



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Químicas**

**Ensayos con partes de plantas como
potenciales biocatalizadores de reacciones de
hidroxilación**

Nº 338

Soraya Isabel Dolian

Tutor: Luis E. Iglesias

Departamento de Investigaciones
Julio 2010

A la memoria de Pichu
A Mumi

Agradecimientos:

Al Dr. Luis E. Iglesias por haber aceptado ser mi tutor y por brindarme la oportunidad de seguir formándome a su lado.

Al Dr. Alberto Postigo por prestar las instalaciones de su laboratorio.

Al Dr. Jorge Martínez por su colaboración en la parte botánica.

A la Dra. Claudia Degrossi por interceder y facilitar la realización de los trámites ante las autoridades de la universidad.

A todos mis profesores.

A mis padres por haberme dado todo su cariño y confianza.

A mis hermanos: Dany y Pedri por quererme y cuidarme cuando lo necesité.

A Liliana por ser como una hermana y por compartir toda una vida de amistad.

A mis sobrinos: Simón, Andre y Pauli por los momentos de alegría que pasamos.

A Gaby por ser mi amiga del alma y por el mutuo aguante.

A mi prima Ale por estar presente en las buenas y en las malas.

A mis amigos Bettina, Daniel, Alfredo, Adu, Eduardo, Andrea, Manuel, Bárbara y Clau por seguir manteniendo la amistad desde que empezamos Veterinaria.

A Gabriela Goldenberg por formar parte de su staff musical y darme el tiempo que necesité para realizar este trabajo.

A mis compañeros de Facultad.

Indice

| | |
|--|----|
| Resumen | 6 |
| 1. Introducción..... | 6 |
| 1.1. Generalidades..... | 6 |
| Propiedades catalíticas de las enzimas | 7 |
| Tipos de biocatalizadores..... | 9 |
| Clasificación de las enzimas | 10 |
| 1.2. Reacciones catalizadas por óxidoreductasas | 11 |
| Deshidrogenasas..... | 11 |
| Oxidadas..... | 12 |
| Oxigenasas..... | 12 |
| 1.3. Oxigenasas..... | 13 |
| Monooxigenasas | 13 |
| Dioxigenasas | 15 |
| Reacciones de hidroxilación..... | 16 |
| 1.4. Empleo de plantas en biotransformaciones | 16 |
| Biotransformaciones usando cultivos de células vegetales | 17 |
| Biotransformaciones empleando enzimas aisladas de plantas | 18 |
| Biotransformaciones usando partes de plantas | 18 |
| 1.5. Objetivo del trabajo..... | 20 |
| 2. Parte experimental..... | 20 |
| 2.1. Generalidades..... | 20 |
| Fuentes de biocatalizadore..... | 20 |
| Reactivos y solventes | 20 |
| Métodos cromatográficos y equipamiento | 20 |
| Aislamiento del ácido acetilsalicílico..... | 21 |
| 2.2. Protocolo general para los ensayos utilizando partes de plantas | 21 |
| 3. Resultados y discusión | 21 |
| 3.1. Biorreducción de acetofenona con zanahoria (<i>Daucus carota</i>) | 21 |
| 3.2. Ensayos tendientes a reacciones de hidroxilación | 21 |
| 4. Conclusión | 23 |
| 5. Referencias | 23 |

Abreviaturas utilizadas

AAS: ácido acetilsalicílico
 AS: ácido salicílico
 CCD: cromatografía en capa delgada
 CDCl₃: cloroformo deuterado
 DMF: dimetilformamida
 e.e.: exceso enantiomérico
 Et: etilo
 EtO: etóxido
 LPP: lipasa pancreática porcina
 Me: metilo
 n-Pr: propilo
 Ph: fenilo
 Rf: Relación de frente
 RMN: resonancia magnética nuclear
 t-Bu: terbutilo
 UV: ultravioleta
 v/v: volumen/ volumen

Resumen

El objetivo de este trabajo fue intentar realizar reacciones de hidroxilación de diferentes sustratos aromáticos no naturales de estructura sencilla, elegidos como modelos. Para esto se utilizaron distintas partes vegetales como potencial fuente de oxigenasas: bulbos, raíces, rizomas, frutos y hojas de diversas plantas accesibles.

Se buscó así estudiar una metodología simple y directa para este tipo de reacciones, en contraste con los métodos sintéticos habitualmente empleados.

Aunque no se llegaron a obtener productos de hidroxilación con ninguno de los sustratos utilizados, se obtuvo reacción con el ácido acetilsalicílico, probablemente debido a la acción de hidrolasas presentes en las partes vegetales empleadas en este trabajo.

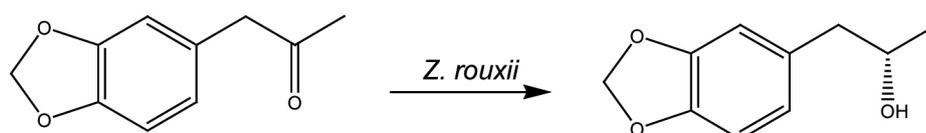
Introducción

1.1. Generalidades

Las biotransformaciones se definen como las reacciones catalizadas por enzimas, tanto aisladas como presentes en células enteras, sobre sustratos no naturales. *In vitro*, las enzimas son capaces de reconocer como sustratos a moléculas de una gran diversidad estructural, lo que sumado a las propiedades catalíticas de las enzimas, abre un importante potencial en química orgánica (Leresche y Meyer 2006).

Por eso, a lo largo de las dos últimas décadas se ha incrementado notablemente la incorporación de enzimas a las estrategias sintéticas convencionales.

Una de las aplicaciones más destacadas de las biotransformaciones en la industria es para la síntesis de fármacos. Por ejemplo, para la elaboración del Talampanol, un medicamento para el tratamiento de la epilepsia, se emplea como biocatalizador el hongo *Zygosaccharomyces rouxii*, que permite efectuar la siguiente transformación para la obtención de un precursor del fármaco (Esquema 1, Ran et al 2008).



Esquema 1. Obtención de un precursor del Talampanol usando *Zygosaccharomyces rouxii* como biocatalizador

Esta biotransformación ofrece una ventaja importante sobre los métodos químicos convencionales, que consiste en reducir una considerable cantidad de pasos de síntesis.

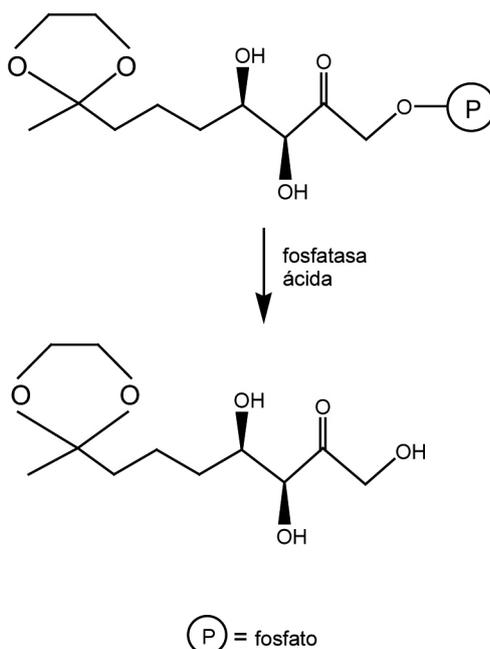
Cabe destacar que una de las diferencias fundamentales entre las biotransformaciones llevadas a cabo por células y las fermentaciones es que en estas últimas se usan microorganismos vivos que actúan sobre fuentes naturales de carbono y nitrógeno e involucran generalmente una secuencia compleja de reacciones químicas. En las biotransformaciones se usan sustratos no naturales para las enzimas y las células no se encuentran metabólicamente activas sino en estado quiescente. Desde el punto de vista sintético, otra ventaja de las biotransformaciones sobre las fermentaciones es que la cantidad de productos secundarios que se forman es mucho menor, esto sucede porque en las fermentaciones se encuentran más enzimas activas.

Propiedades catalíticas de las enzimas (Faber 2003a)

- *Las enzimas son catalizadores muy eficientes:* Las reacciones mediadas por enzimas pueden incrementar su velocidad en un factor de $10^8 - 10^{10}$. En general los biocatalizadores se utilizan en concentraciones de $10^{-3} - 10^{-4} \%$, mientras que los catalizadores químicos se emplean en valores de 0,1- 1 %. Por lo tanto las reacciones catalizadas por enzimas son más eficientes por varios órdenes de magnitud que los catalizadores químicos.
- *Las enzimas son catalizadores sustentables y compatibles con el medio ambiente:* A diferencia de otros catalizadores químicos, las enzimas son biodegradables y su utilización no genera riesgos de contaminación ni formación de residuos tóxicos. Desde hace varios años se presta especial énfasis en el desarrollo de nuevas tecnologías químicas que permitan el crecimiento sostenido, generando lo que se llamó "Green Chemistry" (término acuñado en los EEUU en la década de los '90) o, preferiblemente, "Química Sustentable". Desde entonces, se desarrolla una muy intensa actividad para la recuperación de medios contaminados y la generación de tecnologías benignas. La Química Sustentable busca prevenir la contaminación y diseña productos y metodologías químicas para una aplicación sostenible.
- *Las enzimas actúan bajo condiciones suaves de reacción:* Las enzimas actúan en un rango de pH entre 5-8, típicamente cercano a la neutralidad. Además son capaces de actuar a temperaturas entre 20 y 60 °C. De esta manera, se minimiza la aparición de productos secundarios, debido a descomposiciones, isomerizaciones o racemizaciones que suelen ocurrir en condiciones más extremas de pH, temperatura y presión. Por otro lado, utilizar condiciones suaves disminuye los costos en los procesos de escalado de las reacciones.
- *Pueden ser compatibles con diferentes biocatalizadores:* Las enzimas funcionan bajo idénticas o similares condiciones, lo que facilita que muchas reacciones de biocatálisis puedan ser llevadas a cabo secuencialmente en un mismo recipiente. Esto es factible utilizando un sistema multienzimático con el fin de simplificar el proceso de reacción.
- *Catalizan una gran cantidad de reacciones* y muchas enzimas pueden utilizarse para catalizar tanto una reacción como la inversa, como las hidrolasas.
- *Reconocen como sustratos a moléculas de estructura muy variada:* Las enzimas aceptan una amplia variedad de sustratos no naturales de estructuras diversas y pueden actuar en medios diferentes a los naturales. Muchas enzimas, como las lipasas, poseen actividad en solventes orgánicos.
- *Los biocatalizadores poseen una alta selectividad:* Esta ventaja posibilita que las reacciones aumenten su rendimiento y se facilita la separación y purificación del producto, con respecto a una reacción no selectiva. De esta manera los costos y tiempos de reacción se reducen de forma significativa.

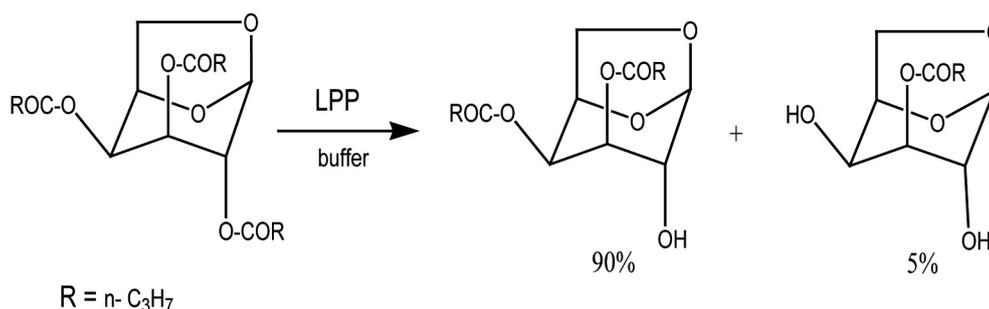
Las enzimas presentan tres tipos de selectividad:

Quimioselectividad: Se produce cuando en sustratos con grupos funcionales de reactividad química similar, hay un grupo que presenta preferencia a reaccionar. Un ejemplo de quimioselectividad es la hidrólisis enzimática de ésteres fosfato (Esquema 2).



Esquema 2. Hidrólisis enzimática de ésteres fosfato

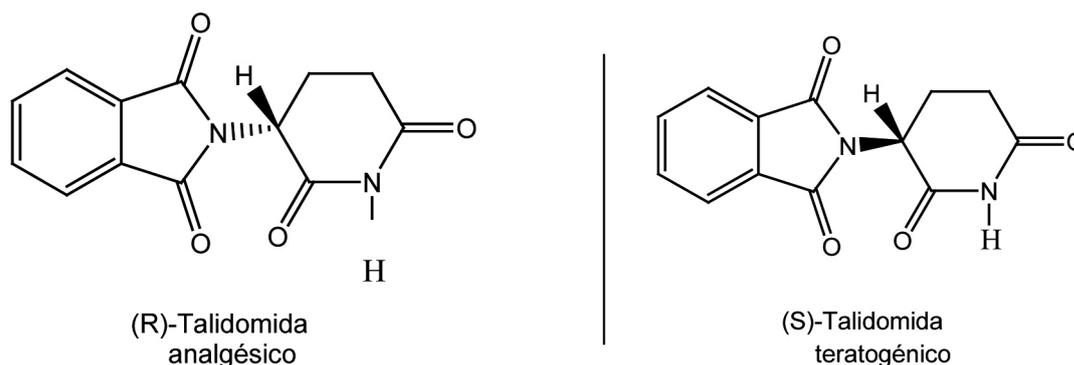
Regioselectividad: Si una molécula posee varios grupos funcionales iguales, las enzimas pueden distinguir entre ellos, para producir mayoritariamente uno o varios isómeros estructurales sobre todos los que se pueden formar. Un ejemplo de regioselectividad (Esquema 3), es la hidrólisis de ésteres derivados de hidratos de carbono catalizada por la lipasa pancreática porcina.



Esquema 3. Hidrólisis regioselectiva de ésteres catalizada por la lipasa pancreática porcina

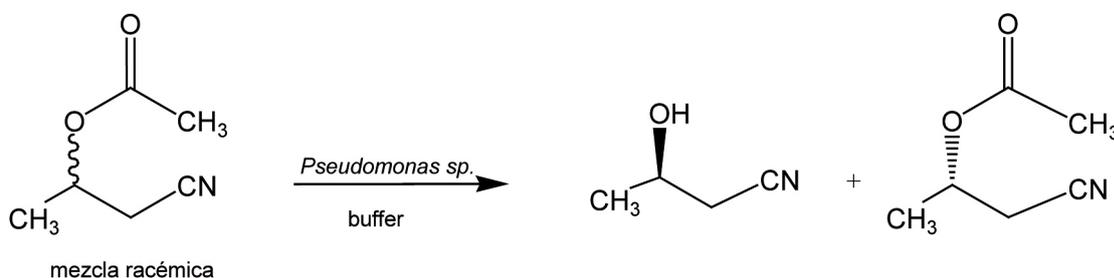
Esteroselectividad: Se da en las reacciones que tienen como productos uno o algunos de todos los estereoisómeros posibles. Los enantiómeros de los compuestos activos de productos farmacéuticos, agroquímicos y de la industria alimenticia suelen causar distintos efectos biológicos. Separar enantiómeros es difícil, las biotransformaciones son un método sencillo para lograr este objetivo porque la mayoría de las enzimas presentan una alta selectividad con respecto a la quiralidad del sustrato cuyas reacciones catalizan, y esto es una de las propiedades más importantes en la aplicación de biotransformaciones.

Probablemente el más conocido y trágico ejemplo de una droga en la que su enantiómero causó serios efectos fue la Talidomida, la cual fue administrada como mezcla racémica en los años '60. No se sabía que el efecto analgésico residía en el enantiómero (R) pero el (S) era altamente teratogénico (Esquema 4).



Esquema 4. Efecto biológico de los enantiómeros (R)- Talidomida y (S)- Talidomida

A modo de ejemplo de una biotransformación estereoselectiva cabe citar la siguiente reacción (Esquema 5).



Esquema 5. Reacción de hidrólisis estereoselectiva catalizada por *Pseudomonas sp.*

Si bien se describió hasta aquí los numerosos beneficios de trabajar con biocatalizadores, éstos presentan algunas desventajas:

Las enzimas son propensas a sufrir inhibiciones por sustratos o productos, lo que causa una disminución en el rendimiento del proceso.

Se inactivan cuando se trabaja a temperaturas o pH muy extremos.

Tipos de biocatalizadores (Faber 2003a)

En una biotransformación se pueden emplear células enteras o enzimas aisladas, que pueden también estar libres o inmovilizadas (Tabla 1). La decisión del biocatalizador a utilizar depende de muchos factores, como por ejemplo su costo, del tipo de reacción, de la necesidad de emplear cofactores y de la escala en la cual la biotransformación se lleva a cabo.

Muchas reacciones enzimáticas, en particular las oxidaciones y reducciones, requieren el uso de cofactores, por ejemplo el NAD y NADP. Estos cofactores son inestables y caros, por lo que es necesario reciclarlos. Si se trabaja con células enteras desaparece la necesidad de agregar y reciclar cofactores. Por otra parte, el uso de enzimas aisladas incrementa la productividad, ya que la tolerancia a mayor concentración de sustrato es mayor y además pueden ser ventajosas en cuanto a costos, porque en general no es necesario que estén puras.

La mayor parte de las enzimas usadas en biotransformaciones se emplean en forma cruda. Las preparaciones enzimáticas contienen 1- 30 % de enzima, y el resto son carbohidratos, lípidos, sales o proteínas del medio del cual han sido aisladas. Se ha encontrado que las preparaciones enzimáticas crudas tienen más actividad que las enzimas purificadas, esto se debe a que en el crudo las enzimas se encuentran más estabilizadas.

| | Modalidad | Ventajas | Desventajas |
|-------------------------|---|---|---|
| Enzimas Aisladas | <i>EN TODAS SUS FORMAS</i> | Manejo experimental simple. Mayor productividad. | Necesidad de reciclar cofactores, si es el caso. |
| | <i>DISUELTAS EN AGUA</i> | Mayor actividad enzimática. | Sustratos insolubles, necesidad de extracciones. |
| | <i>SUSPENDIDAS EN SOLVENTE ORGÁNICO</i> | Solubilidad de sustratos. Fácil recuperación de la enzima. | Actividad enzimática reducida. |
| | <i>INMOVILIZADAS</i> | Fácil recuperación de la enzima y del producto. | Eventual pérdida de la actividad en la inmovilización. |
| Células Enteras | <i>EN TODAS SUS FORMAS</i> | No hay necesidad de reciclar cofactores. | Manejo experimental menos simple, menor productividad, baja tolerancia a solventes orgánicos. Reacciones laterales |
| | <i>QUIESCENTES</i> | Pocos productos secundarios | Menor actividad. |
| | <i>INMOVILIZADAS</i> | Posibilidades de reuso | Menor actividad. |
| | | | |

Tabla 1. Ventajas y desventajas del uso de enzimas aisladas o células enteras en biotransformaciones

Clasificación de las enzimas (Faber 2003a)

La IUB (Internacional Union of Biochemistry), ha reconocido hasta la actualidad más de 3.200 clases de enzimas, que representan sólo el 10 %, ya que se estima que aún quedan unas 25.000 por ser descubiertas. Esta comisión clasifica las enzimas de acuerdo con el tipo de reacción catalizada en: óxidorreductasas, transferasas, liasas, hidrolasas, isomerasas y ligasas.

Las enzimas más usadas en biotransformaciones (Tabla 2) son las hidrolasas (60%), en segundo lugar, las óxidorreductasas (25%), luego le siguen las liasas (7%) y transferasas (5%). Por último las menos usadas para la catálisis enzimática son las isomerasas (2%) y las ligasas (1%).

| Categoría | Ejemplos de reacción catalizada | Ejemplos |
|-------------------------|--|---|
| <i>OXIDORREDUCTASAS</i> | Reacciones redox, Oxigenación de C-H, C-C, C=C; hidroxilaciones y epoxidaciones | Deshidrogenasas, oxigenasas oxidasas |
| <i>TRANSFERASAS</i> | Transferencia de fragmentos activados a moléculas receptoras (azúcares, aldehídos, cetonas, acilos, fosforilos o metilos) | Transaminasas |
| <i>HIDROLASAS</i> | Hidrólisis y formación de ésteres, amidas, lactamas, lactonas, péptidos, enlaces glicosídicos. Hidrólisis de epóxidos y nitrilos. | Lipasas, esterasas, acilasas, proteasas, fosfolipasas, glicosidasas |
| <i>LIASAS</i> | Reacciones de adición y eliminación de pequeñas moléculas a dobles enlaces (C=C, C=O, C=N) | Aldolasas, fumarasas |

Tabla 2. Clasificación de las enzimas

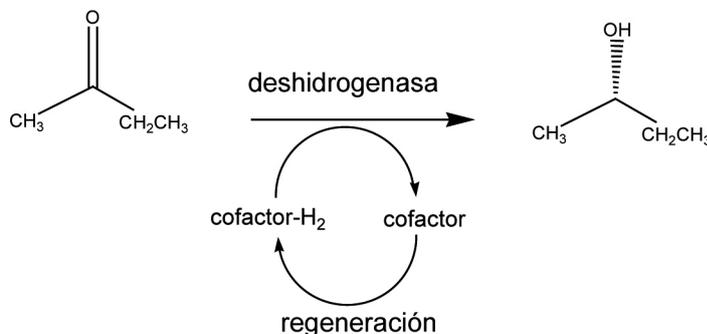
1.2. REACCIONES CATALIZADAS POR OXIDORREDUCTASAS (Faber 2003b)

Como se comentó, en el área de las biotransformaciones, las enzimas que catalizan reacciones de oxidorreducción son las que se emplean en segundo orden de importancia, luego de las enzimas hidrolíticas. Estos biocatalizadores se clasifican en tres categorías: *deshidrogenasas*, *oxidasas* y *oxigenasas*.

Deshidrogenasas

Son ampliamente usadas, principalmente para catalizar estas reacciones:

Reducción del grupo carbonilo de aldehídos y cetonas (Esquema 6).

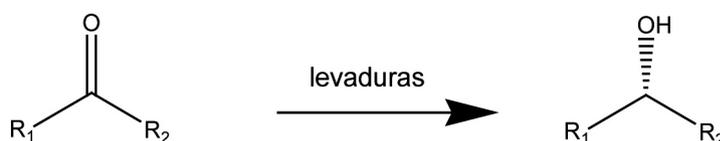


Esquema 6: reacción de reducción del grupo carbonilo usando deshidrogenasas.

A diferencia del uso de deshidrogenasas aisladas, cuyos cofactores deben agregarse y posteriormente reciclarse, el empleo de células enteras es ventajoso ya que contienen todos los cofactores necesarios y las vías metabólicas adecuadas para su regeneración. De esta manera se omite la necesidad de tener que reciclar los cofactores.

Uno de los microorganismos más usados en la reducción de aldehídos y cetonas son las levaduras panaderas (*Saccharomyces cerevisiae*), su empleo se debe a que su uso no necesita equipamiento especial de laboratorio, poseen una alta estereoselectividad, son económicas y disponibles con facilidad.

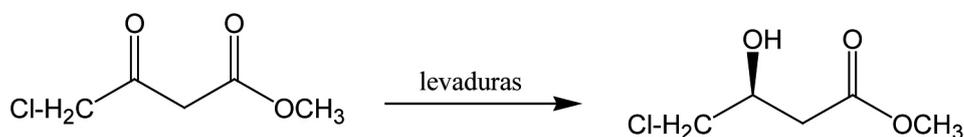
Las cetonas aromáticas y alifáticas son reducidas por las levaduras de acuerdo a la regla de Prelog para obtener los correspondientes (S)- alcoholes con un alto grado de pureza óptica (Esquema 7).



| R1 | R2 | % e.e. |
|--------|-------------|--------|
| metilo | etilo | 67 |
| metilo | butilo | 82 |
| metilo | fenilo | 89 |
| metilo | 3-hexenilo | 94 |
| etilo | ciclohexilo | 95 |

Esquema 7. Reacción general de reducción de cetonas usando levaduras

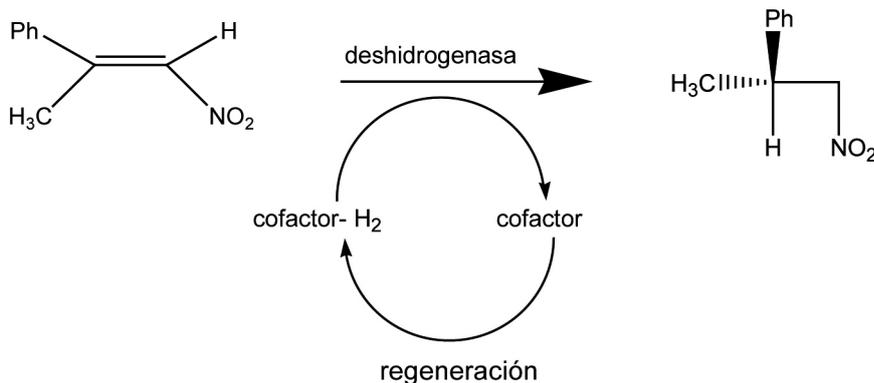
Esta elevada estereoselectividad ha impulsado la aplicación en química orgánica de reacciones de reducción empleando células enteras tanto a compuestos carbonílicos monofuncionales como a cetoésteres (Esquema 8).



Esquema 8. Reducción de cetoésteres usando levaduras como biocatalizadores

Uniones doble carbono-carbono (C=C).

Las enzimas que catalizan la reducción enantioselectiva de las uniones dobles de carbonos proquirales actúan con una alta selectividad y son aplicables a una amplia gama de sustratos (Esquema 9).



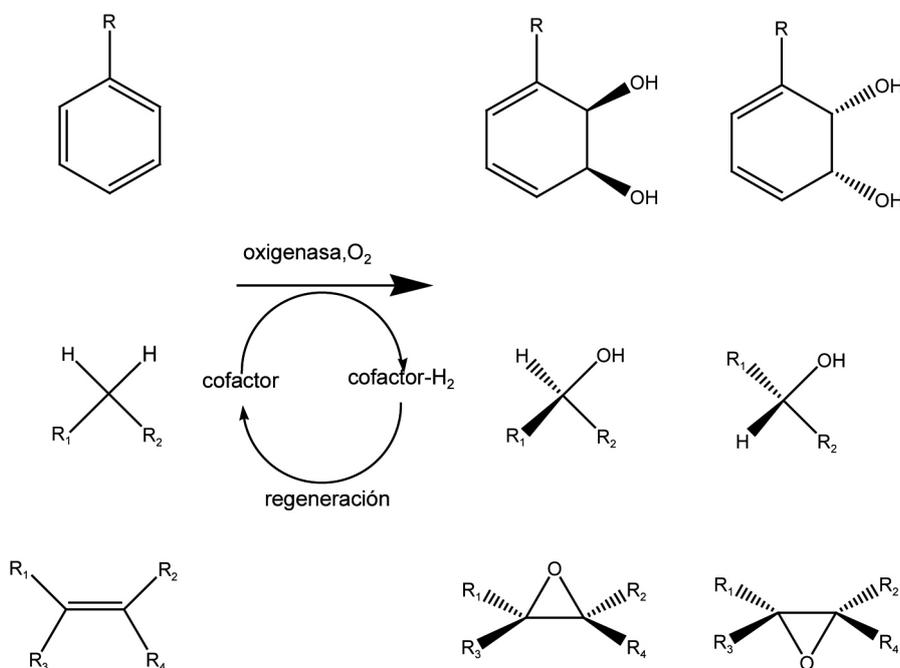
Esquema 9. Reacciones de reducción de uniones C=C catalizadas por deshidrogenasas

Oxidasas

Son las responsables de la transferencia de electrones, son las menos empleadas en biotransformaciones, aunque en los últimos tiempos, hay una tendencia a incrementar su uso. Un ejemplo es el uso a gran escala de la D-glucosa oxidasa en combinación con enzimas catalasas como antioxidante en los alimentos.

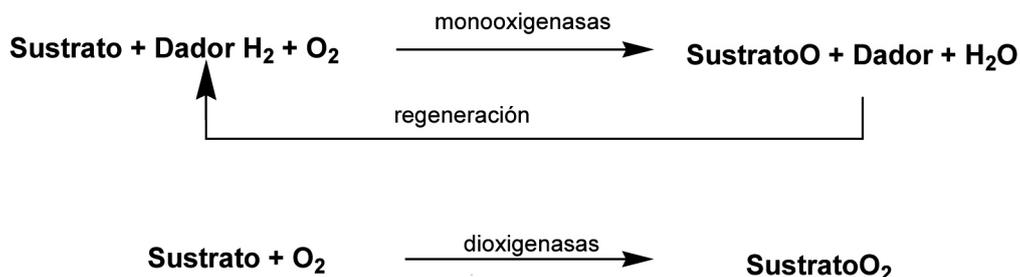
Oxigenasas

Reciben este nombre las enzimas que catalizan la incorporación directa de oxígeno molecular en un compuesto orgánico. Su gran potencial en química orgánica reside en su capacidad de funcionalizar carbonos no reactivos de alcanos y alquenos y en muchos casos, estas biotransformaciones no tienen una contrapartida en síntesis orgánica. Por otra parte, estas funcionalizaciones, como se ve en los ejemplos del Esquema 10, transcurren con notables regio- y estereoselectividades.



Esquema 10. Reacciones catalizadas por oxigenasas

Dentro de las oxigenasas existen dos subgrupos: monooxigenasas y dioxigenasas (Esquema 11).



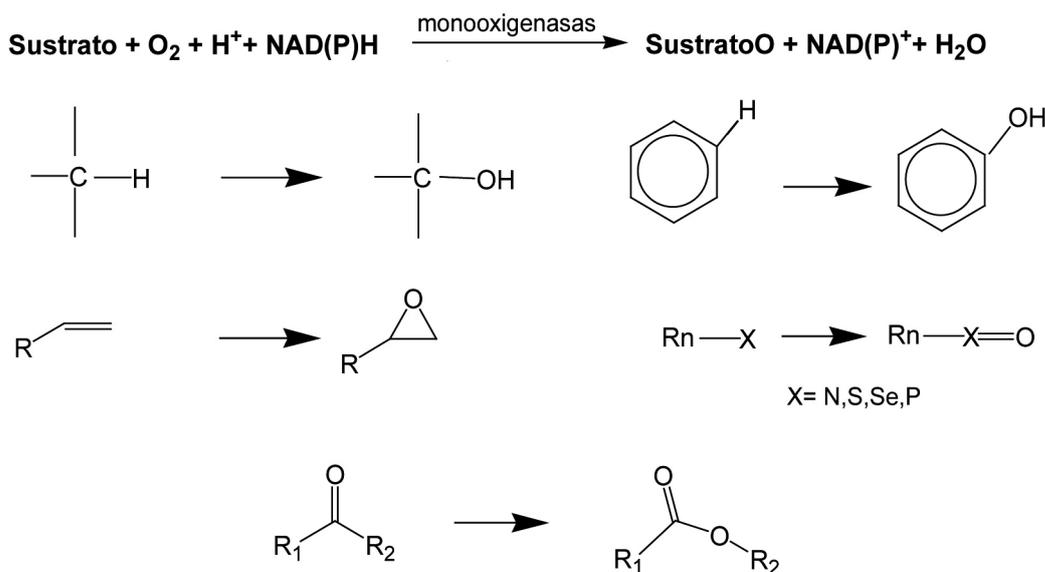
Esquema 11. Esquema general de reacciones catalizadas por mono- y dioxigenasas

1.3. OXIGENASAS

Monooxigenasas

Aunque el mecanismo de reacción de varias monooxigenasas difiere significativamente dependiendo del subtipo de enzimas, el modo de activación del oxígeno es el mismo. El oxígeno molecular es activado por reducción a expensas de un agente reductor, usualmente NADH ó NADPH, que sirve como fuente final de equivalentes redox. Uno de los átomos de oxígeno es transferido al sustrato, el otro es reducido para formar agua (ver Esquema 11).

En el siguiente ejemplo pueden verse las principales reacciones catalizadas por monooxigenasas (Esquema 12).

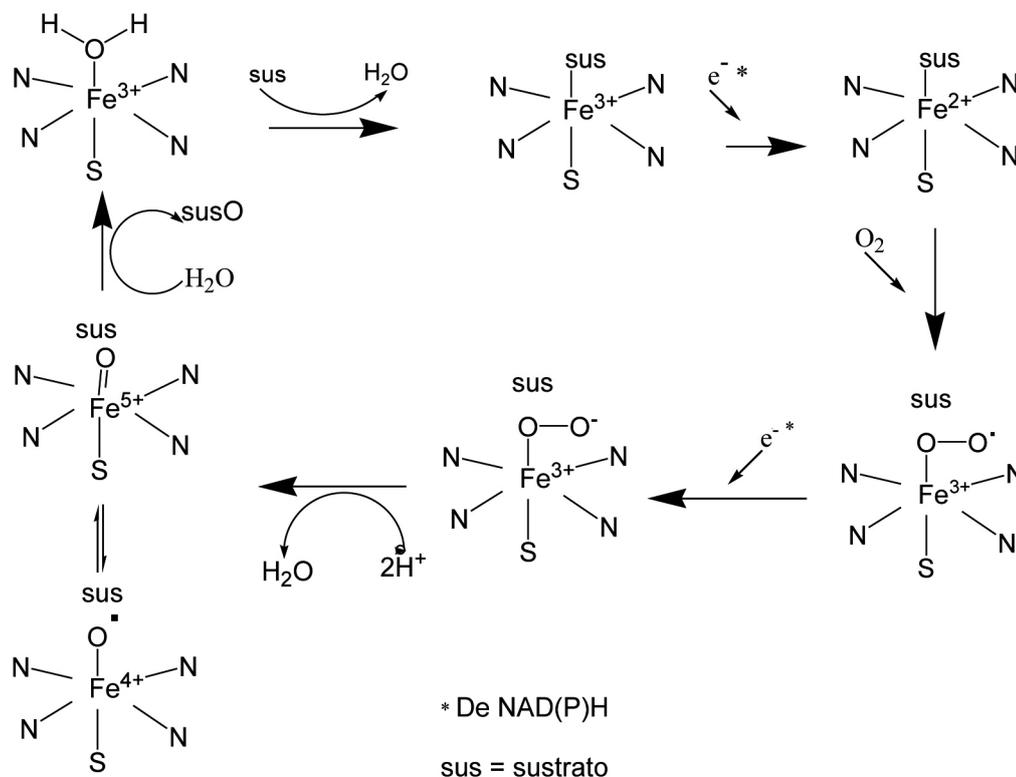


| Sustrato | Producto | Tipo de reacción | Tipo de cofactor |
|------------------------------|---------------|------------------|-------------------------|
| alcano | alcohol | hidroxilación | dependiente de metales |
| aromático | fenol | hidroxilación | dependiente de metales |
| alqueno | epóxido | epoxidación | dependiente de metales |
| con heteroátomo ^a | óxido | oxidación | dependiente de flavinas |
| cetona | éster/lactona | Baeyer-Villiger | dependiente de flavinas |

^a N, S, Se ó P

Esquema 12. Reacciones catalizadas por monooxigenasas

La generación de especies de transferencia de oxígeno activado es mediada por cofactores que contienen metales de transición (Fe ó Cu) o por un sistema heteroaromático, típicamente una flavina. El ciclo catalítico de monooxigenasas dependientes de hierro, la mayoría de las cuales pertenecen al citocromo P-450 se muestra en el Esquema 13.



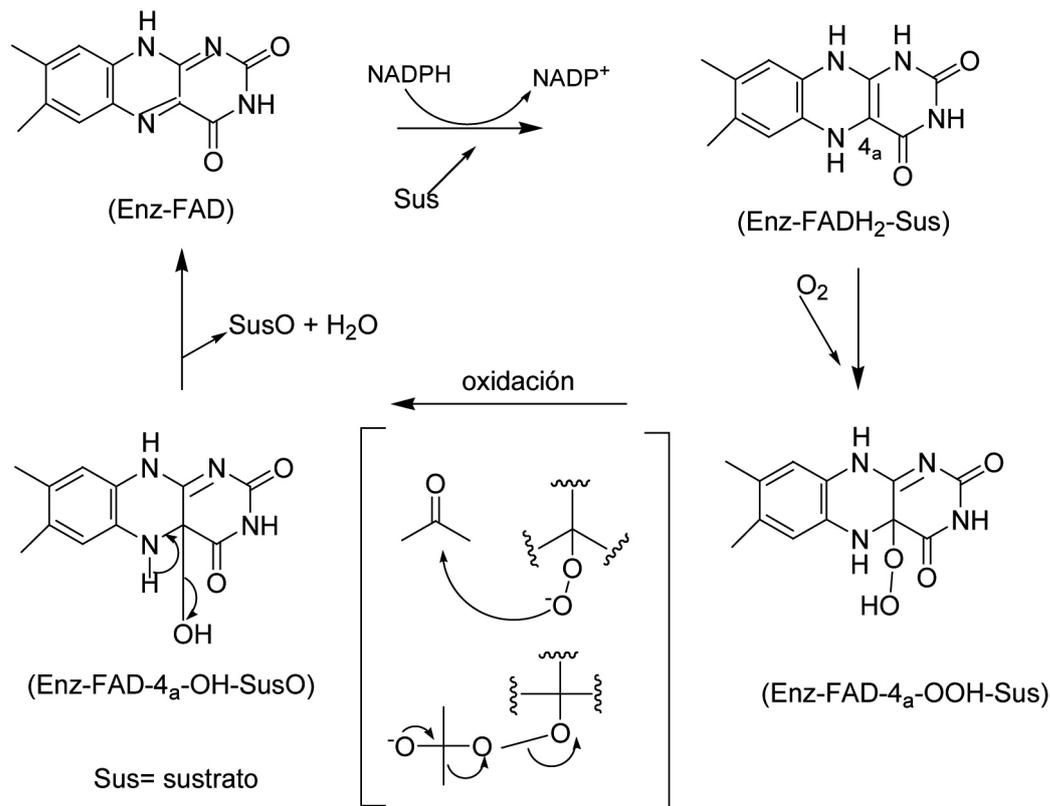
Esquema 13. Ciclo catalítico de monooxigenasas dependientes de hierro

El hierro es coordinado por el grupo hemo y por un átomo de azufre de residuos de cisteína. Después de unirse al sustrato, el hierro es reducido al estado ferroso. Un electrón es entregado desde el NAD(P)H que forma parte de otro cofactor dependiente de monooxigenasas (puede ser flavín nucleótido, ferredoxina o el citocromo b_5). Luego el oxígeno molecular se une para formar el complejo dioxígeno citocromo P-450. La incorporación de un segundo electrón debilita la unión O-O y permite la división de la molécula de oxígeno. Un átomo es expulsado como agua y el segundo forma parte de la especie oxidada Fe^{4+} o Fe^{5+} y ataca el sustrato. Por último se elimina el producto (susO), se reformula la especie Fe^{3+} y se cierra el ciclo catalítico.

El citocromo P-450 no se trata de una única enzima, sino que en realidad es una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies, desde bacterias a mamíferos, y de las que ya se han identificado más de 2000 isoformas diferentes. Todos los P-450s conocidos se nombran siguiendo un criterio común y se agrupan en familias y subfamilias en función de la similitud en la secuencia del ADN que los codifica. Las familias 1, 2 y 3 están constituidas por enzimas encargadas de la biotransformación de xenobióticos, mientras que el resto de familias incluyen P-450s que intervienen en la biosíntesis y el metabolismo de compuestos endógenos. Una de las características más significativas de los citocromos P-450 es su baja especificidad, lo que permite que sean capaces de metabolizar un número casi ilimitado de sustratos, principalmente a través de reacciones de oxidación, pero también de reducción e hidrólisis. Las oxidaciones catalizadas por el P-450 son reacciones de monooxigenación dependientes de NADH y NADPH y para las que se utiliza oxígeno molecular. Como consecuencia de estas reacciones el citocromo P-450 acelera la eliminación del organismo de gran número de fármacos y compuestos tóxicos, pero también es el responsable de la activación de toxinas o precarcinógenos. En el hombre, los P-450s están ampliamente distribuidos por todo el organismo, si bien el hígado es el órgano con mayor expresión de estas enzimas.

Por otra parte, las monooxigenasas dependientes de flavinas involucran un mecanismo distinto al anterior (Esquema 14). Primero el NADPH reduce el complejo Enz-FAD. El $FADH_2$ formado es oxidado y se forma la especie hidroperóxido ($FAD-4_a OOH$), que posteriormente se desprotona y se obtiene el anión peróxido que es sometido al ataque nucleofílico del grupo carbonilo del sustrato, generalmente aldehído

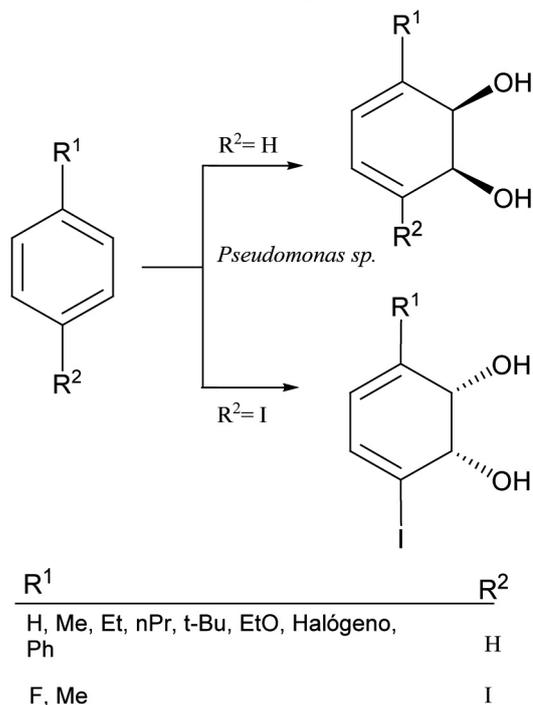
o cetona. Se forma una especie tetraédrica que sufre un reordenamiento y se obtiene como producto un éster o lactona. Finalmente se elimina una molécula de agua del FAD-4_a-OH y el FAD es regenerado.



Esquema 14. Ciclo catalítico de monooxigenasas dependientes de flavinas

Dioxigenasas

Incorporan simultáneamente ambos oxígenos atómicos del O₂ en el sustrato con la formación de peróxidos e hidroperóxidos que generan alcoholes y dioles. Un ejemplo es la *cis*-dihidroxilación de compuestos aromáticos catalizadas por dioxigenasas de microorganismos como *Pseudomonas sp.* (Esquema 15).

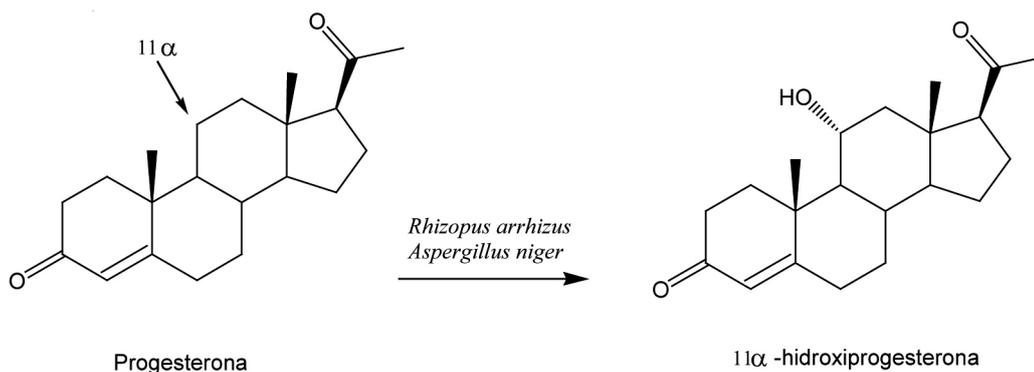


Esquema 15. Reacción de *cis*-dihidroxilación catalizada por dioxigenasas de *Pseudomonas sp.*

Reacciones de hidroxilación (Faber 2003b).

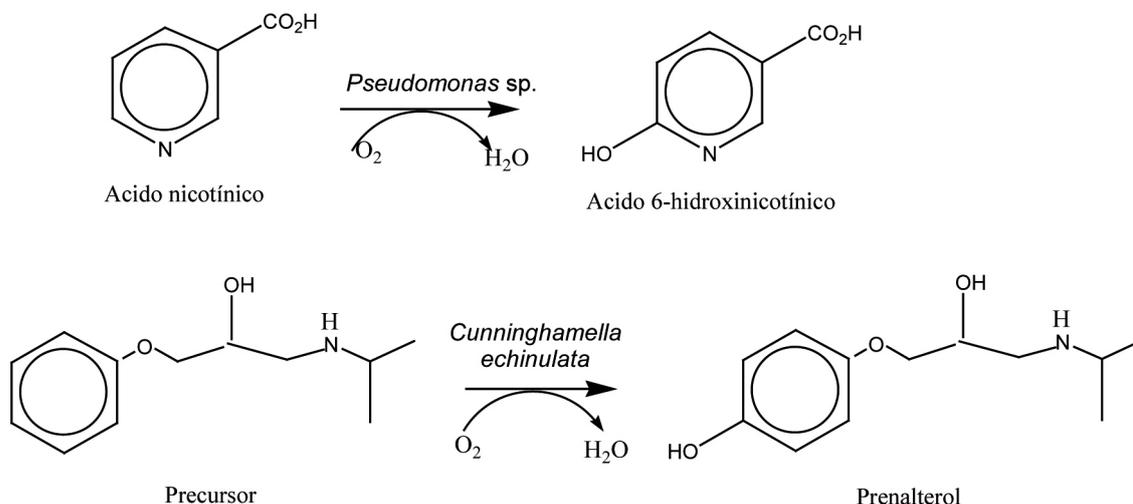
Dentro de las reacciones catalizadas por monooxigenasas, la hidroxilación de centros no reactivos en hidrocarburos es una de las más aplicadas en biotransformaciones debido a que no hay procesos homólogos en un solo paso en la química orgánica convencional.

Los terpenos y esteroides se han estudiado intensamente asociados a las hidroxilaciones microbianas y en la actualidad, eligiendo el microorganismo adecuado, se pueden hidroxilar regio- y selectivamente. Por ejemplo, la hidroxilación de la progesterona por *Rhizopus arrhizus* o *Aspergillus niger* en la posición 11 α reduce a menos de la mitad los pasos que se emplean en la síntesis convencional de 11 α -hidroxiprogesterona y hacen que esté disponible para los tratamientos hormonales a un costo razonable (Esquema 16).



Esquema 16. Hidroxilación regioselectiva de esteroides

Los compuestos aromáticos pueden ser hidroxilados regioselectivamente por monooxigenasas presentes en células enteras. Como lo muestra el Esquema 17, la producción del ácido 6-hidroxinicotínico en escala industrial a partir del ácido nicotínico es catalizada por monooxigenasas presentes en *Pseudomonas* sp. En el caso del prenalterol, compuesto de importancia farmacológica por presentar actividad como β -bloqueante, es obtenido por *p*-hidroxilación regioselectiva de un precursor aromático usando *Cunninghamella echinulata*.



Esquema 17. Reacciones de hidroxilación de compuestos aromáticos

1.4. Empleo de plantas en biotransformaciones (Giri et al 2001)

Los cultivos celulares de plantas son una fuente de producción de metabolitos secundarios y además tienen la capacidad de transformar sustratos exógenos no naturales. *In vitro*, tanto los cultivos celulares como enzimas aisladas de plantas pueden llevar a cabo biotransformaciones de una amplia variedad de compuestos, que incluyen esteroides, alcaloides, cumarinas, terpenoides y aromáticos, y como ya se mencionó, las reacciones mediadas por biocatalizadores son regio y estereoselectivas. Los tipos de reacciones incluidas son las oxidaciones, reducciones, hidroxilaciones, metilaciones, acetilaciones, isomerizaciones, glicosilaciones y esterificaciones.

Existen numerosos ejemplos de aplicación de biotransformaciones usando enzimas de plantas, aisladas o presentes en sus células, y tienen un gran potencial para la producción de productos farmacéuticos (Tabla 3).

| <u>Planta</u> | <u>Precursor</u> | <u>Producto</u> |
|------------------------------|--------------------|----------------------------------|
| <i>Astasia longa</i> | (R)-y (S)-Carvona | Dihidrocarvona |
| <i>Catharanthus roseus</i> | Vinblastina | Vincristina |
| <i>Centella asiatica</i> | Tiocolchicina | 2-O y 3-O-monoglucosil derivados |
| <i>Coffea arabica</i> | Teobromina | Cafeína |
| <i>Daucus carota</i> | Codeinona | Codeína |
| <i>D. carota, N. tabacum</i> | Acetofenona | Alcohol (R) y (S)-fenetílico |
| <i>Glycyrrhiza glabra</i> | Papaverina | Papaverinol |
| <i>Mucura pruriens</i> | L-Tirosina | L-DOPA |

Tabla 3. Biotransformaciones llevadas a cabo por enzimas presentes en plantas

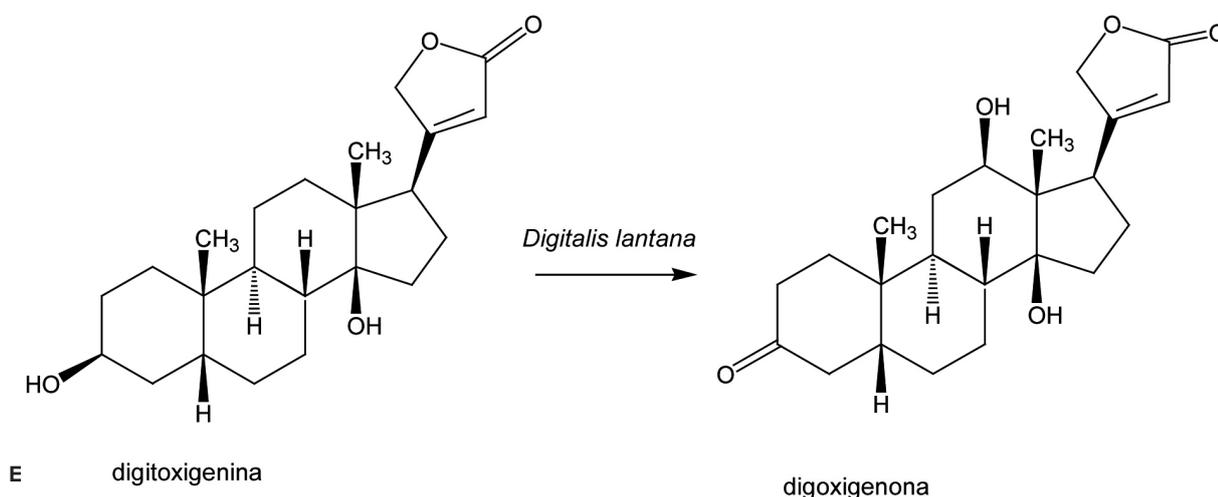
Biotransformaciones usando cultivos de células vegetales

La bioconversión empleando cultivos de células vegetales depende de ciertos factores como la solubilidad de los precursores, el porcentaje de la actividad enzimática, la localización de las enzimas, reacciones colaterales que dan productos no deseados y presencia de enzimas que degradan los productos esperados. La variación en el pH, permeabilización y efectos osmóticos también influyen en la capacidad de bioconversión de las células. Los alcoholes orgánicos y el dimetilsulfóxido se usan para promover la fijación del sustrato y la liberación del producto.

Tal como se mencionó en la página anterior, los principales tipos de biotransformaciones son los mencionados a continuación:

Hidroxilaciones

Por ejemplo, cultivos de células en suspensión de *Catharanthus roseus* hidroxilan geraniol, nerol, (+) y (-) carvona a 5β-hidroxi neodihidroxicarveol. Otra biotransformación aplicada a la industria farmacéutica es la obtención de digoxigenona, catalizada por monooxigenasas presentes en *Digitalis lantana* (Esquema 18).



Glicosilaciones

Las reacciones de glicosilación son de especial interés porque facilitan la conversión de compuestos insolubles en agua en solubles. Los cultivos celulares de plantas juegan un papel importante en este tema, ya que llevar a cabo este tipo de reacciones mediante síntesis química convencional es dificultoso.

Los cultivos celulares de plantas pueden aceptar una amplia variedad de sustratos como fenoles y ácido fenilpropanoico. Por ejemplo, el ácido butírico, que es un potente inhibidor de la proliferación de células tumorales in vitro, tiene una aplicación limitada porque posee una vida media corta. Para prolongar la bioactividad de este compuesto se usan las reacciones de glicosilación usando cultivos de células en suspensión de *Nicotiana plumbaginifolia* para obtener 6-O-butiril-D-glucosa.

Oxido-reducciones

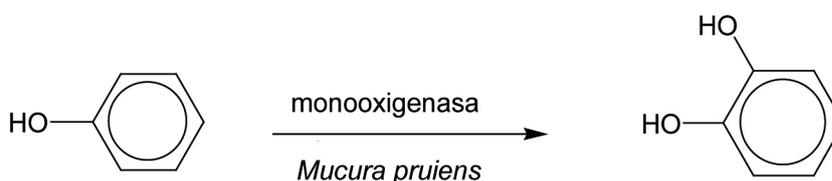
Estas reacciones son útiles para convertir estereoselectivamente alcoholes bicíclicos y monoterpénicos en sus correspondientes cetonas mediante el uso de cultivos celulares de plantas como *Nicotiana tabacum*.

Una desventaja de los cultivos en suspensión es el fenómeno de variación somaclonal, que se define como la variación genética producida por la recomposición del ADN al dividirse las células de plantas desarrolladas en cultivos, ocasionando un comportamiento inestable en los mismos. Realizando continuos *screenings* se mantiene una alta productividad de la línea celular.

Para garantizar buenas condiciones de trabajo, catalizadores estables y reusables, una alternativa para lograr la contención de las enzimas en un medio estable es el empleo de células inmovilizadas de plantas, que además pueden ser usadas repetidamente y por largos periodos.

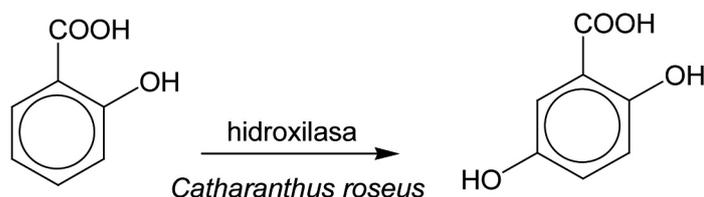
Biotransformaciones empleando enzimas aisladas de plantas

Comparado con el empleo de células enteras, el uso de enzimas aisladas en biotransformaciones depende del balance entre el costo del aislamiento y lograr una eficiencia superior en la bioconversión. Además se debe tener en cuenta como ya se mencionó, que las enzimas aisladas pueden requerir el agregado de cofactores y la necesidad de reciclarlos. En el Esquema 19 se muestra una biotransformación empleando enzimas aisladas de plantas.



Esquema 19. Biotransformación usando enzimas vegetales aisladas

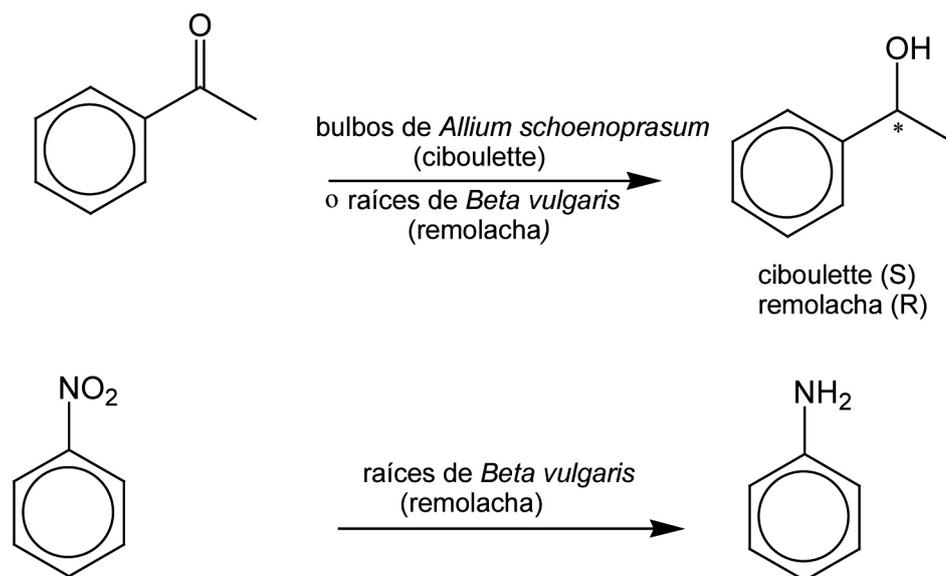
Otro ejemplo es el empleo de enzimas aisladas de cultivos de células de *Catharanthus roseus* para catalizar la hidroxilación del ácido 2-hidroxibenzoico para formar el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (Shimoda et al 2004, Esquema 20).



Esquema 20. Biotransformación del ácido 2-hidroxibenzoico empleando enzimas vegetales aisladas

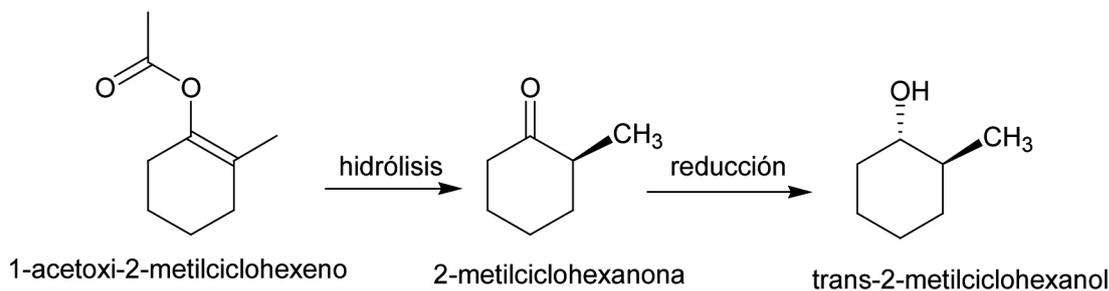
Biotransformaciones usando partes de plantas (Andrade et al 2006)

En los últimos años están recibiendo atención las biotransformaciones con partes de plantas, como tallos, raíces, frutos y hojas como biocatalizadores. Esto se debe al interés que presenta hoy en día la biotecnología por brindar metodologías sustentables, y además porque trabajar con partes de plantas es una alternativa más económica y simple que con cultivos de células. El uso de parte de plantas como fuente de biocatalizadores evita también la necesidad de aislar las enzimas. Las biotransformaciones usando partes de plantas pueden ser empleadas en numerosas reacciones como la biorreducción de cetonas, lactonización enzimática e hidrólisis de ésteres. En el esquema 21 se ejemplifican dos reacciones de reducción catalizadas por partes de plantas.



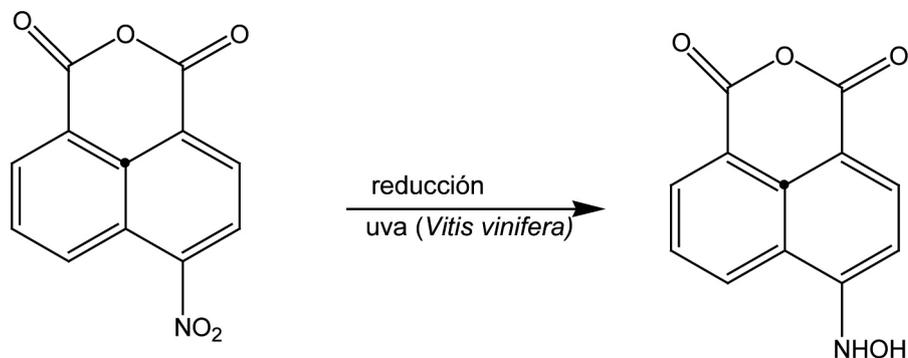
Esquema 21. Reacciones de reducción

También se investigó la hidrólisis del 1-acetoxi-2-metilciclohexeno seguida por la reducción de la 2-metilciclohexanona usando diferentes partes de plantas, tales como raíces de zanahoria (*Daucus carota*), frutos de berenjena (*Solanum melongena*), frutos de pepino (*Cucumis sativus*) y bulbos de ajo (*Allium sativum*) (Esquema 22, Bruni et al 2002).



Esquema 22. Hidrólisis seguida de reducción del 1-acetoxi-2-metilciclohexeno

Otro ejemplo de biotransformación empleando partes de plantas es la reducción de compuestos aromáticos catalizada por enzimas presentes en frutos de uva (Esquema 23, Li et al 2005).



Esquema 23. Biotransformación de compuestos aromáticos catalizada por frutos de uva (*Vitis vinifera*)

1.5. OBJETIVO DEL TRABAJO

El objetivo de este trabajo fue intentar realizar reacciones de hidroxilación de diferentes sustratos aromáticos no naturales de estructura sencilla elegidos como modelo. Para esto se utilizaron distintas partes vegetales como potencial fuente de oxigenasas: bulbos, raíces, rizomas, frutos y hojas de diversas plantas accesibles.

Se buscó así estudiar una metodología simple y directa para este tipo de reacciones, en contraste con los métodos sintéticos habitualmente empleados.

2. Parte experimental

2.1. GENERALIDADES

Fuentes de biocatalizadores

Como posibles fuentes de biocatalizadores se ensayaron partes de plantas, tales como raíces, rizomas, bulbos, hojas y frutos que se compraron en los lugares de distribución habituales (verdulerías y viveros).

Se ensayaron:

- Raíces de zanahoria (*Daucus carota*)
- Rizomas de jengibre (*Zingiber officinale*)
- Bulbos de ajo (*Allium sativum*)
- Frutos de uva (*Vitis vinifera*)
- Hojas de vinca (*Vinca major*)
- Hojas de vinca rosa (*Catharanthus roseus*)

Reactivos y solventes

Los solventes y reactivos utilizados fueron de origen comercial y de grado analítico (Tabla 4). El ácido acetilsalicílico, empleado como sustrato, fue extraído de comprimidos comerciales de aspirina con diclorometano (ver pág. 27).

| Reactivos y solventes |
|----------------------------|
| Acetofenona |
| Acido acetilsalicílico |
| Acido salicílico |
| Agua destilada |
| Alcohol etílico |
| Clorobenceno |
| Cloruro de metileno |
| Dimetilformamida |
| Etanol |
| Eter de petróleo |
| Fenol |
| Hipoclorito de sodio al 5% |
| Metanol |

Tabla 4. Reactivos y solventes utilizados en este trabajo

Métodos cromatográficos y equipamiento

Para realizar el seguimiento de las biotransformaciones, se utilizó la técnica analítica de cromatografía en capa delgada (CCD), en placas de aluminio de silicagel (60 F₂₅₄, Merck).

Los solventes de desarrollo empleados fueron: diclorometano/ metanol 80:20 (v/v) para las alícuotas provenientes de los ensayos con ácido salicílico y con ácido acetilsalicílico; éter de petróleo/ diclorometano 50:50 (v/v) para las alícuotas de los ensayos con clorobenceno y diclorometano/ metanol 95: 5 (v/v) para las de fenol.

Como agente de revelado se empleó luz UV (254 nm). Las cromatografías preparativas en columna se realizaron con silicagel (60, Merck) como adsorbente.

Las biotransformaciones se llevaron a cabo en un agitador magnético con control de temperatura y velocidad de agitación.

Las evaporaciones se llevaron a cabo en un evaporador rotatorio Büchi a 37 °C con vacío.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C se determinaron en un equipo Bruker de 500 MHz con CDCl_3 como solvente.

Aislamiento del ácido acetilsalicílico

Este sustrato se obtuvo pulverizando en un mortero cinco comprimidos comerciales de aspirinas (Glaxosmithkline), que contienen 500 mg de ácido acetilsalicílico cada uno. Se hicieron sucesivas extracciones con un total de 40 mL de diclorometano, luego se filtraron los excipientes y se evaporó el solvente. Se obtuvieron 2,4 g de ácido acetilsalicílico.

2.2. Protocolo general para los ensayos utilizando partes de plantas

Para ensayar las reacciones se usaron vegetales frescos y sanos. Se lavaron cuidadosamente con agua y luego se los mantuvo en una solución de hipoclorito de sodio al

5 % durante 20 minutos según un protocolo descrito (Andrade et al 2006). Posteriormente se enjuagaron con etanol al 96 % y se manipularon bajo condiciones estériles. Las raíces, bulbos y rizomas se pelaron y se cortaron en rebanadas de 5 mm con un bisturí estéril, y también se probó triturar el material con un molinillo. A los frutos se les quitó el hollejo y las semillas, para posteriormente triturarlos con el molinillo. Cuando se trabajó con hojas de plantas, en cambio, éstas se usaron enteras y se molieron. Estos procedimientos se realizaron con el objetivo de incrementar la superficie de contacto del sustrato con el biocatalizador.

Según Andrade et al (2006), los sistemas de reacción consistieron de 2 g de material vegetal, 10 mg de sustrato en 8 mL de buffer fosfato 30 mM pH 7 y se agregó 0,1 mL de etanol como solvente orgánico.

Las mezclas resultantes se dejaron en un agitador magnético a 33 °C y se evaluó el transcurso de las reacciones por CCD tomándose muestras a diferentes tiempos de reacción que fueron 2 horas, 2, 5 y 7 días.

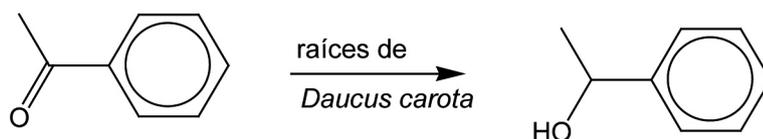
Paralelamente se efectuaron ensayos de control (blancos), en ausencia de material vegetal, que no mostraron reacción.

3. Resultados y discusión

3.1. Biorreducción de acetofenona con zanahoria (*Daucus carota*)

Inicialmente, para poner a punto la técnica empleada en este trabajo, se utilizó como modelo la reacción de reducción de acetofenona a su correspondiente alcohol, usando *Daucus carota* como biocatalizador (Andrade et al 2006, Esquema 24). Se empleó el protocolo descrito en la sección 2.2. y a los siete días de reacción se observó la reducción total de acetofenona.

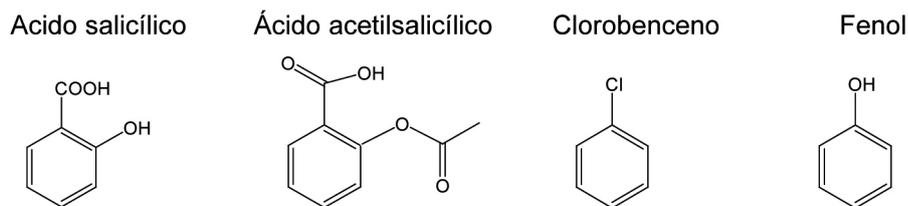
Utilizando DMF como solvente en lugar de etanol, la reacción ocurrió más lentamente.



Esquema 24. Reacción de reducción de acetofenona usando raíces de *Daucus carota* como biocatalizador

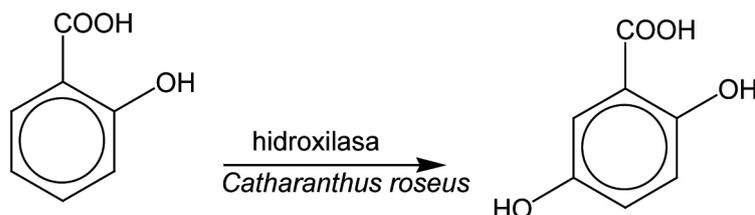
3.2. Ensayos tendientes a reacciones de hidroxilación

Posteriormente, para ensayar posibles reacciones de hidroxilación se probaron los siguientes sustratos (Esquema 25):



Esquema 25. Sustratos ensayados en el presente trabajo

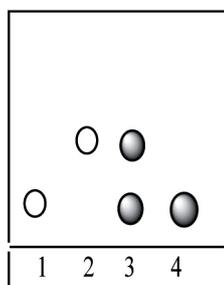
En primer lugar, se estudió como sustrato ácido salicílico, ya que se ha descrito la hidroxilación del ácido salicílico utilizando una monooxigenasa aislada de cultivos celulares de *Catharanthus roseus* (Shimoda et al 2004, Esquema 26).



Esquema 26. Reacción de hidroxilación del ácido salicílico usando una monooxigenasa aislada de cultivos celulares de *Catharanthus roseus*

Para el ácido salicílico se emplearon ajo, zanahoria, uva, jengibre y vinca rosa. Luego la reacción se llevó a escala preparativa con vinca rosa, y a las 8 horas de reacción se la detuvo, se filtró para posteriormente evaporar la fase acuosa y el residuo se purificó por cromatografía en columna. El análisis por RMN evidenció que se recuperó ácido salicílico sin reaccionar.

Con el ácido acetilsalicílico se usó el mismo material vegetal y se siguió el mismo protocolo de trabajo que con el ácido salicílico. Luego de 48 hs. de reacción se observó por CCD que hubo desaparición del sustrato con todos los materiales vegetales usados, formándose un producto cuyo Rf coincidió con el del ácido salicílico. Se observó desaparición total del sustrato a los 5 días de reacción (Figura 1) y no se observaron otros productos de reacción.



- 1: Patrón de AS
- 2: Patrón de AAS
- 3: Reacción de hidrólisis no cuantitativa (48 hs)
- 4: Hidrólisis total del AAS (5 días)

Figura 1. Representación de una CCD de alícuotas de la reacción de ácido acetilsalicílico con diferentes materiales vegetales

Para el caso del clorobenceno y del fenol se emplearon zanahoria, ajo, uvas, jengibre y vinca mayor como fuente de biocatalizadores. No se observaron productos de reacción con ninguno de los dos sustratos.

4. Conclusión

Aunque con los ensayos realizados con sustratos modelos y partes vegetales no se llegó a obtener productos de hidroxilación con ninguno de los sustratos, se obtuvo probablemente la hidrólisis del ácido acetilsalicílico, bajo condiciones suaves de reacción. Esto se debe a la acción de hidrolasas, tales como lipasas y esterasas, presentes en las diferentes partes vegetales empleadas en este trabajo.

5. Referencias

- Andrade LH, Utsunomiya RS, Omori AT, Porto ALM, Comasseto JV. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2006**, *38*, 84.
- Bruni R, Fantin G, Medici A, Pedrini P, Sacchetti G. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 3377.
- Faber K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer, 5ª Ed., Berlín, **2003**; a: Cap.1; b: Cap 2.
- Giri A, Dhingra V, Giri CC, Singh A, Ward OP, Narasu ML. *Biotechnology Advances* **2001**, *19*, 175.
- Leresche J, Meyer HP. *Organic Process Research & Development* **2006**. *10*, 572.
- Li F, Cui J, Quian X, Zhang R, Xiao Y. *Chemical Communications* **2005**, 1901.
- Ran N, Zhao L, Chen Z, Tao J. *Green Chemistry* **2008**, *10*, 361.
- Shimoda K, Kubota N, Sano T, Hirakawa H, Hirata T. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2004**, *98*, 67.

