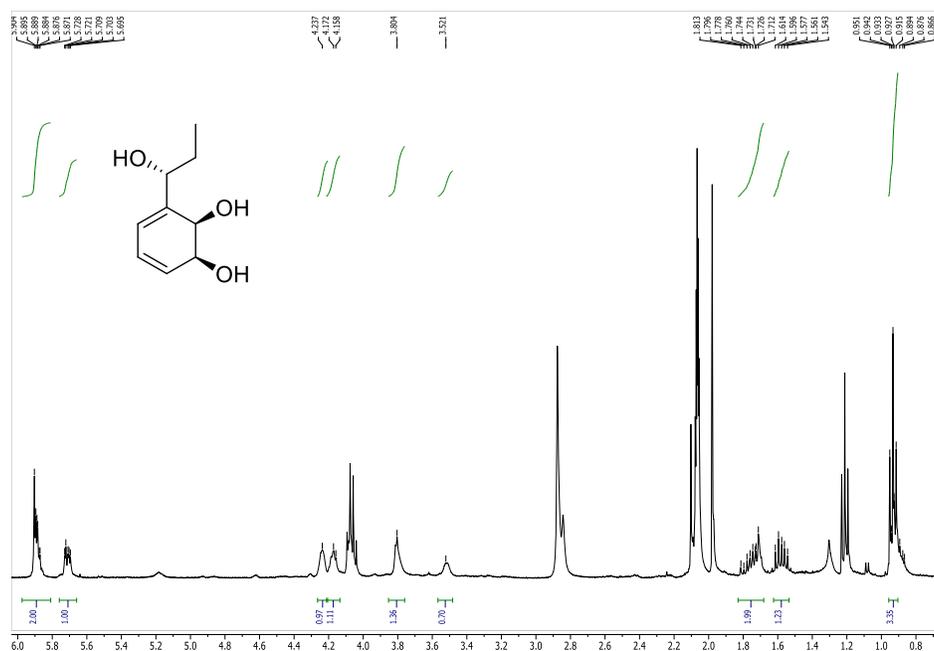
Una vez finalizado el proceso, se centrifugó el medio a 7000 rpm por 30 minutos para separar el pellet de células del sobrenadante, y este último fue liofilizado para obtener un sólido blanco conteniendo 79 % del diol del ácido benzoico. La estabilidad del producto permite su almacenamiento a temperatura ambiente dentro de un desecador.

5.3 Métodos analíticos

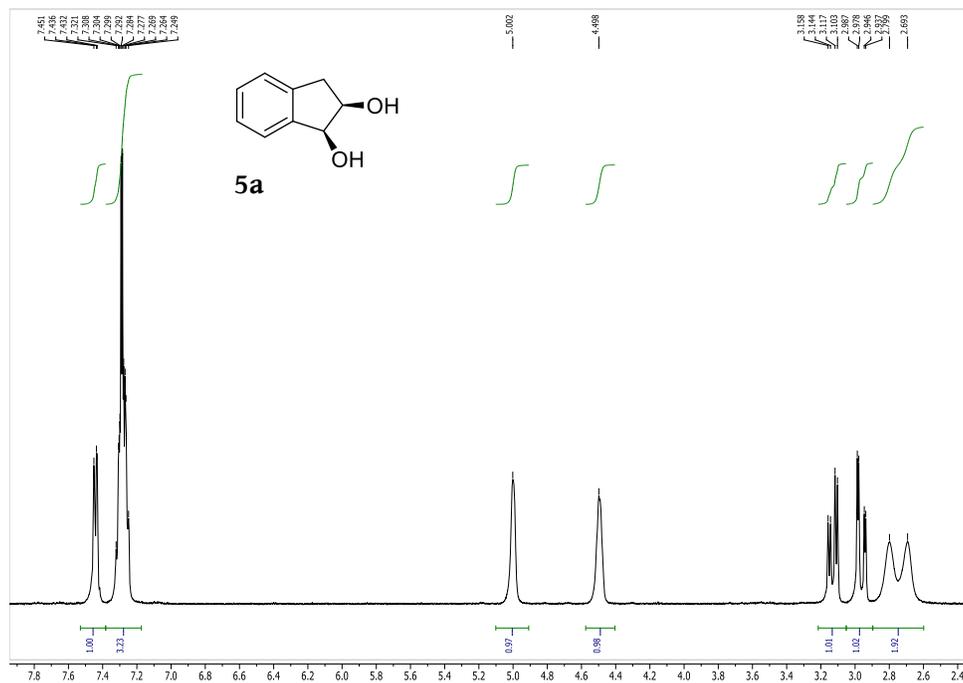
5.3.1 *Análisis de muestras por ^1H -RMN*

Para la identificación de los productos de biotransformación obtenidos y el cálculo de rendimientos, se analizó por ^1H -NMR el crudo obtenido tras la extracción con AcOEt agregando cantidades conocidas de 1,3-dinitrobenceno como estándar interno y comparando los espectros obtenidos con datos de literatura. Los espectros de RMN se obtuvieron en CDCl_3 o acetona deuterada en un instrumento Bruker Avance DPX-400. Los desplazamientos químicos de protones (δ) se reportan en ppm por debajo del valor de TMS como referencia interna. Las constantes de acoplamiento (J) se informan en Hz y se refieren a las multiplicidades de pico aparentes.

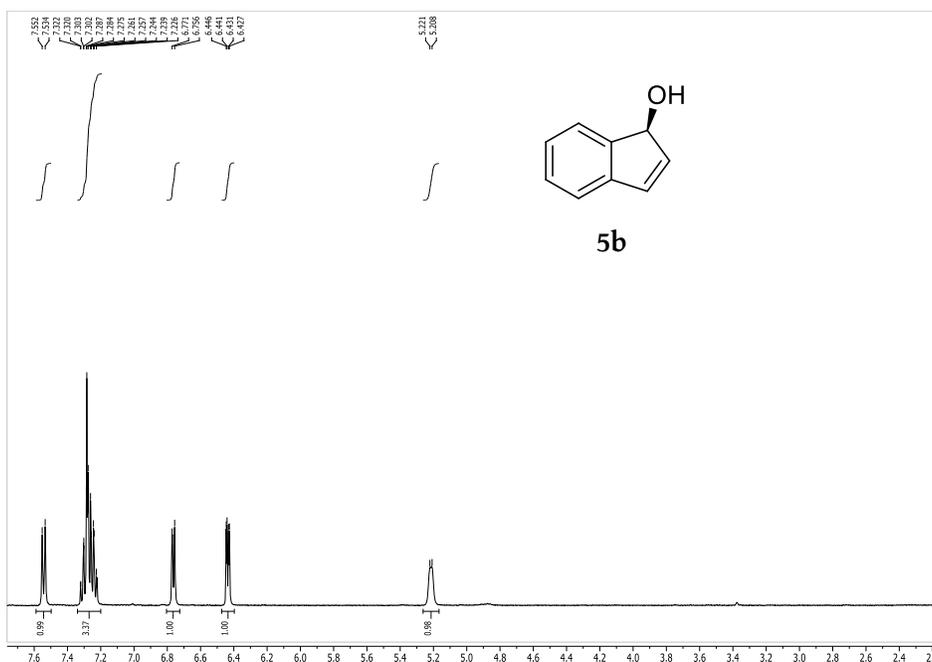




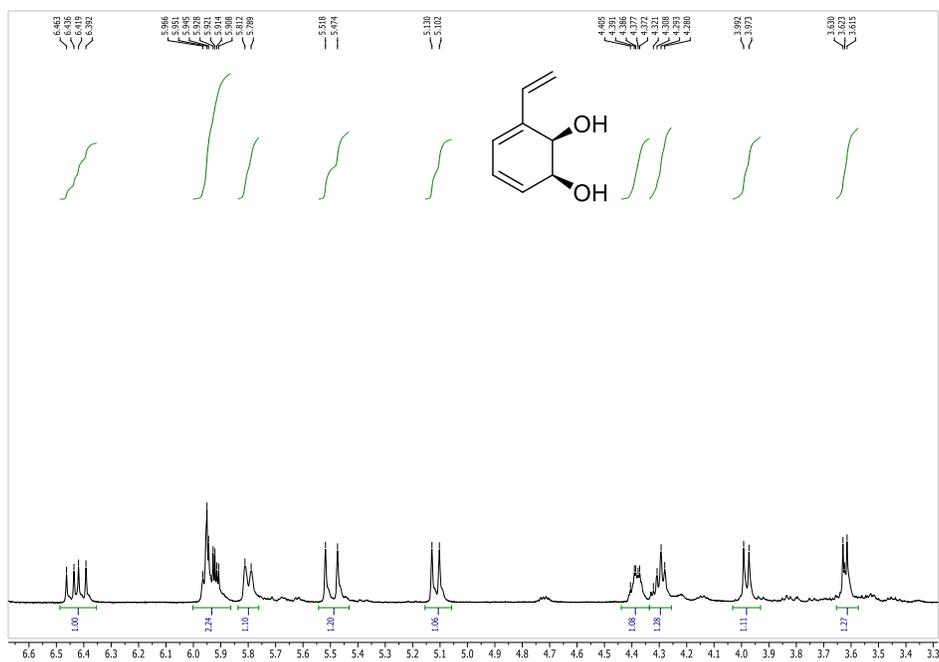
¹H-NMR (400 MHz, CD₃COCD₃): δ 5.85 (m, 2H), 5.71 (m, 1H), 4.24 (s, 1H), 4.17 (m, 1H), 1.75 (m, 1H), 1.58 (m, 1H), 0.93 (m, 3H).³⁹



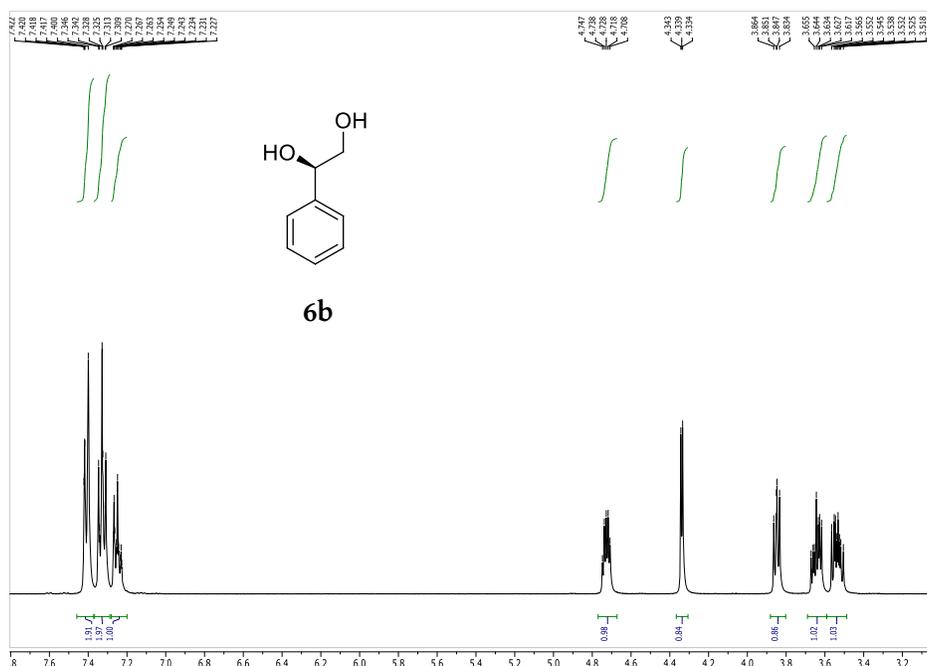
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.34-7.21 (m, 4H), 5.02 (d, *J* = 8), 4.54-4.49 (m, 1H), 3.14 (dd, *J* = 4, 16), 2.98 (dd, *J* = 4, 16, 1H).²⁶



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.55-7.53 (m, 1H), 7.46-7.44 (m, 3H), 6.76 (d, $J=8$, 1H), 6.44 (dd, $J=2, 6$, 1H), 5.21 (s, 1H).²⁶



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3COCD_3): δ 6.43 (dd, $J=8, 16$, 1H), 6.0-5.87 (m, 2H), 5.83-5.77 (m, 1H), 5.52-5.47 (d, $J=20$, 1H), 5.12 (d, $J=12$, 1H).¹²⁹



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3COCD_3): δ 7.43-7.37 (m, 2H), 7.35-7.29 (m, 2H), 7.28-7.21 (m, 1H), 4.72 (dd, $J=4, 8, 1\text{H}$), 3.65 (dd, $J=4, 8, 1\text{H}$), 3.52 (dd, $J=8, 12, 1\text{H}$).¹²⁹

5.3.2 Análisis de muestras por HPLC

El análisis por HPLC se realizó utilizando un equipo Shimadzu Prominence LC-20AT con detector de arreglo de diodos.

Para la determinación del exceso enantiomérico de los compuestos **2** – **6** (**a** y **b**) se utilizaron columnas quirales de fase normal bajo las condiciones que se describen a continuación:

Columna A: Chiralcel® OJ-H (250 mm largo, 4.6 mm diámetro, 5 μm tamaño de partícula – Daicel Chemical Industries, Ltd.) se utilizó para separar los enantiómeros de **2a**, **4a**, **4b**, **5a** and **6a**.

Columna B: Lux® Cellulose-1 (250 mm largo, 4.6 mm diámetro, 5 μm tamaño de partícula - Phenomenex®) utilizada para separar los enantiómeros de **5b** y **6b**.

En ambos casos las condiciones fueron: fase móvil hexanos : 2-propanol (90:10) con un flujo de 0.5 mL/min, temperatura de horno 25 °C, y 30 minutos de corrida, los tiempos de retención se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18: Tiempos de retención observados para los diferentes enantiómeros de los productos obtenidos.

<i>Sustrato</i>	<i>Producto</i>	<i>Columna usada</i>	<i>Isómero 1^a</i>	<i>Tiempo retención (min)</i>	<i>Isómero 2</i>	<i>Tiempo retención (min)</i>	<i>Referencia</i>
2	2a	A	1S,2S	18.067	1R,2S	17.228	130
4	4a	A	1S,2R	10.568	1R,2S	--	130
5	5a	A	1S,2R	25.532	1R,2S	19.790	129
	5b ^b	B	1S	18.241	1R	20.610	129
6	6a	A	1S,2R	21.769	1R,2S	--	39
	6b ^b	B	1R	14.316	1S	13.461	39

^a Los picos se asignaron por comparación con lo reportado previamente en literatura para la enzima nativa.

^b Los tiempos de retención corresponden a los obtenidos para la mezcla racémica sintetizada químicamente. La asignación se realizó en base a los reportes previos de literatura para la enzima nativa.

Para separar los productos de aminación intramolecular se utilizó una columna Agilent eclipse XDB-C18 Zorbax (250 mm x 4.6 mm x 5 µm) utilizando como fase móvil acetonitrilo y H₂O (conteniendo 0.01 % de ácido trifluoroacético) en un gradiente que va de 50 a 100 % de ACN en 20 minutos, retorna a 50 % ACN en 5 minutos y se mantiene 10 minutos pasando la mezcla 50:50, con un flujo de 0.5 mL/min y una temperatura de horno de 30 °C. Los tiempos de retención se presentan en la Tabla 19.

Tabla 19: Tiempos de retención para arilsulfonilazidas trisustituidas y sus productos.

Compuesto	23	23a	23b	42	42a	42b
<i>Tiempo retención (min)</i>	29.1	15.3	17.8	30.8	19.6	21.8

5.4 Análisis de datos

Se utilizó el software GraphPad Prism 8 para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en las reacciones de funcionalización C-H utilizando arilsulfonilazidas trisustituídas y la construcción de los gráficos presentados. Se evaluaron diferencias significativas entre los sujetos de estudio (los biocatalizadores expresando las distintas dioxigenasas) y los grupos control, a cada una de las concentraciones estudiadas para cada uno de los sustratos analizados, para lo cual se realizaron quintuplicados de cada experimento. Las conversiones obtenidas en cada caso fueron comparadas por un análisis de varianza (*one-way ANOVA*), seguido del test de comparaciones múltiples de Sidak, y en todos los casos la significancia estadística se estableció para $P < 0.05$.

6. Referencias

1. Perkins, C., Siddique, S., Puri, M. & Demain, A. L. Biotechnological applications of microbial bioconversions. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 1050–1065 (2015).
2. Rudroff, F. Whole-cell based synthetic enzyme cascades—light and shadow of a promising technology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **49**, 84–90 (2019).
3. Sun, H., Zhang, H., Ang, E. L. & Zhao, H. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. *Bioorganic Med. Chem.* **26**, 1275–1284 (2018).
4. Patel, R. N. Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. *Bioorganic Med. Chem.* **26**, 1252–1274 (2018).
5. De Carvalho, C. C. C. R. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. *Biotechnol. Adv.* **29**, 75–83 (2011).
6. Choi, J. M., Han, S. S. & Kim, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1443–1454 (2015).
7. Gaménara, D., Seoane, G. A., Saenz-Mendez, P. & Domínguez de María, P. *Redox Biocatalysis Fundamentals and Applications*. (John Wiley & Sons, Inc., 2013).
8. Wachtmeister, J. & Rother, D. Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. *Curr. Opin. Biotechnol.* **42**, 169–177 (2016).
9. Turner, N. J. & O'Reilly, E. Biocatalytic retrosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 285–288 (2013).
10. de Souza, R. O. M. A., Miranda, L. S. M. & Bornscheuer, U. T. A Retrosynthesis Approach for Biocatalysis in Organic Synthesis. *Chem. - A Eur. J.* **23**, 12040–12063 (2017).
11. Wu, S. & Li, Z. Whole-Cell Cascade Biotransformations for One-Pot Multistep Organic Synthesis. *ChemCatChem* **10**, 2164–2178 (2018).

12. Prier, C. K. & Kosjek, B. Recent preparative applications of redox enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **49**, 105–112 (2019).
13. Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., Buehler, K., Schallmeyer, A. & Bühler, B. Enzyme-mediated oxidations for the chemist. *Green Chem.* **13**, 226–265 (2011).
14. Özgen, F. F. & Schmidt, S. Rieske non-heme iron dioxygenases: Applications and Future Perspectives. in *Biocatalysis: Enzymatic Basics and Applications* (eds. Husain, Q. (Department of B. M. U. & Fahad Ullah, M. (Department of M. L. T. U. of T.)) 57–82 (Springer International Publishing, 2019). doi:10.1007/978-3-030-25023-2.
15. Solomon, E. I., Decker, A. & Lehnert, N. Non-heme iron enzymes: Contrasts to heme catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 3589–3594 (2003).
16. R. Boyd, D. & N. Sheldrake, G. The dioxygenase-catalysed formation of vicinal cis-diols. *Nat. Prod. Rep.* **15**, 309 (1998).
17. Gibson, D. T., Koch, J. R. & Kallio, R. E. Oxidative Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Microorganisms. I. Enzymatic Formation of Catechol from Benzene. *Biochemistry* **7**, 2653–2662 (1968).
18. Gibson, D. T., Hensley, H., Yoshioka, H. & Mabry, T. J. Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. III. Formation of (+)-cis-2,3-dihydroxy-1-methyl-4,6-cyclohexadiene from toluene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **9**, 1626–1630 (1970).
19. Khan, A., Wang, R. F., Cao, W., Franklin, W. & Cerniglia, C. E. Reclassification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Beijerinckia* sp. strain B1, as *Sphingomonas yanoikuyae* by fatty acid analysis, protein pattern analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S ribosomal DNA sequencing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **46**, 466 (1996).
20. Johnson, B. F. & Stanier, R. Y. Dissimilation of Aromatic Compounds by *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **107**, 468–475 (1971).
21. Hudlicky, T., González, D. & Gibson, D. T. Enzymatic Dihydroxylation of Aromatics in

- Enantioselective Synthesis: Expanding Asymmetric Methodology. *Aldrichimica Acta* **32**, 35–62 (1999).
22. Friemann, R. *et al.* Structures of the multicomponent Rieske non-heme iron toluene 2,3-dioxygenase enzyme system. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **65**, 24–33 (2009).
 23. Gibson, D. T. & Parales, R. E. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 236–243 (2000).
 24. Gibson, D. T., Cardini, G. E., Maseles, F. C. & Kallio, R. E. Incorporation of oxygen-18 into Benzene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **9**, 1631–1635 (1970).
 25. Bugg, T. D. H. Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron* **59**, 7075–7101 (2003).
 26. Wackett, L. P., Kwart, L. D. & Gibson, D. T. Benzylic Monooxygenation Catalyzed by Toluene Dioxygenase from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **27**, 1360–1367 (1988).
 27. Resnick, S. M., Torok, D. S., Lee, K., Brand, J. M. & Gibson, D. T. Regiospecific and Stereoselective Hydroxylation of 1-Indanone and 2-Indanone by Naphthalene Dioxygenase and Toluene Dioxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3323–3328 (1994).
 28. Lee, K. Benzene-induced uncoupling of Naphthalene Dioxygenase activity and enzyme inactivation by production of hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* **181**, 2719–2725 (1999).
 29. Wolfe, M. D., Parales, J. V., Gibson, D. T. & Lipscomb, J. D. Single turnover chemistry and regulation of O₂ activation by the oxygenase component of Naphthalene 1,2-Dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **276**, 1945–1953 (2001).
 30. Hudlicky, T. & Reed, J. W. Special account on the merits of biocatalysis and the impact of arene cis-dihydrodiols on enantioselective synthesis. *Synlett* **5**, 0685–0703 (2009).
 31. Boyd, D. R. *et al.* Dioxygenase-catalysed oxidation of disubstituted benzene substrates: benzylic monohydroxylation versus aryl cis-dihydroxylation and the meta effect. *Org. Biomol. Chem.* **4**, 3343–3349 (2006).

32. Boyd, D. R. *et al.* Stereodirecting substituent effects during enzyme-catalysed synthesis of cis-dihydrodiol metabolites of 1,4-disubstituted benzene substrates. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 974–976 (1993) doi:10.1039/C39930000974.
33. Boyd, D. R. *et al.* Dioxygenase-catalysed oxidation of alkylaryl sulfides: sulfoxidation versus cis -dihydrodiol formation. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 2530–2537 (2004).
34. Allen, C. C. R. *et al.* Sulfoxides of high enantiopurity from bacterial dioxygenase-catalysed oxidation. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 119–120 (1995) doi:10.1039/C39950000119.
35. Boyd, D. R. *et al.* Toluene and naphthalene dioxygenase-catalysed sulfoxidation of alkyl aryl sulfides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1929–1934 (1998) doi:10.1039/a801515e.
36. Boyd, D. R. *et al.* Tandem enzyme-catalysed oxidations of alkyl phenyl sulfides and alkyl benzenes: enantiocomplementary routes to chiral phenols. *Chem. Commun.* **220**, 1914–1915 (2002).
37. Bowers, N. I. *et al.* Stereoselective benzylic hydroxylation of 2-substituted indanes using toluene dioxygenase as biocatalyst. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1453–1461 (1999) doi:10.1039/a901453e.
38. Boyd, D. R. *et al.* Stereochemical and mechanistic aspects of dioxygenase-catalysed benzylic hydroxylation of indene and chromane substrates. *Org. Biomol. Chem.* **1**, 1298–1307 (2003).
39. Boyd, D. R., Sharma, N. D., Bowers, N. I., Harrison, S. & Dalton, H. Enantioselective toluene dioxygenase catalysed di- and tri-hydroxylation of monosubstituted benzenes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1345–1350 (2000) doi:10.1039/b000753f.
40. Boyd, D. R. & Bugg, T. D. H. Arene cis-dihydrodiol formation: from biology to application. *Org. Biomol. Chem.* **4**, 181–192 (2006).
41. Lewis, S. E. Applications of biocatalytic arene ipso,ortho cis-dihydroxylation in synthesis. *Chem. Commun.* **50**, 2821–2830 (2014).

42. Hudlicky, T. Benefits of Unconventional Methods in the Total Synthesis of Natural Products. *ACS Omega* **3**, 17326–17340 (2018).
43. Vila, M. A. *et al.* Production of cis-1,2-dihydrocatechols of high synthetic value by whole-cell fermentation using *Escherichia coli* JM109 (pDTG601): A detailed study. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **96**, 14–20 (2013).
44. Banwell, M. G., Blakey, S., Harfoot, G. & Longmore, Robert, R. cis-1,2-Dihydrocatechols in Chemical Synthesis: First Synthesis of L-Ascorbic Acid (Vitamin C) from a Non-Carbohydrate Source. *Aust. J. Chem.* **52**, 137–142 (1999).
45. Griffen, J. A. *et al.* Benzoate dioxygenase from *Ralstonia eutropha* B9-unusual regiochemistry of dihydroxylation permits rapid access to novel chirons. *Org. Chem. Front.* **1**, 79–90 (2014).
46. Kauppi, B. *et al.* Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase – naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure* **6**, 571–586 (1998).
47. Parales, R. E., Parales, J. V & Gibson, D. T. Aspartate 205 in the Catalytic Domain of Naphthalene Dioxygenase Is Essential for Activity. *J. Bacteriol.* **181**, 1831–1837 (1999).
48. Carredano, E. *et al.* Substrate Binding Site of Naphthalene 1,2-Dioxygenase: Functional Implications of Indole Binding. *J. Mol. Biol.* **296**, 701–712 (2000).
49. Escalante, D. E., Aukema, K. G., Wackett, L. P. & Aksan, A. Simulation of the Bottleneck Controlling Access into a Rieske Active Site: Predicting Substrates of Naphthalene 1,2-Dioxygenase. *J. Chem. Inf. Model.* **57**, 550–561 (2017).
50. Parales, R. E. *et al.* Substrate Specificity of Naphthalene Dioxygenase : Effect of Specific Amino Acids at the Active Site of the Enzyme. *J. Bacteriol.* **182**, 1641–1649 (2000).
51. Parales, R. E. *et al.* Regioselectivity and Enantioselectivity of Naphthalene Dioxygenase during Arene cis -Dihydroxylation: Control by Phenylalanine 352 in the α Subunit. *J. Bacteriol.* **182**, 5495–5504 (2000).

52. Yu, C.-L., Parales, R. E. & Gibson, D. T. Multiple mutations at the active site of naphthalene dioxygenase affect regioselectivity and enantioselectivity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 94–103 (2001).
53. Halder, J. M., Nestl, B. M. & Hauer, B. Semirational Engineering of the Naphthalene Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 towards Selective Asymmetric Dihydroxylation. *ChemCatChem* **10**, 178–182 (2018).
54. Suenaga, H., Watanabe, T., Sato, M., Ngadiman & Furukawa, K. Alteration of regiospecificity in Biphenyl Dioxygenase by active-site engineering. *J. Bacteriol.* **184**, 3682–3688 (2002).
55. Kumamaru, T., Suenaga, H., Mitsuoka, M., Watanabe, T. & Furukawa, K. Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase. *Nat. Biotechnol.* **16**, 663–666 (1998).
56. Suenaga, H., Nishi, A., Watanabe, T., Sakai, M. & Furukawa, K. Engineering a Hybrid *Pseudomonas* to Acquire 3,4-Dioxygenase Activity for Polychlorinated Biphenyls. *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 430–435 (1999).
57. Vézina, J., Barriault, D. & Sylvestre, M. Family shuffling of soil DNA to change the regiospecificity of *Burkholderia xenovorans* LB400 biphenyl dioxygenase. *J. Bacteriol.* **189**, 779–788 (2007).
58. Hurtubise, Y., Barriault, D. & Sylvestre, M. Involvement of the terminal oxygenase b subunit in the biphenyl dioxygenase reactivity pattern toward chlorobiphenyls. *J. Bacteriol.* **180**, 5828–5835 (1998).
59. Vézina, J., Barriault, D. & Sylvestre, M. Diversity of the C-terminal portion of the Biphenyl Dioxygenase large subunit. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 139–151 (2008).
60. Kumar, P. *et al.* Structural insights into the metabolism of 2-chlorodibenzofuran by an evolved biphenyl dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **421**, 757–762 (2012).

61. Lee, K., Friemann, R., Parales, J. V., Gibson, D. T. & Ramaswamy, S. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the three components of the toluene 2,3-dioxygenase enzyme system. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **61**, 669–672 (2005).
62. Zhang, N. *et al.* Directed evolution of toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* for improved selectivity toward cis-indandiol during indene bioconversion. *Metab. Eng.* **2**, 339–348 (2000).
63. Jiang, H., Parales, R. E., Lynch, N. A. & Gibson, D. T. Site-directed mutagenesis of conserved amino acids in the alpha subunit of toluene dioxygenase: Potential mononuclear non-heme iron coordination sites. *J. Bacteriol.* **178**, 3133–3139 (1996).
64. Sakamoto, T., Joern, J. M., Arisawa, A. & Arnold, F. H. Laboratory Evolution of Toluene Dioxygenase To Accept 4-Picoline as a Substrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3882–3887 (2001).
65. Werlen, C., Kahler, H.-P. E. & Van Der Meer, J. R. The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and cis-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation. *J. Biol. Chem.* **271**, 4009–4016 (1996).
66. Raschke, H. *et al.* Biotransformation of Various Substituted Aromatic Compounds to Chiral Dihydrodihydroxy Derivatives. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3333–3339 (2001).
67. Yildirim, S. *et al.* Recombinant chlorobenzene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. P51: A biocatalyst for regioselective oxidation of aromatic nitriles. *Adv. Synth. Catal.* **347**, 1060–1072 (2005).
68. Yildirim, S., Zezula, J., Hudlicky, T., Witholt, B. & Schmid, A. Asymmetric Dihydroxylation of Cinnamitrile to trans-3-[(5S,6R)-5,6-Dihydroxycyclohexa-1,3-dienyl]-acrylonitrile using Chlorobenzene Dioxygenase in *Escherichia coli* (pTEZ30). *Adv. Synth. Catal.* **346**, 933–942 (2004).

69. Ferraro, D. J., Okerlund, A., Brown, E. & Ramaswamy, S. One enzyme, many reactions: Structural basis for the various reactions catalyzed by naphthalene 1,2-dioxygenase. *IUCr* **4**, 648–656 (2017).
70. Boyd, D. R. *et al.* Chemoenzymic Synthesis of the 2,3- and 3,4-cis-Dihydrodiol Enantiomers of Monosubstituted Benzenes. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1147–1148 (1994).
71. Boyd, D. R. *et al.* Enzyme-Catalysed Synthesis and Absolute Configuration Assignments of cis-Dihydrodiol Metabolites from 1,4-Disubstituted Benzenes. *Chem. - A Eur. J.* **13**, 5804–5811 (2007).
72. Boyd, D. R. *et al.* Biocatalytic asymmetric dihydroxylation of conjugated mono- and polyalkenes to yield enantiopure cyclic cis-diols. *Adv. Synth. Catal.* **347**, 1081–1089 (2005).
73. Vila, M. A. *et al.* Computational insights into the oxidation of mono- and 1,4 disubstituted arenes by the Toluene Dioxygenase enzymatic complex. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **133**, 410–419 (2017).
74. Vila, M. A. *et al.* Site-Directed Mutagenesis Studies on the Toluene Dioxygenase Enzymatic System: Role of Phenylalanine 366, Threonine 365 and Isoleucine 324 in the Chemo-, Regio-, and Stereoselectivity. *Adv. Synth. Catal.* **359**, 2149–2157 (2017).
75. Gally, C., Nestl, B. M. & Hauer, B. Engineering Rieske Non-Heme Iron Oxygenases for the Asymmetric Dihydroxylation of Alkenes. *Angew. Chemie Int. Ed.* **54**, 12952–12956 (2015).
76. Ent, F. Van Den & Löwe, J. Short note RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J. Biochem. Biophys. Methods* **67**, 67–74 (2006).
77. You, C., Zhang, X. & Zhang, Y. H. P. Simple Cloning via Direct Transformation of PCR Product (DNA Multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 4–7 (2012).
78. Yang, J. W. *et al.* Evaluation of aromatic hydrocarbon decomposition catalyzed by the dioxygenase system and substitution of ferredoxin and ferredoxin reductase. *Environ. Sci.*

Pollut. Res. (2018) doi:10.1007/s11356-018-3200-y.

79. Reiner, A. M. & Hegeman, G. D. Metabolism of benzoic acid by bacteria. Accumulation of (-)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol-1-carboxylic acid by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. *Biochemistry* **10**, 2530–2536 (1971).
80. Adams, D. R., van Kempen, J., Hudlicky, J. R. & Hudlicky, T. Chemoenzymatic approach to synthesis of hydroxylated pyrrolidines from benzoic acid. *Heterocycles* **88**, 1255–1274 (2014).
81. Pazos, M. *et al.* Aza and oxo Diels-Alder reactions using cis-cyclohexadienediols of microbial origin: Chemoenzymatic preparation of synthetically valuable heterocyclic scaffolds. *Tetrahedron Asymmetry* **26**, 1436–1447 (2015).
82. Pazos, M., González, B., Suescun, L., Seoane, G. & Carrera, I. Production of enantiopure β -amino- γ -hydroxyesters from benzoic acid by selective formal aminohydroxylation. *Tetrahedron Lett.* **58**, 2182–2185 (2017).
83. Thevenet, N. *et al.* Double [3,3]-sigmatropic rearrangement in the enzymatic dioxygenation of benzyl azide: Preparation of novel synthetically valuable azido-diols. *Org. Lett.* **17**, 684–687 (2015).
84. Ferreira-Silva, B., Lavandera, I., Kern, A., Faber, K. & Kroutil, W. Chemo-promiscuity of alcohol dehydrogenases: reduction of phenylacetaldoxime to the alcohol. *Tetrahedron* **66**, 3410–3414 (2010).
85. Vila, M. A. *et al.* Toluene Dioxygenase-Catalysed Oxidation of Benzyl Azide to Benzonitrile: Mechanistic Insights for an Unprecedented Enzymatic Transformation. *ChemBioChem* **17**, 291–295 (2016).
86. Ghorai, S. K., Gopalsamuthiram, V. G., Jawalekar, A. M., Patre, R. E. & Pal, S. Iron catalyzed C-N bond formation. *Tetrahedron* **73**, 1769–1794 (2017).
87. Majumdar, K. C., De, N., Ghosh, T. & Roy, B. Iron-catalyzed synthesis of heterocycles.

- Tetrahedron* **70**, 4827–4868 (2014).
88. Jeffrey, J. L. & Sarpong, R. Intramolecular C(sp³)-H amination. *Chem. Sci.* **4**, 4092–4106 (2013).
 89. Zhang, L. & Deng, L. C-H bond amination by iron-imido/nitrene species. *Chinese Sci. Bull.* **57**, 2352–2360 (2012).
 90. Turner, N. J. Ammonia lyases and aminomutases as biocatalysts for the synthesis of α-amino and β-amino acids. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 234–240 (2011).
 91. Heberling, M. M., Wu, B., Bartsch, S. & Janssen, D. B. Priming ammonia lyases and aminomutases for industrial and therapeutic applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 250–260 (2013).
 92. Zhang, R. K., Huang, X. & Arnold, F. H. Selective C-H bond functionalization with engineered heme proteins: new tools to generate complexity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **49**, 67–75 (2019).
 93. Svastits, E. W., Dawson, J. H., Breslow, R. & Gellman, S. H. Functionalized Nitrogen Atom Transfer Catalyzed by Cytochrome P-450. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 6427–6428 (1985).
 94. Prier, C. K., Zhang, R. K., Buller, A. R., Brinkmann-Chen, S. & Arnold, F. H. Enantioselective, intermolecular benzylic C-H amination catalysed by an engineered iron-haem enzyme. *Nat. Chem.* **9**, 629–634 (2017).
 95. Coelho, P. S. *et al.* A serine-substituted P450 catalyzes highly efficient carbene transfer to olefins in vivo. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 485–487 (2013).
 96. Hyster, T. K., Farwell, C. C., Buller, A. R., McIntosh, J. A. & Arnold, F. H. Enzyme-Controlled Nitrogen-Atom Transfer Enables Regiodivergent C-H amination. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 15505–15508 (2014).
 97. Prier, C. K., Hyster, T. K., Farwell, C. C., Huang, A. & Arnold, F. H. Asymmetric Enzymatic Synthesis of Allylic Amines: A Sigmatropic Rearrangement Strategy. *Angew. Chemie - Int.*

- Ed.* **55**, 4711–4715 (2016).
98. Bordeaux, M., Singh, R. & Fasan, R. Intramolecular C(sp³)H amination of arylsulfonyl azides with engineered and artificial myoglobin-based catalysts. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 5697–5704 (2014).
 99. Singh, R., Kolev, J. N., Sutera, P. A. & Fasan, R. Enzymatic C(sp³)-H amination: P450-catalyzed conversion of carbonazidates into oxazolidinones. *ACS Catal.* **5**, 1685–1691 (2015).
 100. Singh, R., Bordeaux, M. & Fasan, R. P450-Catalyzed intramolecular sp³ C-H Amination with arylsulfonyl azide substrates. *ACS Catal.* **4**, 546–552 (2014).
 101. Giovani, S., Alwaseem, H. & Fasan, R. Aldehyde and Ketone Synthesis by P450-Catalyzed Oxidative Deamination of Alkyl Azides. *ChemCatChem* **8**, 2609–2613 (2016).
 102. Sreenilayam, G., Moore, E., Steck, V. & Fasan, R. Metal Substitution Modulates the Reactivity and Extends the Reaction Scope of Myoglobin Carbene Transfer Catalysts. *Adv. Synth. Catal.* **359**, 2076–2089 (2017).
 103. McIntosh, J. A. *et al.* Enantioselective Intramolecular C-H Amination Catalyzed by Engineered Cytochrome P450 Enzymes In Vitro and In Vivo. *Angew. Chemie* **52**, 9309–9312 (2013).
 104. Groves, J. T., McClusky, G. A., White, R. E. & Coon, M. J. Aliphatic hydroxylation by highly purified liver microsomal cytochrome P-450. Evidence for a carbon radical intermediate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**, 154–160 (1978).
 105. Singh, R., Kolev, J. N., Sutera, P. A. & Fasan, R. Enzymatic C (sp³)-H amination: P450-catalyzed conversion of carbonazidates into oxazolidinones. *ACS Catal.* **5**, 1685–1691 (2015).
 106. Farwell, C. C., McIntosh, J. A., Hyster, T. K., Wang, Z. J. & Arnold, F. H. Enantioselective imidation of sulfides via enzyme-catalyzed intermolecular nitrogen-atom transfer. *J. Am.*

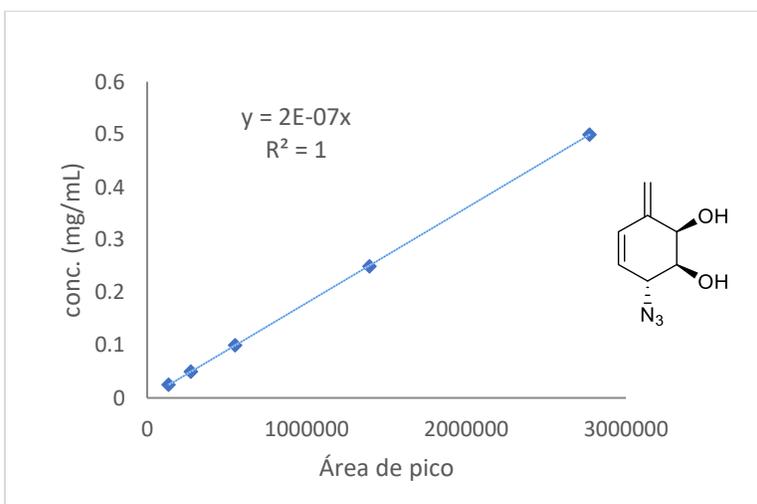
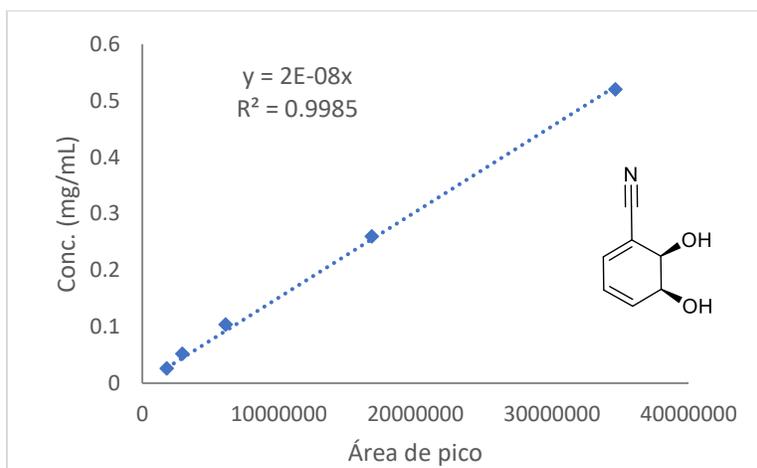
- Chem. Soc.* **136**, 8766–8771 (2014).
107. Farwell, C. C., Zhang, R. K., McIntosh, J. A., Hyster, T. K. & Arnold, F. H. Enantioselective enzyme-catalyzed aziridination enabled by active-site evolution of a cytochrome P450. *ACS Cent. Sci.* **1**, 89–93 (2015).
 108. Coelho, P. S., Brustad, E. M., Kannan, A. & Arnold, F. H. Olefin cyclopropanation via carbene transfer catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes. *Science (80-.)*. **339**, 307–310 (2013).
 109. Bordeaux, M., Tyagi, V. & Fasan, R. Highly diastereoselective and enantioselective olefin cyclopropanation using engineered myoglobin-based catalysts. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **54**, 1744–1748 (2015).
 110. Bajaj, P., Sreenilayam, G., Tyagi, V. & Fasan, R. Gram-Scale Synthesis of Chiral Cyclopropane-Containing Drugs and Drug Precursors with Engineered Myoglobin Catalysts Featuring Complementary Stereoselectivity. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**, 16110–16114 (2016).
 111. Tyagi, V., Bonn, R. B. & Fasan, R. Intermolecular carbene S-H insertion catalysed by engineered myoglobin-based catalysts. *Chem. Sci.* **6**, 2488–2494 (2015).
 112. Tyagi, V., Sreenilayam, G., Bajaj, P., Tinoco, A. & Fasan, R. Biocatalytic Synthesis of Allylic and Allenyl Sulfides through a Myoglobin-Catalyzed Doyle Kirmse Reaction. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**, 13562–13566 (2016).
 113. Tyagi, V. & Fasan, R. Myoglobin-catalyzed olefination of aldehydes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**, 2512–2516 (2016).
 114. Weissenborn, M. J. *et al.* Enzyme-Catalyzed Carbonyl Olefination by the *E. coli* Protein YfeX in the Absence of Phosphines. *ChemCatChem* **8**, 1636–1640 (2016).
 115. Carballeira, J. D., Vogel, A., Zilly, F. & Reetz, M. T. Evolution tools CASTER and B-FITTER. <https://www.kofo.mpg.de/en/research/biocatalysis> (2011).

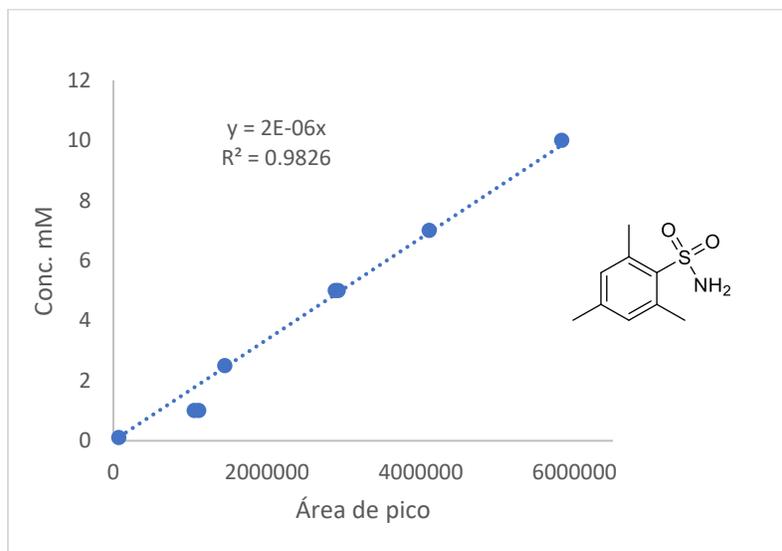
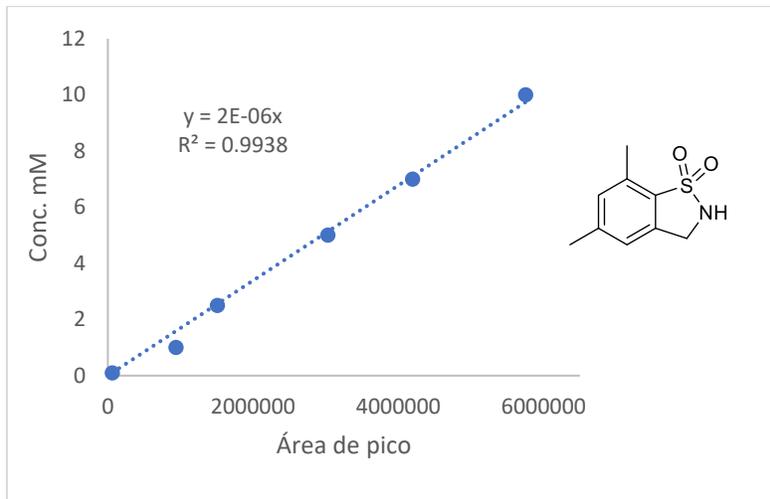
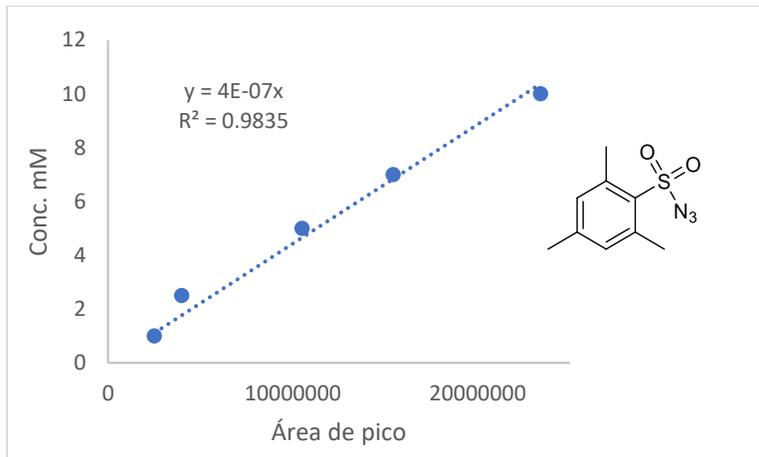
116. Bush, K. & Bradford, P. A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 295–306 (2019).
117. Page, M. I., Hinchliffe, P. S., Wood, J. M., Harding, L. P. & Laws, A. P. Novel mechanism of inhibiting β -Lactamases by sulfonylation using β -Sultams. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **13**, 4489–4492 (2003).
118. Page, M. I. & Laws, A. P. The chemical reactivity of β -lactams, β -sultams and β -phospholactams. *Tetrahedron* **56**, 5631–5638 (2000).
119. Tsang, W. Y. *et al.* Different transition-state structures for the reactions of β -lactams and analogous β -sultams with serine β -lactamases. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 17556–17564 (2005).
120. Page, M. I., Tsang, W. Y. & Ahmed, N. Comparison of the mechanisms of reactions of β lactams and β -sultams, including their reactions with some serine enzymes. *J. Phys. Org. Chem.* **19**, 446–451 (2006).
121. Suen, W. C. & Gibson, D. T. Recombinant Escherichia coli strains synthesize active forms of naphthalene dioxygenase and its individual alpha and beta subunits. *Gene* **143**, 67–71 (1994).
122. Zylstra, G. J. & Gibson, D. T. Aromatic hydrocarbon degradation: a molecular approach. *Genet. Eng. (N. Y.)* **13**, 183–203 (1991).
123. Suen, W. C. PhD thesis. (University of Iowa, 1991).
124. Panke, S., Meyer, A., Huber, C. M., Witholt, B. & Wubbolts, M. G. An alkane-responsive expression system for the production of fine chemicals. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2324–2332 (1999).
125. Sambrook, J. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).
126. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006174B.pdf>.

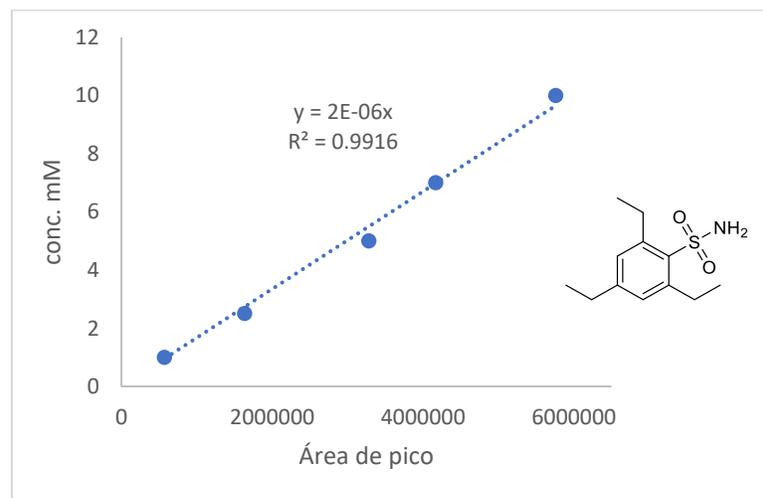
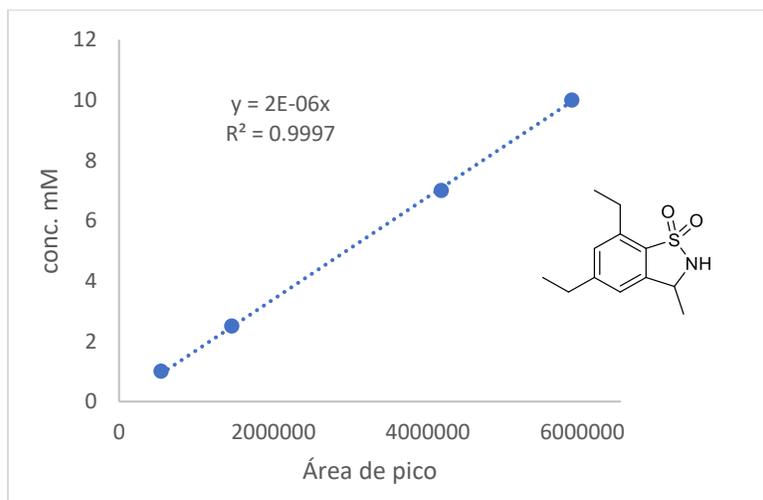
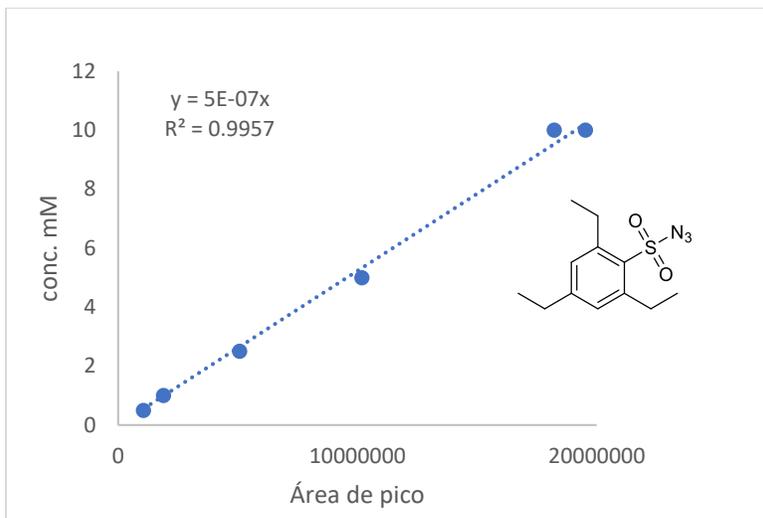
127. Zhu, H. & Dean, R. A. A novel method for increasing the transformation efficiency of *Escherichia coli* — application for bacterial artificial chromosome library construction. *Nucleic Acids Res.* **27**, 910–911 (1999).
128. Boyd, D. R. *et al.* Enzymatic and chemoenzymatic synthesis and stereochemical assignment of cis-dihydrodiol derivatives of monosubstituted benzenes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1935–1944 (1998) doi:10.1039/A800809D.
129. Hudlicky, T., Luna, H., Barbieri, G. & Kwart, L. Enantioselective synthesis through microbial oxidation of arenes. 1. Efficient preparation of terpene and prostanoid synthons. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 4735–4741 (1988).
130. Boyd, D. R. *et al.* Enzymatic and Chemical Syntheses of Cis-Dihydrodiol Derivatives of Monocyclic Arenes. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1630–1632 (1991) doi:10.1039/c39910001630.

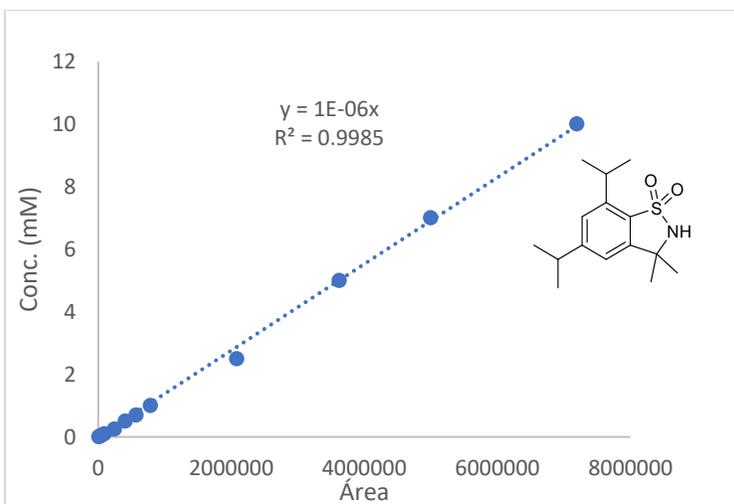
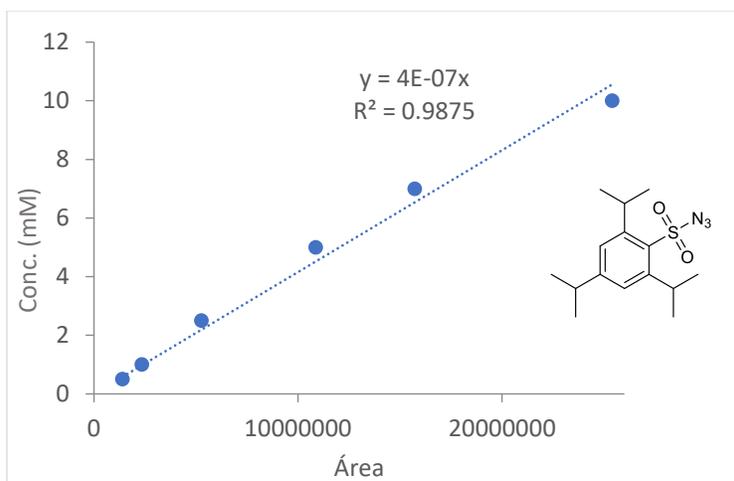
7. Anexo

7.1 Curvas de calibración









7.2 Cromatogramas HPLC

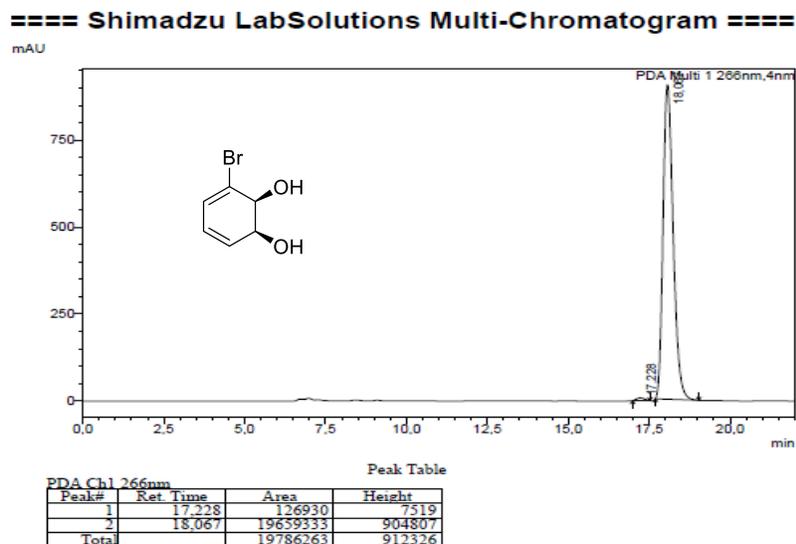


Figura 72: Cromatograma del producto 2a obtenido por biotransformación del bromobenceno con TDO nativa.

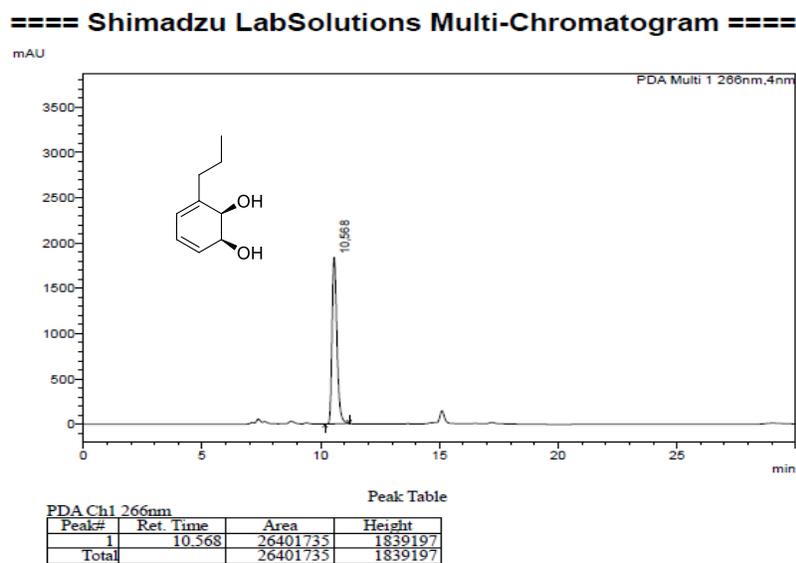


Figura 73: Cromatograma del producto 4a obtenido por biotransformación de propilbenceno con TDO nativa.

==== Shimadzu LabSolutions Multi-Chromatogram ====

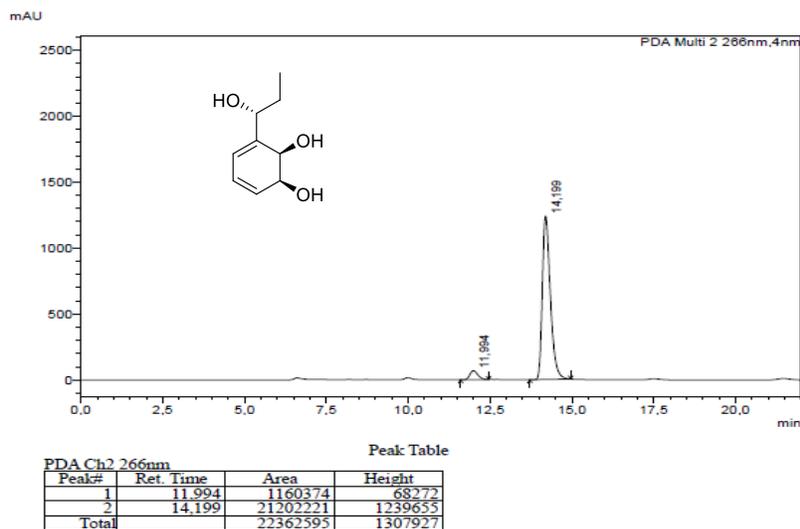


Figura 74: Cromatograma del producto 4b obtenido por biotransformación de propilbenceno utilizando TDO nativa.

==== Shimadzu LabSolutions Multi-Chromatogram ====

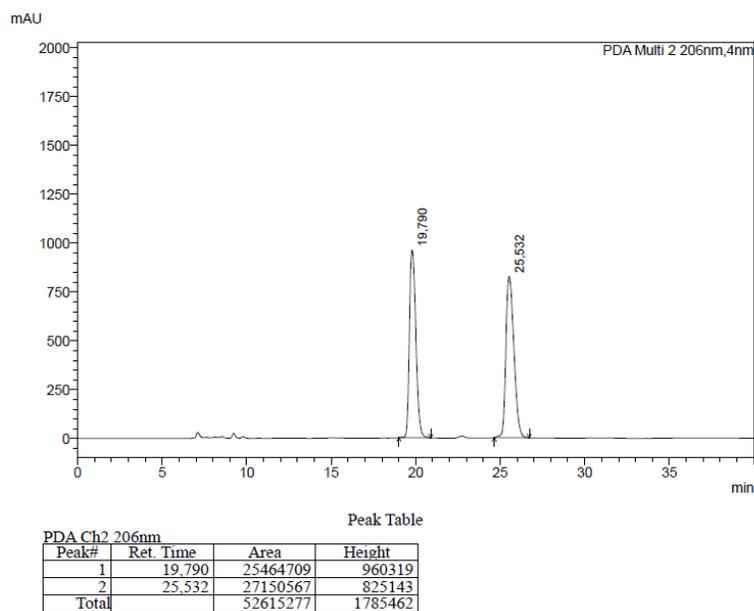


Figura 75: Cromatograma de la mezcla racémica del producto 5a obtenido por síntesis química.

==== Shimadzu LabSolutions Multi-Chromatogram ====

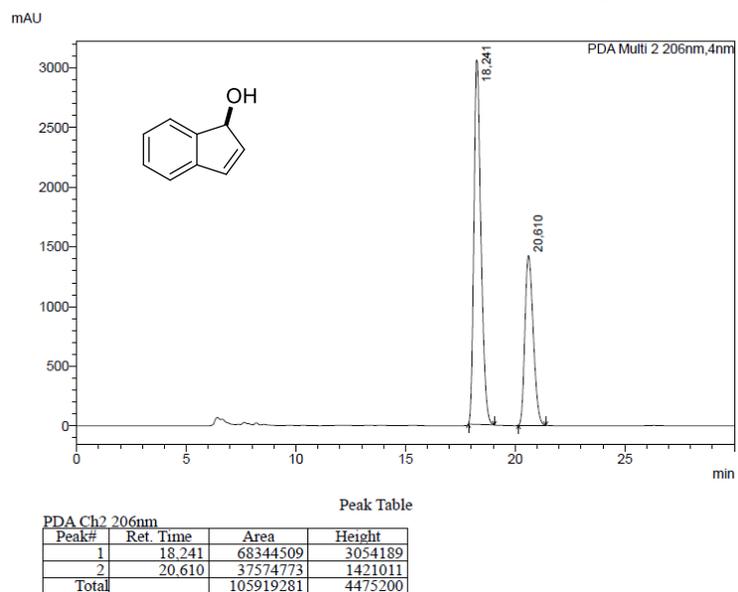


Figura 76: Cromatograma de la mezcla de enantiómeros del compuesto 5b obtenido por biotransformación del indeno con la TDO nativa.

==== Shimadzu LabSolutions Multi-Chromatogram ====

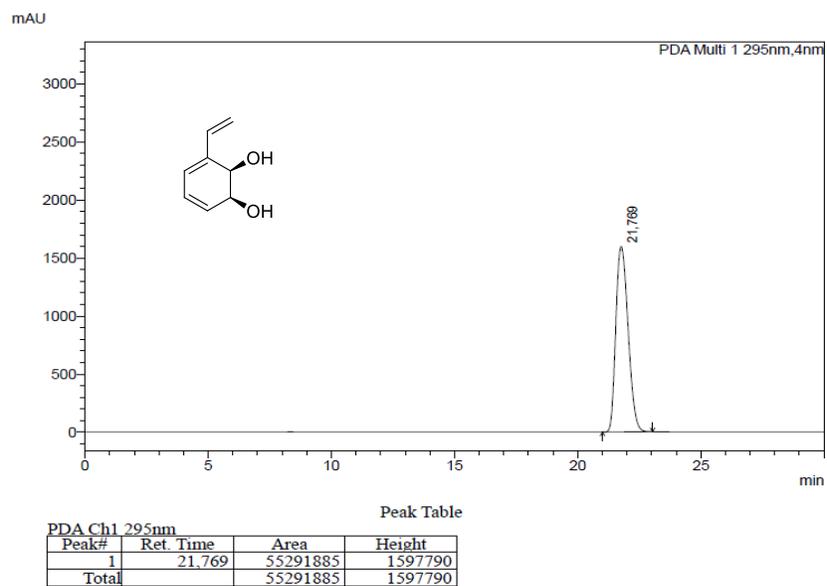


Figura 77: Cromatograma del producto 6a obtenido por biotransformación de estireno con TDO nativa.

==== Shimadzu LabSolutions Multi-Chromatogram ====

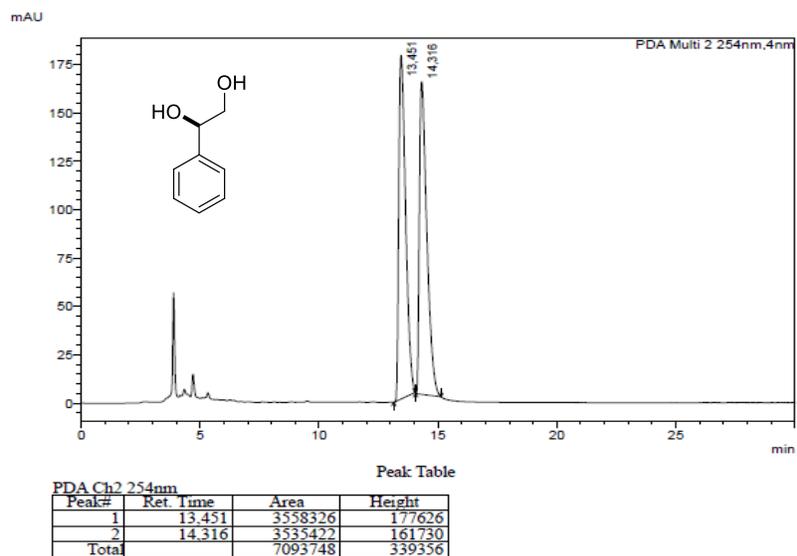


Figura 78: Cromatograma de la mezcla racémica de 6b obtenida por síntesis química.

==== Shimadzu LabSolutions Multi-Chromatogram ====

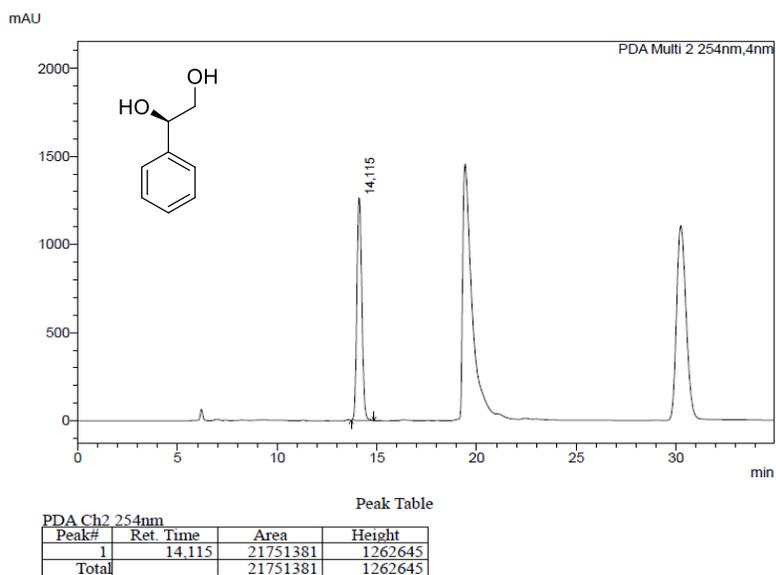


Figura 79: Cromatograma del producto 6b obtenido por biotransformación de estireno con TDO nativa.

8. Publicaciones

