



Fernández Varela, Romina

Empleo de 2-desoxirribosa-5-fosfato aldolasa en la síntesis de intermediarios de potenciales compuestos farmacológicos



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

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

Cita recomendada:

Fernández Varela, R. (2023). Empleo de 2-desoxirribosa-5-fosfato aldolasa en la síntesis de intermediarios de potenciales compuestos farmacológicos. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/3954>

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

Empleo de 2-desoxirribosa-5-fosfato aldolasa en la síntesis de intermediarios de potenciales compuestos farmacológicos

TESIS DOCTORAL

Romina Fernández Varela

romi.fv17@gmail.com

Resumen

La Biocatálisis ofrece importantes ventajas respecto a la síntesis química tradicional, en especial en cuanto a su alta eficiencia, altos rendimientos, alta estereo-, regio- y quimioselectividad y a la baja formación de subproductos. Adicionalmente, el uso de biocatalizadores implica reacciones con bajo impacto ambiental, ya que se utilizan condiciones suaves, no corrosivas y no tóxicas. En particular, la estereoselectividad de las reacciones es extremadamente importante en la industria farmacéutica y actualmente es uno de los mayores desafíos de la síntesis orgánica, ya que la quiralidad es un factor clave en la seguridad y eficacia de la mayoría de las drogas.

La reacción de adición aldólica resulta ser uno de los métodos más poderosos para la formación de uniones C-C. Dicha construcción, realizada con un completo control estereoquímico es una meta muy deseada dentro de la síntesis orgánica y en este sentido, los procesos biocatalizados proveen rutas alternativas de gran potencialidad. Las aldolasas catalizan la reacción aldólica reversible y estereoespecífica entre compuestos carbonílicos formando β -hidroxicetonas o β -hidroxialdehídos quirales. El empleo de aldolasas ha permitido la preparación de diversos precursores sintéticos de productos farmacológicamente activos, entre ellos, drogas antiolesterolémicas conocidas como estatinas.

En este contexto, el objetivo principal de esta Tesis fue la obtención, mediante caminos biocatalizados por 2-desoxirribosa 5-fosfato aldolasa (DERA), de intermediarios y/o precursores de análogos de nucleósidos con actividad farmacológica. En particular se propuso como objetivos específicos el desarrollo de nuevos biocatalizadores basados en DERAs de diferentes fuentes microbiológicas (modificadas genéticamente) y la obtención de 2-desoxirribosa 5-fosfato (DR5P) como intermediario de síntesis de nucleósidos

modificados y de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas sustituidas como precursores de nuevos análogos de estatinas, con el fin de testar su actividad catalítica.

En el primer capítulo se presenta la introducción general a los temas que se abordaron en la Tesis doctoral. En él se describe brevemente la importancia de los compuestos ópticamente puros y las metodologías de síntesis que pueden ser empleadas para obtenerlos. Se analizan las ventajas y desventajas de cada metodología, y cómo la síntesis biocatalizada de este tipo de compuestos ha tomado importancia en la industria. En particular, la discusión se centra en la reacción de adición aldólica, comparando las ventajas que implica el uso de biotransformaciones respecto a la síntesis química tradicional. Luego, se describen los diferentes tipos de aldolasas, principalmente la aldolasa dependiente de acetaldehído, DERA. Enfocados en la síntesis de drogas para el control de colesterol en sangre, en este capítulo también se resumen los antecedentes existentes relacionados con la síntesis química y biocatalizada de estatinas.

En el segundo capítulo se describen los objetivos de la Tesis doctoral acompañados por la definición del problema y las hipótesis que dieron lugar al trabajo experimental.

El tercer capítulo detalla la puesta a punto de los biocatalizadores que posteriormente fueron utilizados en el resto de la Tesis. Se puso a punto la expresión de tres DERAs de distinto género – dos de *Pectobacterium atrosepticum* y una de *Lactobacillus brevis*-, las cuales estaban modificadas genéticamente para obtener una mayor resistencia a su sustrato natural, acetaldehído, e incrementar, de esta forma, la productividad. En primer lugar, se llevó a cabo la optimización del crecimiento de los microorganismos y se puso a punto la expresión y purificación de las enzimas correspondientes. A su vez, fue seleccionada y optimizada la metodología por la cual se midió actividad enzimática.

En el cuarto capítulo se desarrolla la síntesis biocatalizada de desoxirribosa-5-fosfato (DR5P) a partir de distintos sustratos y las DERAs obtenidas previamente, y se describe su utilidad como intermediario en la preparación de nucleósidos modificados. Se aborda, además, la temática relacionada con la selección del biocatalizador más adecuado para cada caso, evaluando el uso de enzimas, extractos libres de células o células enteras.

En el quinto capítulo se describe la puesta a punto de la síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas. Para tal fin se llevaron a cabo reacciones de adición aldólica biocatalizadas por las DERAs antes descriptas, utilizando acetaldehído como dador y aceptor. Este capítulo se encuentra estrechamente ligado al sexto capítulo, en el cual, habiendo determinado la cantidad máxima de acetaldehído tolerada, se llevaron a cabo adiciones aldólicas utilizando acetaldehído como dador nucleofílico y diversos aldehídos como aceptores. Entre los aldehídos aceptores se destaca la utilización de derivados aldehídicos de bases nitrogenadas (N-1-(2-oxoetil) timina, N-9-(2-oxoetil)adenina y N-1-(2-oxoetil) citosina.

En el séptimo capítulo, se describen metodologías químicas y biocatalizadas para la oxidación de los productos obtenidos en los dos capítulos anteriores. La oxidación de los

lactoles a las correspondientes lactonas genera una nueva familia de estatinas, cuyas actividades biológicas serán evaluadas a futuro.

Finalmente, en el octavo capítulo se exponen las conclusiones y los logros obtenidos durante este trabajo doctoral.



TESIS DOCTORAL

**EMPLEO DE
2-DESOXIRRIBOSA-5-FOSFATO
ALDOLASA EN LA SÍNTESIS DE
INTERMEDIARIOS DE POTENCIALES
COMPUESTOS FARMACOLÓGICOS**

LIC. ROMINA FERNÁNDEZ VARELA
2022

DIRECCIÓN DE TESIS:
DRA. ELIZABETH LEWKOWICZ

El presente trabajo de Tesis Doctoral, para optar por el grado de Doctora en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes, ha sido realizado en el Laboratorio de Biotransformaciones y Química de Ácidos Nucleicos del Departamento de Ciencia y Tecnología de dicha Universidad, bajo la dirección de la Dra. Elizabeth Lewkowicz

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

Abreviaturas

ADN	Ácido ribonucleico
AK	Acetato quinasa
ARN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
CCD	Cromatografía en capa delgada
DERA	2-Desoxirribosa 5-fosfato aldolasa
DHA	Dihidroxiacetona
DHAK	Dihidroxiacetona quinasa
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DMF	Dimetilformamida
DMSO-d₆	Dimetilsulfoxido deuterado
DR	Desoxirribosa
DR1P	Desoxirribosa 1-fosfato
DR5P	Desoxirribosa 5-fosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELC	Extracto libre de células
EtOAc	Acetato de etilo
FSA	Fructosa-6-fosfato aldolasa
Fuc1P	L-Fuculosa 1 fosfato
G3P	Gliceraldehído 3-fosfato
GA	Gliceraldehído
IMAC	Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
MeOH	Metanol
Nd	No determinado
NeuAcA	Ácido N-acetilneuramínico aldolasa
Nr	No reacciona
NP	Nucleósido fosforilasa
PPM	Fosfopentomutasa

RAMA	Fructosa 1,6 bisfosfato aldolasa de musculo de conejo
TDHP	2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa
THF	Tetrahidrofurano
TP	Timidín fosforilasa

Índice

Resumen.....	3
Abreviaturas.....	7
Capítulo 1: Introducción.....	17
1.1. Compuestos quirales, su importancia.....	19
1.2. Síntesis de compuestos quirales.....	21
1.2.1. A partir de un compuesto quiral.....	21
1.2.2. Síntesis asimétrica.....	22
1.2.2.1. Catálisis metálica.....	22
1.2.2.2. Organocatálisis.....	23
1.2.2.3. Biocatálisis.....	24
1.2.3. Resolución de mezclas racémicas.....	26
1.2.3.1. Resolución cinética.....	26
1.2.3.2. Resolución cinética dinámica.....	27
1.3. Reacciones de adición aldólica.....	29
1.3.1. Adiciones aldólicas asimétricas.....	30
1.3.2. Adiciones aldólicas mediadas por aldolasas.....	32
1.3.2.1. Clasificación de las Aldolasas.....	32
1.3.2.1.1. Aldolasas dependientes de glicina.....	34
1.3.2.1.2. Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato.....	36
1.3.2.1.2.1. Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa.....	38
1.3.2.1.2.2. L-Fuculosa-1- fosfato aldolasa.....	39
1.3.2.1.2.3. L-Ramnulosa-1-fosfato aldolasa.....	40
1.3.2.1.2.4. Tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa.....	41
1.3.2.1.3. Aldolasa dependiente de dihidroxiacetona.....	42
1.3.2.1.3.1. Fructosa 6-fosfato aldolasa.....	42
1.3.2.1.4. Aldolasas dependientes de piruvato o fosfoenolpiruvato.....	43
1.3.2.1.5. Aldolasa dependiente de acetaldehído.....	44
1.3.2.1.5.1. 2-Desoxirribosa-5-fosfato aldolasa.....	44
1.3.2.1.5.1.1. Modificaciones genéticas en DERA.....	48
1.3.2.1.5.1.1.1. Aceptación de sustratos.....	48
1.3.2.1.5.1.1.2. Resistencia frente a acetaldehído.....	51
1.4. Estatinas.....	54

1.4.1. Síntesis química de precursores sintéticos de estatinas.....	58
1.4.2. Síntesis quimio-enzimática de precursores de estatinas.....	60
1.5. Referencias bibliográficas	65
Capítulo 2: Objetivos.....	79
Capítulo 3: Prepración del biocatalizador	87
3.1. Introducción.....	89
3.2. Materiales y métodos	91
3.2.1. Extracción de los plásmidos	91
3.2.2. Generación de <i>Escherichia coli</i> DH5α electro-competentes	91
3.2.3. Transformación en <i>Escherichia coli</i> DH5α electro-competentes.....	92
3.2.4. Miniprep	92
3.2.5. Electroforesis en gel de agarosa 1%.....	93
3.2.6. Generación de <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 competentes térmicas	93
3.2.7. Transformación de <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 competentes térmicas ...	93
3.2.8. Preparación de criotubos, stock de guardado y stock de trabajo.....	94
3.2.9. Cultivo de bacterias recombinantes	94
3.2.10. Extracto libre de células (ELC)	94
3.2.11. Purificación de enzima	94
3.2.11.1. Purificación en batch	94
3.2.11.2. Purificación de enzima utilizando columna empaquetada.....	95
3.2.12. Determinación de la concentración de proteínas	95
3.2.13. Electroforesis en gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE).....	96
3.2.14. Ensayo de actividad	96
3.3 Resultados y discusión	97
3.3.1. Diseño de las cepas	97
3.3.2. Obtención de plásmidos	101
3.3.3. Transformación en <i>Escherichia coli</i> DH5α	102
3.3.4. Extracciones plasmídicas	102
3.3.5. Transformación de <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3	106
3.3.6. Expresión de PaDERA N-His	107
3.3.7. Expresión de PaDERA C-His C49M y LbDERA C42M E78K C-His	111
3.3.8. Purificación de PaDERA N-His.....	111
3.3.9. Actividad de PaDERA N-His.....	113
3.3.10. Purificación de PaDERA C-His C49M y LbDERA C42M E78K C-His ...	115

3.3.10.1.	Purificación y actividad de <i>PaDERA</i> C-His C49M C-His.....	116
3.3.10.2.	Purificación y actividad de <i>LbDERA</i> C42M E78K C-His	118
3.4	Conclusiones	123
3.5	Referencias bibliográficas.....	125
Capítulo 4: Síntesis biocatalizada de 2-desoxirribosa 5-fosfato.....		129
4.1.	Introducción	131
4.2.	Materiales y métodos.....	137
4.2.1.	Cultivo de <i>Pectobacterium atrosepticum</i>	137
4.2.2.	Cultivo de <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3.....	137
4.2.3.	Cultivo de <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 conteniendo los plásmidos <i>PaDERA</i> N-His, <i>PaDERA</i> C49M C-His y <i>LbDERA</i> C42M E78K C-His	138
4.2.4.	Células enteras liofilizadas.....	138
4.2.5.	Extracto libre de células (ELC).....	138
4.2.6.	Síntesis de DR5P.....	138
4.2.6.1.	Utilizando células enteras a partir de G3P.....	138
4.2.6.2.	Utilizando células enteras liofilizadas a partir de G3P	139
4.2.6.3.	Utilizando células enteras a partir de glucosa.....	139
4.2.6.4.	Utilizando ELC a partir de G3P	139
4.2.7.	Métodos analíticos	139
4.2.7.1.	Análisis cualitativo de DR5P	139
4.2.7.2.	Análisis cuantitativo de DR5P	140
4.2.7.3.	Análisis cuantitativo de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas	141
4.2.7.3.1	Aislamiento.....	141
4.2.7.3.2.	Cuantificación.....	141
4.3.	Resultados y discusión	143
4.3.1.	Síntesis de DR5P a partir de G3P	143
4.3.1.1.	Utilizando células enteras de <i>PaDERA</i> wt.....	143
4.3.1.2.	Utilizando <i>Escherichia coli</i> BL21DE3 <i>PaDERA</i> N-His.....	146
4.3.1.2.1.	Como células enteras	146
4.3.1.2.2.	Como células liofilizadas.....	147
4.3.1.2.3.	Como ELC.....	147
4.3.1.2.4.	Como enzima libre	149
4.3.1.2.5.	Comparación de los distintos formatos	149
4.3.1.3.	Utilizando células enteras de <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 <i>PaDERA</i> C49M C-His.....	150

4.3.1.4.	Utilizando células enteras de <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 <i>LbDERA</i> C42M E78K C-His.....	152
4.3.2.	Síntesis de DR5P a partir de glucosa.....	154
4.3.2.1.	Utilizando células enteras de <i>PaDERA</i> wt.....	155
4.3.2.2.	Utilizando células enteras de <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 <i>PaDERA</i> N-His.....	156
4.3.2.3.	Utilizando células enteras de <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 <i>PaDERA</i> C49M C-His.....	157
4.3.2.4.	Utilizando <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 <i>LbDERA</i> C42M E78K C-His	161
4.3.3.	Resultados comparativos	162
4.4.	Conclusiones.....	165
4.5.	Referencias bibliográficas	166
Capítulo 5: Síntesis biocatalizada de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa		169
5.1.	Introducción.....	171
5.2.	Materiales y métodos	175
5.2.1	Cultivo de <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3	175
5.2.2	Cultivo de bacterias recombinantes	175
5.2.3	Tolerancia a acetaldehído de los biocatalizadores.....	176
5.2.4	Síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa, reacción standard... 176	
5.2.5	Optimización de tiempo de reacción y concentración de acetaldehído. 176	
5.2.6	Síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa, escala preparativa .. 177	
5.2.7	Análisis de las muestras.....	177
5.2.7.1	Cromatografía en capa delgada	177
5.2.7.2	Resonancia magnética nuclear	177
5.2.7.3	Cromatografía gaseosa.....	178
5.3.	Resultados y discusión.....	179
5.3.1	Tolerancia a acetaldehído de los biocatalizadores.....	179
5.3.2	Síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa	180
5.3.2.1	Empleando <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 <i>PaDERA</i> N-His y <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 <i>PaDERA</i> C49M C-His	180
5.3.2.1.1.	Reacción en condición estándar, escala analítica.....	180
5.3.2.1.2.	Reacción en condición estándar, escala preparativa	182
5.3.2.1.3.	Optimización de las condiciones experimentales, utilizando células enteras <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 <i>PaDERA</i> C49M C-His.....	183
5.3.2.2.	Empleando <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 <i>LbDERA</i> C42M E78K C-His ...	190
5.3.2.2.1.	Reacción en condición estándar, escala analítica.....	190

5.3.2.2.2.	Reacción en condición estándar, escala preparativa.....	191
5.3.2.2.3.	Optimización de las condiciones experimentales, utilizando células enteras de <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His	191
5.3.3	Determinación estructural de TDHP	192
5.3.3.1.	Por análisis de masas	192
5.3.3.2.	Por RMN	194
5.3.3.2.1.	Del crudo.....	194
5.3.3.2.2	De una muestra pura	196
5.4.	Conclusiones	199
5.5.	Referencias bibliográficas.....	201
Capítulo 6: Síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas 6-sustituidas		203
6.1.	Introducción	205
6.2.	Materiales y métodos.....	207
6.2.1	Alquilación de bases nitrogenadas	207
6.2.1.1	Síntesis de 2,2-dimetoxietil derivados de bases nucleosídicas	207
6.2.1.2	Síntesis de N-1-(2,2-dimetoxietil) benzimidazol.....	207
6.2.1.3	Análisis de las reacciones.....	208
6.2.1.4	Purificación.....	208
6.2.1.5	Análisis estructural de los acetales	209
6.2.2	Desprotección de acetales.....	216
6.2.2.1.	Preparación de derivados aldehídicos de bases nitrogenadas.....	216
6.2.2.2	Preparación de 2- cloroacetaldehído.....	217
6.2.3	Biotransformaciones con DERA.....	217
6.2.3.1	Síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas 6-sustituidas utilizando células enteras.....	217
6.2.3.2	Síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas 6-sustituidas utilizando ELC.....	218
6.2.3.3	Síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas 6-sustituidas utilizando enzima libre.....	218
6.2.4	Purificación de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas 6-sustituidas	218
6.2.5	Análisis de las biotransformaciones.....	218
6.2.5.1.	Análisis por CCD.....	219
6.2.5.2.	Análisis por HPLC.....	220
6.2.5.3.	Análisis por GC-FID	221
6.2.5.4.	Análisis por RMN	221

6.3.	Resultados y discusión.....	223
6.3.1.	Preparación de los sustratos.....	224
6.3.1.1.	Desprotección de cloroacetaldehído dimetilacetal.....	224
6.3.1.2.	Alquilación de bases nucleosídicas.....	225
6.3.1.3.	Alquilación de benzimidazol.....	227
6.3.1.4.	Desprotección de acetales.....	227
6.3.2.	Síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas 6-sustituidas a partir de aldehídos comerciales.....	228
6.3.2.1	Síntesis de 6-cloro-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa (3.e).....	229
6.3.2.2	Síntesis de 6,6-dimetoxi-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa (3.f).....	232
6.3.2.3	Síntesis de 6-metil-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa (3.g).....	232
6.3.2.4.	Síntesis de 6-feniltetrahidro-2,4-piranodiol (3.h).....	234
6.3.2.5	Síntesis de 6-fenil-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa (3.i).....	235
6.3.3	Síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas 6-sustituidas con bases nitrogenadas.....	237
6.3.3.1.	Empleando células enteras.....	237
6.3.3.2.	Empleando ELC.....	237
6.3.3.3.	Utilizando enzima libre.....	238
6.3.3.3.1.	Síntesis de 6-timinil-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa (3.a).....	238
6.3.3.3.2.	Síntesis de 6-adenil-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa (3.b).....	242
6.3.3.3.3.	Síntesis de 6-citosil-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa (3.c).....	243
6.3.3.3.4.	Síntesis de 6-benzimidazoil-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa (3.d).....	244
6.3.4.	Resultados comparativos.....	245
6.4.	Conclusiones.....	247
6.5.	Referencias bibliográficas.....	249
Capítulo 7: Oxidaciones		251
7.1.	Introducción.....	253
7.2.	Materiales y métodos.....	257
7.2.1.	Oxidación química.....	257
7.2.2.	Análisis de la reacción.....	257
7.2.2.1.	Análisis por CCD.....	257
7.2.2.2.	Análisis por GC-FID.....	258
7.2.2.3.	Análisis por RMN.....	258
7.3.	Resultados y discusión.....	259

7.3.1	Oxidación de TDHP	259
7.3.2	Oxidación de 3.e,3.g y 3.i	263
7.4.	Conclusiones	265
7.5.	Referencias bibliográficas.....	267
Capítulo 8: Conclusiones generales.....		269
Agradecimientos.....		277

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

Capítulo 1

Introducción

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

1.1. Compuestos quirales, su importancia.

La generación de compuestos quirales es uno de los desafíos más importantes para la síntesis orgánica. La demanda de estereoisómeros puros se ha extendido a casi todas las industrias. En particular, la industria farmacéutica requiere separar y testear cada uno de los estereoisómeros por separado y así determinar propiedades farmacológicas, metabolismo y toxicidad.¹ Esto conduce a obtener compuestos homoquirales para evitar así cualquier posibilidad de efectos adversos. En una mezcla racémica, por ejemplo, es frecuente encontrar que uno de los isómeros sea una droga activa y beneficiosa para el organismo, mientras que el otro constituya una impureza y pueda tener cierta toxicidad. Podemos citar una gran cantidad de compuestos que presentan dicha dualidad de acción entre sus isómeros.

El primer caso de droga anti-inflamatoria no esteroidea (AINE) en su versión de fármaco enantiopuro fue reportada en 1994. El *S*-Ibuprofeno (**Tabla 1, entrada 1**) presenta actividad anti-inflamatoria 100 veces mayor que el *R*-ibuprofeno,^{2,3} lo que deriva en una acción más rápida administrando una dosis más baja.⁴

Ketoprofeno también pertenece al grupo de los AINEs y su administración se recomienda para dolores postoperatorios. El isómero *S* es conocido como Dexketoprofeno (**Tabla 1, entrada 2**) y es el doble de activo que el isómero *R*, por lo cual se puede reducir su administración y evitar efectos gastrointestinales adversos.⁵

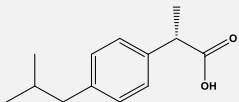
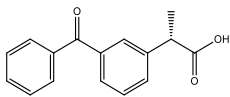
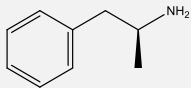
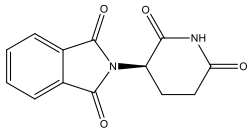
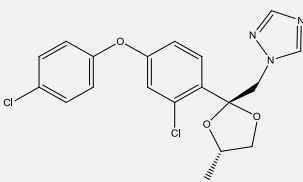
El metabolismo de la anfetamina es estereoselectivo, es decir, *S*-anfetamina (Dexanfetamina) (**Tabla 1, entrada 3**) se metaboliza más rápido que su isómero *R*. En la mayoría de los países la droga es prescripta como el enantiómero puro, pero la mezcla racémica está aún disponible.⁶

En todos los casos anteriores, el hecho de administrar el fármaco en forma de mezcla racémica proporciona una menor actividad farmacológica, pero se han reportados casos en los que uno de los isómeros presenta efectos adversos en quienes lo consumen. El caso más conocido es el de la droga Talidomida (**Tabla 1, entrada 4**), que era administrada a mujeres entre los años 1950 y 1960 para evitar sensación de malestar en los primeros meses del embarazo. Su comercialización se realizaba como mezcla

racémica, comprobándose posteriormente que *S*-talidomida presentaba efectos teratogénicos.⁷

Hace algunos años, el estudio de las consecuencias medioambientales de los estereoisómeros se ha ido incrementando.⁸ En el año 2013, un estudio descrito por Dong y colaboradores, reportó un análisis sobre ecotoxicidad de los dos enantiómeros del fungicida Difenconazol (**Tabla 1, entrada 5**) que demostró que (2*R*,4*S*)-difenconazol presenta mayor bioactividad y menor ecotoxicidad. Sin embargo, para el isómero (2*S*,4*S*)-difenconazol los resultados fueron los contrarios (mayor ecotoxicidad, menor bioactividad).⁹

Tabla 1. 1: compuestos quirales de importancia farmacológica

Nº	NOMBRE	ESTRUCTURA QUÍMICA	EMPLEO
1	<i>S</i> -Ibuprofeno		Anti-inflamatorio
2	Dexketoprofeno		Analgésico y anti-inflamatorio
3	Dexanfetamina		Supresor del apetito
4	<i>R</i> -Talidomida		Evita los primeros síntomas del embarazo
5	(2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-Difenconazol		Fungicida

1.2. Síntesis de compuestos quirales

Como se mencionó anteriormente, obtener compuestos homoquirales es de suma importancia para varias industrias. Además, es importante contar con metodologías que incluyan bajo impacto ambiental, reducción de desechos, bajo costo de energía y el uso de reactivos y catalizadores baratos, fácilmente disponibles y reciclables.¹⁰

Existen tres metodologías para obtener compuestos quirales: (i) empleo de compuestos quirales puros como sustratos de partida, (ii) síntesis asimétrica a partir de un sustrato proquiral empleando un catalizador (organocatalizador, catalizador metálico o biocatalizador), (iii) resolución de mezclas racémicas.

1.2.1. A partir de un compuesto quiral

Esta metodología consiste en emplear compuestos ópticamente activos como material de partida y modificar grupos funcionales presentes en la molécula sin alterar ninguna de las unidades estereogénicas iniciales. La síntesis a partir de un compuesto quiral suele ser económica sólo cuando un material de partida está disponible a gran escala y, generalmente, se necesitan varios pasos de reacción para llegar al compuesto de interés.¹¹

La elección del sustrato de partida, depende exclusivamente de la molécula a sintetizar.¹² Por ejemplo, eleuterobina (**2**) - un glucósido de diterpeno con actividad anticancerígena – pudo ser sintetizado a partir (+)-carvona (**1**), mediante una secuencia de pasos químicos que involucra pasos de acilación, epoxidación y apertura del epóxido sin que se altere la configuración deseada (**figura 1.1**).¹³

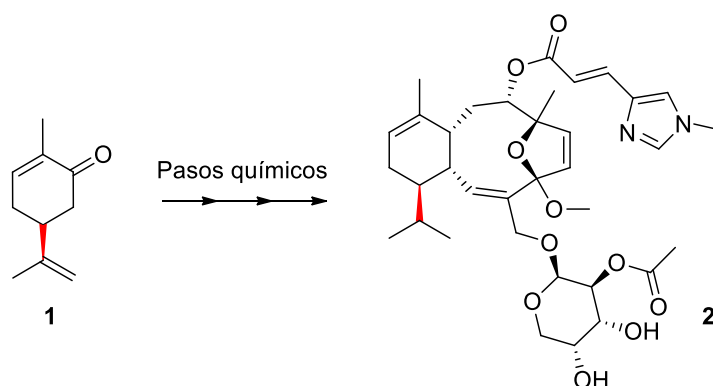


Figura 1. 1: Eleuterobina y su sustrato quiral de partida (+)-carvona.

1.2.2. Síntesis asimétrica

La síntesis asimétrica es considerada la estrategia más poderosa para la producción de moléculas quirales a partir de moléculas proquirales. Este procedimiento puede llevarse a cabo utilizando catalizadores metálicos, organocatalizadores o biocatalizadores.

1.2.2.1. Catálisis metálica

Los catalizadores metálicos fueron, durante mucho tiempo, la herramienta más usada en síntesis asimétrica. El uso de metales de transición, contaminantes importantes para el medio ambiente (entre otras desventajas),¹⁴ hizo que se empezaran a reemplazar por nuevas alternativas como los ya mencionados biocatalizadores u organocatalizadores. Sin embargo, la remarcada y diversa reactividad junto a la controlada selectividad hacen que en la actualidad se sigan utilizando.¹⁵

Hoy en día, la catálisis metálica intenta realizarse con catalizadores que sean abundantes en la Tierra para disminuir el costo y el efecto ambiental de las reacciones.¹⁶ Por este motivo, el titanio es uno de los catalizadores más utilizados; este metal no solo es barato, sino que también sus subproductos son considerados biocompatibles y de baja toxicidad. Su utilización se ha extendido en catálisis redox, reacciones de hidroaminación e hidroaminoalquilación.¹⁷ En la **figura 1.2** se muestra la hidroaminoalquilación intramolecular de aminoalquenos 2,2'-disustituídos. Para tal proceso se utilizó un complejo de piridonato de titanio para dar como producto ciclohexilaminas.

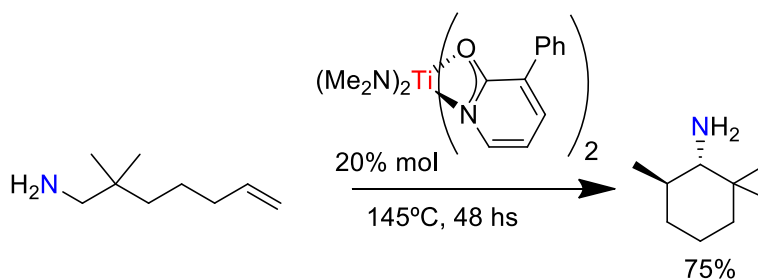


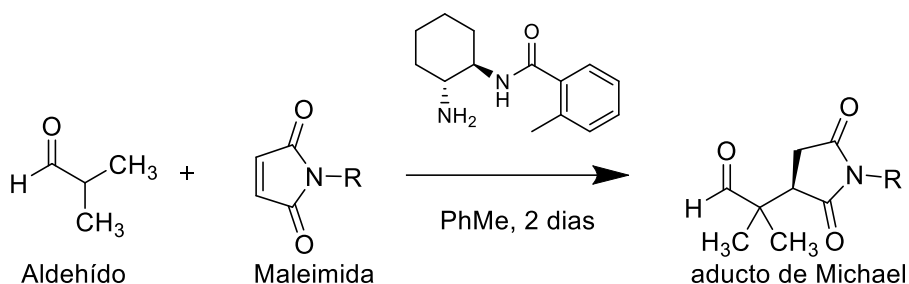
Figura 1. 2: Hidroaminoalquilación intramolecular utilizando un complejo de titanio como catalizador metálico.

1.2.2.2. Organocatálisis

El uso de moléculas orgánicas pequeñas como catalizadores en reacciones de síntesis orgánica se denomina Organocatálisis. Debido a que esta metodología resulta rápida y simple, es muy común que se utilice para sintetizar estructuras complejas.¹⁸ En general, las reacciones organocatalizadas se llevan a cabo en condiciones compatibles con el medio ambiente, utilizando solventes verdes, a temperatura ambiente y sin necesitar de maquinarias específicas. En comparación con los catalizadores metálicos, los organocatalizadores son más estables, menos costosos, no tóxicos, fácilmente disponibles y ambientalmente amigables. Además, estas reacciones son poco sensibles a la presencia de agua o aire y pueden llevarse a cabo con éxito en condiciones experimentales simples.¹⁹

L-Prolina es el modelo de organocatalizador más sencillo y el más descrito en bibliografía ya que es muy eficiente y práctico en muchos tipos de reacciones (Michael, Mannich, Diels-Alder, entre otras). Sin embargo, este organocatalizador presenta muchas limitaciones respecto a su solubilidad en solventes orgánicos, manteniendo una gran enantioselectividad y elevada actividad catalítica solo en solventes polares apróticos (DMSO, DMF o Acetonitrilo).¹⁰ Por tal motivo, se comenzaron a diseñar nuevas estrategias basadas en la derivatización de (*L*)-prolina,²⁰ el agregado de aditivos al medio de reacción (agua, dioles, ácidos, etc.) o la utilización de mezcla de solventes.²¹

Las succinimidas son compuestos heterocíclicos utilizados en la producción de nuevos fármacos con diversas aplicaciones terapéuticas. A lo largo del tiempo, se han aislado y sintetizado derivados de succinimida que poseen actividad anticonvulsiva, antiinflamatoria, antitumoral y antimicrobiana.²² Estos compuestos pueden ser sintetizados mediante una adición de Michael enantioselectiva de aldehídos a maleimidas, organocatalizada por una amina primaria quiral (**figura 1.3**).²³ Como se puede observar, utilizando este organocatalizador, se obtienen rendimientos y excesos enantioméricos elevados, a partir de una amplia variedad de maleimidas *N*-sustituidas.



<i>Maleimida</i>	<i>Aducto de Michael</i>	
R	Rendimiento (%)	e.e. (%)
Ph	98	94
4-MeC ₆ H ₄	87	88
4-MeOC ₆ H ₄	77	89
4-ClC ₆ H ₄	92	88
4-O ₂ NC ₆ H ₄	78	70
Me	91	82

Figura 1. 3: Síntesis organocatalizada de succinamidas sustituidas.

1.2.2.3. Biocatálisis

La utilización de biocatalizadores para realizar transformaciones químicas de sustratos no naturales se denomina Biocatálisis. Se considera biocatalizador a cualquier sistema con actividad enzimática (enzimas aisladas, complejos enzimáticos, organelas celulares, células enteras, etc.). Las enzimas aisladas presentan gran actividad y buen rendimiento y, debido a su alta quimio- regio- y enantioselectividad, se elimina la formación de productos secundarios, lo que simplifica el *downstream* del proceso. La desventaja más notable es que en algunas reacciones es necesario el agregado de cofactores (NAD(P)H o ATP), lo que deriva en un costo de producción elevado.²⁴ Además, la mayoría de las enzimas no se encuentran comercialmente disponibles de forma aislada.

Cuando se utilizan células enteras, en cambio, se elimina la posible necesidad de agregar cofactores en las reacciones biocatalizadas, ya que se regeneran por sus propias vías metabólicas. A la vez, la utilización de células enteras le permite a la enzima “desenvolverse” en su entorno natural confiriéndole mayor estabilidad. Sin embargo, es posible que se produzcan problemas difusionales a causa de la membrana semipermeable y la pared celular, produciendo reacciones más lentas.²⁵ Además, teniendo en cuenta que en la célula no solo actúa la enzima de interés, la aparición de productos secundarios, que conlleva a rendimientos más bajos, se presenta como otro de los inconvenientes que derivan del uso de este tipo de biocatalizadores.

Por ejemplo, las enzimas alcohol deshidrogenasas son muy utilizadas en la reducción asimétrica de cetonas proquirales para producir el correspondiente alcohol. Estos compuestos son sintones quirales en la síntesis de productos farmacéuticos, productos químicos o productos naturales.² A modo de ejemplo, Vitale y colaboradores reportaron la síntesis de Rivastigmina, un sintón quiral de muchas drogas para el tratamiento de Alzheimer y Parkinson.²⁶ En uno de los pasos de esta reacción se utilizan células enteras de *Lactobacillus reuteri*, las cuales reducen la cetona al correspondiente alcohol de configuración *R* con buen rendimiento y marcada enantioselectividad (**figura 1.4**).

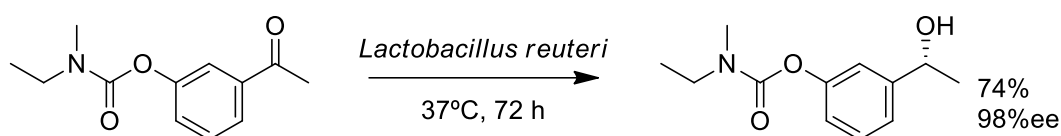


Figura 1. 4: Reducción biocatalizada para la síntesis de Rivastigmina.

El empleo de células enteras cuando se llevan a cabo reacciones de reducción u oxidación –entre otras- tiene la ventaja de que en las células se encuentran todos los cofactores necesarios para la reacción y las vías metabólicas adecuadas para su regeneración. En cambio, cuando se emplean enzimas libres se necesita incorporar el cofactor al medio de reacción y acoplar un sistema de regeneración de cofactores, lo cual incrementa el costo del procedimiento.

Otra característica notable es que las biotransformaciones se realizan, generalmente, en medios acuosos, haciendo que el proceso sea ecológicamente sustentable, y más eficiente en tiempo y costo. Actualmente, se llevan a cabo reacciones biocatalizadas que pueden producir una amplia gama de productos industriales (farmacéuticos, químicos, alimenticios, etc.). El diseño de la reacción, la elección y la optimización del biocatalizador y el desarrollo del bioproceso, son factores que posibilitan un proceso biocatalítico eficiente.²⁷ Esta metodología se empleó en el presente trabajo doctoral y se desarrollará en los próximos capítulos.

1.2.3. Resolución de mezclas racémicas

La separación de enantiómeros mediante la formación de diastereoisómeros derivados y la subsiguiente separación de estos por medios físicos se ha practicado a gran escala durante muchos años.¹¹ Sin embargo, con el surgimiento de los biocatalizadores se han logrado resoluciones parciales de mezclas racémicas de forma simple y eficiente. Las dos metodologías más utilizadas son: i) resolución cinética y ii) resolución cinética dinámica.

1.2.3.1. Resolución cinética

La resolución cinética es una de las metodologías más utilizadas para obtener compuestos enantioméricamente puros. Esta metodología implica una reacción entre un compuesto quiral en su forma racémica y un reactivo, donde uno de los dos enantiómeros da lugar a un producto más rápidamente que el otro. La evolución rápida de uno de los enantiómeros hacia un producto de reacción determinado dará lugar a la recuperación total o parcial del otro enantiómero. Sin embargo, esta metodología presenta como desventaja que solo se puede obtener como máximo un 50% de rendimiento teórico.²⁸ En otras palabras, la resolución cinética puede ser considerada como un proceso de aislamiento de uno de los dos enantiómeros, el enantiómero de interés.

La primera evidencia de resolución cinética biocatalizada fue en 1858, donde Luis Pasteur logró aislar el ácido (S,S)-(-)tartárico de su enantiómero, utilizando como biocatalizador el hongo *Penicillium glaucum*.²⁹ A partir de este descubrimiento, muchas de enzimas han sido utilizadas para la resolución de racematos. Las lipasas se han convertido en las enzimas más explotadas para esta metodología, debido a su amplia

tolerancia a sustratos no naturales, su fácil disponibilidad y su capacidad de trabajar en medios orgánicos, sin perder actividad ni selectividad.³⁰ Por ejemplo, Kamal y colaboradores plantearon la resolución cinética de derivados sustituidos de 1-feniletanol utilizando una lipasa de *Pseudomonas cepacia*. Como se observa en la **figura 1.5**, las cetonas se reducen químicamente utilizando borohidruro de sodio, dando como resultado la mezcla racémica de ambos alcoholes. Posteriormente, uno de los dos isómeros se acila enzimáticamente utilizando una Lipasa, y de esta forma este producto (**2**) puede ser separado fácilmente del enantiómero remanente del alcohol (**1**). Se obtuvo de esta manera un exceso enantiomérico mayor a 99% en todos los productos, pero solo rendimientos cercanos al 50% del isómero requerido.³¹

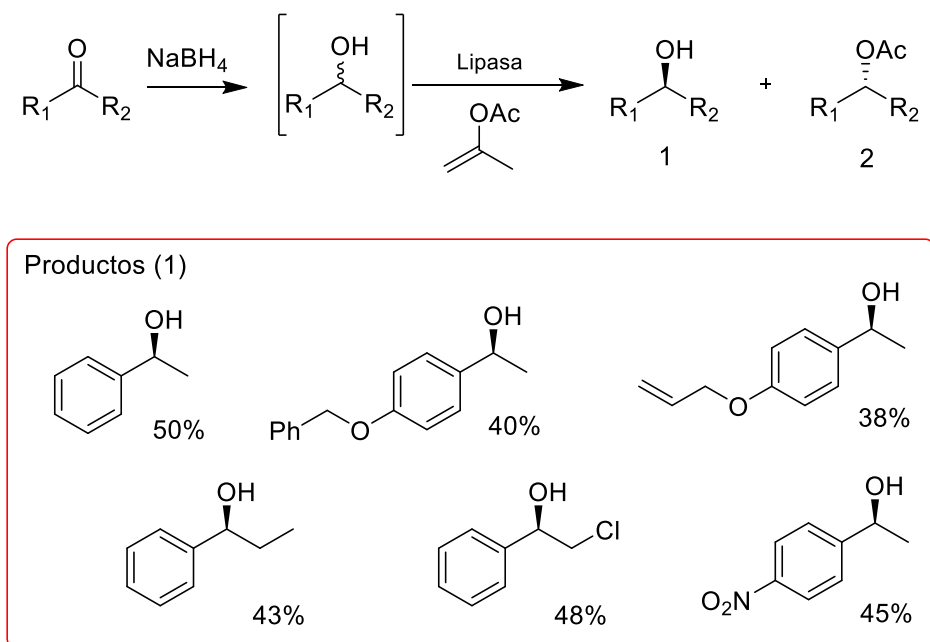


Figura 1. 5: Resolución cinética biocatalizada para la producción de alcoholes quirales. % ee >99%

1.2.3.2. Resolución cinética dinámica

Con el fin de evitar la limitación que presenta la resolución cinética clásica, la resolución cinética dinámica (DKR) permite obtener un rendimiento teórico del 100% del enantiómero de interés. DKR combina resolución cinética clásica con un paso de racemización, donde el sustrato se transforma en el enantiómero deseado luego de

varias rondas de racemización. La racemización puede realizarse por organocatálisis, catálisis metálica o biocatálisis, pero debe ser el paso rápido de la reacción para no convertirse en el cuello de botella (**figura 1.6**).²⁸

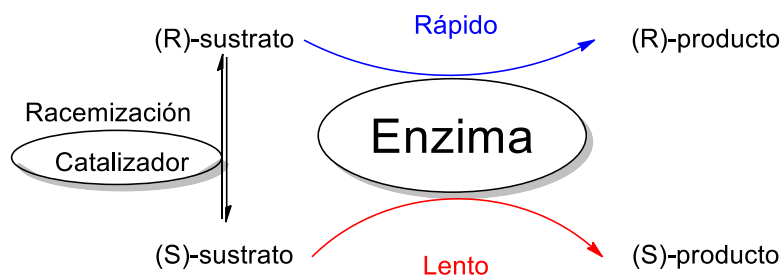


Figura 1. 6: Esquema de resolución cinética dinámica.

Si bien DKR parece ser muy prometedora, la dificultad de aplicar esta metodología radica en la puesta a punto del proceso ya que se deben cumplir varios requisitos:³² (i) la resolución cinética debe alcanzar suficiente enantioselectividad, (ii) la biotransformación y la racemización deben ser compatibles en las condiciones de reacción, (iii) la velocidad de racemización debe ser alta y (iv) el catalizador utilizado para la racemización no debe reaccionar con el producto de la reacción.

Gamal y colaboradores han descrito la DKR de binaftoles, utilizando la lipasa de *Pseudomonas sp.* (resolución cinética) y un complejo que contiene rutenio (racemización) (**figura 1.7**). El primer desafío al que se enfrentaron estos autores fue la optimización de esta metodología, buscando la compatibilidad de ambos catalizadores en el medio de reacción. Una vez definidos los parámetros a utilizar, los binaftoles 1-4 fueron convertidos en el correspondiente binaftol ópticamente activo con un rendimiento mayor al 80% y un exceso enantiomérico hacia el isómero *R* mayor al 90%. Adicionalmente, este método, también fue aplicable a binaftoles tetrasustituidos como (**5**), dando el isómero *R*, el cual es difícil de sintetizar cuando se utilizan resoluciones cinéticas convencionales.³³

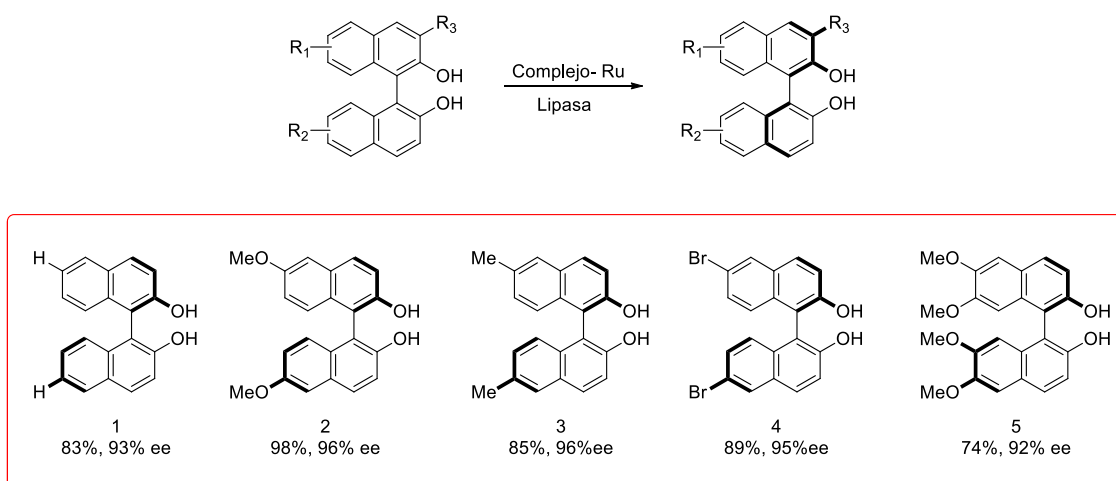


Figura 1. 7: DKR de binaftoles utilizando como catalizadores un complejo con rutenio y una lipasa de *Pseudomonas sp.*

1.3. Reacciones de adición aldólica

La reacción de adición aldólica fue descrita por primera vez por Wurtz y colaboradores y se ha convertido en una de las herramientas más importantes para la formación de enlaces C-C en síntesis orgánica.³⁴ En las reacciones de adición aldólica un compuesto carbonílico, que actúa como nucleófilo, pierde el protón del carbono α formando un ion enolato. Seguidamente este ion enolato ataca al carbono del grupo carbonílico de una segunda molécula, que actúa como electrófilo, generando una unión C-C entre las dos moléculas (**figura 1.8**). En ciertas condiciones las reacciones de adición aldólica pueden ser reversibles, debido a que se puede inducir la ruptura de dicha unión en el medio de reacción (ruptura retro aldólica) produciendo los compuestos iniciales.

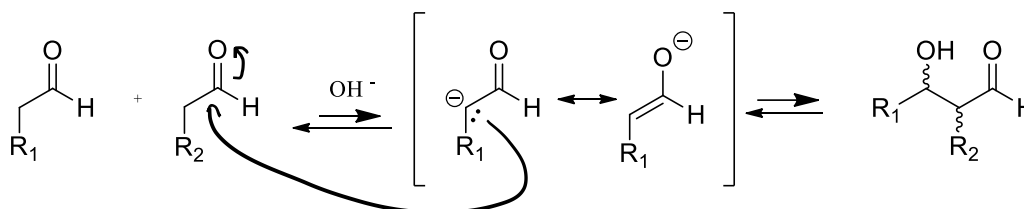


Figura 1. 8: Reacción aldólica catalizada por NaOH.

Las adiciones aldólicas pueden realizarse utilizando bases fuertes como el hidróxido de sodio (NaOH) o el hidróxido de potasio (KOH). Sin embargo, aunque las bases son buenos catalizadores, el empleo de esta metodología de reacción presenta varias desventajas: i) la reacción se lleva a cabo en condiciones fuertes de reacción (pH y temperatura elevados) ii) se producen desechos inorgánicos producto de la degradación de las bases y iii) se genera una mezcla de todos los isómeros posibles para el producto.³⁵ Por estos motivos su implementación a gran escala es muy difícil de realizar.

1.3.1. Adiciones aldólicas asimétricas

Las adiciones aldólicas catalizadas por anticuerpos, pequeñas moléculas (Organocatálisis) o enzimas (Biocatálisis) constituyen una alternativa a la reacción de adición aldólica convencional, generando compuestos quirales con una elevada selectividad y gran eficiencia atómica.³⁶

Las aldolasas, enzimas pertenecientes al grupo de las liasas, catalizan la reacción aldólica reversible entre compuestos carbonílicos formando β -hidroxicetonas (cetoles) quirales o β -hidroxialdehídos (aldoles) (**figura 1.9**). Estas enzimas se caracterizan por generar estos productos con elevado rendimiento y gran exceso enantiomérico, en condiciones suaves de reacción.³⁷

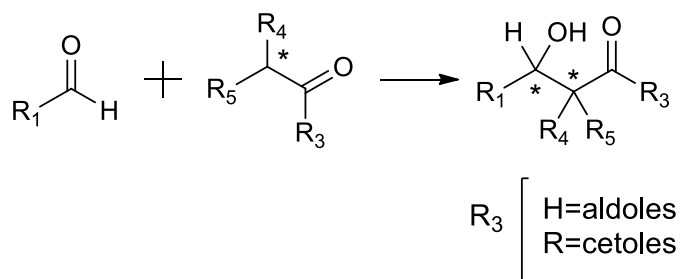


Figura 1. 9: Reacción aldólica catalizada por aldolasas.

Los anticuerpos también pueden ser utilizados como catalizadores en reacciones de adición aldólica. Estas moléculas son generadas mediante una inmunización reactiva con el sustrato de interés unido a un aptámero con una proteína conjugada.

Posteriormente, entre el *pool* de anticuerpos formados se seleccionan aquellos que son capaces de reconocer y llevar a cabo la reacción de adición aldólica. Por ejemplo, el anticuerpo 38C2 formado por la inmunización reactiva en ratones con 1,3-dicetona unida a una proteína (disponible comercialmente) permite llevar a cabo adiciones aldólicas entre cetonas alifáticas y aldehídos (**figura 1.10**).^{38,39}

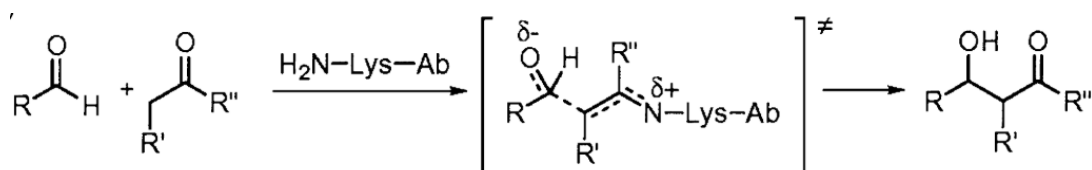


Figura 1. 10: adición aldólica catalizada por un anticuerpo. Ab: anticuerpo.

En contraste con las enzimas y los anticuerpos, los organocatalizadores pueden catalizar adiciones aldólicas con mayor variedad de sustratos, mediante la formación de una enamina intermediaria.⁴⁰ Por ejemplo, Martins y colaboradores han reportado la utilización de una prolinamida sustituida con glicerol para catalizar la adición aldólica de aldehídos voluminosos y ciclohexanonas sustituidas, en medios de reacción acuosos.⁴¹ La **figura 1.11**, muestra la reacción llevada a cabo y los productos obtenidos. Como se puede observar, para estas reacciones organocatalizadas, se alcanzaron buenos rendimientos y considerables excesos enantioméricos.

Si bien existen varios métodos para llevar a cabo síntesis asimétricas que involucran reacciones de adición aldólica, en la actualidad se ha dado gran importancia a aquellos procedimientos donde la asimetría es controlada por un biocatalizador. Es por ello que, en las siguientes secciones, se desarrollará el empleo de aldolasas como biocatalizadores en reacciones de adición aldólica con mayor detalle.

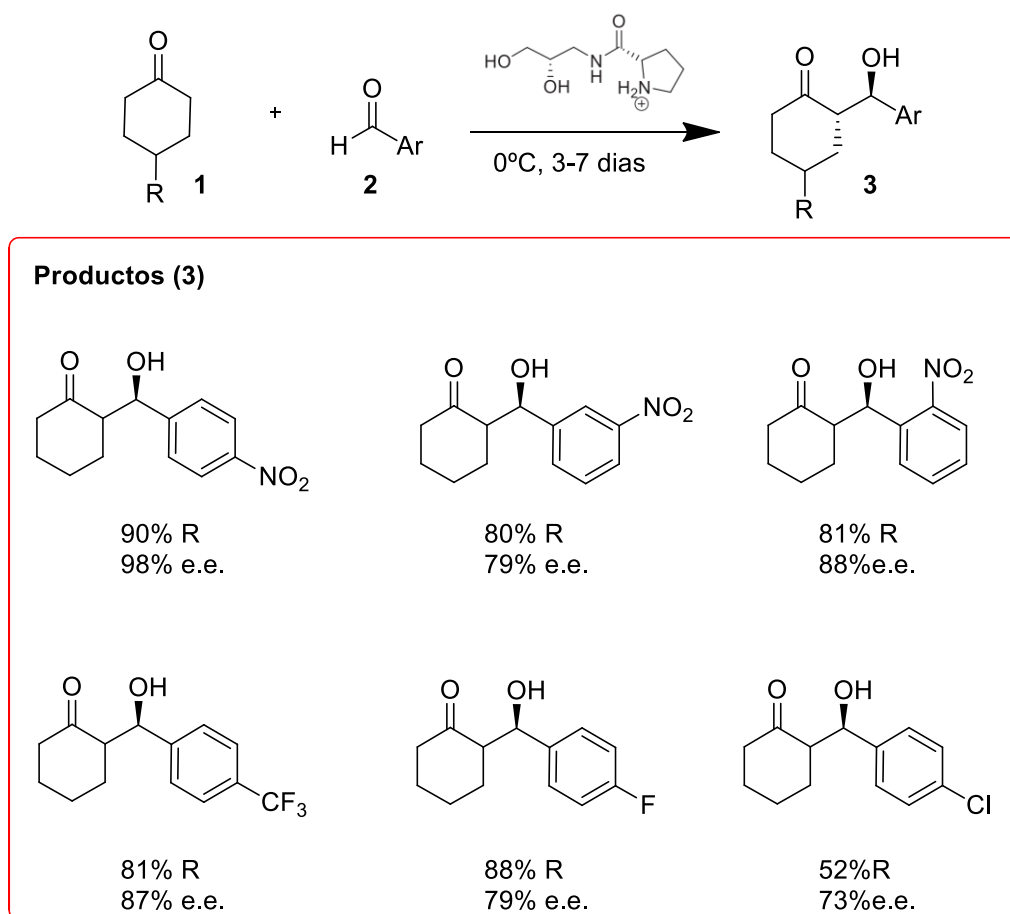


Figura 1. 11: Reacción aldólica organocatalizada entre ciclohexanonas sustituidas y diferentes aldehídos.

1.3.2. Adiciones aldólicas mediadas por aldolasas

1.3.2.1. Clasificación de las Aldolasas

Las aldolasas pueden clasificarse según su mecanismo de reacción en tipo I o II. En las aldolasas de tipo I se genera una base de Schiff entre un residuo conservado de lisina correspondiente al sitio activo y el sustrato dador nucleofílico, lo que posibilita la activación del sustrato. Se encuentran normalmente en animales y plantas. Por otro lado, las aldolasas de tipo II son dependientes de cofactores metálicos (en general Zn^{2+} o Mg^{2+}) los cuales actúan como ácidos de Lewis y activan al sustrato dador nucleofílico formando un enolato. Este tipo de enzimas está ampliamente distribuido en bacterias y hongos (figura 1.12).³⁷

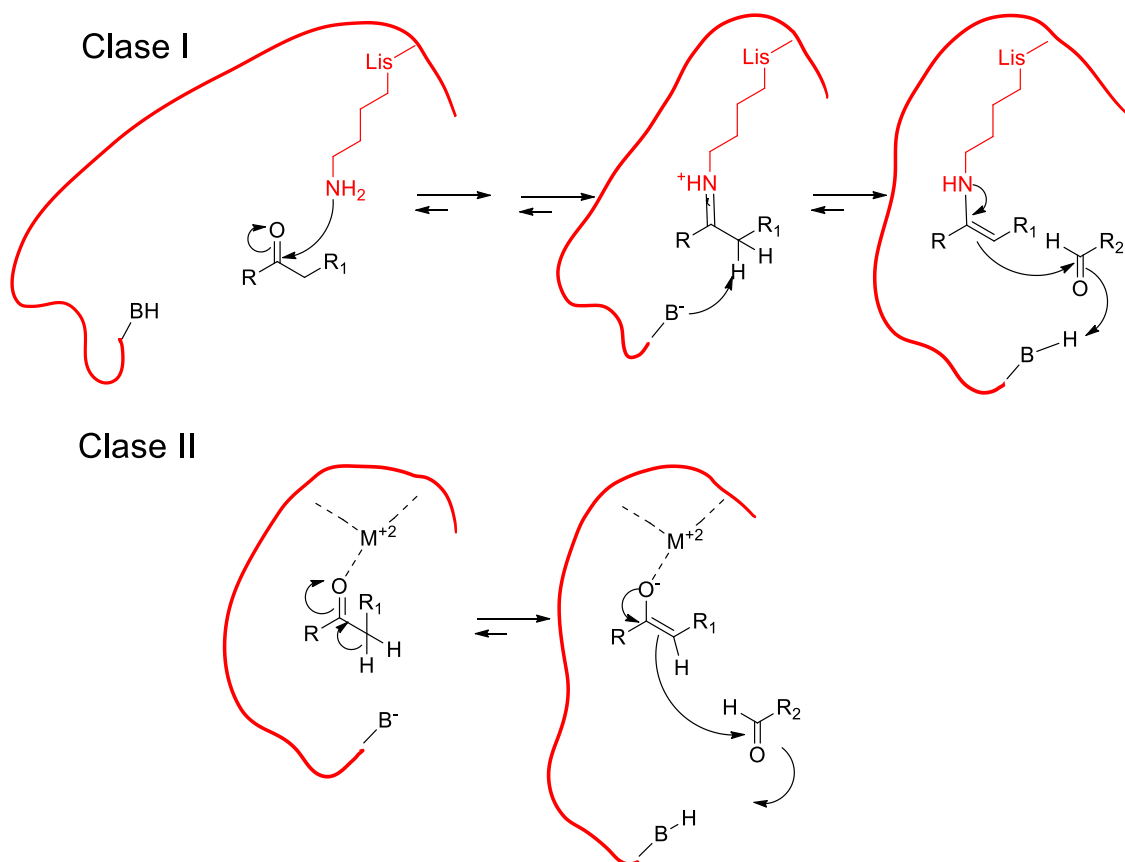


Figura 1. 12: Mecanismo de reacción de aldolasas de tipo I y II.

Teniendo en cuenta que las aldolasas son fuertemente dependientes del sustrato dador nucleofílico, también es posible clasificarlas según esta característica en cinco grupos (**Figura 1.13**). Podemos encontrar aldolasas dependientes de i) glicina, ii) dihidroxiacetona fosfato (DHAP), iii) dihidroxiacetona (DHA), iv) piruvato o v) acetaldehído. No obstante, hace unos años se descubrió que fructosa-6-fosfato aldolasa (aldolasa dependiente de dihidroxiacetona) también podía utilizar como dadores nucleofílicos diferentes cetonas o aldehídos.⁴² Debido a esto, muchos ensayos actuales sobre estas enzimas se basan en encontrar aldolasas capaces de aceptar un mayor rango de nuevos dadores nucleofílicos. La utilización de aldolasas presenta la ventaja que la estereoselectividad, en general, depende de la enzima y no del sustrato.⁴³

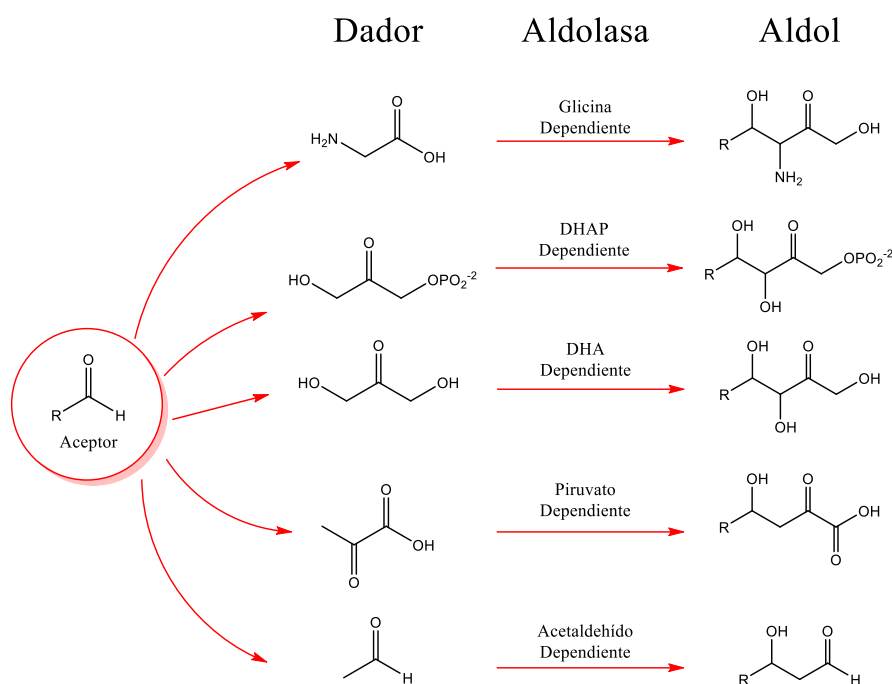


Figura 1. 13: Clasificación de aldolasas según la dependencia de su sustrato dador nucleofílico.

1.3.2.1.1. Aldolasas dependientes de glicina

Existen dos grupos de aldolasas dependientes de glicina: serina hidroximetil transferasa (SHMT) o treonina aldolasa (ThrA). Ambos grupos catalizan la adición aldólica reversible entre glicina y un aldehído, utilizando piridoxal fosfato (PLP) como cofactor. Tanto SHMT como ThrA aceptan un amplio rango de aldehídos aromáticos o alifáticos como sustratos,⁴⁴ generando β -hidroxi- α -aminoácidos. Los productos de estas reacciones pueden ser utilizados como intermediarios en la síntesis de antibióticos, inmunosupresores y drogas para la terapia del Parkinson.⁴⁵

Existen cuatro variantes de ThrA, dos selectivas para treonina (D- o L-treonina) y otras dos selectivas para allo-treonina (D- y L- *allo*-treonina). Todas llevan a cabo la reacción de adición aldólica con un completo control estereoquímico (**Figura 1.14**).⁴⁶

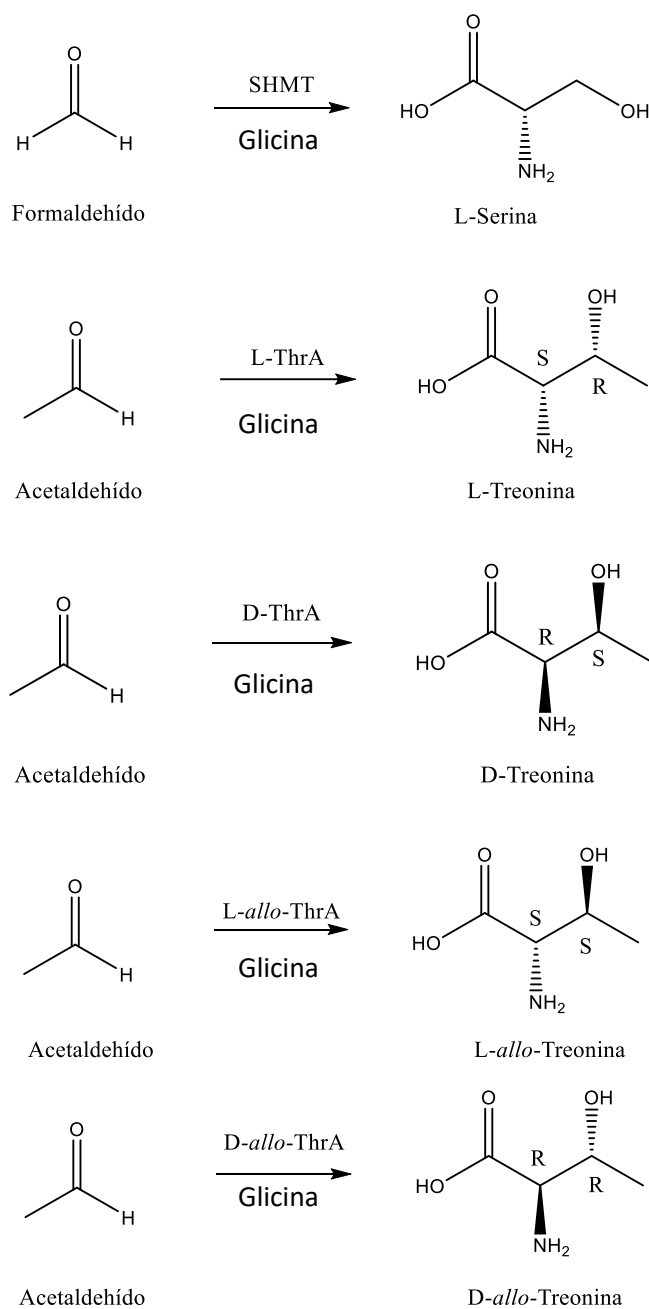


Figura 1. 14: Aldolasas dependientes de glicina.

L-ThrA puede emplearse como biocatalizador en la síntesis de β -hidroxi- α -L-amino ácidos, drogas utilizadas como antivirales, antitumorales e inmunosupresores. La síntesis se puede llevar a cabo utilizando glicina como dador y un amplio rango de aldehídos como aceptores. Si bien estas enzimas llevan a cabo la reacción con alta estereoselectividad cuando el sustrato aceptor es un aldehído alifático, la

estereoselectividad del carbono β se ve drásticamente afectada cuando los aceptores utilizados son aldehídos aromáticos, mientras que la estereoselectividad del carbono α se mantiene. (**figura 1.15**).⁴⁷ Por este motivo, y sumado al bajo rendimiento que se obtiene utilizando estas enzimas, la aplicación de L-ThrAs se encuentra aún limitada, pero en búsqueda de nuevas variantes capaces de mantener el control estereoquímico en la reacción.⁴⁸

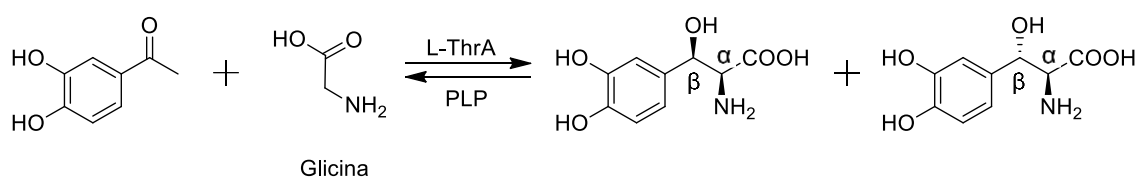


Figura 1. 15: Síntesis de L-treo-3,4-dihidroxifenilserina utilizando L-ThrA como biocatalizador.

1.3.2.1.2. Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato

Como muestra la **figura 1.16** existen cuatro aldolasas dependientes de DHAP: i) D-fructosa-1,6-bisfosfato (FruA), ii) L-fuculosa-1-fosfato (FucA), iii) L-ramnulosa-1-fosfato (RhuA) y iv) D-tagatosa-1,6-bisfosfato (TagA) aldolasa. Estas enzimas catalizan naturalmente la adición aldólica asimétrica y reversible entre DHAP y gliceraldehído-3-fosfato (G3P) o L-lactaldehído.⁴⁹

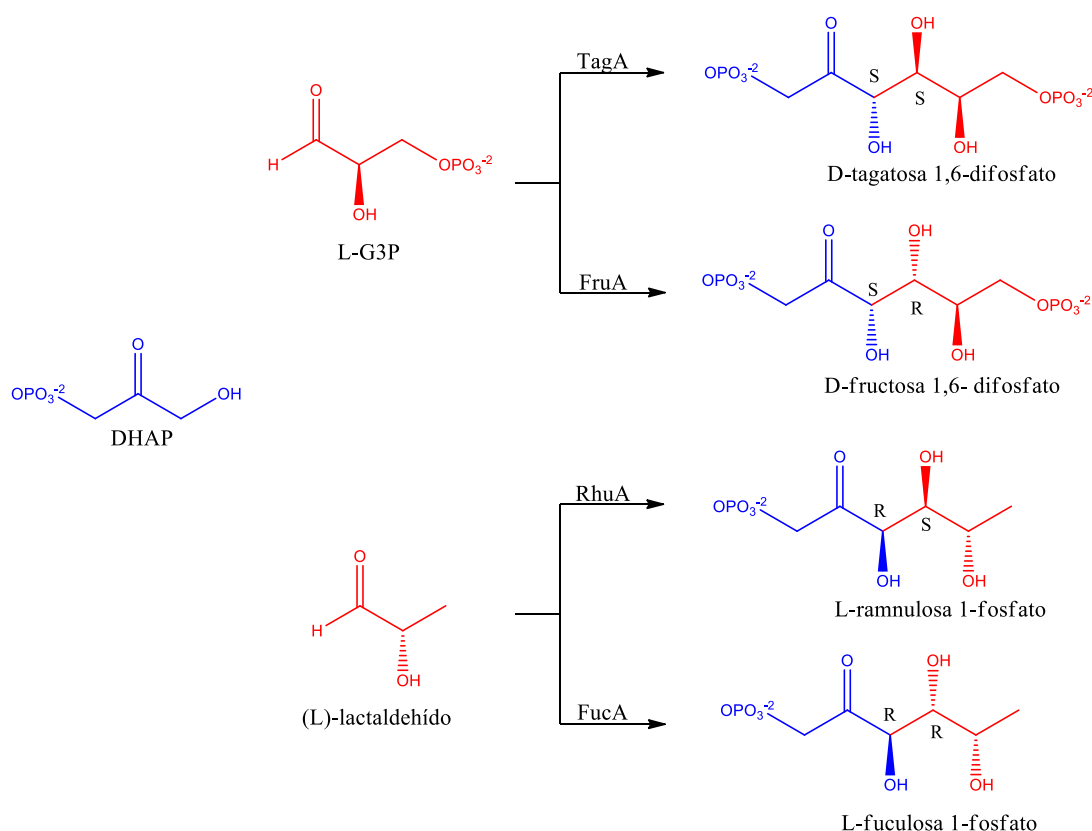


Figura 1. 16: Aldosas dependientes de dihidroxiacetona fosfato.

Debido a que proceden con un completo control estereoquímico, estas cuatro enzimas son las más utilizadas e investigadas. Pueden llevar a cabo adiciones aldólicas entre DHAP y una amplia variedad de aldehídos, generando dos nuevos centros estereogénicos. Cada aldolasa genera un único producto, y la estereoquímica de estos compuestos en C-3 y C-4 es complementaria. La estereoquímica del C-3 es estricta ya que depende de la interacción de cada enzima con su sustrato dador mientras que la del C-4 puede llegar a variar, en algunos pocos casos, con la estructura del sustrato aceptor.⁴³

La fuerte especificidad de estas enzimas por DHAP representa un inconveniente para la síntesis biocatalizada, debido a que este sustrato es caro y de baja estabilidad. Es por ello que se han desarrollado distintos protocolos enzimáticos o químicos para sintetizar DHAP o sus precursores, respectivamente. Los procesos químicos se centran en sintetizar a gran escala precursores de DHAP que puedan ser fácilmente convertidos

al momento de ser usados. Sin embargo, estos procesos son muy tediosos y generan desechos tóxicos.⁵⁰ Es por ello que se han sustituido por procesos enzimáticos que involucran la conversión desde dihidroxiacetona (DHA), glicerol, glicidol, entre otros sustratos.⁵¹ El grupo de investigación dirigido por Garcia Junceda, ha descrito un sistema de producción de DHAP muy eficiente a partir de DHA utilizando dihidroxiacetona kinasa (DHAK) recombinante de *Citrobacter freundii*. La regeneración *in-situ* del ATP utilizado es catalizado por una acetato kinasa (AK) (**figura 1.17**).⁵²

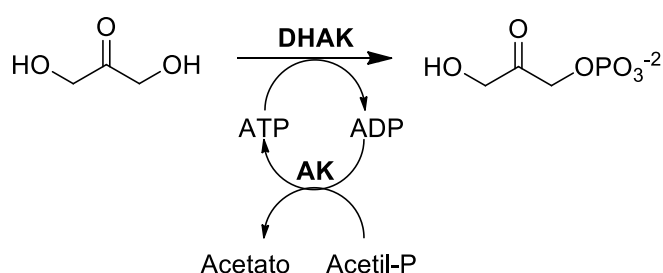


Figura 1. 17: producción de DHAP a partir de DHA, utilizando DHAK y AK.

1.3.2.1.2.1. Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa

In vivo, esta enzima forma parte de la glucólisis, de la gluconeogénesis y del ciclo de Krebs, y puede encontrarse tanto en mamíferos como en plantas o microorganismos. A diferencia de los mamíferos y de las plantas donde solo encontramos FruA de Clase I, en microorganismos podemos encontrar ambas clases. La expresión de una de las clases es constitutiva, mientras que la otra puede ser inducida por cambios en las condiciones de crecimiento del microorganismo.⁵³

Dentro de este tipo de enzimas, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de músculo de conejo (RAMA) es una de las aldolasas más versátiles y más utilizadas para la preparación de azúcares, desoxiazúcares, fluoroazúcares, análogos de nucleósidos, terpenoides, alcaloides, macrociclos, iminociclitales y antibióticos de tipo macrólidos. En el sitio activo de RAMA el ataque nucleofílico del intermedio enamina formado entre DHAP y la enzima ocurre en la cara *si* del aldehído aceptor, proporcionando así el producto con estereoquímica (3*S*,4*R*) con respecto al carbonilo.^{54,55}

A modo de ejemplo, en la **figura 1.18** se puede observar la síntesis de un iminociclitol, inhibidores de glucosidasas y glicosiltransferasas.⁵⁶ En un primer paso de reacción, RAMA cataliza la condensación aldólica de 3-azido-2-hidroxiopropanal (1) y DHAP, dando el producto de configuración 3*S*, 4*R*. Posteriormente, mediante una fosfatasa ácida y una glucosa isomerasa, se obtiene 6-azido-6-desoxi-D-glucopiranos (4). El último paso de reacción involucra una aminación reductiva dando como producto un iminociclitol de siete miembros (5).⁵⁷

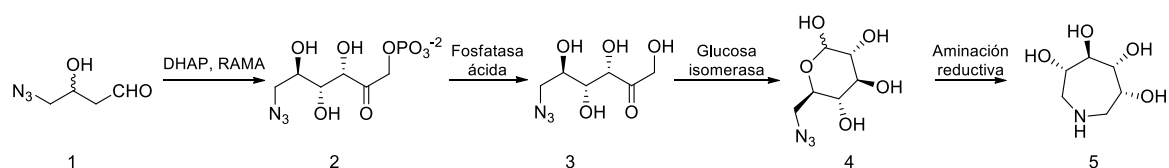


Figura 1. 18: Síntesis de iminociclitol de 7 miembros, usando RAMA como biocatalizador

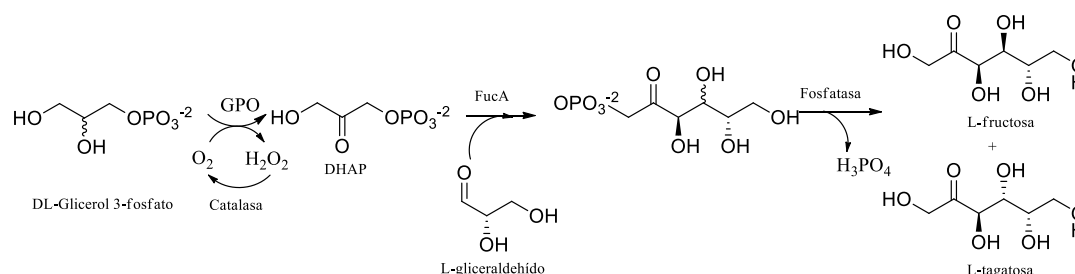
1.3.2.1.2.2. L-Fuculosa-1- fosfato aldolasa

La reacción natural de esta aldolasa de Clase II es la ruptura reversible de L-fuculosa-1-fosfato para generar DHAP y L-lactaldehído, paso central en el metabolismo de L-fucosa en bacterias.⁵⁸ Como otras aldolasas, FucA presenta gran selectividad para su sustrato dador (DHAP) pero puede aceptar un amplio rango de aldehídos como sustratos aceptores.

FucA está ampliamente descrita para la síntesis de azúcares raros, compuestos que poseen una potencial aplicación en industrias farmacéuticas, alimenticias o de nutrición. Esta síntesis se puede llevar a cabo mediante una reacción multienzimática *one-pot* utilizando FucA entre los biocatalizadores y generando DHAP a partir de D- o L-glicerol-3-fosfato como material de partida. El primer paso consiste en la oxidación de D- o L-glicerol-3-fosfato para formar DHAP utilizando glicerol fosfato oxidasa (GPO). El peróxido de hidrógeno (subproducto) que se genera se elimina como oxígeno por adición de una catalasa al medio de reacción. Una vez formado DHAP, la adición aldólica se realiza agregando D- o L-gliceraldehído y FucA como biocatalizador. Como resultado, cuando se utilizó D-gliceraldehído, los productos de reacción obtenidos

fueron D-sorbosa-1-fosfato o su isómero D-psicosa-1-fosfato, siendo el último el producto mayoritario. En cambio, cuando se utilizó L-gliceraldehído los productos de reacción fueron L-tagatosa-1-fosfato y L-fructosa-1-fosfato, en similares proporciones. La desfosforilación posterior permitió producir los cuatro azúcares raros como puede verse en la **figura 1.19**. Cabe mencionar que esta variante de FucA parece perder su estereoselectividad cuando acepta L-gliceraldehído, lo que no sucede cuando el D-gliceraldehído es el aceptor. No obstante, esta propiedad de las aldolasas podría aprovecharse bien para la síntesis de varios tipos de azúcares raros.⁵⁹

a.



b.

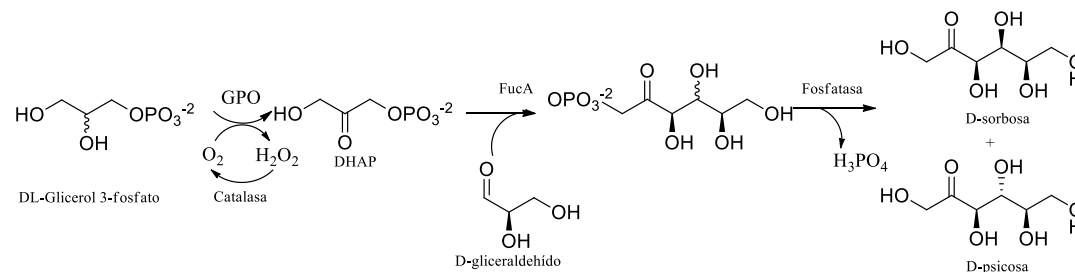


Figura 1. 19: Reacción multienzimática *one-pot*, utilizando FucA y (a.) L-gliceraldehído (b.) D-gliceraldehído

1.3.2.1.2.3. L-Ramnulosa-1-fosfato aldolasa

La reacción natural de RhuA es la adición aldólica reversible y asimétrica entre DHAP y L-lactaldehído para producir L-ramnulosa 1-fosfato. RhuA puede aceptar un amplio rango de aldehídos naturales y no naturales como sustratos aceptores produciendo la síntesis de 3*R*,4*S* dioles.⁶⁰

Esta enzima, al igual que FucA puede ser empleada como biocatalizador en la síntesis de azúcares raros. Recientemente, Chen y colaboradores⁵¹ reportaron la síntesis de cetosas raras utilizando un eficiente sistema biocatalítico de cuatro enzimas clonadas en *E. coli*. Como muestra la **figura 1.20**, en los primeros dos pasos de reacción el glicerol se transforma en DHAP utilizando dos enzimas: glicerol kinasa (GK) y GPO (acoplada a una catalasa). Posteriormente, RhuA cataliza la adición aldólica entre DHAP y D-gliceraldehído (D-GA), el cual es incorporado al medio de reacción. En concordancia con lo postulado anteriormente (**inciso 1.3.2.1.2.2.**), cuando se emplea D-GA la estereoselectividad de RhuA se pierde, dando los dos isómeros. Los productos de esta reacción se desfosforilan por una glicerol fosfatasa oxidasa de *S. pneumoniae*, generando D-sorbosa y D-psicosa con un rendimiento de 99% al cabo de 8 h de reacción. Este sistema presenta la ventaja de maximizar el rendimiento evitando utilizar DHAP como material de partida, por lo que la reacción reduce costos de producción.

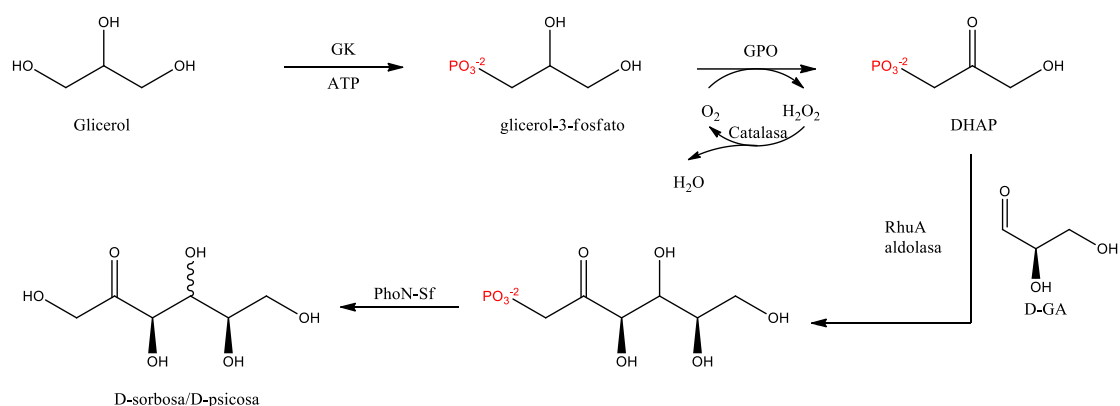


Figura 1. 20: Síntesis de cetosas raras catalizada por una *E. Coli* recombinante conteniendo GK, GPO, RhuA y una glicerol fosfatasa oxidasa.

1.3.2.1.2.4. Tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa

Esta enzima tetramérica cataliza la adición aldólica reversible entre DHAP y D-gliceraldehído-3-fosfato produciendo tagatosa-1,6-bisfosfato. Naturalmente, TagA está involucrada en el metabolismo de lactosa, D-galactosa y galactitol.⁶¹ Debido a su baja selectividad, esta aldolasa no es muy utilizada como biocatalizador. Hace unos años, Bolt y colaboradores, realizaron modificaciones genéticas sobre TagA para revertir este inconveniente con buenos resultados. Las modificaciones se realizaron sobre los

aminoácidos cercanos al sitio activo, que están implicados en el posicionamiento del sustrato.⁶²

1.3.2.1.3. Aldolasa dependiente de dihidroxiacetona

1.3.2.1.3.1. Fructosa 6-fosfato aldolasa

FSA es la única enzima representante del grupo de aldolasas dependiente de dihidroxiacetona (DHA). Esta enzima utiliza como sustrato D-fructosa-6-fosfato generando, mediante una reacción reversible, G3P y DHA. Actualmente, se ha convertido en una herramienta importante en la síntesis de carbohidratos, derivados de azúcares y sus análogos polihidroxilados. Una de las mayores ventajas que ofrece esta enzima es que acepta análogos de DHA como sustratos dadores (como hidroxiacetona, hidroxibutanal o hidroxibutanona), evitando el uso de costosos compuestos fosforilados.⁶³ A su vez, se ha reportado la posibilidad de utilizar una amplia variedad de aldehídos como electrófilos, dando productos de estereoquímica (3*S*,4*R*).⁶⁴

D-Fagomina es un iminoazúcar aislado por primera vez de una variedad de trigo serraceno.⁶⁵ Este iminoazúcar es un potente inhibidor de *R*-glucosidasa y *R*-galactosidasa intestinal de mamíferos. La síntesis de este compuesto puede llevarse a cabo utilizando una estrategia quimioenzimática de dos pasos.⁶⁶ Como se muestra en la **figura 1.21** el primer paso de reacción consta de una adición aldólica estereoselectiva entre DHA y *N*-Cbz-3-aminopropanal; posteriormente el producto de esta adición se somete a una aminación reductiva utilizando hidrógeno/paladio para generar D-fagomina con un rendimiento de 89% y un exceso enantiomérico de 93%. Una segunda aminación reductiva puede generar otros derivados *N*-alquilados, los cuales pueden utilizarse potencialmente como drogas inhibitorias de la actividad *R*-glucosidasa.

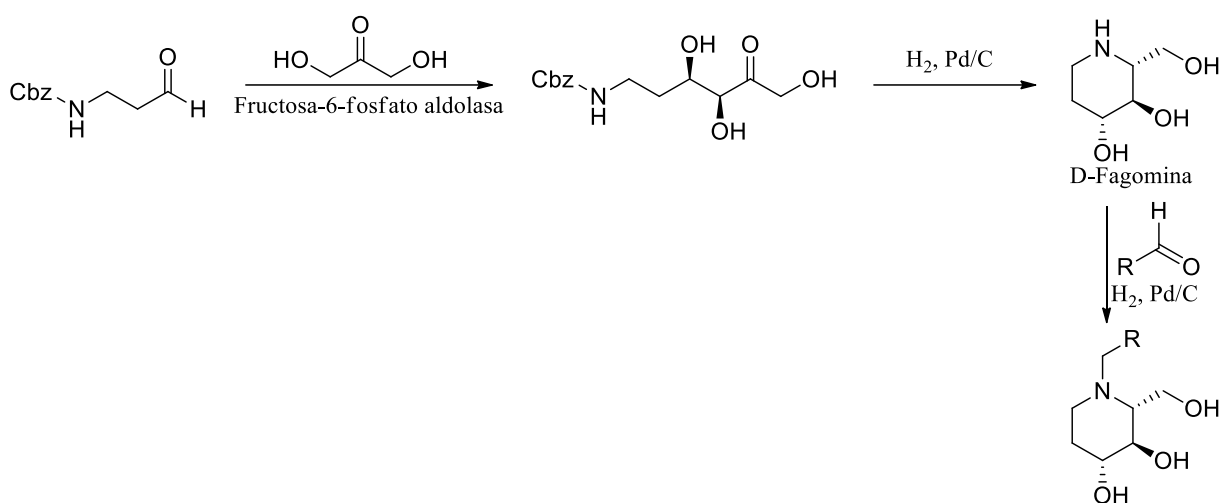


Figura 1. 21: Síntesis quimioenzimática de D-Fagomina.

1.3.2.1.4. Aldolasas dependientes de piruvato o fosfoenolpiruvato

Estas aldolasas catalizan la adición aldólica entre diversos aldehídos (electrófilos) y piruvato o fosfoenolpiruvato, dando como producto 3-desoxi-2-ceto ácidos. Mientras que las aldolasas dependientes de piruvato están implicadas en la degradación de ácidos 3-desoxi-2-ulosónicos, unidades de azúcares esenciales para procesos biológicos, las aldolasas dependientes de fosfoenolpiruvato están involucradas en la biosíntesis de cetoácidos.⁶⁷ Ambas enzimas son fuertemente dependientes de sus sustratos dadores pero no así de sus sustratos aceptores, por lo cual pueden aceptar un amplio rango de aldehídos.⁴⁵

Ácido *N*-acetilneuramínico aldolasa (NeuAcA) es una aldolasa dependiente de piruvato que cataliza la adición aldólica entre piruvato y *N*-acetilmanosamina. Esta enzima está ampliamente estudiada ya que, a diferencia del resto de las aldolasas, NeuAcA presenta una estereoquímica determinada por el sustrato y no por la enzima. Por tal motivo, se aprovechó esta característica para sintetizar análogos de ácido siálico en sus isómeros D y L (**figura 1.22**).^{68,69}

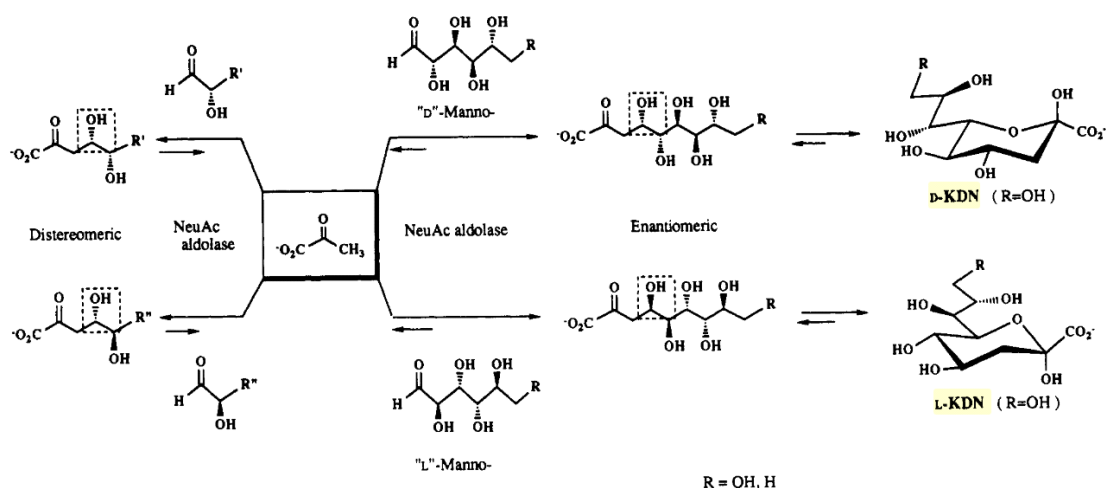


Figura 1. 22: Síntesis de análogos de ácido siálico catalizada por NeuAcA.

1.3.2.1.5. Aldolasa dependiente de acetaldehído

1.3.2.1.5.1. 2-Desoxirribosa-5-fosfato aldolasa

2-Desoxirribosa-5-fosfato aldolasa (DERA), es una aldolasa de tipo I y la única reportada dependiente de acetaldehído. DERA está involucrada en el catabolismo de las pentosas que forman parte de desoxinucleósidos, en la ruta de las pentosas fosfato. La reacción natural de DERA es la adición aldólica reversible entre gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y acetaldehído para generar 2-desoxirribosa-5-fosfato (DR5P) (**figura 1.23**),⁷⁰ un intermediario ampliamente empleado en la síntesis de desoxinucleósidos modificados, compuestos de reconocida actividad antiviral y antitumoral.⁷¹

Esta enzima se encuentra descrita en plantas, animales o microorganismos. En humanos se expresa mayormente en hígado y pulmón, y está involucrada en las respuestas al estrés celular.⁷² DERA se encuentra codificada dentro del operón *deo*, específicamente en *deoC*. Debido a que DERA es una enzima inducible, la transcripción de los genes involucrados en este operón es inducida por la unión de DR5P a los promotores adyacentes P1 y P2, y es reprimida por la proteína *deoR* (**figura 1.24**).

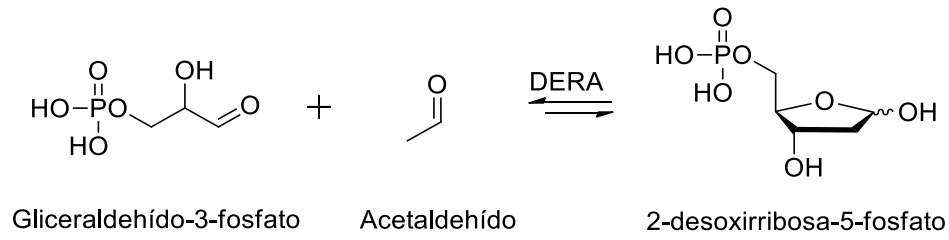


Figura 1. 23: Reacción de adición aldólica entre G3P (aceptor nucleofílico) y acetaldehído (dador nucleofílico) biocatalizada por DERA.

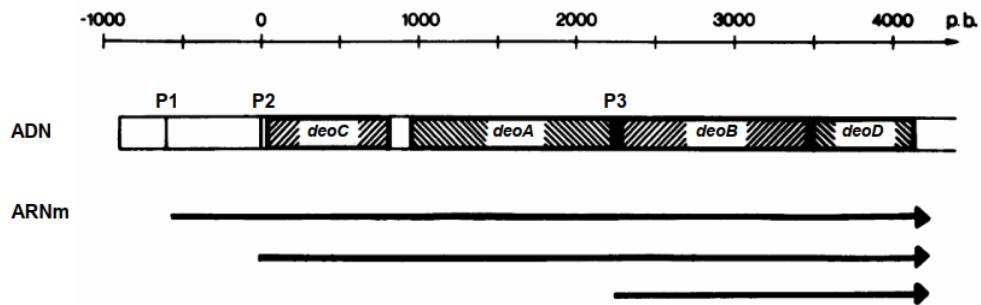


Figura 1. 24: operón deo.

La secuencia del gen que codifica DERA de *E. coli* K12 (*EcDERA*), una de las DERAs más estudiadas, se reportó por primera vez en el año 1982 por Valentin-Hansen y colaboradores.⁷³ Posteriormente, la enzima se aisló y se determinó que contenía 259 aminoácidos y tenía un peso molecular de 27,7 kDa. El análisis de la estructura por rayos X determinó que *EcDERA* (**Figura 1.25**) presenta un plegamiento típico de (α/β)s barril TIM,⁷⁴ donde el sustrato forma un base de Schiff con la lisina 167;⁷⁵ dicho plegamiento es común entre las aldolasas más eficientes.

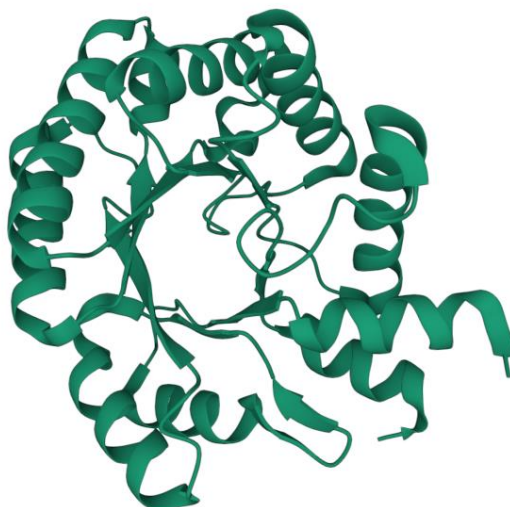
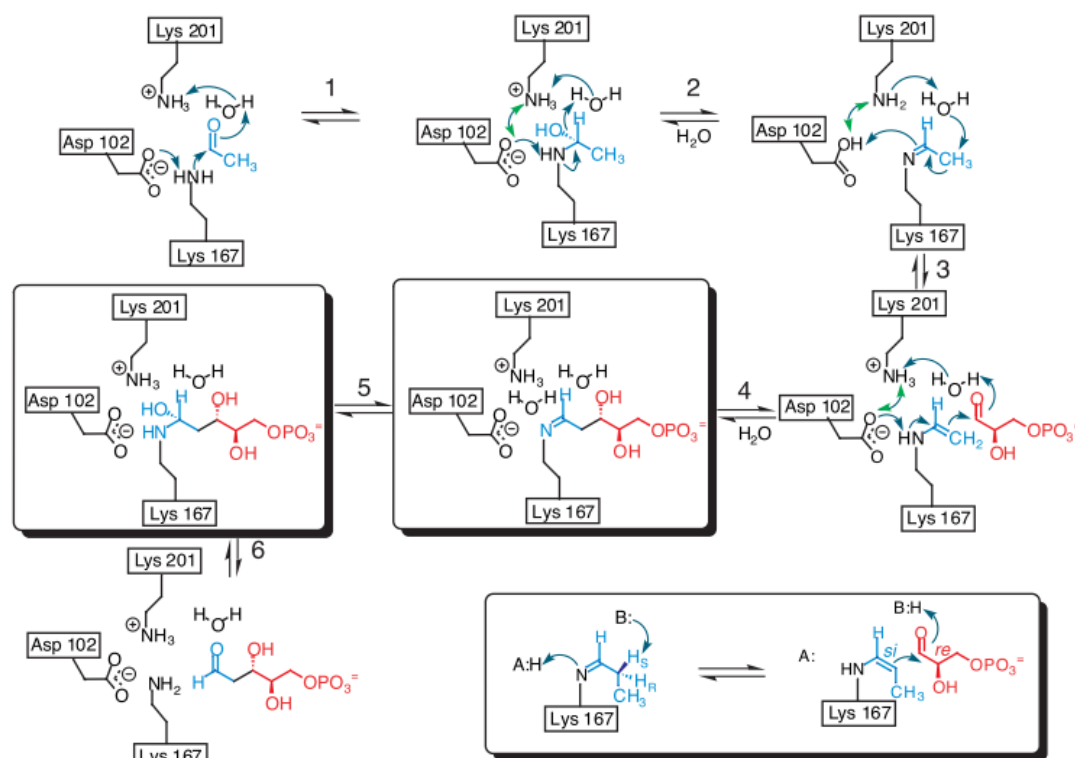


FIGURA 1. 25: DERA DE *E. COLI* K12 (*EcDERA*), PDB: 1PX1.

Aunque la mayoría de las aldolasas presenta una estructura multimérica, DERA puede ser encontrada en solución tanto como monómero o como dímero. Estudios previos han confirmado que la enzima se halla en forma monomérica en *buffer* Tris-HCl-EDTA, mientras que en *buffer* fosfato se la encuentra en forma dimérica.⁷⁶ Actualmente, se hallan disponible comercialmente DERA de *E. coli* K12 y de *Lactobacillus plantarum*.

El mecanismo catalítico de DERA se determinó por estudios cristalográficos de alta resolución, RMN, mutagénesis y modelado molecular. Lys167 de *EcDERA*, se identificó como el residuo implicado en la formación de la base de Schiff, correspondiente al mecanismo de las aldolasas de tipo I. Inicialmente, Lys167 forma una imina (base de Schiff) con el acetaldehído, la cual se estabiliza por resonancia dando lugar a la formación de una enamina. Al mismo tiempo, Asp102, Lys201 y una molécula de agua forman un sistema de abstracción del protón de la imina del C2 del acetaldehído y para la protonación del carbonilo del sustrato aceptor. De esta forma, el sistema se prepara para atacar nucleofilicamente al carbono carbonílico de dicho sustrato. La **figura 1.26** muestra en detalle el mecanismo catalítico de DERA propuesto por Heine y colaboradores; las estructuras recuadradas fueron identificadas en los estudios cristalográficos de *EcDERA*.⁷⁷


 Figura 1. 26: Mecanismo catalítico de *EcDERA*. Extraído de Heine et al., 2001⁷⁷

Adicionalmente, Schulte y colaboradores^{78,79} han demostrado, con ensayos de dinámica molecular y RMN, que el extremo C-terminal de *EcDERA* funciona como una “tapadera” del sitio activo que hace variar a esta enzima entre un estado abierto o cerrado. El estado abierto permite el ingreso del sustrato y la liberación del producto, mientras que en el estado cerrado se produce el paso de catálisis de la abstracción del protón tal como se describió por Heine. La tirosina más cerca del C-terminal (Tyr259) es la encargada de entrar al sitio activo para generar el estado cerrado y se cree que este residuo también está implicado en el paso de abstracción del protón. Sin embargo, su mecanismo todavía no ha sido dilucidado.

Además, estos investigadores demostraron la existencia de residuos de unión de fosfato auxiliares en la cola C-terminal de *EcDERA* que podrían facilitar su orientación en la posición óptima para la catálisis. Esta podría ser la razón por la cual la eficiencia catalítica de *EcDERA* se reduce drásticamente para sustratos no fosforilados. Sin embargo, esto es más importante en la dirección retro-aldólica de los hemiacetales

cíclicos (lactoles), ya que se requiere un paso de apertura de anillo adicional dado que el aldehído reactivo es el de cadena abierta. Así, la presencia de un grupo fosfato podría actuar como una marca de afinidad facilitando la unión al sitio activo en el que se cataliza la apertura del anillo.

Las características antes mencionadas, conducen a que DERA sintetice hemiacetales cíclicos estables a partir de aldehídos no fosforilados. Por ejemplo, DERA puede aceptar tres aldehídos no quirales y no fosforilados como sustratos,⁸⁰ lo que posibilita que se generen dos reacciones de adición aldólica consecutivas. Como se observa en la **figura 1.27**, el producto de la primera adición aldólica sigue siendo sustrato de DERA (electrófilo), el cual reacciona con otro acetaldéhído (nucleófilo) dando lugar a una nueva adición aldólica altamente estereoespecífica. Finalmente, por sus características, esta molécula se cicla espontáneamente en el correspondiente β -hidroxi-D-lactol.

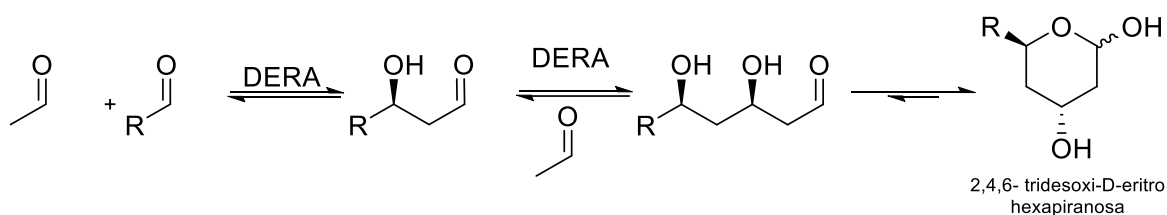


Figura 1. 27: Adición aldólica catalizada por DERA utilizando tres aldehídos como sustratos.

1.3.2.1.5.1.1. Modificaciones genéticas en DERA

1.3.2.1.5.1.1.1. Aceptación de sustratos

Una gran variedad de β -hidroxi-D-lactoles-5-sustituídos se prepararon empleando DERAs *wild-type*, pero la actividad de esta enzima depende en gran medida de los grupos sustituyentes del sustrato. Debido a que DERA es naturalmente dependiente de sustratos aceptores fosforilados, la mayor actividad se observa conteniendo aldehídos con grupos cargados negativamente.⁸¹ Esto se demostró en 1990 cuando Barbas y colaboradores describieron que, al utilizar D-gliceraldehído, la actividad de DERA^{wt} era 6 (seis) veces menor que al utilizar D-gliceraldehído-3-fosfato.⁸² La dependencia de DERA hacia sustratos fosforilados y con determinadas características limita su

aplicación en la industria a gran escala, es por ello que se han realizado estrategias racionales para expandir la especificidad de DERA y mejorar su actividad frente a una amplia variedad de sustratos no fosforilados. Estas estrategias incluyen ingeniería de sustrato o solvente, modificaciones covalentes o mutaciones dirigidas o al azar.^{83,84}

En particular, las mutaciones para mejorar la preferencia de sustratos se basaron en modificar aminoácidos del bolsillo de unión a fosfato conservado en muchas proteínas. Este bolsillo está compuesto, en el caso de *EcDERA*, por los residuos Gly171, Lys172, Gly204, Gly205, Val206, Arg207, Gly236, Ser238 y Ser239. Sin embargo, solo Ser238 se une a DR5P formando un puente de hidrógeno. Al cambiar Ser238 por aminoácidos ácidos como aspartato (Ser238Asp), la preferencia por sustratos neutros o cargados positivamente aumentó significativamente sobre los sustratos cargados negativamente.⁸⁴ Esta mutante fue empleada en la adición aldólica consecutiva entre acetaldehído y sustratos electrofílicos no fosforilados (**figura 1.28**).⁸¹

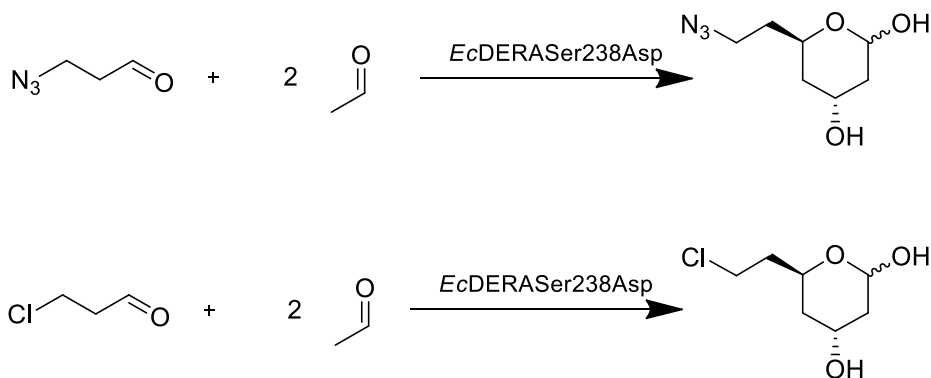


Figura 1. 28: Biotransformación utilizando *EcDERA* Ser238Asp y sustratos electrofílicos no fosforilados.

Como describimos anteriormente las aldolasas son muy utilizadas para sintetizar análogos de azúcares, por lo que el empleo de DERAs en dichas síntesis está ampliamente descrito en bibliografía. Chabre y colaboradores emplearon una DERA de *Arthrobacter chlorophenolicus* (*ArthroDERA*) para sintetizar varios azúcares raros.⁸⁵ La secuencia de esta proteína, obtenida de bases de datos (UniProt), fue sintetizada y luego clonada y sobre-expresada en *Escherichia coli* BL21 DE3.

Si bien las aldolasas suelen ser específicas por su nucleófilo, *ArthroDERA* descrita por Chabre puede aceptar diversos sustratos como dadores nucleofílicos (**figura 1.29**).⁸⁶⁻⁸⁸ Esta promiscuidad catalítica ya había sido reportada por otros autores, lo que demuestra que la especificidad de DERA puede ser menos estricta de lo que se pensaba.⁸⁹ Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con las aldolasas dependientes de DHAP mencionadas anteriormente, DERA es altamente estereoselectiva y los productos que se obtienen empleando esta enzima poseen un exceso diastereomérico mayor al 95% para todos los casos.

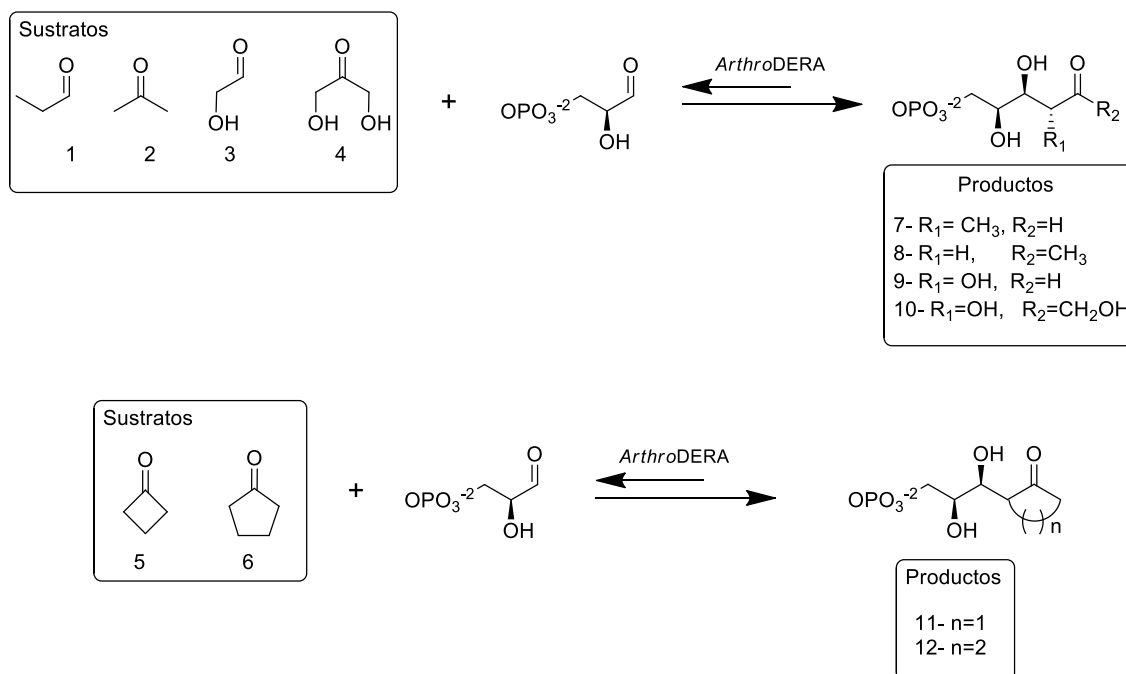
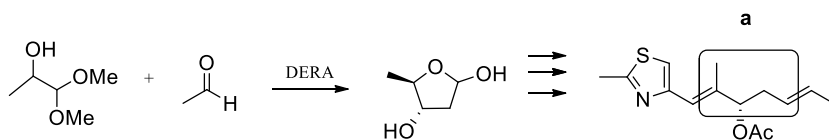


Figura 1. 29: Adición aldólica catalizada por *ArthroDERA* sintética.

Otro ejemplo del empleo de DERA se muestra en la **figura 1.30** para la síntesis de Epotilona A, un potente anticancerígeno. Los dos intermediarios de Epotilona A se sintetizaron utilizando una estrategia quimioenzimática. La furanosa que se puede observar en la síntesis del **intermediario a**, se realizó mediante una adición aldólica entre acetaldehído y 1,1-dimetoxi-2-propanol catalizada por *EcDERA*. Posteriormente, diversas reacciones químicas se llevaron a cabo hasta llegar al **intermediario a** con un 60% de rendimiento. En paralelo, el anillo lactónico requerido para formar el

intermediario b se sintetizó utilizando DERA, acetaldehído y 3-hidroxi-2-metilpropanal como sustratos. Finalmente, utilizando diferentes pasos químicos de reacción pudo llevarse a cabo la síntesis completa de Epotilona A.⁹⁰

Síntesis de intermediario a



Síntesis de intermediario b

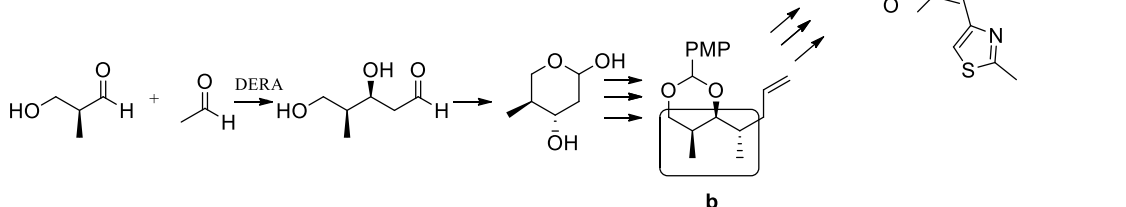


Figura 1. 30: Síntesis de intermediarios de Epotilona A utilizando DERA como biocatalizador.

1.3.2.1.5.1.1.2. Resistencia frente a acetaldehído

La función natural de DERA es utilizar el azúcar formado por degradación de los desoxirribonucleósidos como sustrato. Al catabolizarlo se produce gliceraldehído-3-fosfato y acetaldehído, los cuales ingresan a la glucólisis y al ciclo de Krebs, respectivamente.⁹¹ La presencia de acetaldehído funciona como un regulador del catabolismo, haciendo que la enzima se inhiba cuando se encuentra en presencia de elevada concentración de este producto. Esta inhibición dificulta la aplicación de DERA en la industria ya que, es necesario incorporar una gran cantidad de acetaldehído para desplazar la reacción hacia la síntesis. Es por ello que se ha puesto mucho esfuerzo en dilucidar este mecanismo de inhibición e, indirectamente, modificar la tolerancia de DERA frente a su sustrato.

Dick y colaboradores⁹² describieron el mecanismo de inhibición de *EcDERA* en presencia de una alta concentración de acetaldehído. Mediante estudios de cristalografía se determinó la estructura de DERA luego de una incubación *overnight* con acetaldehído (300 mM). Como se muestra en la **figura 1.31** el producto de la adición aldólica de dos acetaldehídos (2) es propenso a deshidratarse, perdiendo un grupo hidroxilo. Este producto de deshidratación, que se denomina crotonaldehído (3), sería el responsable de la inhibición de DERA. En el mecanismo de inhibición propuesto por Dick, el crotonaldehído forma una base de Schiff con la cadena lateral de la Lisina 167 implicada en el sitio activo de la enzima (4). Posteriormente, el grupo tiol de la Cisteína 47, distante del sitio activo, actúa como nucleófilo y ataca al crotonaldehído unido a la Lisina 167, formando una unión covalente (5). Finalmente, se produce la hidratación del doble enlace formando el compuesto (6), haciendo que la modificación sea irreversible.

Debido a que la Lys 167 implicada en la inhibición de DERA se encuentra en el sitio activo, modificar este aminoácido concluye en la pérdida de la actividad de DERA. Es por ello que las modificaciones genéticas para obtener *EcDERA* resistente a elevada concentración de acetaldehído se centraron en sustituir la cisteína distante al sitio activo por un aminoácido no nucleofílico, como metionina (C47M). Dicha cisteína se encuentra conservada en DERAs de distintos microorganismos.

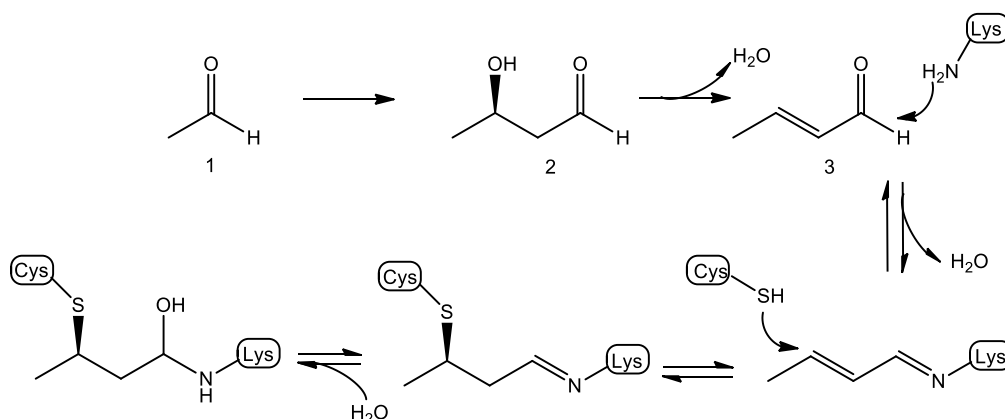


Figura 1. 31: Mecanismo de inhibición de DERA propuesto por Dick.⁹²

Sin embargo, Bramski⁸⁰ y colaboradores han demostrado que esta forma de inhibición no es la única. Al reemplazar la Cys47 de *EcDERA* por Leucina (aminoácido voluminoso) la estabilidad de la enzima frente a la incubación con acetaldehído y crotonaldehído fue mayor respecto a *DERA_{wt}*. En cambio, cuando Cys47 se reemplazó por Alanina o Glicina (aminoácidos menos voluminosos), DERA fue muy sensible a la incubación con acetaldehído y crotonaldehído. Esto indicaría que, cuando la cavidad del sitio activo de la enzima se vuelve más pequeña, su resistencia aumenta. C47S fue la única excepción; aunque Serina y Cisteína son similares en tamaño, la variante que posee la mutación C47S resultó ser diez veces más estable que *DERA_{wt}*. Esto indica que existe un mecanismo de inhibición independiente de Cys47, donde otro aminoácido sirve como un nucleófilo secundario (Thr18). Al reemplazar Cys47 por aminoácidos de gran tamaño, estos bloquean la adición de Michael entre Thr18 y crotonaldehído. Sin embargo, al mutar Thr18 se produce una pérdida de estereoselectividad, por lo cual esta modificación resultó poco viable debido a que la estereoselectividad es uno de los aportes más importantes de esta enzima.

Las modificaciones genéticas planteadas por Dick⁹² y Jiao¹²⁴ son las más utilizadas para mejorar la resistencia de DERA frente a concentraciones elevadas de acetaldehído y sus derivados. Sin embargo, durante mucho tiempo se han testeado DERAs con el fin de encontrar microorganismos *wild type* que posean resistencia a elevadas concentraciones de acetaldehído. Hoy en día se han reportado varios microorganismos *wt* con esta característica,⁹³ siendo los microorganismos termófilos los más prometedores. Sakuraba y colaboradores han clonado dos aldolasas de dos microorganismos hipertermófilos: *Pyrobaculum aerophilum* y *Thermotoga marítima*. En ambos casos la actividad inicial se retuvo en un 50% luego de ser incubados 20 horas con 300 mM de acetaldehído.⁹⁴ En comparación, con DERA de *Rhodococcus erythropolis*, se retuvo solo el 30% de la actividad inicial luego de haber sido incubada con 300 mM de acetaldehído durante 2 horas.⁹⁵ Estos datos sugieren que existe una relación entre la estabilidad térmica de DERA y la resistencia frente a concentraciones elevadas de acetaldehído. En DERAs hipertermófilas existen puentes de hidrógeno y puentes salinos intermoleculares entre los dímeros de esta proteína, que son responsables de la estabilidad de la proteína a temperaturas mayores a 50°C y, a la vez, aumentan la tolerancia a aldehídos. Jiao y colaboradores realizaron una mutación dirigida para contribuir a la formación de estos puentes, cambiando ácido glutámico por

lisina en una zona distal al sitio activo (E78K) sobre DERA perteneciente a *Lactobacillus brevis* (LbDERA). En la **figura 1.32** se puede ver cómo esta mutación induce a la formación de dos puentes de hidrógeno entre Lys78 y Val96 y entre Lys78 y Gly71. A su vez, se forma un puente salino con Asp113. Esta mutante presenta una tolerancia a sus sustratos de 700 mM (cloroacetaldehído) y 1400 mM (acetaldehído) y duplica el rendimiento respecto a la enzima *wild type* ⁹⁶.

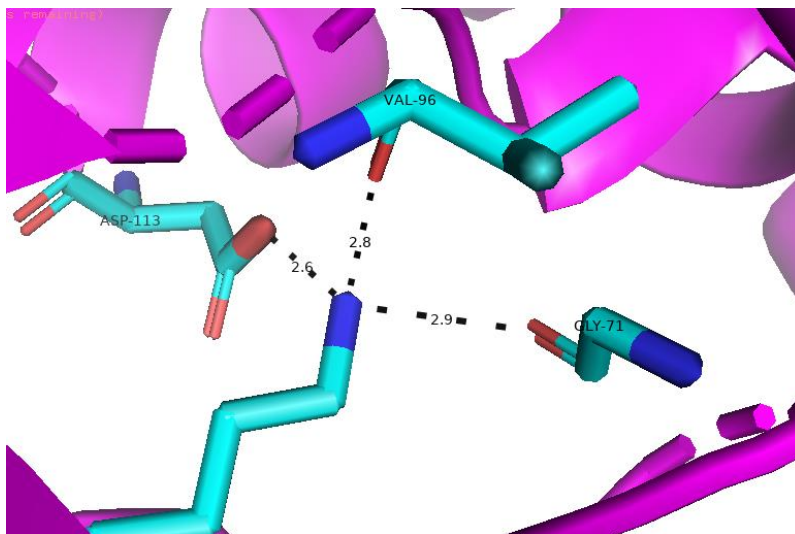


Figura 1. 32: La mutagénesis dirigida que introduce una Lys78, genera dos puentes de hidrógeno con Gly71 y Val96 con una distancia de 2.8 y 2.9 Å, respectivamente; y un puente salino con Asp113 con una distancia de 2.6 Å.

1.4. Estatinas

La hipercolesterolemia está asociada a niveles elevados de colesterol en el plasma sanguíneo y representa un importante problema de salud pública. Aquellas personas que sufren de este síndrome metabólico poseen más riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares, las cuales son reconocidas como la principal causa de mortalidad y morbilidad en el mundo.^{97,98} Para disminuir los valores de colesterol en sangre se recomienda, en primera instancia, un abordaje no farmacológico como actividad física o estilo de vida saludable.⁹⁹ Si los valores de colesterol continúan siendo elevados se prescriben estatinas. Las estatinas son inhibidores competitivos de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa). Esta inhibición evita la conversión de HMG-CoA a mevalonato, precursor biosintético del colesterol ¹⁰⁰⁻¹⁰² (**figura 1.33a**). La estructura de estas estatinas puede dividirse en tres partes (**figura**

1.33b): (i) una cadena lateral con dos grupos hidroxilo quirales en forma de lactona o hidrolizada que le confiere actividad biológica, (ii) un anillo hidrofóbico que está involucrado en la unión a la enzima HMG-CoA reductasa y (iii) grupos laterales que definen la solubilidad de la molécula y sus propiedades farmacocinéticas.¹⁰³ Las estatinas pueden clasificarse según su forma de obtención en tres tipos: naturales, semi-sintéticas y totalmente sintéticas (super-estatinas).

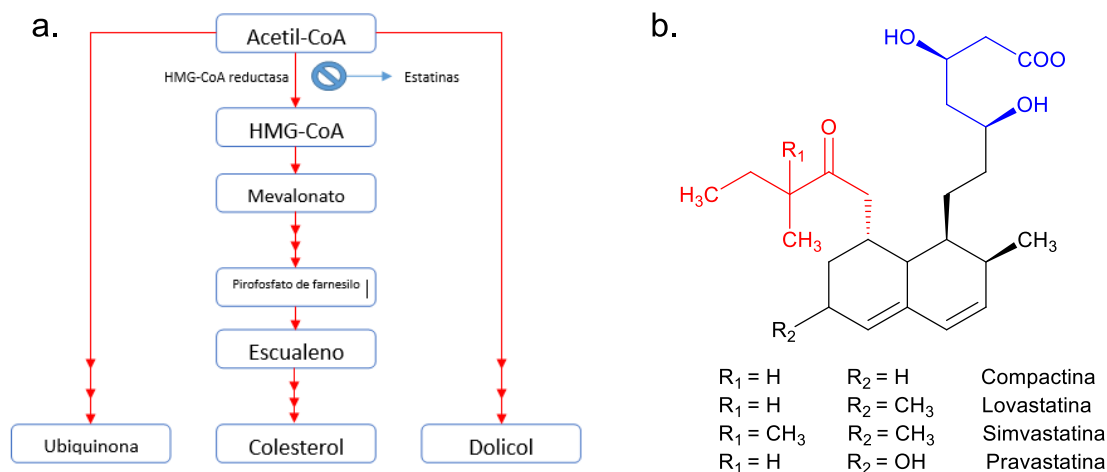


Figura 1. 33: a. Esquema simplificado de la biosíntesis del colesterol. Las estatinas inhiben el paso de conversión de HMG-CoA a Mevalonato. b. Estructura general de las estatinas: (i) cadena lateral con actividad biológica (Azul); (ii) anillo hidrofóbico involucrado en la unión a la enzima HMG-CoA reductasa (Negro); (iii) grupos laterales (Rojo)

Se denominan estatinas **naturales** a aquellas que fueron aisladas a partir de fermentaciones (**figura 1.34**). Mevastatina, la primer estatina natural, fue descubierta por Akira Endo alrededor de 1970.¹⁰⁴ Su estructura similar a HMG-CoA capturó la atención del grupo de trabajo cuando se analizaban los productos de fermentación de *Penicillium citrinum*. Posteriormente, se comprobó que la droga reducía el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) en un 30%.¹⁰⁵ Si bien estos resultados no cautivaron a la industria farmacéutica, alentaron la búsqueda de otros compuestos similares. Años después, Stokker y colaboradores descubrieron una nueva estatina natural como producto de fermentación de *Aspergillus terreus*, denominada Lovastatina, la cual reducía el porcentaje de LDL-C eficientemente.¹⁰⁶

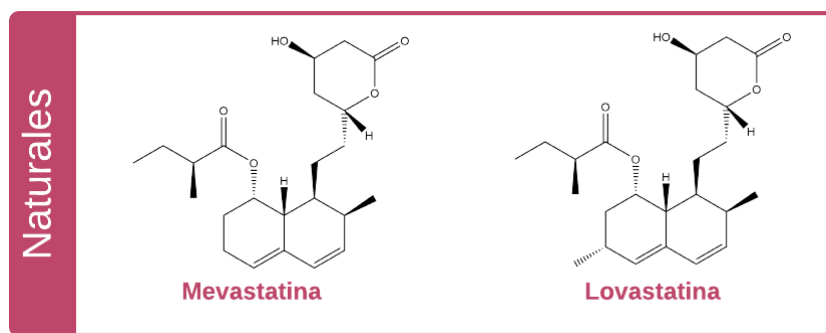


Figura 1. 34: Estatinas naturales de 1° generación

Los ensayos clínicos de las estatinas naturales demostraron que, quienes las consumían, presentaban varios efectos adversos. Es por ello que se llevaron a cabo modificaciones estructurales de manera biocatalizada o química, dando como resultado moléculas conocidas como estatinas **semi-sintéticas**, cuyos efectos adversos eran menores y su efectividad mucho mayor (**figura 1.35**). Pravastatina, un análogo biosintético de mevastatina,¹⁰⁷ presenta en su estructura un grupo hidroxilo adicional. Esta modificación hace que la molécula sea más soluble en agua, lo cual minimiza la habilidad para penetrar la membrana lipídica de células no hepáticas y le confiere especificidad a la molécula.¹⁰⁸ Por otro lado, simvastatina es un análogo semi-sintético de lovastatina,¹⁰⁹ cuya estructura presenta un grupo metilo adicional en la posición 2 de la cadena lateral sustituyente del ciclo.

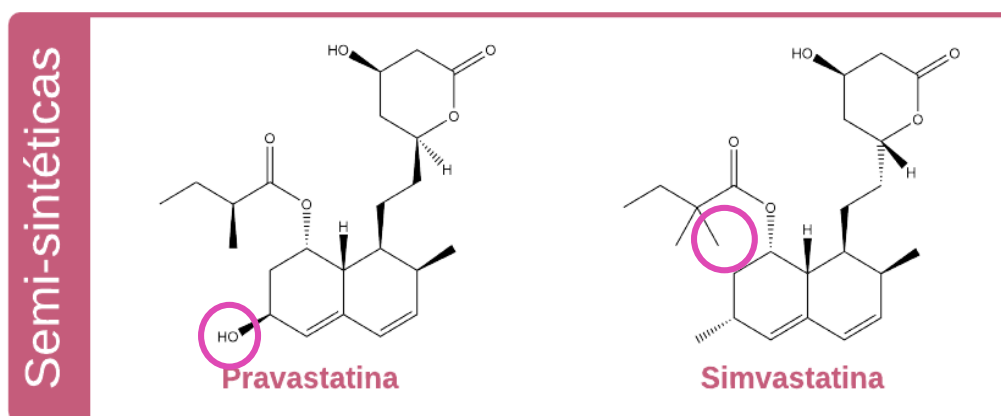


Figura 1. 35: Estatinas semi-sintéticas.

Tanto las estatinas naturales como las estatinas semi-sintéticas presentan la cadena lateral en forma de lactona. Estas pro-drogas al ingresar al organismo se hidrolizan a ácido 3,5-dihidroxiheptanoico, su forma activa.¹¹⁰ Las **super-estatinas**, en cambio, poseen la cadena lateral ya hidrolizada (**figura 1.36**). Actualmente existen cuatro super-estatinas comerciales: Fluvastatina, Rosuvastatina, Atorvastatina y Pitavastatina. A diferencia de las estatinas semi-sintéticas, las super-estatinas son completamente sintetizadas mediante métodos químicos y/o enzimáticos.¹⁰⁵

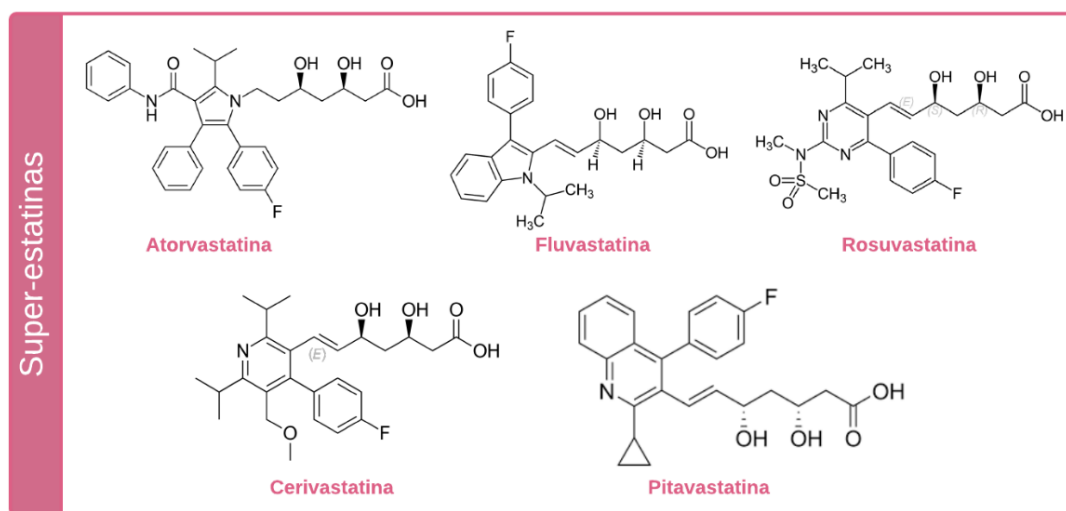


Figura 1. 36: Super-estatinas.

Aproximadamente un 5% de los pacientes que utilizan estatinas discontinúan el tratamiento.¹¹¹ Se considera que una de las principales razones es que presentan diversos efectos adversos como complicaciones gastrointestinales, fatiga, dolor de cabeza o mialgias. Por ejemplo, la comercialización de la super-estatina Cerivastatina fue suspendida puesto que produce miopatías (debilidad y dolor muscular) incluso en dosis bajas.¹¹² Actualmente la síntesis de fármacos para el control del colesterol está centrada en producir estatinas más efectivas, modificando la estructura heterocíclica sin alterar la cadena lateral responsable de la actividad. Todas estas modificaciones se piensan en pos de obtener menores efectos adversos, pero considerando al mismo tiempo un equilibrio entre el tiempo de desarrollo y costo.

1.4.1. Síntesis química de precursores sintéticos de estatinas

La síntesis química, tanto de estatinas semi-sintéticas como super-estatinas, normalmente contiene muchos pasos de reacción, involucra protección y desprotección de moléculas y genera subproductos, lo que dificulta la purificación.¹¹³ Por ejemplo, la síntesis de Simvastatina a partir de Lovastatina puede realizarse mediante un proceso complejo de muchos pasos.¹¹⁴ En el primer paso de reacción (**figura 1.37**) Lovastatina fue tratada con n-butilamina y cloruro de ter-butildimetilsililo (TBSCl) dando un producto el cual es alquilado, posteriormente hidrolizado y nuevamente lactonizado para obtener Simvastatina. Si bien el rendimiento de reacción es elevado (91%), el costo de reacción es 5 veces mayor que la producción de Lovastatina.¹¹⁵

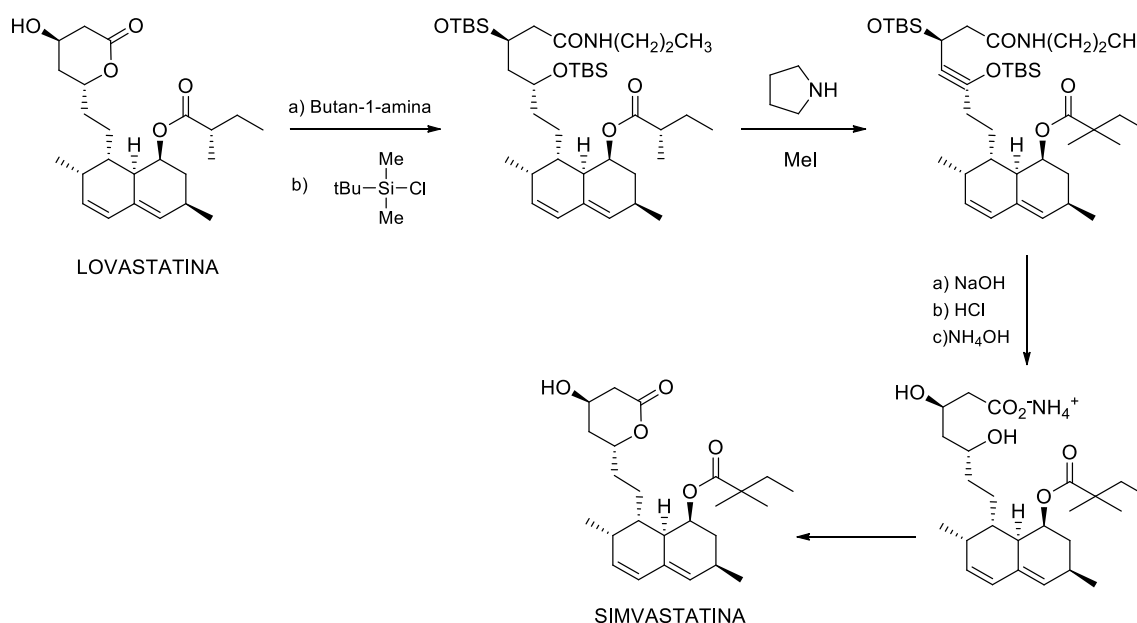


Figura 1. 37: Síntesis de Simvastatina a partir de Lovastatina.

La síntesis de intermediarios de Rosuvastatin y Pitavastatin a partir de un alcohol alenílico (1) fue descrita por Spreider y Breit.¹¹⁶ Como se observa en la **figura 1.38** el sustrato enantioméricamente puro (1) reacciona con paladio/DPEphos para producir 1,3 dioxano (2), el cual luego de una ozonólisis en presencia de diferentes difenilfosforilos (3 o 4) producen los intermediarios de Rosuvastatin (ruta 1) y Pitavastatina (ruta 2).

Las metodologías químicas antes descritas, se realizan en condiciones fuertes de reacción (temperatura elevada y pH muy altos) lo que hace el proceso de síntesis química costoso y perjudicial para el medio ambiente. Es por ello que las nuevas metodologías para sintetizar estatinas se basan en procesos quimioenzimáticos.

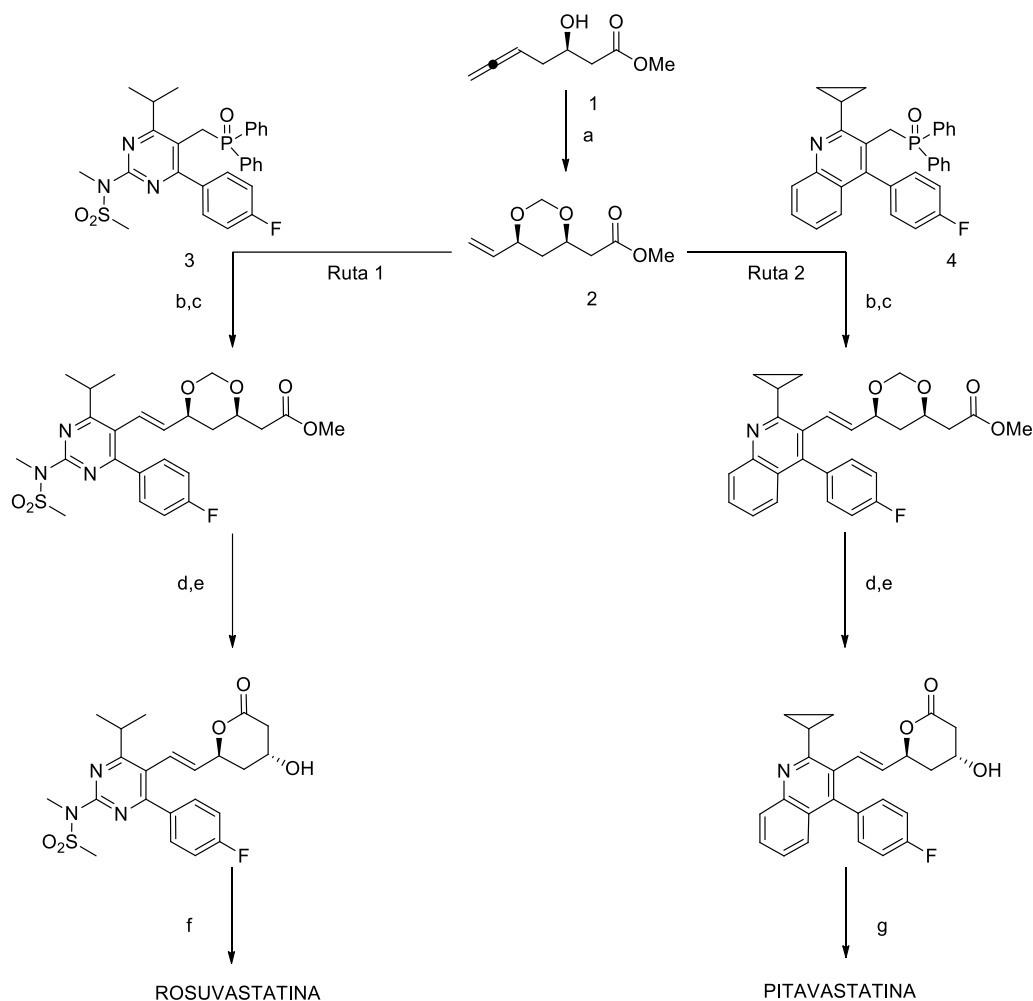


Figura 1. 38: Síntesis química de Rosuvastatina y Pitavastatina; Condiciones de reacción: a) paladio/ DPEphos, tolueno, 80°C, 16 h. b) O₃, Me₂S, MeOH, -78°C. c) THF, -78 °C, 3 h . d) NaOH, EtOH, 80°C, 16 h. e) HCl, tolueno, temperatura ambiente, 8 h. f) NaOH, Ca(OAc)₂, THF, temperatura ambiente, 3 h. (g) NaOH, CaCl₂, H₂O, temperatura ambiente, 4 h.

1.4.2. Síntesis quimio-enzimática de precursores de estatinas

Desde las últimas dos décadas, varios de los procesos químicos involucrados en la síntesis de estatinas empezaron a sustituirse por procesos biocatalizados. Como ya hemos mencionado, el uso de biocatalizadores permite obtener productos quirales con alta pureza estereoquímica en reacciones ecológicamente sustentables.¹¹⁷

Se han descrito en bibliografía varias metodologías biocatalizadas para obtener precursores sintéticos de las cadenas laterales de las super-estatinas. Por ejemplo, la síntesis biocatalizada del hidroxinitrilo (*R*)-4-ciano-3-hidroxi-2-butirato de etilo propuesta por Ma y colaboradores¹¹⁸ involucra tres enzimas aisladas: una cetorreductasa (KRED), una glucosa deshidrogenasa (GDH) y una halohidrina deshalogenasa (HHDH). Como se puede observar en la **figura 1.39**, KRED reduce enantioselectivamente 4-cloroacetato de etilo (**1.39 (1)**) para dar como producto (*S*)-4-cloro-3-hidroxi-2-butirato de etilo (**1.39 (2)**). El cofactor utilizado por KRED es regenerado utilizando GDH y glucosa (agente reductor). Posteriormente, HHDH transforma **1.39 (2)** en (*R*)-4-ciano-3-hidroxi-2-butirato de etilo (**1.39 (3)**); al cabo de 13 hs de reacción se obtiene un 92% de rendimiento y un exceso enantiomérico mayor a 99%. Esta reacción de dos pasos es una alternativa favorable a las primeras síntesis reportadas, donde las reacciones biocatalizadas involucraban un último paso químico en condiciones fuertes de reacción (pH alcalino y elevada temperatura) para formar **1.39 (3)** desde **1.39 (2)** o 3-hidroxi-4-bromobutirato de etilo **1.40 (1)** (**figura 1.40**).¹¹⁹ Una vez obtenido **1.39 (3)**, por una nueva serie de pasos químicos puede sintetizarse, por ejemplo, atorvastatina (**Figura 1.41**).

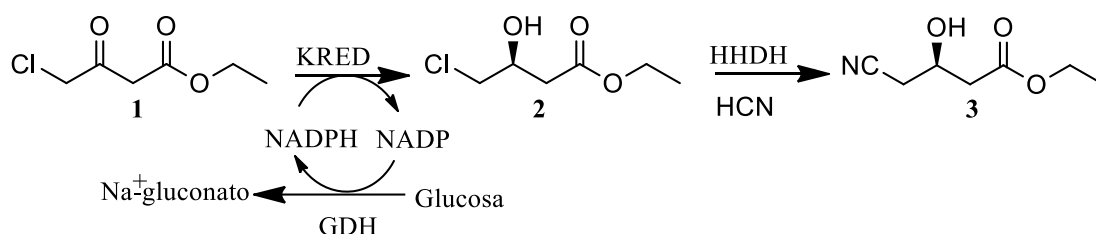


Figura 1. 39: Síntesis biocatalizada de (*R*)-4-ciano-3-hidroxi-2-butirato de etilo (**3**) utilizando tres enzimas.

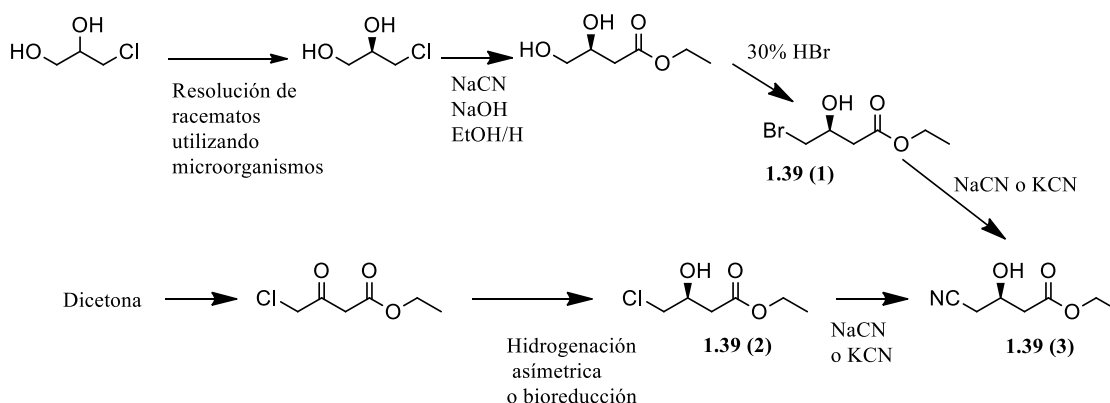


Figura 1. 40: Síntesis quimioenzimática de (*R*)-4-ciano-3-hidroxibutirato de etilo.

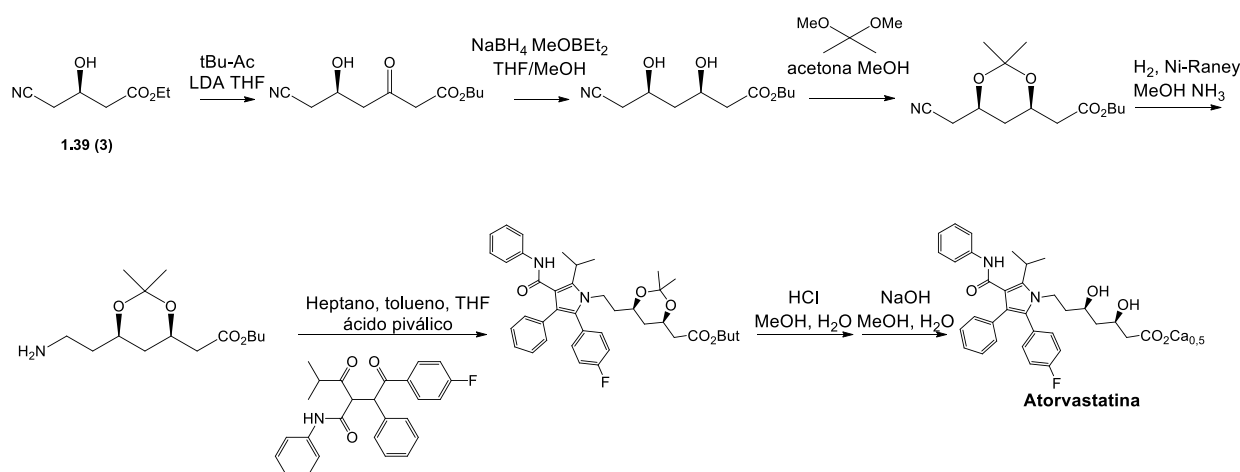
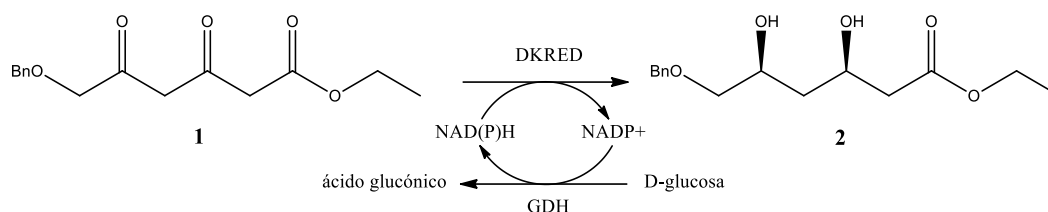


Figura 1. 41: Síntesis de Atorvastatina utilizando 1.39 (3) como precursor.

Otro precursor sintético de super-estatinas es (3*R*,5*S*) dihidroxi-6-benciloxihexanoato de etilo (**figura 1.42 (2)**). La síntesis de este compuesto descrita por Wu y colaboradores¹²⁰ se puede observar en la **figura 1.42**. En este caso, 3,5-diceto-6-benciloxihexanoato de etilo (**1**) es reducido a (**2**) utilizando células enteras de *Escherichia coli* que co-expresan una dicetorreductasa (DKRED) y una GDH. La enzima GDH ayuda a desplazar el equilibrio hacia la formación de (**2**); al cabo de 6 hs de reacción se obtiene una conversión completa de este producto con un exceso enantiomérico del 99.5%.


 Figura 1. 42: síntesis de (3*R*,5*S*) dihidroxi-6-benziloxihexanoato de etilo.

Adicionalmente, Metzner y colaboradores,¹²¹ han descrito un proceso quimioenzimático de alta productividad para la síntesis de un precursor de rosuvastatina utilizando hidrolasas. Como se puede observar en la **figura 1.43**, en el primer paso de reacción se produce una acetilación en el grupo hidroxilo de **1** utilizando como catalizador $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$. Los pasos dos y tres involucran dos hidrolasas, α -quimiotripsina y cefalosporina C acetilesterasa, respectivamente. Como resultado de estos pasos de reacción se obtiene el ácido (*R*)-5-etoxi-3-hidroxi-5-oxopentanoico (**4**) con un rendimiento mayor al 95% y un exceso enantiomérico del 97%. El crudo de esta reacción se sililó para obtener **5** y posteriormente se purificó. Este único paso de purificación incrementa el rendimiento final de la reacción. Los pasos químicos siguientes dan como resultado el intermediario **7**, con excelentes rendimientos.

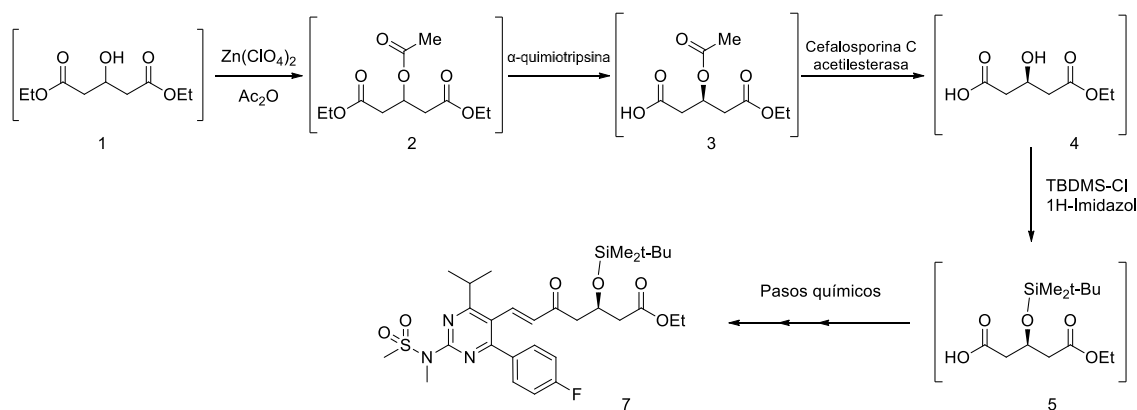


Figura 1. 43: Síntesis quimioenzimática de precursor de rosuvastatina, utilizando hidrolasas.

Sin embargo, la utilización de DERA en la síntesis de precursores de estatinas es uno de los caminos más prometedores debido a que la incorporación de los 2 centros quirales de la cadena lateral -responsable de la actividad biológica- se puede realizar al mismo tiempo en el paso biocatalizado.⁹⁶ Los productos de la doble adición aldólica catalizada por DERA se ciclan espontáneamente produciendo 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas quirales (**1**) estables, los cuales mediante un paso siguiente de oxidación química o biocatalizada se convierten en la correspondiente lactona, cuya estructura coincide con la cadena lateral de estatinas (**2**) (**figura 1.44**).¹²² La oxidación química puede realizarse utilizando varias metodologías; el empleo de una solución acuosa de hipoclorito de sodio y ácido acético es considerado el menos tóxico y más económico de todos.¹¹⁷

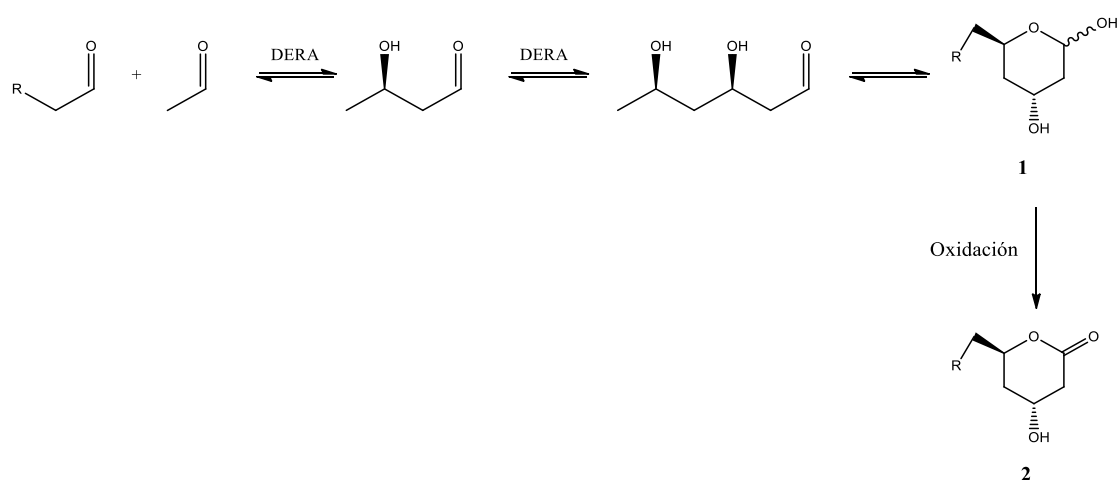


Figura 1. 44: Síntesis de precursores de estatinas utilizando DERA.

Si bien esta síntesis quimioenzimática es la más descrita en bibliografía, el diseño de una cascada multi-enzimática es una de las metodologías más prometedoras. La utilización de DERA y una enzima oxidorreductasa lleva a la producción de intermediarios puros de la cadena lateral de las estatinas, en condiciones suaves de reacción con elevada productividad y potencialmente escalables.¹⁰⁵ Recientemente, Švarc y colaboradores,¹²³ han sugerido una ruta de síntesis *one-pot* de un precursor de la cadena lateral de atorvastatina (**figura 1.45**). En el primer paso de esta ruta, DERA cataliza la adición aldólica entre acetaldehído (**1**) y *N*-fenilacetil-3-aminopropanal (**2**).

Posteriormente, el producto de esta adición aldólica (**3**), es consecutivamente oxidado por una cetorreductasa (KRED) y esterificado utilizando una lipasa y vinilacetato. El precursor de la cadena lateral (**5**) es finalmente producido empleando penicilina G-acilasa (PGA), en condiciones suaves de reacción. La utilización de **2** como sustrato, permite que **4** pueda ser fácilmente desacilado. Una vez obtenido **5** se puede continuar con la síntesis química de atorvastatina en forma similar a lo descrito en la **figura 1.41**.

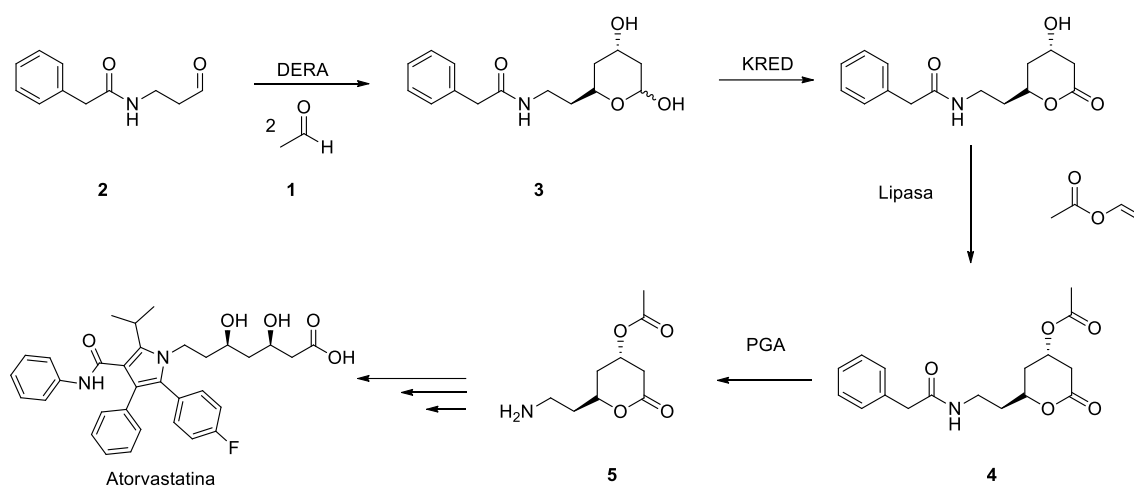


Figura 1. 45: Síntesis enzimática de precursores de Atorvastatina.

Las síntesis antes descriptas involucran a DERA como enzima responsable de la producción de la cadena lateral activa de las estatinas. A lo largo de este trabajo doctoral se empleará una variante de esta metodología para la síntesis de nuevos derivados de estatinas.

1.5. Referencias bibliográficas

1. Nováková, L., and Plachká, K. (2017). *Pharmaceutical Applications* (Elsevier).
2. Kuncham, R., Gurumurthy, K.T., Chandan, N., Javed, A., Ashwini, L.S., Shenoi, R., and Baranwal, A. (2014). Biocatalytic Ketone Reduction - A Study on Screening and Effect of Culture Conditions on the Reduction of Selected Ketones. *Int. Lett. Nat. Sci.* 1, 54–77.
3. Evans, A.M. (2001). Clinical Rheumatology Comparative Pharmacology of S(+)-Ibuprofen and (RS)-Ibuprofen. *Clin. Rheumatol.* 20, 9–14.
4. Hao, H., Wang, G., and Sun, J. (2005). Enantioselective pharmacokinetics of ibuprofen and involved mechanisms. *Drug Metab. Rev.* 37, 215–234.
5. Gaskell, H., Derry, S., Philip, W., and Moore, A. (2017). Single dose oral ketoprofen or dexketoprofen for acute postoperative pain in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 1–120.
6. Hegstad, S., Havnen, H., Helland, A., Spigset, O., and Frost, J. (2018). Enantiomeric separation and quantification of R/S-amphetamine in urine by ultra-high performance supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1077–1078, 7–12.
7. Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y., and Handa, H. (2010). Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* (80). 327, 1345–1350.
8. Stanley, J.K., and Brooks, B.W. (2009). Perspectives on ecological risk assessment of chiral compounds. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5, 364–373.
9. Dong, F., Li, J., Chankvetadze, B., Cheng, Y., Xu, J., Liu, X., Li, Y., Chen, X., Bertucci, C., Tedesco, D., et al. (2013). Chiral triazole fungicide difenoconazole: Absolute stereochemistry, stereoselective bioactivity, aquatic toxicity, and environmental behavior in vegetables and soil. *Environ. Sci. Technol.* 47, 3386–3394.

10. Schettini, R., and Della Sala, G. (2021). New trends in asymmetric catalysis. *Catalysts* **11**, 1–3.
11. Ager, D. (2005). *Handbook of Chiral Chemicals*.
12. Hoffmann, R.W. (2009). *Elements of synthesis planning* (Springer).
13. Ceccarelli, S.M., Piarulli, U., and Gennari, C. (2001). Synthetic studies on the sarcodictyins: Synthesis of fully functionalized cyclization precursors. *Tetrahedron* **57**, 8531–8542.
14. Agahi, R., Challinor, A.J., Carter, N.B., and Thomas, S.P. (2019). Earth-Abundant Metal Catalysis Enabled by Counterion Activation. *Org. Lett.* **21**, 993–997.
15. Fanourakis, A., Docherty, P.J., Chuentragool, P., and Phipps, R.J. (2020). Recent Developments in Enantioselective Transition Metal Catalysis Featuring Attractive Noncovalent Interactions between Ligand and Substrate. *ACS Catal.* **10**, 10672–10714.
16. Chirik, P., and Morris, R. (2015). Getting Down to Earth: The Renaissance of Catalysis with Abundant Metals. *Acc. Chem. Res.* **48**, 2495.
17. Manßen, M., and Schafer, L.L. (2020). Titanium catalysis for the synthesis of fine chemicals-development and trends. *Chem. Soc. Rev.* **49**, 6947–6994.
18. Gaunt, M.J., Johansson, C.C.C., McNally, A., and Vo, N.T. (2007). Enantioselective organocatalysis. *Drug Discov. Today* **12**, 8–27.
19. Pellissier, H. (2007). Asymmetric organocatalysis. *Tetrahedron* **63**, 9267–9331.
20. Juaristi, E. (2021). Recent developments in next generation (S)-proline-derived chiral organocatalysts. *Tetrahedron* **88**, 132143.
21. Emma, M.G., Tamburrini, A., Martinelli, A., Lombardo, M., Quintavalla, A., and Trombini, C. (2020). A simple and efficient protocol for proline-catalysed asymmetric aldol reaction. *Catalysts* **10**, 649.
22. Zhao, Z., Yue, J., Ji, X., Nian, M., Kang, K., Qiao, H., and Zheng, X. (2021).

Research progress in biological activities of succinimide derivatives. *Bioorg. Chem.* **108**, 104557.

23. Torregrosa-Chinillach, A., Moragues, A., Pérez-Furundarena, H., Chinchilla, R., Gómez-Bengoa, E., and Guillena, G. (2018). Enantioselective michael addition of aldehydes to maleimides organocatalyzed by a chiral primary amine-salicylamide. *Molecules* **23**, 3299.
24. Drepper, T., Eggert, T., Hummel, W., Leggewie, C., Pohl, M., Rosenau, F., Wilhelm, S., and Jaeger, K.E. (2006). Novel biocatalysts for white biotechnology. *Biotechnol. J.* **1**, 777–786.
25. Wachtmeister, J., and Rother, D. (2016). Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. *Curr. Opin. Biotechnol.* **42**, 169–177.
26. Vitale, P., Perna, F.M., Agrimi, G., Pisano, I., Mirizzi, F., Capobianco, R.V., and Capriati, V. (2018). Whole-cell biocatalyst for chemoenzymatic total synthesis of rivastigmine. *Catalysts* **8**, 1–12.
27. Bell, E.L., Finnigan, W., France, S.P., Hepworth, L.J., Lovelock, S.L., Hayes, M.A., Osuna, S., Romero, E., Ryan, K.S., Turner, N.J., et al. (2021). Biocatalysis. *Nat. Rev. Method Prim.* **1**, 1–21.
28. El Gihani, M.T., and Williams, J.M.J. (1999). Dynamic kinetic resolution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 11–15.
29. Pasteur, L. (1858). Nouveaux faits concernant l’histoire de la fermentation alcoolique. *Comptes Rendus Chim.* **47**, 1011–1013.
30. Wolf, C. (2008). *Dynamic Stereochemistry of Chiral Compounds, Principles and Applications* (The Royal Society of Chemistry).
31. Kamal, A., Sandbhor, M., and Ramana, K.V. (2002). One-pot lipase-catalyzed synthesis of enantiopure secondary alcohols from carbonyl compounds: A new protocol for lipase-mediated resolution. *Tetrahedron Asymmetry* **13**, 815–820.

32. Verho, O., and Bäckvall, J.E. (2015). Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution: A powerful tool for the preparation of enantiomerically pure alcohols and amines. *J. Am. Chem. Soc.* *137*, 3996–4009.
33. Gamal, M., Yasuhiro, O., and Shuji, A. (2018). Lipase-Catalyzed Dynamic Kinetic Resolution of C1- and C2-Symmetric Racemic Axially Chiral 2,2'-Dihydroxy-1,1'-biaryls. *Angew. Chemie - Int. Ed.* *57*, 10278–10282.
34. Wurtz, A. (1872). Ueber einen Aldehyd-Alkohol. *J. für Prakt. Chemie* *5*, 457–464.
35. Mandal, S., Mandal, S., Ghosh, S.K., Ghosh, A., Saha, R., Banerjee, S., and Saha, B. (2016). Review of the aldol reaction. *Synth. Commun.* *46*, 1327–1342.
36. Guillena, G., Nájera, C., and Ramón, D.J. (2007). Enantioselective direct aldol reaction: the blossoming of modern organocatalysis. *Tetrahedron Asymmetry* *18*, 2249–2293.
37. Hélaïne, V., Gastaldi, C., Lemaire, M., Clapés, P., and Guérard-Hélaïne, C. (2022). Recent Advances in the Substrate Selectivity of Aldolases. *ACS Catal.* *12*, 733–761.
38. Tanaka, F., and Barbas, C.F. (2002). Reactive immunization: A unique approach to catalytic antibodies. *J. Immunol. Methods* *269*, 67–79.
39. Hilvert, D. (2002). Critical analysis of antibody catalysis. *51*, 7–8.
40. Bisai, V., Bisai, A., and Singh, V.K. (2012). Enantioselective organocatalytic aldol reaction using small organic molecules. *Tetrahedron* *68*, 4541–4580.
41. Martins, R., Pereira, M., de Castro, P., and Bombonato, F. (2020). Design and preparation of a novel prolinamide- based organocatalyst for the solvent- free asymmetric aldol reaction. *Tetrahedron* *76*, 1–10.
42. Garrabou, X., Castillo, J.A., Guérard-Hélaïne, C., Parella, T., Joglar, J., Lemaire, M., and Clapés, P. (2009). Asymmetric self- and cross-aldol reactions of glycolaldehyde catalyzed by d-fructose-6-phosphate aldolase. *Angew. Chemie - Int. Ed.* *48*, 5521–5525.

43. Brovetto, M., Gamenara, D., Saenz Méndez, P., and Seoane, G.A. (2011). C-C bond-forming lyases in organic synthesis. *Chem. Rev.* *111*, 4346–4403.
44. Bustamante Saldaña, G., and Salinas, P.A. (2015). Efecto del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp. sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*. *Rebiolest* *1*.
45. Samland, A.K., and Sprenger, G.A. (2006). Microbial aldolases as C-C bonding enzymes - Unknown treasures and new developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *71*, 253–264.
46. Wang, L.C., Xu, L., Xu, X.Q., Su, B.M., and Lin, J. (2020). An L-threonine aldolase for asymmetric synthesis of β -hydroxy- α -amino acids. *Chem. Eng. Sci.* *226*, 115812.
47. Zhao, W., Yang, B., Zha, R., Zhang, Z., Tang, S., Pan, Y., Qi, N., Zhu, L., and Wang, B. (2021). A recombinant L-threonine aldolase with high diastereoselectivity in the synthesis of L-threo-dihydroxyphenylserine. *Biochem. Eng. J.* *166*, 107852.
48. Fesko, K. (2016). Threonine aldolases: perspectives in engineering and screening the enzymes with enhanced substrate and stereo specificities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *100*, 2579–2590.
49. Schoevaart, R., Rantwijk, F. Van, and Sheldon, R.A. (2000). Stereochemistry of Nonnatural Aldol Reactions Catalyzed by DHAP Aldolases. *Biotechnol. Bioeng.* *70*, 349–352.
50. Schümperli, M., Pellaux, R., and Panke, S. (2007). Chemical and enzymatic routes to dihydroxyacetone phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *75*, 33–45.
51. Chen, Z., Li, Z., Li, F., Wang, M., Wang, N., and Gao, X.D. (2020). Cascade synthesis of rare ketoses by whole cells based on L-rhamnulose-1-phosphate aldolase. *Enzyme Microb. Technol.* *133*, 109456.
52. Sánchez-Moreno, I., García-García, J.F., Bastida, A., and García-Junceda, E. (2004). Multienzyme system for dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolase

- catalyzed C-C bond formation from dihydroxyacetone. *Chem. Commun.* **4**, 1634–1635.
53. Ramsaywak, P.C., Labbé, G., Siemann, S., Dmitrienko, G.I., and Guillemette, J.G. (2004). Molecular cloning, expression, purification, and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Mycobacterium tuberculosis* - A novel Class II A tetramer. *Protein Expr. Purif.* **37**, 220–228.
 54. Garcia-junceda, E. (2008). *Multi-Step Enzyme Catalysis: Biotransformations and Chemoenzymatic Synthesis* 2nd ed. (Wiley-VCH).
 55. Clapés, P., Fessner, W.D., Sprenger, G.A., and Samland, A.K. (2010). Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 154–167.
 56. Seoane, G. (2000). Enzymatic C-C Bond-Forming Reactions in Organic Synthesis. *Curr. Org. Chem.* **4**, 283–304.
 57. Morís-Varas, F., Qian, X.H., and Wong, C.H. (1996). Enzymatic/chemical synthesis and biological evaluation of seven-membered iminocyclitols. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 7647–7652.
 58. Ghalambor, M., and Heath, E. (1962). The Metabolism of L-Fucose. *J. Biol. Chem.* **237**, 2427–2433.
 59. Li, Z., Cai, L., Qi, Q., Styslinger, T.J., Zhao, G., and Wang, P.G. (2011). Synthesis of rare sugars with l-fucose-1-phosphate aldolase (FucA) from *Thermus thermophilus* HB8. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **21**, 5084–5087.
 60. Vidal, L., Ferrer, P., Álvaro, G., Benaiges, M.D., and Caminal, G. (2005). Influence of induction and operation mode on recombinant rhamnulose 1-phosphate aldolase production by *Escherichia coli* using the T5 promoter. *J. Biotechnol.* **118**, 75–87.
 61. Eyrisch, O., Sinerius, G., and Fessner, W.D. (1993). Facile enzymic de novo synthesis and NMR spectroscopic characterization of d-tagatose 1,6-bisphosphate. *Carbohydr. Res.* **238**, 287–306.

62. Bolt, A., Berry, A., and Nelson, A. (2008). Directed evolution of aldolases for exploitation in synthetic organic chemistry Amanda. *Arch. Biochem. Biophys.* **474**, 318–330.
63. Concia, A.L., Lozano, C., Castillo, J.A., Parella, T., Joglar, J., and Clapés, P. (2009). D-fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: Cascade chemical-enzymatic preparation of sugar-related polyhydroxylated compounds. *Chem. - A Eur. J.* **15**, 3808–3816.
64. Roldán, R., Sanchez-Moreno, I., Scheidt, T., Hélaine, V., Lemaire, M., Parella, T., Clapés, P., Fessner, W.D., and Guérard-Hélaine, C. (2017). Breaking the Dogma of Aldolase Specificity: Simple Aliphatic Ketones and Aldehydes are Nucleophiles for Fructose-6-phosphate Aldolase. *Chem. - A Eur. J.* **23**, 5005–5009.
65. Koyama, M., Koyama, M., and Sakamura, S. (1974). The structure of a new piperidine derivative from buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum* moench). *Agric. Biol. Chem.* **38**, 1111–1112.
66. Castillo, J.A., Calveras, J., Casas, J., Mitjans, M., Vinardell, M.P., Parella, T., Inoue, T., Sprenger, G.A., Joglar, J., and Clapés, P. (2006). Fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: Preparation of D-fagomine, N-alkylated derivatives, and preliminary biological assays. *Org. Lett.* **8**, 6067–6070.
67. El-Sepelgy, O., Schwarzer, D., Oskwarek, P., and Mlynarski, J. (2012). Direct aldol reaction of pyruvic derivatives: Catalytic attempt to synthesize ulosonic acids. *European J. Org. Chem.*, 2724–2727.
68. Lin, C.H., Sugai, T., Halcomb, R.L., Ichikawa, Y., and Wong, C.H. (1992). Unusual Stereoselectivity in Sialic Acid Aldolase-Catalyzed Aldol Condensations: Synthesis of Both Enantiomers of High-Carbon Monosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10138–10145.
69. Dean, S.M., Greenberg, W.A., and Wong, C.H. (2007). Recent advances in aldolase-catalyzed asymmetric synthesis. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1308–1320.
70. Haridas, M., Abdelraheem, E.M.M., and Hanefeld, U. (2018). 2-Deoxy-d-ribose-5-phosphate aldolase (DERA): applications and modifications. *Appl. Microbiol.*

Biotechnol. 102, 9959–9971.

71. Yoshida, Y., Honma, M., Kimura, Y., and Abe, H. (2021). Structure, Synthesis and Inhibition Mechanism of Nucleoside Analogues as HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs). *ChemMedChem* 16, 743–766.
72. Salleron, L., Magistrelli, G., Mary, C., Fischer, N., Bairoch, A., and Lane, L. (2014). DERA is the human deoxyribose phosphate aldolase and is involved in stress response. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1843, 2913–2925.
73. Valentin-Hansen, P., Boëtius, f., Hammer-Jespersen, K., and Svendsen, I. (1982). The Primary Structure of Escherichia coli K12 2-Deoxyribose 5-Phosphate Aldolase: Nucleotide Sequence of the deoC Gene and the Amino Acid Sequence of the Enzyme. *Eur. J. Biochem.* 125, 561–566.
74. Heine, A., Luz, J.G., Wong, C.H., and Wilson, I.A. (2004). Analysis of the class I aldolase binding site architecture based on the crystal structure of 2-Deoxyribose-5-phosphate aldolase at 0.99 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 343, 1019–1034.
75. Petrovic, D., Risso, V.A., Kamerlin, S.C.L., and Sanchez-Ruiz, J.M. (2018). Conformational dynamics and enzyme evolution. *J. R. Soc. Interface* 15, 20180330.
76. Stura, E.A., Ghosh, S., Garcia-Junceda, E., Chen, L., Wong, C. -H, and Wilson, I.A. (1995). Crystallization and preliminary crystallographic data for class I deoxyribose-5-phosphate aldolase from Escherichia coli: An Application of Reverse Screening. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 22, 67–72.
77. Heine, A., DeSantis, G., Luz, J., Mitchell, M., Wong, C.-H., and Witson, I. (2001). Observation of covalent intermediates in an enzyme mechanism at atomic resolution. *Science* (80-.). 294, 369–374.
78. Schulte, M., Stoldt, M., Neudecker, P., Pietruszka, J., Willbold, D., and Panwalkar, V. (2017). ¹H, ¹³C, and ¹⁵N backbone and sidechain resonance assignments of a monomeric variant of E. coli deoxyribose-5-phosphate aldolase. *Biomol. NMR Assign.* 11, 197–201.

79. Schulte, M., Petrović, D., Neudecker, P., Hartmann, R., Pietruszka, J., Willbold, S., Willbold, D., and Panwalkar, V. (2018). Conformational Sampling of the Intrinsically Disordered C-Terminal Tail of DERA Is Important for Enzyme Catalysis. *ACS Catal.* **8**, 3971–3984.
80. Bramski, J., Dick, M., Pietruszka, J., and Classen, T. (2017). Probing the acetaldehyde-sensitivity of 2-deoxy-ribose-5-phosphate aldolase (DERA) leads to resistant variants. *J. Biotechnol.* **258**, 56–58.
81. Liu, J., Hsu, C.C., and Wong, C.H. (2004). Sequential aldol condensation catalyzed by DERA mutant Ser238Asp and a formal total synthesis of atorvastatin. *Tetrahedron Lett.* **45**, 2439–2441.
82. Barbas, C.F., Wang, Y.F., and Wong, C.H. (1990). Deoxyribose-5-phosphate Aldolase as a Synthetic Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 2013–2014.
83. Hult, K., and Berglund, P. (2003). Engineered enzymes for improved organic synthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 395–400.
84. DeSantis, G., Liu, J., Clark, D.P., Heine, A., Wilson, I.A., and Wong, C.H. (2003). Structure-based mutagenesis approaches toward expanding the substrate specificity of D-2-deoxyribose-5-phosphate aldolase. *Bioorganic Med. Chem.* **11**, 43–52.
85. Chambre, D., Guérard-Hélaine, C., Darii, E., Mariage, A., Petit, J.L., Salanoubat, M., De Berardinis, V., Lemaire, M., and Hélaine, V. (2019). 2-Deoxyribose-5-phosphate aldolase, a remarkably tolerant aldolase towards nucleophile substrates. *Chem. Commun.* **55**, 7498–7501.
86. Barbas, C.F., Wang, Y., Wong, C., Force, A., and Command, S. (1990). Deoxyribose-5-phosphate Aldolase as a Synthetic Catalyst. *J Am Chem SocAm Chem Soc* **112**, 2013–2014.
87. Wong, C.H., Garcia-Junceda, E., Chen, L., Blanco, O., Gijzen, H.J.M., and Steensma, D.H. (1995). Recombinant 2-Deoxyribose-5-phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Use of Sequential Two-Substrate and Three-Substrate Aldol Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 3333–3339.

88. Chen, L., Dumas, D.P., and Wong, C.H. (1992). Deoxyribose 5-phosphate Aldolase as a Catalyst in Asymmetric Aldol Condensation. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 741–748.
89. Rouvinen, J., Andberg, M., Pääkkönen, J., Hakulinen, N., and Koivula, A. (2021). Current state of and need for enzyme engineering of 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolases and its impact. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **105**, 6215–6228.
90. Liu, J., and Wong, C.H. (2002). Aldolase-catalyzed asymmetric synthesis of novel pyranose synthons as a new entry to heterocycles and epothilones. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **41**, 1404–1407.
91. Racker, E. (1952). Enzymatic synthesis and breakdown of desoxyribose phosphate. *J. Biol. Chem.* **196**, 347–365.
92. Dick, M., Hartmann, R., Weiergräber, O.H., Bisterfeld, C., Classen, T., Schwarten, M., Neudecker, P., Willbold, D., and Pietruszka, J. (2016). Mechanism-based inhibition of an aldolase at high concentrations of its natural substrate acetaldehyde: Structural insights and protective strategies. *Chem. Sci.* **7**, 4492–4502.
93. Lou, X. cong, Zheng, C. cai, Chen, W. qi, Ma, Y. xin, Mkingule, I., He, F. fan, and Fei, H. (2019). Heterologous expression and characterization of novel 2-Deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase (DERA) from *Pyrobaculum calidifontis* and *Meiothermus ruber*. *Process Biochem.* **80**, 35–42.
94. Sakuraba, H., Yoneda, K., Yoshihara, K., Satoh, K., Kawakami, R., Uto, Y., Tsuge, H., Takahashi, K., Hori, H., and Ohshima, T. (2007). Sequential aldol condensation catalyzed by hyperthermophilic 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7427–7434.
95. Kullartz, I., and Pietruszka, J. (2012). Cloning and characterisation of a new 2-deoxy-d-ribose-5-phosphate aldolase from *Rhodococcus erythropolis*. *J. Biotechnol.* **161**, 174–180.
96. Jiao, X.C., Pan, J., Xu, G.C., Kong, X.D., Chen, Q., Zhang, Z.J., and Xu, J.H. (2015). Efficient synthesis of a statin precursor in high space-time yield by a new

aldehyde-tolerant aldolase identified from *Lactobacillus brevis*. *Catal. Sci. Technol.* 5, 4048–4054.

97. Al-Foraih, M., and Somerset, S. (2016). Factors Affecting Adherence to Statins in Hypercholesterolemic Kuwaiti Patients: A Cross-Sectional Study. *Med. Princ. Pract.* 26, 35–40.
98. Ruan, Y., Guo, Y., Zheng, Y., Huang, Z., Sun, S., Kowal, P., Shi, Y., and Wu, F. (2018). Cardiovascular disease (CVD) and associated risk factors among older adults in six low-and middle-income countries: Results from SAGE Wave 1. *BMC Public Health* 18, 1–13.
99. López Morais, A., Lama Mora, R.A., Dalmau Serra, J., and AEP, C. de N. de la (2009). Hipercolesterolemia. Abordaje terape. *An. pediatria* 70, 488–496.
100. Moutinho, M., Nunes, M.J., and Rodrigues, E. (2017). The mevalonate pathway in neurons: It's not just about cholesterol. *Exp. Cell Res.* 360, 55–60.
101. Arts, R.J.W., Novakovic, B., ter Horst, R., Carvalho, A., Bekkering, S., Lachmandas, E., Rodrigues, F., Silvestre, R., Cheng, S.C., Wang, S.Y., et al. (2016). Glutaminolysis and Fumarate Accumulation Integrate Immunometabolic and Epigenetic Programs in Trained Immunity. *Cell Metab.* 24, 807–819.
102. Bekkering, S., Arts, R.J.W., Novakovic, B., Kourtzelis, I., van der Heijden, C.D.C.C., Li, Y., Popa, C.D., ter Horst, R., van Tuijl, J., Netea-Maier, R.T., et al. (2018). Metabolic Induction of Trained Immunity through the Mevalonate Pathway. *Cell* 172, 135–146.
103. Schachter, M. (2004). Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: An update. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 19, 117–125.
104. Endo, A. (1992). The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Lipid Reseach* 33, 1569–1582.
105. Časar, Z. (2015). Recent Progress in the Synthesis of Super-Statins. *Top. Heterocycl. Chem.* 44, 113–185.

106. Stokker, G., Hoffman, W., Alberts, E., Cragoe, J., Deana, J., Gilfillan, L., Huff, W., Novello, C., Prugh, D., Smith, L., et al. (1985). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A Reductase Inhibitors. 1. Structural Modification of 5-Substituted 3,5-Dihydroxypentanoic Acids and Their Lactone Derivatives. *J. Med Chem* 26, 347–358.
107. Manzoni, M., and Rollini, M. (2002). Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 555–564.
108. Serajuddin, A.T.M., Ranadive, S.A., and Mahoney, E.M. (1991). Relative lipophilicities, solubilities, and structure-pharmacological considerations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a (HMG-CoA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin. *J. Pharm. Sci.* 80, 830–834.
109. Endo, A., and Hasumi, K. (1992). HMG-CoA Reductase Inhibitors. *Natural Product Reports*, 10(6), 541-550.
110. Gazzerro, P., Proto, M.C., Gangemi, G., Malfitano, A.M., Ciaglia, E., Pisanti, S., Santoro, A., Laezza, C., and Bifulco, M. (2012). Pharmacological actions of statins: A critical appraisal in the management of cancer. *Pharmacol. Rev.* 64, 102–146.
111. McKenney, J.M. (2002). New cholesterol guidelines, new treatment challenges. *Pharmacotherapy* 22, 853–863.
112. Endo, A. (2008). A gift from nature: The birth of the statins. *Nat. Med.* 14, 1050–1052.
113. Časar, Z., Steinbücher, M., and Košmrlj, J. (2010). Lactone pathway to statins utilizing the wittig reaction. the synthesis of rosuvastatin. *J. Org. Chem.* 75, 6681–6684.
114. Askin, D., Verhoeven, T.R., Liu, T., and Shinkai, I. (1991). Synthesis of Synvinolin: Extremely High Conversion Alkylation of an Ester Enolate. *J. Org. Chem.* 56, 4930–4932.

115. Hoyos, P., Pace, V., and Alcántara, A.R. (2019). Biocatalyzed synthesis of statins: A sustainable strategy for the preparation of valuable drugs. *Catalysts* 9, 1–32.
116. Spreider, P.A., and Breit, B. (2018). Palladium-Catalyzed Stereoselective Cyclization of in Situ Formed Allenyl Hemiacetals: Synthesis of Rosuvastatin and Pitavastatin. *Org. Lett.* 20, 3286–3290.
117. Ručigaj, A., and Krajnc, M. (2013). Optimization of a crude deoxyribose-5-phosphate aldolase lyzate-catalyzed process in synthesis of statin intermediates. *Org. Process Res. Dev.* 17, 854–862.
118. Ma, S.K., Gruber, J., Davis, C., Newman, L., Gray, D., Wang, A., Grate, J., Huisman, G.W., and Sheldon, R.A. (2010). A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate. *Green Chem.* 12, 81–86.
119. Nakamura, K., and Matsuda, T. (2006). Biocatalytic Reduction of Carbonyl Groups. *Curr. Org. Chem.* 10, 1217–1246.
120. Wu, X., Jiang, J., and Chen, Y. (2011). Biocatalytic Efficiency: Coexpression of Diketoreductase and Glucose Dehydrogenase for the Preparation of Chiral Diol for Statin Drugs. *ACS Catal.* 1, 1661–1664.
121. Metzner, R., Hummel, W., Wetterich, F., König, B., and Gröger, H. (2015). Integrated Biocatalysis in Multistep Drug Synthesis without Intermediate Isolation: A de Novo Approach toward a Rosuvastatin Key Building Block. *Org. Process Res. Dev.* 19, 635–638.
122. Greenberg, W.A., Varvak, A., Hanson, S.R., Wong, K., Huang, H., Chen, P., and Burk, M.J. (2004). Development of an efficient, scalable, aldolase-catalyzed process for enantioselective synthesis of statin intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5788–5793.
123. Švarc, A., Fekete, M., Hernandez, K., Clapés, P., Findrik Blažević, Z., Szekrenyi, A., Skendrović, D., Vasić-Rački, Đ., Charnock, S.J., and Presečki, A.V. (2021). An innovative route for the production of atorvastatin side-chain precursor by DERA-catalysed double aldol addition. *Chem. Eng. Sci.* 231, 116312.

124. Jiao, X. C., Pan, J., Kong, X. D., & Xu, J. H. (2017). Protein engineering of aldolase LbDERA for enhanced activity toward real substrates with a high-throughput screening method coupled with an aldehyde dehydrogenase. *Biochemical and biophysical research communications*, 482, 159-163.

Capítulo 2

Objetivos

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

Objetivos

En función de lo desarrollado en el capítulo anterior se puede decir que las estatinas, drogas que contribuyen a disminuir la concentración de colesterol en sangre, representan un desafío para la química sintética. Si bien la cadena lateral hidroxiácida quiral, conservada en todas las estatinas, es la responsable de la actividad biológica, el ciclo al cual está unida está muy ligado a otras características como biodisponibilidad y efectos adversos.¹ Dicho ciclo fue evolucionando desde la decalina, en las primeras estatinas naturales, hasta heterociclos complejos en las super-estatinas (**figura 2.1**) con el fin de mejorar la eficiencia de la droga.

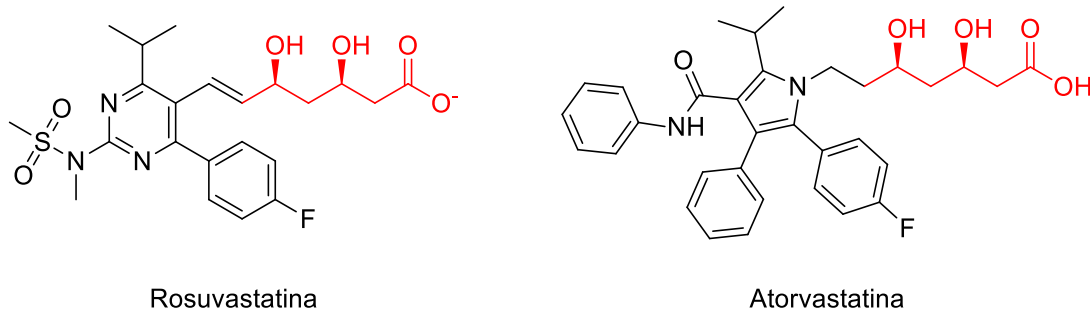


Figura 2. 1: Ejemplo de súper-estatinas comerciales.

En consecuencia, existe una constante búsqueda de nuevos análogos de estatinas con mayor actividad y menos efectos adversos. Por ejemplo, la estatina SIPI-4884 (**figura 2.2**) sintetizada por Cai y colaboradores, resultó ser más potente en la inhibición de HMG-CoA que la estatina comercial Rosuvastatina.²

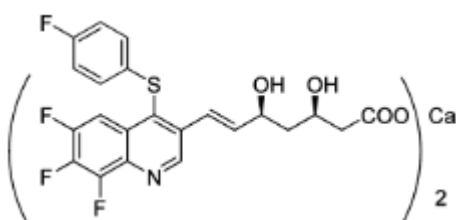


Figura 2. 2: Estatina SIPI-4884.

Como se ha mencionado, los métodos químicos para sintetizar estatinas generalmente contienen varios pasos de reacción, los cuales involucran protección y desprotección de grupos funcionales. Además, estas metodologías implican condiciones de reacción fuertes, medios básicos y/o ácidos a temperaturas altas, y costos de producción elevados. Por tal motivo, es importante el uso de metodologías de síntesis compatibles con el medio ambiente, que rindan nuevas estructuras más eficientes y más económicas.³ La Biocatálisis demostró ser una alternativa favorable debido a que las reacciones se generan en condiciones suaves y con un estricto control estereoquímico. En particular, empleando 2-desoxirribosa-5-fosfato aldolasa (DERA) como biocatalizador, se obtuvieron 2,4,6-tridesoxihexosas sustituidas en C-6, las cuales, previa oxidación a lactona, fueron empleadas para introducir la cadena lateral en los heterociclos y formar super-estatinas.

Por otro lado, los análogos de nucleósidos forman parte de una gran cantidad de compuestos farmacológicamente activos, en particular como antivirales. Su estructura mimetiza a un nucleósido natural e interrumpe la biosíntesis de ADN o ARN, o actúa como un inhibidor de otras enzimas claves en el metabolismo del patógeno.⁴ De forma similar, muchos de ellos presentan actividad antitumoral. Existe un permanente interés en generar nuevas estructuras. En particular, desoxinucleósidos^{5,6} (**figura 2.3**) como AZT e Islatravir -importantes antivirales- o Floxuridina –antitumoral- pueden ser preparados quimioenzimáticamente a partir de 2-desoxirribosa-5-fosfato (DR5P) sintetizada de forma biocatalizada empleando DERA

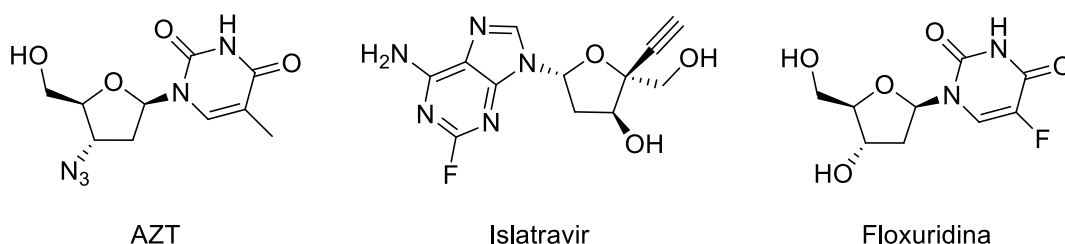


Figura 2. 3: Desoxinucleósidos modificados con actividad farmacológica

Por otro lado, los nucleósidos acíclicos, cuya cadena alquílica permite adoptar la configuración adecuada para unirse en el sitio activo de las enzimas implicadas en el metabolismo, han dado como resultado drogas de alta actividad terapéutica.⁶ Podemos mencionar entre ellos Aciclovir o Ganciclovir, altamente efectivos para tratamientos contra herpes.

Un ejemplo particular es eritadenina (**figura 2.4**), un análogo acíclico de adenosina, que posee una comprobada actividad tanto antiviral como antihipercolesterolemica.⁷ Este fármaco modula el metabolismo de los fosfolípidos hepáticos por la inhibición de la enzima S-adenosil-L-homocisteina hidrolasa (SAHH).

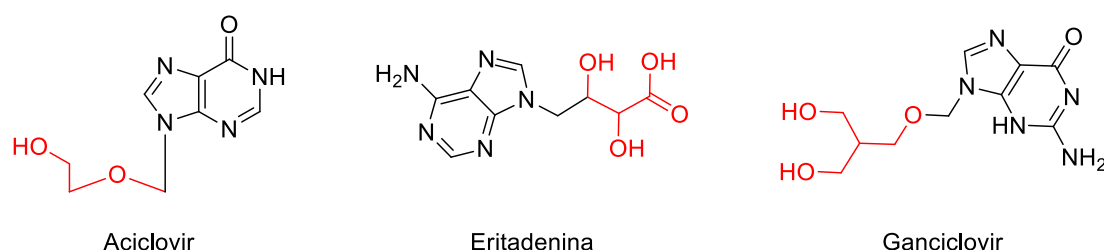


Figura 2. 4: Nucleosidos acíclicos con actividad biológica.

En este contexto, el *objetivo general* de esta Tesis doctoral fue la obtención, mediante caminos biocatalizados por DERA, de intermediarios y/o precursores de análogos de nucleósidos con actividad farmacológica.

Para alcanzar el objetivo propuesto, se postularon tres objetivos específicos:

- Desarrollar biocatalizadores basados en DERAs de diferentes fuentes microbiológicas, modificadas genéticamente. Se utilizaron DERAs pertenecientes a *Pectobacterium atrosepticum* y *Lactobacillus brevis*, las cuales fueron sobre-expresadas y/o modificadas genéticamente para obtener variantes activas frente al empleo de concentraciones elevadas del acetaldehído.
- Sintetizar DR5P como intermediario de la síntesis de desoxinucleósidos, empleando la reacción natural de DERA a partir de gliceraldehído-3-fosfato o glucosa

(como su precursor metabólico) y acetaldehído (**figura 2.5**), utilizando los biocatalizadores obtenidos en forma de células enteras.

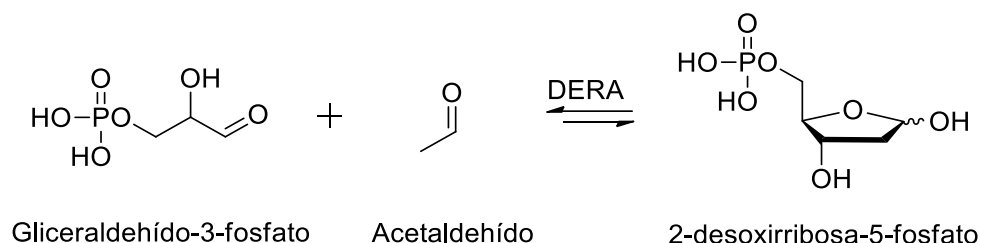


Figura 2. 5: Síntesis de DR5P biocatalizada por DERA.

- Obtener 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexosas 6-sustituidas como precursores de potenciales estatinas, haciendo uso de la capacidad de DERA de dar reacciones de adición aldólica secuenciales. La estrategia que se planteó en este objetivo consistió en un proceso quimio-enzimático que involucró la preparación de un aldehído derivado de bases nitrogenadas seguida de la biotransformación con DERA para generar un aldol cíclico quiral. La oxidación de este compuesto a lactona permitiría formar el análogo de estatinas. Un esquema de la reacción se muestra en la **figura 2.6**. Cabe aclarar que esta metodología no sólo tuvo la novedad de utilizar bases nitrogenadas como alternativa de los heterociclos habituales de estatinas, sino que es la primera síntesis reportada en construir la molécula desde el heterociclo.

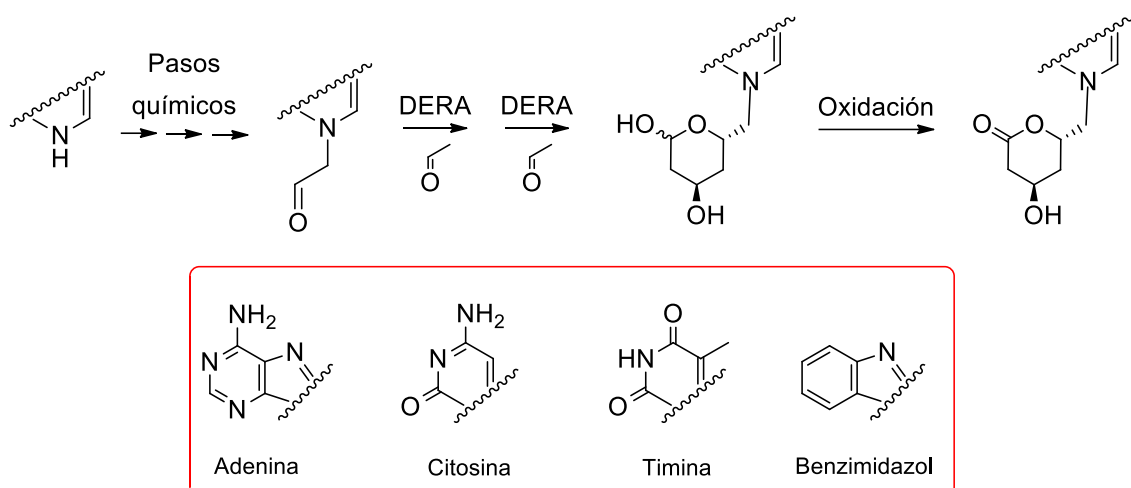


Figura 2. 6: Estrategia quimio-enzimática planteada para la síntesis de nuevos análogos de estatinas.

Estos objetivos se desarrollarán en los siguientes capítulos:

- Capítulo 3: Optimización de biocatalizadores
- Capítulo 4: Síntesis biocatalizada de desoxirribosa-5-fosfato
- Capítulo 5: Síntesis biocatalizada de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranos
- Capítulo 6: Síntesis biocatalizada de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranos 6-sustituidas
- Capítulo 7: Oxidación de lactoles.

Referencias bibliográficas

1. Schachter, M. (2004). Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: An update. *Fundam. Clin. Pharmacol.* *19*, 117–125.
2. Cai, Z., Zhou, W., and Sun, L. (2007). Synthesis and HMG CoA reductase inhibition of 4-thiophenyl quinolines as potential hypocholesterolemic agents. *Bioorganic Med. Chem.* *15*, 7809–7829.
3. Časar, Z. (2015). Recent Progress in the Synthesis of Super-Statins. *Top. Heterocycl. Chem.* *44*, 113–185.
4. Yates, M.K., and Seley-Radtke, K.L. (2019). The evolution of antiviral nucleoside analogues: A review for chemists and non-chemists. Part II: Complex modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Res.* *162*, 5–21.
5. Seley-Radtke, K.L., and Yates, M.K. (2018). The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Res.* *154*, 66–86.
6. Cosgrove, S.C., and Miller, G.J. (2022). Advances in biocatalytic and chemoenzymatic synthesis of nucleoside analogues. *Expert Opin. Drug Discov.* *17*, 355–364.
7. Morales, D., Tabernero, M., Largo, C., Polo, G., Piris, A.J., and Soler-Rivas, C. (2018). Effect of traditional and modern culinary processing, bioaccessibility, biosafety and bioavailability of eritadenine, a hypocholesterolemic compound from edible mushrooms. *Food Funct.* *9*, 6360–6368.

Capítulo 3

Preparación del biocatalizador

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

3.1. Introducción

Como se mencionó previamente, 2-desoxirribosa-5-fosfato aldolasa (DERA), es una aldolasa del tipo I y la única reportada dependiente de acetaldehído. Su reacción natural involucra la adición aldólica reversible y estereoselectiva entre gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y acetaldehído para dar 2-desoxirribosa-5-fosfato (DR5P). Si bien el equilibrio de esta reacción está desplazado hacia la descondensación, esto puede ser solucionado con el uso de concentraciones elevadas de acetaldehído. No obstante, DERA *wild-type* presenta una fuerte inhibición por este sustrato¹ por razones de regulación metabólica ya descritas en el **capítulo 1**, y por este motivo existe una búsqueda constante de nuevas fuentes con mayor tolerancia al mismo.² Con el fin de encontrar una DERA con estas características, en nuestro grupo de trabajo se ha llevado a cabo un *screening* jerárquico sobre el cepario del laboratorio. El *screening* contó con un primer paso de selección de microorganismos que pudieran crecer en un medio líquido cuya única fuente de carbono fuera desoxirribosa (DR). Las 41 bacterias seleccionadas capaces de metabolizar DR fueron sometidas a un segundo paso de *screening* para testear su resistencia a concentraciones altas de acetaldehído. Luego de un tercer paso de *screening* que involucró la síntesis de DR5P a partir de G3P y acetaldehído, se seleccionó *Pectobacterium atrosepticum* (previamente *Erwinia Caratovora*) como el mejor biocatalizador. Esta bacteria, con actividad DERA, se empleó para preparar DR5P a partir de diversos precursores de G3P, con moderados rendimientos y en presencia de 200 mM de acetaldehído.³

Debido a que *Pectobacterium atrosepticum* resultó ser un buen biocatalizador, su DNA genómico se extrajo y se envió al Laboratorio de Biocatálisis de la Universidad Tecnológica de Delft, con el cual nuestro laboratorio se encuentra en colaboración. Dicho grupo clonó y expresó el gen *deoC* perteneciente a *Pectobacterium atrosepticum* en pET 28a(+).

Se obtuvieron cuatro variantes de DERA de *Pectobacterium atrosepticum*: PaDERA N-His, PaDERA C-His, PaDERA C49M C-His y PaDERA AA C-His. Adicionalmente, se obtuvo de dicha colaboración otra DERA perteneciente a *Lactobacillus brevis* sobre-expresada y modificada genéticamente.

Este capítulo describe la optimización de estos biocatalizadores. Parte de la expresión y la purificación de estas DERAs recombinantes se realizó mediante una

pasantía en el Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, perteneciente a la Universidad de Buenos Aires.

3.2. Materiales y métodos

Los reactivos analíticos y los sustratos se adquirieron en Sigma Aldrich, los solventes orgánicos utilizados en Sintorgan y los componentes del medio de cultivo en Britania y Biopack.

Escherichia coli DH5 α (Invitrogen) y *Escherichia coli* BL21 (DE3) (ATCC 47092, deficiente en fosfatasas ácidas) se utilizaron como cepas de clonado y expresión, respectivamente. Los plásmidos (*PaDERA* N-His, *PaDERA* C49M C-His y *LbDERA* C42M E78K C-His) obtenidos en colaboración con la Universidad Tecnológica de Delft (Países Bajos) se transportaron a la Universidad en papel Whatman FTA.

Los medios de cultivo fueron Luria Bertani (LB) (bacteriotripton 1%p/v, extracto de levadura 0,5%p/v, NaCl 1%p/v; pH 7,5), LB *low-salt* (bacteriotripton 1%p/v, extracto de levadura 0,5%p/v; pH 7,5), LB con kanamicina (LB-kana) (bacteriotripton 1%p/v, extracto de levadura 0,5%p/v, NaCl 1%p/v; pH 7,5, 30 μ g/ml kanamicina).

3.2.1. Extracción de los plásmidos

Se cortó el papel Whatman FTA -que contenían los plásmidos- en dos partes, se depositó uno de los trazos en un eppendorf estéril y se agregaron 100 μ l de agua destilada estéril. Luego de 15 minutos a temperatura ambiente se lo puso en un bloque seco a 80°C o 98°C. Se separó el papel del agua y se conservó el líquido para la posterior transformación. 2 μ l del plásmido en solución se utilizaron para cuantificar los ácidos nucleicos utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

3.2.2. Generación de *Escherichia coli* DH5 α electro-competentes

Se realizó un preinóculo de *Escherichia coli* DH5 α en 5 ml de medio LB y se lo dejó crecer a 37°C y 200 rpm overnight. Al día siguiente se realizó una dilución 1/10 en medio LB *low salt* (volumen final 200 ml) y se lo dejó a 37°C y 200 rpm hasta que la medición de DO₆₀₀ fue 0,5. Se centrifugó el cultivo durante 10 minutos a 5000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el total del pellet bacteriano con 1000 ml de una solución 10% de glicerol en agua MiliQ. Se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm, se descartó el sobrenadante y el total del pellet se resuspendió en 20 ml de glicerol al 10%. Se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm y el pellet bacteriano se resuspendió

en 2 ml de solución. Se alicuotaron 500 µl en *eppendorfs* y se conservaron a -80°C hasta su utilización.

3.2.3. Transformación en *Escherichia coli* DH5α electro-competentes

Se utilizó el equipo Gene Pulser (BioRad) para electroporar las bacterias con los plásmidos obtenidos en el inciso **3.2.1** en 500 µl de *Escherichia coli* DH5α obtenidas en el inciso **3.2.2**. Las bacterias transformadas fueron incubadas a 37°C durante 1 h en medio LB sin antibiótico. Posteriormente se sembraron en placas de Petri con LB-kana sólido donde se observó el crecimiento de colonias aisladas.

3.2.4. Miniprep

Se realizó un preinóculo de una colonia aislada de las bacterias obtenidas en el punto **3.2.3** en 5 ml de LB-kana, se dejó *overnight* a 37°C, 200rpm. Al día siguiente se centrifugó el cultivo a 3500 rpm durante 5 minutos. El pellet bacteriano se resuspendió en 100 µL de **solución I** de miniprep. Se centrifugó nuevamente; al pellet bacteriano se le agregaron 200 µL de la **solución II** de miniprep y se mezcló por inversión. Se dejó 5 minutos a temperatura ambiente, luego se agregaron 150 µL de la **solución III** de miniprep y se volvió a mezclar por inversión. Se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm y se conservó el sobrenadante. Se agregaron 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, se homogeneizó, se centrifugó a 13000 rpm y se conservó la fase acuosa. Este último paso se repitió tres veces. A la suma de las fases colectadas se le agregó 1 volumen de isopropanol, se homogeneizó y se incubó a -20°C durante 15 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm durante 20 minutos y el pellet se lavó con 500 µL de una solución de etanol 70%v/v. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y el pellet se secó a temperatura ambiente. Por último, se resuspendió en 20 µL de agua destilada estéril.

Composición de las soluciones de miniprep:

- Solución I: 50 mM glucosa, 25 mM tris base, 10 mM EDTA; pH 8
- Solución II: 0,2 M NaOH, 1% p/v SDS
- Solución III: 60 ml de Acetato de potasio 5M, 11,5 ml de Ac. Acético, 28,5 ml de agua

3.2.5. Electroforesis en gel de agarosa 1%

Todas las minipreparaciones obtenidas en el inciso **3.2.4** se sembraron en un gel de agarosa 1%. Se agregó 1 g de agarosa y 100 mL de buffer TAE en Erlenmeyer y se calentó en un horno de microondas dando pulsos de 30 segundos hasta lograr una mezcla homogénea. Se agregó bromuro de etidio en una concentración final 0,5 µg/mL. Se vertió la solución en la bandeja y se agregó el peine. Se dejó enfriar, se retiró el peine y se agregó buffer TAE hasta cubrir el gel. Se colocaron 5 µL de muestras de ADN en cada pozo con buffer de carga y se corrió el gel a 70 volts por una hora. Se observó con transiluminador.

Composición del buffer:

Buffer TAE 1X: 0,04 M tris base, 0,02 M ácido acético glacial, 1mM EDTA; pH8

3.2.6. Generación de *Escherichia coli* BL21 DE3 competentes térmicas

Se realizó un preinóculo de *Escherichia coli* BL21 DE3 en 5 ml de medio LB y se lo dejó crecer a 37°C y 200 rpm *overnight*. Al día siguiente se realizó una dilución 1/10 en medio LB (volumen final 10 ml) y se lo dejó a 37°C y 200 rpm hasta que la medición de DO₆₀₀ fue igual a 0,5. Se centrifugó el cultivo durante 10 minutos a 3900 rpm y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet bacteriano en 4 ml de una solución 20 mM de CaCl₂, 80 mM de MgCl₂. Se separaron los 4 ml en cuatro *ependorf* conteniendo 1 ml cada uno, se centrifugaron 5 minutos a 3900 rpm y se descartó el sobrenadante. A cada *ependorf* se le agregó 100 µl de una solución de MgCl₂ 100 mM. Se conservaron en hielo para transformar.

3.2.7. Transformación de *Escherichia coli* BL21 DE3 competentes térmicas

A 500 µl de las bacterias competentes térmicas se le agregó 5 µl del plásmido obtenido de las minipreps del inciso **3.2.4**. Se lo llevó a hielo durante 2 minutos y luego a un baño de agua a 45°C. Las bacterias se dejaron a 37°C y 200 rpm durante 1h y, transcurrido ese tiempo, se plaquearon en LB-kana sólido.

3.2.8. Preparación de criotubos, stock de guardado y stock de trabajo

Se tomó una de las colonias aisladas de cada una de las bacterias recombinantes obtenidas en las placas de los incisos **3.2.3** y **3.2.7** y se realizó un cultivo de 10 ml en LB-kana, se dejó a 37°C y 200 rpm. Al cabo de un día, 850 µl del cultivo saturado se mezclaron con 150 µl de glicerol estéril y se conservó a -80 °C como stock de guardado y stock de trabajo.

3.2.9. Cultivo de bacterias recombinantes

A partir del stock de trabajo de *Escherichia coli* BL21 (PaDERA N-His), *Escherichia coli* BL21 (PaDERA C49M C-His) o *Escherichia coli* BL21 (LbDERA C42M E78K C-His) se realizó un preinóculo de 5 ml de medio LB-kana, se dejó *overnight* a 37°C y 200 rpm. Al día siguiente, se utilizaron 2,5 ml del cultivo para inocular 250 ml de medio LB-kana y se lo dejó a 37°C y 200 rpm hasta $DO_{600}=0,5$. Se agregó IPTG en una concentración final de 50 mM, 100 mM, 400 mM o 1 M y se dejó *overnight* a 28 °C y 180 rpm. Una vez transcurridas las 16 hs, el cultivo se centrifugó a 4°C a 9000 rpm y se descartó el sobrenadante. Las células enteras se resuspendieron en buffer 100 mM fosfato de potasio pH 7 hasta obtener una concentración de 30 g de células en 100 ml de buffer para continuar con la obtención del extracto libre de células (ELC).

3.2.10. Extracto libre de células (ELC)

La suspensión de células (obtenida en el **inciso 3.2.9**) se sonicó con un sonicador de punta (Vibra-Cell VCX 130 PB) cinco ciclos de 20 seg y descanso de 40 seg y se centrifugó a 4°C a 9000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se colectó y se dejó en agitación a 4°C durante 1 hora. Se agregó estreptomicina y se dejó en agitación a 4°C durante 1 hora. Se centrifugó a 4°C y 9000 rpm durante 10 minutos. Se alicuotó en *ependorfs* conteniendo 500 µl del extracto libre de células (ELC) y se conservó a -80°C.

3.2.11. Purificación de enzima

3.2.11.1. Purificación en batch

Se agregó 20 µl de resina Ni-Sefaros 6 Fast Flow (GE- Healthcare) a 1 ml de ELC obtenido en el **inciso 3.2.10** y se agitó en agitador orbital a 4°C durante 1 h. Se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto y el sobrenadante se guardó en hielo. Se

agregaron 200 µl de una solución 5 mM de imidazol en buffer fosfato de potasio 100 mM, pH 7, se dejó un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto; se conservó el sobrenadante en frío. Se repitió el procedimiento con soluciones de imidazol 20 mM, 100 mM, 250 mM y 500 mM. Las fracciones fueron colectadas y concentradas mediante centrífuga *vivaspin 15R* (Sartorius). La proteína concentrada fue desalada usando una columna PD-10 (GE, Healthcare, New York, NY, USA) y 2 ml de buffer fosfato de potasio 100mM pH 7.

3.2.11.2. Purificación de enzima utilizando columna empaquetada

Se realizó una cromatografía de afinidad utilizando una columna IMAC-Ni²⁺. 1 ml de ELC obtenido en el **inciso 3.2.10** se sembró en la columna. La muestra se eluyó con 1 volumen de una solución 150 mM de NaCl en buffer Tris 20 mM pH 9 y luego se adicionaron 2 volúmenes de solución de imidazol 0,5 M. Las fracciones fueron colectadas y concentradas mediante centrífuga *vivaspin 15R* (Sartorius). La proteína concentrada fue desalada usando una columna PD-10 (GE, Healthcare, New York, NY, USA) y 2 ml de buffer fosfato de potasio 100mM pH 7.

3.2.12. Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el ensayo de Bradford empleando 200 µl del reactivo de Sigma Aldrich y 10 µl de las fracciones proteicas a determinar. Se midió a 595 nm utilizando Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader (BioTek). Se preparó la curva de calibración de albúmina bovina (BSA) en un rango desde 0 mg/ml hasta 1 mg/ml.

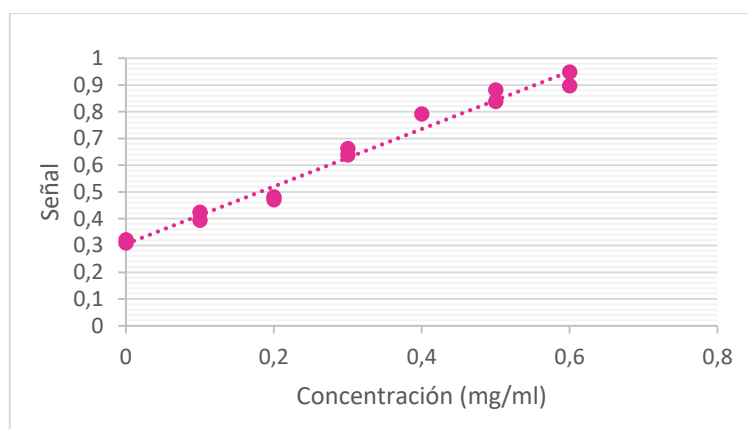


Figura 3. 1: Curva de calibración de BSA. Recta de regresión lineal: $y=1,0748x + 0,3058$, $R^2 = 0,979$

3.2.13. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para corroborar la expresión proteica, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida 15%. Para ello, se emplearon el *separating* gel y el *stacking* para montar el sistema electroforético en un equipo vertical *gel system* (BIO-RAD). Se prepararon las muestras para sembrar en el gel. Se alicuotaron 5 µl de las fracciones de proteína pura o ELC, según corresponda, en un *ependorf* y se agregaron 10 µl de sample buffer y 5 µl de β-mercaptoetanol. Se llevaron a un baño de agua a ebullición durante 5 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se sembró cada fracción en las calles del gel. Se sembró también un marcador de peso molecular (rango de 11 KDa a 245 KDa). La corrida se realizó a 90V durante 3 h. Los geles se tiñeron utilizando Coomassie Brilliant Blue R250 durante 2 h. Luego se destiñeron utilizando la solución de desteñido.

Composición de las soluciones utilizadas:

- Separating gel: 2,5 ml de acrilamida:bisacrilamida 37,5:1, 2 ml buffer tris pH 8 100 mM, 50 µl SDS 10% p/v, 400 µl agua, 2,5 µl TEMED, 50 µl APS 10% p/v.
- Stacking gel: 0,7 ml de acrilamida:bisacrilamida 37,5:1, 0,65 ml buffer tris pH 8 100 mM, 50 µl SDS 10% p/v, 3,55 ml agua, 5 µl TEMED, 50 µl APS 10% p/v.
- Sample buffer 2X: azul de bromofenol 0,2%p/v, glicerol 20%p/v, SDS 4%p/v en buffer Tris 100mM pH 6,8
- Coomassie Brilliant Blue R250: 0.1% del reactivo comercial en 25% metanol, 10% ácido acético
- Solución de desteñido: 30%v/v metanol, 10%v/v ácido acético y 60%v/v de agua

3.2.14. Ensayo de actividad

El ensayo de actividad se realizó en una cubeta de 500 µl conteniendo buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7, 0,2 mM NADH, 0,4 mM DR5P, 4 µL de α-glicerol fosfato deshidrogenasa/triosafosfato isomerasa (α-GDH-TPI) y 5 µL de proteína purificada. La reacción se inició con la adición de DERA y se monitoreó el decaimiento de la concentración de NADH a longitud de onda 340 nm. 1U de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1 µmol de DR5P por minuto a una temperatura de 28 °C.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1. Diseño de las cepas

Como mencionado, en un trabajo previo en nuestro laboratorio se reportó la bacteria *Pectobacterium atrosepticum* con actividad DERA, capaz de tolerar un máximo de 200 mM de acetaldehído. En el marco de un proyecto con el grupo de Biocatálisis de la Universidad Tecnológica de Delft, el gen *deoC* (**figura 3.2**), perteneciente a *P. atrosepticum*, se sobre-expresó y mutó con el fin de obtener distintas variantes con una tolerancia a su sustrato aún mayor que DERA wild-type (*PaDERA wt*). La construcción del plásmido se realizó utilizando el vector pET-28a+.

```
ATGACCAAGCTGACCACGGCCGCGCAGCGCGCTGGCGTTGATGGATTAAACCACGCTGAATGAGGATG
ATACGGATGAAAAAGTGACGGCACTCTGCCGTCAGGCAAATAGCCCGGCAGGAAAACTGCTGCTATCTG
TATCTATCCACGTTTTATCCCCCTGGCGAAAAAAATCCTGCGTGAGCAGGGTACGCCGGATATCCGTATT
GCGACGGTGACCAACTCCCGCACGGCAATGATGATGTTGACATCGCTGTTGCAGAAACCAGAGCGGCGA
TAGCCTATGGCGCTGATGAAGTTGATGTCGTATCCCTTACCGAGCACTGATTGCAGGCAATGCGCAAAT
TGGTTTTGAGCTGGTGCAGGCATGCAAAGCCGTATGTCAGGATGCCACGTGCTGCTGAAGGTGATCATC
GAGACAGGCGAGCTGAAACAGGAAACGCTGATACGTAGGCGAGCGAGATTGTCATTGATGCGGGTGCCG
ACTTCATTAACCTCAACCGGTAAAGTGCCGGTGAACGCGACGCCGAGAGTGCCTCGATCATGCTGAA
GACGATCCGCGATAAAGGCGTGGGTGAGTATGTCGGCTTTAAAGCCGCTGGCGGCGTGCGTAACGCGGAA
GACGCCGCCATTTATCTGCAACTGGCGGACGATATCATGGGCGCTGAATGGGCGAATGCGCAGCATTTTC
GCTTTGGCGCATCCAGTTTGCTGGCGAGCCTGCTGACAACGCTCGGACACGCGGCAGCGGCCACAGGG
CAGCTACTAA
```

Figura 3. 2: Secuencia del gen *deoC* perteneciente a *Pectobacterium atrosepticum*.

La sobre-expresión de la enzima nos permitió tener mayor concentración de DERA respecto a su variante *wild-type*. Cuanto mayor sea la carga del biocatalizador, el sustrato se consumirá más rápido y, por lo tanto, la velocidad de reacción será mayor. A su vez, el consumo rápido de acetaldehído favorece la tolerancia a este sustrato ya que pasa menos tiempo en el medio de reacción. Por otro lado, las modificaciones genéticas realizadas tuvieron como finalidad aumentar aún más dicha resistencia.

En un primer experimento, DERA fue sobre-expresada agregando un Tag de histidina, el cual permite su purificación, en el extremo N-terminal (*PaDERA N-His*) de la enzima. Debido a que se han reportado varios estudios en donde la adición de dicho Tag puede producir cambios inesperados en el plegamiento como en las propiedades

de la proteína,⁴⁻⁶ el grupo colaborador decidió también sobre-expresar DERA con el Tag de histidina en el C-terminal (PaDERA AA C-His). En la **figura 3.3** se puede observar la secuencia de aminoácidos correspondientes a DERA de *Pectobacterium atrosepticum*, con el Tag de histidina en el C-terminal.

MG	MTKLTTAA	QRALALMDLT	TLNEDDTDEK	VTALCRQANS	PAGKTAAICI	YPRFIPLAKK
IL	REQGTPDI	RIATVTNFPH	GNDDVDIAVA	ETRAAIAYGA	DEVVVFPYR	ALIAGNAQIG
FEL	VQACKAV	CQDAHVLLKV	IIETGELKQE	TLIRQASEIV	IDAGADFIKT	STGKVPVNAT
PES	SIMLKT	IRDKGVGEYV	GFKAAGGVRN	AEDAAIYLQL	ADDIMGAEWA	NAQHFRFGAS
SLL	ASLLTTL	GHAAAAPQGS	YSLE	HHHHHH	Stop	

Figura 3. 3: Secuencia de aminoácidos de PaDERA AA C-His. Celeste: aminoácidos agregados, Gris: región conservada, Amarillo: Tag de histidinas, Rojo cisteína del sitio activo.

Además del Tag, se puede observar la presencia de 5 aminoácidos extras, que corresponden al proceso de clonado, 2 aminoácidos en el N-terminal y 3 aminoácidos entre la enzima y el Tag de histidina.

Si bien el agregado de pequeñas secuencias de aminoácidos en la proteína de interés previene la alteración de algunas de sus propiedades (por ejemplo, el plegamiento incorrecto, la solubilidad de la proteína, el impedimento estérico al momento de unirse con su sustrato, etc), estas modificaciones dependen exclusivamente de la enzima.^{7,8} Con el fin de testear que la actividad de DERA no se vea afectada frente al agregado de aminoácidos espaciadores, se diseñó una tercera variante de PaDERA con el Tag de histidina en el C-terminal, pero sin la presencia de estos 5 aminoácidos extra (PaDERA C-His). En la **figura 3.4** se puede observar su secuencia de aminoácidos.

MTKLTTAAQR	ALALMDLTTL	NEDDTDEKVT	ALCRQANS	PA	GKTAAICYP	RFIPLAKKIL
REQGTPDIRI	ATVTNEPHGN	DDVDIAVAET	RAAIAYGADE		VDVVFPYRAL	IAGNAQIGFE
LVQACKAVCQ	DAHVLLKVII	ETGELKQETL	IRQASEIVID		AGADFIKTST	GKVPVNATPE
SASIMLKTIR	DKGVGEYVGF	KAAGGVRNAE	DAAIYLQLAD		DIMGAEWANA	QHFRFGASSL
LASLLTTLGH	AAAAPQGSYH	HHHHH	Stop			

Figura 3. 4: Secuencia de aminoácidos de PaDERA C-His. Amarillo: Tag de histidina

Además, teniendo en cuenta el mecanismo de inhibición para DERA propuesto por Dick y colaboradores (**figura 3.5**) ya mencionado en el **capítulo 1, inciso 1.3.2.1.5.1.12**,¹ se realizó un cambio de cisteína de la posición 49 de PaDERA AA C-His por una metionina (equivalente a C47 en EcDERA) (**figura 3.6**). Metionina no es capaz de unirse al complejo formado por crotonaldehído (producto de adición aldólica de dos acetaldehídos) y lisina del sitio activo, haciendo que DERA mantenga su actividad aun estando en concentraciones elevadas de acetaldehído por tiempos largos. A esta variante se la denominó PaDERA C49M C-His, cuya actividad específica será discutida en este capítulo.

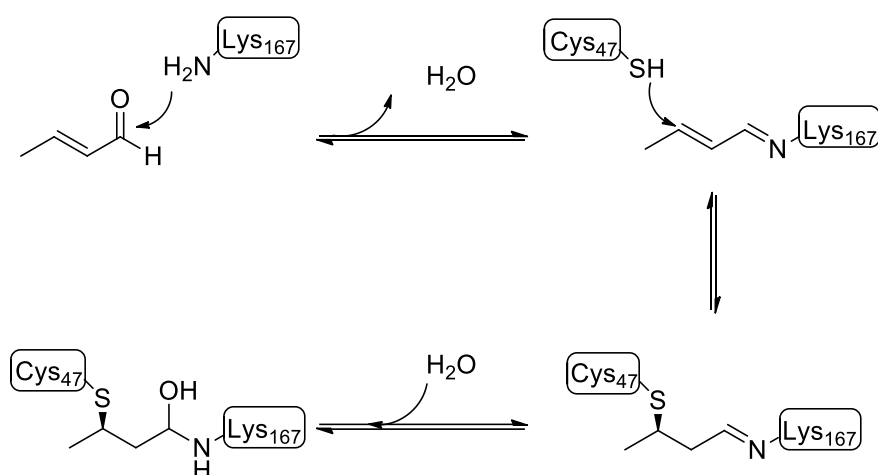


Figura 3. 5: Inhibición de DERA propuesta por Dick y colaboradores.¹

```

MGMTKLTTAA QRALALMDLT TLNEDDTDEK VTALCRQANS PAGKTAAIMI YPRFIPLAKK
ILREQGTPDI RIATVTNFPH GNDDVDIAVA ETRAAYGA DEVDVFPYR ALIAGNAQIG
FELVQACKAV CQDAHVLLKV IIETGELKQE TLIRQASEIV IDAGADFIKT STGKVPVNAT
PESASIMLKT IRDKGVGEYV GFKAAGGVRN AEDAAIYLQL ADDIMGAEWA NAQHFRFGAS
SLLASLLTTL GHAAAAPQGS YSLEHHHHHHStop
    
```

Figura 3. 6: Secuencia de aminoácidos de PaDERA C49M C-His. Celeste: aminoácidos agregados, Gris: región conservada, Amarillo: Tag de histidinas, Rojo: posición de la mutación.

Por otro lado, el grupo colaborador contaba con otra DERA de *Lactobacillus brevis* (*LbDERA*). Esta bacteria ya había sido reportada por Jiao y colaboradores⁹ como un biocatalizador eficiente en la síntesis de (3*R*,5*S*)-6-cloro-2,4,6-tridesoxi hexapiranos,

utilizando 300 mM de acetaldehído. El cambio de la cisteína de la posición 42 (equivalente a C49 en *P. atrosepticum*) por una metionina se realizó en conjunto con otra mutación del ácido glutámico de la posición 78 por una lisina (E78K). La incorporación de la lisina en esta posición permite la formación de un puente de hidrógeno y un puente salino extra entre los dímeros de proteína, estabilizando a DERA cuando se encuentra en presencia de aldehídos. El efecto sinérgico de estas dos mutaciones (*LbDERA* C42M E78K C-His) será estudiado en este capítulo. La secuencia de aminoácidos de *LbDERA* C-His y *LbDERA* C42M E78K C-His se puede observar en las **figuras 3.7 y 3.8**, respectivamente.

MGTLTTEQLA	KYIDHTNLKA	DATEADIKQT	CDEAKKFNTA	SV ^C VNSYWIP	FVTEQLKGTD
VNPIAVVGFP	LGAMATES ^E I	FEATTAIDQG	AAEIDMVLNV	GELKGGNDEK	VLADIQGLAD
AVHAKGKILK	VILENALLTK	DEIVRACQLS	EKAGADFVKT	STGFSTSGAK	VEDVKLMRET
VGDRLGVKAS	GGIHSREEAL	AMIDAGASRM	GVSATVAILT	GDDSHAKAGY	LEHHHHHHH

Figura 3. 7: Secuencia de aminoácidos de *LbDERA*. Rojo: posición de las mutaciones.

MGTLTTEQLA	KYIDHTNLKA	DATEADIKQT	CDEAKKFNTA	SV ^M VNSYWIP	FVTEQLKGTD
VNPIAVVGFP	LGAMATE ^K EI	FEATTAIDQG	AAEIDMVLNV	GELKGGNDEK	VLADIQGLAD
AVHAKGKILK	VILENALLTK	DEIVRACQLS	EKAGADFVKT	STGFSTSGAK	VEDVKLMRET
VGDRLGVKAS	GGIHSREEAL	AMIDAGASRM	GVSATVAILT	GDDSHAKAGY	LEHHHHHHH

Figura 3. 8: Secuencia de aminoácidos de *LbDERA* C42M E78K. Rojo: Posición de las mutaciones.

En la **tabla 3.1** se listan todas las variantes de DERA obtenidas y sus características. Los plásmidos de las variantes consideradas más eficientes (entrada **1, 4 y 5**) fueron cedidos a nuestro grupo de trabajo para evaluar su actividad sintética.

Tabla 3. 1: Características de los plásmidos.

	Plásmido	Resistencia	Tag	Gen
1	pET 28a(+) <i>PaDERA</i> N-His	KAN	His (N-terminus)	<i>deoC</i> <i>P. atrosepticum</i>
2	pET 28a(+) <i>PaDERA</i> C-His	KAN	His (C-terminus)	<i>deoC</i> <i>P. atrosepticum</i>
3	pET 28a(+) <i>PaDERA</i> AA C-His	KAN	His (C-terminus)	<i>deoC</i> <i>P. atrosepticum</i>
4	pET 28a(+) <i>PaDERA</i> C49M C-His	KAN	His (C-terminus)	<i>deoC</i> <i>P. atrosepticum</i>
5	pET 28a(+) <i>LbDERA</i> C42M E78K C-His	KAN	His (C-terminus)	<i>deoC</i> <i>L. brevis</i>

3.3.2. Obtención de plásmidos

El plásmido correspondiente a la variante *PaDERA* N-His fue enviado en solución, mientras que los plásmidos de las variantes *PaDERA* C49M C-His y *LbDERA* C42M E78K C-His se recibieron embebidos en papel Whatman *FTA*. Este papel de filtro preserva la integridad del DNA plasmídico ya que inhibe la actividad enzimática y/o bacteriana.¹⁰

Con el fin de optimizar la extracción del plásmido del papel Whatman *FTA*, se testearon dos temperaturas para la extracción inicial: 80°C y 98°C. Si bien 98°C es la temperatura recomendada para la extracción del plásmido del papel, se probó trabajar también con una temperatura más baja para resguardar la integridad del plásmido. Se obtuvieron aproximadamente 50 µl del plásmido en solución. La concentración del DNA se calculó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop; dicho equipo estima la concentración en ng/µl mediante una ecuación de Lambert-Beer modificada con el coeficiente de extinción molar de los ácidos nucleicos. La **tabla 3.2** muestra las concentraciones obtenidas para cada extracción:

Tabla 3. 2: Concentración de los plásmidos (ng/µl) luego de la extracción a 98°C y a 80°C

Plásmido	98°C Concentración (ng/µl)	80°C Concentración (ng/µl)
pET 28a(+) <i>PA DERA</i> C49M C-His	4,7	2,7
pET 28a(+) <i>LB DERA</i> C42M E78K C-His	6,7	3,3

Como se puede observar en la tabla anterior, al utilizar una temperatura mayor, la concentración del plásmido fue el doble respecto a la concentración obtenida cuando la temperatura fue más baja. Dicha diferencia nos indica que parte del plásmido no termina de extraerse a 80°C y sigue en el papel, por lo que la temperatura apropiada fue 98°C.

3.3.3. Transformación en *Escherichia coli* DH5α

Para la incorporación de los plásmidos obtenidos en el inciso anterior a las bacterias, se procedió a realizar una transformación por electroporación. En este método de transformación, el DNA plasmídico ingresa a la célula a través de los poros generados por la aplicación de un pulso eléctrico.

Para tal fin, 10 ng de cada plásmido se transformaron en células de *Escherichia coli* DH5α competentes. La elección de la cepa de clonado se debió a que la misma posee una mutación en *recA* que impide que se produzcan recombinaciones heterólogas por lo que mantiene la estabilidad en el inserto. Adicionalmente, es deficiente de algunas endonucleasas lo que evita la degradación del plásmido durante el procesamiento posterior.

Debido a que el vector de clonado pET28a+ contiene la secuencia que codifica a resistencia a kanamicina, luego de la electroporación las células se plaquearon en LB-Kana sólido. Sólo las células que incorporaron el plásmido pueden crecer en este medio. Se seleccionaron dos colonias aisladas de cada una de las variantes de DERA y se crecieron hasta saturación. Se prepararon los stocks de guardado y de trabajo en glicerol y se conservaron a -80°C.

3.3.4. Extracciones plasmídicas

Para obtener una mayor cantidad de plásmido, se realizaron minipreparaciones de los clones seleccionados por lisis alcalina según el protocolo descrito por Sambrook.¹¹ Inicialmente, el pellet bacteriano de cada clon se resuspendió en la solución isotónica de lavado (Solución I). El agregado de la Solución II provocó la desnaturalización de las proteínas (por el SDS) y del DNA plasmídico y cromosomal (por el NaOH).¹² Con el agregado de la solución III, el DNA plasmídico hibridó rápidamente, quedando en solución. En cambio, las proteínas y el DNA genómico precipitaron y se eliminaron en la centrifugación. Se realizaron extracciones con cloroformo-alcohol isoamílico para

concentrar el plásmido puro. La integridad y la pureza del plásmido se evaluaron utilizando un gel de agarosa.

En la **figura 3.9** se puede observar el gel de agarosa de las extracciones de DNA plasmídico de las 6 colonias seleccionadas. 1 y 4 corresponden a los clones de *PaDERA* N-His, 2 y 5 corresponden a los clones de *PaDERA* C49M C-His, y 3 y 6 corresponden a los clones de *LbDERA* C42M E78K C-His. Los duplicados corresponden a extracciones de plásmidos realizadas de distintos lotes.

En la parte superior se observan las bandas correspondientes a las conformaciones del DNA plasmídico: (A) relajado, (B) super-enrollado negativo y (C) super-enrollado positivo. Si bien en todos los casos se observa la extracción del DNA plasmídico, las conformaciones nos dan una idea de cuán eficiente fue la purificación. Siempre se espera obtener una banda más intensa para la conformación (B) la cual es la conformación natural del plásmido.

En las muestras correspondientes a las calles 1, 2 y 3 no se puede distinguir la conformación (B), esto puede deberse a un tratamiento excesivo con la solución II de la miniprep (lisis alcalina) que produjo una mayor cantidad de la conformación (C) haciendo que las bandas se junten sin ser definidas. En las calles 4 y 5 se pueden apreciar las conformaciones (A) y (B) con una intensidad similar. No se observa, a simple vista, la conformación (C). En la calle 6, en cambio, se pueden distinguir las tres conformaciones, siendo la conformación (B) la más intensa.

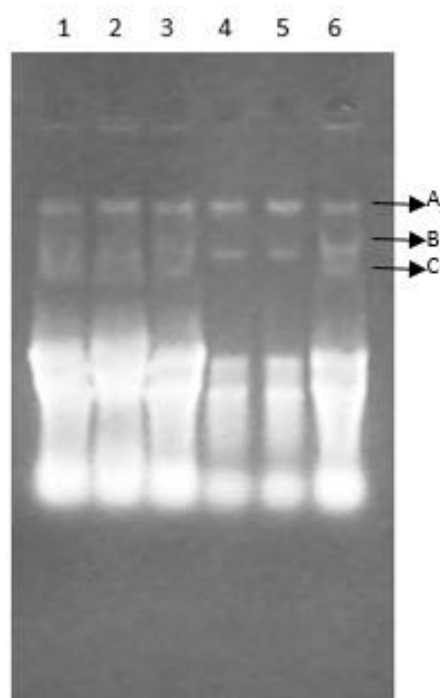


Figura 3. 9: Electroforesis en gel de agarosa 1%, miniprep de las colonias de DH5 α seleccionadas. Calle 1 y 4 corresponden a los clones de *PaDERA* N-His, 2 y 5 corresponden a los clones de *PaDERA* C49M C-His, y 3 y 6 corresponden a los clones de *LbDERA* C42M E78K C-His.

En la parte inferior del gel corre el RNA, que no fue degradado durante el proceso de miniprep debido a que no se utilizó RNAsa en el procedimiento.

Debido a que en las calles 4, 5 y 6 se visualiza mejor el DNA plasmídico, estos tres stocks del plásmido se volvieron a clonar en *Escherichia coli* DH5 α con el fin de obtener el plásmido más puro (**figura 3.10**). La calle 1 corresponde al plásmido de *PaDERA* N-His, en esta calle se observan las conformaciones (B) y (C), siendo la conformación (B) la más abundante. En la calle 2 se observan las tres conformaciones del plásmido de *PaDERA* C49M C-His. Por último, la calle 3 corresponde a *LbDERA* C42M E78K C-His y se pueden visualizar las conformaciones (B) y (C). En la parte inferior del gel se observa nuevamente RNA que no fue eliminado, puesto que no se utilizó RNAsa.

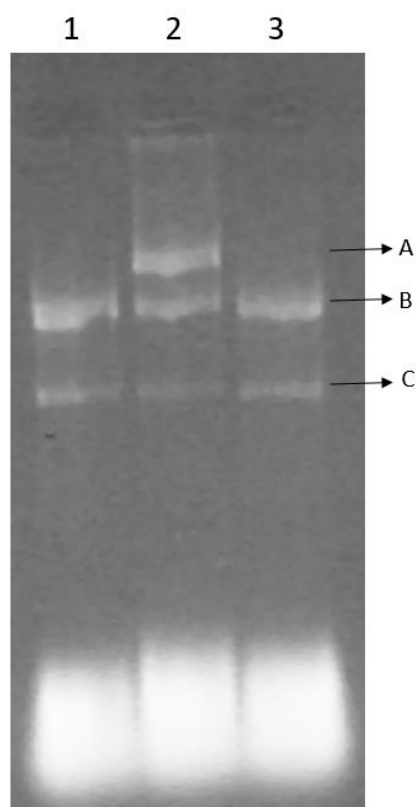


Figura 3. 10: Electroforesis en gel de agarosa 1%, miniprep de las colonias de DH5 α seleccionadas. Calle 1 corresponde al plásmido *Pa*DERA N-His; calle 2 corresponde al plásmido *Pa*DERA C49M C-His; calle 3 corresponde al plásmido *Lb*DERA C42M E78K C-His.

Con estas tres soluciones de plásmidos, se estimó la concentración del DNA plasmídico utilizando un espectrofotómetro Nanodrop y se determinaron las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230. La concentración de DNA se determina a una longitud de onda de 260 nm, mientras que a 280 nm y 230 nm se miden los contaminantes de las muestras (**tabla 3.3**).

Tabla 3. 3: Concentración de los plásmidos obtenidos por miniprep.

Plásmido	Concentración (ng/ μ l)	Abs 260/280	Abs 260/230
<i>Pa</i> DERA N-His	100	1,81	1,73
<i>Pa</i> DERA C49M C-His	48	2,04	1,79
<i>Lb</i> DERA C42M E78K C-His	166	2,01	2,12

La relación de absorbancia 260/230 es cercana o mayor a 1,8; este parámetro nos indica que la pureza del DNA plasmídico es aceptable para realizar las transformaciones.

La relación de absorbancia 260/280 cercano a 2,1 nos indica que el DNA plasmídico se encuentra contaminado con RNA, esto confirma lo visualizado en la parte inferior en el gel de agarosa. Los plásmidos se conservaron a -20°C en agua destilada estéril.

3.3.5. Transformación en *Escherichia coli* BL21 DE3

Con el fin de realizar la expresión de la proteína, cada plásmido se transformó en células competentes químicas de *Escherichia coli* BL21 DE3. La selección de la cepa de expresión se debe a que esta bacteria es deficiente en fosfatasa ácida, dicho fenotipo permite la producción de DR5P sin generar DR como producto de la hidrólisis del grupo fosfato. Todo el proceso de expresión de la enzima se realizó en el marco de una pasantía de investigación en el Laboratorio de Parasitología - Alfredo Lanari, bajo la dirección del Dr. Claudio Pereira. Este laboratorio no cuenta con un equipo electroporador y es por ello que se utilizaron células de *Escherichia coli* BL21 DE3 competentes químicas.

Debido a que las minipreparaciones realizadas contienen RNA, que interfiere en la medición de la concentración de DNA plasmídico, no fue posible calcular el volumen necesario para transformar 10 ng de plásmido (cantidad estándar). Por tal motivo, se utilizaron 5 µl de los plásmidos de mayor concentración (*PaDERA* N-His y *LbDERA* C42M E78K C-His) y 10 µl del plásmido de menor concentración (*PaDERA* C49M C-His) para transformar *Escherichia coli* BL21 DE3. La transformación se realizó mediante cambios bruscos de temperatura que desestabilizan la membrana celular y permiten el ingreso del DNA al citoplasma a través de los poros formados.¹³

Al igual que lo mencionado para *Escherichia coli* DH5α, sólo las células que incorporaron el plásmido pudieron crecer en presencia de kanamicina. Se seleccionó una colonia aislada de cada una de las variantes de DERA y se crecieron hasta saturación. Se prepararon los stocks de guardado y de trabajo en glicerol y se conservaron a -80°C.

3.3.6. Expresión de PaDERA N-His

Para ser utilizadas como biocatalizadores, las células de *Escherichia coli* BL21 DE3 que contienen el plásmido debieron ser inducidas para expresar la enzima. En el caso del vector pET- 28a+, el gen deoC esta clonado bajo el promotor del fago T7 inducible por IPTG (**figura 3.11**).



Figura 3. 11: Plásmido pET-28a+

Escherichia coli BL21 DE3 posee en su genoma el gen que codifica para la ARN polimerasa T7, necesaria para la transcripción de los genes clonados en el plásmido. El gen LacI, contenido en el plásmido, se traduce produciendo un represor que bloquea la unión de la ARN polimerasa T7 al promotor. Si esto ocurre, no se inicia la transcripción del gen clonado y no hay producción de la enzima (**figura 3.12**). Caso contrario, al agregar IPTG, LacI no puede unirse al sitio de unión de la ARN polimerasa T7, por lo tanto, se produce la transcripción del gen clonado y su posterior traducción (**figura 3.13**).

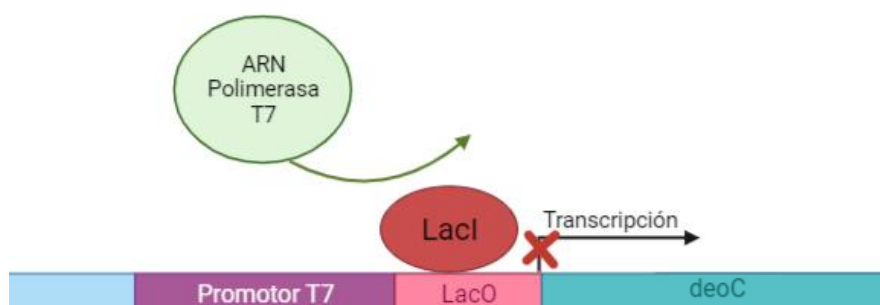


Figura 3. 12: Inhibición de la transcripción por ARN polimerasa en ausencia de IPTG.

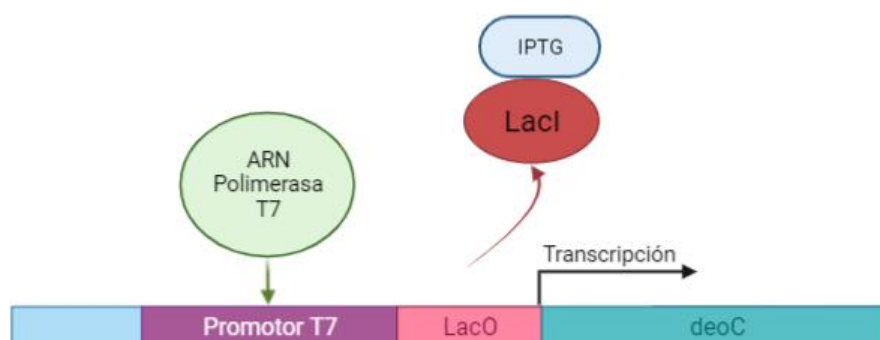


Figura 3. 13: Transcripción del gen deoC en presencia de IPTG.

Con el fin de obtener la máxima expresión de la enzima, se evaluó la influencia de la concentración del inductor. Las concentraciones de IPTG testeadas fueron 50 mM, 100 mM, 400mM y 1 M, esperando obtener un resultado que beneficie en tiempo y costo la producción de la enzima. El cultivo bacteriano se hizo crecer hasta la fase exponencial ($DO_{600}=0,5$; 3 hs) (**figura 3.14**), momento en que se agregó el inductor. El cultivo se dejó ON a 28°C.

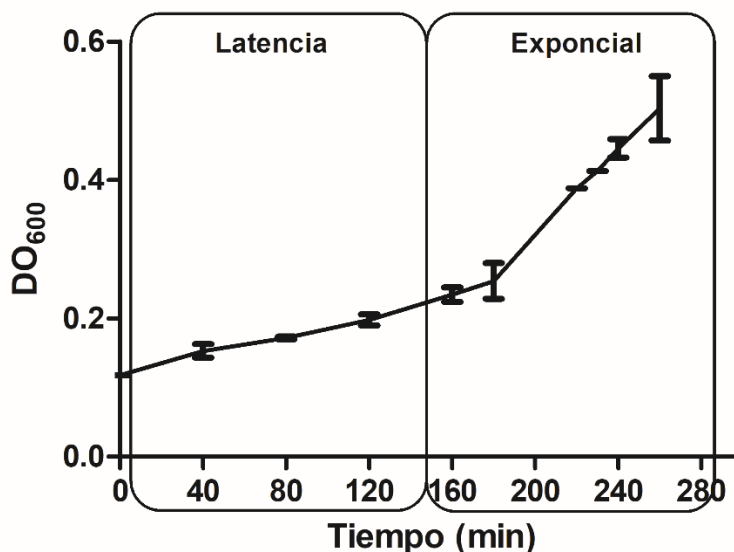


Figura 3. 14: Curva de crecimiento de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His

Con el fin de analizar la expresión de la enzima a dichas concentraciones, se sometió a la bacteria a lisis celular por sonicación, un método de lisis físico muy utilizado. Se empleó una concentración 30% pellet bacteriano/ml de buffer fosfato (30% p/v), con 5 ciclos de 10 segundos de sonicación, con una potencia de 50% y 30 segundos de pausa entre cada ciclo. Luego de centrifugar, el pellet bacteriano - que contenía todos los restos celulares - se descartó y el sobrenadante con las proteínas solubles se conservó como extracto libre de células (ELC).

Como mencionamos anteriormente, DERA está clonada bajo el control de un promotor inducible por IPTG, al agregar este inductor se produce la proteína de interés a gran nivel. Sin embargo, el resto de las proteínas - que no están bajo el control del promotor inducible - no se ven afectadas por el agregado IPTG. Por tal motivo, la concentración de ELC resulta proporcional a la cantidad de enzima producida. El cálculo se realizó midiendo la concentración de proteínas totales en el ELC de PaDERA N-His, utilizando el reactivo de Bradford, frente a una curva de calibración de BSA como proteína patrón. Los resultados se pueden observar en el gráfico de la **figura 3.15**.

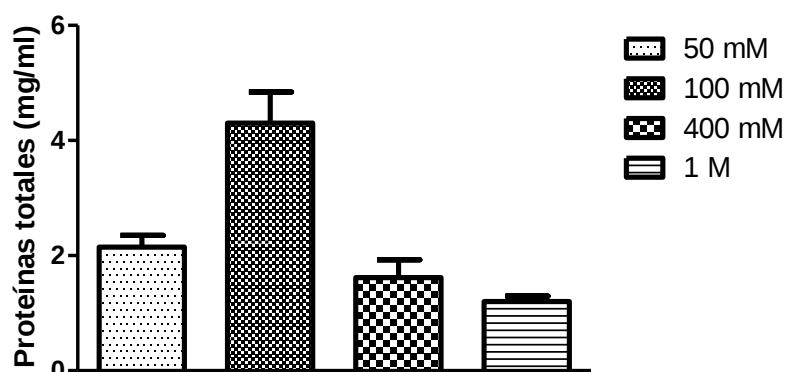


Figura 3. 15: Concentración de proteínas totales de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-HIS producidas a distinta concentración de IPTG.

Cuando se emplearon 100 mM de IPTG, la concentración de proteínas obtenida fue la mayor entre todas las condiciones ensayadas. Por otra parte, utilizando concentraciones de 50 mM, 400 mM y 1 M de IPTG la concentración fue menor, pero la causa de la disminución no es la misma para estas tres condiciones. Una concentración de 50 mM de IPTG, parece no ser suficiente para inducir a la proteína y así obtener una concentración alta de la misma. Sin embargo, al inducir con 400 mM y 1 M de IPTG la disminución en la cantidad de proteína obtenida está relacionada con la generación de cuerpos de inclusión. Estas estructuras son insolubles en solución y, por lo tanto, no medibles con la metodología de Bradford.¹⁴ El ELC obtenido de PaDERA N-His se conservó para realizar la purificación de la enzima.

Para confirmar la expresión, se llevó a cabo un SDS-Page de ambas variantes, comparando su peso con un marcador de peso molecular (estándar). Como se puede observar en la **figura 3.16**, la cantidad de DERA obtenida fue mucho mayor que para su variante *wild-type*.

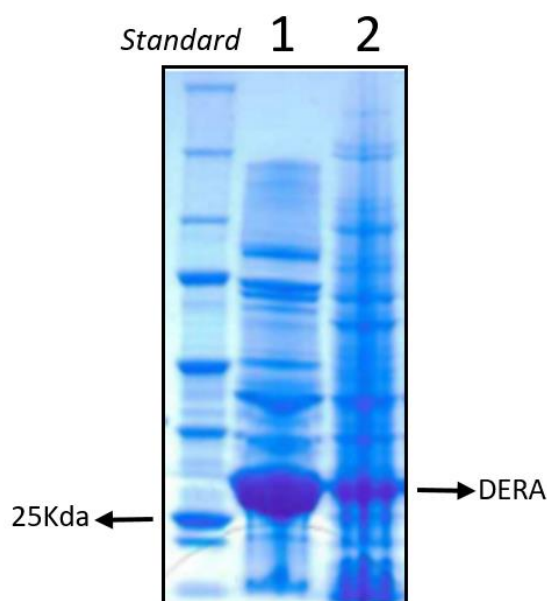


Figura 3. 16: SDS-PAGE 15% 1. ELC de *PaDERA* N-His, 2. ELC *PaDERA* wt.

3.3.7. Expresión de *PaDERA* C49M C-His y *LbDERA* C42M E78K C-His

Las condiciones de inducción de las otras variantes de DERA (*PaDERA* C49M C-His y *LbDERA* C42M E78K C-His) ya habían sido puestas a punto por el grupo colaborador. Se realizó un preinóculo de cada bacteria que, posteriormente, fue utilizado para inocular un medio LB-Kana de mayor volumen. A este último, se lo hizo crecer hasta la fase exponencial ($DO_{600}=0,5$; 3 h). Se indujeron los cultivos con 100 mM de IPTG y se dejaron ON a 28°C. Empleando la metodología descrita en el ítem anterior se obtuvieron los correspondientes ELCs.

3.3.8. Purificación de *PaDERA* N-His

Se utilizó la enzima *PaDERA* N-His con el fin de poner a punto el procedimiento de purificación de las diferentes variantes de DERA. Se analizaron dos procedimientos: columna empaquetada de IMAC- Ni^{+2} y resina Ni^{+2} -Sefarosa en batch. La elección de estas metodologías se basó en la afinidad que presenta la extensión terminal de histidinas por los iones metálicos.¹⁵

Inicialmente, se realizó la purificación de la proteína en batch. La resina de Ni^{+2} -Sefarosa se incubó con el ELC durante 1 h a 4°C . Las proteínas que contienen el Tag de histidina presentan afinidad por los iones Ni^{+2} de la resina, por lo cual quedan retenidas. El resto de las proteínas no tienen afinidad por la resina y se eliminan progresivamente en cada uno de los lavados con solución de imidazol. Se utilizaron soluciones de imidazol de 0 a 500 mM (**figura 3.17**). El grupo colaborador reportó la elución de la proteína en las fracciones de 250 mM y 500 mM, es por esto que fracciones correspondientes a esta concentración de imidazol se colectaron y su concentración proteica se midió por Bradford. Debido a que el imidazol puede interferir en la actividad de la enzima,¹⁶ las fracciones enriquecidas fueron concentradas y luego desaladas utilizando una columna de exclusión molecular. Se obtuvieron 500 μL de enzima pura con una concentración de 0,66 mg/ml. Esta solución se reservó para determinar su actividad.

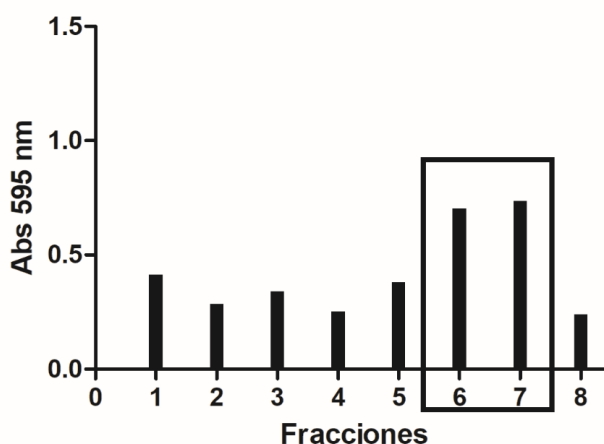


Figura 3. 17: Fracciones de proteínas colectadas en la purificación en batch de *PaDERA* N-His.

En el segundo procedimiento se llevó a cabo la purificación de *PaDERA* N-His utilizando una columna empaquetada IMAC- Ni^{+2} . 40 mg de proteínas totales en solución se sembraron en una columna de 1 ml de capacidad. Las proteínas que contienen el Tag de histidina presentan afinidad por los iones de Ni^{+2} de la columna, por lo cual quedan retenidas. El resto de las proteínas no se retienen en la columna y se eluyen

fácilmente en las primeras fracciones. Se utilizó un gradiente de imidazol de 0 mM a 500 mM para eluir las proteínas que quedaron retenidas en la columna. Todas las fracciones del eluido se colectaron y analizaron por Bradford (**figura 3.18**). Las fracciones correspondientes a 250 mM y 500 mM de imidazol - las cuales también fueron las de mayor concentración proteica - fueron concentradas y luego desaladas utilizando una columna de exclusión molecular. Se recuperaron 300 μ L de enzima pura con una concentración de 1,28 mg/ml. Esta solución se reservó para determinar su actividad.

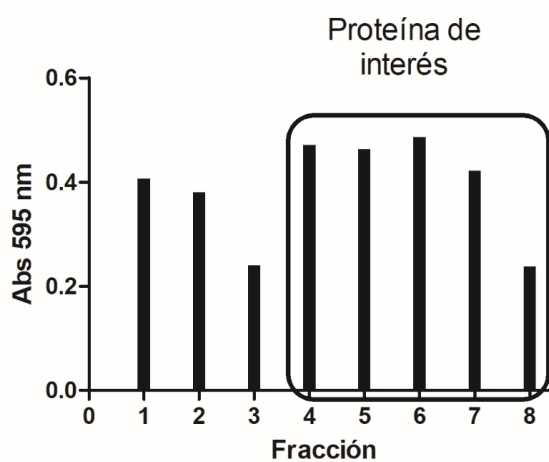


Figura 3. 18: Fracciones de proteínas colectadas en la purificación en columna de *PaDERA* N-His.

3.3.9. Actividad de *PaDERA* N-His

La determinación de la actividad de *PaDERA* N-His – purificada en batch o en columna - se realizó utilizando un método basado en la hidrólisis de DR5P, su sustrato natural. Este método se encuentra ampliamente descrito en bibliografía.^{9,17,18}

Como se puede observar en la **figura 3.19**, DR5P se hidroliza por acción de DERA generando G3P y acetaldehído. Posteriormente, la enzima triosafosfato isomerasa (TPI) convierte G3P en DHAP y como un último paso, la enzima glicerol fosfato deshidrogenasa (α -GDH) reduce la DHAP formada para producir glicerol fosfato, utilizando como cofactor NADH, el cual se oxida a NAD⁺. La cantidad de moles de NADH que se utilizan en esta reacción es equivalente a la cantidad de moles de DR5P consumidos por DERA.

Como NADH tiene un máximo de absorbancia a 340 nm, mientras que NAD⁺ no absorbe a esa longitud de onda, midiendo espectrofotométricamente el descenso de la absorbancia a 340 nm fue posible determinar la actividad de la enzima. Se graficaron los puntos de absorbancia vs tiempo (**figura 3.20a**) y, midiendo por un minuto desde el agregado de la GDH/TPI, se obtuvo la velocidad inicial (Vi) como la pendiente del gráfico (**figura 3.20b**).

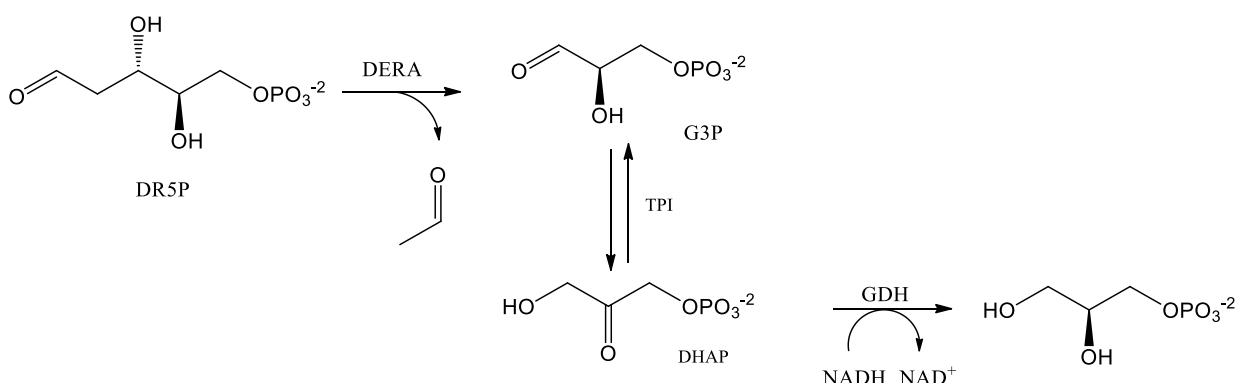


Figura 3. 19: método colorimétrico acoplado a la oxidación de NADH.

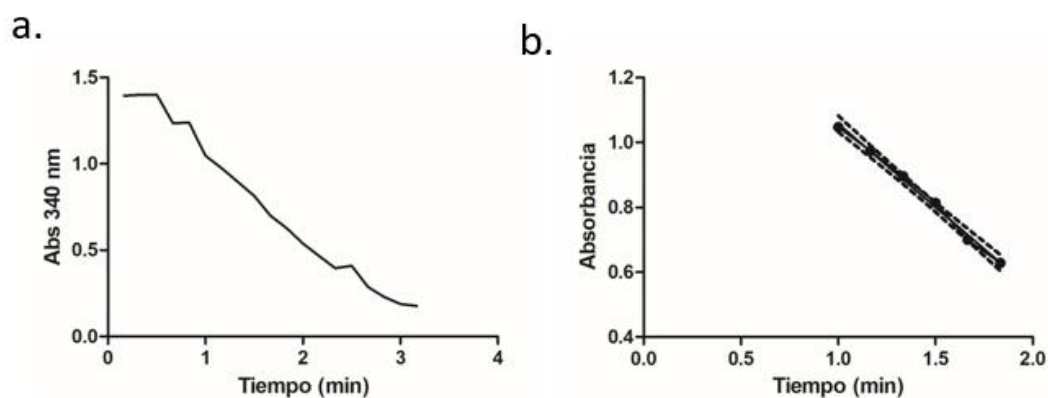


Figura 3. 20: Gráfico de absorbancia vs tiempo para la determinación de la Vi de PaDERA N-His.

A partir de la Vi obtenida, sabiendo el coeficiente de extinción molar de NADH y teniendo en cuenta las diluciones correspondientes, se determinó la actividad específica

de DERA como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1 μmol de DR5P por minuto.

La ecuación utilizada fue la siguiente:

$$Actividad = \frac{vi \left(\frac{abs}{min} \right) \times vol (ml)}{\epsilon_{340nm} \text{ NADH } (M^{-1}cm^{-1}) \times b (cm) \times Proteína (mg)}$$

Donde:

- Vi = velocidad inicial de PaDERA N-His
- Vol = volumen del ensayo
- ϵ_{340nm} NADH = $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- b = camino óptico
- Proteína = cantidad de proteína utilizada

La actividad retroaldólica de PaDERA N-His purificada en batch dio como resultado 9,3 U/mg. Sin embargo, al determinar la actividad enzimática a un día de almacenamiento a 4°C el resultado fue nulo. La estabilidad operacional de la enzima nos limitó a utilizar la enzima recién purificada.

Adicionalmente, la actividad retroaldólica de PaDERA N-His purificada en columna también fue nula. Esto podría estar relacionado con el mayor tiempo que pasa la proteína en contacto con la fase sólida en este sistema, aumentando la posibilidad de interacciones desnaturalizantes.

3.3.10. Purificación de las proteínas PaDERA C49M C-His y LbDERA C42M E78K C-His

Debido a los resultados obtenidos purificando PaDERA N-His con columna empaquetada, se decidió continuar con la purificación de las otras enzimas utilizando el sistema en batch y un gradiente de imidazol de 0 mM a 500 mM.

3.3.10.1. Purificación y actividad de *PaDERA* C49M C-His

El ELC que contenía *PaDERA* C49M C-His se incubó con la resina de Ni²⁺-Sefarosa durante 1 h a 4°C y, posteriormente, se realizaron lavados con soluciones de imidazol (0 mM a 500 mM). Se seleccionaron nuevamente las fracciones correspondientes a 250 mM y 500 mM (**figura 3.21**). Luego del desalado se obtuvieron 500 µL de enzima pura con una concentración de 0,98 mg/ml, un 50% más que la concentración de *PaDERA* N-His.

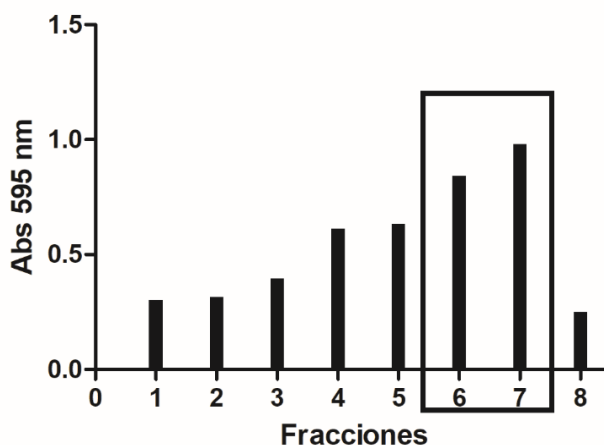


Figura 3. 21: Fracciones obtenidas de la purificación en Batch de *PaDERA* C49M C-His

Las fracciones proteicas de *PaDERA* N-His y de *PaDERA* C49M C-His fueron sembradas en un SDS-Page (**figura 3.22**), la calle 1 corresponde a *PaDERA* C49M C-His y la calle 2 a *PaDERA* N-His. Tanto en la calle 1 como en la calle 2 se puede observar una única banda con un peso molecular mayor a 25 KDa. Debido a que el peso molecular de DERA es de 28,8 KDa, podemos inferir que estas bandas corresponden a la proteína pura. A su vez, la diferencia de intensidad entre la calle 1 y la calle 2, nos confirma la diferencia de concentración entre estas dos enzimas.

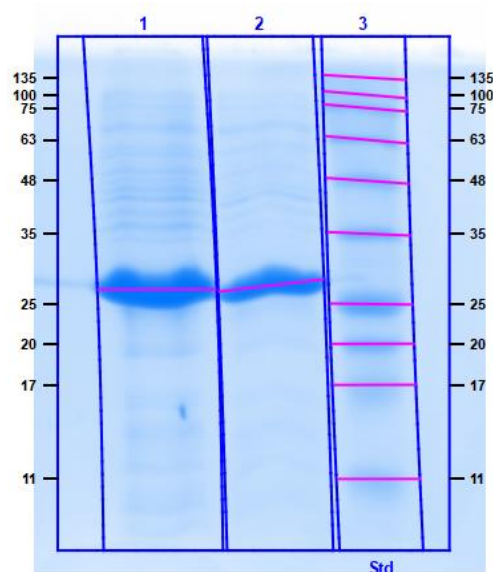


Figura 3. 22: Gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). Calle 1: *PaDERA* C49M C-His; calle 2: *PaDERA* N-His; calle 3: marcador de peso molecular.

La actividad enzimática nuevamente fue determinada por el método de hidrólisis de DR5P. Se determinó la V_i como la pendiente del gráfico de absorbancia a 340 nm vs tiempo (figura 3.23).

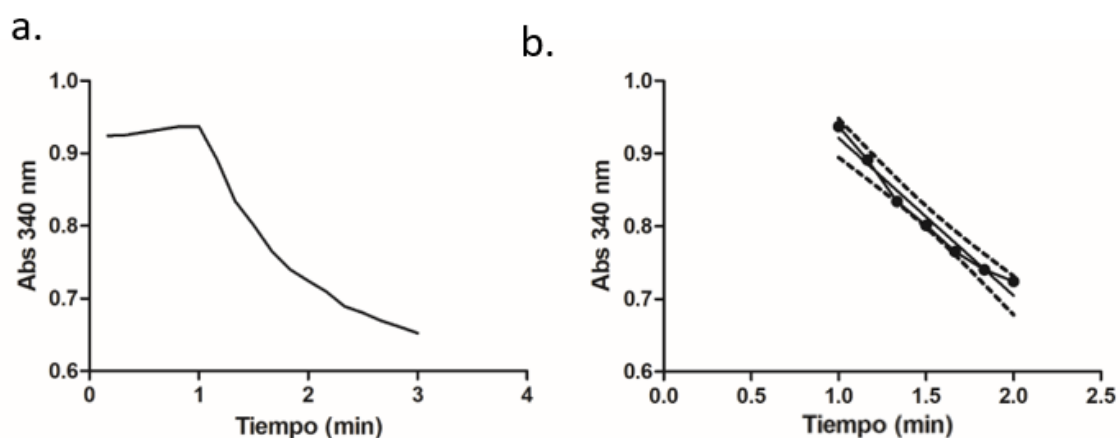


Figura 3. 23: Gráfico de absorbancia vs tiempo para la determinación de la V_i de *PaDERA* C49M C-His .

A partir de la Vi obtenida, sabiendo el coeficiente de extinción molar de NADH y teniendo en cuenta las diluciones correspondientes, se determinó la actividad enzimática de *PaDERA* C49M C-His dando como resultado una actividad de 28,9 U/mg. Al determinar la actividad enzimática a un día de almacenamiento a 4°C, si bien no decayó completamente, disminuyó a 17,19 U/mg. Este resultado indica que, al igual que para *PaDERA* N-His, la enzima debe ser utilizada en el momento.

Podemos observar entonces que, tanto la actividad como la concentración de la enzima aumentan cuando el Tag de histidina se encuentra en el C-terminal respecto al clon que posee el Tag de histidina en N-terminal. Si bien *PaDERA* C49M C-His posee una mutación en la posición 49, este cambio sólo está comprometido en la reacción de síntesis –donde se agregan concentraciones elevadas de acetaldehído- y no en la reacción retroaldólica con la que se mide la actividad, por lo que la modificación del residuo C-terminal sería la causa del aumento de la actividad. Este resultado está en concordancia con lo observado para DERAs como las de *Escherichia coli* y *Rhodococcus erythropolis* entre otras.^{1,19} El efecto de la localización del Tag de histidina ha sido reportado para otras enzimas, pero con un efecto contrario.^{20–22}

3.3.10.2. Purificación y actividad de *LbDERA* C42M E78K C-His

Empleando el mismo procedimiento con el ELC que contenía *LbDERA* C42M E78K C-His, luego del tratamiento con la resina y el desalado se obtuvieron 500 µL de enzima pura con una concentración de 0.64 mg/ml (**figura 3.24**). La concentración de proteínas obtenida fue aproximadamente la misma cantidad que la obtenida para *PaDERA* N-His.

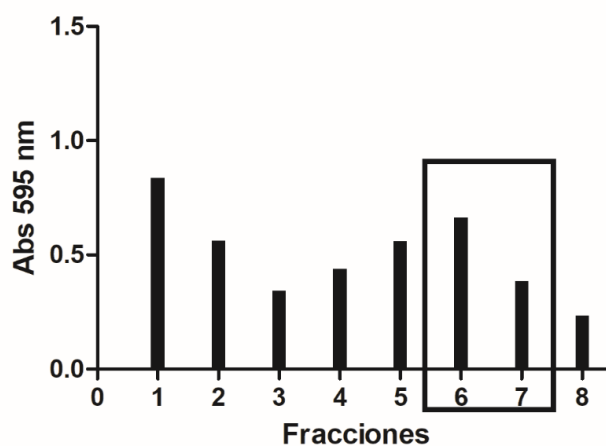


Figura 3. 24: Fracciones obtenidas de la purificación en batch de *LbDERA* C42M E78K C-His.

Se determinó la Vi como la pendiente del gráfico de absorbancia a 340 nm vs tiempo (figura 3.25). Igual que antes, a partir de la Vi obtenida, sabiendo el coeficiente de extinción molar de NADH y teniendo en cuenta las diluciones correspondientes, se determinó la actividad enzimática de *LbDERA* C42M E78K C-His dando como resultado una actividad de 8,11 U/mg.

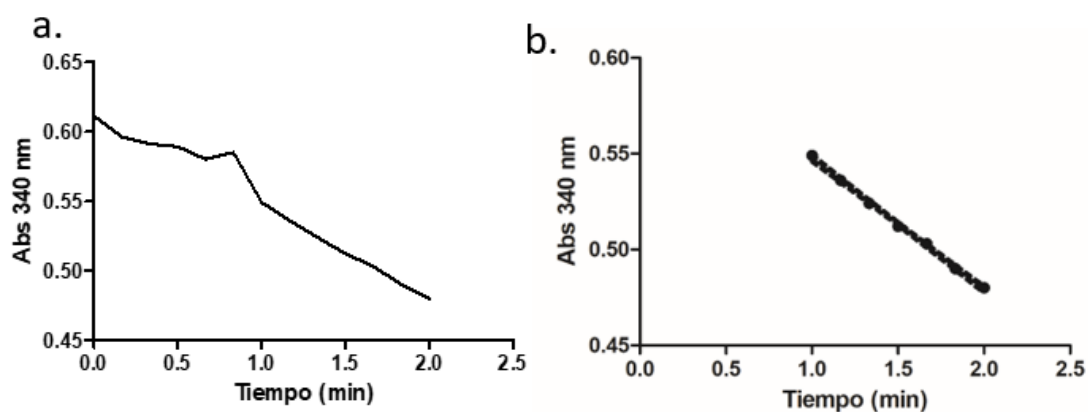


Figura 3. 25: Gráfico de absorbancia vs tiempo para la determinación de la Vi de *LbDERA* C42M E78K C-His.

Si bien la actividad enzimática determinada para *LbDERA* C42M E78K C-His resultó ser más baja que la actividad de las otras variantes (*PaDERA* N-His, *PaDERA* C49M C-His, *PaDERA* C-His y *PaDERA* AA C-His, las últimas dos caracterizadas por el grupo colaborador,²³ su actividad solo disminuyó en un 20% al cabo de un día de almacenamiento (6,65 U/mg). Dicho resultado puede atribuirse a la estabilidad que le confiere la mutación en la posición 78 de la proteína.

En la **tabla 3.4** se puede observar la concentración y la actividad retroaldólica de las proteínas *PaDERA* N-His, *PaDERA* C-His, *PaDERA* AA C-His, *PaDERA* C49M C-His y *LbDERA* C42M E78K C-His, así como también de DERAs aisladas de otros microorganismos. Si bien la actividad específica de las DERAs caracterizadas en este capítulo resultó menor que algunas de las reportadas en bibliografía, estudios previos demuestran que la actividad de clivaje de DR5P puede no estar vinculada con la actividad de síntesis, especialmente al utilizar sustratos no naturales, como los que se plantearon para este trabajo doctoral.

Kim y colaboradores han sobre-expresado una DERA de *Yersinia Sp* cuya actividad es 137 U/mg, aproximadamente 4 veces más activa que *PaDERA* C49M C-His. Sin embargo, cuando esta enzima se empleó como biocatalizador en la síntesis de DR5P a partir de G3P y 200 mM de acetaldehído, el rendimiento fue de 2% aproximadamente.²⁴ Dicho resultado también se observó para DERA de *Paenibacillus Sp* cuya actividad específica fue de 62 U/mg, pero el rendimiento para la síntesis de DR5P fue menor al 2%.¹⁸

Sakuraba y colaboradores caracterizaron otras DERAs pertenecientes a *Thermotoga maritima*²⁵ y *Pyrobaculum aerophilum*.²⁶ Si bien la actividad específica de las enzimas fue baja (1 U/mg y 0.25U/mg, respectivamente), cuando se utilizaron como biocatalizadores en la adición aldólica de acetaldehído como único sustrato, se obtuvo 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexosa como producto con buenos rendimientos.

Podemos evidenciar que, a pesar de evaluar la actividad específica de cada una de las DERAs, este parámetro no caracteriza del todo a la enzima. Por esta razón, es necesario evaluar la capacidad sintética de las nuevas DERAs. El desafío más importante se centra en obtener una DERA estable en concentraciones elevadas de

acetaldehído, así como también en condiciones operacionales aplicables a la producción a gran escala.

Tabla 3. 4: Características de DERAs aisladas de distintos microorganismos. ne= no especificada

Fuente de DERA	Peso molecular (kDa)	Actividad específica (U/mg)	Concentración de proteínas (mg/ml)	Referencia
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> (PaDERA N-His)	28,8	9,3	0,66	Este trabajo
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> (PaDERA C-His)	28,8	13,0	2,9	23
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> (PaDERA AA C-His)	28,8	13,7	1,44	23
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> (PaDERA C49M C-His)	28,8	28,9	0,98	Este trabajo
<i>Lactobacillus brevis</i> (LbDERA C42M E78K C-His)	29	8,11	0,68	Este trabajo
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	24,5	0,25	n.e.	25
<i>Termotoga maritima</i>	27,8	1	n.e.	25
<i>Escherichia coli</i>	28	58	n.e.	25
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	22,9	17	n.e.	19
<i>Escherichia coli</i>	n.e.	16	n.e.	19
<i>Yersinia Sp.</i>	24,8	137	1,4	24
<i>Paenibacillus Sp.</i>	24,5	62	4,8	18
<i>Haemophilus influenzae</i>	23,6	34,1	20,8	27
<i>Hyperthermus butylicus</i>	26,4	0,5	n.e.	28
<i>Aeropyrum pernix</i>	24,5	4,4	n.e.	26
<i>Staphylococcus epidermis</i> (wild type)	29,2	67,1	n.e.	29
<i>Staphylococcus epidermis</i> (T120C, G174I, G213C)	29,2	32,3	n.e.	29

3.4 Conclusiones

En este primer capítulo, los plásmidos de distintas variantes de DERA (*PaDERA* N-His, *PaDERA* C-His, *PaDERA* AA C-His, *PaDERA* C49M C-His y *LbDERA* C42M E78K C-His) se transformaron en *Escherichia coli* DH5 α (cepa de clonado) y posteriormente en *Escherichia coli* BL21 DE3 (cepa de expresión). Debido a que los plásmidos codifican para el Tag de histidina, la proteína se purificó por afinidad a los iones de Ni⁺². Siendo que el Tag de histidina puede estar localizado en el extremo C-terminal o en el N-Terminal de la proteína, fue conveniente evaluar ambas posibilidades puesto que la determinación de la posición dependía de no generar un efecto negativo en la actividad catalítica y en el rendimiento de la purificación.³⁰ Las modificaciones genéticas realizadas a DERA fueron en pos de aumentarle la estabilidad y la resistencia a acetaldehído.

En una primera instancia, como las condiciones de expresión de la enzima *PaDERA* N-His no estaban puestas punto, se procedió a seleccionar la mejor condición de inducción. Agregando 100 mM de IPTG a 28 °C se obtuvo la mayor concentración de proteínas totales y, por lo tanto, una mayor expresión de la enzima. En cuanto a la purificación de *PaDERA* N-His se pudo determinar que al utilizar una columna empaquetada IMAC-Ni⁺² la enzima pierde su actividad, por lo que se procedió a utilizar una resina de Ni-Sefarosa en batch. Se obtuvo una concentración de 0,66 mg/ml de enzima para un cultivo de 200 ml con una actividad de 9,3 U/mg.

Empleando un procedimiento similar con las restantes enzimas, se observó que *PaDERA* C49M C-His resultó ser la variante de DERA que expresó mayor cantidad de enzima y con mayor actividad (0,98 mg/ml y 28,9 U/mg, respectivamente). En particular, esta enzima se expresó en un 50% más que las otras dos variantes analizadas y es, aproximadamente, 2 veces más activa que *PaDERA* N-His y 4 veces más activa que *LbDERA* C42M E78K C-His. Adicionalmente, comparando la actividad de *PaDERA* C-His y *PaDERA* AA C-His, se pudo comprobar que la incorporación de 5 aminoácidos en la proteína no afecta negativamente, sino que la mejora levemente.

Tres de las variantes caracterizadas se utilizarán como fuente de DERA en el resto de la tesis: *PaDERA* N-His, *PaDERA* C49M C-His y *LbDERA* C42M E78K C-His).

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

3.5 Referencias bibliográficas

1. Dick, M., Hartmann, R., Weiergräber, O.H., Bisterfeld, C., Classen, T., Schwarten, M., Neudecker, P., Willbold, D., and Pietruszka, J. (2016). Mechanism-based inhibition of an aldolase at high concentrations of its natural substrate acetaldehyde: Structural insights and protective strategies. *Chem. Sci.* 7, 4492–4502.
2. Chambre, D., Guérard-Hélaine, C., Darii, E., Mariage, A., Petit, J.L., Salanoubat, M., De Berardinis, V., Lemaire, M., and Hélaine, V. (2019). 2-Deoxyribose-5-phosphate aldolase, a remarkably tolerant aldolase towards nucleophile substrates. *Chem. Commun.* 55, 7498–7501.
3. Valino, A.L., Palazzolo, M.A., Iribarren, A.M., and Lewkowicz, E. (2012). Selection of a new whole cell biocatalyst for the synthesis of 2-deoxyribose 5-phosphate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 300–308.
4. Cuesta, A., Vila, M., Molina-Marquez, A., Carbajo, C., Lebron, J.A., López-López, M., López-Cornejo, P., Moyá, M.L., López-Sanmartín, M., López, J.R., et al. (2021). Influence of adding terminal tags on the structural and antimicrobial properties of the peptide caerin 1.1. *Aquaculture* 532, 736035.
5. Ledent, P., Duez, C., Vanhove, M., Lejeune, A., Fonzé, E., Charlier, P., Rhazi-Filali, F., Thamm, I., Guillaume, G., Samyn, B., et al. (1997). Unexpected influence of a C-terminal-fused His-tag on the processing of an enzyme and on the kinetic and folding parameters. *FEBS Lett.* 413, 194–196.
6. Zimmerling, J., Oelschlägel, M., Großmann, C., Voitel, M., Schlömann, M., and Tischler, D. (2021). Biochemical Characterization of Phenylacetaldehyde Dehydrogenases from Styrene-degrading Soil Bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 193, 650–667.
7. Tham, H.Y., Song, A.A.L., Yusoff, K., and Tan, G.H. (2020). Effect of different cloning strategies in pet-28a on solubility and functionality of a staphylococcal phage endolysin. *Biotechniques* 69, 161–170.
8. Eschenfeldt, W.H., Maltseva, N., Stols, L., Donnelly, M.I., Gu, M., Nocek, B., Tan, K., Kim, Y., and Joachimiak, A. (2010). Cleavable C-terminal His-tag vectors for structure determination. *J. Struct. Funct. Genomics* 11, 31–39.
9. Jiao, X.C., Pan, J., Xu, G.C., Kong, X.D., Chen, Q., Zhang, Z.J., and Xu, J.H. (2015). Efficient synthesis of a statin precursor in high space-time yield by a new aldehyde-tolerant aldolase identified from *Lactobacillus brevis*. *Catal. Sci. Technol.* 5, 4048–4054.
10. Borman, A., Linton, C., Miles, S.J., Campbell, C., and Johnson, E. (2006). Ultra-rapid preparation of total genomic DNA from isolates of yeast and mould using Whatman FTA filter paper technology - A reusable DNA archiving system. *Med. Mycol.* 44, 389–398.
11. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd Editio.
12. Engebrecht, J., Brent, R., and Kaderbhai, M.A. (1991). *Minipreps of Plasmid DNA*

- . Curr. Protoc. Mol. Biol. *15*, 1–10.
13. Chan, J., Davis, C., and Jokic, I. (2006). Influences of growth temperature and preparation of competent cells on efficiency of chemically-induced transformation in *Escherichia coli* DH5 α . *J. Exp. Microbiol. Immunol* *9*, 92–96.
 14. Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A.K., Singh, S.M., and Panda, A.K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb. Cell Fact.* *14*, 1–10.
 15. Spriestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H., and Maertens, B. (2015). Purification of His-Tagged Proteins. *Methods Enzymol.* *559*, 1–15.
 16. Bornhorst, J., and Falke, J. (2004). Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. In *Methods in Enzymology*, pp. 446–453.
 17. Kim, T., Stogios, P.J., Khusnutdinova, A.N., Nemr, K., Skarina, T., Flick, R., Joo, J.C., Mahadevan, R., Savchenko, A., and Yakunin, A.F. (2020). Rational engineering of 2-deoxyribose-5-phosphate aldolases for the biosynthesis of (R)-1,3-butanediol. *J. Biol. Chem.* *295*, 597–609.
 18. Kim, Y.M., Choi, N.S., Kim, Y.O., Son, D.H., Chang, Y.H., Song, J.J., and Kim, J.S. (2010). Expression and characterization of a novel deoxyribose 5-phosphate aldolase from *Paenibacillus* sp. EA001. *J. Microbiol. Biotechnol.* *20*, 995–1000.
 19. Kullartz, I., and Pietruszka, J. (2012). Cloning and characterisation of a new 2-deoxy-d-ribose-5-phosphate aldolase from *Rhodococcus erythropolis*. *J. Biotechnol.* *161*, 174–180.
 20. Guo, F.M., Wu, J.P., Yang, L.R., and Xu, G. (2015). Soluble and functional expression of a recombinant enantioselective amidase from *Klebsiella oxytoca* KCTC 1686 in *Escherichia coli* and its biochemical characterization. *Process Biochem.* *50*, 1264–1271.
 21. Yeon, Y.J., Park, H.J., Park, H.Y., and Yoo, Y.J. (2014). Effect of His-tag location on the catalytic activity of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* *19*, 798–802.
 22. Sabaty, M., Grosse, S., Adryanczyk, G., Boiry, S., Biaso, F., Arnoux, P., and Pignol, D. (2013). Detrimental effect of the 6 His C-terminal tag on YedY enzymatic activity and influence of the TAT signal sequence on YedY synthesis. *BMC Biochem.* *14*, 1–12.
 23. Haridas, M., Bisterfeld, C., Chen, L.M., Marsden, S.R., Tonin, F., Médici, R., Iribarren, A., Lewkowicz, E., Hagedoorn, P.-L., Hanefeld, U., et al. (2020). Discovery and Engineering of an Aldehyde Tolerant 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate Aldolase (DERA) from *Pectobacterium atrosepticum*. *Catalysts* *10*, 883.
 24. Kim, Y.M., Chang, Y.H., Choi, N.S., Kim, Y.O., Song, J.J., and Kim, J.S. (2009). Cloning, expression, and characterization of a new deoxyribose 5-phosphate aldolase from *Yersinia* sp. EA015. *Protein Expr. Purif.* *68*, 196–200.
 25. Sakuraba, H., Yoneda, K., Yoshihara, K., Satoh, K., Kawakami, R., Uto, Y., Tsuge, H., Takahashi, K., Hori, H., and Ohshima, T. (2007). Sequential aldol

- condensation catalyzed by hyperthermophilic 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7427–7434.
26. Sakuraba, H., Tsuge, H., Shimoya, I., Kawakami, R., Goda, S., Kawarabayashi, Y., Katunuma, N., Ago, H., Miyano, M., and Ohshima, T. (2003). The first crystal structure of Archaeal aldolase. Unique tetrameric structure of 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase from the hyperthermophilic Archaea *Aeropyrum pernix*. *J. Biol. Chem.* 278, 10799–10806.
 27. Woo, M.H., Kim, M.S., Chung, N., and Kim, J.S. (2014). Expression and characterization of a novel 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase from *Haemophilus influenzae* Rd KW20. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 57, 655–660.
 28. Wang, Q., Chen, R., Du, P., Wu, H., Pei, X., Yang, B., Yang, L., Huang, L., Liu, J., and Xie, T. (2010). Cloning and characterization of thermostable-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase from *Hyperthermus butylicus*. *African J. Biotechnol.* 9, 2898–2905.
 29. Fei, H., Xu, G., Wu, J.P., and Yang, L.R. (2015). Improving the acetaldehyde tolerance of DERASEP by enhancing the rigidity of its protein structure. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 116, 148–152.
 30. Dickson, J.M.J., Lee, W.J., Shepherd, P.R., and Buchanan, C.M. (2013). Enzyme activity effects of N-terminal His-tag attached to catalytic sub-unit of phosphoinositide-3-kinase. *Biosci. Rep.* 33, 857–863.

(esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

Capítulo 4

Síntesis biocatalizada de 2-desoxirribosa 5-fosfato

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

4.1. Introducción

Los nucleósidos naturales están involucrados en numerosos procesos biológicos. En particular, son componentes esenciales de la síntesis de ADN y ARN. Debido a esto, se pueden diseñar modificaciones en su estructura produciendo análogos que mimeticen a los nucleósidos naturales y bloqueen el metabolismo de patógenos.¹ Actualmente, hay más de 30 análogos de nucleósidos aprobados para el tratamiento de virus, cáncer, parásitos, así como infecciones bacterianas y fúngicas (**figura 4.1**).² Por ejemplo, el uso de Gemcitabina, un potente antiviral, fue aprobado también para el tratamiento de cáncer de mama y ovario entre otros.³

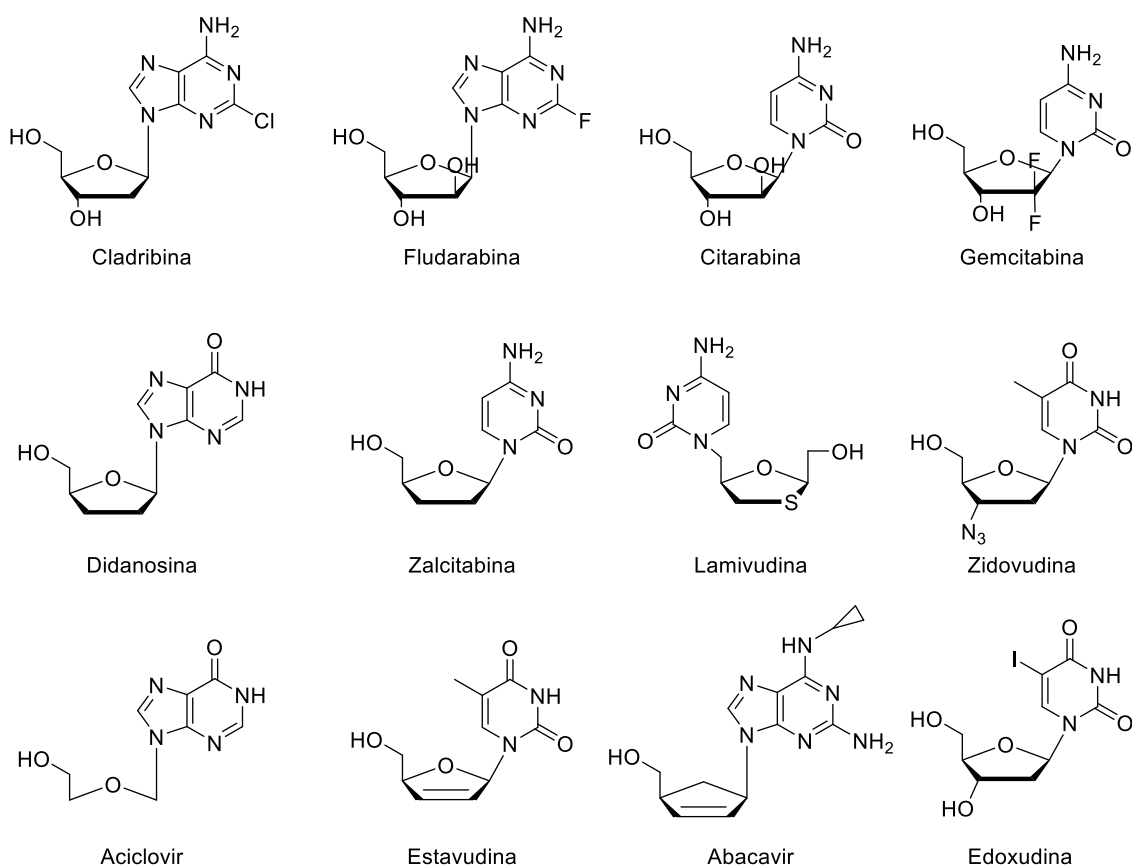


Figura 4. 1: Ejemplos de análogos de nucleósidos utilizados en la industria farmacéutica.

A diferencia de los nucleósidos, los nucleótidos presentan grupos fosfato. Las modificaciones de los nucleótidos naturales pueden darse tanto sobre la fracción del

fosfato, del azúcar o de la base,⁴ siendo las dos últimas modificaciones las más conocidas y activas (**figura 4.2**).

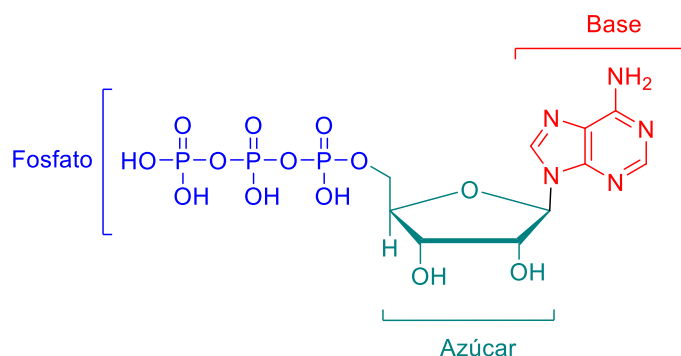


Figura 4. 2: Sitios donde puede ser modificado el nucleótido.

Durante muchos años, se han utilizado métodos químicos para obtener estas modificaciones, pero tanto sus rendimientos como su regio- y estéreo selectividad han sido muy bajos, rindiendo una baja productividad. Además, la síntesis química de análogos de nucleósidos a menudo implica el uso de sustancias peligrosas (reactivos químicos y solventes orgánicos), condiciones operativas ambientalmente agresivas y altos costos de energía.⁵ Asimismo, se necesitan pasos de protección y desprotección de grupos funcionales y se generan numerosos subproductos indeseables.⁶

La utilización de biocatalizadores, tanto enzimas como células, conduce a la obtención de moléculas con la configuración adecuada, empleando tecnologías sustentables y en pocos pasos de reacción. Por tales motivos, las síntesis de análogos de nucleósidos más actuales se centran en procesos biocatalizados o quimio-enzimáticos.

En la estrategia planteada por Taverna-Porro y colaboradores,⁷ DR5P se sintetizó a partir de DR empleando como primer paso una acetilación regioselectiva de la posición 5 con una lipasa de *Candida Antartica* (CAL-B), paso fundamental para mantener la forma furanosa de DR. Posteriormente, se realizó una acetilación química usando anhídrido acético en piridina para proteger las posiciones 1 y 3, obteniendo desoxirribosa peracetilada que luego se desacetiló en la posición 5 utilizando CAL-B en

etanol. Una vez protegidas las posiciones 1 y 3 se incorporó químicamente el grupo fosfato en la posición 5 de 2-desoxirribosa en tres pasos de reacción: i) fosforilación con *N,N*-diisopropilfosforamidita de dibencilo en THF ii) oxidación con hidroperóxido de *tert*-butilo y iii) eliminación de los grupos bencilos por hidrogenólisis con paladio (**figura 4.3a**). Una vez obtenida DR5P, se procedió a utilizar una fosfopentomutasa (PPM) para producir DR1P. Por último, una nucleósido fosforilasa (NP) catalizó la sustitución del grupo fosfato por distintas bases (**figura 4.3b**) para producir 2'-desoxirribonucleósidos.

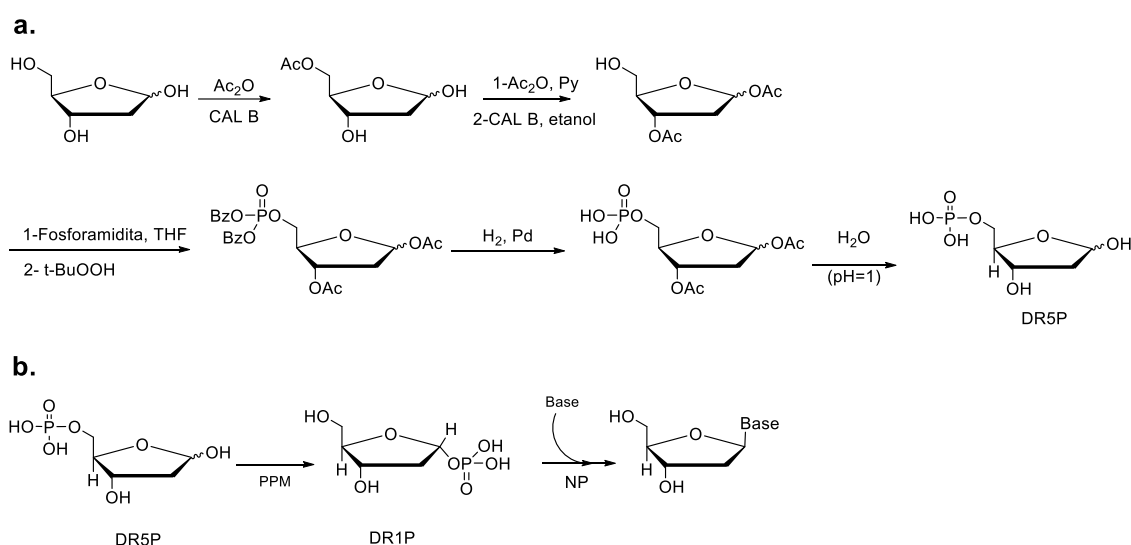


Figura 4. 3: Síntesis quimio-enzimática de 2'-desoxirribonucleósidos a) síntesis química de DR5P b) síntesis de enzimática.

Aunque la síntesis de desoxinucleósidos se podría hacer partir de furanosas 1-fosfato, el fosfato anomérico es muy inestable por la ausencia del grupo hidroxilo en la posición 2 y se desfosforila rápidamente.⁸ Es por este motivo que la metodología planteada anteriormente constituye una valiosa alternativa.

La síntesis química de *nov*o de los grupos 2-desoxirribosilos también puede resultar tediosa ya que implica numerosos pasos de protección y desprotección.⁹ Es por ello que obtener enzimáticamente DR5P se presenta como un desafío importante.¹⁰ Como ya se

había mencionado, su síntesis puede llevarse a cabo utilizando DERA como biocatalizador (**figura 4.4**).

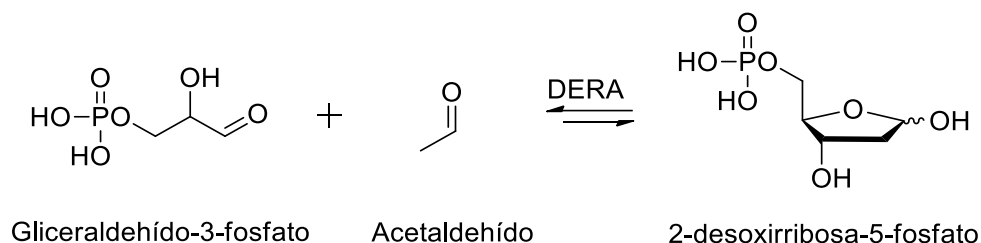


Figura 4. 4: Síntesis de DR5P biocatalizada por DERA

Como mencionamos previamente, nuestro laboratorio ha reportado el empleo de DERA de *Pectobacterium atrosepticum* como catalizador en la síntesis de DR5P con rendimientos cercanos al 10%.¹¹ La DR5P así formada se utilizó en un proceso multienzimático *one-pot* para la síntesis de 2'-desoxirribonucleósidos difosfato.¹² En primer lugar, partiendo de glucosa se obtuvo timidina empleando células enteras de *Pectobacterium atrosepticum*, seguido de la acción de una PPM y una timidina fosforilasa (TP) para formar timidina (**figura 4.5a**). En el último paso de reacción el nucleósido se convirtió en timidina 5'-difosfato utilizando una fosfatasa ácida no específica de *Rutella planticola* sobreexpresada en *Escherichia coli*, conjuntamente con una timidina monofosfato quinasa (TMPK) de *Saccharomyces cerevisiae* (**figura 4.5b**).

Sin embargo, el cuello de botella para esta síntesis fue también la producción de DR5P, debido a que utilizando PaDERA wt solo se obtuvo 14,1 mM de DR5P, un rendimiento menor al 1%.

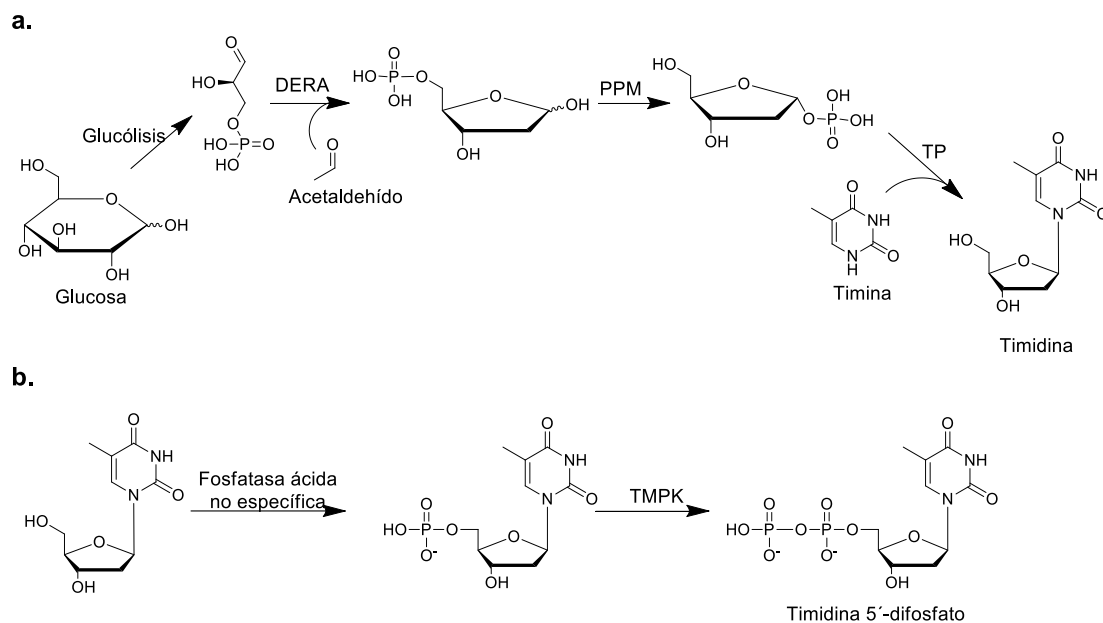


Figura 4. 5: Síntesis multienzimática *one-pot* de timidina 5'-difosfato.

En este capítulo se evalúa la producción de DR5P comparando la actividad sintética de los tres biocatalizadores seleccionados en el Capítulo 3: *PaDERA* N-His, *PaDERA* C49M C-His y *LbDERA* C42M E78K C-His.

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

4.2. Materiales y métodos

Los reactivos analíticos y los sustratos se adquirieron en Sigma Aldrich, los solventes orgánicos utilizados en Sintorgan y los componentes del medio de cultivo en Britania y Biopack.

Pectobacterium atrosepticum (ATCC 33260) se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia (España) y *Escherichia coli* BL21 DE3 se obtuvo de Invitrogen.

Los medios de cultivo fueron LB, LB-Kana, YDC (extracto de levadura 1% p/v, dextrosa 2% p/v y carbonato de calcio 2% p/v) y medio de inducción de DERA (MI) (KH_2PO_4 0.1% p/v, K_2HPO_4 0.1% p/v, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% p/v, extracto de levadura 0.01% p/v, NH_4Cl 0.2% p/v y 2-desoxirribosa (DR) 0.3% p/v).

4.2.1. Cultivo de *Pectobacterium atrosepticum*

Se realizó un cultivo líquido de *Pectobacterium atrosepticum* en 250 ml de medio YDC a partir del stock de trabajo conservado a -80°C . Se lo dejó a 28°C y 200 rpm hasta alcanzar la fase exponencial media (4 días). Posteriormente el cultivo se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 13000 rpm y el pellet bacteriano se utilizó para inocular 250 ml del medio de inducción (MI). Este último cultivo se mantuvo a 28°C y 200 rpm *overnight*. Luego se centrifugó a 4°C y 9000 rpm, se descartó el sobrenadante y las células enteras húmedas se resuspendieron en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7 hasta obtener una concentración de 30 g de células en 100 ml de buffer. Se reservaron para ser utilizadas como biocatalizadores.

4.2.2. Cultivo de *Escherichia coli* BL21 DE3

Se realizó un cultivo líquido de *Escherichia coli* BL21 DE3 en 250 ml de medio YDC a partir del stock de trabajo conservado a -80°C . Se lo dejó *overnight* a 37°C y 200 rpm. Al día siguiente, el cultivo se centrifugó a 4°C y 9000 rpm y se descartó el sobrenadante. Las células enteras se resuspendieron en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7 hasta obtener una concentración de 30 g de células en 100 ml de buffer. Se reservaron para ser utilizadas como biocatalizadores.

4.2.3. Cultivo de *Escherichia coli* BL21 DE3 conteniendo los plásmidos PaDERA N-His, PaDERA C49M C-His y LbDERA C42M E78K C-His

A partir del stock de trabajo de las bacterias recombinantes se realizó un preinóculo en 5 ml de medio LB-kana y se lo dejó *overnight* a 37°C y 200 rpm. Al día siguiente, se utilizaron 2,5 ml del cultivo para inocular 250 ml de medio LB-kana y se lo dejó a 37°C 200 rpm hasta $DO_{600}=0,5$. Se agregaron 250 μ l de IPT (concentración final 100 mM) y se dejó *overnight* a 28°C y 180 rpm. Una vez transcurridas las 16 hs, el cultivo se centrifugó a 4°C a 9000rpm y se descartó el sobrenadante. Las células enteras se resuspendieron en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7 hasta obtener una concentración de 30 g de células en 100 ml de buffer. Se reservaron para ser utilizadas como biocatalizadores.

4.2.4. Células enteras liofilizadas

Se realizó el cultivo de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His tal como se describe en el **inciso 4.2.3**. Las células enteras se resuspendieron en buffer fosfato y se liofilizaron durante 24 hs. Las células liofilizadas se conservaron a -20°C para su posterior uso como biocatalizador. Se obtuvo 0,5 g de células liofilizadas/ 1 g de células peso húmedo.

4.2.5. Extracto libre de células (ELC)

La suspensión de células (obtenida en el **inciso 4.2.3**) se sonicó con un sonicador de punta (Vibra-Cell VCX 130 PB) cinco ciclos de 20 seg y descanso de 40 seg, se centrifugó a 4°C a 9000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se colectó y se dejó en agitación a 4°C durante 1 hora. Se agregó estreptomicina y se dejó en agitación a 4°C durante 1 hora. Se centrifugó a 4°C, 9000 rpm durante 10 minutos. Se alicuotó en *eppendorfs* conteniendo 500 μ l del extracto libre de células (ELC) y se conservó a -80°C.

4.2.6. Síntesis de DR5P

4.2.6.1. Utilizando células enteras a partir de G3P

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 1 ml, conteniendo 15% p/v de pellet bacteriano, 98,3 mM de G3P y 200 mM de acetaldehído en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7. Se agitó a 200 rpm y 28°C tomando alícuotas de 50 μ L cada hora

durante 3 h. Las muestras se centrifugaron a 9000 rpm durante 5 minutos, conservando el sobrenadante para su posterior análisis.

4.2.6.2. Utilizando células enteras liofilizadas a partir de G3P

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 1 ml, conteniendo 7,5% p/v de pellet bacteriano, 98,3 mM de G3P y 200 mM de acetaldehído en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7. Se agitó a 200 rpm y 28°C tomando alícuotas de 50 µL cada hora durante 7 h. Las muestras se centrifugaron a 9000 rpm durante 5 minutos, conservando el sobrenadante para su posterior análisis.

4.2.6.3. Utilizando células enteras a partir de glucosa

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 1 ml, conteniendo 15%p/v de pellet bacteriano, glucosa 500 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 mM, adenosina 5'-trifosfato (ATP) 15 mM, xileno 1% (v/v), acetaldehído 200 mM y buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7. Se agitó a 200 rpm y 28°C tomando alícuotas de 50 µL cada hora durante 7 h. Las muestras se centrifugaron a 9000 rpm durante 5 minutos, conservando el sobrenadante para su posterior análisis.

4.2.6.4. Utilizando ELC a partir de G3P

Se utilizaron 250 µL del ELC, se agregó G3P y acetaldehído en una concentración final de 98,7 mM y 200 mM respectivamente y se completó a un volumen de 1 ml con buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7. Se agitó a 200 rpm y 28°C tomando alícuotas de 50 µL cada hora durante 3 h. Se agregaron 100 µL de acetona fría para cortar la reacción. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos, conservando el sobrenadante para su posterior análisis.

4.2.7. Métodos analíticos

Las muestras de reacción se analizaron cualitativamente por cromatografía en capa delgada (CCD) y cuantitativamente por el método colorimétrico de Burton.¹³ Se utilizaron placas de sílica gel 60 F254 (Merck).

4.2.7.1. Análisis cualitativo de DR5P

El análisis cualitativo de DR5P se llevó a cabo mediante CCD usando n-butanol:2-propanol:H₂O, 3:12:4 (v/v/v) como fase móvil. Como revelador de azúcares y sus

correspondientes productos fosforilados se utilizó 1% (v/v) anisaldehído y 2% (v/v) H_2SO_4 en ácido acético.

	<i>R_f</i>	<i>Color del revelado</i>
<i>G3P</i>	0	Amarillo
<i>DR5P</i>	0,25	Violeta
<i>DR</i>	0,66	Violeta
<i>Glucosa</i>	0,4	Marrón

4.2.7.2. Análisis cuantitativo de DR5P

Se utilizó el método colorimétrico de Burton, usando 100 μl de reactivo recién preparado [20 ml de la solución A (1,5 g difenilamina, 98,5 ml ácido acético glacial, 1,5 ml H_2SO_4) + 100 μl de la solución B (16 mg/ml acetaldehído aq.)] y 50 μl de muestra. Las muestras se midieron en placas de 96 Wells a 600 nm usando BioTek Cytation 5. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. El ajuste de datos se realizó utilizando Prism (GraphPad).

Los resultados se compararon frente a una curva de calibración de DR5P (0 mM-1,25 mM). Todas las soluciones se hicieron por triplicado. Cada una de estas fue analizada mediante el método de Burton descrito anteriormente. Utilizando el programa Excel se graficó absorbancia vs concentración y se obtuvo una recta de regresión lineal con su respectiva ecuación.

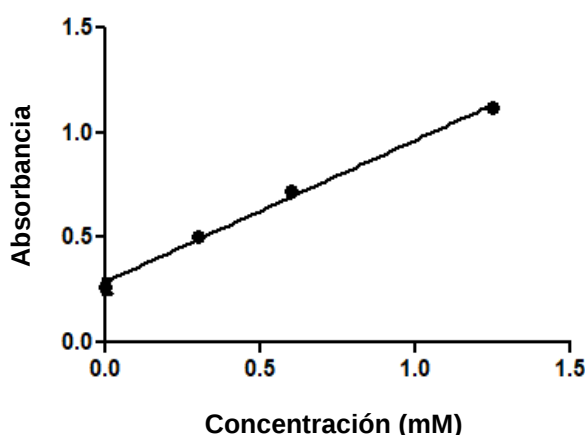


Figura 4. 6: Curva de calibración de DR5P; curva de regresión lineal: $0,6747x + 0,2879$; $R^2 = 0,9855$

4.2.7.3. Análisis cuantitativo de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa

4.2.7.3.1. Aislamiento

Al sobrenadante de las muestras obtenidas en 4.2.6 se le agregaron dos volúmenes de acetonitrilo y 2 mg de NaCl. Se llevó a frío durante 5 minutos. Se separaron las fases y la fase orgánica se conservó para su posterior análisis por GC.

4.2.7.3.2. Cuantificación

Para el análisis cuantitativo se empleó un cromatógrafo gaseoso (Thermo Trace 1300) acoplado a un detector de ionización de llama (CG-FID). Se empleó una columna TRACE TR-5MS (0,25 µm, 0,25 mm, 30 m). Las condiciones de corrida fueron: temperatura del inyector 200 °C, temperatura de la columna: 5 minutos a 50 °C, un gradiente de 10 °C/min hasta 250 °C y 5 minutos a 250 °C. El tiempo total de corrida fue 30 min. Volumen de inyección 1 µl, split: 1:50, calentador: 280 °C. (Tr: 13,9 minutos). Se utilizó como estándar interno dioxano en una concentración de 6 mM.

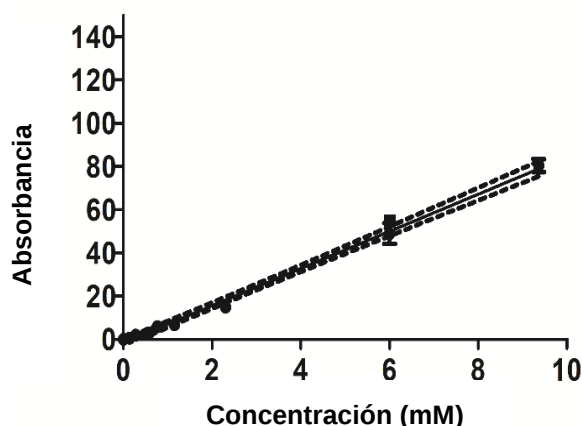


Figura 4. 7: Curva de calibración de Dioxano. $y=1,668X + 0,1510$; $R^2 = 0,9933$.

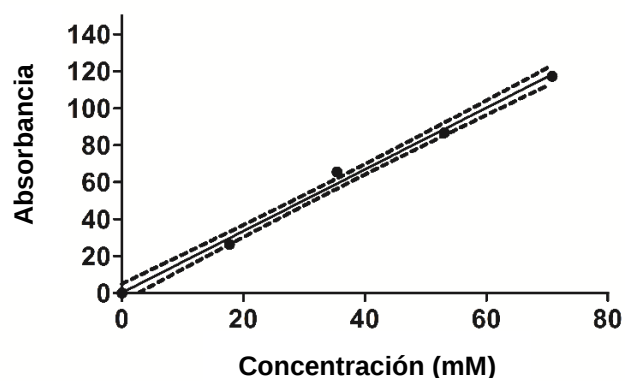


Figura 4. 8: Curva de calibración de 2,4,6-trideoxi D-eritro-hexapiranos. $y = 8,600 X - 1,610$; $R^2: 0,9839$.

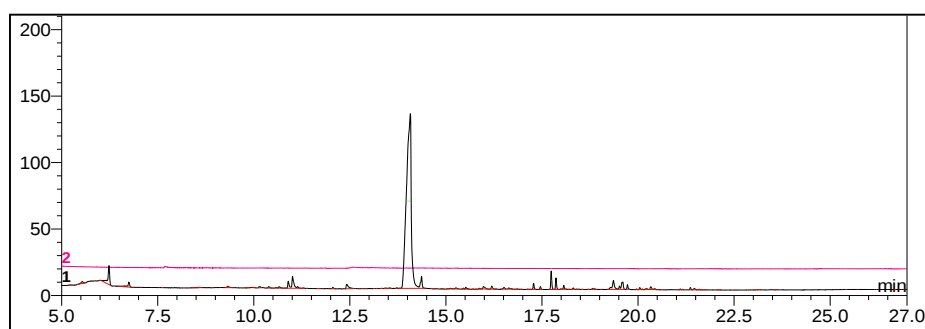


Figura 4. 9: Cromatograma de 2,4,6-trideoxi D-eritro-hexapiranos.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Síntesis de DR5P a partir de G3P

En primera instancia se emplearon las tres variantes de DERA y G3P como material de partida (**figura 4.4**) para sintetizar DR5P. Adicionalmente, se empleó la cepa *wild-type* para comparar con los resultados previos. Los biocatalizadores fueron empleados en forma de célula entera, célula entera liofilizada, ELC y enzima libre.

4.3.1.1. Utilizando células enteras de *PaDERA wt*

DERA forma parte de la ruta de las pentosas fosfato y, por ser una enzima no constitutiva, es inducible sólo en presencia de DR. Inicialmente, *Pectobacterium atrosepticum* se hizo crecer en su medio óptimo (no selectivo y enriquecido con carbonato de calcio). A diferencia de lo ya reportado,¹¹ el cultivo se dejó crecer hasta saturación (4 días) y la biomasa obtenida se utilizó para inocular el medio de inducción, el cual contiene DR como única fuente de carbono. Las bacterias inducidas se centrifugaron luego de un día en el medio de inducción y se utilizaron como biocatalizador.

La reacción aldólica entre G3P y acetaldehído, catalizada por DERA, se siguió por el método colorimétrico descrito por Burton.¹⁴ Si bien este método se utiliza para cuantificar DNA, el verdadero sustrato de la reacción colorimétrica es DR5P, producido por hidrólisis ácida y térmica del material genómico.

Como se puede ver en la **figura 4.10**, DR5P se oxida y desfosforila por el medio ácido de la reacción. Posteriormente, 5-hidroxi-4-oxopentanal se dimeriza y reacciona con difenilamina produciendo un compuesto coloreado que puede ser medido a una longitud de onda de 600 nm. Las absorbancias obtenidas se convirtieron en concentración utilizando la curva de calibración de DR5P descrita en el **inciso 4.2.7.2**.

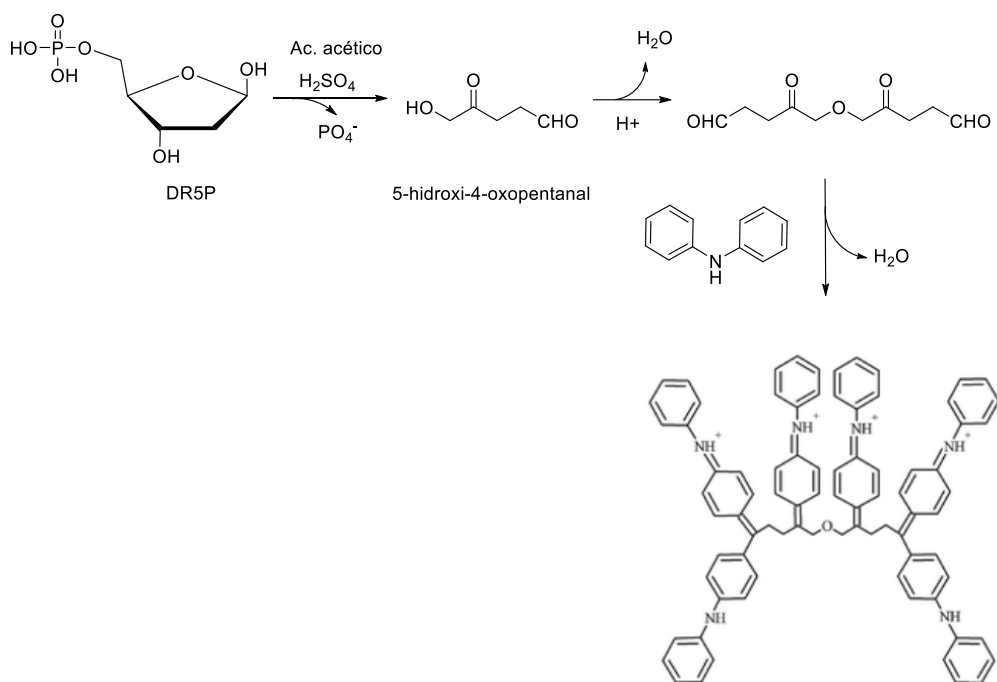


Figura 4. 10: Método colorimétrico descrito por Burton.

El método de Burton también es sensible a la presencia de desoxirribosa (DR) que se puede formar por la desfosforilación espontánea de DR5P. Para descartar su formación, se realizó el seguimiento de la reacción mediante CCD utilizando como revelador anisaldehído en ácido sulfúrico. En este método, los grupos hidroxilos reaccionan con anisaldehído en reacciones de acetalización produciendo un catión altamente conjugado (**figura 4.11**). Esta estructura catiónica, cuyo color depende de la estructura del compuesto a detectar, es factible en las condiciones altamente ácidas de la tinción.

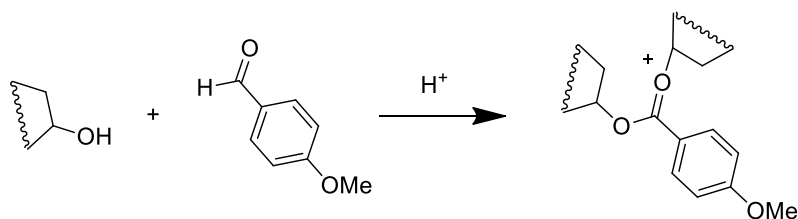


Figura 4. 11: Reacción implicada en el método de revelado con anisaldehído.

Empleando este método de revelado, se observó la formación de DR5P como una mancha violeta, y la disminución de una señal amarillenta en la línea de base, correspondiente a G3P (**figura 4.12**). La reacción se siguió hasta las 4 h, tiempo en el que se observó la formación de DR por la aparición de una señal de color violeta a mayor Rf.

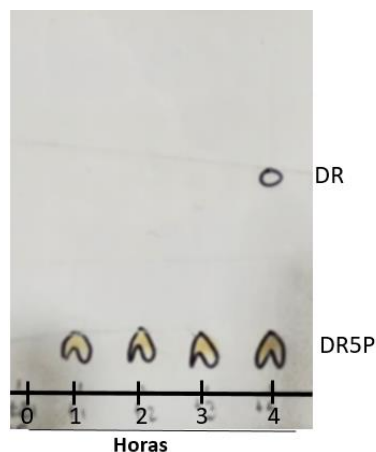


Figura 4. 12: CCD correspondiente al curso de síntesis de DR5P utilizando G3P como sustrato y *PaDERA* wt como biocatalizador.

Se obtuvo un rendimiento máximo de 13,5% correspondiente a 13,2 mM a las 3 h de reacción. En la **figura 4.13** se puede ver el curso de la reacción.

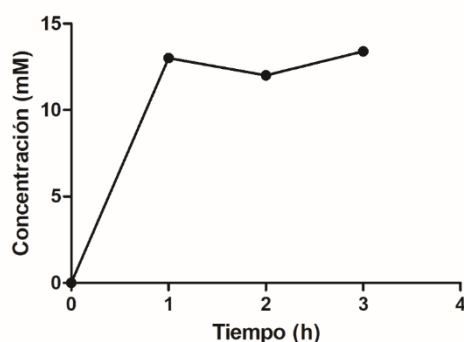


Figura 4. 13: Síntesis de DR5P utilizando *PaDERA* wt como biocatalizador y G3P y acetaldehído como sustratos.

Comparando con los datos previos de nuestro laboratorio, se incrementó levemente el rendimiento respecto al obtenido en el trabajo de la Dr. Ana Valino (10%, 10,1 mM).

Este resultado podría atribuirse al cambio del buffer de reacción ya que en este trabajo se utilizó buffer fosfato, en lugar del buffer Tris-HCl originalmente reportado.

4.3.1.2. Utilizando *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His

Escherichia coli BL21 DE3 PaDERA N-His fue utilizada como modelo para seleccionar la forma de uso de los biocatalizadores recombinantes. Esta bacteria se testeó como células enteras, células enteras liofilizadas, extracto libre de células o enzima libre. En las siguientes secciones se discuten los resultados obtenidos.

4.3.1.2.1. Como células enteras

Para evaluar la actividad sintética de PaDERA N-His en la reacción de síntesis de DR5P a partir de G3P, las células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 conteniendo el plásmido correspondiente se resuspendieron en buffer fosfato. La reacción se inició con el agregado de acetaldehído, y se tomaron alícuotas a distintos tiempos (0, 1, 2, 3, 4 h).

El análisis cualitativo de las reacciones se realizó mediante CCD utilizando como revelador anisaldehído en ácido sulfúrico. Se observó la formación de DR5P, como una mancha violeta, y la disminución de una señal amarillenta en la línea de base, correspondiente a G3P. El análisis cuantitativo de cada muestra se llevó a cabo mediante el método colorimétrico descrito por Burton, comparando las absorbancias obtenidas a 600 nm con la curva de calibración de DR5P descrita en el **inciso 4.2.7.2**.

Empleando este biocatalizador se obtuvo un rendimiento máximo de 41,9% (42,9 mM de DR5P) a las tres horas de reacción. Este resultado fue dos veces más alto que el obtenido para la misma reacción, pero utilizando células enteras de la bacteria *wild-type* (PaDERA *wt*) (13,5%). Si bien la cantidad de células que se utilizan de ambos biocatalizadores es la misma (15% p/v), en *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His la enzima se encuentra sobre-expresada y, por lo tanto, hay mayor disponibilidad de DERA. Este aumento en la cantidad de enzima generó una mayor cantidad de producto, lo cual podría deberse a que el consumo más rápido de G3P impide que este sustrato sea desfosforilado o que pueda redirigirse a otras rutas metabólicas naturales de las células. En la figura **4.14** se puede observar el curso de la reacción.

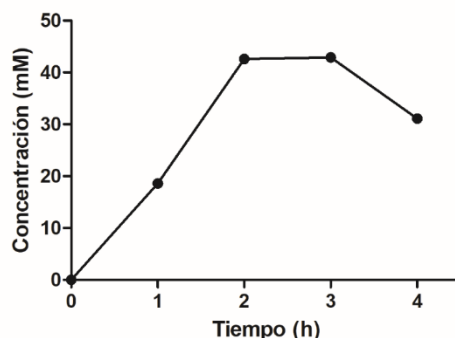


Figura 4. 14: Síntesis de DR5P utilizando *Escherichia coli* PaDERA N-His como biocatalizador y G3P y acetaldehído como sustratos.

Cuando se utilizaron células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 sin el plásmido, no hubo consumo de G3P y por lo tanto no se produjo DR5P. Este resultado nos demuestra que no existe una producción basal de DR5P por la cepa de expresión seleccionada, ni existe reacción química no catalizada.

4.3.1.2.2. Como células liofilizadas

Con el fin de reducir el tiempo en el proceso de obtención del biocatalizador al utilizar células enteras, se decidió liofilizar las células para conservarlas hasta el momento de su uso. Para ello, las células se resuspendieron en mínimo volumen de buffer y se liofilizaron durante 24 hs para eliminar toda el agua. Sin embargo, cuando se utilizaron como biocatalizador no hubo conversión de G3P a DR5P. Este resultado podría atribuirse a que DERA no logró reconstituirse a su forma activa luego de la deshidratación. Esto nos indicó que esta metodología de almacenamiento no podía ser utilizada.

4.3.1.2.3. Como ELC

El extracto libre de células (ELC), como su nombre lo indica, es una solución que contiene las proteínas solubles de una bacteria, entre ellas las enzimas. El empleo de ELC en síntesis biocatalizadas ha tomado un gran impulso en los últimos años debido a que presenta ciertas ventajas respecto al empleo de las células enteras. Al utilizar ELC se reducen problemas asociados con transferencia de masas y permeabilidad de las paredes celulares.¹⁵ El ELC de bacterias conteniendo DERA ya fue utilizado por Ručigaj y colaboradores demostrando buenos rendimientos.¹⁶

Con el fin de probar esta metodología, células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His resuspendidas en buffer se sometieron a una lisis física utilizando un sonicador de punta. El ELC obtenido fue utilizado como biocatalizador en la síntesis de DR5P, empleando G3P y acetaldehído como sustratos.

Se tomaron alícuotas a distintos tiempos (0, 1, 2 y 3 h), y se les agregó acetonitrilo frío para precipitar las proteínas y cortar la reacción.¹⁷ Las muestras se centrifugaron, el pellet se descartó y el sobrenadante se analizó igual que antes, cualitativamente por CCD y cuantitativamente por el método de Burton.

El utilizar ELC de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His se obtuvo un rendimiento máximo de 32,9 % (32,4 mM de DR5P) al cabo de 3 h de reacción, tiempo estándar empleado para comparar con el rendimiento obtenido con células enteras (32,9% y 42,9%, respectivamente), lo que puede deberse a que la enzima dentro la célula se encuentra en un ambiente protegido que le confiere cierta estabilidad.¹⁶ Además, la síntesis empleando ELC no fue reproducible, dando mediciones de absorbancia muy dispersas entre reacciones realizadas en distintos días. Siendo que la producción del ELC involucra un paso experimental extra de lisis física y no mejora el rendimiento obtenido por las células enteras, su utilización se descartó como forma de biocatalizador.

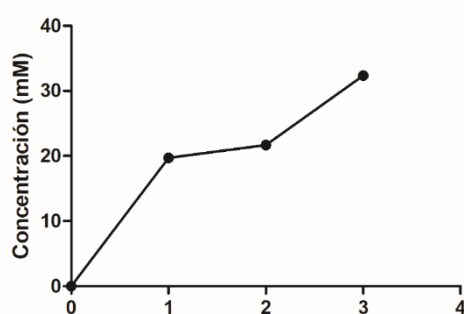


Figura 4. 15: síntesis de DR5P utilizando ELC de *Escherichia coli* PaDERA N-His como biocatalizador y G3P y acetaldehído como sustratos.

4.3.1.2.4. Como enzima libre

Como se describe en el **capítulo 3**, la enzima libre *PaDERA* N-His se purificó a partir del ELC utilizando resina de Ni^{+2} Sefarosa y un gradiente de imidazol. Las fracciones enriquecidas con la proteína fueron concentradas y desaladas. Posteriormente, se midió su actividad específica (9,3 U/mg) y la concentración proteica (0,66mg/ml).

Se utilizó 1 mg/ml de enzima purificada como biocatalizador para sintetizar DR5P a partir de G3P, en condiciones de reacción similares a las descritas para células enteras y ELC. Se inició la reacción con el agregado de la enzima y se tomaron alícuotas a distintos tiempos (0, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos). Las reacciones se siguieron por CCD frente a un patrón de DR5P, pero no se observó la formación del producto. Estos resultados pueden deberse a la exposición directa de la enzima al acetaldehído, siendo esta exposición suficiente para inhibir completamente a la enzima.

4.3.1.2.5. Comparación de los distintos formatos

La **tabla 4.1** resume los resultados obtenidos utilizando *PaDERA* N-His en sus cuatro formas de biocatalizador.

Tabla 4. 1: Síntesis de DR5P utilizando distintas formas del biocatalizador *PaDERA* N-His.

Variante	Forma del biocatalizador	DR5P (%R)
<i>PaDERA</i> N-His	Células enteras	42,9%
	ELC	32,9%
	Enzima pura	0%
	Células liofilizadas	0%

Utilizando células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* N-His, la concentración de DR5P obtenida fue mayor que al utilizar ELC en las mismas condiciones de reacción, mientras que cuando el biocatalizador se utilizó como células enteras liofilizadas o enzima libre no hubo reacción. Esta mayor eficiencia del biocatalizador en forma de células enteras se justifica pues, además de brindar un entorno natural para la enzima, la membrana semipermeable de la célula permite administrar el ingreso del acetaldehído, haciendo que la inhibición de la enzima sea más lenta.¹⁸

Estos resultados concuerdan con la mayoría de los reportes existentes en donde, empleando la enzima aislada, los rendimientos suelen ser muy bajos. Por ejemplo, Kim y colaboradores han obtenido un rendimiento menor al 3% utilizando una DERA purificada de *Paenibacillus sp* y G3P como sustrato.¹⁹ Adicionalmente, se reportaron otras DERAs de *Haemophilus influenzae* y de *Escherichia coli* con rendimientos menores al 5% y al 3%, respectivamente.²⁰

Teniendo en cuenta los rendimientos y/o los problemas que se presentaron a utilizar PaDERA N-His en los distintos formatos, se prosiguió utilizando células enteras con las otras dos variantes.

4.3.1.3. Utilizando células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His

La variante PaDERA C49M C-His se encuentra sobre-expresada en *Escherichia coli* conteniendo el Tag de histidina en el C-terminal. A su vez, presenta un cambio de la cisteína en la posición 49 por una metionina, que le permite soportar concentraciones altas de acetaldehído. Acorde a los resultados anteriores, una suspensión de células de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His se utilizó como biocatalizador para sintetizar DR5P.

De manera habitual, se inició la reacción con el agregado de acetaldehído, y se tomaron alícuotas a distintos tiempos (0, 1, 2 y 3 hs). Las células fueron separadas del medio de cultivo mediante centrifugación y el sobrenadante se sometió al análisis cualitativo mediante CCD utilizando como revelador anisaldehído en ácido sulfúrico. Se observó la formación de DR5P, como una única mancha violeta, y la disminución de la señal correspondiente a G3P.

El análisis cuantitativo de cada muestra se llevó a cabo mediante el método colorimétrico descrito por Burton y en la **figura 4.16** se puede observar el curso de la reacción. Al utilizar este biocatalizador, se obtuvo un rendimiento casi cuantitativo (98,1 mM) a las dos horas de reacción, el cual se mantuvo constante a mayor tiempo.

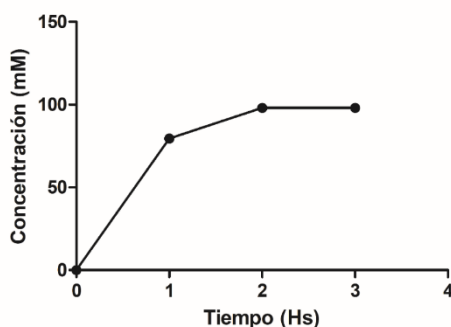


Figura 4. 16: Síntesis de DR5P utilizando células enteras de *Escherichia coli* PaDERA C49M C-His como biocatalizador y G3P y acetaldehído como sustratos.

En la **figura 4.17** se muestra el resultado de la síntesis de DR5P utilizando las tres variantes de DERA. En comparación con el resultado obtenido con la bacteria *wild-type*, cuando se utilizaron las bacterias recombinantes, el rendimiento en la síntesis de DR5P fue mayor. Este incremento se puede relacionar con la sobre-expresión de la enzima en la célula. Como ya mencionado, una mayor cantidad de enzima activa disponible genera un consumo más rápido de los sustratos, lo cual restringe la disponibilidad de consumo de G3P por ingresar a cualquier ruta metabólica que la bacteria pueda realizar.

Comparando las dos bacterias recombinantes, puede observarse que *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His es dos veces más activa, lo que concuerda con el mayor nivel de expresión de la enzima y la estabilidad que le confiere la mutación C49M. La Met49 no puede formar la unión covalente irreversible de DERA con crotonaldehído, por lo que la enzima no se inhibe fácilmente y sigue activa a lo largo de la reacción.

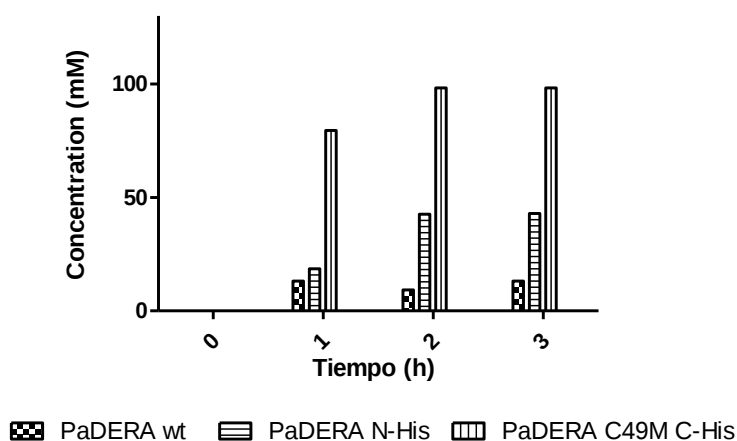


Figura 4. 17: Comparación de la síntesis de DR5P utilizando las tres variantes de PaDERA.

4.3.1.4. Utilizando células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 *LbDERA* C42M E78K C-His.

La otra variante de DERA testada pertenece a *Lactobacillus brevis*. *LbDERA* C42M E78K está sobre-expresada con el tag de histidina en el C-terminal y posee dos mutaciones que le confieren mayor resistencia a acetaldehído y mayor estabilidad.

Las células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 *LbDERA* C42M E78K C-His se resuspendieron en buffer fosfato para ser utilizadas como biocatalizadores y se procedió de la manera habitual. Se observó la formación de DR5P por CCD como una única mancha violeta y se cuantificó por el método de Burton. En la **figura 4.18** se puede ver el avance de reacción luego de cuantificar las muestras a distintos tiempos. Utilizando este biocatalizador se obtuvo un 99% de rendimiento (98,2mM de DR5P) a las dos horas de reacción. Al comparar este resultado con la concentración de DR5P obtenida con *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* C49M C-His (**figura 4.19**), se observa que la concentración fue similar en todos los tiempos testados, dando rendimientos mayores al 98%. Sin embargo, debido a que el nivel de expresión de *LbDERA* C42M E78K C-His en la célula es menor respecto a la expresión de *PaDERA* C49M C-His, estaríamos en presencia de un biocatalizador más activo.

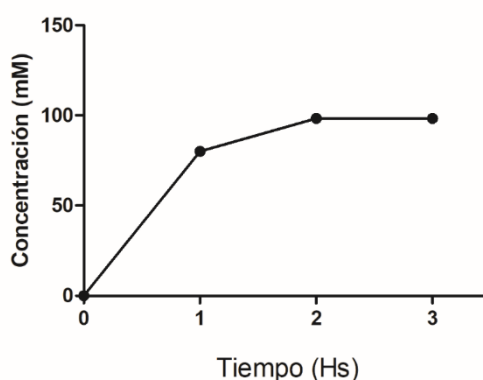


Figura 4. 18: Síntesis de DR5P utilizando *Escherichia coli* *LbDERA* C42M E78K C-His como biocatalizador y G3P y acetaldehído como sustratos.

Cabe mencionar que la actividad hidrolítica determinada para *Escherichia coli* BL21 DE3 *LbDERA* C42M E78K C-His fue menor que para *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* C49M C-His (28,9 U/mg y 5,9 U/mg, respectivamente). Sin embargo, la actividad sintética para estas dos variantes fue similar. Esta comparación nos demuestra que la actividad hidrolítica de la enzima no siempre está relacionada con su actividad sintética.

Resultados parecidos fueron reportados por el grupo de Horinouchi para DERA de *Klebsiella pneumoniae* sobre-expresada en *Escherichia coli*.¹⁰ Si bien uno de los clones presentó una actividad específica de 2,5 U/mg, la síntesis de DR5P utilizando células enteras alcanzó un 63% de rendimiento. Caso similar sucedió con la variante *wild type* de *Klebsiella pneumoniae* que, con solo una actividad de 0,77 U/mg, se obtuvo un 52% de rendimiento.²¹

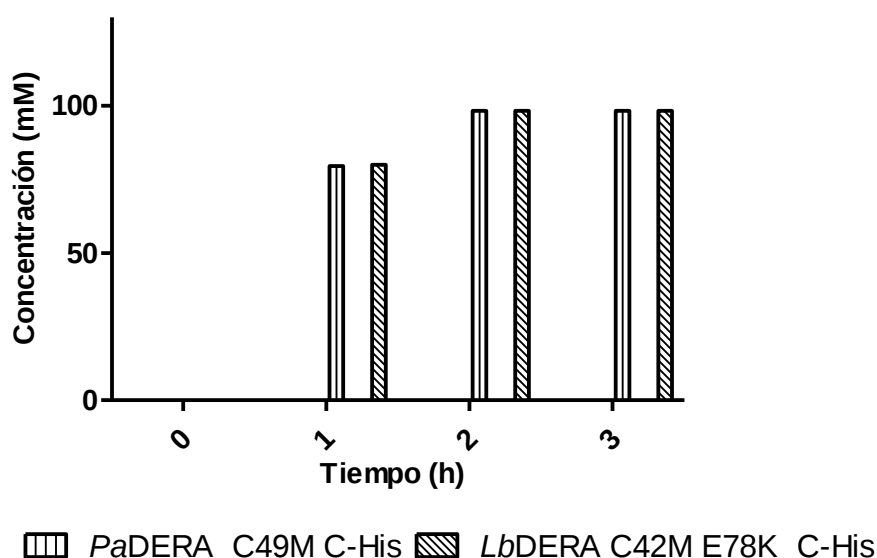


Figura 4. 19: Síntesis de DR5P utilizando *Escherichia coli* *PaDERA* C49M y *Escherichia coli* *LbDERA* C42M E78K C-His y G3P y acetaldehído como sustratos.

4.3.2. Síntesis de DR5P a partir de glucosa

Debido al elevado valor comercial que tiene G3P, generarlo *in-situ* a partir de un sustrato económico como glucosa (**figura 4.20**) resulta una alternativa favorable para disminuir el costo inicial de las reacciones. La glucosa puede ingresar a la glucólisis generando fructosa-1,6-difosfato, la cual se escinde en una molécula de G3P y una molécula de dihidroxiacetona-fosfato a través de la enzima Fructosa 1,6-difosfato aldolasa.⁹

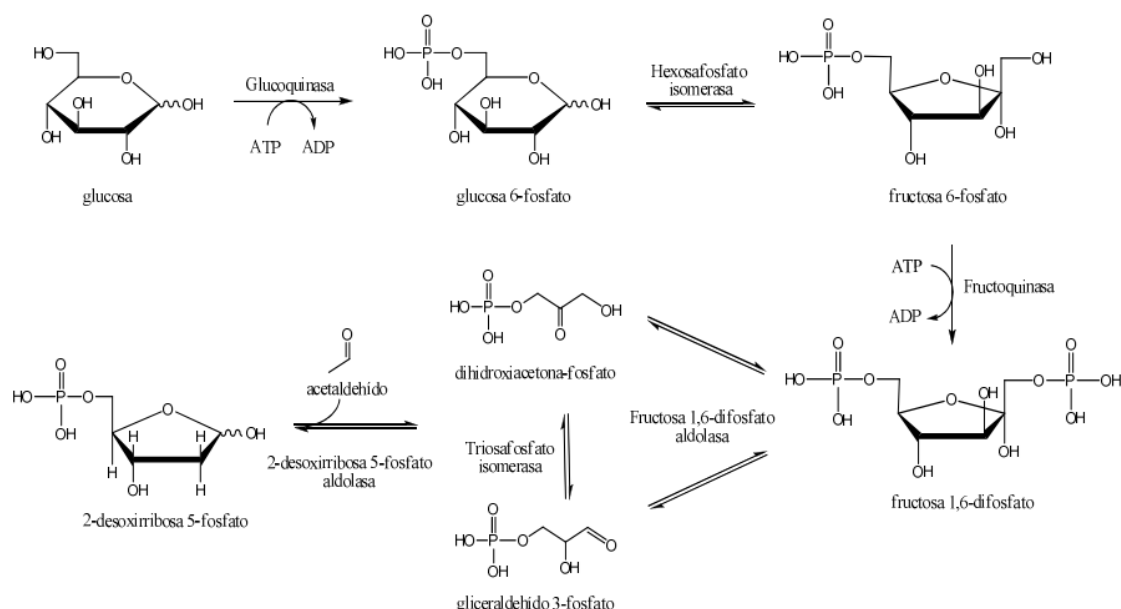


Figura 4. 20: Síntesis *in-situ* de DR5P a partir de glucosa.

El medio de reacción utilizado para la síntesis de G3P *in-situ* ya había sido puesto a punto en el trabajo doctoral de la Dr. Ana Valino.¹¹ Este medio (MR) contiene ATP y MgSO₄ en cantidades catalíticas, y xileno como agente porante para favorecer el ingreso de ATP a las células.

Con el fin de buscar la reacción de síntesis de DR5P a partir de glucosa más eficiente, se utilizaron las tres variantes de *Pectobacterium atrosepticum* (PaDERA wt, *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His y *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His) y la

variante de *Lactobacillus brevis* (*Escherichia coli* BL21 DE3 *LbDERA* C42M E78K C-His).

4.3.2.1. Utilizando células enteras de *PaDERA* wt

Las células enteras de *PaDERA* wt se resuspendieron en el MR hasta obtener una concentración de 15% p/v. El inicio de la reacción se marcó con el agregado de acetaldehído, y se tomaron alícuotas a distintos tiempos (0, 1, 2 y 3 h). Las células de *PaDERA* wt fueron separadas del medio de cultivo mediante centrifugación, el pellet bacteriano se descartó y el sobrenadante se analizó cuali- y cuantitativamente.

El análisis por CCD utilizando como revelador anisaldehído en ácido sulfúrico mostró la formación de DR5P, como una única mancha violeta, y la disminución de la señal de glucosa. El análisis cuantitativo de cada muestra se llevó a cabo mediante el método colorimétrico descrito por Burton y en la **figura 4.21** se puede ver el avance de la reacción graficado como la concentración de DR5P en el tiempo. Al utilizar células enteras de *PaDERA* wt se obtuvo un máximo de concentración de 23,4 mM de DR5P a las tres horas de reacción. Los resultados obtenidos cuando se utiliza glucosa como sustrato se presentaron como concentración (mM) debido a que, si bien uno sabe la cantidad de glucosa que se emplea, no se puede calcular la cantidad de G3P que se genera en la célula. En el caso de calcular rendimiento deberíamos referenciarlo a la cantidad de acetaldehído agregado en la reacción, pero dada su alta volatilización no conduce a una medida muy precisa.

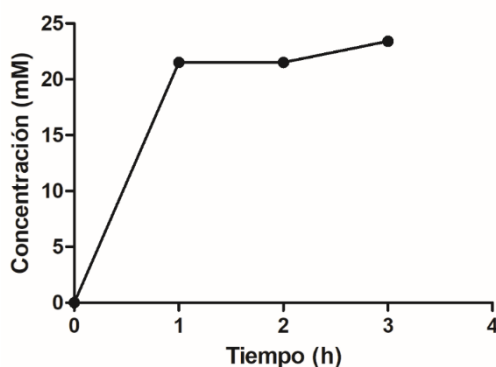


Figura 4. 21: Síntesis de DR5P utilizando *PaDERA* wt como biocatalizador y glucosa y acetaldehído como sustratos

4.3.2.2. Utilizando células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His

Similar a lo ocurrido anteriormente, las células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His se resuspendieron en el MR y se inició la reacción con el agregado de acetaldehído. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos (0, 1, 2 y 3 h).

El mismo procedimiento se realizó con células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 para realizar el blanco de la reacción y verificar la ausencia de actividad DERA en la célula huésped.

En el análisis cualitativo del curso de la reacción por CDD, se observó la formación de DR5P, como una única mancha violeta, y la disminución de la señal de glucosa. Además, en el análisis cuantitativo por Burton se determinó que, a las 3 h de reacción la concentración de DR5P fue 37 mM. En la **figura 4.22** se puede ver el avance de la reacción.

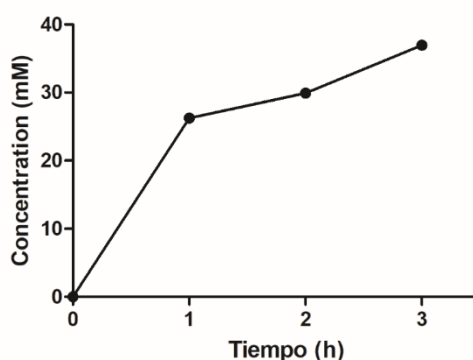


Figura 4. 22: Síntesis de DR5P utilizando *Escherichia coli* PaDERA N-His como biocatalizador y glucosa y acetaldehído como sustratos

Debido a la sobre-expresión de la enzima en *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His, la concentración de DR5P obtenida fue mayor que la sintetizada por PaDERA wt (23,4 mM). Sin embargo, resultó menos eficiente que cuando se empleó G3P como sustrato. Esto puede deberse a que, como hemos mencionado anteriormente, la glucosa debe ingresar a la vía de la glucólisis para producir G3P y, posiblemente, la cantidad de

G3P producida no es la suficiente para equiparar la cantidad incorporada en las reacciones donde se utiliza el sustrato directamente.

4.3.2.3. Utilizando células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His

Con el fin de evaluar la síntesis de DR5P utilizando glucosa como sustrato y *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His como biocatalizador, se procedió de manera similar a lo descrito anteriormente.

Inesperadamente, en el análisis cualitativo del curso de reacción se observó una gran cantidad de glucosa remanente y, consecuentemente, una muy baja formación de DR5P (**figura 4.23**). Además, a la hora de reacción se observó la producción de 2,4,6- tridesoxi D-eritro-hexapiranososa (TDHP), producto de la doble adición aldólica de 3 moléculas de acetaldehído.

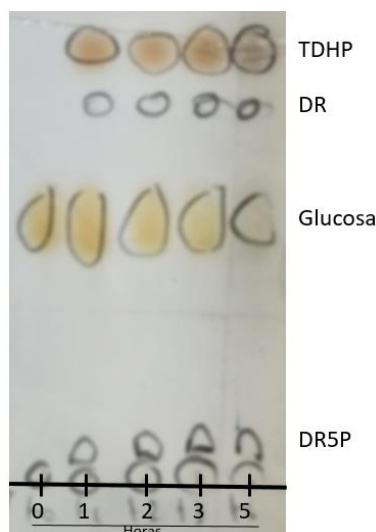


Figura 4. 23: CCD correspondiente a la síntesis de DR5P utilizando glucosa como sustrato y células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His.

Al realizar el análisis cuantitativo se corroboró que el rendimiento obtenido de DR5P en esta reacción fue despreciable (<4%, <2 mM). Esto nos llevó a pensar que este resultado podría estar relacionado con una baja cantidad de G3P formado a causa de una disminución de la actividad metabólica normal de la célula. La síntesis *in-situ* de G3P

a partir de glucosa se realiza mediante el proceso metabólico de la glucólisis, el cual podría estar afectado por la alta expresión de la enzima recombinante. Para la expresión de una proteína exógena, la célula huésped emplea una gran cantidad de recursos eliminándolos del metabolismo normal (enzimas del metabolismo, cofactores, etc.). Como consecuencia, la bioquímica del microorganismo huésped puede verse drásticamente alterada.²² Por lo tanto, podría haber una menor cantidad de G3P en el medio al momento de iniciar la reacción.

Por otro lado, la falta de G3P hace que el acetaldehído presente desde el inicio, reaccione consigo mismo produciendo THDP, si bien la cantidad que se obtiene resultó también muy baja. En la **figura 4.24** se puede observar la producción de DR5P y de TDHP para esta reacción. La concentración de DR5P obtenida fue analizada cuantitativamente por el método colorímetro de Burton; mientras que el TDHP, extraído del medio acuoso de reacción, se analizó utilizando GC-FID en las condiciones descritas en materiales y métodos.

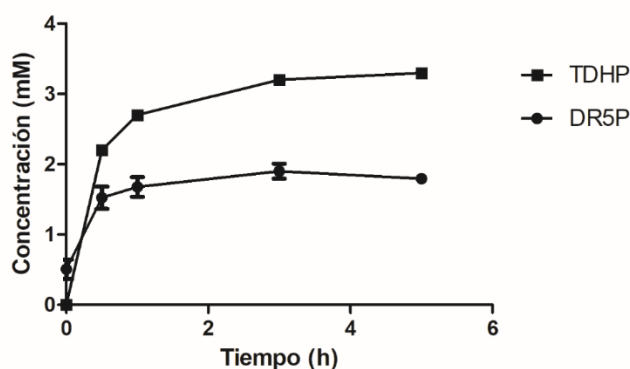


Figura 4. 24: Síntesis de DR5P y TDHP utilizando células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His.

La baja actividad metabólica en la célula por causa de la producción de la proteína exógena, nos hizo pensar que el tiempo que pasan las células en presencia de glucosa, podría no ser suficiente para la producción de G3P *in-situ*. Por tal motivo, se incubaron las células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His con el medio de reacción (MR) durante media hora, una hora o tres horas, antes de agregar acetaldehído y dar inicio a la reacción. Dicho tiempo serviría para acumular suficiente cantidad de

G3P y, consecuentemente, elevar la producción de DR5P. Así, luego del agregado de acetaldehído se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (0, 0.5, 1, 2, 3, 5 y 7 h) y se trataron de la manera habitual.

A partir de los resultados obtenidos en la cuantificación de DR5P, realizada por el método colorimétrico descrito por Burton, se realizó un análisis de regresión lineal en GraphPad Prism, y se determinó las pendientes de las mismas, que se corresponden con el valor de velocidad inicial (V_o) de reacción (**figura 4.25**). V_o nos dio una idea de la cantidad de G3P que se encontraba disponible en el medio de reacción en el momento de agregar acetaldehído. Una mayor V_o nos indicaría que se produjo G3P por glucolisis y que se acumuló conforme pasó el tiempo de incubación con MR.

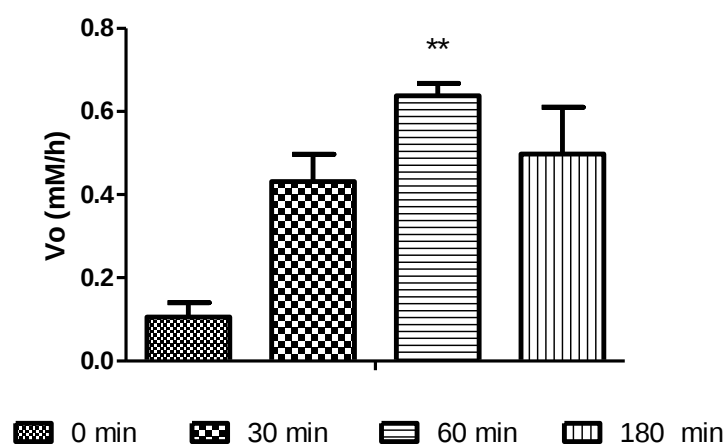


Figura 4. 25: Variación de la actividad de *Escherichia coli* PaDERA C49M C-His en la síntesis de DR5P, producida por el agregado de acetaldehído a distintos tiempos.

Al analizar estos resultados, pudimos observar que pre-incubando las células enteras de *Escherichia coli* BL21DE3 PaDERA C49M C-His durante 0,5 h hubo un incremento significativo en la velocidad de reacción respecto a la reacción donde no se incubó con el medio de reacción. Cuando las bacterias se incuban durante 1 h, la velocidad de reacción fue 5 veces mayor respecto a la reacción sin preincubar y luego de tres horas de incubación, teniendo cuenta el error del cálculo, podríamos decir que no hubo un incremento en la V_o respecto a la preincubación durante 1 h. Sin embargo, si

comparamos el resultado de V_o obtenido en estas condiciones (V_o entre 0,17 y 0,64 mM/h) con el resultado obtenido para la reacción catalizada por *Escherichia coli* BL21 D3E PaDERA N-His (9,9 mM/h) y la catalizada por PaDERA wt (5,13 mM/h) los valores no son significativos por lo que no impactan en la concentración de DR5P máxima obtenida (3,5 mM)

Los resultados obtenidos, podrían explicarse de 2 formas: (i) el G3P producido cuando acetaldehído no está presente para reaccionar es re-direccionado hacia las otras vías metabólicas o (ii) que la glucosa o algún intermediario interfiera en la actividad de la enzima inhibiéndola.

Para comprobar de qué manera los componentes del medio de reacción afectan a la síntesis de DR5P, las células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His se pre-incubaron durante 30 min con el medio de reacción de glucosa. Pasado ese tiempo se agregó G3P y acetaldehído, esperando obtener un rendimiento elevado antes de las dos horas de reacción, tiempo en el que se obtuvo el máximo rendimiento utilizando G3P como sustrato. De esta manera, la cantidad de G3P producido por la bacteria en la glucolisis - sumada a la cantidad de G3P adicionada - generaría un desplazamiento de la reacción hacia la formación de DR5P. Sin embargo, la cantidad de DR5P producida en estas condiciones fue de 4,6 mM (en lugar de 98,1 mM). Este resultado nos muestra que el problema no fue la falta de G3P, sino que podría existir una inhibición de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His por algún componente del medio de reacción o de algún intermediario de la ruta metabólica de degradación de glucosa (**figura 4.20**). Esta última hipótesis se condice con los resultados obtenidos para la formación de TDHP en esta reacción, que también fueron mucho más bajos que los esperados (ver **capítulo 5**).

Para comprobar si la glucosa era la causa de la inhibición, se incubaron las células únicamente con glucosa sin el resto de los componentes del medio de reacción. Dichas células se emplearon luego para realizar la reacción en condiciones normales. En este experimento, la producción de DR5P fue nula, lo que nos indicó que la glucosa agregada en el medio de reacción estaría inhibiendo a *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His.

Por último, para comprobar si la actividad de la enzima purificada se ve afectada por el agregado de la glucosa, se midió la actividad enzimática en presencia de este

sustrato. Para tal fin la enzima se preincubó con glucosa durante 30 minutos y, posteriormente, se midió la actividad enzimática con el método acoplado a la oxidación de NADH. La actividad retro aldólica de DR5P fue reducida en un 50%. Estos resultados avalan la hipótesis de la inhibición de DERA por parte de glucosa, aunque esta inhibición afectaría más en la dirección de la síntesis que en la reacción inversa. Debido a que la glucosa se encuentra en equilibrio con su estado abierto (aldehído) la inactivación de la enzima podría estar relacionado a la cantidad de aldehído en el medio de reacción, puesto que está comprobado que no sólo acetaldehído inhibe la enzima, sino que los aldehídos en general reaccionan irreversiblemente con residuos de lisina de la superficie de la proteína.^{23,24}

Debido a que esta inhibición no se presentó al utilizar células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His, se podría pensar que está relacionada con la modificación en el extremo C-terminal. Como habíamos mencionado en el **capítulo 1** este extremo funciona como una “tapadera” del sitio activo que hace variar a esta enzima entre un estado abierto y uno cerrado para producir la catálisis. La modificación de este extremo podría afectar las características de esta enzima, en cuanto a su estabilidad o su actividad sintética. Sin embargo, para comprender esta inhibición, se deberían realizar ensayos de *docking* y dinámica molecular.

4.3.2.4. Utilizando *Escherichia coli* BL21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His

Finalmente, se probó la síntesis de DR5P a partir de glucosa con células enteras de LbDERA C42M E78K C-His. En la **figura 4.26** se puede ver el avance de reacción. Se obtuvo un máximo de concentración de 71,6 mM de DR5P a las dos horas de reacción, el mejor resultado entre las variantes testeadas. Teniendo en cuenta la actividad específica de las enzimas, este análisis también nos muestra que la actividad sintética de esta enzima es mayor y que la misma no puede relacionarse con su actividad hidrolítica.

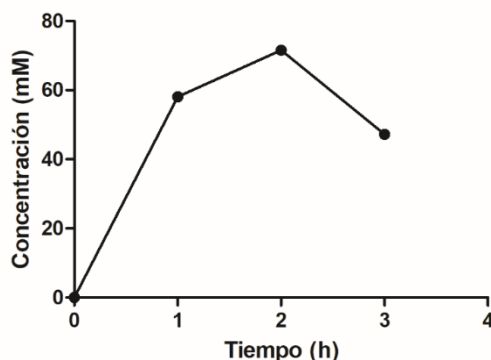


Figura 4. 26: Síntesis de DR5P utilizando *Escherichia coli* LbDERA C42M E78K C-His como biocatalizador y glucosa y acetaldehído como sustratos

4.3.3. Resultados comparativos

Comparando las cuatro variantes de DERA utilizadas en la síntesis de DR5P a partir de glucosa podemos observar que los mejores rendimientos se obtuvieron con *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His y *Escherichia coli* BL21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His, lo que podría estar relacionado con la cantidad de proteína exógena producida por la célula. Como analizamos en el **capítulo 3**, la concentración de enzima pura obtenida para estas dos variantes fue aproximadamente 0,7 mg/ml.

Estos resultados superan los reportados en bibliografía y en particular por el grupo de Horinouchi.¹⁰ Utilizando DERA de *Klebsiella pneumoniae wild-type* estos autores obtuvieron una concentración de 3,4 mM a las 5 h de reacción, mientras que para las variantes sobre-expresadas de *Klebsiella pneumoniae* se obtuvo una concentración de 6,3 mM. De esta forma, las DERAS recombinantes testeadas en este capítulo pueden ser utilizadas como catalizadores eficientes en la síntesis de DR5P.

Por otro lado, al emplear *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His se obtuvieron rendimientos de DR5P muy bajos. Los ensayos realizados nos demuestran que existiría una inhibición de PaDERA C49M C-His por glucosa causada por la modificación estructural de la enzima.

La **tabla 4.2** muestra un resumen de los resultados obtenidos en la síntesis de DR5P en las reacciones llevadas a cabo con células enteras.

Tabla 4. 2: Análisis de las reacciones con células enteras, ^a reactivo limitante G3P; ^b reactivo limitante acetaldehído.

Células enteras	Sustrato aceptor	DR5P (mM)	DR5P (%)	Tiempo (h)
<i>PaDERA wt</i>	G3P	13,2	13,5 ^a	3
	Glucosa	23,4	11,7 ^b	3
<i>PaDERA N-His</i>	G3P	42,9	41,9 ^a	4
	Glucosa	37	18,5 ^b	4
<i>PaDERA C49M C-His</i>	G3P	98,1	>99 ^a	2
	Glucosa	<2	<1 ^b	7
<i>LbDERA C42M E78K C-His</i>	G3P	98,2	>99 ^a	2
	Glucosa	71,6	35,8 ^b	2

Como se puede observar en la tabla, partiendo de G3P, debido a la cantidad de enzima que se encuentra en la célula los resultados fueron mejores para todas las células recombinantes que para *PaDERA wt*.

Si se comparan los resultados obtenidos cuando se emplea glucosa como sustrato, a diferencia de lo que ocurre con *PaDERA wt*, en las bacterias recombinantes la concentración de DR5P obtenida siempre fue menor respecto a la cantidad obtenida a cuando se parte de G3P. Este resultado podría estar relacionado una baja cantidad de G3P disponible a la hora de realizar la reacción. En particular, en el caso de las bacterias recombinantes, el metabolismo se ve ralentizado por la producción exacerbada de la proteína recombinante, afectando los procesos bioquímicos normales en la célula como la glucólisis.

Empleando *Escherichia coli* BL21 DE3 *LbDERA C42M E78K C-His* y *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA C49M C-His* se obtuvieron los mejores rendimientos de reacción cuando el sustrato fue G3P en tiempo cortos de reacción. Sin embargo, *Escherichia coli* BL21 DE3 *LbDERA C42M E78K C-His* se muestra como un biocatalizador más eficiente porque permite también el empleo de glucosa como material de partida más económico, con un rendimiento mayor al 70% y en un tiempo corto de reacción.

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

4.4. Conclusiones

Como hemos mencionado anteriormente, la síntesis de análogos de nucleósidos puede ser llevada a cabo por diversas metodologías químicas o quimioenzimáticas. En particular, para producir la porción del azúcar químicamente, son necesarios varios pasos de protección y desprotección que involucran métodos no amigables con el medio ambiente. Es por tales motivos que, en este capítulo, se llevó a cabo el testeo de las variantes de DERA para obtener DR5P biocatalíticamente con buenos rendimientos.

Con el fin de seleccionar la mejor forma de emplear el biocatalizador, se utilizó la variante *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His como células enteras, células enteras liofilizadas, ELC o enzima libre, y G3P como sustrato. Mientras que con enzima libre o células enteras liofilizadas no se obtuvo DR5P, cuando se emplearon células enteras o ELC los resultados fueron buenos comparados con la variante *wild-type*. Debido a que los rendimientos obtenidos con células enteras fueron levemente mayores que los obtenidos por ELC y, teniendo en cuenta que el proceso para obtener ELC tiene un costo de tiempo mayor, se eligió esta forma de biocatalizador para continuar con el resto de las variantes.

Al comparar las cuatro variantes pudimos seleccionar a *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His y *Escherichia coli* BL21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His como buenos catalizadores en la síntesis de DR5P a partir de G3P, ya que sus conversiones fueron mayores al 99%. Cabe destacar que a pesar de la baja actividad de hidrólisis y de expresión de *Escherichia coli* BL21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His, su actividad sintética fue muy alta.

La utilización de glucosa implicó utilizar un material de partida económico para la producción de DR5P. Para este sustrato la variante más activa resultó ser *Escherichia coli* BL21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His con una conversión del 35,8%, en comparación con PaDERA *wt* y *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His donde las conversiones fueron menores al 20%. Inesperadamente, utilizando células enteras de PaDERA C49M C-His no se obtuvo DR5P. Se puede presumir una inhibición de esta variante cuando la glucosa se encuentra en el medio de reacción, ya que no solo la síntesis de DR5P sino también la reacción retroaldólica, se vieron disminuidas en presencia de dicho sustrato.

4.5. Referencias bibliográficas

1. Borbone, N., Piccialli, G., Roviello, G.N., and Oliviero, G. (2021). Nucleoside analogs and nucleoside precursors as drugs in the fight against SARS-CoV-2 and other coronaviruses. *Molecules* 26, 1–17.
2. Seley-Radtke, K.L., and Yates, M.K. (2018). The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Res.* 154, 66–86.
3. Guinan, M., Benckendor, C., Smith, M., and Miller, G.J. (2020). Recent Advances in the Chemical Synthesis and Evaluation of Anticancer Nucleoside Analogues Mieke. *Molecules* 25, 2050.
4. Yates, M.K., and Seley-Radtke, K.L. (2019). The evolution of antiviral nucleoside analogues: A review for chemists and non-chemists. Part II: Complex modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Res.* 162, 5–21.
5. Mikhailopulo, I. (2007). Biotechnology of Nucleic Acid Constituents - State of the Art and Perspectives. *Curren Org. Chem.* 11, 317–335.
6. Del Arco, J., Acosta, J., and Fernández-Lucas, J. (2021). New trends in the biocatalytic production of nucleosidic active pharmaceutical ingredients using 2'-deoxyribosyltransferases. *Biotechnol. Adv.* 51, 107701.
7. Taverna-Porro, M., Bouvier, L.A., Pereira, C.A., Montserrat, J.M., and Iribarren, A.M. (2008). Chemoenzymatic preparation of nucleosides from furanoses. *Tetrahedron Lett.* 49, 2642–2645.
8. Hamon, N., Quintiliani, M., Balzarini, J., and McGuigan, C. (2013). Synthesis and biological evaluation of prodrugs of 2-fluoro-2-deoxyribose- 1-phosphate and 2,2-difluoro-2-deoxyribose-1-phosphate. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 23, 2555–2559.
9. Ogawa, J., Saito, K., Sakai, T., Horinouchi, N., Kawano, T., Matsumoto, S., Sasaki, M., Mikami, Y., and Shimizu, S. (2003). Microbial production of 2-deoxyribose 5-phosphate from acetaldehyde and triosephosphate for the synthesis of 2'-deoxyribonucleosides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 933–936.
10. Horinouchi, N., Ogawa, J., Sakai, T., Kawano, T., Matsumoto, S., Sasaki, M., Mikami, Y., and Shimizu, S. (2003). Construction of deoxyriboaldolase-overexpressing *Escherichia coli* and its application to 2-deoxyribose 5-phosphate synthesis from glucose and acetaldehyde for 2'-deoxyribonucleoside production. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3791–3797.
11. Valino, A.L., Palazzolo, M.A., Iribarren, A.M., and Lewkowicz, E. (2012). Selection of a new whole cell biocatalyst for the synthesis of 2-deoxyribose 5-phosphate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 300–308.
12. Valino, A.L., Iribarren, A.M., and Lewkowicz, E. (2015). New biocatalysts for one pot multistep enzymatic synthesis of pyrimidine nucleoside diphosphates from readily available reagents. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 114, 58–64.
13. Burton, K. (1968). Determination of DNA concentration with diphenylamine.

Methods Enzymol. 12, 163–166.

14. Burton, K. (1956). A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62, 315–323.
15. Koch, K., van den Berg, R.J.F., Nieuwland, P.J., Wijtmans, R., Wubbolts, M.G., Schoemaker, H.E., Rutjes, F.P.J.T., and van Hest, J.C.M. (2008). Enzymatic synthesis of optically pure cyanohydrins in microchannels using a crude cell lysate. *Chem. Eng. J.* 135, 89–92.
16. Ručigaj, A., and Krajnc, M. (2013). Optimization of a crude deoxyribose-5-phosphate aldolase lysate-catalyzed process in synthesis of statin intermediates. *Org. Process Res. Dev.* 17, 854–862.
17. Grabner, B., Pokhilchuk, Y., and Gruber-Woelfler, H. (2020). DERA in flow: Synthesis of a statin side chain precursor in continuous flow employing deoxyribose-5-phosphate aldolase immobilized in alginate-luffa matrix. *Catalysts* 10, 137.
18. Kuncham, R., Gurumurthy, K.T., Chandan, N., Javed, A., Ashwini, L.S., Shenoi, R., and Baranwal, A. (2014). Biocatalytic ketone reduction - a study on screening and effect of culture conditions on the reduction of selected ketones. *Int. Lett. Nat. Sci.* 1, 54–77.
19. Kim, Y.M., Choi, N.S., Kim, Y.O., Son, D.H., Chang, Y.H., Song, J.J., and Kim, J.S. (2010). Expression and characterization of a novel deoxyribose 5-phosphate aldolase from *Paenibacillus* sp. EA001. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 995–1000.
20. Woo, M.H., Kim, M.S., Chung, N., and Kim, J.S. (2014). Expression and characterization of a novel 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase from *Haemophilus influenzae* Rd KW20. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 57, 655–660.
21. Horinouchi, N., Ogawa, J., Sakai, T., Kawano, T., Matsumoto, S., Sasaki, M., Mikami, Y., and Shimizu, S. (2003). Construction of deoxyriboaldolase-overexpressing *Escherichia coli* and its application to 2-deoxyribose 5-phosphate synthesis from glucose and acetaldehyde for 2'-deoxyribonucleoside production. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3791–3797.
22. Glick, B.R. (1995). Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol. Adv.* 13, 247–261.
23. Jennewein, S., Schürmann, M., Wolberg, M., Hilker, I., Luiten, R., Wubbolts, M., and Mink, D. (2006). Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-d-ribose 5-phosphate aldolase. *Biotechnol. J.* 1, 537–548.
24. Jiao, X.C., Pan, J., Xu, G.C., Kong, X.D., Chen, Q., Zhang, Z.J., and Xu, J.H. (2015). Efficient synthesis of a statin precursor in high space-time yield by a new aldehyde-tolerant aldolase identified from *Lactobacillus brevis*. *Catal. Sci. Technol.* 5, 4048–4054.

(esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

Capítulo 5

Síntesis biocatalizada de 2,4,6-tridesoxi
D-eritro-hexapiranosas

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

5.1. Introducción

La reacción aldólica es una de las reacciones más utilizadas para llevar a cabo la formación de enlaces C-C. En la actualidad se ha dado gran relevancia a aquellos procedimientos en los cuales la asimetría de la reacción no depende de la estructura o estereoquímica del sustrato, sino que es controlada por el catalizador. A diferencia de la reacción química, la estereoselectividad de la reacción aldólica catalizada por aldolasas cumple con dicha característica ya que, en general, es controlada por la enzima y no depende de la estructura del sustrato, lo que hace que la estereoquímica del producto, algunas veces, sea muy predecible.¹ La aplicación de las aldolasas como biocatalizadores puede, por lo tanto, rendir productos enantioméricamente puros a partir de sustratos no quirales. Como mencionamos anteriormente, aunque DERA cataliza naturalmente la síntesis de DR5P a partir de G3P, su empleo puede extenderse a una amplia variedad de sustratos aceptores electrofílicos produciendo centros quirales con configuración S.² Otra característica importante de esta enzima es su capacidad de catalizar adiciones aldólicas secuenciales, debido a que tanto sus sustratos como sus productos son aldehídos. Dicha reacción se realiza con un completo control estereoquímico y, cuando se utiliza acetaldehído tanto como sustrato dador como aceptor, esta reacción rinde 2,4,6-tridesoxiD-eritro-hexapiranos (TDHP). Como se puede observar en la **figura 5.1**, la TDHP puede formarse como una mezcla anomérica (α/β). El producto de esta biotransformación puede ser utilizado como un precursor de la cadena lateral de las estatinas.³

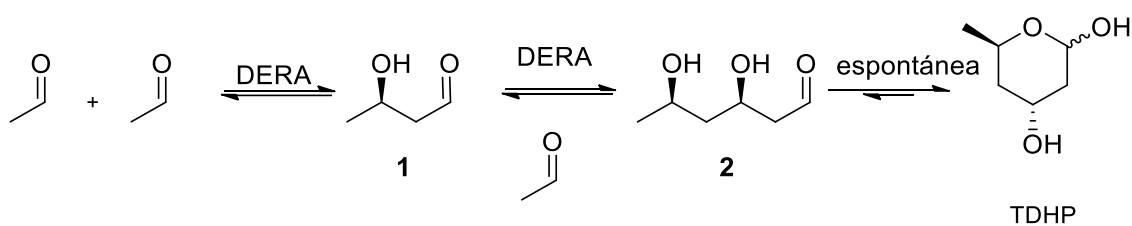


Figura 5. 1: Síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranos.

El empleo de DERA en la síntesis de TDHP conduce a reacciones limpias, de alto rendimiento y de bajo costo, con una elevada pureza química y estereoquímica de sus

dos centros quirales. Sin embargo, una de las limitaciones del empleo de esta enzima es que se inhibe a altas concentraciones de acetaldehído, lo que supone un problema para realizar reacciones a gran escala. La búsqueda de nuevas DERA's resistentes a altas concentraciones de acetaldehído, se encuentra en expansión.⁴

Dick y colaboradores han reportado una DERA de *Corynebacterium bovis* modificada genéticamente en la cisteína de la posición 47 para mejorar su tolerancia a acetaldehído. La actividad remanente, tanto de la enzima recombinante como de la *wild-type*, fue analizada.⁵ Para tal fin la enzima se incubó durante 18 h con 100 mM, 200 mM o 300 mM de acetaldehído y luego se midió la actividad hidrolítica de la enzima con el método acoplado a la oxidación de NADH. La **figura 5.2** muestra que para la enzima *wild-type*, luego de dos horas de incubación con acetaldehído a 200mM y 300mM, la actividad se redujo al 50 %. Sin embargo, luego de 18 h de incubación con acetaldehído, la enzima recombinante (DERA C47) siguió siendo activa.

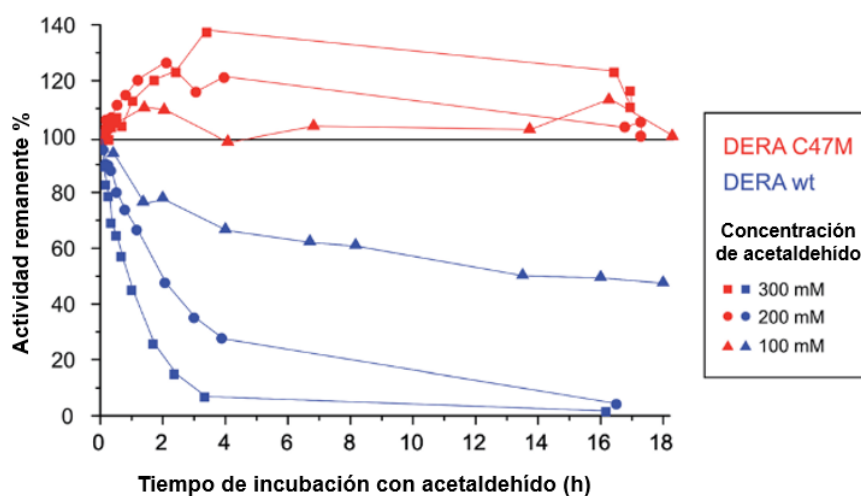


Figura 5. 2: Actividad remanente para DERA de *Corynebacterium bovis* luego de la incubación con acetaldehído. Extraído de Dick et al. ⁵

La actividad remanente de la variante PaDERA C49M C-His fue determinada por el grupo holandés colaborador de la misma manera descrita anteriormente.⁶ Como se puede observar en la **figura 5.3**, la actividad se conserva en un 100%, luego de 100 min

de incubación con las tres concentraciones de acetaldehído. Estos ensayos se hicieron con la enzima aislada.

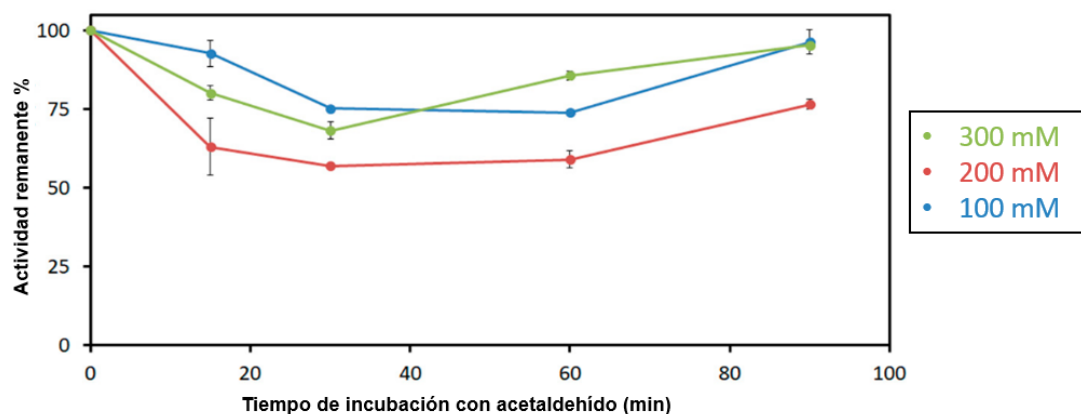


Figura 5. 3: Actividad remanente para *PaDERA* C49M C-His luego de la incubación con acetaldehído. Extraído de Haridas et al.⁶

Esta variante fue, además, testeada por este grupo en la síntesis de TDHP utilizando 3 mg/ml de células y 100 mM de acetaldehído, obteniendo una conversión máxima de 50 % a las 48 h de reacción.

En este capítulo se describe la puesta a punto del método de obtención de TDHP como modelo de síntesis de acetales cíclicos. Para tal fin se utilizaron las bacterias recombinantes, desarrolladas en el capítulo 3: *Escherichia coli* conteniendo *PaDERA* N-His, *PaDERA* C49M C-His, *LbDERA* C42M E78K C-His. Estas bacterias se utilizaron como células enteras.

(esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

5.2. Materiales y métodos

Los reactivos analíticos y los sustratos fueron adquiridos en Sigma Aldrich. Los solventes orgánicos utilizados, fueron de Sintorgan. Los componentes del medio de cultivo fueron de Britania y Biopack.

Escherichia coli BL21 DE3 se obtuvo de Invitrogen. Se utilizaron las cepas recombinantes *Escherichia coli* BL21 DE3 conteniendo los plásmidos: PaDERA N-His, PaDERA C49M C-His y LbDERA C42M E78K C-His.

Los medios de cultivo utilizados fueron: LB y LB-Kana

5.2.1 Cultivo de *Escherichia coli* BL21 DE3

A partir del stock de trabajo de *Escherichia coli* BL21 DE3 se realizó un cultivo en 250 ml de medio LB y se dejó overnight a 37°C y 200 rpm. Al día siguiente el cultivo se centrifugó a 4°C y 9000 rpm y se descartó el sobrenadante. Las células enteras se resuspendieron en buffer fosfato de potasio pH 7 100 mM hasta obtener una concentración de 30 g de células en 100 ml de buffer para ser utilizadas como biocatalizadores.

5.2.2 Cultivo de bacterias recombinantes

A partir del stock de trabajo de *Escherichia coli* BL21 conteniendo los plásmidos (PaDERA N-His, PaDERA C49M C-His y LbDERA C42M E78K C-His) se realizó un preinóculo de 5 ml de medio LB-kana y se dejó overnight a 37°C y 200 rpm. Al día siguiente, se utilizaron 2,5 ml del cultivo para inocular 250 ml de medio LB-Kana y se lo dejó a 37°C y 200 rpm hasta $DO_{600}=0,5$. Se agregó IPTG en una concentración final de 50 mM, 100mM, 400 mM o 1 M y se dejó *overnight* a 28 °C y 180 rpm. Una vez transcurridas las 16 hs, el cultivo se centrifugó a 4°C y 9000 rpm y se descartó el sobrenadante. Las células enteras se resuspendieron en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7 hasta obtener una concentración de 30 g de células en 100 ml de buffer para ser utilizadas como biocatalizadores.

5.2.3 Tolerancia a acetaldehído de los biocatalizadores

La suspensión de células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His, PaDERA C49M C-His o LbDERA C42M E78K C-His (obtenidas en el inciso 5.2.2) se diluyó en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7 hasta obtener una concentración de 15% v/v. A 1 ml de células en suspensión se le agregó acetaldehído en una concentración 0 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM o 500 mM y se agitó a 200 rpm a 28°C por 48 h. La suspensión se centrifugó, se descartó el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspendió en 500 µl de buffer fosfato pH 7 100mM. 20 µl de esta suspensión se plaquearon en medio sólido de LB-Kana. Las placas se incubaron durante un día a 37°C.

5.2.4 Síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa, reacción estándar

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 1 ml, conteniendo 15% p/v de pellet bacteriano (*Escherichia coli* BL21 DE3 conteniendo PaDERA N-His, PaDERA C49M C-His o LbDERA C42M E78K C-His) y acetaldehído (200 mM) en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7 y la reacción se dejó en agitación a 28°C y 200 rpm. Al cabo de 24 h las muestras se centrifugaron a 9000 rpm durante 5 minutos, se descartó el pellet y se conservó el sobrenadante.

Al sobrenadante obtenido se le agregaron dos volúmenes de acetonitrilo y 2 mg de NaCl. Se llevó a frío durante 5 minutos, se separaron las fases y la fase orgánica se conservó para su posterior análisis.

5.2.5 Optimización de tiempo de reacción y concentración de acetaldehído

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 1 ml, conteniendo 15% p/v de pellet de *Escherichia coli* BL21 DE3 conteniendo los plásmidos PaDERA C49M C-His o LbDERA C42M E78K C-His en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7. Se agregó acetaldehído en una concentración de 100 mM, 200 mM, 300mM o 500 mM y se siguió durante 48 h tomando alícuotas de 50 µL a las 3 h, 6 h, 12 h, 24 h y 48 h. Las muestras se centrifugaron a 9000 rpm durante 5 minutos, se descartó el pellet y se conservó el sobrenadante.

5.2.6 Síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas, escala preparativa

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 4 ml, conteniendo 15% p/v de pellet de *Escherichia coli* BL21 PaDERA C49M C-His y acetaldehído (200 mM) en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7. La reacción se dejó en agitación a 28°C. La reacción se centrifugó a 9000 rpm durante 5 minutos, se descartó el pellet y se conservó el sobrenadante.

Al sobrenadante obtenido se le realizaron tres extracciones con 2 ml de acetato de etilo. Se separaron las fases, se evaporó el solvente de la fase orgánica preparando una pastilla con Sílica gel 60: 0,040 – 0,063 mm (Sigma Aldrich). Se empaquetaron aproximadamente 1 g de Sílica gel 60 en una columna de vidrio con acetonitrilo, se sembró la pastilla y se eluyó con acetonitrilo:éter etílico (50:50 v/v). Se colectaron fracciones de 1 ml y se verificó la purificación mediante CCD. Las alícuotas se conservaron para su posterior análisis.

5.2.7 Análisis de las muestras

5.2.7.1 Cromatografía en capa delgada

Las muestras se analizaron mediante cromatografía en capa delgada (CCD) sobre placa de sílica gel (con un soporte de aluminio) con un indicador F254 (Merck). usando dos fases móviles: a) acetonitrilo:éter etílico, 50:50 (v/v) o b) acetato de etilo: éter de petróleo, 50:50 (v/v). Las placas se revelaron mediante exposición a ácido sulfúrico al 5% en etanol y posteriormente se sometieron a calor. R_f de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas: a) 0,6; b) 0,15.

5.2.7.2 Resonancia magnética nuclear

Para los experimentos de ¹H RMN se utilizaron dos equipos: Avance Neo 500 (Bruker) a 500 MHz y AVIII 600 (Bruker Biospin) a 600 MHz. Para los experimentos de ¹³C RMN se utilizó Avance II 500 (Madison, WI, EE.UU.) a 126 MHz. Las soluciones se prepararon disolviendo el compuesto en 700 µL de CDCl₃. Se observan las siguientes señales:

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 5.50 – 5.42 (m, 1H), 5.35 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 4.44 (dq, J = 12.5, 6.3, 2.4 Hz, 1H), 4.29 – 4.03 (m, 4H), 3.87 (tt, J = 11.1, 4.7 Hz, 1H), 3.56 (dq,

$J = 12.5, 6.3, 2.1 \text{ Hz}$, 1H), 2.38 – 2.26 (m, 1H), 2.14 (ddt, $J = 12.6, 4.7, 1.8 \text{ Hz}$, 1H), 1.95 (ddt, $J = 12.5, 4.8, 2.0 \text{ Hz}$, 1H), 1.88 – 1.81 (m, 2H), 1.60 – 1.47 (m, 1H), 1.31 – 1.29 (m, 3H), 1.23 (dd, $J = 6.3, 3.7 \text{ Hz}$, 6H).

^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3) δ 94.32 C-1, 93.04 C-1', 68.35 C-5, 66.84 C-5', 65.11 C-3, 64.17 C-3', 42.85 C-2, 42.31 C-2', 39.92 C-4, 39.11 C-4', 21.48 C-6, 21.26 C-6'.

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 5.34 (t, $J = 4.7 \text{ Hz}$, 1H, H-1 α), 5.22 – 5.12 (m, 1H, H-2 β), 4.35 (q, $J = 3.1 \text{ Hz}$, 1H, H-5 α), 4.24 (dt, $J = 6.4, 3.1 \text{ Hz}$, 1H, H-5 β), 3.17 (d, $J = 6.1 \text{ Hz}$, 1H, H-3 β), 3.01 (d, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 1H, H-3 α), 2.05 – 1.95 (m, 2H, H-2 α/β), 1.83 (tq, $J = 12.1, 3.1 \text{ Hz}$, 2H, H-2 α/β), 1.68 - 1.52 (m, 4H, H-4 α/β), 1.26 (d, $J = 6.3 \text{ Hz}$, 3H, H-6 β), 1.24 (d, $J = 6.3 \text{ Hz}$, 3H, H-6 α).

5.2.7.3 Cromatografía gaseosa

Para el análisis cualitativo se utilizó un cromatógrafo gaseoso (Bruker micrOTOF-Q II) acoplado a un detector de masa (CG-MS). Se empleó una columna Rxi-5ms (0,25 μm , 0,25 mm, 30 m). Las condiciones de corrida fueron: temperatura del inyector 200°C, temperatura de la columna: 5 minutos a 50°C, un gradiente de 10°C/min hasta 250°C y 5 minutos a 250°C. El tiempo total de corrida fue 30 min. Volumen de inyección 1 μl , split: 1:50, calentador: 280°C.

Para el análisis cuantitativo se empleó un cromatógrafo gaseoso (Thermo Trace 1300) acoplado a un detector de llama (CG-FID). Se empleó con una columna TRACE TR-5MS (0,25 μm , 0,25 mm, 30 m). Las condiciones de corrida fueron descritas en el **inciso 4.2.7.3.2** junto con las curvas de calibración del estándar interno y de TDHP.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1 Tolerancia a acetaldehído de los biocatalizadores

Debido a que los resultados reportados por el grupo colaborador solo muestran la tolerancia de la enzima libre en acetaldehído,⁶ se planteó estudiar dicha tolerancia en células enteras. *Escherichia coli* BL21 DE3 conteniendo los plásmidos PaDERA N-His, PaDERA C49M C-His o LbDERA C42M E78K C-His se incubaron durante 48 hs en distintas concentraciones de acetaldehído. Las bacterias se separaron del medio por centrifugación y el pellet bacteriano se resuspendió en *buffer*. La suspensión de células se plaqueó en medio sólido y al cabo de 24 hs se vio crecimiento para todas las condiciones (**figura 5.4**). Dichos resultados nos demuestran que el crecimiento de la célula no se ve inhibido hasta 500 mM de acetaldehído

Si bien medir la actividad enzimática de DERA en las bacterias recombinantes hubiese sido mejor parámetro, el método utilizado solo es compatible con la enzima libre. Como mencionamos en el **capítulo 3**, la actividad enzimática se mide por el consumo de DR5P que, en una célula, puede ser redirigido a otras rutas metabólicas interfiriendo con el resultado final. Es por este motivo que se decidió utilizar el crecimiento de la bacteria como un parámetro de la tolerancia de la misma hacia acetaldehído, sabiendo que las enzimas en su forma aislada lo eran hasta 300 mM.

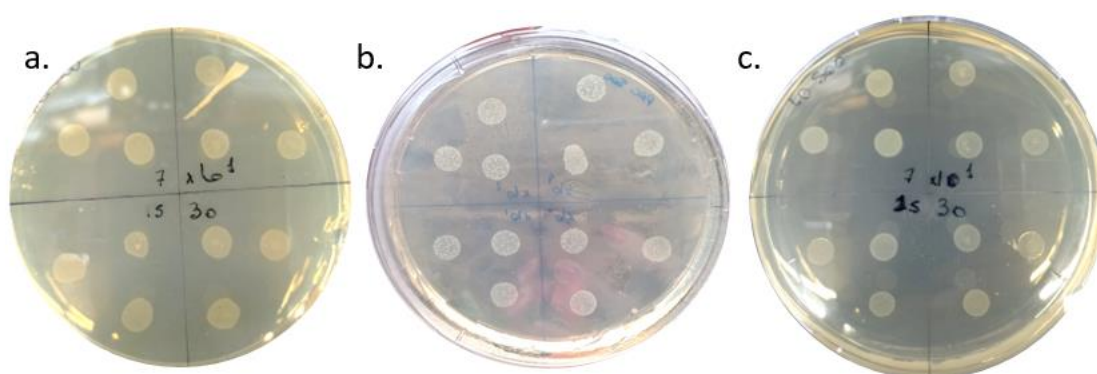


Figura 5. 4: Crecimiento de las bacterias luego de incubar con 500 mM de acetaldehído a. *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His b. *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His, c. *Escherichia coli* BL21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His.

Como se puede deducir, en comparación con las enzimas aisladas, las células enteras suelen ser más estables debido al entorno natural y, evitar la purificación de la enzima, reduce tiempos y costos en la biotransformación.^{7,8} Si bien el uso de células enteras como biocatalizadores es más común que el uso de la enzima aislada, esta metodología puede presentar algunos problemas que afectan el rendimiento de la reacción. Por ejemplo, problemas difusionales a través de la membrana de la célula o bien la posibilidad de una mayor degradación de los productos por otras enzimas presentes en la célula.⁹ Por lo cual es importante optimizar el tiempo de reacción, la cantidad de sustrato, entre otros.

La tolerancia a acetaldehído de *PaDERA* wt ya había sido testeada en un trabajo previo en el laboratorio. Utilizando la misma metodología, se determinó que la tolerancia de la bacteria *wild-type* tenía el máximo en 200 mM.¹⁰

5.3.2 Síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas

5.3.2.1 Empleando *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* N-His y *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* C49M C-His

5.3.2.1.1. Reacción en condiciones estándar, escala analítica

Para evaluar la actividad sintética de *Escherichia coli* BL21 DE3 conteniendo los plásmidos *PaDERA* N-His y *PaDERA* C49M C-His en la síntesis de TDHP se llevó a cabo la biotransformación empleando acetaldehído como único sustrato.¹¹ El acetaldehído se agregó a la suspensión de células en una concentración de 200 mM y la reacción se dio por finalizada a las 24 h. Se utilizaron como controles las células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 sin plásmido y *PaDERA* wt.

Para la purificación de cada muestra se utilizó acetonitrilo (ACN) y NaCl, según una metodología descrita en bibliografía.¹² Debido a que TDHP es bastante soluble en agua, la adición de NaCl produce un efecto *salting-out*, lo que disminuye la solubilidad de los compuestos orgánicos en la fase acuosa. De esta forma, una mayor cantidad de TDHP se disuelve en la fase orgánica. Dado que la solubilidad de ACN en agua es dependiente de la temperatura, la mezcla obtenida se llevó a un baño de hielo para lograr la separación completa de las fases. La fase orgánica superior se analizó cualitativamente mediante CCD utilizando como revelador ácido sulfúrico en etanol, el cual oxida los restos orgánicos dando manchas oscuras.

Al utilizar la cepa *wild type* (*PaDERA wt*) y *Escherichia coli* BL21 DE3 sin plásmido no se observó formación de producto. Este resultado nos demostró que no existe producción basal de TDHP para estas dos bacterias, ni existe reacción química no catalizada.

En cambio, al utilizar las bacterias recombinantes se observó la formación de TDHP como dos manchas de Rf cercanos, que corresponderían a los anómeros del producto (**figura 5.5**). Cabe aclarar que el acetaldehído no se observa en la placa a las concentraciones de trabajo. A partir del análisis cualitativo por CCD, se determinó la mayor conversión a TDHP para *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* C49M C-His.

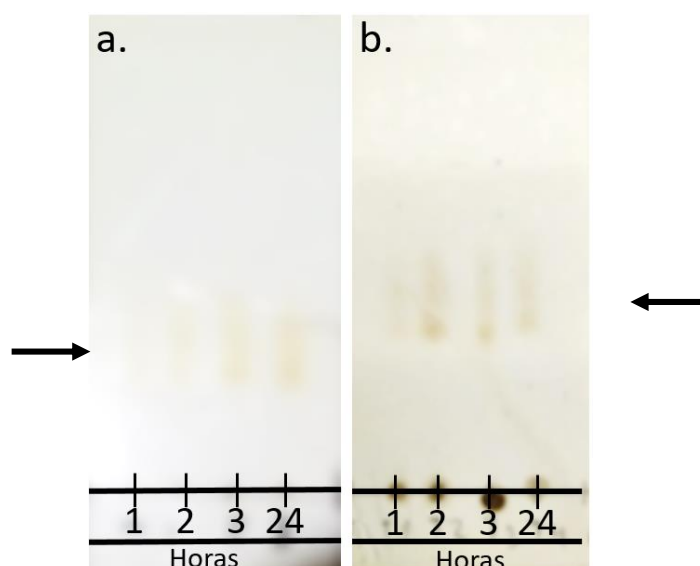


Figura 5. 5: CCD correspondiente a la síntesis de TDHP utilizando 200 mM de acetaldehído y a) *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* N-His b) *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* C49M C-His.

El análisis cuantitativo de cada muestra se realizó mediante CG-FID y, utilizando las curvas de calibración del producto (incluidas en el **inciso 4.2.7.3.2.**), se calculó el porcentaje de conversión.

Mientras que utilizando células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* N-His se obtuvo una conversión menor al 5% a las 24 hs de reacción, cuando se utilizaron células de *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* C49M C-His, la conversión obtenida a las 24 h de reacción fue aproximadamente diez veces mayor (66,2%). Similarmente a lo

obtenido en la síntesis de DR5Pa partir de G3P, el incremento en este valor, respecto de las otras variantes, puede atribuirse a su mayor nivel de expresión y actividad. Además, la mutación en cisteína 49 contribuye con la estabilidad de la enzima frente al acetaldehído. A la misma concentración de acetaldehído, la enzima no se inhibe y, por lo tanto, se genera mayor cantidad de producto al mismo tiempo de reacción. En la **tabla 5.1** se resumen los valores de conversión determinado para las reacciones ensayadas.

Tabla 5. 1: Resultados obtenidos para los biocatalizadores de *PaDERA* para la síntesis de TDHP en condiciones estándar. Nr: no reacciona.

Biocatalizador	Condiciones	Concentración TDHP	Conversión
<i>PaDERA</i> wt		Nr	Nr
<i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 <i>PaDERA</i> N-His	Acetaldehído 200mM, 24 h, 28 °C	1,6 mM	<5 %
<i>Escherichia coli</i> BL21 DE3 <i>PaDERA</i> C49M C-His		44,2 mM	66,3%

Los resultados antes descriptos indican que tanto *PaDERA* wt como *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* N-His no son biocatalizadores adecuados para la síntesis de TDHP, debido a las bajas conversiones obtenidas. En cambio, utilizando *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* C49M C-His se obtuvieron conversiones elevadas que permiten seleccionar a esta bacteria para seguir con las biotransformaciones planteadas para esta tesis.

5.3.2.1.2. Reacción en condiciones estándar, escala preparativa

A causa de los resultados obtenidos en el inciso anterior, se escaló la síntesis de TDHP utilizando *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* C49M C-His en condiciones estándar (200mM de acetaldehído, 24 h de reacción, 28°C) para obtener cantidades significativas de producto y realizar los correspondientes análisis cromatográficos y espectrofotométricos.

En este caso, se realizó la extracción de TDHP utilizando acetato de etilo, una metodología más sencilla que la descrita para la escala analítica. La fase orgánica se concentró y el producto de interés se purificó mediante cromatografía en columna. Las

fracciones enriquecidas con TDHP se secaron al vacío hasta obtener un peso constante. El cálculo del rendimiento de TDHP nos dio como resultado 75% del producto purificado.

5.3.2.1.3. Optimización de las condiciones experimentales, utilizando células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His

La reacción en condiciones estándar nos brindó las primeras ideas sobre la síntesis de TDHP y cómo llevar a cabo la purificación del producto. Sin embargo, fue necesario evaluar el tiempo de la reacción y la concentración de acetaldehído máxima permitida por el biocatalizador.

Con el fin de optimizar estos parámetros, se llevaron a cabo biotransformaciones con 100 mM, 200 mM, 300 mM y 500 mM de acetaldehído y se tomaron alícuotas a distintos tiempos. Las muestras se extrajeron con ACN como se describió anteriormente.

En este caso también se observó por CCD la formación de TDHP como dos manchas de R_f cercanos, correspondientes a los anómeros del producto y una mancha de R_f menor que correspondería a la forma abierta de la TDHP (**figura 5.6**).

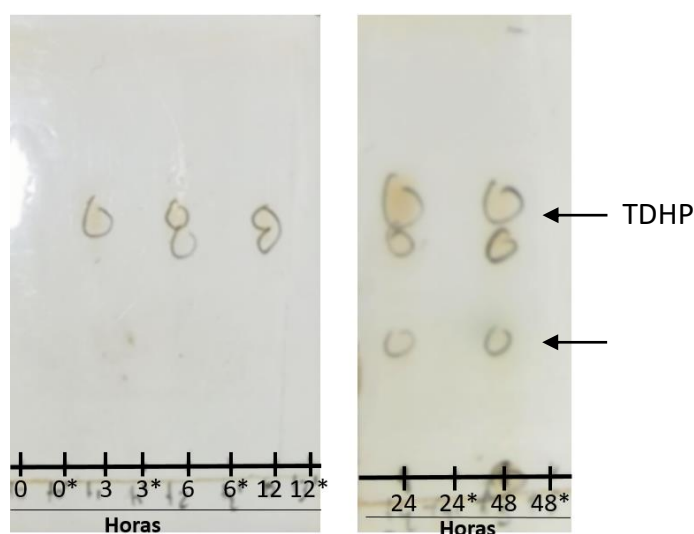


Figura 5. 6: CCD correspondiente a la reacción con 300 mM de acetaldehído. *Blanco sin acetaldehído.

El análisis cuantitativo de cada muestra se realizó mediante CG (**figura 5.7, 5.8, 5.9, 5.10**) y, comparando con las curvas de calibración del producto y del estándar interno (incluidas en el **inciso 4.2.7.3.**), se calculó el porcentaje de conversión para cada condición.

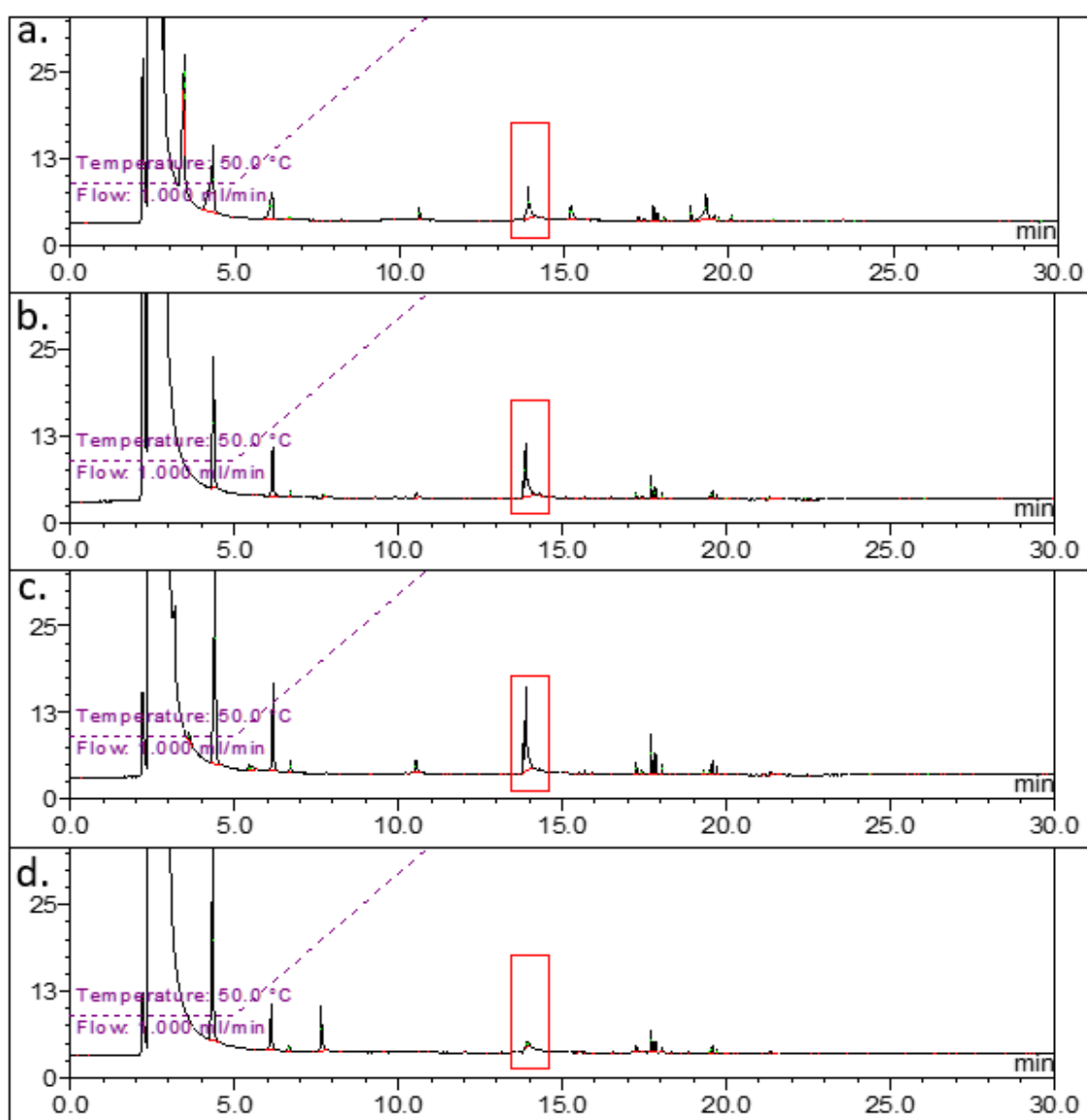


Figura 5. 7: Cromatogramas correspondientes a la reacción con 100 mM de acetaldehído. a) 6 h b) 12 h c) 24 h d) 48 h. la señal marcada correspondiente a TDHP.

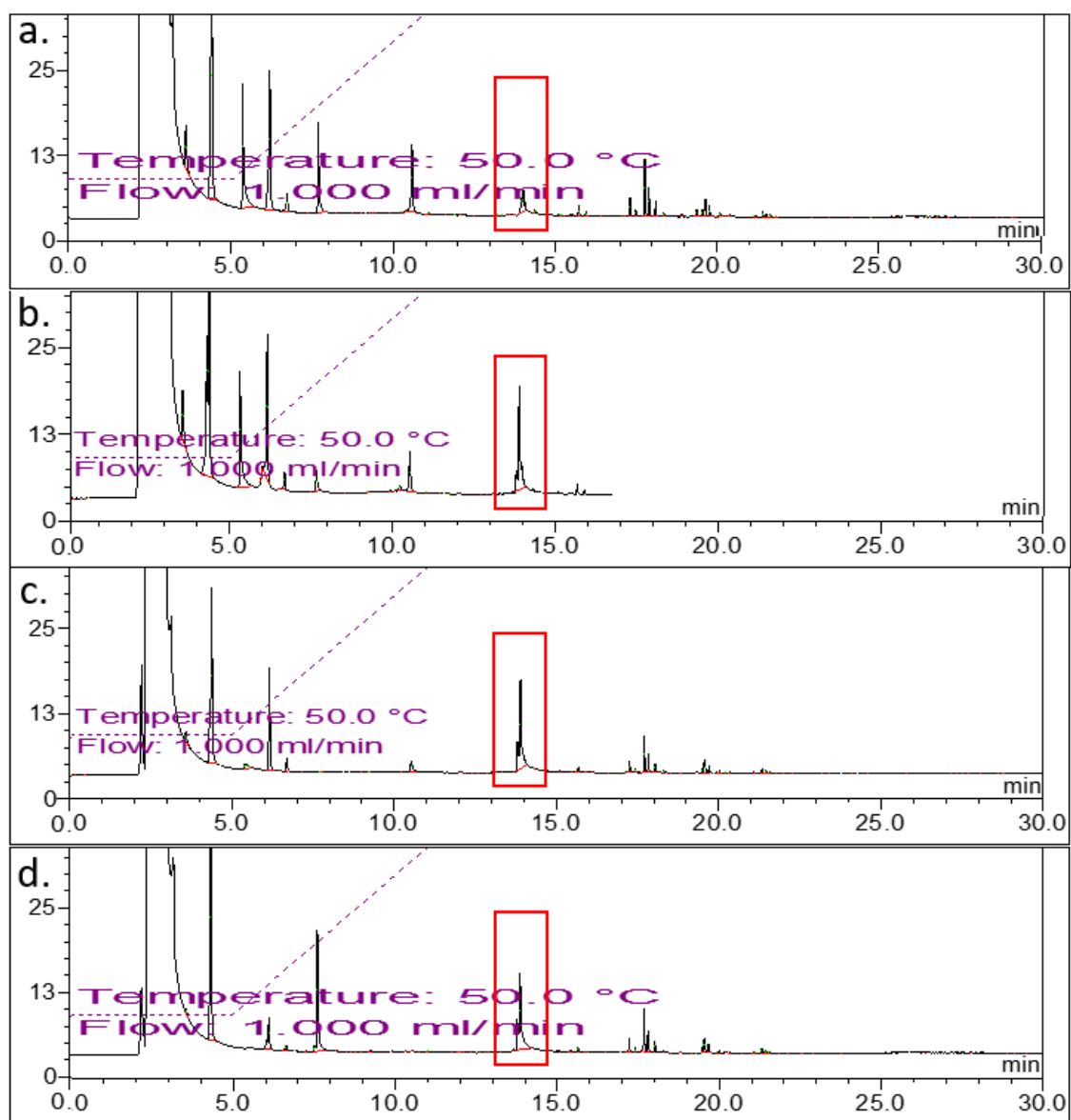


Figura 5. 8: Cromatogramas correspondientes a la reacción con 200 mM de acetaldehído. a) 6 h b) 12 h c) 24 h d) 48 h. la señal marcada correspondiente a TDHP.

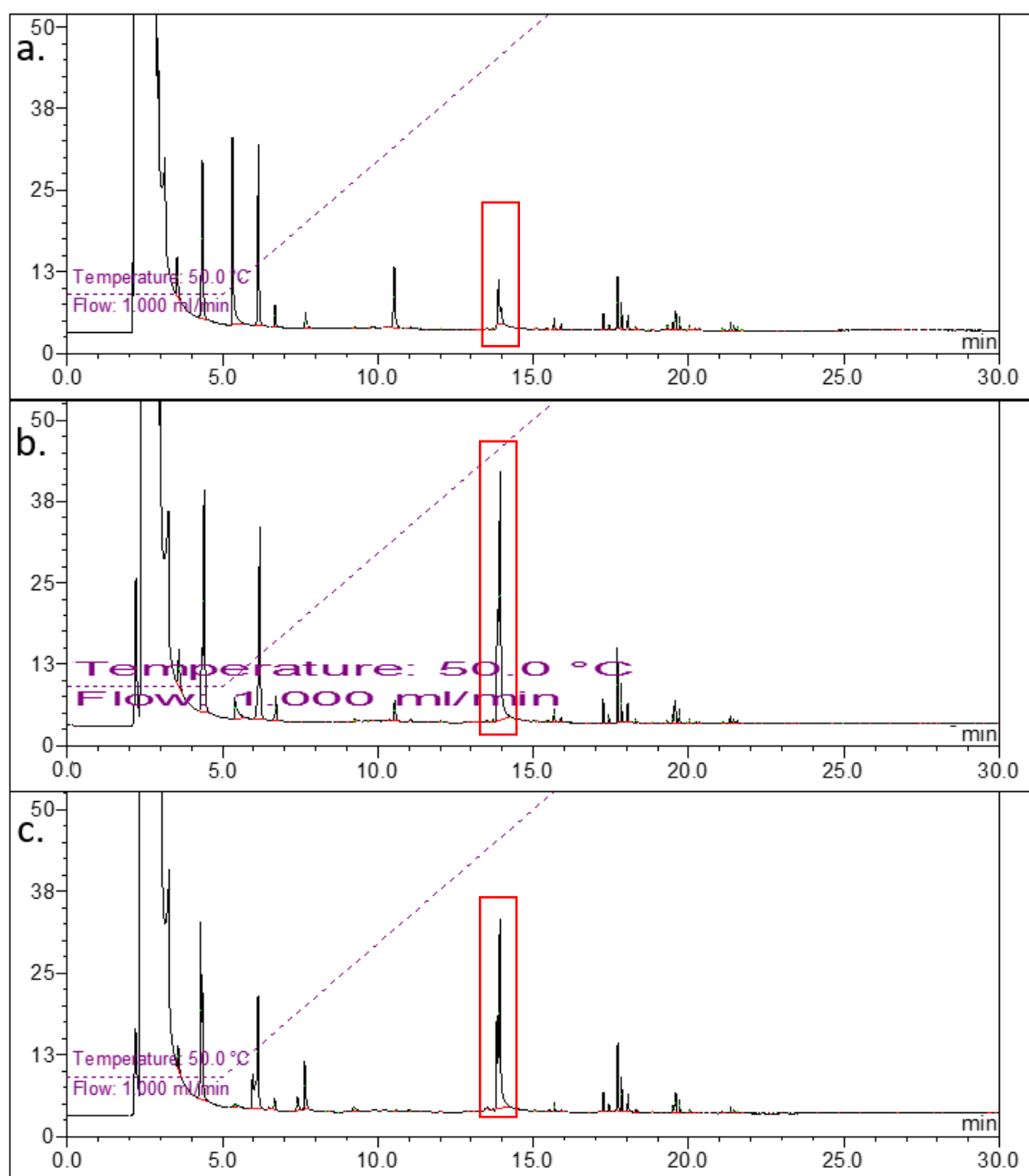


Figura 5. 9: Cromatogramas correspondientes a la reacción con 300 mM de acetaldehído. a) 6 h b) 24 h c) 48 h. la señal marcada correspondiente a TDHP.

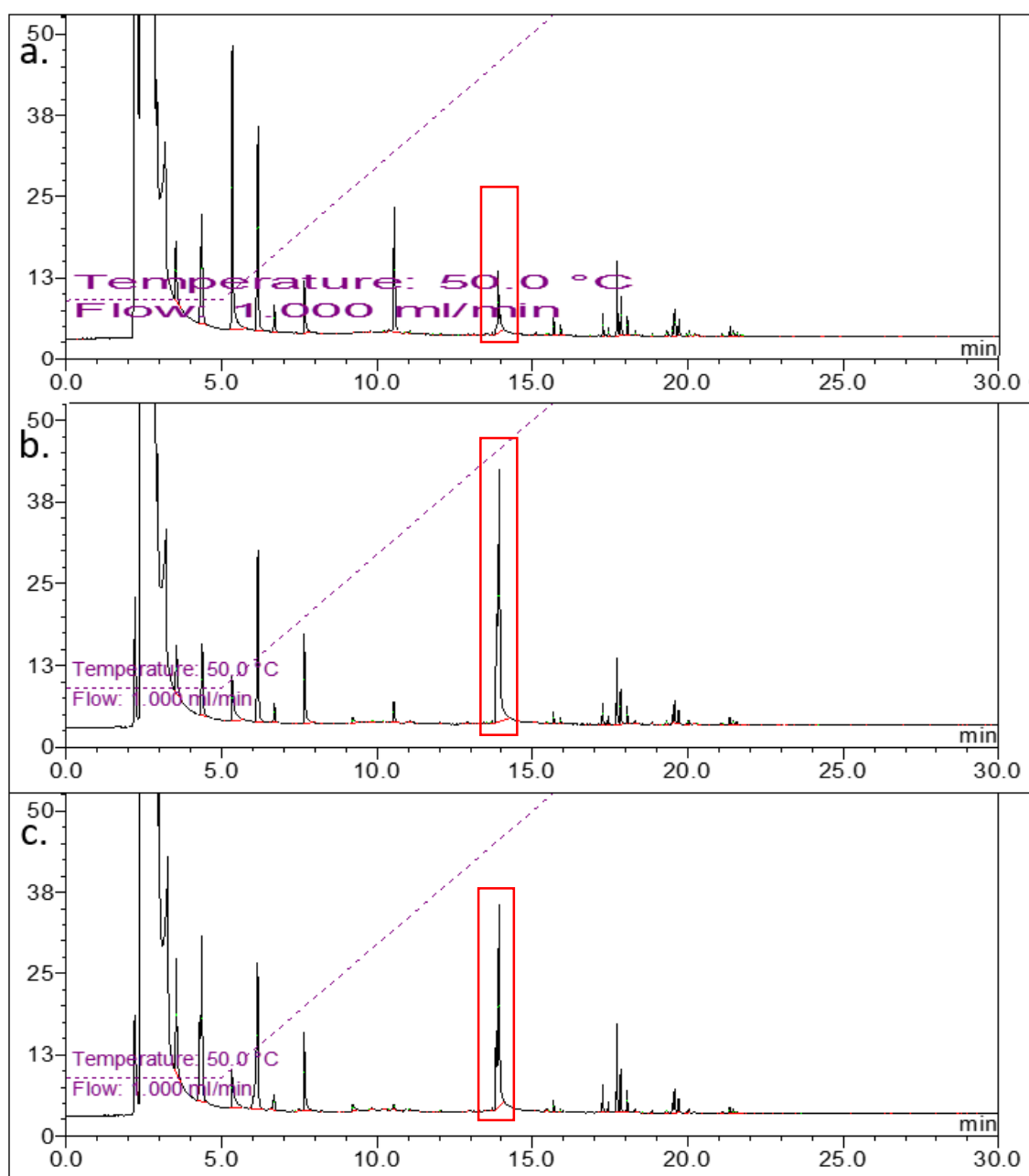


Figura 5. 10: Cromatogramas correspondientes a la reacción con 500 mM de acetaldehído. a) 6 h b) 24 h c) 48 h. la señal marcada correspondiente a TDHP.

En la **figura 5.11** se puede observar el curso de cada una de las reacciones.

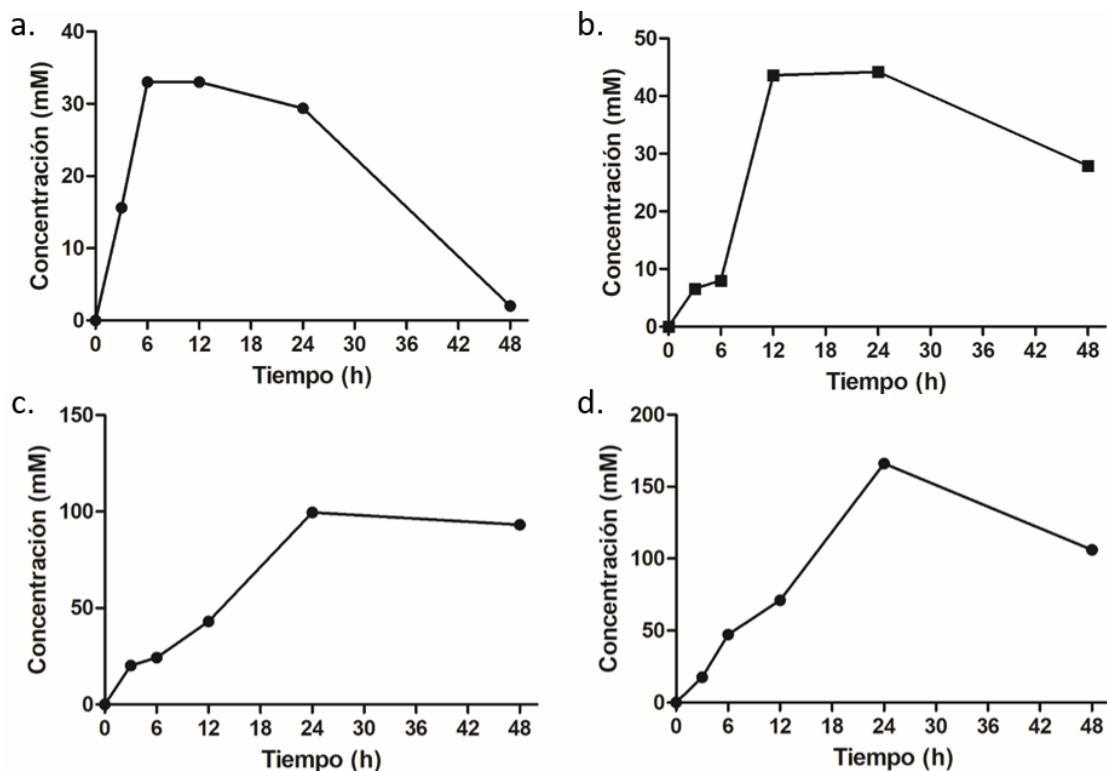


Figura 5. 11: Curso de la reacción de síntesis de TDHP utilizando acetaldehído en una concentración de a) 100 mM b) 200 mM c) 300 mM y d) 500 mM.

En la **figura 5.11a.** se observa el curso de la reacción utilizando 100 mM de acetaldehído. Al cabo de 6 h de reacción se obtuvo una conversión del 100% (33 mM). Podemos notar también que, transcurridas las 48 h, la cantidad de producto decae al 10% de conversión (2mM). A pesar de que TDHP es un hemiacetal muy estable frente a la reacción retroaldólica catalizada por DERA¹³, es posible que parte del producto sea utilizado por la bacteria en reacciones secundarias disminuyendo así la conversión.

Al utilizar 200 mM de acetaldehído (**figura 5.11b**), se obtiene una conversión máxima de 66,3% (44,2 mM) al día de reacción. Al igual que utilizando 100 mM de acetaldehído, la conversión de TDHP decae (a las 48 h).

La **figura 5.11c** muestra el curso de la reacción utilizando 300 mM de acetaldehído. Al cabo de 24 h de reacción se obtuvo una conversión >99%, correspondiente a 99,5 mM de TDHP. Si bien se tardó más en llegar a la conversión máxima respecto a las otras dos concentraciones de acetaldehído ensayadas (100 mM y 200 mM), la cantidad de TDHP obtenida fue mayor.

Notablemente, cuando se utiliza 500 mM de acetaldehído se obtuvo una conversión del 100% (166 mM de TDHP) a las 24 h de reacción. Si bien es la misma conversión que la obtenida para 300 mM, al partir de una mayor concentración de acetaldehído la concentración de TDHP es mayor, lo que es una ventaja con miras a un escalado de la reacción. La **figura 5.11d** muestra el curso de la reacción utilizando 500 mM de acetaldehído.

En la **figura 5.12** se puede observar el rendimiento de las reacciones usando PaDERA C49M C-His con las distintas concentraciones de acetaldehído. En la mayoría de las reacciones analizadas, se llega a un máximo de conversión a las 24 h. Adicionalmente podemos mencionar que, al utilizar células enteras se incrementa la tolerancia a acetaldehído respecto a los datos reportados para la enzima purificada, probablemente por encontrarse la enzima en un microentorno más favorable. La actividad de la enzima purificada se mantiene solo hasta 300mM, mientras que para las células enteras la actividad se mantuvo hasta 500mM.⁶

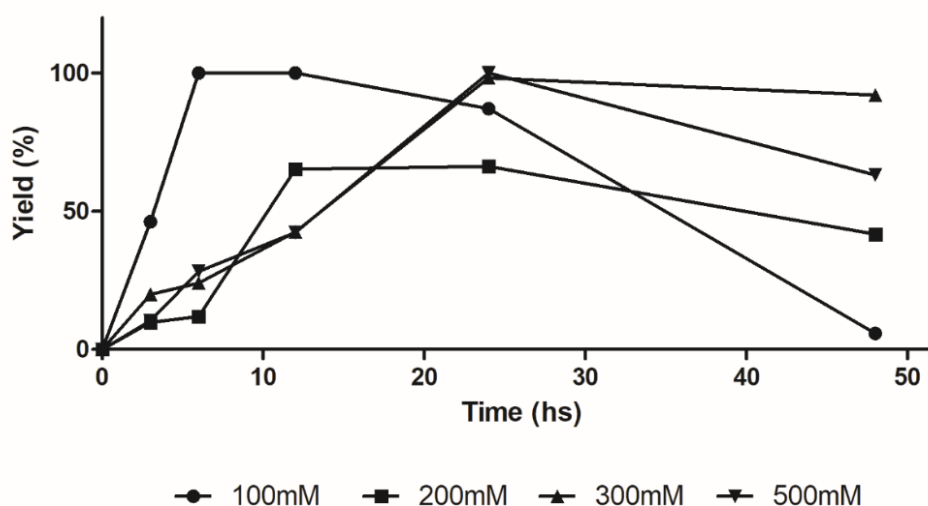


Figura 5. 12: Rendimiento de TDHP utilizando *Escherichia coli* PaDERA C49M C-His.

5.3.2.2 Empleando *Escherichia coli* BL21 DE3 *LbDERA* C47M E78K C-His

5.3.2.2.1. Reacción en condiciones estándar, escala analítica

Con el fin de evaluar la actividad sintética de *Escherichia coli* BL21 DE3 *LbDERA* C42M E78K C-His en la síntesis de TDHP, se llevó a cabo la biotransformación empleando acetaldehído como único sustrato, tal como se describió anteriormente. Las células se incubaron durante 48 h con 200 mM de acetaldehído tomando alícuotas a distintos tiempos. Posteriormente la mezcla de reacción se purificó utilizando ACN y NaCl y se analizaron mediante CCD. En el análisis cualitativo de la reacción se observó la máxima formación de TDHP a las 48 h de reacción (**figura 5.13**).

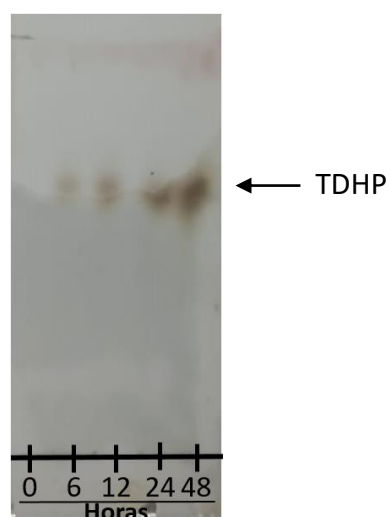


Figura 5. 13: CCD correspondiente a la síntesis de TDHP utilizando *Escherichia coli* BL21 DE3 *LbDERA* C42M E78K C-His.

Al momento de realizar estas reacciones y por problemas con el detector del GC-FID perteneciente a nuestro laboratorio durante el período de emergencia sanitaria COVID19, no fue posible obtener el valor de conversión de la reacción, es por ello que se tomaron en cuenta los valores de los ensayos cualitativos por CCD.

5.3.2.2.2. Reacción en condiciones estándar, escala preparativa

Debido a los resultados positivos obtenidos en la escala analítica, se decidió escalar la reacción empleando las condiciones estándar (200 mM y 28°C), con el fin de obtener cantidades significativas de producto y realizar los correspondientes análisis cromatográficos y espectrofotométricos.

La extracción de TDHP se realizó utilizando acetato de etilo, la fase orgánica se concentró y se purificó el producto de interés mediante una cromatografía en columna. Las fracciones enriquecidas con TDHP se secaron al vacío hasta obtener un peso constante. El cálculo del rendimiento de TDHP dio como resultado un 62%, ligeramente menor que el obtenido con *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His.

5.3.2.2.3. Optimización de las condiciones experimentales, utilizando células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His

Para evaluar la concentración de acetaldehído máxima permitida por *Escherichia coli* BL21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His, se utilizó este biocatalizador frente a distintas concentraciones de acetaldehído (100 mM, 200 mM, 300 mM o 500 mM). Para tal fin, se procedió de la misma manera que utilizando *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His.

El análisis cualitativo de las reacciones por CCD demostró que utilizando este biocatalizador también se obtuvieron los dos anómeros de TDHP como dos manchas de R_f cercanos. Además, al comparar la reacción de formación de TDHP a las 48 h (**figura 5.14**), se puede observar que cuando se utiliza 500 mM la señal correspondiente a TDHP es menor respecto a cuándo se utiliza 100 mM o 300 mM. Sin embargo, como mencionamos anteriormente, no fue posible realizar el análisis cuantitativo de cada muestra a distintos tiempos, lo cual nos daría un valor claro sobre la conversión obtenida y el tiempo óptimo de reacción.

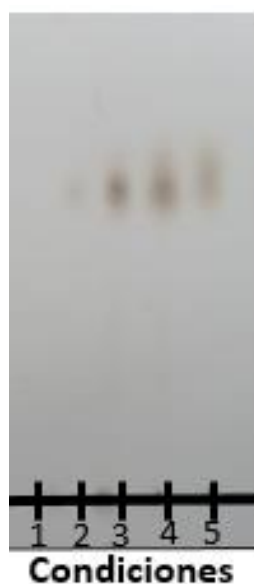


Figura 5. 14: CCD correspondiente a la síntesis de TDHP utilizando *Escherichia coli* BL21 DE3 *LbDERA* C42M E78K C-His. Concentración de acetaldehído: 1 = 0 mM, 2 = 100 mM, 3 = 200 mM, 4 = 300 mM y 5 = 500 mM.

5.3.3 Determinación estructural de TDHP

5.3.3.1 Por análisis de masas

Debido a que, como se ha reportado en bibliografía, en los cromatogramas también se pueden observar las señales correspondientes a la estructura abierta en equilibrio del hemiacetal y a productos intermedios (Compuestos 1 y 2 **figura 5.1**),¹³ se utilizó GC-MS para identificar la señal correspondiente a TDHP en un crudo de reacción sin purificar (**figura 5.15**).

Siguiendo las rupturas comunes para piranosas descritas por Lönngrén¹⁴ se analizó el cromatograma **5.15** y se asignaron las rupturas para la señal de $t_r = 13,9$ minutos. En el espectro de masas obtenido para esta señal (**figura 5.16**) se observa una ruptura de $m/z = 114$ correspondiente a la pérdida de una molécula de agua. Además, se observan las señales en $m/z = 68$ y $m/z = 70$, con una abundancia relativa mayor, correspondientes a la pérdida de una molécula de agua y de una molécula de etanol. Esta última ruptura es una de las más características para piranosas. Estos resultados nos permitieron identificar la señal correspondiente a TDHP.

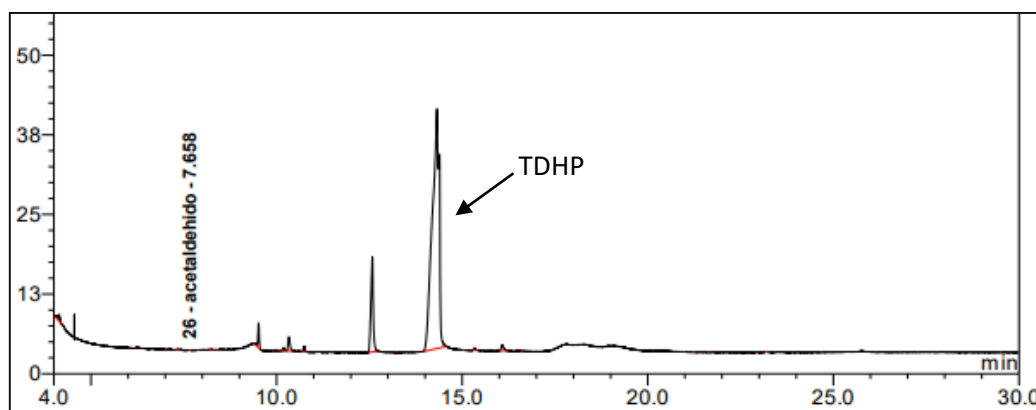


Figura 5. 15: GC correspondiente a la reacción de síntesis de TDHP.

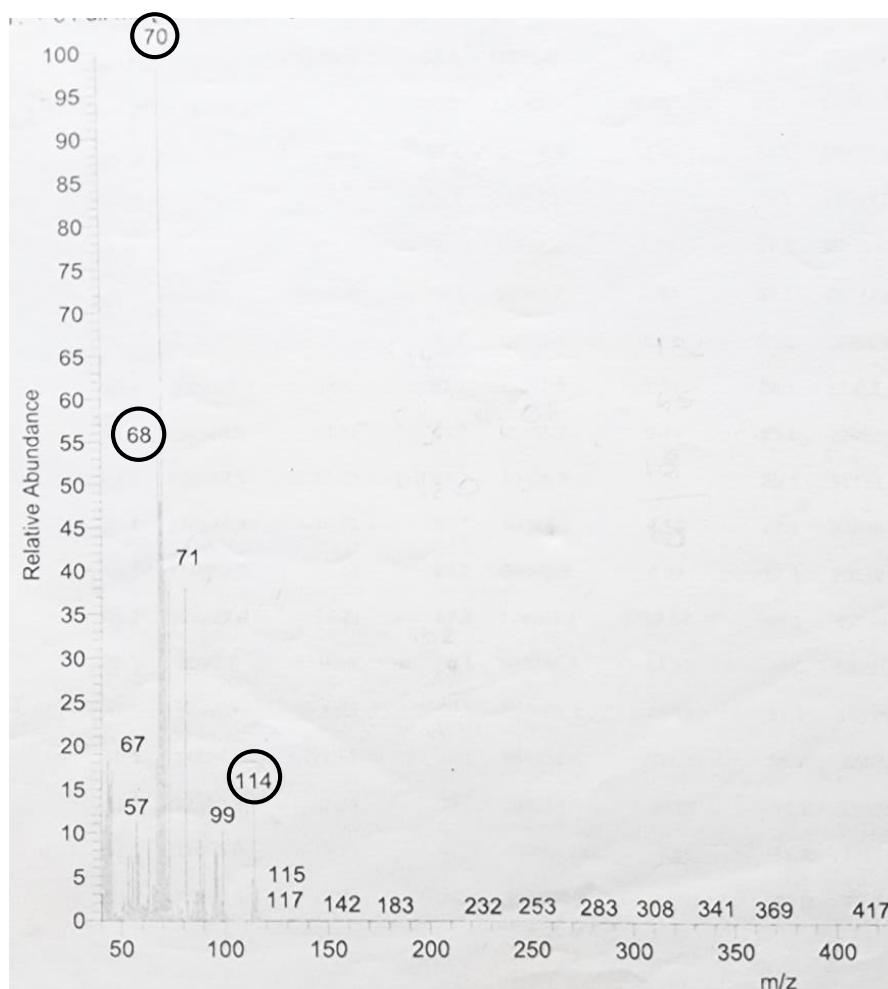


Figura 5. 16: Espectro de masas para la señal de Tr= 13,9 min.

5.3.3.2 Por RMN

5.3.3.2.1. Del crudo

Debido a que la purificación por columna puede alterar la proporción original de anómeros, con el propósito de determinar inequívocamente dicha proporción, se realizó un análisis espectroscópico de RMN de una muestra de la mezcla de reacción.

En primer lugar, en este espectro protónico (**figura 5.17**) no se aprecia ninguna señal característica correspondiente a hidrógeno del grupo funcional aldehído (10-11 ppm), lo que demuestra la ausencia del acetaldehído y de las especies intermediarias (**figura 5.1**). En segundo lugar, se observan las señales correspondientes a cada uno de los hidrógenos de los carbonos anoméricos (α y β) de TDHP (**figura 5.18**): un doblete a 5,35 ppm y un multiplete a 5,42-5,5 ppm, ambas señales con una integración para un solo hidrógeno. Además, todas las señales se observan por duplicado, lo que evidencia la presencia de estos dos anómeros.

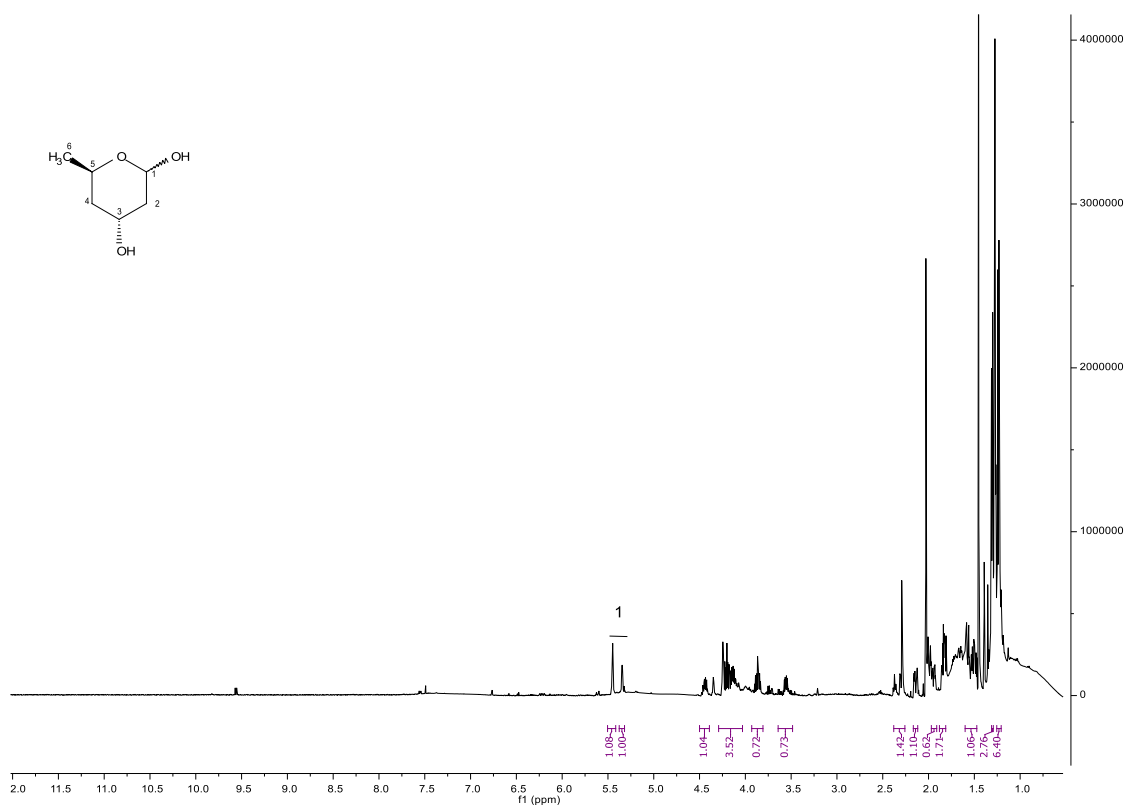


Figura 5. 17: ¹H-RMN 500MHz correspondiente a la mezcla de reacción.

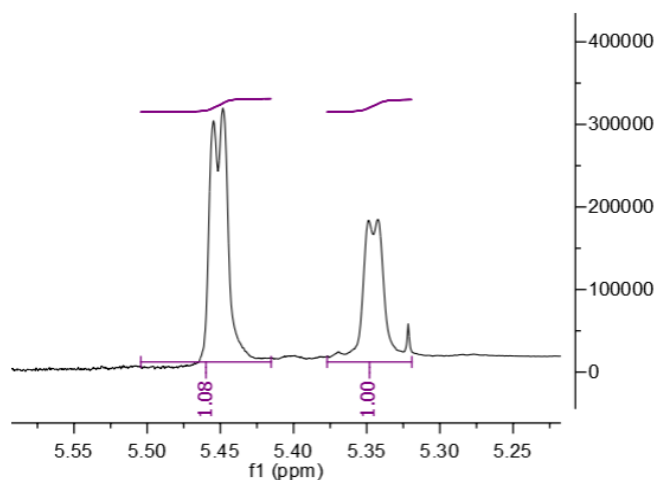


Figura 5. 18: Proporción de anómeros.

La proporción de anómeros en esta reacción resultó ser 1:1 α/β (figura 5.17). Este resultado no es habitual de encontrar en la síntesis de TDHP catalizada por DERA. Según lo reportado en bibliografía, DERA resultaba ser selectiva para sintetizar un anómero respecto al otro, pero este resultado parece estar vinculado a que el análisis de la proporción de anómeros siempre se realizó luego de la purificación, donde se separan y se concentran las fracciones más enriquecidas en el producto de interés alterando la proporción original. Por ejemplo, Haridas y colaboradores han reportado una proporción anómerica de 2:1 α/β utilizando PaDERA C49M C-His en las mismas condiciones de reacción.² Adicionalmente, otros investigadores han reportado proporciones anómericas totalmente distintas; para Sakuraba y colaboradores la proporción obtenida - utilizando DERA de *Thermotoga marítima* - resultó ser 4:3 α/β y para Wong y colaboradores - de origen desconocido – resultó ser 1:8 α/β .

Paralelamente, también se realizó un análisis por ^{13}C -RMN de dicha muestra. Como también se observó en el espectro protónico de esta mezcla, se distinguen todas las señales por duplicado. Se observan un total de 12 señales, correspondientes a los carbonos de los anómeros α y β de TDHP. Entre ellas podemos destacar las señales correspondientes a los carbonos anoméricos C1- α (94,32 ppm) y C1- β (93 ppm) y las señales correspondientes a los C2 de ambos anómeros (42,85 ppm y 42,31 ppm). Estas señales resultan importantes en el análisis debido a que, en el caso de no haberse

formado TDHP, las señales se desplazarían a campos menores (C1= 199 ppm y C2= 52 ppm).

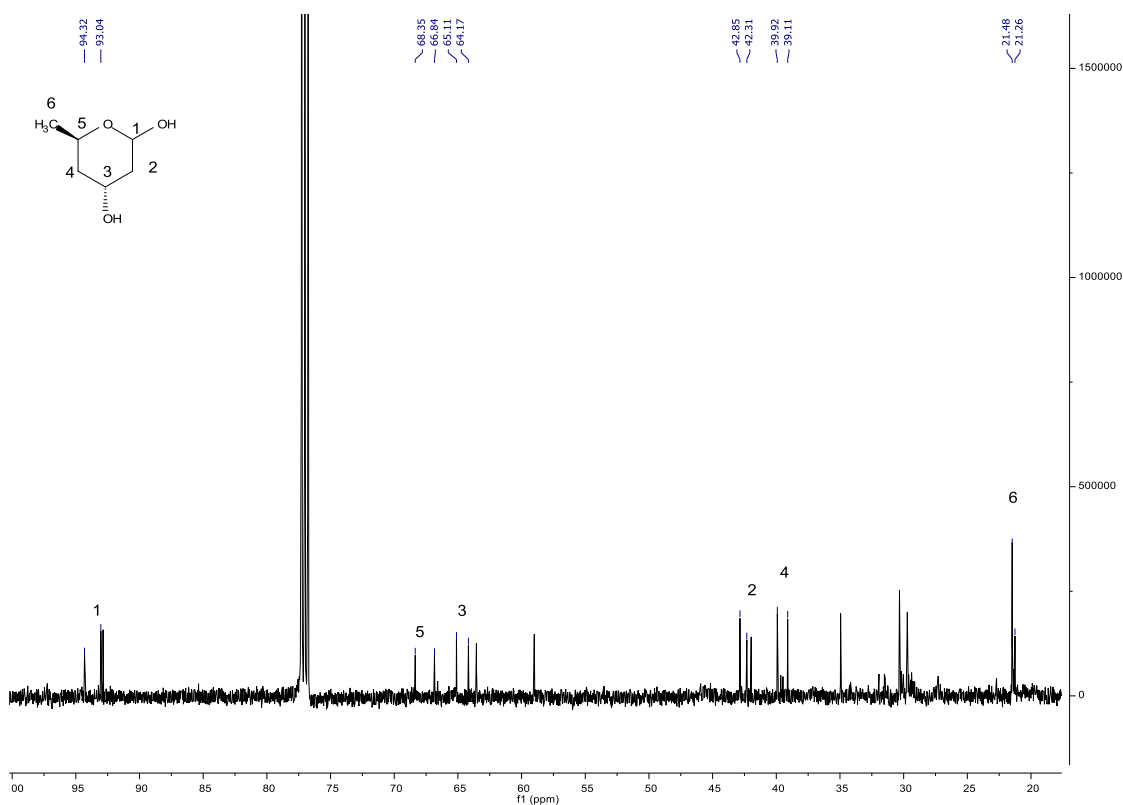


Figura 5. 19: ^{13}C -RMN correspondiente a TDHP.

5.3.3.2.2. De una muestra pura

Una vez determinada la proporción de anómeros para la reacción catalizada por *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His, se realizó una purificación en columna y se tomaron las fracciones más enriquecidas en el producto de interés. Estas se concentraron en evaporador rotatorio y se analizaron mediante espectroscopia de RMN en un equipo con una resolución de 600 MHz. Se obtuvo un espectro del producto limpio y sin interferencias. En la **figura 5.20** se observa el espectro; las señales concuerdan con los datos bibliográficos.⁶ Se pueden observar las señales correspondientes al hidrógeno del carbono anomérico en 5,12-5,22 ppm y 5,34 ppm en proporción anomérica 3:1 α/β . Adicionalmente se pueden observar las señales correspondientes a

los hidrógenos de C2 entre 1,8 ppm y 2 ppm que, en el caso de que la molécula no se hubiese ciclado, las señales serían cercanas a 2,5 ppm.

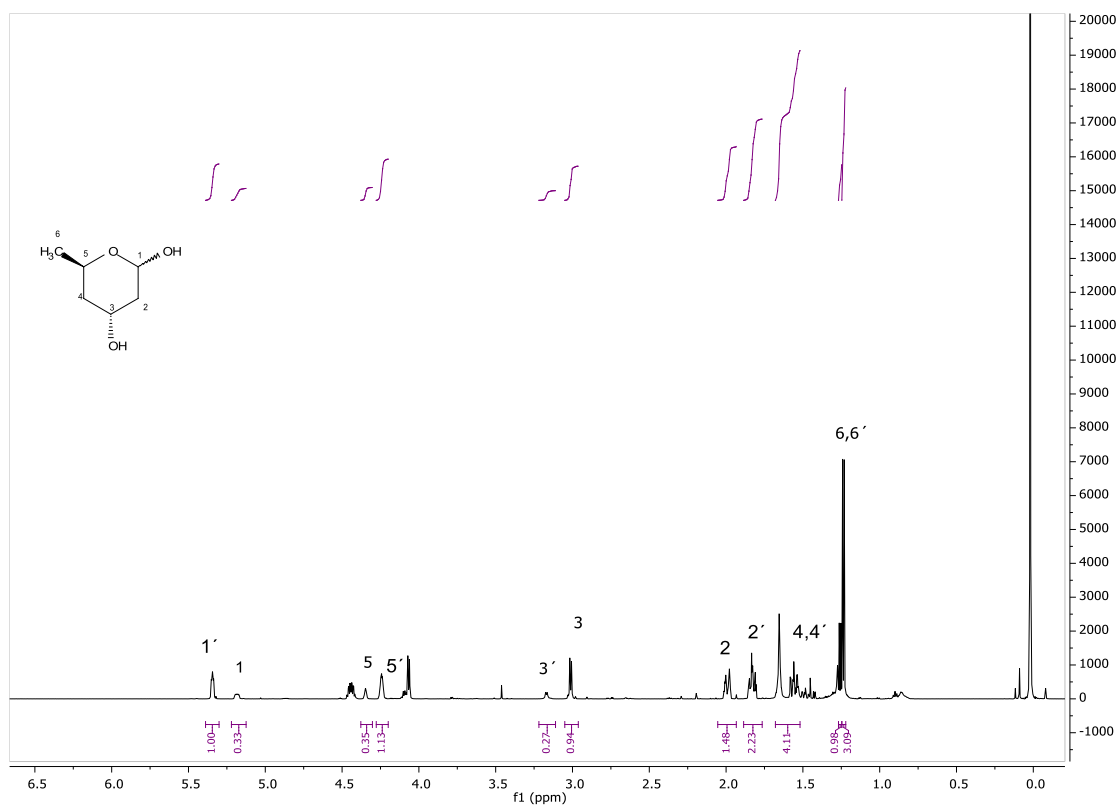


Figura 5. 20: ¹H-RMN 600 MHz correspondiente a TDHP.

(esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

5.4. Conclusiones

En este capítulo se desarrolló el trabajo realizado en relación a la síntesis de TDHP utilizando las distintas variantes de DERA como biocatalizadores. Debido a que no existen muchos reportes bibliográficos que involucren la síntesis de este compuesto utilizando células enteras, en un primer lugar se testeó la tolerancia de las bacterias recombinantes frente a distintas concentraciones de acetaldehído. *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His y *Escherichia coli* BL21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His, presentaron viabilidad luego de ser incubadas en una elevada concentración de su sustrato dador (500 mM). Esta concentración fue mayor que la soportada por la bacteria *Pectobacterium atrosepticum* wt.¹⁰

Estas tres variantes se utilizaron en condiciones estándar de reacción (200 mM de acetaldehído, 28°C, 24 h) obteniéndose buenos resultados con el empleo de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His y *Escherichia coli* BL21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His, tanto en condiciones analíticas como en preparativas, con rendimientos de 75% y 62%, respectivamente. En contraposición, cuando se utilizó *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA N-His la conversión a TDHP fue menor al 5%, la cual no se consideró relevante.

La optimización de la reacción permitió determinar que la mejor condición para la síntesis de TDHP fue utilizar 15% p/v de células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His, 500 mM de acetaldehído y 24 h de reacción con 100% de conversión. Dado que la enzima aislada tiene una tolerancia de 300 mM de acetaldehído, este resultado confirma la ventaja de utilizar células enteras en cuanto a la protección de las enzimas de entornos desfavorables.

Además, empleando técnicas espectroscópicas fue posible confirmar la estructura de TDHP y, en particular, empleando ¹H-RMN se pudo establecer la proporción anómerica α:β, 1:1.

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

5.5. Referencias bibliográficas

1. Clapés, P., Fessner, W.D., Sprenger, G.A., and Samland, A.K. (2010). Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 154–167.
2. Haridas, M., Abdelraheem, E.M.M., and Hanefeld, U. (2018). 2-Deoxy-d-ribose-5-phosphate aldolase (DERA): applications and modifications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 9959–9971.
3. Grabner, B., Pokhilchuk, Y., and Gruber-Woelfler, H. (2020). DERA in flow: Synthesis of a statin side chain precursor in continuous flow employing deoxyribose-5-phosphate aldolase immobilized in alginate-luffa matrix. *Catalysts* **10**, 137.
4. Švarc, A., Findrik Blažević, Z., Vasić-Rački, Đ., Szekrenyi, A., Fessner, W.D., Charnock, S.J., and Vrsalović Presečki, A. (2019). 2-Deoxyribose-5-phosphate aldolase from *Thermotoga maritima* in the synthesis of a statin side-chain precursor: characterization, modeling and optimization. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **94**, 1832–1842.
5. Dick, M., Hartmann, R., Weiergräber, O.H., Bisterfeld, C., Classen, T., Schwarten, M., Neudecker, P., Willbold, D., and Pietruszka, J. (2016). Mechanism-based inhibition of an aldolase at high concentrations of its natural substrate acetaldehyde: Structural insights and protective strategies. *Chem. Sci.* **7**, 4492–4502.
6. Haridas, M., Bisterfeld, C., Chen, L.M., Marsden, S.R., Tonin, F., Médici, R., Iribarren, A., Lewkowicz, E., Hagedoorn, P.L., Hanefeld, U., et al. (2020). Discovery and engineering of an aldehyde tolerant 2-deoxy-d-ribose 5-phosphate aldolase (Dera) from *pectobacterium atrosepticum*. *Catalysts* **10**, 883.
7. Wang, Z., Xu, J.H., and Chen, D. (2008). Whole cell microbial transformation in cloud point system. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 645–656.
8. de Carvalho, C.C.C.R. (2017). Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry. *Microb. Biotechnol.* **10**, 250–263.
9. Wachtmeister, J., and Rother, D. (2016). Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. *Curr. Opin. Biotechnol.* **42**, 169–177.
10. Valino, A.L., Palazzolo, M.A., Iribarren, A.M., and Lewkowicz, E. (2012). Selection of a new whole cell biocatalyst for the synthesis of 2-deoxyribose 5-phosphate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**, 300–308.
11. Li, J., Yang, J., Men, Y., Zeng, Y., Zhu, Y., Dong, C., Sun, Y., and Ma, Y. (2015). Biosynthesis of 2-deoxysugars using whole-cell catalyst expressing 2-deoxy-d-ribose 5-phosphate aldolase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 7963–7972.
12. Ručigaj, A., and Krajnc, M. (2013). Optimization of a crude deoxyribose-5-phosphate aldolase lyzate-catalyzed process in synthesis of statin intermediates. *Org. Process Res. Dev.* **17**, 854–862.

13. Ošljaj, M., Cluzeau, J., Orkić, D., Kopitar, G., Mrak, P., and Časar, Z. (2013). A highly productive, whole-cell DERA chemoenzymatic process for production of key lactonized side-chain intermediates in statin synthesis. *PLoS One* 8, e62250.
14. Lönnngren, J., and Svensson, S. (1974). Mass spectrometry in structural analysis of natural carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 29, 41–106.

Capítulo 6

Síntesis biocatalizada de 2,4,6-tridesoxi
D-eritro-hexapiranosas 6-sustituidas

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

6.1. Introducción

Como mencionamos anteriormente, una aplicación interesante de DERA es en la producción de estatinas, drogas que reducen el nivel de colesterol en sangre. El empleo de esta enzima como biocatalizador proporciona una ruta simple para sintetizar la cadena lateral que les confiere actividad biológica. Sin duda, una de las ventajas más prometedoras de DERA y su alta estereoselectividad es la incorporación de los dos centros quirales característicos de dicha cadena lateral en un solo paso, a través de reacciones aldólicas secuenciales (**figura 6.1**).¹

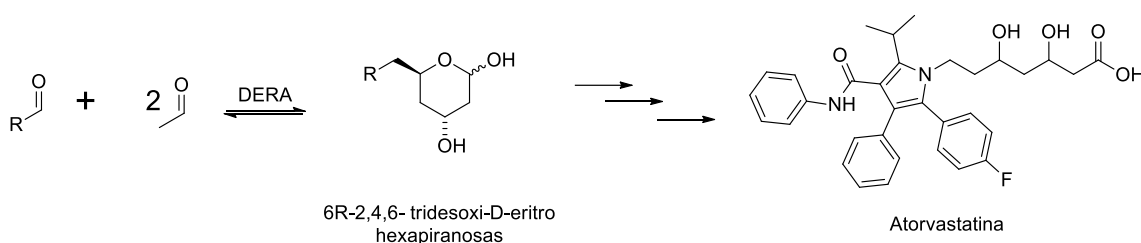


Figura 6. 1: Producción de intermediarios de estatinas mediante adición aldólica catalizada por DERA.

Las síntesis de estatinas descritas en bibliografía que involucran a DERA en la producción de la cadena lateral activa, introducen un grupo suficientemente reactivo (grupo **R** de la **figura 6.1**) para su posterior unión al heterociclo mediante diversas metodologías químicas complejas como se muestra en la **figura 1.45 (capítulo 1)** para la síntesis de Atorvastatina. Si bien DERA presenta un gran potencial para obtener estos productos quirales, la poca tolerancia de la enzima cuando se la somete a concentraciones elevadas de aldehídos limita su aplicación en la industria.² Es por ello que, constantemente, se buscan nuevas DERAs (*wild-type* o recombinantes) capaces de aceptar un amplio rango de aldehídos en grandes concentraciones y condiciones suaves de reacción. Por ejemplo, Grabner y colaboradores clonaron con éxito una DERA que demostró una gran tolerancia a cloroacetaldehído (500 mM) y a acetaldehído (1000 mM).³ La modificación genética en esta DERA (C47M) permitió la formación en grandes cantidades de 6-cloro-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas, compuesto que constituye un excelente material de partida para la síntesis de super-estatinas.^{4,5}

Por otro lado, no existen reportes de super-estatinas conteniendo bases nucleosídicas como heterociclo, aun sabiendo que Eritadenina – y sus derivados- (**figura 6.2**), un nucleósido acíclico cuya cadena lineal posee similitudes estructurales con las cadenas laterales de las estatinas, posee efectos antiolesterolémicos.⁶

Además, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no existen estrategias en las cuales el aldehído aceptor de DERA ya contenga el heterociclo, y la cadena lateral se construya a partir del mismo.

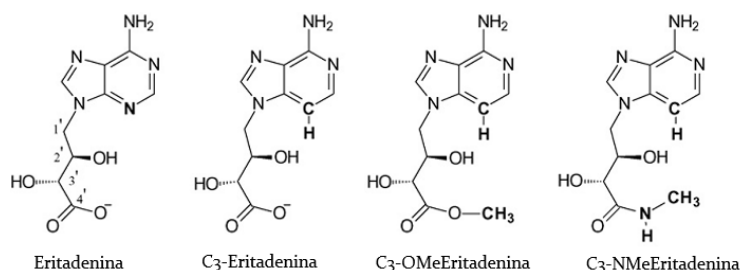


Figura 6. 2:Eritadenina y sus derivados.

Es por ello que se planteó estudiar la aceptación como sustratos electrofílicos de las dos variantes de DERA seleccionadas en el **capítulo 5** (*Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His y *Escherichia coli* BL21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His) a derivados aldehídicos de bases nitrogenadas, cuya síntesis ya había sido puesta a punto en nuestro laboratorio.^{7,8}

6.2. Materiales y métodos

Los reactivos analíticos y los sustratos fueron adquiridos en Sigma Aldrich. Los solventes orgánicos utilizados fueron de Sintorgan. Los componentes del medio de cultivo fueron de Britania y Biopack.

Se utilizaron las cepas recombinantes *Escherichia coli* BL21 DE3 conteniendo los plásmidos PaDERA C49M C-His y LbDERA C42M E78K C-His.

El medio de cultivo utilizado fue LB-Kana

6.2.1 Alquilación de bases nitrogenadas

6.2.1.1 Síntesis de 2,2-dimetoxietil derivados de bases nucleosídicas

Se colocaron 6 mmoles de base nitrogenada (timina, adenina y citosina) y 12 mmoles de K_2CO_3 en un balón de doble entrada conteniendo 30 ml de DMF. Se calentó a reflujo en atmósfera de N_2 con agitación magnética durante 1 h a 50°C en un baño de glicerina. Luego se aumentó la temperatura a 90°C y se adicionaron gota a gota 12 mmoles de 1-bromo-2,2-dimetoxietano (previamente purgados con N_2). Al cabo de 24 hs se filtró la reacción en caliente, se lavaron los sólidos retenidos con 1 volumen del solvente utilizado y el líquido resultante se evaporó a presión reducida.

Se obtuvieron como productos de reacción *N*-1-(2,2-dimetoxietil) y *N*-1,*N*-3-bis(2,2-dimetoxietil) timina; *N*-3- y *N*-9-(2,2-dimetoxietil) adenina; *N*-1-(2,2-dimetoxietil) y *O*-2-(2,2-dimetoxietil) citosina.

6.2.1.2 Síntesis de *N*-1-(2,2-dimetoxietil) benzimidazol

Se colocaron 10 mmoles de benzimidazol y 15 mmoles de CS_2CO_3 en un balón de doble entrada conteniendo 30 ml de DMF. Se calentó a reflujo en atmósfera de N_2 con agitación magnética durante 1 h a 50°C en un baño de glicerina. Luego se aumentó la temperatura a 90°C y se adicionaron gota a gota 15 mmoles de 1-bromo-2,2-dimetoxietano (previamente purgados con N_2). Al cabo de 1,5 h se filtró la reacción en caliente, se lavaron los sólidos retenidos con 1 volumen del solvente utilizado y el líquido resultante se evaporó a presión reducida. Se obtuvo *N*-1-(2,2-dimetoxietil)-benzimidazol como único producto de la reacción.

6.2.1.3 Análisis de las reacciones

Las muestras se analizaron mediante CCD y se detectaron con lámpara UV-visible. En la **tabla 6.1** se detallan las fases móviles y los R_f de cada compuesto analizado.

Tabla 6. 1: Análisis de Acetales de bases nitrogenadas por CCD.

Base nitrogenada	Fase móvil	Compuesto	R _f
Timina	EtOAc	Timina	0.3
		<i>N</i> -1-(2,2-dimetoxietil)-timina	0.5
		<i>N</i> -1, <i>N</i> -3-bis(2,2-dimetoxietil)-timina	0.6
Adenina	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (85 :15)	Adenina	0.25
		<i>N</i> -3-(2,2-dimetoxietil)-adenina	0.4
		<i>N</i> -9-(2,2-dimetoxietil)-adenina	0.6
Citosina	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (85 :15)	Citosina	0.1
		<i>N</i> -1-(2,2-dimetoxietil)-citosina	0.4
		<i>O</i> -2-(2,2-dimetoxietil)-citosina	0.6
Benzimidazol	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95 :5)	Benzimidazol	0.3
		<i>N</i> -1-(2,2-dimetoxietil)-benzimidazol	0.5

6.2.1.4 Purificación

Se purificaron los productos de reacción mediante cromatografía en columna de sílica gel (Merck) con un volumen de columna de 40 ml. En la **tabla 6.2** se detalla la fase móvil que se utilizó para cada reacción.

Tabla 6. 2: Condiciones de purificación de productos de alquilación.

Derivado	Método de purificación (VC= volumen de columna)
<i>N</i> -1-(2,2-dimetoxietil)-timina	Hexano :EtOAc ; 8 Vc (80:20), 2 Vc (75:25), 2 Vc (70:30), 2 Vc (65:35), 2 Vc (60:40), 4 Vc (50:50), 2 Vc (0:100)
<i>N</i> -9-(2,2-dimetoxietil)-adenina	CH ₂ Cl ₂ :MeOH ; 2 Vc (99:1), 10 Vc (98:2)
<i>N</i> -1-(2,2-dimetoxietil)-citosina	CH ₂ Cl ₂ :MeOH ; 2 Vc (100:0), 2 Vc (99:1), 4 Vc (97:3), 4 Vc (95:5), 4 Vc (90:10), 2Vc (85:15), 2 Vc (80:20)
<i>N</i> -1-(2,2-dimetoxietil)-benzimidazol	CH ₂ Cl ₂ :MeOH ; 2 Vc (100:0), 3 Vc (98:2), 1 Vc (95:5)

6.2.1.5 Análisis estructural de los acetales

Para los experimentos de ^1H RMN se utilizó un Avance Neo 500 (Bruker) a 500 MHz. Para los experimentos de ^{13}C RMN se utilizó Avance II 500 (Madison, WI, EE.UU.) a 126 MHz. Las soluciones se prepararon disolviendo el compuesto en 700 μL de DMSO-d_6 o CDCl_3 .

N-1-(2,2-dimetoxietil)-timina (4a)

^1H -RMN (500 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 11.28 (s, 1H, NH), 7.43 (d, 1H, $J=1.21$ Hz, H6), 4.53 (t, 1H, $J=5.37$ Hz, H8), 3.71 (d, 2H, $J=5.37$ Hz, H7), 3.29 (s, 6H, H9), 1.74 (d, 3H, $J=1.16$ Hz, CH_3 exocíclico).

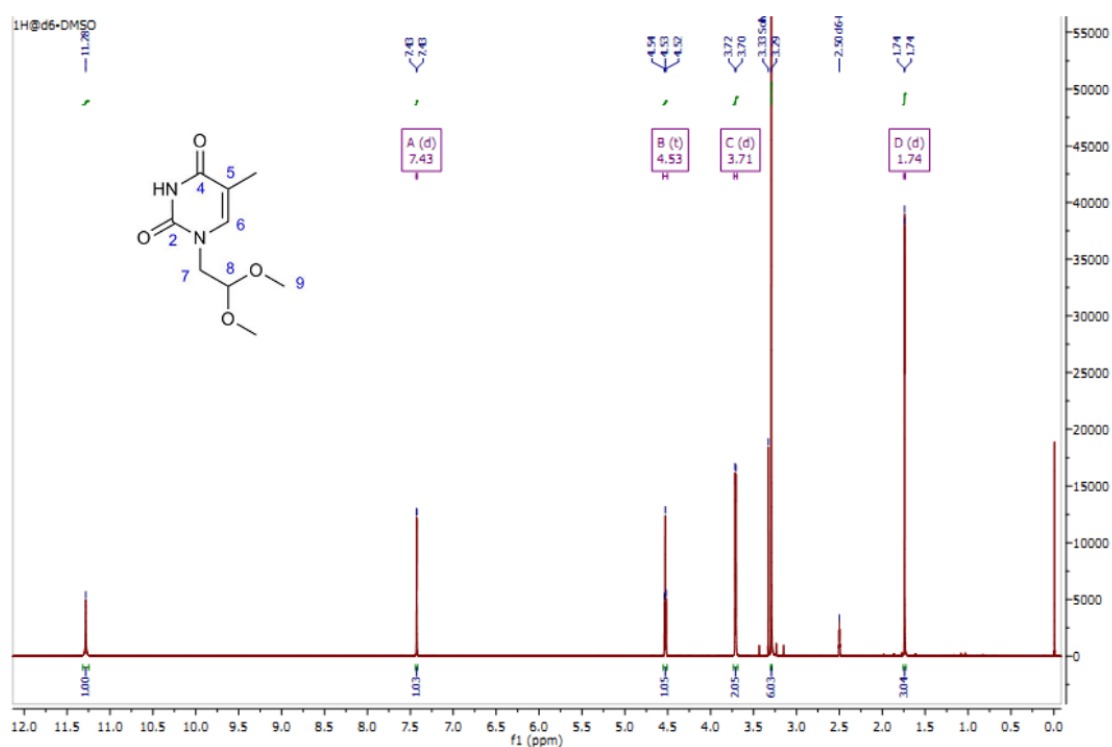


Figura 6. 3: ^1H -RMN de 4a

^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 163.2 (C2), 150.09 (C4), 142.1 (C6), 108.1 (C5), 101.3 (C8), 54.0 (C9), 48.5 (C7), 11.9 (C10, CH_3).

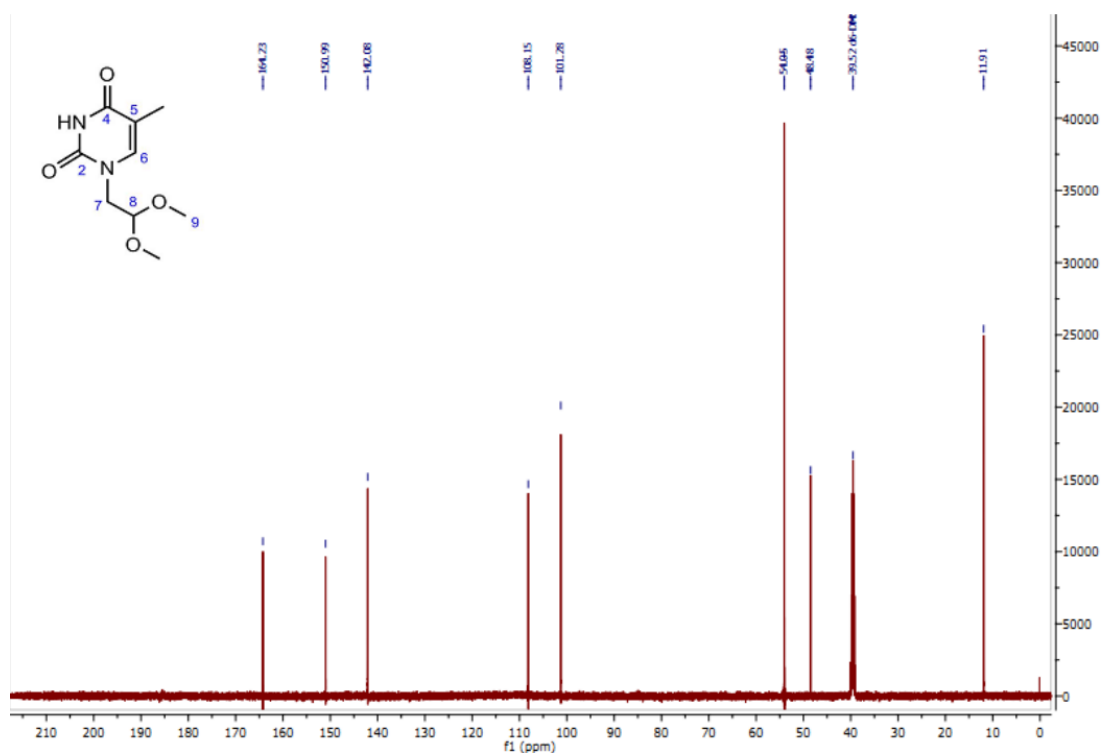


Figura 6. 4: ^{13}C -RMN de 4a.

N-9-(2,2-dimetoxietil)-adenina (4b)

^1H -RMN (500 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 8.15 (s, 1H, H2), 8.07 (s, 1H, H8), 7.24 (s, 2H, NH_2 exocíclico), 4.76 (t, 1H, $J=5.38$ Hz, H11), 4.25 (d, 2H, $J= 5.38$ Hz, H10), 3.29(s, 6H, H12).

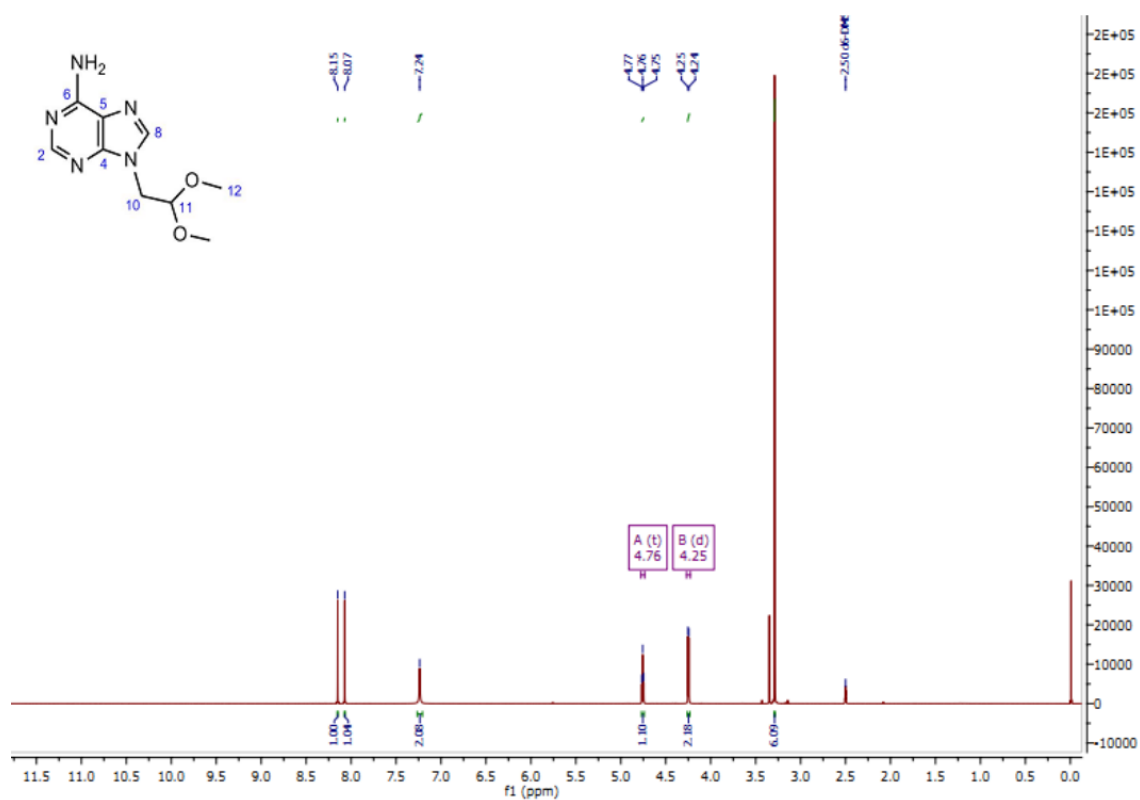


Figura 6. 5: ^1H -RMN de 4b.

^{13}C -RMN (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 155.9 (C4), 152.5 (C2), 149.7 (C6), 141.2 (C8), 116.7 (C5), 101.2 (C11), 53.8 (C12), 44.1 (C10).

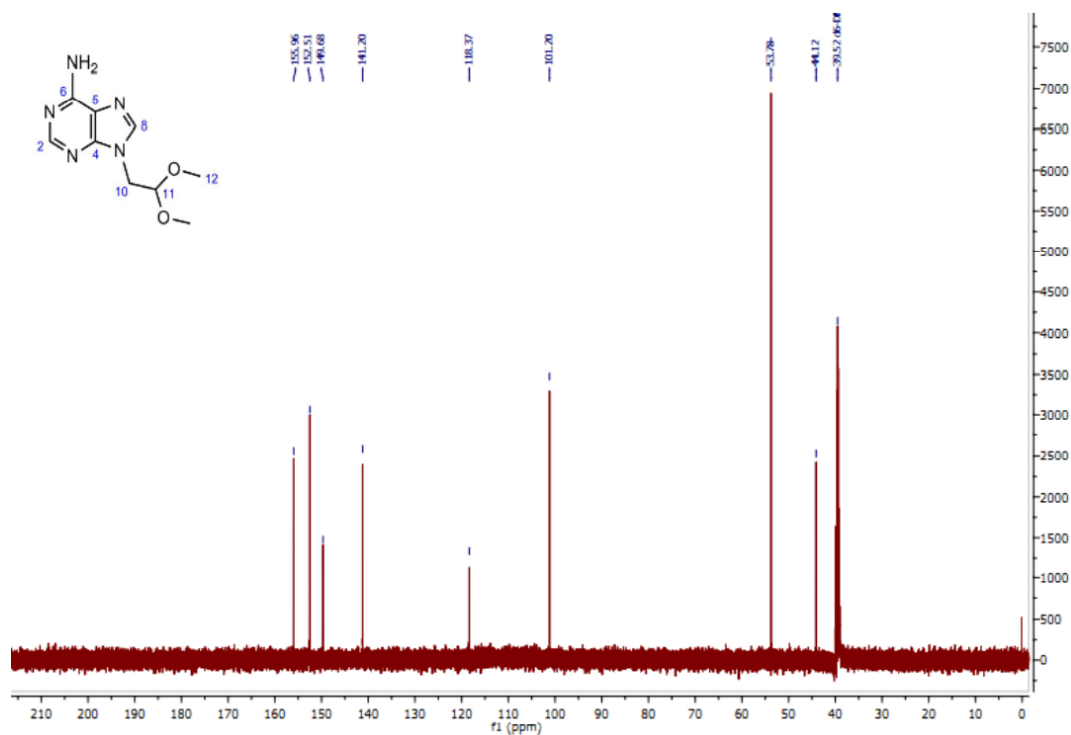


Figura 6. 6: ¹³C-RMN de 4b

N-1-(2,2-dimetoxietil)-citosina (4c)

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.45 (d, 1H, J=7.2 Hz, H6), 7.09 (d, 2H, J=5.52 Hz, NH₂exocíclico), 5.63 (d, 1H, J=7.2 Hz, H5), 4.51 (t, 1H, J=5.4 Hz, H8), 3.69 (d, 2H, J=5.4 Hz, H7), 3.27 (s, 6H, H9).

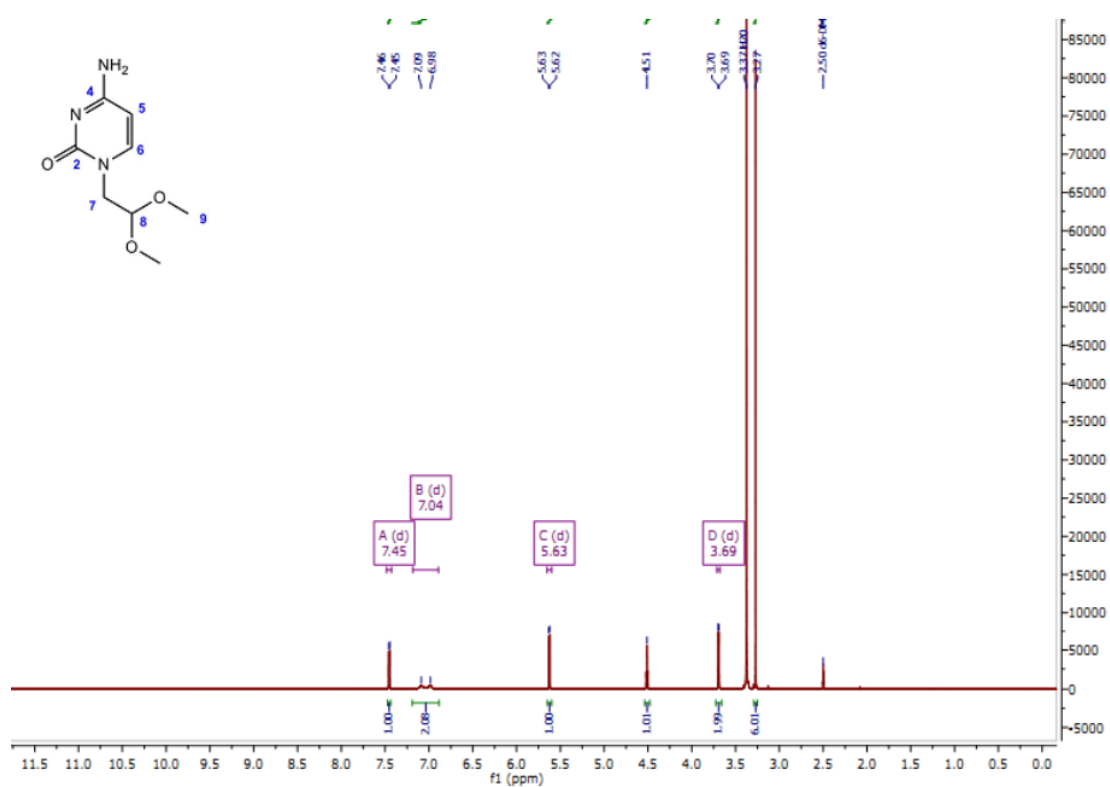


Figura 6. 7: ^1H -RMN de 4c.

^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 166.1 (C2), 155.9 (C4), 145.9 (C6), 101.5 (C8), 93.1 (C5), 54.1 (C9), 50.3 (C7).

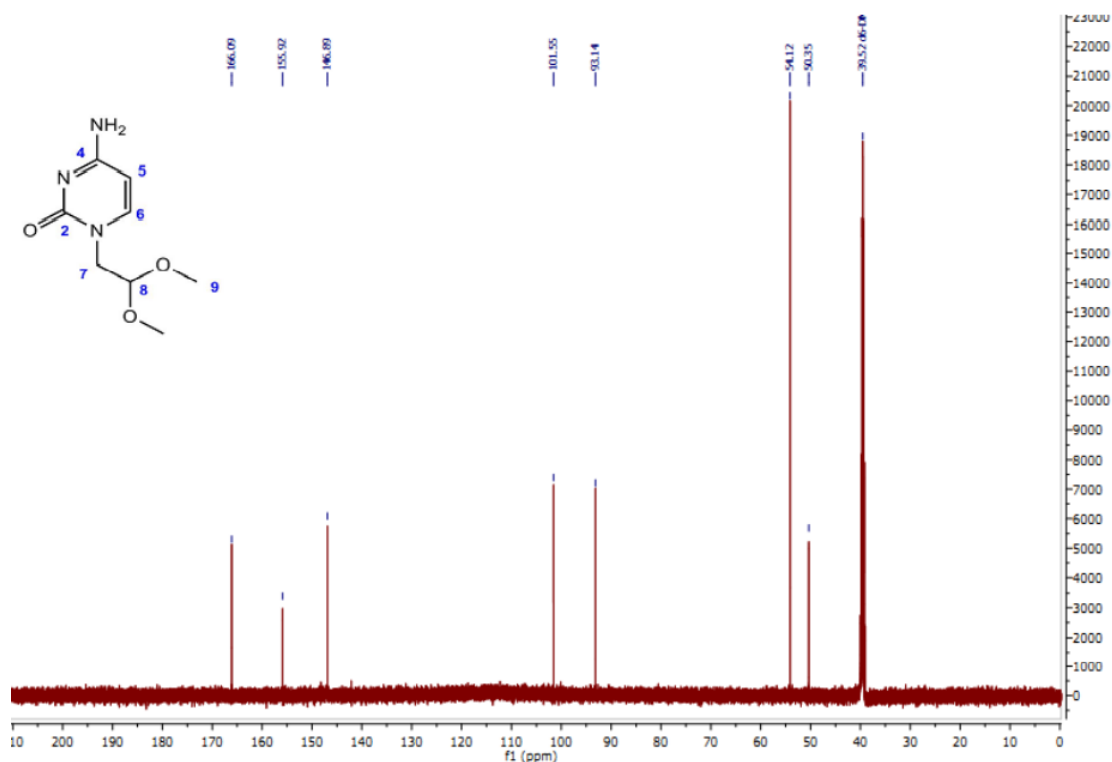


Figura 6. 8: ^{13}C -RMN de 4c.

N-1-(2,2-dimetoxietil)-benzimidazol (4d)

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (s, 1H, H8), 7.87 – 7.75 (m, 1H, H6), 7.52 – 7.40 (m, 1H, H3), 7.40 – 7.21 (m, 2H, H1, H2), 4.56 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, H11), 4.24 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H, H10), 3.37 (s, 6H, H14, H15).

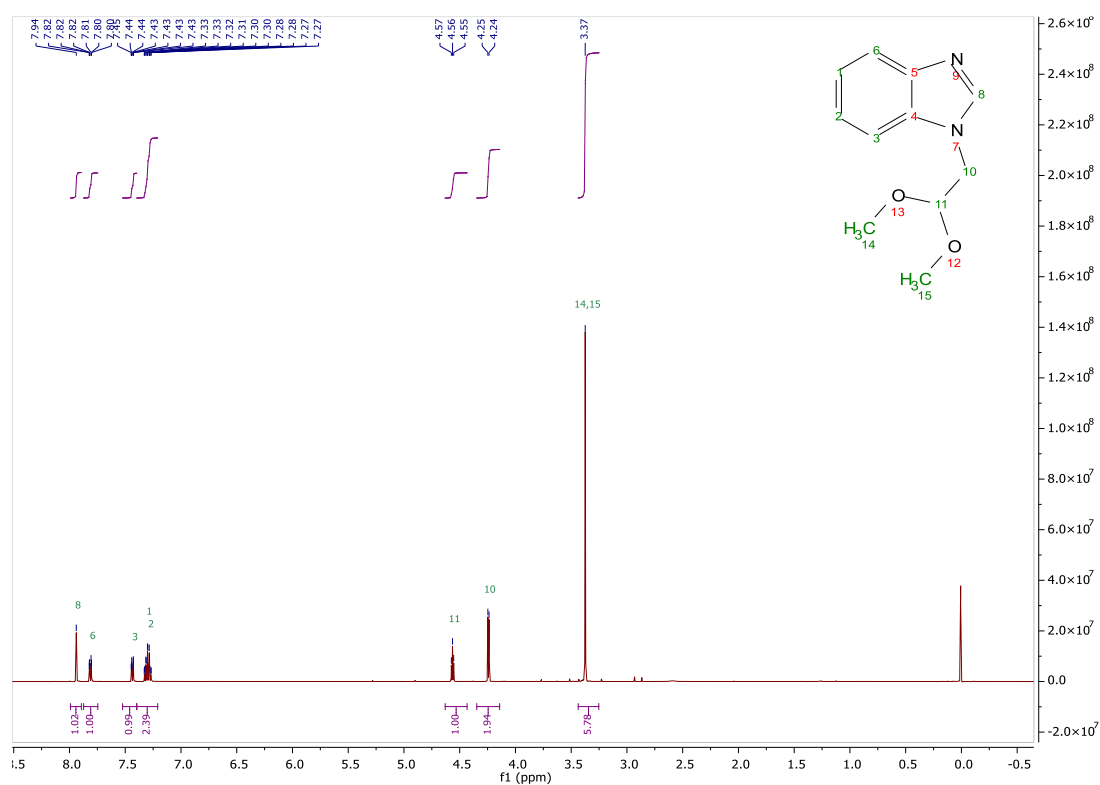
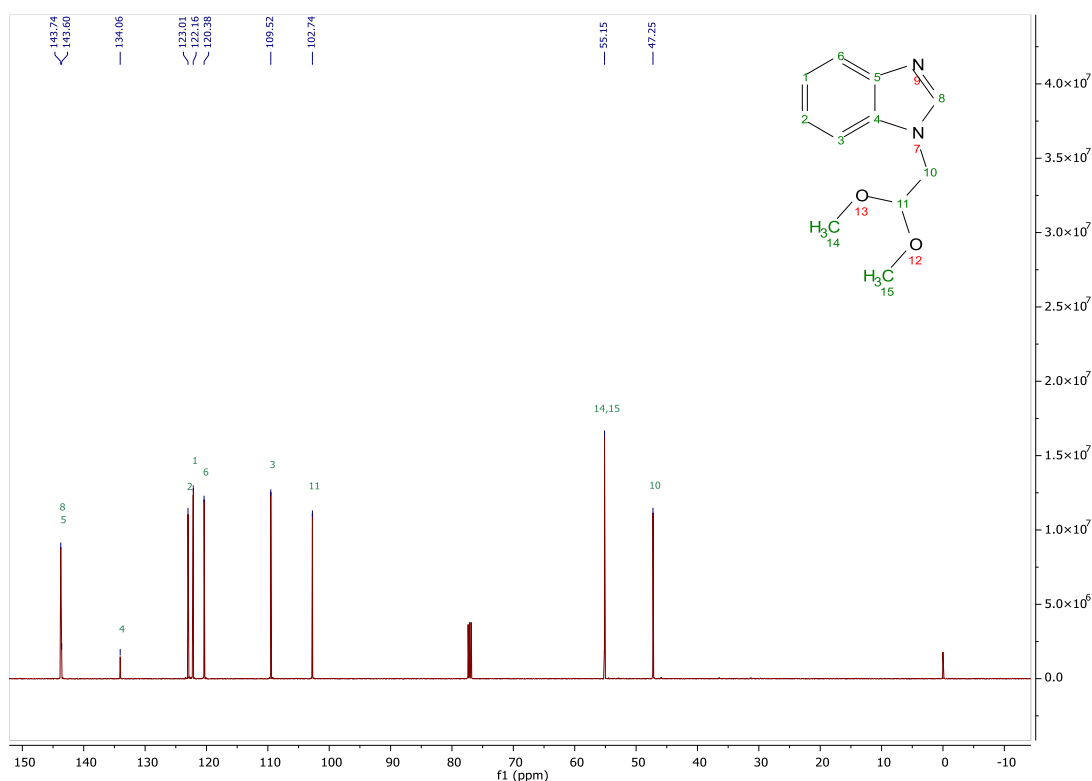


Figura 6. 9: ^1H -RMN de 4d.

^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3) δ 143.74 (C8), 143.60 (C5), 134.06 (C4), 123.01 (C2), 122.16 (C1), 120.38 (C6), 109.52 (C3), 102.74 (C11), 55.15 (C14, C15), 47.25 (C10).


 Figura 6. 10: ^{13}C -RMN de 4d.

6.2.2 Desprotección de acetales

6.2.2.1. Preparación de derivados aldehídicos de bases nitrogenadas

Se colocaron los acetales purificados de timina, adenina, citosina y benzimidazol (4a-d) (0,2 mmol) obtenidos según lo descrito anteriormente, en 200 μl de HCl 1N. Se tapó con septum y se colocó una aguja para liberar los gases que se produjeran. Se incubó durante 1,5 h con agitación magnética en un baño de glicerina a 90°C. Luego, las soluciones se dejaron enfriar y se neutralizaron utilizando 100 μl de NaOH 2N aproximadamente. El pH fue monitoreado con papel indicador (Merck). El consumo de los acetales y la formación de aldehído fueron verificados por CCD (Merck) como se muestra en la **tabla 6.3**.

Tabla 6. 3: Análisis de la formación de aldehído por CCD.

	Fase móvil	Compuesto	R _f
Timina	EtOAc	<i>N</i> -1-(2-oxoetil) timina	0,15
		<i>N</i> -1-(2,2-dimetoxietil) timina	0,5
Adenina	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 85:15	<i>N</i> -9-(2-oxoetil) adenina	0,2
		<i>N</i> -9-(2,2-dimetoxietil)-adenina	0,6
Citosina	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 85:15	<i>N</i> -1-(2-oxoetil) citosina	0,15
		<i>N</i> -1-(2,2-dimetoxietil)-citosina	0,4
Benzimidazol	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 90:10	<i>N</i> -1-(2-oxoetil) benzimidazol	0,22
		<i>N</i> -1-(2,2-dimetoxietil)-benzimidazol	0,38

6.2.2.2 Preparación de 2- cloroacetaldehído

Se calentaron a reflujo 10 mmol de cloroacetaldehído dimetilacetal comercial en 10 ml de HCl 1 N con agitación magnética en un baño de glicerina durante 24 h. La reacción se neutralizó utilizando NaOH 2 N. El consumo del acetal y la formación de aldehído fueron verificados por GC-FID (Thermo Trace 1300) hasta la desaparición completa del acetal. Se empleó una columna TRACE TR-5MS (0,25 μ m, 0,25 mm, 30 m). Las condiciones de corrida fueron: temperatura del inyector 200°C, temperatura de la columna 50°C, tiempo total de corrida 15 min, Volumen de inyección 1 μ l, split: 1:50, calentador: 280°C. Tr: cloroacetaldehído dimetilacetal= 7,09 min y cloroacetaldehído = 7,46 minutos.

6.2.3 Biotransformaciones con DERA

6.2.3.1 Síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas 6-sustituidas utilizando células enteras

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 4 ml, conteniendo 15%p/v de pellet bacteriano (*Escherichia coli* BL21 DE3 conteniendo los plásmidos PaDERA C49M C-His o LbDERA C42M E78K C-His), 200 mM de acetaldehído y 100 mM de aldehído [propanaldehído, dimetoxiacetaldehído, fenilacetaldehído, benzaldehído, *N*-1-(2-oxoetil) timina, *N*-9-(2-oxoetil) adenina, *N*-1-(2-oxoetil) citosina o *N*-1-(2-oxoetil) benzimidazol] en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7. Al cabo de 24 hs de reacción,

las muestras se centrifugaron a 9000 rpm durante 5 minutos, conservando el sobrenadante.

6.2.3.2 Síntesis de 2,4,6-tridesoxi-D-eritro-hexapiranosas 6-sustituidas utilizando ELC.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 4 ml, conteniendo 500 µl ELC de *Escherichia coli* BL21 DE3 conteniendo *PaDERA* C49M C-His o *LbDERA* C42M E78K C-His, 200 mM de acetaldehído y 100 mM de aldehído [*N*-1-(2-oxoetil) timina, *N*-9-(2-oxoetil) adenina, *N*-1-(2-oxoetil) citosina o *N*-1-(2-oxoetil) benzimidazol] en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7. Se tomaron alícuotas a 1 h, 2 h y 3 h, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos, conservando el sobrenadante.

6.2.3.3 Síntesis de 2,4,6-tridesoxi-D-eritro-hexapiranosas 6-sustituidas utilizando enzima libre.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 4 ml, conteniendo 3 mg/ml de *PaDERA* C49M C-His, 200 mM de acetaldehído y 100 mM de aldehído [*N*-1-(2-oxoetil) de timina, *N*-9-(2-oxoetil) de adenina, *N*-1-(2-oxoetil) citosina o *N*-1-(2-oxoetil) benzimidazol] en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7. Al cabo de 24 hs de reacción, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min, conservando el sobrenadante.

6.2.4 Purificación de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas 6-sustituidas

Se agregaron dos volúmenes de acetonitrilo y 2 mg de NaCl al sobrenadante conservado descrito en el **inciso 6.2.3** y se llevó a frío durante 5 minutos. Se conservaron 10 µl de la fase orgánica para su posterior análisis. La fase orgánica remanente se concentró al vacío. Se purificaron los productos de reacción mediante cromatografía en columna de sílica gel (Merck) con un volumen de columna de 5 ml utilizando ACN:éter etílico 50:50 o AcOEt:éter de petróleo (50:50) para la reacción con cloroacetaldehído.

6.2.5 Análisis de las biotransformaciones

Las muestras de reacción se analizaron cualitativamente por CCD y GC-FID o un HPLC con detector UV y/o acoplado a un detector de masas.

6.2.5.1. Análisis por CCD

En la **tabla 6.4** se detallan las fases móviles y los métodos de detección utilizados en las reacciones.

Tabla 6. 4: Condiciones para el análisis por CCD de las reacciones de condensación aldólica.

Sustrato	Fase móvil	Detección	Compuesto	Rf
Cloroacetaldehído	ACN:éter etílico 50:50	H ₂ SO ₄ 5% etanol	6-cloro-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas	0,5
			Cloroacetaldehído	-
Dimetoxiacetaldehído	ACN:éter etílico 50:50	H ₂ SO ₄ 5% etanol	6,6-dimetoxi-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas	0,81
			2,2-Dimetoxiacetaldehído	0,18
			6-metil-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas	0,75
Propanaldehído	ACN:éter etílico 50:50	H ₂ SO ₄ 5% Etanol	Propanaldehído	-
			6-feniltetrahidro-2,4-pirandiol	0,81
Benzaldehído	ACN:éter etílico 50:50	UV	Benzaldehído	0,18
			6-fenil-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas	0,85
Fenilacetaldehído	ACN:éter etílico 50:50	UV	Fenilacetaldehído	0,33
			6-timinil-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas	0,17
<i>N</i> -1-(2-oxoetil) timina	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 90:10	UV	<i>N</i> -1-(2-oxoetil) timina	0,3
			6-adenil-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas	0,38
<i>N</i> -1-(2-oxoetil) adenina	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 85:15	UV	<i>N</i> -1-(2-oxoetil) adenina	0,2
			6-citosil-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas	0,8
<i>N</i> -1-(2-oxoetil) citosina	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 80:20	UV	<i>N</i> -1-(2-oxoetil) citosina	0,44

<i>N</i>-1-(2-oxoetil) benzimidazol	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 90:10	UV	6-benzimidazoil-2,4,6- tridesoxi D-eritro- hexapiranosas	0,93
			<i>N</i> -1-(2-oxoetil) benzimidazol	0,69

6.2.5.2. Análisis por HPLC

Para las reacciones con los sustratos **derivados de bases nitrogenadas** se emplearon dos HPLC con detectores diferentes.

- Para identificar el compuesto por peso molecular: HPLC con detector UV/MS dejando fija la longitud de onda del detector a 254nm. Se empleó una columna de sílica gel C18 (1,7 µm, 1 mm x 100 mm). Utilizando 0,1 % TFA en agua (A) y 0,1 % TFA en ACN. Flujo 0,05ml/min. Condiciones: 5 min, 95% A, 5% B; 10 min, 25% A, 75% B; 11 min, 25% A, 75% B; 12 min, 95% A, 5% B; 15 min, 95% A, 5% B.
- Para cuantificar: HPLC con detector UV (Siliachrom) con longitud de onda del detector a 254nm. Se empleó una columna de sílica gel C18 (5 µm, 150 mm × 4.6 mm) Utilizando Agua (A) y ACN (B). Flujo 0,9 ml/min. Condiciones: 4 min, 99% A, 1% B; un gradiente de 3 min hasta 88% A, 12% B; 5 min, 88% A, 12% B; un gradiente de 3 min hasta 99% A, 1% B. Se obtuvieron las curvas de calibración que se muestran en la **figura 6.11**.

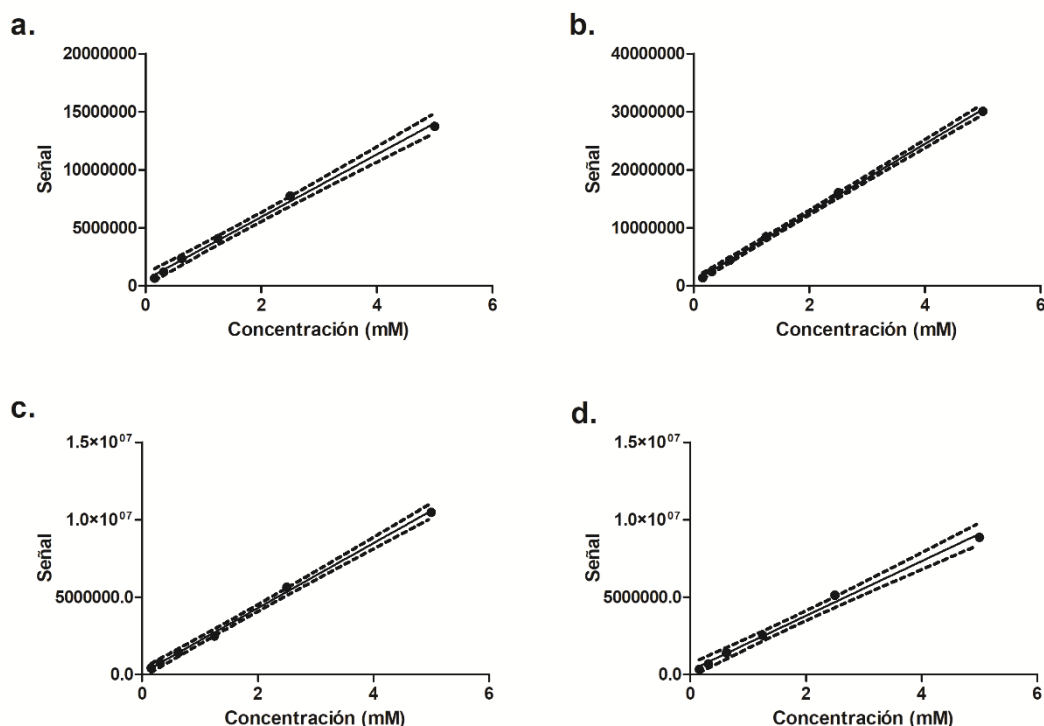


Figura 6. 11: curvas de calibración a) timina $y=3 \times 10^6 x + 543802$, $R^2 = 0,9963$ b) adenina $y = 6 \times 10^6 x + 763838$, $R^2 = 0,9991$ c) citosina $y=2 \times 10^6 x + 95552$, $R^2 = 0,9981$ d) benzimidazol $y = 2 \times 10^6 x + 261648$, $R^2 = 0,9942$

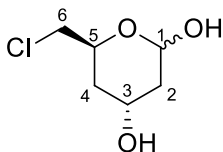
6.2.5.3. Análisis por GC-FID

Para el análisis de los productos **3.g** y **3.e** se empleó un cromatógrafo gaseoso (Thermo Trace 1300) acoplado a un detector de llama (CG-FID). Se empleó con una columna TRACE TR-5MS (0,25 μm , 0,25 mm, 30 m). Las condiciones de corrida fueron: temperatura del inyector 200°C, temperatura de la columna: 5 minutos a 50°C, un gradiente de 10°C/min hasta 250°C y 5 minutos a 250°C. El tiempo total de corrida fue 30 min. Volumen de inyección 1 μL , split: 1:50, calentador: 280°C.

6.2.5.4. Análisis por RMN

Para los experimentos de ^1H RMN se utilizó un Avance Neo 500 (Bruker) a 500 MHz. Para los experimentos de ^{13}C RMN se utilizó Avance II 500 (Madison, WI, EE.UU.) a 126 MHz. Las soluciones se prepararon disolviendo el compuesto en 700 μL de CDCl_3 .

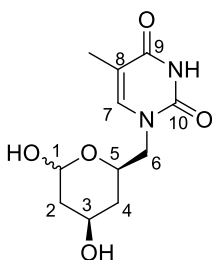
6-Cloro-2,4,6-trideoxi D-eritro-hexapiranosas (3.e)



^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 5.51 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, β), 5.41 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, α), 4.53 (dd, $J = 9.0, 4.2$ Hz, 1H, H-5), 4.32 (m, 1H, H-5'), 4.28 – 4.18 (m, 1H, H-3'), 3.91 (dq, $J = 11.7, 6.2$ Hz, 1H, H-3), 3.63 – 3.55 (m, 4H, H's-6), 2.22 – 1.74 (H-4, H-4', H-2b, H-2'b), 1.55 (td, $J = 12.0, 3.6$ Hz, 1H, H-2a), 1.47 – 1.28 (m, 1H, H-2'a).

^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3) α - ^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3) δ 93.16 C-1, 64.60 C-5, 63.16 C-3, 47.75 C-6, 39.07 C-2, 35.49 C-4. β - δ 92.92 C-1, 68.00 C-5, 63.12 C-3, 47.28 C-6, 38.34 C-2, 34.84 C-4.

6-Timidil-2,4,6-trideoxi D-eritro-hexapiranosas (3.a)



^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 7.17 (s, 1H, H-7), 5.71 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H-1), 4.27 (dd, $J = 11.7$ Hz, 1H, H-5), 3.84-3.70 (m, 3H, H-3 e H-6), 1.13 (d, $J = 7.0$ Hz, 4H, H-2 e H-4),

^{13}C RMN (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 165.51 (C-9), 148.18 (C-10), 137.93 (C-7), 114.31 (C-8), 95.53 (C-1), 65.83 (C-5), 62.14 (C-3), 54.31 (C-6), 39.69 (C-4), 26.84 (C-2), 12.60 (C-CH₃).

6.3. Resultados y discusión

La estrategia innovadora planteada para obtener nuevos análogos de estatinas derivados de las bases nitrogenadas (**figura 6.12**) consiste en un proceso quimioenzimático en el cual el primer paso implica la síntesis de derivados aldehídicos a partir de las correspondientes bases, y el segundo el empleo de estos compuestos como sustratos de DERA. Para ello, se emplearon las dos variantes de DERA seleccionadas en el capítulo anterior. Debido a las características de DERA, la formación de los lactoles se realiza con un completo control estereoquímico creando los estereocentros 3*R*, 5*S*, requeridos para la actividad de la cadena lateral de estatinas. Además, durante la ciclación espontánea se forman los dos anómeros del producto.

Por otro lado se propuso evaluar la aceptación de sustrato de dichas DERAs, empleando aldehídos comerciales cuyos productos (**figura 6.13**), podrían ser utilizados como sustratos en la síntesis tradicional de estatinas. Finalmente, las características de cada sustrato en cuanto a tamaño e hidrofiliicidad, llevaron a tener que aplicar los biocatalizadores en distinto formato (células enteras o enzima libre).

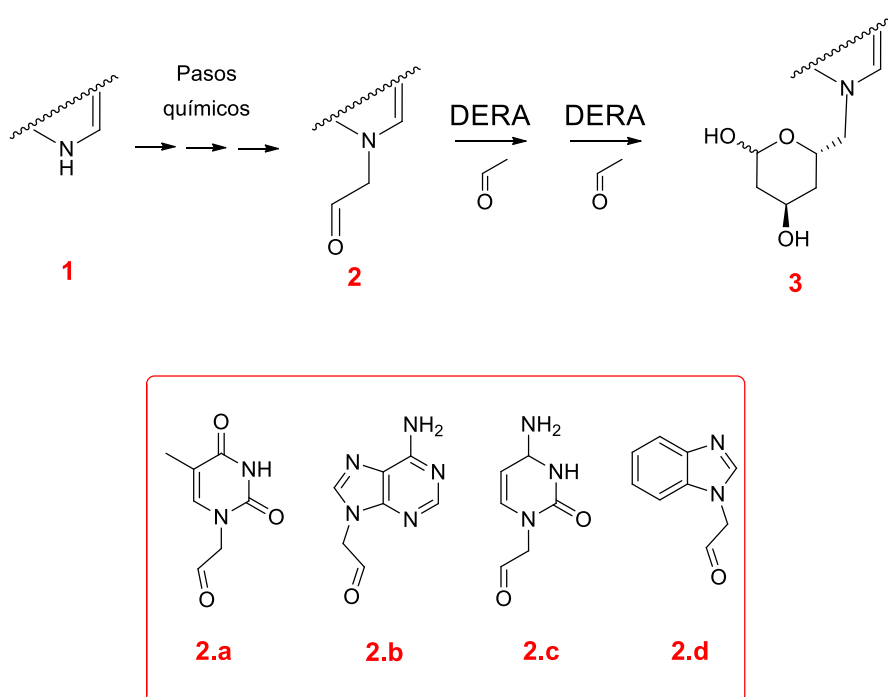


Figura 6. 12: Síntesis de derivados aldehídicos de bases nitrogenadas.

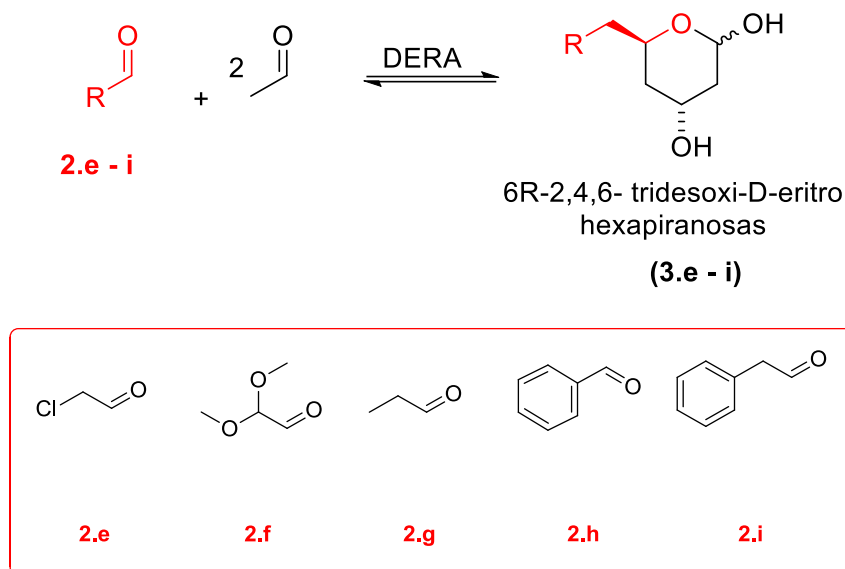


Figura 6. 13: Adiciones aldólicas cruzadas ensayadas con DERA.

6.3.1. Preparación de los sustratos

6.3.1.1. Desprotección de cloroacetaldehído dimetilacetal

A pesar de que el cloroacetaldehído se encuentra disponible comercialmente, su precio elevado y su baja estabilidad hicieron que se adquiriera como cloroacetaldehído dimetilacetal. Por tal motivo, para obtener **2.e** se llevó a cabo la desprotección del reactivo comercial mediante una hidrólisis ácida.

Cloroacetaldehído dimetilacetal se calentó a reflujo hasta observar la desaparición completa del sustrato (24 h). Debido a que ni el sustrato ni el producto se observan por CCD, se realizó el seguimiento de la reacción mediante GC-FID observando la formación del producto **2.e**. como un único producto, el cual fue utilizado como sustrato de DERA (**figura 6.14**).

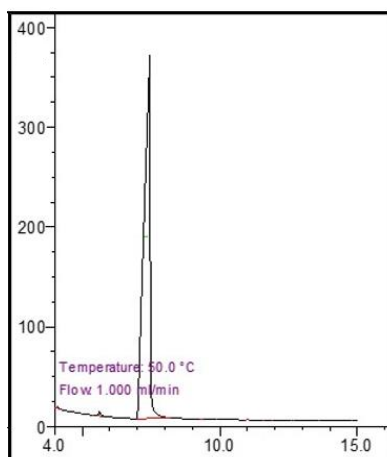


Figura 6. 14: Cromatograma de cloroacetaldehído.

6.3.1.2. Alquilación de bases nucleosídicas

Con el fin de obtener los derivados aldehídicos de las bases nitrogenadas como material de partida para la reacción con DERA, inicialmente se llevó a cabo la síntesis de acetales por *N*-alquilación de timina (**1.a**), adenina (**1.b**) y citosina (**1.c**). Se utilizaron las condiciones ya puestas a punto en nuestro laboratorio, empleando una proporción 1:2:2 de base nitrogenada: 1-bromo-2,2-dimetoxietano: K_2CO_3 en DMF (**figura 6.15**). El curso de la reacción se siguió por CCD.

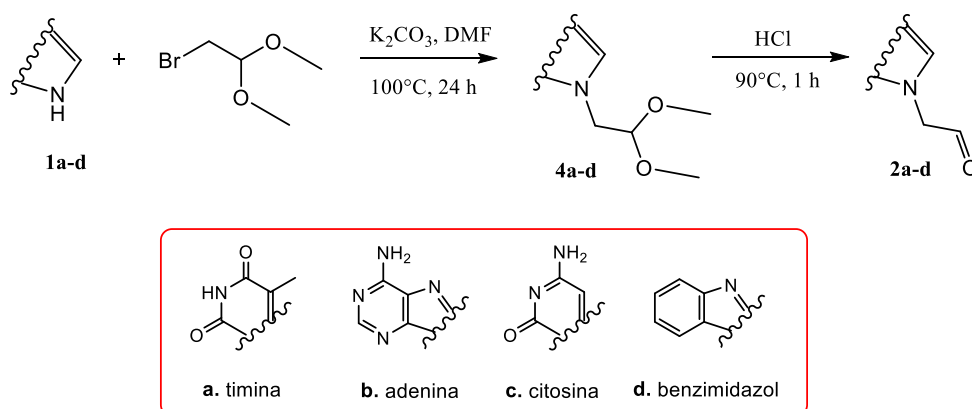


Figura 6. 15: Síntesis química de derivados aldehídicos de bases nitrogenadas.

Si bien las bases nitrogenadas pueden alquilarse en distintas posiciones (**figura 6.16**), las especies mayoritarias obtenidas fueron las adecuadas para continuar hacia la obtención de los análogos nucleosídicos planteados. En el caso de timina se observó la alquilación mayoritaria en la posición *N*-1 y la formación minoritaria del producto bisalquilado (*N*-1, *N*-3). Cuando se utilizó citosina, se obtuvieron los productos monoalquilados en posición *N*-1 y *O*-2 y utilizando adenina en posiciones *N*-3 y *N*-9, siendo este último el necesario para continuar con las reacciones posteriores. A diferencia del caso de timina, en la *N*-alquilación de adenina no se observaron productos bisalquilados, lo cual coincide con lo reportado previamente.⁷⁻⁹ Esto puede explicarse por verse desfavorecida la segunda *N*-alquilación ya sea por problemas electrónicos o estéricos.

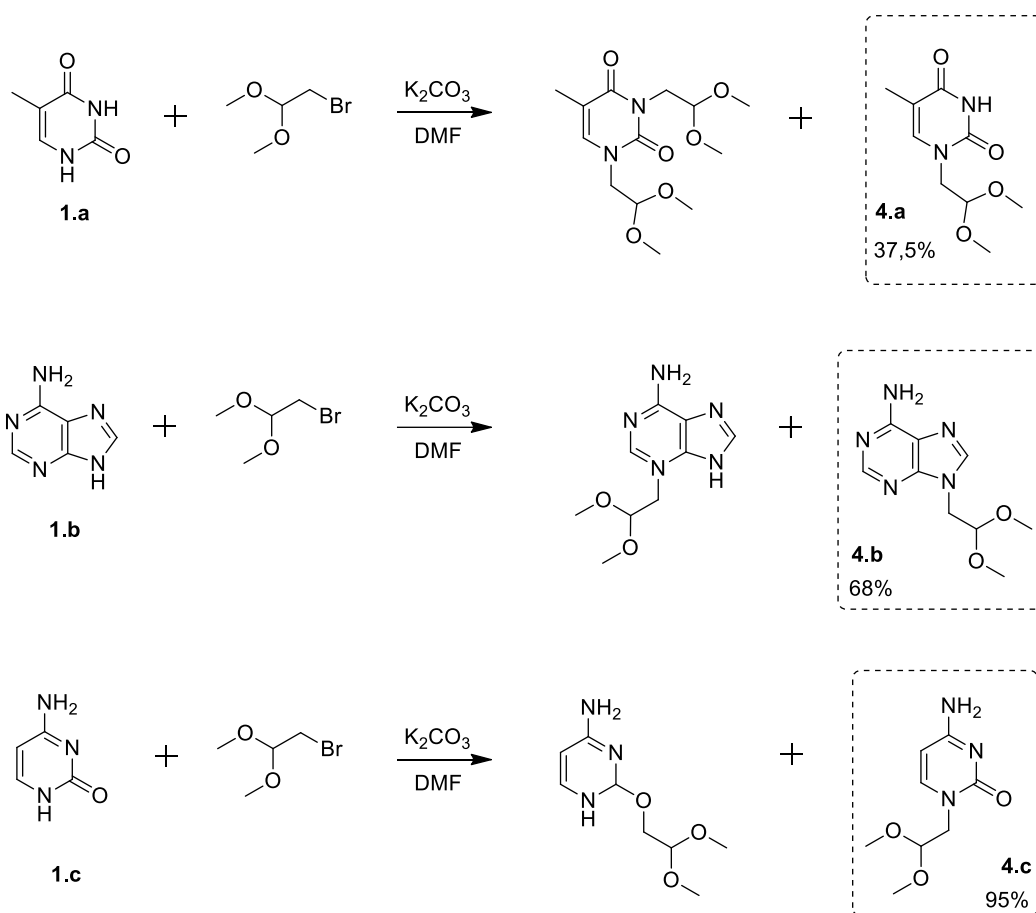


Figura 6. 16:Reacción de alquilación de las distintas bases nucleosídicas.

Los productos de interés fueron aislados por columna cromatográfica y el rendimiento obtenido se observa en la **figura 6.16**. Mediante el estudio por RMN se confirmó la identidad de los productos, y en todos los casos, los espectros obtenidos concuerdan con los reportados en bibliografía.^{7,8}

6.3.1.3. Alquilación de benzimidazol

A diferencia de las bases nucleosídicas, la reacción de alquilación de benzimidazol (**4d**) se llevó a cabo utilizando Cs_2CO_3 - en vez de KCO_3 -, una base más fuerte capaz de sustraer el hidrogeno del anillo imidazólico cuyo pKa es más alto que en las bases nitrogenadas mencionadas anteriormente (**figura 6.17**). Al cabo de 1,5 h la reacción se completó obteniendo N1-(2,2-dimetoxietil)-benzimidazol como único producto, el cual es el apropiado para continuar con las reacciones subsiguientes.¹⁰

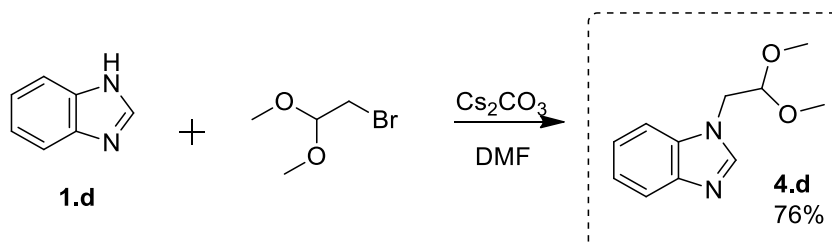


Figura 6. 17: Reacción de alquilación de benzimidazol.

El producto fue purificado por columna cromatográfica y el rendimiento obtenido se observa en la **figura 6.17**. Mediante el estudio por RMN se confirmó la identidad del producto, el cual coincide con datos de bibliografía.¹¹

6.3.1.4. Desprotección de acetales

La formación de los aldehídos es importante para continuar con las reacciones aldólicas, debido a que son los verdaderos sustratos de la reacción. A diferencia de los aldehídos, los acetales son muy estables y pueden almacenarse hasta el momento de la reacción. Los aldehídos se prepararon *in situ* al momento de usarlos, por hidrólisis ácida en caliente para acelerar el proceso de desprotección (**figura 6.18**). La reacción se siguió por CCD y, cuando se observó la desaparición completa del reactivo por UV,

se cortó neutralizando con NaOH 2N. El aldehído resultante se usó en el momento para evitar su degradación.

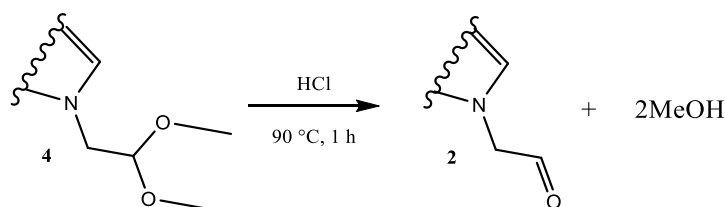


Figura 6. 18: Reacción de desprotección de aldehídos.

6.3.2. Síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas 6-sustituidas a partir de aldehídos comerciales

Con el fin de testear la aceptación de sustrato de las dos variantes de DERA, se llevaron a cabo adiciones aldólicas entre acetaldehído y diversos aldehídos comerciales con distintas características. Cloroacetaldehído (**2.e**) es el sustrato modelo de interés en las reacciones catalizadas por DERA debido a su gran reactividad. Las reacciones con dimetoxiacetaldehído (**2.f**) y propanaldehído (**2.g**) están discutidas en bibliografía ya que los productos **3f** y **3g** pueden ser sintones quirales de interés en la síntesis tradicional de estatinas. Adicionalmente, fenilacetaldehído (**2.i**) y benzaldehído (**2.h**) nos permitieron tener una idea de la aceptación de sustratos voluminosos por DERA.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los capítulos anteriores, en primer lugar se utilizaron los biocatalizadores en forma de células enteras (*Escherichia coli* BL21 DE3 conteniendo los plásmidos PaDERA C49M C-His y LbDERA C42M E78K C-His). Los resultados de las biotransformaciones de los distintos aldehídos con acetaldehído se presentan a continuación. En todos los casos se llevaron a cabo controles con células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 sin plásmido y los biocatalizadores sin sustrato, así como de sustratos sin biocatalizador, no encontrándose formación de productos en ninguno de ellos.

6.3.2.1 Síntesis de 6-cloro-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas (3.e)

La reacción de adición aldólica entre acetaldehído y **2.e** se llevó a cabo utilizando un 15% p/v de células enteras en buffer y el doble de la concentración de acetaldehído que de **2.e**. La reacción se dio por finalizada a las 24 h, y la fase acuosa se separó de las células por centrifugación. La extracción del producto se realizó utilizando acetonitrilo (ACN) y NaCl, tal como se describió en el capítulo anterior. La fase orgánica superior se analizó cualitativamente mediante CCD utilizando como revelador ácido sulfúrico en etanol (**figura 6.19**).

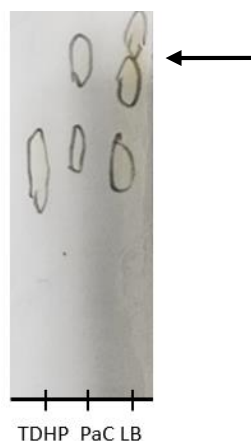


Figura 6. 19: CCD de las reacciones utilizando **2.e**. Reacciones catalizadas por *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His (PaC) o *Escherichia coli* BL21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His (LB).

Como se puede observar en la **figura 6.19**, al emplear **2.e** como sustrato se observó la formación del producto de interés como dos manchas de Rf cercanos, correspondientes a los anómeros. Adicionalmente, y en concordancia con lo descrito en bibliografía,⁵ se observó también la señal correspondiente a formación de los dos anómeros de TDHP, el cual se genera como producto secundario de la reacción por la adición aldólica de tres acetaldehídos. El producto fue purificado empleando cromatografía en columna. Las fracciones de interés se secaron hasta obtener un peso constante y se calculó el rendimiento tomando como referencia a **2.e** como el reactivo limitante de la reacción.

Si bien en el análisis cualitativo de la reacción se observó la producción de **3.e** por las dos bacterias, al momento de purificar la reacción catalizada por *Escherichia coli* PaDERA C49M C-His el rendimiento fue menor al 5%, considerándose despreciable. En cambio, cuando se utilizó *Escherichia coli* LbDERA C42M E78K C-His se obtuvo un rendimiento del 33%. Dicho resultado es aproximadamente la mitad de lo obtenido recientemente por Xuan y colaboradores, en las mismas condiciones de reacción, pero utilizando DERA perteneciente a *Streptococcus sius* purificada¹². Además, la enzima libre LbDERA E78K reportada por Jiao¹³ rindió **3.e** en un 85%, partiendo de 700 mM de cloroacetaldehído.

La **figura 6.20** muestra el espectro ¹H-RMN correspondiente a **3.e**. Como se puede observar, se evidencian las señales correspondientes a los hidrógenos unidos a los carbonos anoméricos de los dos anómeros en 5,41 ppm y en 5,51 ppm. La proporción entre los anómeros encontrada mediante la integración de las señales es de 7:3 (α/β). Se pueden observar también las señales correspondientes a los hidrógenos de los metilenos C6 de ambos anómeros, α y β , entre 3,63 y 3,55 ppm. La integración de estas señales es para 4 hidrógenos. Además, las señales correspondientes a los hidrógenos del C5 se presentan en forma de multiplete debido a que acopla con los hidrógenos de C6 (3,63 – 3,55 ppm, m, H6 y H6') y C4 (H4 y H4'). También, podemos observar que todas las señales se presentan por duplicado lo que muestra la existencia de los dos anómeros. Por otro lado, no se observa la señal del metilo C6 correspondiente al TDHP, lo que indica que la purificación fue eficiente.

Por otra parte, se realizó un análisis por ¹³C-RMN (**figura 6.21**). El espectro presenta un total de 12 señales, correspondientes a los carbonos de los anómeros alfa y beta. Asimismo, en este espectro no se observa la presencia de señales características de carbonos carbonílicos, por lo que se puede inferir que la muestra no contiene reactivos ni intermediarios de reacción.

Las señales fueron asignadas según lo reportado en bibliografía por Xuan y colaboradores.¹²

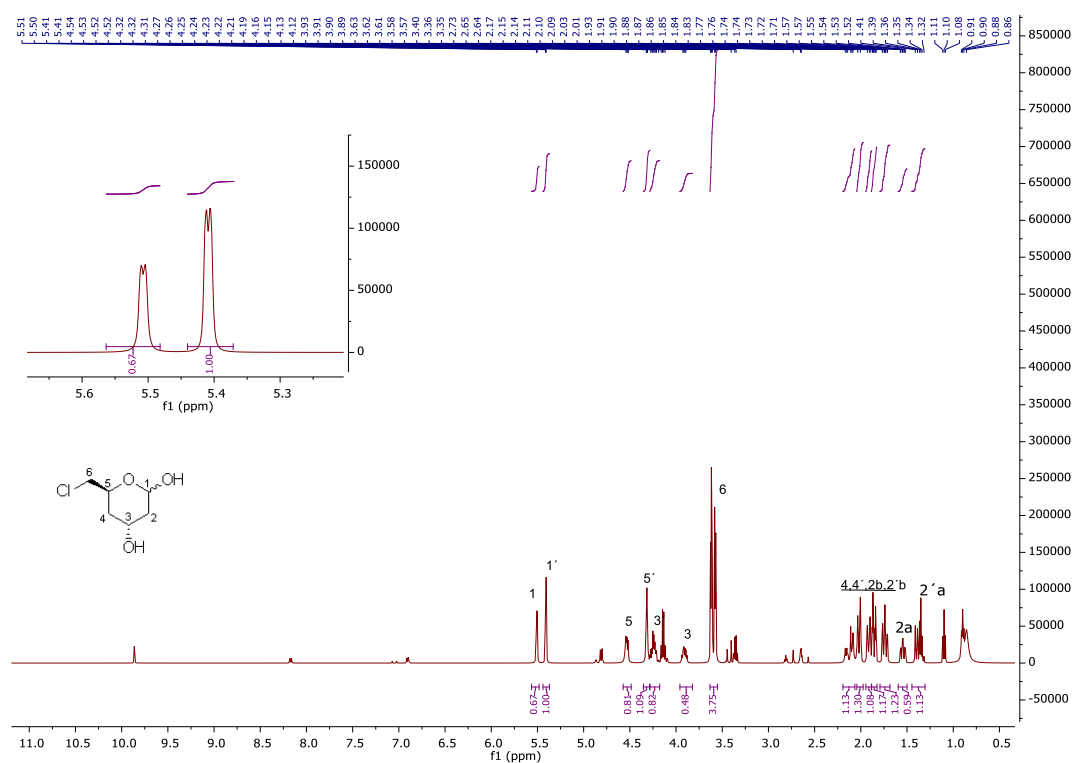


Figura 6. 20: ¹H-RMN de 3.e.

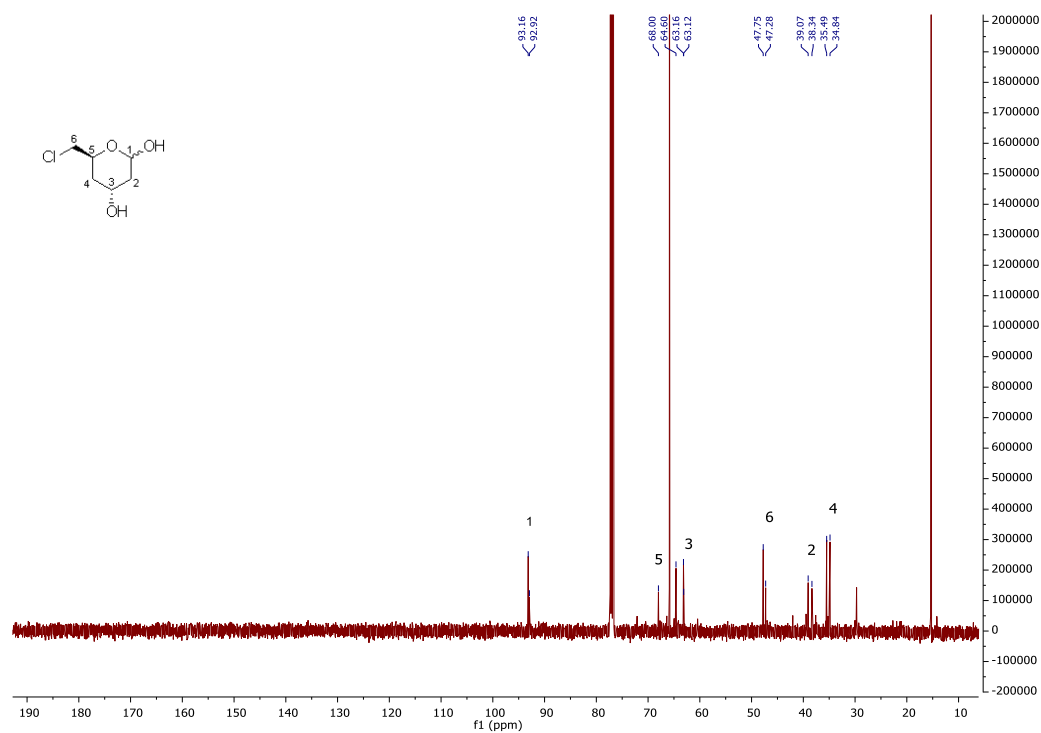


Figura 6. 21: ¹³C-RMN de 3.e.

6.3.2.2 Síntesis de 6,6-dimetoxi-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas (3.f)

De igual forma, la reacción de adición aldólica entre dimetoxiacetaldehído (**2.f**) y acetaldehído se llevó a cabo utilizando células enteras de ambas variantes recombinantes. En la **figura 6.22** se puede observar la presencia de una señal muy tenue de mayor R_f que TDHP, la cual correspondería al producto de interés. Sin embargo, al momento de purificar la reacción, el rendimiento fue despreciable. El bajo resultado puede ser por una posible reacción retroaldólica o por la apertura del aldol por el medio ácido de la sílica. Este aldehído aceptor ya había sido testeado como sustrato de DERA por Gijzen y Wong, sin obtener resultados favorables.¹⁴ No obstante, Ošljaj y colaboradores obtuvieron **3.f** utilizando células enteras de *Escherichia coli* sobreexpresando EcDERA, aunque el rendimiento de la reacción no fue reportado.⁵

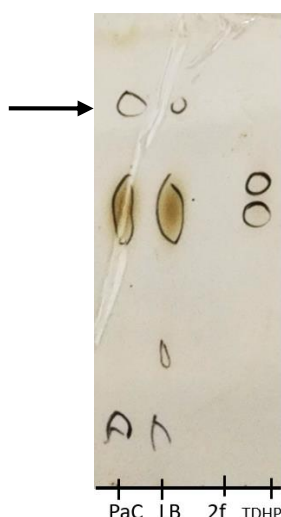


Figura 6. 22: CCD correspondiente a la reacción con **2.f**. PaC: *Escherichia coli* BI21 DE3 PaDERA C49M C-His; Lb: *Escherichia coli* BI21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His.

6.3.2.3 Síntesis de 6-metil-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas (3.g)

La reacción de adición aldólica entre propanaldehído (**2.g**) y acetaldehído se llevó a cabo en las condiciones antes descritas. En el análisis cualitativo de la reacción se evidenció la formación del producto de interés como dos manchas de R_f cercanos, correspondientes a los anómeros. En concordancia con lo descrito en bibliografía,⁵ también se observó la formación de los dos anómeros de TDHP (**figura 6.23**). Al igual

que el acetaldehído, el propanalaldehído no se observa en la CCD en la concentración utilizada.

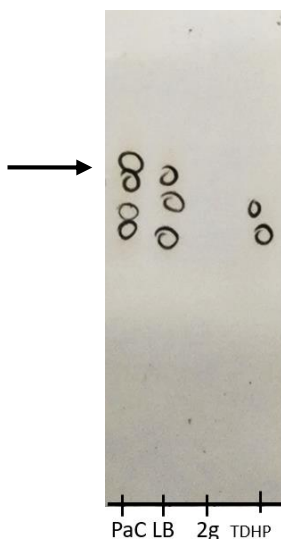


Figura 6. 23: CCD correspondiente a la reacción con **2.g**. PaC: *Escherichia coli* PaDERA C49M C-His Lb: *Escherichia coli* LbDERA C42M E78K C-His

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis cualitativo por GC-FID (**figura 6.23**), donde se observó la presencia de dos productos: la señal correspondiente a TDHP (Tr: 13,9 min) y otra señal que correspondería a **3.g** (Tr: 15,3 min) con concentraciones similares.

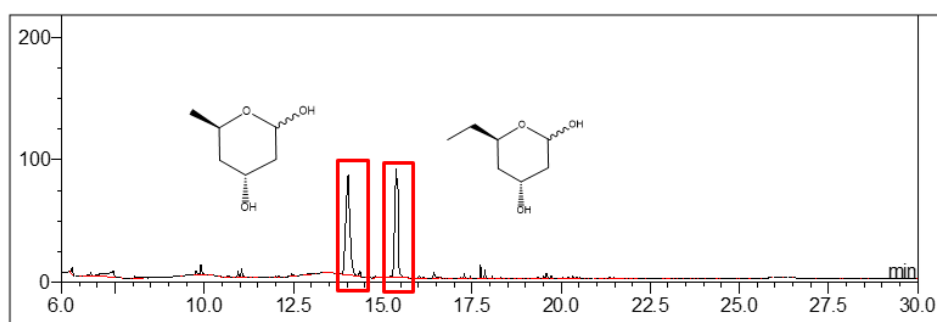


Figura 6. 24: GC-FID correspondiente a la reacción con **3.g**.

El producto fue purificado empleando cromatografía en columna. Las fracciones de interés se secaron hasta obtener un peso constante y se calculó en rendimiento tomando como referencia a **2.g**, el reactivo limitante de la reacción.

Para esta biotransformación, ambos biocatalizadores presentaron un rendimiento relativamente bajo. Utilizando *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His se obtuvo un rendimiento 22,3% mientras que utilizando *Escherichia coli* BL21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His el rendimiento fue del 18%. Esto podría atribuirse a problemas en la purificación dado que, siendo TDHP y **3.g** estructuralmente similares, fue muy difícil aislar el producto y obtener fracciones puras de **3.g**, lo que impactó en el rendimiento final. Debido a estos problemas de purificación, en los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN correspondientes a **3.g** fue complicado asignar las señales correspondientes al compuesto, ya que se cree que parte de TDHP también fue arrastrado en la purificación por columna. La purificación de este compuesto debe continuar con su puesta a punto.

La síntesis de **3.g** empleando DERA, sólo se encuentra reportada bajo patente.¹⁵ Esto es debido a que los esfuerzos en la aceptación de **2.g** como sustrato se centran en emplearlo como sustrato dador nucleofílico y no como aceptor, con el fin de obtener sintones quirales y construir estructuras complejas quirales, como nuevos candidatos a fármacos,¹⁶ y en particular azúcares raros cuando se utiliza propanalaldehído y G3P como sustratos.

6.3.2.4. Síntesis de 6-feniltetrahidro-2,4-piranodiol (**3.h**)

La reacción de adición aldólica entre benzaldehído (**2.h**) y acetaldehído se llevó a cabo en las condiciones antes descritas, realizando el análisis cualitativo de la reacción mediante CCD.

Como se puede observar en la **figura 6.25**, al utilizar **2.h** se observó la aparición de una señal tenue de un producto de mayor R_f que TDHP- del cual se observaron las señales correspondientes a ambos anómeros-. Sin embargo, al momento de la purificación, su recuperación fue despreciable. La baja reactividad de **2.h** puede estar dada por problemas estéricos o bien debido al bajo carácter electrofílico del carbono carbonílico al ser el benzaldehído un compuesto aromático. Grabner y colaboradores ya habían testeado la aceptación de este sustrato utilizando DERA con un rendimiento de reacción nulo.³ Dado que, aunque en muy baja proporción, este sustrato fue aceptado por nuestras DERAs, la optimización de las condiciones de reacción es una opción para plantear a futuro.



Figura 6. 25: CCD correspondiente a la reacción con 2.h. PaC: *Escherichia coli* PaDERA C49M C-His Lb: *Escherichia coli* LbDERA C42M E78K C-His

6.3.2.5 Síntesis de 6-fenil-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas (3.i)

Se utilizaron las condiciones antes descriptas para llevar a cabo la adición aldólica entre fenilacetaldehído (2.i) y acetaldehído. En el análisis cualitativo de la reacción se observó la formación del producto de interés como dos manchas de R_f cercanos, correspondientes a los anómeros. Acorde a lo sucedido anteriormente y a lo reportado en bibliografía, también se observó la formación de los dos anómeros de TDHP (figura 6.26).



Figura 6. 26: CCD correspondiente a la reacción con **3.i**. PaC: *Escherichia coli* PaDERA C49M C-His Lb: *Escherichia coli* LbDERA C42M E78K C-His.

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis cualitativo por GC-FID (**figura 6.27**). En correlación con lo antes mencionado, en el cromatograma también se observa la presencia de los dos productos: la señal correspondiente a TDHP (Tr: 13,9 min) y la señal que correspondería a **3.i** (Tr: 18,7 min).

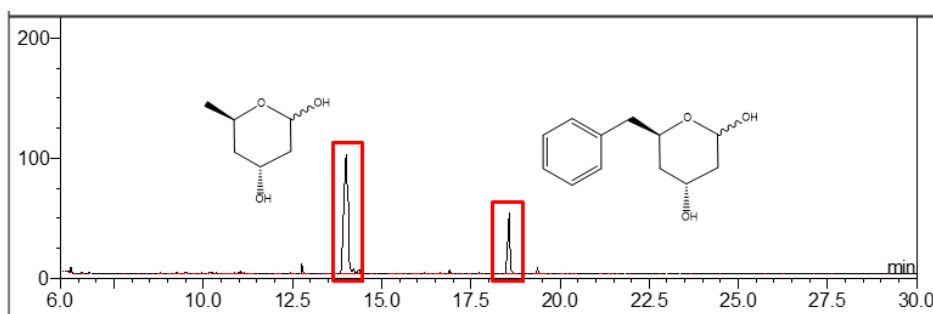


Figura 6. 27: GC-FID correspondiente a la reacción con **3.i** empleando *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His.

El producto fue purificado empleando cromatografía en columna. Las fracciones de interés se secaron hasta obtener un peso constante y se calculó en rendimiento tomando como referencia a **2.i** - el reactivo limitante de la reacción.

Al utilizar *Escherichia coli* BL21 DE3 *LbDERA* C42M E78K C-His como catalizador se obtuvo un rendimiento de 62%, un poco más del doble de lo obtenido por la otra variante (28,3%). Al igual que para **3.g**, poco se conoce sobre la síntesis de **3.i** utilizando DERA debido a que se encuentra reportada sólo bajo patente.¹⁵ Sin embargo, el análisis por RMN mostró una gran cantidad de señales correspondientes a los distintos intermediarios de la reacción indicando la baja estabilidad del compuesto luego de su purificación, lo que requiere de una optimización de la misma, que se llevará a cabo próximamente.

6.3.3 Síntesis de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas 6-sustituidas con bases nitrogenadas

6.3.3.1. Empleando células enteras

Para llevar a cabo las reacciones de adición aldólica entre **2.a** - **2.d** y acetaldehído se utilizaron las mismas condiciones antes descriptas. El análisis cualitativo por CCD demostró que no se formaron los productos de interés con ninguno de los dos biocatalizadores.

Esto podría atribuirse o bien a problemas en la permeabilidad de las células que pueden presentarse cuando se utilizan células enteras como biocatalizadores o bien a que los sustratos no sean aceptados por DERA. Por tales motivos, se procedió a realizar las reacciones utilizando el ELC de las bacterias recombinantes o bien las enzimas aisladas.

6.3.3.2. Empleando ELC

Con el fin de comprobar el motivo por el cual no se obtuvo producto en las reacciones con célula entera, se probó emplear como biocatalizador el ELC de las bacterias recombinantes, el cual se preparó utilizando la metodología ya descripta en el **capítulo 3**. Cabe aclarar que el ELC se realizó conservando la misma concentración de bacterias que las utilizadas en forma de células enteras para poder comparar los resultados.

Se agregaron los aldehídos derivados de las bases y el acetaldehído y se tomaron alícuotas a distintos tiempos para seguir la reacción. En el análisis cualitativo por CCD

se observó, para todos los sustratos, la formación de un producto de Rf mayor al sustrato aldehídico cuya identidad podría atribuirse a los lactoles de interés.

Sin embargo, al cabo de 3 h de reacción el producto se degradó, viéndose por placa una señal difusa muy cercana a la línea de base. Dicho inconveniente podría estar vinculado a que los productos poseen estructuras similares a los nucleósidos naturales y podrían ser sustratos de otras enzimas contenidas en el ELC. Por tal motivo, se consideró no continuar con este formato de biocatalizador. De cualquier forma, este resultado nos hizo pensar que el problema no se encontraba en la aceptación del sustrato por DERA, sino que la metodología utilizada no era la correcta. Es por ello que, en una última instancia, se realizaron las reacciones de adición aldólica empleando enzima purificada.

6.3.3.3. Utilizando enzima libre

Si bien teníamos como objetivo probar las dos variantes de DERA (*PaDERA* C49M C-His y *LbDERA* C42M E78K C-His), al momento de comenzar con las reacciones se restringió el acceso al laboratorio por las medidas sanitarias por COVID-19. Este inconveniente nos llevó a avanzar en las reacciones empleando *PaDERA* C49M C-His, dejando para un futuro las reacciones catalizadas por *LbDERA* C42M E78K C-His. Para llevar a cabo la reacción, la enzima *PaDERA* C49M C-His se purificó tal como se describió en el **capítulo 3**. Luego de la determinación de la concentración y de la actividad, se procedió a realizar la reacción de adición aldólica entre los derivados aldehídicos (**2.a- 2.d**) y acetaldehído (en una relación 1:2) utilizando 3 mg/ml de enzima. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos cada 0,5 h durante 5 h, las cuales se centrifugaron a máxima velocidad para obtener el sobrenadante libre de enzima. Las muestras se analizaron cualitativamente y cuantitativamente utilizando HPLC-UV, observándose el consumo del sustrato y la aparición del producto. Los resultados se describen a continuación.

6.3.3.3.1. Síntesis de 6-timinil-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa (3.a)

En la **figura 6.28** se muestra un análisis de masas utilizando un HPLC-MS. En el espectro obtenido se observa una señal de $m/z = 257,11$ correspondiente a la molécula de interés. Una vez identificado el producto, se cuantificó utilizando una curva de

calibración de timina (**inciso 6.2.5.2**) dando como resultado una conversión de 42% (42 mM) a las 4 h de reacción.

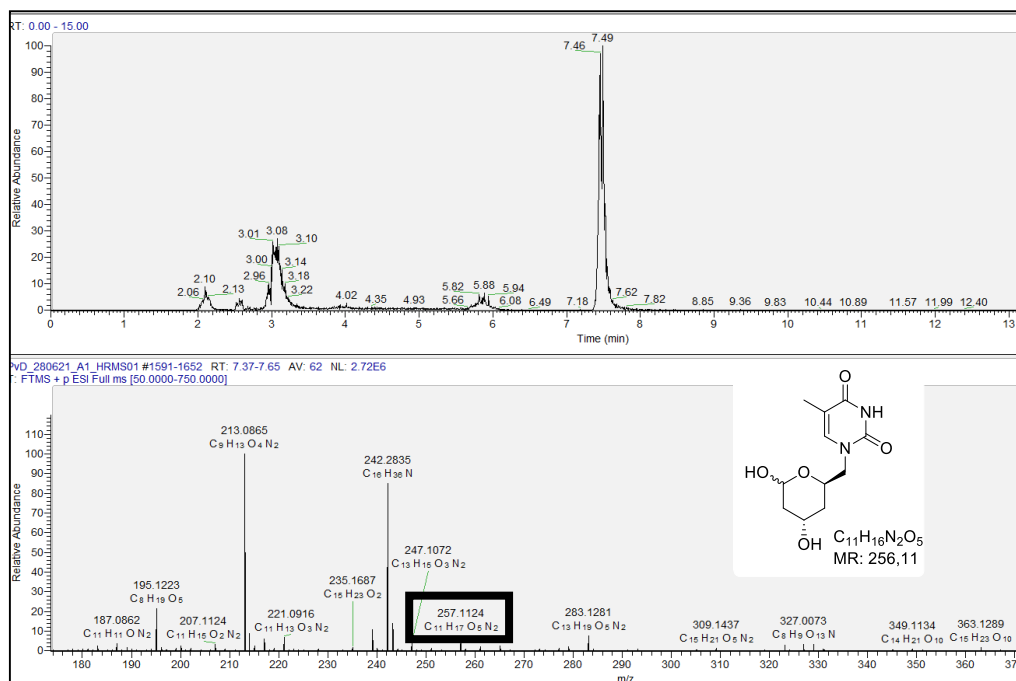
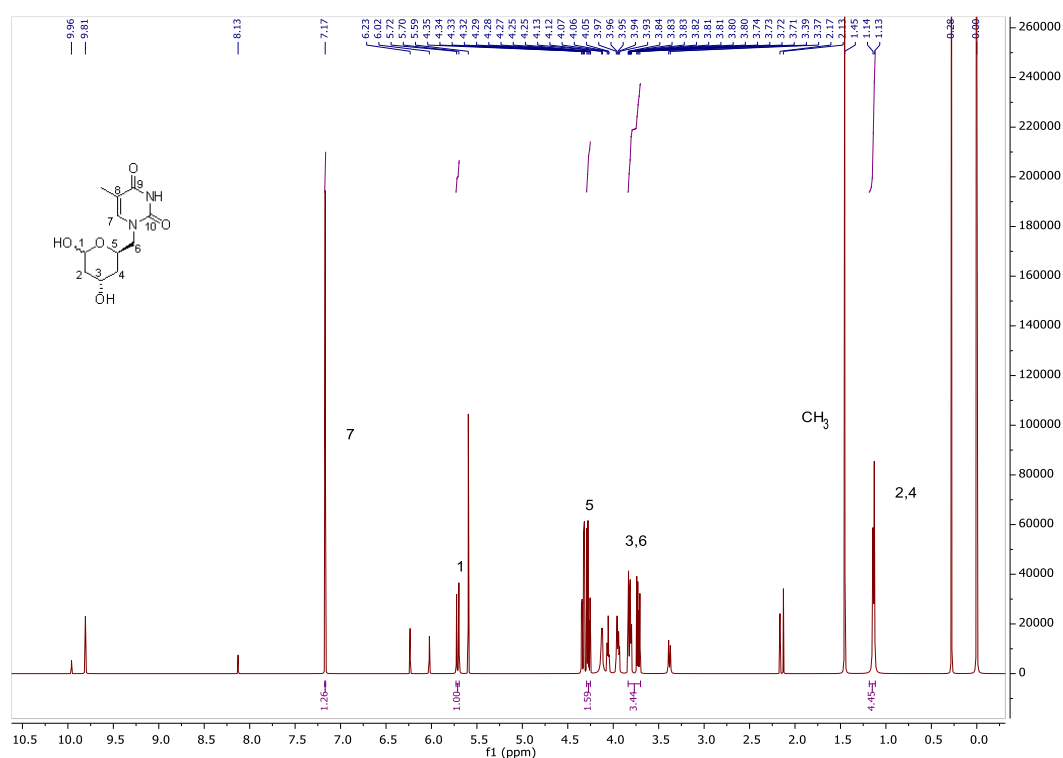


Figura 6. 28: Espectro de masas correspondiente a **3a**.

El producto **3.a** se aisló empleando cromatografía en columna y se analizó por ¹³C-RMN y ¹H-RMN. En la **figura 6.29** se muestra el espectro protónico donde se puede observar la señal correspondiente al hidrógeno del C-5 como un multiplete por el acoplamiento con los hidrógenos de C-6 y C-4. Los doble dobletes de los hidrógenos de C-6, que muestran un comportamiento diasterotópico característico de la unión al carbono quiral del ciclo, se solapan con el multiplete del hidrógeno del C-3. También es posible observar el típico doblete del hidrógeno del C-1 y los hidrógenos correspondientes a la timina, el singulete del metilo y el hidrogeno vinílico (H-7).


 Figura 6. 29: ¹H-RMN de **3.a**.

Sin embargo, luego de analizar el espectro de RMN, nos dimos cuenta que aparte de las señales del compuesto de interés también se observan señales correspondientes al sustrato y a otras especies intermediarias. Como se puede visualizar en la **figura 6.30**, existe la posibilidad de que solo se dé la adición aldólica entre un acetaldehído y el derivado aldehídico de la timina formando el compuesto **5.a**. A su vez, la eventual formación del hidrato **7.a** ya había sido discutido en un trabajo previo del laboratorio.¹⁷ Las formas aldehído e hidrato de los derivados de las bases nitrogenadas se encuentran en equilibrio en medios acuosos, muchos de ellos estabilizados por interacciones puente hidrógeno con los heteroátomos de las bases.⁷ Por tales motivos, se cree necesario escalar la reacción para una mejor purificación del producto de interés; esto, por cuestiones de tiempo, no se logró hacer al momento de escribir esta Tesis.

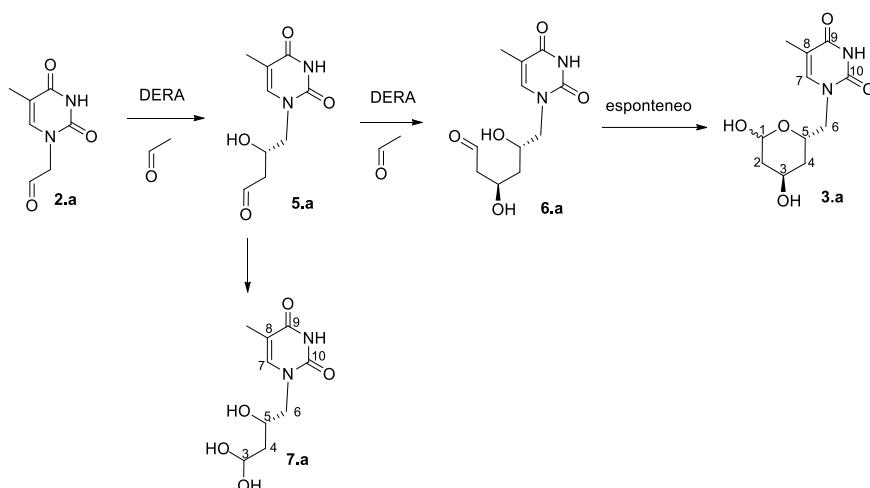


Figura 6. 30: Reacción de síntesis de **3.a**

En el ^{13}C -RMN (**figura 6.31**) se ven las señales típicas del anillo aromático y se pueden apreciar que las señales de los carbonos del ciclo concuerdan con lo esperado. Como habíamos mencionado anteriormente, también se observan señales que corresponden a los compuestos intermediarios de la reacción.

Los resultados obtenidos nos indican que se formó el producto de interés **3.a**, aunque deben realizarse algunas modificaciones tanto en el protocolo de síntesis como de purificación para evitar la presencia de las otras especies.

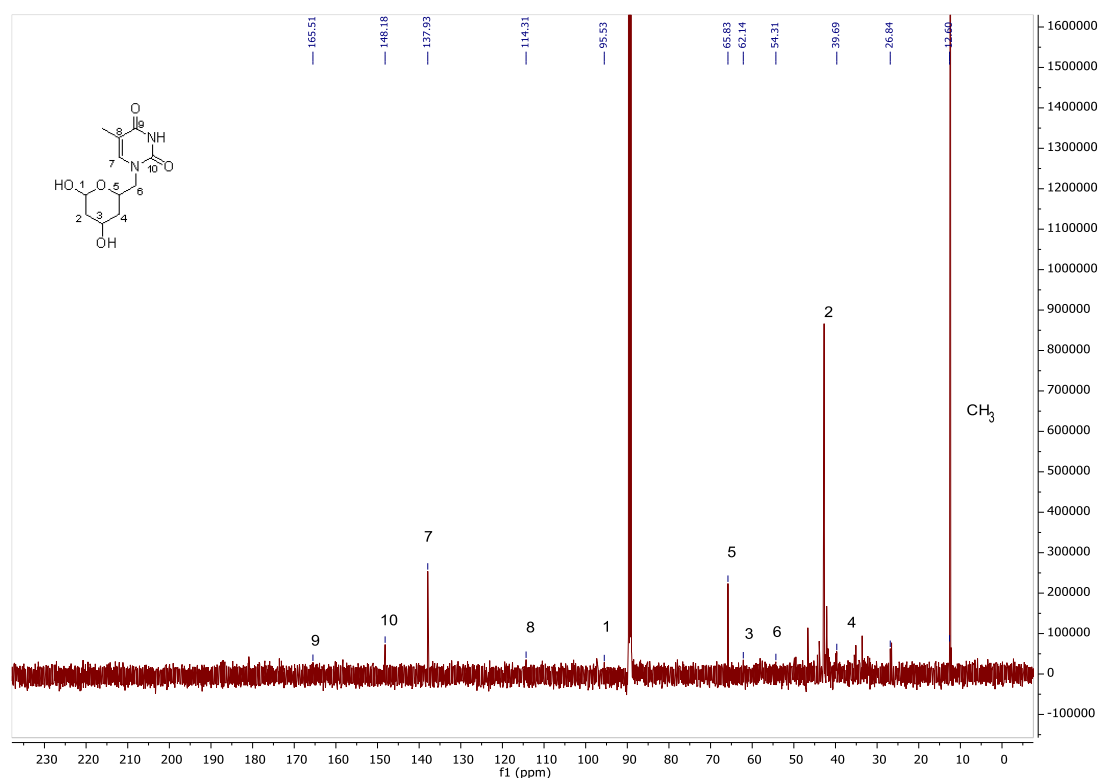
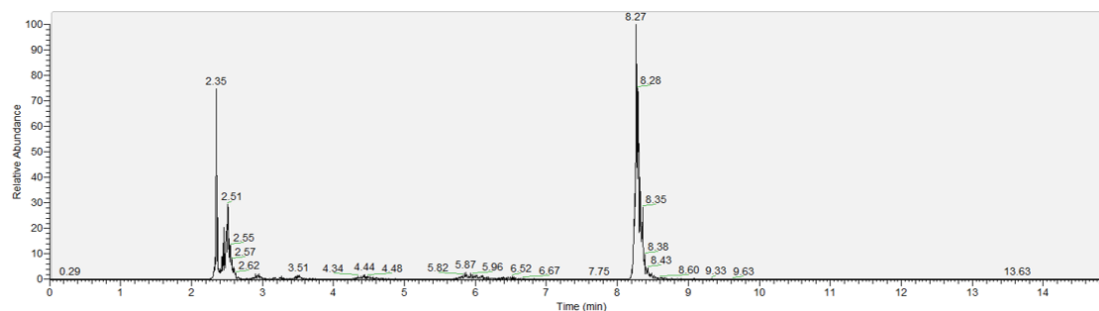


Figura 6. 31: ^{13}C -RMN de **3.a**.

6.3.3.3.2. Síntesis de 6-adenil-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa (**3.b**)

En la figura 6.32 se muestra el análisis de masas utilizando un HPLC-MS. En el espectro obtenido se observa una señal de $m/z = 266,12$ correspondiente a la molécula de interés.



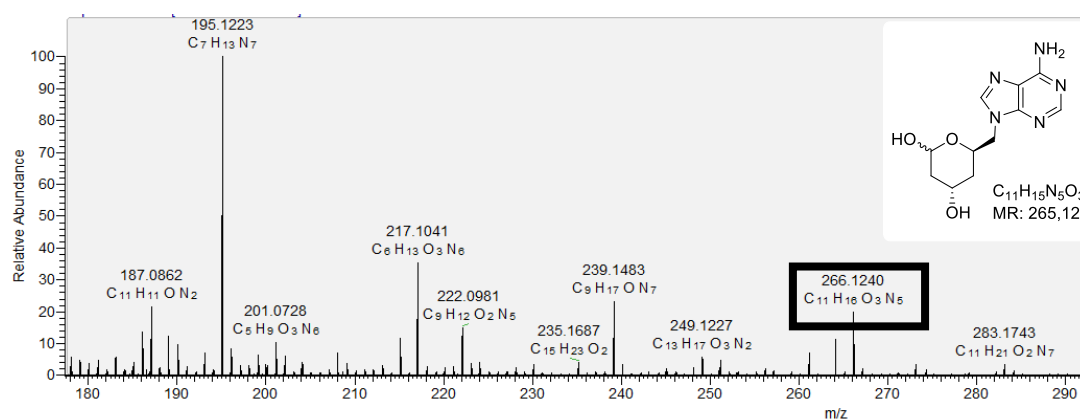


Figura 6. 32: Espectro de masas correspondiente a 3.b.

Una vez identificado el producto, se calculó la conversión a las 2 h utilizando una curva de calibración de adenina, obteniéndose un resultado menor al 5%. Al no obtener cantidad suficiente de muestra, no se pudo realizar aun la determinación estructural de **3b**.

6.3.3.3.3. Síntesis de 6-citosil-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa (**3.c**)

En la figura 6.33 se muestra el cromatograma obtenido utilizando un HPLC-MS. Se observó la señal correspondiente a Tr= 3,19 min, la cual sometió a un análisis de masas dando como resultado una señal de m/z= 242,11 coincidente con masa de **3.c**. Si bien hasta el momento no se pudo calcular el porcentaje de conversión, se pudo comprobar la existencia del producto de interés.

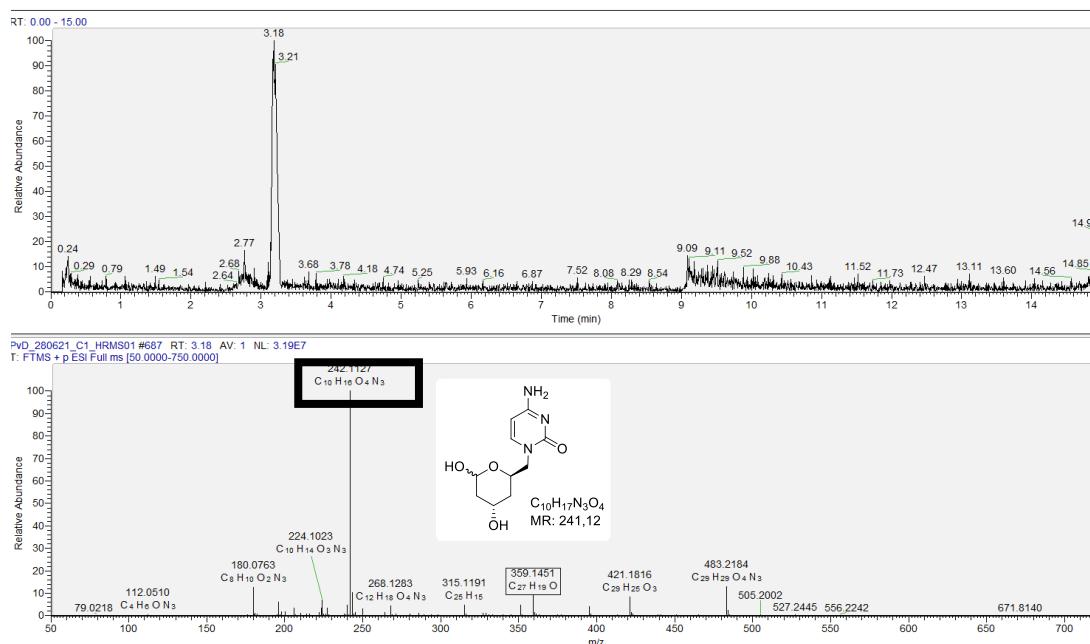


Figura 6. 33: Espectro de masas correspondiente a 3.c.

6.3.3.3.4. Síntesis de 6-benzimidazoyl-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas (3.d)

Al igual que en los casos anteriores, mediante HPLC-MS fue posible determinar la existencia del producto **3.d**. El análisis de masas de la señal correspondiente a un Tr= 9,9 min, dio como resultado una señal de $m/z = 249,12$ coincidente con la masa de nuestro producto de interés (figura 6.34).

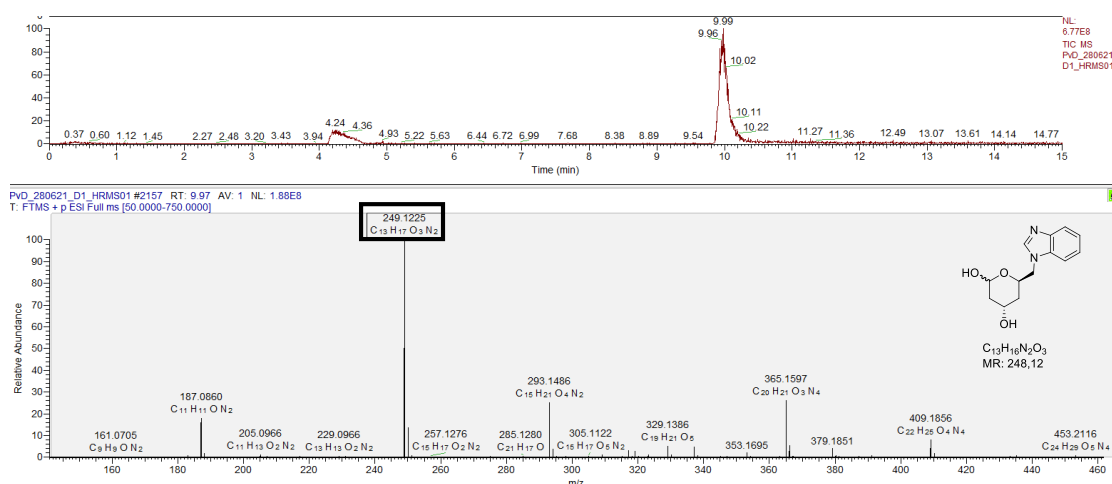


Figura 6. 34: Espectro de masas correspondiente a 3.d.

6.3.4 Resultados comparativos

En la **tabla 6.5** se resumen las reacciones llevadas a cabo en este capítulo utilizando los sustratos **2.a - 2.i**.

Tabla 6. 5: Rendimientos de reacción. Nr: no reacciona. Nd: resultado positivo, pero rendimiento no determinado

<i>ESCHERICHIA COLI</i> BL21 DE3	3.A	3.B	3.C	3.D	3.E	3.F	3.G	3.H	3.I
PADERA C49M C-HIS	42%	5%	Nd	Nd	<5%	Nr	22,3%	Nr	28,3%
LBDERA C42M E78K C-HIS	-	-	-	-	33,2%	Nr	18%	Nr	62%

En primer lugar, y acorde a lo estudiado en los capítulos anteriores, se utilizaron células enteras como biocatalizadores, obteniéndose resultados aceptables para tres de los sustratos propuestos (**2.e**, **2.g** y **2.i**). El rendimiento se calculó llevando a peso constante los productos obtenidos y tomando como referencia los aceptores electrofílicos, ya que estos eran los reactivos limitantes en cada reacción. En particular, utilizando *Escherichia coli* BL21 DE3 *LbDERA* C42M E78K C-His se obtuvo un rendimiento de 62% cuando el sustrato fue **2.i**. En contraposición, y acorde con lo reportado en bibliografía, el empleo de **2.f** y **2.i** como sustratos no rindieron cantidades suficientes de los productos para ser purificados.

Cuando se utilizaron los sustratos **2.a – 2.d** y las células enteras de las bacterias recombinantes, no se produjo reacción. No obstante, al utilizar el ELC de ambas variantes se observó la formación de producto, pero al poco tiempo de reacción se degradó imposibilitando su análisis. Esto nos indicó que el problema no era la aceptación de los sustratos, sino que, al ser moléculas voluminosas, podrían existir problemas de transferencia de masas que impidan el paso del sustrato a través de la membrana de la célula. Para evitar las reacciones secundarias que pueden darse por las enzimas en el ELC y, por ende, la degradación de los productos, se decidió trabajar con enzima libre. Hasta el momento, solo fue posible realizar las reacciones utilizando *PaDERA C49M C-His* obteniendo resultados prometedores para todos los sustratos.

Si bien se comprobó la formación de los productos **3.a – 3.d**, el aislamiento de los productos no se pudo realizar correctamente, por lo que queda pendiente la optimización de la purificación y la confirmación estructural de todos los productos por RMN. Podemos decir entonces que estos biocatalizadores son adecuados para ser utilizados en la síntesis de estos productos.

6.4. Conclusiones

En este capítulo se demuestra que utilizando las dos variantes de DERA fue posible sintetizar 2,4,6- tridesoxi D-eritro-hexapiranosas 6-sustituidas, utilizando acetaldehído y diversos sustratos aceptores electrofílicos, entre ellos los derivados de bases nucleosídicas propuestos en esta Tesis.

En una primera instancia, y acorde con los resultados previos, se llevaron a cabo biotransformaciones utilizando células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His y *Escherichia coli* BL21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His, con buenos rendimientos para tres de los sustratos ensayados (cloroacetaldehído, propanalaldehído y fenilacetaldehído).

Es por esto último que se decidió probar con otras formas de biocatalizador ya ensayadas en los capítulos anteriores (ELC o enzima libre) con los restantes sustratos aldehídicos derivados de las bases nitrogenadas (**2a** – **2d**). Debido a que estos compuestos son estructuralmente similares a moléculas comunes del metabolismo de las células, el empleo de ELC no brindó buenos resultados. Sin embargo, cuando se empleó la enzima libre, se lograron sintetizar los productos **3.a** - **3.d**, restando la optimización de las condiciones de reacción que permita el escalado de la misma a fin de realizar los estudios estructurales correspondientes.

La metodología empleada resulta novedosa en cuanto a la síntesis de estatinas, ya que la cadena lateral, al construirse a partir del sustrato conteniendo el heterociclo, se evitan acoplamiento posteriores que conducen a procesos menos productivos.

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

6.5. Referencias bibliográficas

1. Švarc, A., Fekete, M., Hernandez, K., Clapés, P., Findrik Blažević, Z., Szekrenyi, A., Skendrović, D., Vasić-Rački, Đ., Charnock, S.J., and Presečki, A.V. (2021). An innovative route for the production of atorvastatin side-chain precursor by DERA-catalysed double aldol addition. *Chem. Eng. Sci.* **231**, 116312.
2. Jennewein, S., Schürmann, M., Wolberg, M., Hilker, I., Luiten, R., Wubbolts, M., and Mink, D. (2006). Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-d-ribose 5-phosphate aldolase. *Biotechnol. J.* **1**, 537–548.
3. Grabner, B., Pokhilchuk, Y., and Gruber-Woelfler, H. (2020). DERA in flow: Synthesis of a statin side chain precursor in continuous flow employing deoxyribose-5-phosphate aldolase immobilized in alginate-luffa matrix. *Catalysts* **10**, 137–147.
4. Časar, Z. (2008). Straightforward and efficient synthesis of (4R,6S)-4-(tert-butylidimethyl-siloxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydropyran-2-one. *Synlett*, 2036–2040.
5. Ošljaj, M., Cluzeau, J., Orkić, D., Kopitar, G., Mrak, P., and Časar, Z. (2013). A highly productive, whole-cell DERA chemoenzymatic process for production of key lactonized side-chain intermediates in statin synthesis. *PLoS One* **8**, e62250.
6. Morales, D., Tabernero, M., Largo, C., Polo, G., Piris, A.J., and Soler-Rivas, C. (2018). Effect of traditional and modern culinary processing, bioaccessibility, biosafety and bioavailability of eritadenine, a hypocholesterolemic compound from edible mushrooms. *Food Funct.* **9**, 6360–6368.
7. Palazzolo, M.A., Nigro, M.J., Iribarren, A.M., and Lewkowicz, E.S. (2016). A Chemoenzymatic Route to Prepare Acyclic Nucleoside Analogues. *European J. Org. Chem.* **2016**, 921–924.
8. Palazzolo, M.A., Pérez-Sánchez, M., Iribarren, A.M., Lewkowicz, E.S., and Domínguez De María, P. (2012). Organocatalytic synthesis of novel purine and pyrimidine acyclic nucleosides. *Tetrahedron Lett.* **53**, 6797–6800.
9. Ze-Qi, X., Qiu, Y.-L., Chokekijchai, S., Mitsuya, H., and Zemlicka, J. (1995). Unsaturated acyclic analogues of 2'-deoxyadenosine and thymidine containing fluorine: synthesis and biological activity. *J. Med Chem* **38**, 875–882.
10. Howell, J.R., and Rasmussen, M. (1993). Heterocyclic ambident nucleophiles. V. Alkylation of benzimidazoles. *Aust. J. Chem.* **46**, 1177–1191.
11. Lafuente, L., Maidana, L., Bisceglia, J., Iribarren, A., and Lewkowicz, E. (2022). Organocatalytic synthesis of benzimidazole derivatives. *Synthesis (Stuttg.)*, 1–8.
12. Xuan, K., Yang, G., Wu, Z., Xu, Y., and Zhang, R. (2020). Efficient synthesis of (3R,5S)-6-chloro-2,4,6-trideoxyhexapyranose by using new 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase from *Streptococcus suis* with moderate activity and aldehyde tolerance. *Process Biochem.* **92**, 113–119.
13. Jiao, X.C., Pan, J., Xu, G.C., Kong, X.D., Chen, Q., Zhang, Z.J., and Xu, J.H. (2015). Efficient synthesis of a statin precursor in high space-time yield by a new

- aldehyde-tolerant aldolase identified from *Lactobacillus brevis*. *Catal. Sci. Technol.* **5**, 4048–4054.
14. Gijzen, H., and Wong, C.-H. (1995). Sequential three- and four-substrate aldol reactions catalyzed by aldolases. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 7585–7591.
 15. Mink, Wolberg, Schurmann, and Hilker (2007). Patente.
 16. Chambre, D., Guérard-Hélaine, C., Darii, E., Mariage, A., Petit, J.L., Salanoubat, M., De Berardinis, V., Lemaire, M., and Hélaine, V. (2019). 2-Deoxyribose-5-phosphate aldolase, a remarkably tolerant aldolase towards nucleophile substrates. *Chem. Commun.* **55**, 7498–7501.
 17. Nigro, M.J., Brardinelli, J.I., Lewkowicz, E.S., Iribarren, A.M., and Laurella, S.L. (2017). Aldehyde-hydrate equilibrium in nucleobase 2-oxoethyl derivatives: An NMR, ESI-MS and theoretical study. *J. Mol. Struct.* **1144**, 49–57.

Capítulo 7

Oxidaciones

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

7.1. Introducción

Como hemos mencionado anteriormente, todas las estatinas poseen una cadena lateral quiral, en forma de lactona o hidrolizada, que le confiere actividad biológica (**figura 7.1**). Esta cadena lateral 3,5-dihidroxiheptanoica puede ser obtenida a partir de la oxidación de los hemiacetales cíclicos obtenidos por adición aldólica catalizada por DERA.

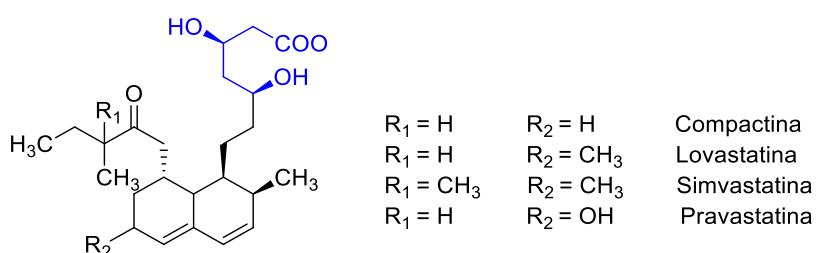


Figura 7. 1: Estructura general de las estatinas. En azul se muestra la cadena quiral conservada.

Una vez obtenidas las lactonas correspondientes, para continuar hacia la síntesis de las super-estatinas, es necesario que se hidrolice y se protejan adecuadamente los grupos hidroxilo para el ensamblaje de la cadena lateral con el heterociclo, como se ejemplifica en la **figura 7.2**.¹

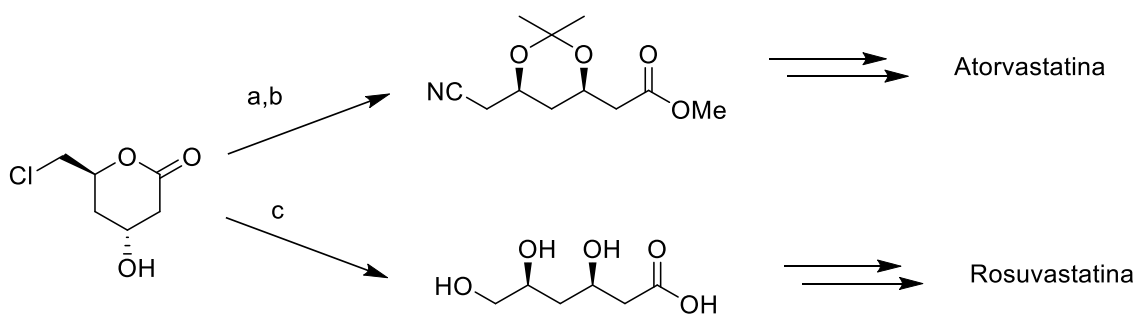


Figura 7. 2: Síntesis de Atorvastatina y Rosuvastatina. a) NaCN, DMF, 5% H₂O, 40°C, 16 h; b) Dimetoxipropano, DMF, H₂SO₄, seguido de trimetilsilil diazometano; c) NaOH, H₂O, 40°C, 16 h

Existen varias metodologías, químicas y biocatalizadas, ya descritas en bibliografía, para realizar la oxidación del hemiacetal cíclico a lactona. Una de las primeras reacciones químicas para oxidar el oxhidrilo del carbono anómero, fue llevada a cabo

por Lee en la década de los 80s.² Esta metodología utilizaba *N*-iodosuccinimida/ yoduro de tetrabutilamonio para oxidar TDHP a la correspondiente lactona a temperatura ambiente. Posteriormente, Rajagopal y colaboradores³ desarrollaron una metodología que incluía el empleo de $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ como catalizador de transferencia de electrones desde glucosa a ciclohexanona, produciendo así la correspondiente lactona (gluconolactona) y ciclohexanol como subproducto (**figura 7.3**). Sin embargo, las condiciones experimentales involucraban temperaturas elevadas (100°C) y el empleo de una atmosfera de N_2 , lo que hacía que las reacciones no fueran sustentables.

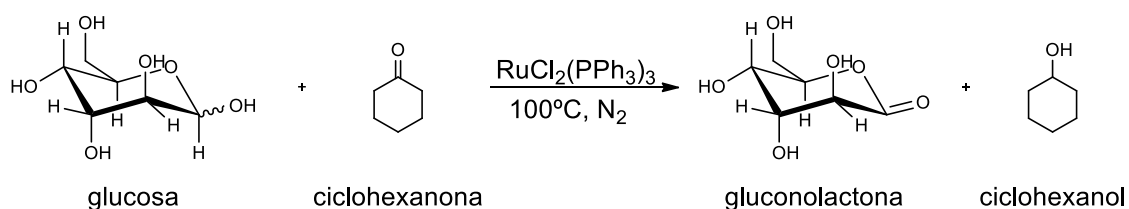


Figura 7. 3: Oxidación del glucosa empleando $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ como catalizador.

En un caso similar, la oxidación publicada por Wong y Gijsen⁴ implicaba una reacción con bromo y carbonato de bario, con buenos resultados a escala laboratorio en la oxidación de TDHP. Sin embargo, el costo y la toxicidad del bromo imposibilitarían su uso en un proceso a gran escala.

Debido a que la mayoría de las metodologías antes descriptas no son posibles de aplicar en procesos industriales, las oxidaciones más actuales proporcionan métodos fácilmente escalables y menos contaminantes. Por ejemplo, Greenberg y colaboradores,¹ identificaron un método económico para la oxidación selectiva de 6-cloro-2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranos a la correspondiente lactona utilizando hipoclorito de sodio acuoso (lavandina) y ácido acético. Debido a que la lactona es un sólido cristalino, la purificación se realizó por recrystalización, dando un producto con una alta pureza enantio- y diastereomérica.

En una metodología más reciente, Ošljaj y colaboradores⁵ emplearon hipoclorito de calcio para reemplazar la solución acuosa de hipoclorito de sodio, de esta forma se evita la incorporación de un volumen grande de agua que dificulta la purificación posterior de la lactona. Adicionalmente, esta metodología resultó innovadora debido a que la

oxidación se realizó directamente en el sobrenadante del medio de reacción sin el aislamiento del lactol, dando como resultado un rendimiento elevado, 84%, para la oxidación de acetiloximetil lactol (**figura 7.4**).

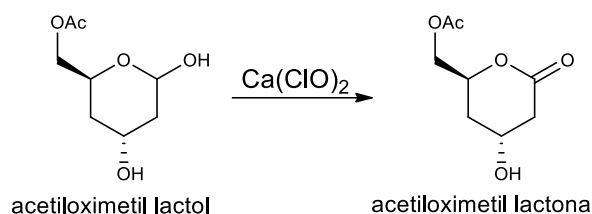


Figura 7. 4: Oxidación de acetiloximetil lactol, empleando hipoclorito de calcio

En cuanto a las metodologías biocatalíticas, hasta el momento solo dos enzimas pertenecientes al grupo de las oxidorreductasas fueron empleadas para la oxidación regioselectiva de 2,4,6-tridesoxihexopiranosas 6-sustituidas. Estas enzimas catalizan oxidaciones o reducciones, mediante la transferencia de electrones, o la incorporación de Oxígeno desde O_2 o H_2O_2 , empleando en general co-sustratos o cofactores. Ciertos cofactores actúan como co-sustratos y se consumen de manera equimolar.⁶ Debido a esto último, cuando se emplean enzimas aisladas es necesario desarrollar un sistema para su regeneración, puesto que, de otra forma, haría al proceso económicamente desfavorable.⁷

Una de las oxidorreductasas estudiadas en la oxidación de lactoles fue Glucosa deshidrogenasa, la cual se expresó en *Escherichia coli* como una proteína de membrana.⁸ Estas células enteras recombinantes fueron utilizadas en la oxidación de acetiloximetil lactol. Debido a que el cofactor de la enzima es pirroloquinolín quinona (PQQ), el cual tiene un costo elevado, fue necesario incluir un sistema para su regeneración. Esto último, sumado a la baja expresión obtenida de glucosa deshidrogenasa, hicieron que esta metodología no pueda ser empleada en una escala industrial.

A diferencia de lo ocurrido con PQQ, el empleo de cofactores como NADH o NADPH es un poco más barato, pero principalmente más fácil de regenerar. Por lo tanto, Jiao y colaboradores,⁹ sobre-expresaron la enzima aldehído deshidrogenasa de *Lodderomyces elongisporus*, dependiente de NAD(P)H para llevar a cabo la oxidación

de 6-cloro-2,4,6-trideoxi D-eritro-hexapiranosas, acoplado a un sistema de regeneración con NAD(P) oxidasas (SmNOX), obteniendo conversiones mayores a 95% (**figura 7.5**).

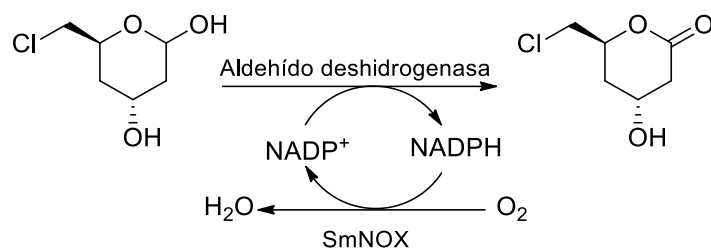


Figura 7. 5: Oxidación de 6-cloro-2,4,6-trideoxi D-eritro-hexapiranosas empleando aldehído deshidrogenasa.

En este capítulo se describe la oxidación de los compuestos obtenidos en los **capítulos 5 y 6**, llevada a cabo químicamente basándose en la metodología propuesta por Ošljaj y colaboradores.⁵

7.2. Materiales y métodos

Los reactivos analíticos y los sustratos fueron adquiridos en Sigma Aldrich. Los solventes orgánicos utilizados fueron de Sintorgan. Los componentes del medio de cultivo fueron de Britania y Biopack.

El medio de cultivo empleado fue LB-Kana

7.2.1. Oxidación química

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 4 ml, conteniendo 15% p/v de pellet bacteriano (*Escherichia coli* BL21 DE3 conteniendo PaDERA C49M C-His) en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7 y 500 mM de acetaldehído o 200 mM de acetaldehído y 100 mM de **3.f**, **3.g** y **3.i**. Al cabo de 24 h, la reacción se centrifugó a 9000 rpm durante 5 minutos. Al sobrenadante se le agregó 1,4 g de NaCl y se dejó agitando a temperatura ambiente hasta disolución completa de la sal. Posteriormente, se agregaron 1,4 ml de acetato de etilo y se dejó en baño de hielo. En un tiempo total de 3 h se agregó 640 mg de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$. La reacción se continuó por 2 h más. Se tomaron muestras cada hora. El acetato de etilo se evaporó y la fase acuosa resultante se filtró utilizando celite y se lavó con agua destilada. La solución acuosa filtrada se extrajo con CH_2Cl_2 , se concentró y se conservó para su análisis.

7.2.2. Análisis de la reacción

7.2.2.1. Análisis por CCD

Las muestras se analizaron CCD sobre placa de sílica gel (con un soporte de aluminio) con un indicador F254 (Merck), usando como fase móvil acetato de etilo: éter de petróleo, 10:90 (v/v). Las placas se revelaron mediante exposición a ácido sulfúrico al 5% en etanol y posterior calentamiento.

Tabla 7. 1: Rf correspondiente a las lactonas sintetizadas.

Lactona	Rf
TDHP	0,8
3.e	0,07
3.g	0,22
3.i	0.16

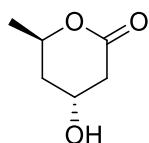
7.2.2.1. Análisis por GC-FID

Se empleó un cromatógrafo gaseoso (Thermo Trace 1300) acoplado a un detector de llama (CG-FID). Se empleó con una columna TRACE TR-5MS (0,25 μ m, 0,25 mm, 30 m). Las condiciones de corrida fueron: temperatura del inyector 200°C, temperatura de la columna: 5 minutos a 50°C, un gradiente de 10°C/min hasta 250°C y 5 minutos a 250°C. El tiempo total de corrida fue 21 min. Volumen de inyección 1 μ l, split: 1:50, calentador: 280°C. Tr TDHP= 13,9 min; Tr Lactona= 9,5 min

7.2.2.2. Análisis por RMN

Para los experimentos de ^1H -RMN se utilizó un equipo Avance Neo 500 (Bruker) a 500 MHz. Para los experimentos de ^{13}C -RMN se utilizó un equipo Avance II 500 (Madison, WI, EE.UU.) a 126 MHz. Las soluciones se prepararon disolviendo el compuesto en 700 μ L de CDCl_3 .

(4R,6R) 4-Hidroxi-6-metiltetrahidro-2H-piran-2-ona



^1H -RMN (500 MHz, Cloroformo-*d*) δ 4.16 – 4.12 (m, 1H), 3.78 – 3.70 (m, 1H), 1.86 – 1.81 (m, 1H), 1.70 – 1.41 (m, 3H), 1.27 (dd, J = 4.3, 2.9 Hz, 3H).

^{13}C -RMN (126 MHz, CDCl_3) δ 171.25, 65.01, 64.04, 37.68, 35.29, 28.68.

7.3. Resultados y discusión

Debido a que los verdaderos sintones quirales de las estatinas son las lactonas, en este último capítulo se describe el trabajo realizado en cuanto a la oxidación de los hemiacetales cíclicos empleando la reacción con hipoclorito de calcio ya descrita en bibliografía.⁵ Por una cuestión de practicidad se decidió iniciar con TDHP como sustrato modelo para poner a punto las técnicas de purificación y aislamiento del producto. Posteriormente, el estudio se extendió a los sustratos **3.e**, **3.g** y **3.i** obtenidos en el **capítulo 6**, los cuales fueron oxidados en las mismas condiciones de reacción (**figura 7.6**).

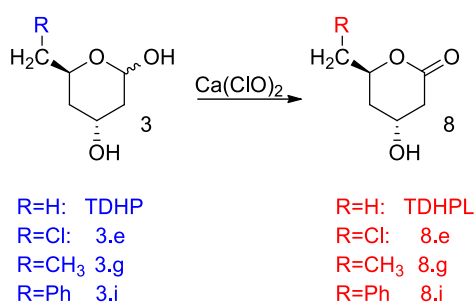


Figura 7. 6: Oxidación de lactoles.

Debido al cierre del laboratorio por las medidas sanitarias tras la pandemia de Covid19, la oxidación de los lactoles **3a** - **3d** aún sigue en proceso. Una de las limitantes afrontadas fue la baja producción de los lactoles, por lo cual todavía se siguen optimizando las reacciones de síntesis para obtener cantidad suficiente de sustrato de partida y oxidar a las correspondientes lactonas de interés.

7.3.1. Oxidación de TDHP

Como mencionamos anteriormente, se utilizó TDHP como sustrato modelo. En primer lugar, se realizó la síntesis de TDHP descrita en el **capítulo 5** utilizando 500 mM de acetaldehído y células enteras del biocatalizador. Al cabo de 24 h, se separó el pellet bacteriano del sobrenadante mediante centrifugación.

A dicho sobrenadante se le agregó $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, sin necesidad de aislar el lactol. Esto favorece al rendimiento ya que evita los pasos de purificación. Debido a que la reacción es exotérmica, la incorporación de este compuesto se realizó en baño de hielo y de a porciones, tomando muestras regularmente. En el análisis por CCD de la reacción se observó la desaparición completa de TDHP a las 5 h y la aparición de una señal de mayor R_f (**figura 7.7**).



Figura 7. 7: CCD de la lactona correspondiente a la oxidación de TDHP.

Adicionalmente, se realizó el análisis mediante GC-FID (**figura 7.8**). En el cromatograma se puede observar una señal mayoritaria de menor tiempo de retención que TDHP que correspondería a la lactona.

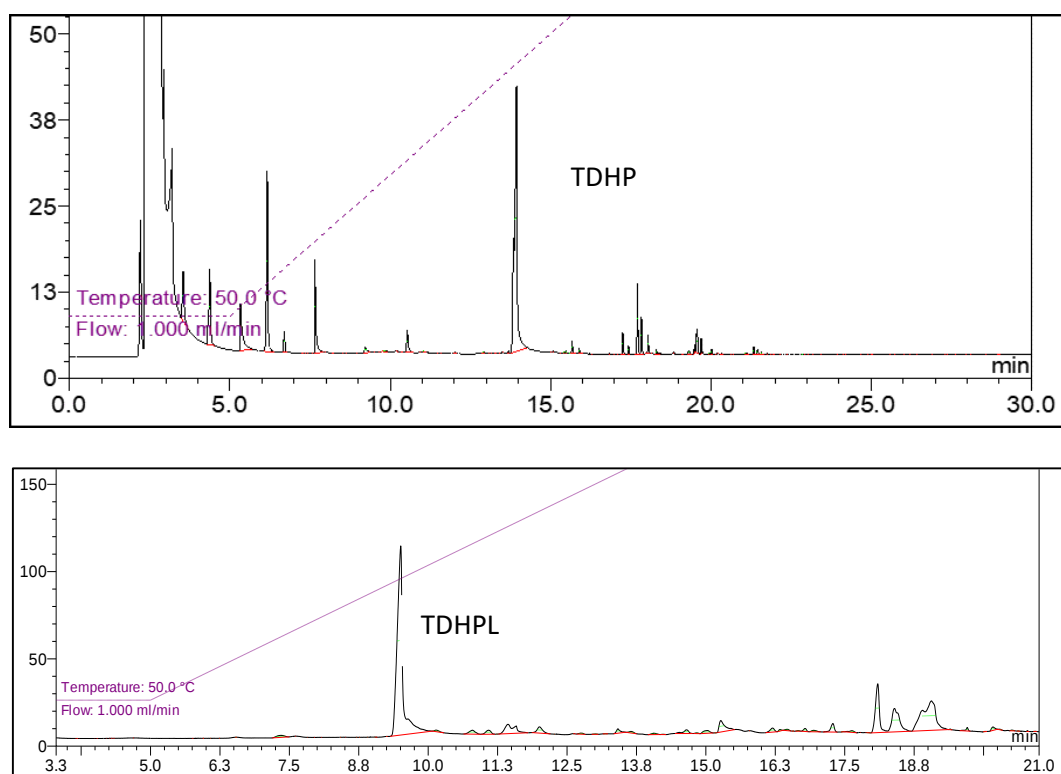


Figura 7. 8: GC-FID de la lactona correspondiente a la oxidación de TDHP.

El producto se aisló tal como se describe en la bibliografía⁵ obteniéndose 7 mg del compuesto, lo cual implica un rendimiento de 23,3% respecto de la cantidad de acetaldehído inicial. Posteriormente su estructura fue identificada por técnicas espectroscópicas.

En la **figura 7.9** se muestra el espectro ^{13}C -RMN, donde se evidencia la señal correspondiente al carbono carbonílico (C1) en 171,25 ppm, demostrando que TDHP se oxidó. También se pueden observar las señales de 95 ppm y 92 ppm, entre otras, correspondientes al lactol (TDHP) aunque en bajas proporciones. En el espectro de ^1H -RMN de la **figura 7.10**, se puede observar que señales concuerdan con la formación de la lactona, aunque observa, similar a lo ocurrido en el espectro ^{13}C -RMN, al H del C-1 del TDHP. Esto nos indica que, el método de purificación no fue eficiente y debe seguir poniéndose a punto para la eficiencia del resto de las reacciones. Las señales se asignaron de acuerdo a lo reportado por bibliografía.⁵

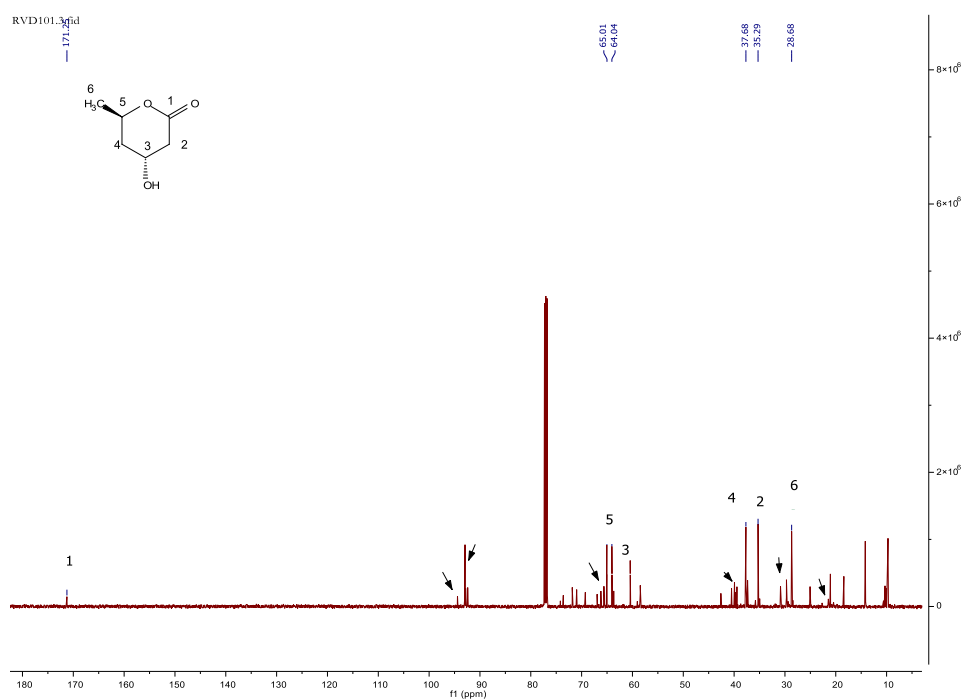


Figura 7. 9: ^{13}C -RMN: correspondiente a la oxidación de TDHP. Flechas señalando señales correspondientes al remanente de TDHP

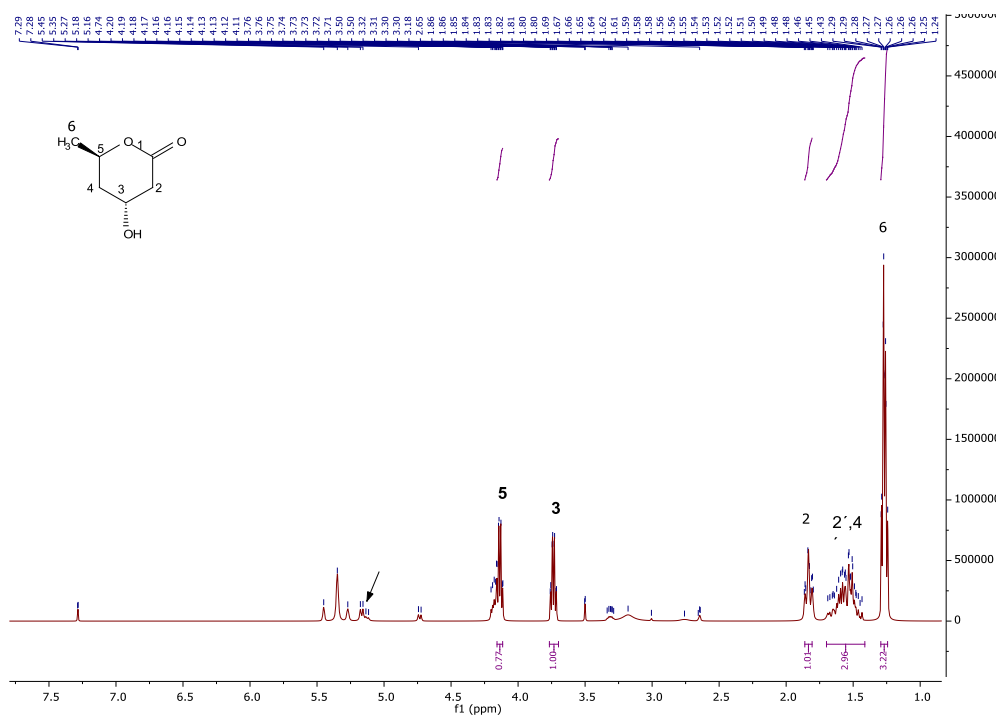


Figura 7. 10: ^1H -RMN: correspondiente a la oxidación de TDHP. Flecha señalando la señal correspondiente a TDHP

7.3.2. Oxidación de 3.e, 3.g y 3.i

Debido a los resultados prometedores empleando esta metodología, se procedió a realizar la oxidación con $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ del hemiacetal derivados del sustrato **3e**, **3g** o **3i**. Una vez sintetizados los lactoles correspondientes, al medio de reacción sin purificar se le agregó el agente oxidante tomando alícuotas a distintos tiempos controlando la desaparición total del sustrato y la aparición del producto. En la **figura 7.10** se pueden observar el tiempo inicial de las reacciones y luego de 5 h de reacción. Aunque el resultado de las oxidaciones fue favorable, el producto de la reacción aún no ha podido aislarse para su análisis por RMN.

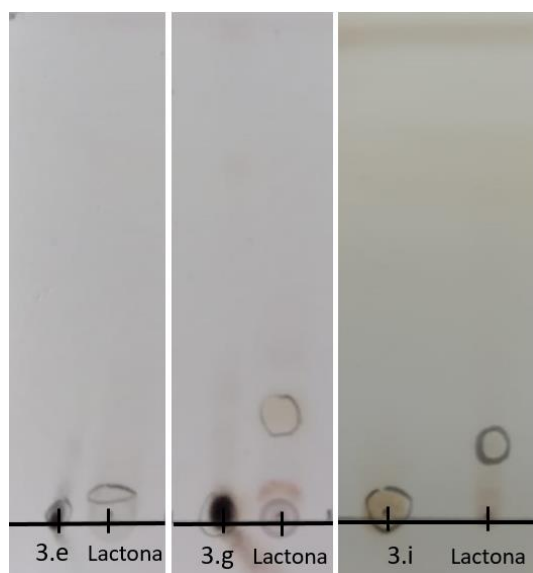


Figura 7. 11: CCD correspondientes a las oxidaciones de 3.e, 3.g y 3.i.

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

7.4. Conclusiones

Realizando la reacción de oxidación con $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ se pudo obtener la lactona derivada de TDHP, cuya formación fue confirmada por RMN. Si bien aún se sigue optimizando la metodología empleada, al extender la aplicación a varios de los lactoles sintetizados en el **capítulo 6** de esta Tesis se dieron indicios de la formación de las correspondientes lactonas. Actualmente, se aguardan los análisis por RMN para confirmar los productos de oxidación obtenidos.

Si bien debido a los retrasos causados por la emergencia sanitaria COVID 19, aún no se han obtenido las lactonas sustituidas con bases nitrogenadas (**7.a - 7.d**), compuestos potencialmente análogos de estatinas propuestos como objetivo de esta Tesis, los logros obtenidos con los demás sustratos y los ensayos preliminares nos alientan a continuar con la metodología empleada y nos auguran un resultado exitoso.

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

7.5. Referencias bibliográficas

1. Greenberg, W.A., Varvak, A., Hanson, S.R., Wong, K., Huang, H., Chen, P., and Burk, M.J. (2004). Development of an efficient, scalable, aldolase-catalyzed process for enantioselective synthesis of statin intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 5788–5793.
2. Lee, T.-J. (1985). An expeditious chiral route to analogs of mevinolin and compactin. *Tetrahedron Asymmetry* *26*, 4995–4996.
3. Rajagopal, S., Vancheesan, S., Rajaram, J., and Kuriacose, J.C. (1992). $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ -catalyzed transfer hydrogenation of D-glucose. *J. Mol. Catal.* *75*, 199–208.
4. Wong, C.H., and Gijsen, H.J.M. (1994). Unprecedented asymmetric aldol reactions with three aldehyde substrates catalyzed by 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase. *J. Am. Chem. Soc.*, 8422–8423.
5. Ošljaj, M., Cluzeau, J., Orkić, D., Kopitar, G., Mrak, P., and Časar, Z. (2013). A highly productive, whole-cell DERA chemoenzymatic process for production of key lactonized side-chain intermediates in statin synthesis. *PLoS One* *8*, e62250.
6. Zhao, H., and van Der Donk, W.A. (2003). Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* *14*, 583–589.
7. Immanuel, S., Sivasubramanian, R., Gul, R., and Dar, M.A. (2020). Recent progress and perspectives on electrochemical regeneration of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). *Chem. - An Asian J.* *15*, 4256–4270.
8. Vajdič, T., Ošljaj, M., Kopitar, G., and Mrak, P. (2014). Engineered, highly productive biosynthesis of artificial, lactonized statin side-chain building blocks: The hidden potential of *Escherichia coli* unleashed. *Metab. Eng.* *24*, 160–172.
9. Jiao, X.-C., Zhang, Y.-J., Chen, Q., Pan, J., and Xu, J.-H. (2016). A green-by-design system for efficient bio-oxidation of an unnatural hexapyranose into chiral lactone for building statin side-chains. *Catal. Sci. Technol.* *6*, 7094–7100.

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

Capítulo 8

Conclusiones generales

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

Conclusiones generales

El trabajo realizado, expuesto en los distintos capítulos de esta Tesis, ha permitido cumplir con los objetivos propuestos, la obtención de 2-desoxirribosa-5-fosfato (DR5P) como intermediario en la síntesis de nucleósidos con actividad antitumoral o antiviral, como así también la síntesis de derivados de bases nucleosídicas como novedosos compuestos para ser testeados como fármacos con actividad anticolesterolémica. En ambos casos, se empleó una estrategia quimioenzimática utilizando biocatalizadores basados en 2-desoxirribosa-5-fosfato aldolasa (DERA).

En primer lugar, DERAs pertenecientes a *Pectobacterium atrosepticum* y *Lactobacillus brevis* fueron sobre-expresadas y/o modificadas genéticamente con el fin de aumentar la tolerancia a concentraciones elevadas de acetaldehído. Las variantes de DERA fueron obtenidas gracias a una colaboración con el grupo de investigación a cargo del Prof. Ulf Hanefeld (Universidad Tecnológica de Delft, Países Bajos) en el marco de un Proyecto de la Unión Europea (ERACo BioDiMet) del cual fui una de las estudiantes de doctorado participante. Se obtuvieron cuatro variantes de DERA de *Pectobacterium atrosepticum*: PaDERA N-His, PaDERA C-His, PaDERA C49M C-His y PaDERA AA C-His. Adicionalmente, se obtuvo de dicha colaboración otra DERA perteneciente a *Lactobacillus brevis* sobre-expresada y modificada genéticamente para aumentarle no solo la resistencia a acetaldehído sino también su estabilidad.

La puesta a punto de la expresión y purificación de cada enzima se realizó en el marco de una pasantía de investigación en el Instituto de Investigaciones Médicas Dr. Alfredo Lanari bajo la supervisión del Dr. Claudio Pereira. La determinación de la concentración de enzima obtenida luego de la optimización, como así también de la actividad enzimática nos permitió seleccionar tres de las variantes caracterizadas como fuentes de DERA para emplear en esta Tesis: PaDERA N-His, PaDERA C49M C-His y LbDERA C42M E78K C-His. Los resultados más notables fueron los obtenidos para PaDERA C49M C-His, cuya expresión y actividad fueron de 0,98 mg/ml y 28,9 U/mg, respectivamente. Esto corresponde a un 50% más de expresión que las otras dos variantes analizadas y, a la vez, esta enzima resultó ser 2 veces más activa que PaDERA N-His y 4 veces más activa que LbDERA C42M E78K C-His.

Los biocatalizadores antes descritos fueron inicialmente evaluados para la síntesis de DR5P a partir de acetaldehído y gliceraldehido-3-fosfato (G3P) o glucosa. Estos biocatalizadores fueron empleados en tres formatos: enzima libre, extracto libre de células (ELC) o células enteras, siendo esta última seleccionada para continuar con las biotransformaciones. Utilizando células enteras, se obtuvieron conversiones mayores al 90% para las tres variantes de DERA cuando el sustrato de la reacción fue G3P. Cuando se empleó glucosa como sustrato se obtuvieron rendimientos mayores al 20% al emplear *PaDERA* N-His y *LbDERA* C42M E78K C-His. Sin embargo, uno de los resultados que llamó la atención en esta reacción fue que la variante *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* C49M C-His produjo una conversión despreciable de DR5P. Debido a los valores altos de actividad y de expresión y a las pruebas realizadas, se puede presumir una inhibición de la enzima por glucosa, hipótesis que requerirá de pruebas bioinformáticas que avalen el trabajo experimental realizado.

Por otro lado, el empleo de DERA como biocatalizador permitió llevar a cabo una adición aldólica secuencial empleando acetaldehído como único sustrato, generando 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranososa (TDHP), el cual resulta muy útil como precursor en la síntesis de la cadena lateral de fármacos tipo estatinas. Dado que la síntesis de TDHP utilizando células enteras no se encuentra ampliamente reportada en bibliografía, se decidió buscar las condiciones apropiadas para obtener dicho compuesto en cantidades suficientes para seguir con el resto de los ensayos planificados. Empleando *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* C49M C-His y *Escherichia coli* BL21 DE3 *LbDERA* C42M E78K C-His en condiciones estándar se obtuvieron rendimientos del 75% y 62%, respectivamente; un poco más de 10 veces del rendimiento obtenido al emplear *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* N-His. Este resultado era de esperarse debido a que *PaDERA* N-His no posee mutaciones que hagan a la enzima más tolerante a acetaldehído y como consecuencia no fue tomada en cuenta para seguir con el resto de las biotransformaciones. Se determinaron como condiciones óptimas de reacción para *Escherichia coli* BL21 DE3 *PaDERA* C49M C-His y *Escherichia coli* BL21 DE3 *LbDERA* C42M E78K C-His, 500 mM de acetaldehído y 24 h de reacción, con las cuales se obtuvo un 100% de conversión a TDHP. Similares condiciones de reacción se emplearon para posteriormente llevar a cabo las síntesis de TDHP 6-sustituidas, empleando distintos aldehídos - comerciales o sintetizados a partir de bases nitrogenadas - como sustratos electrofílicos en la reacción con acetaldehído catalizada por DERA.

En la primera etapa se llevaron a cabo las biotransformaciones con células enteras de *Escherichia coli* BL21 DE3 PaDERA C49M C-His y *Escherichia coli* BL21 DE3 LbDERA C42M E78K C-His, empleando sustratos comerciales. Al utilizar fenilacetaldehído, cloroacetaldehído y propanaldehído ambos biocatalizadores catalizaron la adición aldólica con rendimientos mayores al 15% para la mayoría de las reacciones. Sin embargo, benzaldehído y dimetoxiacetaldehído no reaccionaron.

Con el fin de preparar los nuevos derivados conteniendo bases nucleosídicas, en una primera instancia se llevó a cabo la síntesis de los sustratos aldehídicos adecuados a partir de las bases nitrogenadas: adenina, citosina, timina y benzimidazol. Debido a la analogía que presentan estos sustratos con las bases nitrogenadas naturales, la reacción con células enteras no fue eficiente, por lo que se decidió realizar la reacción la síntesis empleando PaDERA C49M C-His y LbDERA C42M E78K C-His como enzimas libres. De esta forma, se lograron obtener los respectivos productos de cada uno de los derivados aldehídicos de las bases nitrogenadas, cuya síntesis se verificó por HPLC-MS. Llegado a este punto, y debido al contexto de la pandemia de Covid-19, la obtención de cantidades suficientes de producto puro necesario para realizar los análisis por RMN se vió frenada y actualmente se continúa trabajando en esa dirección teniendo resultados preliminares muy favorables. Es importante destacar que esta metodología de sintetizar nuevos análogos de estatinas es novedosa debido a que, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no existen estrategias en las cuales el aldehído aceptor de DERA ya contenga el heterociclo, y la cadena lateral se construya a partir del mismo. Además, hasta el momento no existen reportes de estatinas conteniendo bases nucleosídicas como heterociclo, aun sabiendo que Eritadenina - un nucleósido acíclico - posee efectos antiolesterolémicos por lo que los compuestos obtenidos son moléculas nuevas.

Por último, y para obtener la cadena lateral 3,5-dihidroxiheptanoica conservada y responsable de la actividad farmacológica de las estatinas, es necesario oxidar el hemiacetal cíclico obtenido luego de la adición aldólica catalizada por DERA. En el final de esta tesis, se comenzaron a ensayar oxidaciones químicas de las TDHP 6-sustituidas empleando $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ como agente oxidante. Hasta el momento solo se han obtenido resultados cualitativos de la presencia de las correspondientes lactonas las cuales también serían compuestos novedosos. Se planea continuar desarrollando en el

laboratorio tanto oxidaciones químicas como reacciones empleando biocatalizadores redox para la obtención de las mismas.

Los resultados de esta Tesis Doctoral dieron origen a las siguientes publicaciones:

- **Importancia de las aldolasas en la síntesis de productos anticolesterolémicos.** Fernández Varela, R. N., Iribarren, A. M., & Lewkowicz, E. S., Perfiles académicos de posgrado Universidad Nacional de Quilmes (2019)
- **Synthetic Activity of Recombinant Whole Cell Biocatalysts Containing 2-Deoxy-D-ribose-5-phosphate Aldolase from *Pectobacterium atrosepticum*.** Fernandez Varela, R. N., Valino, A. L., Abdelraheem, E., Médici, R., Sayé, M., Pereira, C. A. Hagedoorn, P-L., Hanefeld, U., Iribarren, A. M., Lewkowicz E. S. ChemBioChem, (2022).
- **Methyltransferases: Functions and Applications.** Abdelraheem, E., Thair, B., Fernández Varela, R. N., Jockmann, E., Popadic, D., Hailes, H., Ward, J., Iribarren, A. M., Lewkowicz E. S., Andexer, J., Hagedoorn, P-L., Hanefeld, U. ChemBioChem, (2022).
- **Nucleoside derivatives as precursors to statin analogues by biocatalyzed aldol addition.** Fernández Varela, R.; Abdelraheem, E.; Valino, A.; Lafuente, L. Cortes, L.; Giaimo, L.; Hagedoorn, P-L; Hanefeld, U.; Iribarren, A.; Lewkowicz, E. (en preparación).

Presentaciones en congresos:

- **Síntesis quimioenzimática de 2,4,6-tridesoxi D-eritro-hexapiranosas 6-sustituidas.** Luciano Cortes; Romina Fernández Varela; Leticia Lafuente; Ana Valino; Adolfo Iribarren; Elizabeth Lewkowicz. Chile, Santiago de Chile. 2022. VI Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones. (Poster)
- **Use of 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase for the synthesis of precursors of pharmacologically relevant compounds.** Romina Fernández Varela; Ana Valino; Eman Abdelraheem; Ulf Hanefeld; Adolfo Iribarren; Elizabeth Lewkowicz. Austria. Graz. 2021. International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations. University of Graz. (Poster)
- **Adiciones aldólicas biocatalizadas por 2-desoxirribosa-5- fosfato aldolasas recombinantes.** Romina Fernández Varela; Tomas Frosio; Victoria Folonier; Ana Valino; Adolfo Iribarren; Elizabeth Lewkowicz. Argentina. Bernal. 2021. IV Jornadas de Investigadores en Formación en CyT. (Poster – Exposición oral)

- **Síntesis de nucleósidos con bases imidazólicas mediante reacciones biocatalizadas.** Romina Fernández Varela; Leticia Lafuente; Ana Valino; Adolfo Iribarren; Elizabeth Lewkowicz. Argentina. Córdoba. 2021. XXI Simposio Nacional de Química Orgánica. Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica. (Poster)
- **Síntesis biocatalizada de precursores de análogos de estatinas.** Lautaro Giaimo; Romina Fernández Varela; Leticia Lafuente; Adolfo Iribarren; Elizabeth Lewkowicz. Argentina. Córdoba. 2021. XXI Simposio Nacional de Química Orgánica. Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica. (Poster)
- **Hemiacetales cíclicos quirales preparados mediante microorganismos recombinantes con actividad aldolasa.** Fernández Varela Romina; Folonier Lauglé M Victoria; Valino Ana; Iribarren Adolfo; Lewkowicz Elizabeth. Argentina. Mendoza. 2019. XXI Simposio Nacional de Química Orgánica. Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica. (Poster – Exposición oral)
- **2-Desoxirribosa-5-fosfato aldolasa de *Pectobacterium atrosepticum* como biocatalizador en la síntesis de desoxirribosa-5-fosfato.** Fernández Varela Romina; Medici Rosario; Valino Ana; Iribarren Adolfo; Ulf Hanefeld; Lewkowicz Elizabeth. Argentina. San Luis. 2018. III Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones.
- **Síntesis de derivados de estatinas mediante 2-desoxy-D-ribosa-5-fosfato aldolasa.** Romina Fernández Varela; Adolfo Iribarren; Elizabeth Lewkowicz. Argentina. Bernal. 2018. III Reunión de Jóvenes Investigadores de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes. (Poster).

Y se obtuvieron las siguientes menciones especiales y premios:

- Mención por Mejor Trabajo presentado de forma oral, Adiciones aldólicas biocatalizadas por 2-desoxirribosa-5- fosfato aldolasas recombinantes. Argentina. Bernal. 2021. IV Jornadas de Investigadores en Formación en CyT.
- Mejor Comunicación del III Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones, Hemiacetales cíclicos quirales preparados mediante microorganismos recombinantes con actividad aldolasa. Argentina. Mendoza. 2019. XXI Simposio Nacional de Química Orgánica. Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica.

(Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente)

Agradecimientos

Hace unos meses empecé a escribir los agradecimientos para mi tesis, pero, como toda la tesis, fue sufriendo modificaciones y correcciones. No por las personas a las que incluí, sino porque cuando recopilé cada capítulo para darle el formato a la versión final me surgieron un montón de recuerdos y sentimientos hacia ellos, afirmando que las personas en las que pensé merecen el reconocimiento por ayudarme a cerrar esta etapa. Una etapa que abarca más de mis años de doctorado y que empezó por el 2009 cuando comencé la Licenciatura en Biotecnología...

En primer lugar, quiero agradecerles a mis papás que sin duda nada hubiese sido posible sin ellos. A mi mamá que está desde que empecé acompañándome, cebándome mates y compartiendo noches de desvelo mientras pasaba por esta carrera. Gracias Ma, Te amo. A mi papá que, aunque no lo tenga presente físicamente, lo llevo conmigo siempre y sé que estaría orgulloso de todo lo que logré. Me acuerdo del día en el que le conté que iba a seguir Biotecnología y me dijo “¡Vos estás loca!”, obvio que tenía razón, pero fue una hermosa locura.

A mi abuela Iaia y a mis tíos Héctor y Sofía por estar presentes en este camino, por llamarme para preguntarme como me había ido en cada parcial o si había llegado bien.

A mis hermanas Andre y Vane y cuñados Cris y Nel que se bancaron mis “no puedo, estoy escribiendo/estudiando” desde el 2009 hasta el presente. Pero por sobre todo gracias por darme mis hermosos cinco sobrinos: Toto, Valen, Martu, Juanse e Isa. Las personas con las me gusta hablar y divertirme en mis tiempos libres, con las que elijo charlar si estoy aburrida, las que me dan la paz que necesito, mis cables a tierra.

A Bruno, mi compañero de vida, que me ayudó a tomar las decisiones que hoy me llevaron a terminar esta tesis. Ahí estuvo decorando posters científicos, descargándome programas, escuchando por vez cinco mil mis charlas mientras practicaba. Haciendo portadas de tesis con esa gran habilidad de combinar colores y formas y que quede perfecto. Por cocinarme cuando pasaba días enteros escribiendo. Por ayudarme siempre. Te amo, tenemos más de una tesis juntos y espero que sigamos compartiendo muchas más aventuras.

A mi gran y fiel perrito Rodi, mientras comenzaba a escribir la tesis estuvo al lado mío de la misma manera que lo hizo en mi tesina. Cuando se fue me dejó a Sirius, mi nuevo compañero de escritura que me alegra las tardes.

A mis amigas Aldi, Vale, Noe, Meli y Vani, por estar cerca, aunque sea con un mensajito para alegrarme y distraerme. Las quiero un montón.

En estos años en el laboratorio pasé momentos hermosos y conocí a las mejores personas:

Quiero agradecerle a mi directora Eli, que es mi gran profesora. Todo lo que sé se lo debo a ella, me ayudó a crecer profesionalmente. Siempre empujándome para mejorar en todo. Tuve la suerte de estar unos 8 años en el laboratorio, y nada hubiese sido igual si mi directora no hubiese sido ella. Confío en mí muchos proyectos y siempre me dio la oportunidad y el apoyo para crecer profesionalmente.

Ado y Luis, gracias por estar dispuestos a ayudarme con cada duda. Por todas las veces que me aconsejaron, por ser unos muy buenos directores.

A mis primeros compañeros de laboratorio. En especial a Yami que sigue siendo parte de nuestro laboratorio como si nunca se hubiese ido, y agradezco que esté porque me da siempre los mejores consejos.

A Mati, por esos cafés, esas charlas y la complicidad que construimos. Siempre presente para sacarte una sonrisa. Gracias por escucharme, por entenderme y por siempre trabajar juntos para ayudarnos. ¡Te quiero Mati!

A Ani, por trabajar conmigo y con DERA a la par, por ayudarme siempre con buena onda. A Juan, por todo ese conocimiento compartido, siempre dispuesto a explicar cosas y solucionarte problemas. A Lauti M., Nico, Lucas y Aylu por compartir las tardes en el laboratorio más divertidas.

A Lucho, sin él esta tesis no hubiese sido igual. Parte de este trabajo lo hicimos en conjunto y le agradezco por encargarse de algunos de los experimentos, ayudándome y bancándome hasta el final. Ojalá todos tuvieran un Lucho en sus tesis doctorales para ayudarlos como él me ayudó a mí. Sos el mejor compañero trabajo. Gracias Lu!!!!

A Lauti G. por ayudarme, por tomarme muestra y hacer asados ricos. Pero sobre todo porque es un gran compañero y buena persona. Me pone muy feliz que seas parte del laboratorio.

A las más importantes de esta tesis, a mis amigas: Leti y Tefi. Quiero agradecerles porque son las que hacen que mis días en el laboratorio sean los mejores. Son con las que comparto el día a día, me escuchan, me ayudan a analizar RMNs, me levantan el ánimo cuando algo no sale bien. Nos reímos, hablamos, cantamos, lloramos, siempre juntas en este lio de investigar. Las quiero mil. Cuando sea grande quiero ser como ustedes. Leti...que cuando empecé a escribir me hacía el aguante en persona y, ahora en Estados Unidos, se hace sentir como si estuviera al lado. Tefi... que hace que los días en los que compartimos el laboratorio sean siempre felices.

Y....Gracias a mi querida UNQ y cada uno de los actores en esta universidad que te hacen el trabajo más sencillo, en especial a Mari, Bruno, Néstor y Sergio.