

T
761

104301





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LINEA DE INVESTIGACIÓN

PRODUCCIÓN DE FARMOQUÍMICOS

"RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE DERIVADOS DE LA PIPERIDINA"

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS QUE PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

P R E S E N T A

Q.F.B. ARTEMIO NAVA SÁNCHEZ
MATRÍCULA 205382491

COMITÉ TUTORIAL

Tutor: DRA. AIDA SOLÍS OBA

Asesor: DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ

Asesor: DR. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ

JULIO / 2008

“RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE DERIVADOS DE LA PIPERIDINA”

COMITÉ TUTORIAL

Tutor: DRA. AIDA SOLÍS OBA



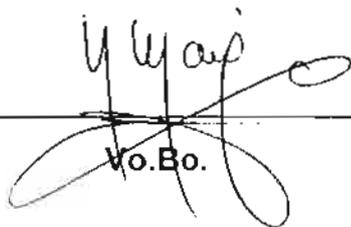
Vo.Bo.

Asesor: DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ



Vo.Bo.

Asesor: DR. NORBERTO MANJARREZ ALVAREZ



Vo.Bo.

Alumno: Q.F.B. ARTEMIO NAVA SÁNCHEZ

Matricula: 205382491



“RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE DERIVADOS DE LA PIPERIDINA”

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

PRESIDENTE: DR. HÉCTOR JAIME SALGADO ZAMORA

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Héctor Salgado Zamora', written in a cursive style.

VOCAL: DRA. MARÍA DEL CARMEN VILLEGAS HERNÁNDEZ

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'María del Carmen Villegas Hernández', written in a cursive style.

SECRETARIO: DRA. AIDA SOLÍS OBA

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Aida Solís Oba', written in a cursive style.

RESUMEN

Muchas sustancias biológicamente activas poseen centros quirales y sus enantiómeros, aunque tengan las mismas propiedades físicas, suelen poseer propiedades biológicas distintas. A pesar de lo anterior, muchos fármacos se comercializan como mezclas racémicas, sin embargo, es importante mencionar que los efectos adversos y toxicidad pueden presentarse debido a la presencia de estas mezclas.

Por lo antes mencionado, es necesario contar con métodos que permitan obtener compuestos enantioméricamente puros. La biocatálisis, es un medio para la producción de compuestos químicos, intermediarios farmacéuticos y agroquímicos. Un ejemplo son los derivados de la piperidina con aplicación en la industria farmacéutica, como el 2-piperidínmetanol y el ácido pipecólico cuya importancia reside en que son materia prima para diversos compuestos bioactivos.

El objetivo principal de este trabajo es llevar a cabo la resolución enzimática de los derivados de la piperidina: acetato del *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidínmetanol, el acetato del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidínmetanol y los ésteres metílico y butílico del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidíncarboxílico.

En el presente trabajo se utilizaron como fuente de enzima los polvos acetónicos de hígado de diferentes animales (PAH), así como polvos liofilizados y acetónicos de vegetales. Los biocatalizadores vegetales que mostraron los mejores resultados fueron extraídos de nopal y mamey. También se modificaron las condiciones de reacción como: codisolvente, tiempo de reacción, temperatura, pH y relación enzima sustrato, que dieron los mejores resultados.

Además, se prepararon, identificaron y caracterizaron los ésteres metílico y butílico del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidíncarboxílico, sin embargo, las diferentes fuentes de enzima empleadas, no catalizaron la hidrólisis de los ésteres, utilizando las mejores condiciones de reacción que se encontraron para los derivados del 2-piperidínmetanol.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el período de octubre/2005 a septiembre/2007 con número de registro 198446, para el desarrollo de este proyecto.

Al Cuerpo Académico Consolidado: Biocatálisis Aplicada a la Química Orgánica, UAM-X-CA-30, Laboratorio G-206, UAM-Xochimilco.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Esta investigación es el resultado de la experiencia y la conclusión del trabajo realizado, existen personas que merecen las gracias porque sin su valiosa aportación no hubiera sido posible este trabajo y también hay quienes las merecen por haber plasmado su huella en mi camino.

A mis padres, Artemio y Elena les agradezco su apoyo, su guía y su confianza en la realización de mis sueños. Soy afortunado por contar siempre con su amor, comprensión y ejemplo.

A mis hermanos Trinidad, Violeta, Gerardo y Nestor David, con mucho cariño, por la amistad, el ejemplo y los sueños que hemos compartido.

A Nancy por creer y confiar siempre en mí, apoyándome en todas las decisiones que he tomado.

A la Dra. Aida Solís Oba por compartir conmigo sus conocimientos, además de brindarme su orientación, sugerencias y su inmejorable disposición, para conducir la investigación.

A la Dra. Herminia I. Pérez Méndez y al Dr. Norberto Manjarrez Alvarez por su confianza, generosidad y paciencia, al brindarme su apoyo en la realización de este trabajo, aportando valiosas observaciones y correcciones que he procurado atender en la medida de lo posible.

Al Dr. Héctor Luna Contla y la Dra. Julia Cassani, por su colaboración, observaciones, sugerencias, en el desarrollo y evaluación de este trabajo.

A (Sin estricto orden) Cony, Gaby, Aida, Jorge, Mario, Ricardo y Sergio por ser compañeros y amigos increíbles y con quienes he compartido consejos, apoyo y motivación, además de muchos momentos que siempre llevaré en mi corazón. Ustedes con su cariño y alegría han motivado y enriquecido mi vida.

Gracias a todos, por recordarme que hay personas valiosas en el mundo y gracias por estar a mi lado.

ÍNDICE

1.	Introducción	1
2.	Antecedentes	3
2.1	Relación Estructura Química - Actividad Biológica	3
2.2	Producción de compuestos enantioméricamente puros	4
2.3	Biocatálisis	5
2.4	Ácido piperólico	9
2.5	2-piperidinmetanol	11
2.6	Métodos empleados para la determinación de exceso enantiomérico	12
2.7	Hidrolasas	13
2.8	Protección de aminas	14
3.	Planteamiento del problema	15
4.	Hipótesis	16
5.	Objetivos	17
5.1	Objetivo General	17
5.2	Objetivos Específicos	17
6.	Materiales y métodos	18
6.1	Descripción del equipo	18
6.2	Reactivos	18
6.3	Preparación de los polvos de hígados deshidratados con acetona	18
6.4	Preparación de polvos de vegetales deshidratados con acetona o liofilizados	18
6.5	Preparación del material fresco vegetal	19

6.6	Preparación del <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)-2-piperidinmetanol	19
6.7	Preparación del acetato del <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)-2-piperidinmetanol	20
6.8	Preparación del <i>N</i> -(<i>t</i> -butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol	20
6.9	Preparación del acetato del <i>N</i> -(<i>t</i> -butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol	21
6.10	Intento de preparación del ácido <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico	21
6.11	Preparación de los ésteres metílico y butílico del ácido pípecólico	21
6.12	Preparación de los ésteres metílico y butílico del ácido <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico	22
6.13	Procedimiento general para la hidrólisis enzimática de derivados de la piperidina	23
6.14	Determinación del porcentaje de conversión	24
6.15	Determinación del porcentaje de relación enantiomérica	25
7.	Resultados y discusión	26
7.1	Evaluación de la influencia de los polvos acetónicos de hígado y las condiciones de reacción sobre la hidrólisis del acetato del <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)-2-piperidinmetanol	26
7.2	Hidrólisis enzimática del acetato del <i>N</i> -(<i>t</i> -butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol	32
7.3	Evaluación de la influencia de material fresco de origen vegetal en la hidrólisis del acetato del <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)-2-piperidinmetanol	33
7.4	Evaluación de la influencia de los polvos liofilizados de origen vegetal en la hidrólisis del acetato del <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)-2-piperidinmetanol y el acetato del <i>N</i> -(<i>t</i> -butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol	34
7.5	Evaluación de la influencia de los polvos acetónicos	

de origen vegetal en la hidrólisis del acetato del <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)-2-piperidinmetanol y el acetato del <i>N</i> -(<i>t</i> -butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol	37
7.6 Comparación de los resultados de la hidrólisis del acetato del <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)-2-piperidinmetanol y el acetato del <i>N</i> -(<i>t</i> -butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol utilizando PAH, polvos liofilizados o polvos acetónicos de vegetales	39
7.7 Purificación y medición de la rotación óptica del acetato del <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)-2-piperidinmetanol, <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)-2-piperidinmetanol, Acetato del <i>N</i> -(<i>t</i> -butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol y <i>N</i> -(<i>t</i> -butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol	40
7.8 Evaluación de los PAH y vegetales en la hidrólisis de los ésteres metílico y butílico del ácido <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico	41
8. Conclusiones	43
9. Referencias	44
10. Anexos	49

1. INTRODUCCIÓN

Muchas sustancias biológicamente activas poseen centros quirales y sus enantiómeros, aunque tengan las mismas propiedades físicas, suelen poseer propiedades biológicas distintas. Un ejemplo que cobró gran importancia es la talidomida, ya que uno de sus enantiómeros es el responsable de los efectos teratogénicos, otros ejemplos son: el propranolol en donde el isómero activo es el que presenta la configuración "S", la morfina y la codeína que dependiendo su enantiómero pueden ser narcóticos adictivos o antitusivos, por todo lo anterior no es recomendable el uso de mezclas racémicas en la terapia de enfermedades.^{1,2}

A pesar de lo anterior, muchos fármacos se comercializan como mezclas racémicas, por ejemplo: ibuprofeno y fluoxetina, entre otros. Sin embargo, es importante mencionar que los efectos adversos y toxicidad pueden presentarse debido a la presencia de mezclas racémicas.³

Debido a lo antes mencionado es necesario contar con métodos que permitan obtener compuestos enantioméricamente puros. Entre estos métodos se encuentra la biocatálisis, la cual ha cobrado gran auge en el mundo debido a sus grandes ventajas como son: alta regio y enantioselectividad, condiciones suaves de reacción y posibilidad de recuperar el biocatalizador; estos atributos se utilizan en la producción de compuestos químicos, intermediarios farmacéuticos y agroquímicos.⁴

La estructura del anillo de piperidina se encuentra en numerosos metabolitos secundarios y compuestos ópticamente activos con actividad biológica, por ejemplo el (S)-ácido pipecólico un aminoácido no proteinogénico, agentes inmunosupresores como el Sirolimus, inhibidor de la trombina como el Argatroban, entre otros.^{5,6} El (+/-)-2-piperidinmetanol es un precursor de compuestos que contienen el anillo de la piperidina, y ha sido resuelto por hidrólisis biocatalizada de acetatos *N*-protegidos.^{7,8} La resolución de alcoholes racémicos, vía hidrólisis enantioselectiva de sus correspondientes ésteres se ha llevado a cabo utilizando hidrolasas, que incluyen lipasas de origen

microbiano y esterasas de origen animal.^{8,9} Los polvos acetónicos de hígado (PAH) de diferentes animales, se han utilizados como fuente de esterasas y en menor grado las obtenidas de vegetales, ambas constituyen fuentes accesibles de este tipo de enzimas.^{8,9}

En esta investigación se describe y discuten los resultados obtenidos sobre la resolución enzimática de los derivados de la piperidina: el acetato del *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidinmetanol y el acetato del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol, en donde se emplearon como fuente de biocatalizadores PAH de diferentes animales como: ratón, rata, cerdo, pollo, conejo, res, cuyo, gato, perro y borrego, se evaluaron diferentes condiciones de reacción como: codisolvente, pH, temperatura y fuente de enzima; también polvos deshidratados y liofilizados de vegetales como: calabaza larga (*Cucurbita pepo*), chayote (*Sechium edule*), chícharo (*Pisum sativum*), mamey (*Pouteria sapota*), nopal (*Opuntia ficus-indica*) y tomate verde (*Physalis ixocarpa*). Se han encontrado reportes que indican la presencia de hidrolasas en *Cucurbita*¹⁰, *Sechium*¹¹, *Pisum sativum*¹² y *Opuntia ficus*¹³.

Finalmente, se prepararon los ésteres metílico y butílico del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico, pero no se logró la hidrólisis para obtener el ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico, por medios químicos ni enzimáticos.

2. ANTECEDENTES

2.1 RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA - ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Tradicionalmente, y con cierta vigencia, se ha mantenido la clasificación de los fármacos en: estructuralmente inespecíficos y estructuralmente específicos. El primer grupo es minoritario e incluye aquellos fármacos cuya acción no está directamente relacionada con su estructura, o esta relación no se conoce. La acción se explica, en este caso, por su capacidad para modificar las propiedades fisicoquímicas de un medio biológico.¹⁴

En el segundo grupo, se incluye la mayoría de fármacos, donde cambios estructurales mínimos pueden dar lugar a un compuesto inactivo o con una actividad biológica diferente, a veces inesperada. Esto puede interpretarse aceptando que ejercen su efecto cuando interactúan con alguna macromolécula biológica (receptor) y que la interacción, afinidad y especificidad de ambas especies químicas (estructura, estereoquímica, distancia entre ciertos átomos o grupos funcionales y la distribución electrónica en el agonista), inicia una serie de procesos que conducen a la respuesta farmacológica.^{14,15}

Hay que hacer notar que muchas sustancias biológicamente activas poseen centros quirales y sus enantiómeros, aunque tengan las mismas propiedades físicas, suelen poseer propiedades biológicas distintas, lo que condiciona la interacción del enantiómero con el receptor quiral. Por lo anterior no es recomendable el uso de mezclas racémicas en la terapia de enfermedades.^{1,2,3,16}

Es por ello que existe gran interés en tener métodos eficientes para la producción de sólo uno de los enantiómeros de los compuestos quirales biológicamente activos en la industria agroquímica, de alimentos y especialmente la farmacéutica.^{17,18}

2.2 PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ENANTIOMÉRICAMENTE PUROS

La producción de compuestos enantioméricamente puros representa un gran desafío en química orgánica, ya que es una forma de proveer una enorme cantidad y diversidad de posibles materias primas para la preparación de nuevos fármacos.^{19, 20, 21}

Tradicionalmente, el procedimiento para obtener moléculas enantioméricamente puras se ha basado en el empleo de rutas sintéticas convencionales, seguido de la resolución racémica.¹⁴

En la actualidad, existen métodos para la síntesis de enantiómeros ópticamente puros, como los que se mencionan a continuación:^{1, 14, 16}

- A partir de productos naturales quirales se aíslan moléculas enantioméricamente puras.
- Resolución clásica de enantiómeros, por separación de los derivados diastereoisoméricos, ya sea por cristalización o cromatografía quiral.
- Por fermentación.
- Resolución cinética de mezclas racémicas, empleando catálisis química o biocatálisis.
- Síntesis asimétrica a partir de compuestos proquirales, usando catalizadores químicos o biológicos.

Para evitar los problemas que existen en la elaboración de fármacos, como también en su actividad farmacológica y toxicológica en el organismo, surge la necesidad de preparar productos enantioméricamente puros, además de generar procesos más eficientes y menos contaminantes por lo que la resolución cinética de mezclas racémicas utilizando biocatálisis es una buena alternativa.^{4, 18}

2.3 BIOCATÁLISIS

Los términos biocatálisis y biotransformaciones son usados para describir la metodología basada en el uso de enzimas (también llamadas biocatalizadores), que se utilizan para la preparación de compuestos orgánicos ópticamente activos.^{4, 18, 20}

La biocatálisis ha tenido gran aceptación en la preparación regioselectiva, o enantioselectiva, de compuestos que no se pueden preparar por métodos químicos convencionales; esta metodología permite llevar a cabo diferentes reacciones químicas sin la necesidad de pasar por etapas de protección o desprotección reduciendo, con esto, el número de pasos en la síntesis de un compuesto.²²

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones bioquímicas en los seres vivos. Por esta razón, pueden ser obtenidas de organismos de origen animal, vegetal o microbiano.⁴

Como todos los catalizadores, las enzimas, no afectan la constante de equilibrio de una reacción, solo actúan para abatir la energía de activación para una reacción, por lo que aceleran dicha reacción, sin tener que utilizar condiciones extremas de presión, temperatura y pH.²³

Las enzimas se han agrupado de acuerdo al tipo de reacción que catalizan, ejemplos de algunas son: las *hidrolasas*, que catalizan las reacciones de hidrólisis; las *isomerasas*, catalizan las isomerizaciones; las *ligasas*, favorecen la formación de un enlace para unir dos moléculas; las *liasas*, favorecen la ruptura de moléculas; las *oxidoreductasas*, favorecen la oxidación y reducción; y las *transferasas*, catalizan la transferencia de un grupo de un sustrato a otro.²⁴

Las enzimas presentan grandes ventajas en la biocatálisis, como las que se mencionan a continuación:^{25, 26}

- Eficientes en pequeñas cantidades.
- No se modifican durante la reacción, ni afectan el equilibrio de la misma.
- Están sujetas a regulación (cantidad y función).
- Facilitan la obtención de compuestos químicos de alta pureza óptica, minimizando reacciones laterales.
- Catalizan reacciones difíciles de obtener por técnicas en química orgánica clásica.
- Extremadamente versátiles y con un amplio espectro de reacciones.
- Hay un catalizador enzimático para cada tipo de reacción en química orgánica.
- Requieren condiciones de reacción suaves, frecuentemente a temperatura ambiente y pH cercano a la neutralidad, minimizando con esto problemas de isomerización, racemización, epimerización y transposiciones.
- Promueven velocidades de reacción con factores de 10^{12} .
- Selectivas con respecto a la estructura y estereoquímica del sustrato.
- Gran especificidad estructural, permitiendo reacciones regio-selectivas, difíciles de realizar a través de química tradicional.
- Poder dirigir la reacción hacia el producto menos favorecido termodinámicamente con sólo cambiar las condiciones de reacción como: la remoción del producto menos estable, uso de disolventes orgánicos, precipitar el producto, controlar la temperatura y el pH del medio de reacción, entre otros.

En la actualidad el empleo de biocatalizadores en síntesis orgánica ha ido en aumento, ya que el uso de estos se limitaba a reacciones que tenían lugar a temperatura ambiente, en medio acuoso e intervalos de pH muy estrechos,

además de la creencia que sólo actuaban sobre sus sustratos naturales. Hoy en día esta situación ha cambiado, ya que se han aislado enzimas provenientes de organismos extremófilos que actúan en condiciones extremas de temperatura, presión, pH y salinidad.^{1, 27} También se ha observado que la mayoría de las enzimas son activas en medio orgánico, trayendo esto consigo grandes ventajas como:^{28, 29, 30}

- Buena alternativa cuando los compuestos orgánicos no son solubles en agua.
- Aumenta la estabilidad de las enzimas, ya que en medio acuoso puede existir descomposición de estas.
- Se pueden llevar a cabo reacciones que son imposibles en agua, debido a las restricciones cinéticas o termodinámicas.
- Pueden mejorar la facilidad de recuperar los productos de la reacción y con esto mejorar rendimientos.
- Mejora la opción de recuperar las enzimas, porque estas son insolubles en medio orgánico, favoreciendo también su reutilización sin necesidad de inmovilizarlas.
- Minimiza la inhibición de la enzima causada por sustratos lipofílicos.
- Evitan reacciones indeseables promovidas por agua como son: hidrólisis, racemización, polimerización y descomposición.

Es importante mencionar que el agua es necesaria para la función catalítica de las enzimas debido a que esta primera participa, de manera directa o indirecta, en todas las interacciones no-covalentes que mantienen la conformación nativa de la enzima que es catalíticamente activa, la cantidad de agua necesaria es diferente para que cada enzima retenga su actividad catalítica. Por lo tanto, la elección del disolvente orgánico es crucial, ya que este debe mantener intacta la capa esencial de agua alrededor de la molécula de enzima.⁴

Las reacciones biocatalíticas se pueden llevar a cabo utilizando enzimas en diferentes condiciones, como son:^{4, 31, 32}

- o Enzimas contenidas en células completas de microorganismos, esta alternativa presenta grandes ventajas, ya que de esta forma se tienen los cofactores necesarios, además de su bajo costo en el mercado. Aunque también presenta una desventaja considerable ya que al no estar purificada puede producir reacciones indeseables asociadas a la presencia de otras enzimas existentes en las células.
- o Enzimas purificadas, teniendo como ventaja que se evita la formación de productos secundarios, con lo que aumenta su especificidad química. Como principal desventaja, es el alto costo que representa la purificación de la enzima.
- o Enzimas o células inmovilizadas, donde la mayor estabilidad y reutilización son su principal ventaja ante las dos anteriores.

A los avances biotecnológicos que se tienen hoy en día en el campo de las biotransformaciones, se unen los avances en la tecnología del DNA recombinante, con la cual se pueden modificar las cepas y hacer que produzcan en mayor proporción las enzimas deseadas, así como también el poder obtener enzimas que no existan en la naturaleza.^{33, 34}

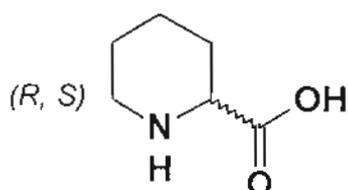
Por lo tanto, la biocatálisis es una excelente estrategia para la preparación de compuestos biológicamente activos, además en este proceso se requieren condiciones más suaves de reacción en comparación a la metodología química tradicional, especialmente en el caso de catálisis química. Sin embargo, en muchos de los casos la combinación de procedimientos químicos con métodos biocatalíticos ha sido una buena estrategia para la producción en química fina.²⁰

2.4 ÁCIDO PIPECÓLICO

El (+/-) ácido pipecólico (1) es un aminoácido no proteínogénico; que se encuentra presente en plantas, animales y hongos.^{35, 36, 37}

Las propiedades físico-químicas de la mezcla racémica del ácido pipecólico son:³⁸

Fórmula estructural (1):



Peso molecular: 129.16 g/mol

Punto de fusión: 270°C c/ descomp.

Características físicas:

Sólido color crema

Solubilidad : Sol. en alcohol, acetona,
agua y cloroformo

Insol. en éter

Fórmula molecular: C₆H₁₁NO₂

Nombres afines:

Ácido pipecolínico

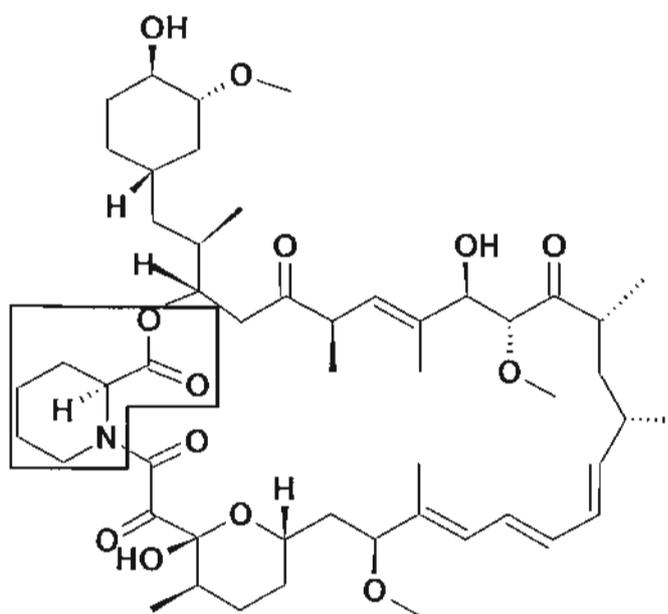
Ácido 2-piperidincarboxílico

Homoprolina

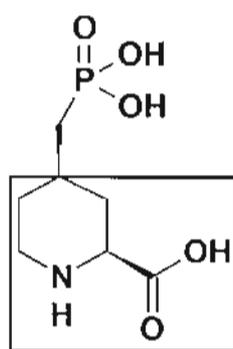
Ácido hexahidropicolínico

Composición: Carbono: 55.80%
 Hidrógeno: 8.58%
 Nitrógeno: 10.84%
 Oxígeno: 24.77%

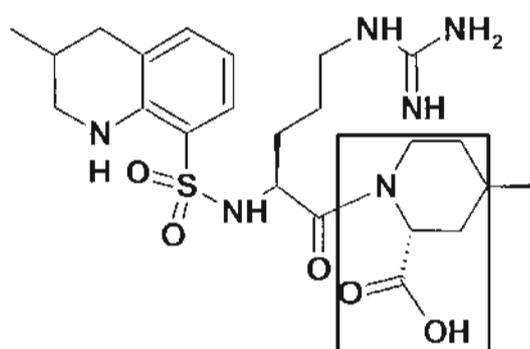
El ácido pipercolico enantioméricamente puro es de gran interés para la industria farmacéutica, ya que es materia prima para numerosos compuestos bioactivos tales como: agentes inmunosupresores, como el Sirolimus (2) utilizado después del trasplante renal; el Selfotel (3) utilizado como antagonista del receptor N-methyl D-aspartato (NMDA) y el Argatroban (4) utilizado en la inhibición de la trombina. Estos y otros fármacos con actividad anticonvulsiva, anestésicos locales, agentes anticancerígenos y en el tratamiento del VIH-1 tienen en alguna parte de su estructura al núcleo de ácido pipercolico.^{6, 40, 41, 42}



(2) Sirolimus



(3) Selfotel

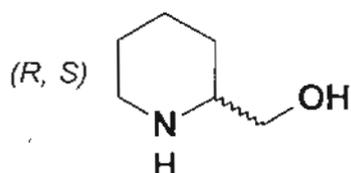


(4) Argatroban

2.5 2-PIPERIDINMETANOL

El (+/-) 2-piperidinmetanol (**5**) es un amino-alcohol derivado de la piperidina, que tiene en su estructura el ciclo piperidínico, las propiedades físico-químicas de la mezcla racémica son:³⁹

Fórmula estructural (**5**):



Peso molecular: 115 g/mol

Punto de fusión: 68-70°C

Características físicas:

Sólido cristalino
color amarillo crema

Solubilidad: Alcohol etílico, alcohol metílico y agua.

Insol. en éter.

Fórmula molecular: C₆H₁₃NO

Composición:

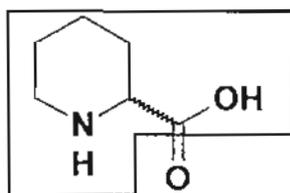
Carbono: 62.60%

Hidrógeno: 11.30%

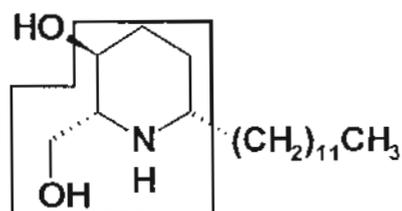
Nitrógeno: 12.17%

Oxígeno: 13.93%

La importancia del 2-piperidinmetanol, en la industria farmacéutica, radica en que el núcleo de este se presenta en compuestos con una amplia gama de actividades biológicas como el ácido piperídico (**1**) y derivados de la desoxoprosofilina (**6**) con actividad analgésica, antibiótica e hipotensiva.⁴³



(1) Ácido piperídico



(6) Desoxoprosofilina

La resolución de derivados de la piperidina como el (+/-) ácido piperídico, se ha llevado a cabo mediante la resolución clásica del racemato por cristalización

fraccionada con sales de tartrato, o la menos conveniente, que consiste en la destrucción de un enantiómero por fermentación.^{5, 44} Existen reportes que señalan la resolución de ácido piperídico y del 2-piperidinmetanol a partir de la hidrólisis de ésteres derivados de estos compuestos, utilizando como catalizadores hidrolasas de origen microbiano o animal.^{44, 45}

La resolución cinética catalizada por hidrolasas, es una buena alternativa que se utiliza para la formación de aminoácidos enantioméricamente puros aquirales.

2.6 MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE EXCESO ENANTIOMÉRICO

Debido a la importancia de la pureza óptica de compuestos biológicamente activos es necesario contar con métodos analíticos adecuados para determinar con precisión dicha pureza óptica tanto de los productos como de sus intermediarios.

Un método ampliamente utilizado pero poco confiable, es la medición de la rotación óptica.^{4, 46} Por lo que se han desarrollado métodos que han permitido determinar el exceso enantiomérico de manera más confiable, entre los que se encuentran:^{4, 47, 48, 49}

- o Formación de ésteres diastereoisoméricos por reacción con cloruro de (*R*)- α -metoxi- α -trifluorometilfenilacetilo y posterior análisis por cromatografía de gases (CG) o cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).
- o Resolución por cromatografía quiral, utilizando columnas quirales.
- o Derivatización con el cloruro del ácido (+)-metoxitri-fluoro-metilfenilacético (MTPA) seguido por análisis de ¹⁹F-RMN y ¹H-RMN.
- o Derivatización con agentes quirales y análisis de los diastereoisómeros resultantes por CG, CLAR o ¹H-RMN.

La pureza óptica expresada como el exceso enantiomérico del producto o el remanente (% ee) es calculado por medio de la **Ecuación 1**.^{14, 50}

Ecuación 1.

$$\%ee = \% \text{ de enantiómero } R - \% \text{ de enantiómero } S = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \times 100$$

2.7 HIDROLASAS.

El uso de los diferentes tipos de hidrolasas, como lipasas y esterasas, predominan en las biotransformaciones. Entre las ventajas de estas enzimas se encuentran: el no necesitar cofactores e hidrolizar diversos tipos de ésteres para dar lugar a sus respectivos ácidos, pero en medio orgánico catalizan la reacción inversa, es decir, la esterificación; presentan una alta selectividad para dar lugar a compuestos enantioméricamente puros; son estables en medio orgánico y a altas temperaturas, por lo cual su uso en síntesis orgánica es muy atractivo.^{51, 52, 53}

Las lipasas y las esterasas aunque comparten actividades catalíticas similares, se han logrado diferenciar. Las lipasas se obtienen principalmente de microorganismos (bacterias y hongos), y aceptan como sustratos tanto ácidos grasos con cadena larga como derivados de los mismos, mientras que las esterasas son obtenidas de hígados, riñones e intestino delgado así como de plantas, aceptan como sustratos ácidos grasos de cadena corta.^{9, 10, 11, 54}

Por lo anterior, los polvos acetónicos de diversos órganos de animales se han utilizado como fuentes crudas de enzimas, con la gran ventaja de la disponibilidad que esto representa y el bajo costo.^{9, 44}

Existen numerosos ejemplos de la aplicación de hidrolasas para la preparación de saborizantes, feromonas y compuestos con actividad farmacológica que incluyen bloqueadores β -adrenérgicos, antidepresivos e inhibidores de la Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).⁵¹

Aun cuando la principal aplicación de las hidrolasas es la resolución de mezclas racémicas, para la preparación de compuestos ópticamente activos, la presencia de estas enzimas no es garantía de una alta enantioselectividad, se ha

observado que la variación de la estructura del sustrato, la modificación de las condiciones de reacción, el uso de enzimas modificadas, son estrategias que se emplean para que se favorezca la separación de los dos enantiómeros.^{53, 54}

2.8 PROTECCIÓN DE AMINAS

Debido a la naturaleza básica y nucleofílica de las aminas, en muchas ocasiones es recomendable proteger el grupo amino, ya que esto elimina la probabilidad de que este grupo reaccione con otros, disminuyendo así la formación de compuestos no deseados.^{55, 56}

Debido a lo anterior, existen diversos grupos utilizados para la protección de intermediarios nitrogenados de compuestos con actividad biológica importante.⁵¹

Una de las reacciones más utilizadas en la protección de aminas primarias y secundarias es la formación de sulfonamidas, principalmente con cloruro de *p*-toluensulfonilo.^{55, 57}

Otra forma de proteger al grupo amino es mediante la formación de carbonilamidas, por la adición de cloruro de benzoilo o bien de *tert*-butoxicarbonilamida (BOC) el cual tiene gran popularidad para la protección tanto de aminas primarias como secundarias.⁵⁵ Estos grupos protectores pueden ser removidos mediante tratamiento con HCl acuoso.^{55, 58, 59.}

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que la actividad biológica es diferente para cada uno de los enantiómeros de un compuesto, se ha hecho indispensable contar con metodologías que permitan la obtención de compuestos biológicamente activos en forma enantiopura, entre ellos se encuentran los métodos biocatalíticos los cuales presentan amplias ventajas sobre los métodos químicos tradicionales de resolución.

Los métodos biocatalíticos implican el uso de enzimas como biocatalizadores, dichas enzimas pueden ser de origen microbiano, animal o vegetal. Las enzimas puras tienen la ventaja de catalizar un tipo específico de reacción, pero tienen la desventaja de ser costosas, y en algunos casos son difíciles de conseguir. Por lo que el uso de biocatalizadores crudos como los polvos de hígados o de vegetales, representan una alternativa atractiva a las enzimas purificadas, ya que estos polvos se pueden utilizar como fuentes crudas de enzimas, que ya se encuentran en un soporte natural, no necesitan de mayor tratamiento, son baratos y accesibles.

En el presente proyecto se estudiará el uso de hidrolasas crudas de origen animal o vegetal, para llevar a cabo la hidrólisis enantioselectiva de ésteres derivados de la piperidina.

4. HIPÓTESIS

La hidrólisis de los acetatos de *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidinmetanol y el acetato del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol, así como de los ésteres metílico y butílico del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico utilizando diferentes fuentes de hidrolasas, procederá de manera enantioselectiva.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar un método de resolución enzimática por medio de la hidrólisis enantioselectiva de los derivados de la piperidina: acetato del *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidinmetanol, acetato del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol así como los ésteres metílico y butílico del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico, utilizando fuentes crudas de hidrolasas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Desarrollar el método de hidrólisis enantioselectiva de los acetatos del *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidinmetanol y del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol utilizando hidrolasas.
- Desarrollar el método de hidrólisis enantioselectiva de los ésteres metílico y butílico del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico utilizando hidrolasas.
- Probar diferentes fuentes crudas de hidrolasas, de origen animal y vegetal, para llevar a cabo las reacciones de hidrólisis mencionadas.
- Desarrollar los métodos analíticos para determinar el grado de avance de la reacción hidrolítica y el exceso enantiomérico de los productos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Descripción del equipo.

- 1.- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) Agilent 1100 con detector de UV/visible de arreglo de diodos.
- 2.- Cromatógrafo de gases (CG) HP 6890 series, equipado con un detector de ionización de flama.
- 3.- Polarímetro Perkin Elmer modelo 341.
- 4.- Espectrofotómetro de infrarrojo (IR) Perkin-Elmer Paragon 1600 FT.
- 5.- Resonancia magnética nuclear (RMN) Varian 400 MHz.
- 6.- Liofilizadora Labconco:Freezone 6.

6.2 Reactivos.

(±) ácido piperólico 98 % (Sigma-Aldrich), 2-piperidinmetanol 97 % (Sigma-Aldrich), disolventes grado CLAR.

6.3 Preparación de los polvos de hígados deshidratados con acetona.

Los hígados de cerdo, pollo, res y borrego se adquirieron en los mercados locales. Los hígados de ratón, rata, conejo y cuyo fueron donados por la Unidad de Protección y Experimentación de Animales de Laboratorio-Bioterio de la UAM-Xochimilco. Finalmente, los hígados de gato y perro fueron donados por el Centro de Control Canino de la Delegación Iztacalco.

Los hígados previamente lavados se molieron con acetona, en la licuadora, el sólido se filtró y se molió de igual manera dos veces más. El sólido se dejó secar en la campana de extracción y se almacenó a 4°C. Esta preparación cruda se usó sin purificar.

6.4 Preparación de polvos de vegetales deshidratados con acetona o liofilizados.

Los vegetales se adquirieron en los mercados locales. Las partes de los vegetales utilizadas fueron: en la calabaza larga y el chayote se utilizó la

cáscara, el tomate verde y nopal se utilizaron enteros menos las espinas de este último, finalmente, en el mamey se utilizó la semilla.

La preparación de los polvos deshidratados con acetona se realizó de la misma forma que los hígados.

Los polvos liofilizados de vegetales previamente lavados, se molieron en una licuadora y se procedió a liofilizar con 313×10^{-3} mbar a -43°C . Los polvos resultantes se almacenaron a 4°C y se usaron sin purificar.

6.5 Preparación del material fresco vegetal.

Las partes de los vegetales que fueron utilizados: la calabaza larga y chayote se utilizó la cáscara, el tomate verde y nopal se utilizaron enteros, menos las espinas de este último. La preparación de los materiales frescos vegetales fue previamente lavados, se utilizaron las partes que se mencionan y se muelen en un mortero, dicho material se utilizó en fresco.

6.6 Preparación del *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidínmetanol (7):

El 2-piperidínmetanol (500 mg, 4.34 mmol) y trietilamina (439 mg, 4.34 mmol) se disolvieron en 20 mL de diclorometano, esta mezcla se enfrió en baño de hielo y poco a poco, para evitar que suba la temperatura, con agitación magnética constante, se le adicionó una solución de cloruro de *p*-toluensulfonilo (993 mg, 1.2 eq.) en 20 mL de diclorometano, la mezcla se agitó por 30 min en un baño de hielo, posteriormente, se dejó en agitación a temperatura ambiente toda la noche. La suspensión resultante se filtró y el disolvente se evaporó a sequedad, el producto se purificó por cromatografía en columna de sílica gel. Se emplearon mezclas hexano:cloroformo (empezando con una proporción 90:10, aumentando gradualmente de 10 en 10 partes la cantidad cloroformo hasta llegar a 100% del mismo) como eluyentes, posteriormente se usó una mezcla cloroformo:metanol 90:10. Se obtuvo un sólido incoloro, (pf= $63-65^{\circ}\text{C}$), rend= 70%, (pf reportado= $62-65^{\circ}\text{C}$).⁷ El compuesto se identificó por IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN.⁷

IR (cm^{-1}) ν : 3506, 2938, 1595, 1492, 1323; ^1H -RMN (CDCl_3) δ : 7.59 (m, 2H), 7.31 (m, 2H), 4.05 (m, 1H), 3.81 (m, 2H), 3.5 (m, 1H), 3.11 (m, 1H), 2.4 (s, 3H),

1.65 (m, 1H), 1.30 (m, 5H); ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 142.91, 137.72, 129.46, 126.67, 60.51, 54.56, 41.29, 24.73, 24.12, 21.49, 19.14.

6.7 Preparación del acetato del *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidinmetanol (8):

Al *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidinmetanol (250 mg, 1.85 mmol) en diclorometano (2 mL) se le adicionó con agitación magnética anhídrido acético (1.25 mL) y trietilamina (0.15 mL), la mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente, posteriormente se le adicionó diclorometano (5 mL), la solución resultante se lavó con una solución saturada de carbonato de sodio, después con agua, la capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. Se obtuvo un sólido amarillo, (pf=45°C), rend=75%, (pf reportado= 45°C⁷). El compuesto se identificó por IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN.⁷

IR (cm^{-1}) ν : 2938, 1736, 1595, 1334; ^1H -RMN (CDCl_3) δ : 7.73 (m, 2H), 7.29 (m, 2H), 4.3 (m, 2H), 4.08 (m, 1H), 3.75 (m, 2H), 3.08 (m, 1H), 2.41 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.46 (m, 5H); ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 170.52, 142.67, 138.15, 129.34, 126.61, 61.06, 50.79, 41.00, 25.03, 24.27, 21.45, 20.85, 18.82.

6.8 Preparación del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol (10):

El 2-piperidinmetanol (3 g, 26 mmol) se disolvió en 35 mL de una mezcla dioxano/agua, con agitación magnética, posteriormente, se le adicionó el di-*t*-butildicarbonato (8.52 g, 39 mmol) y NaOH (1.5 g, 39 mmol), la mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente. La solución resultante se concentró y se diluyó con 20 mL de agua, se extrajo con 3x10 mL de acetato de etilo. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El producto se recristalizó con hexano y se obtuvo un sólido amarillo, (pf= 66°C) rend= 63%, (pf reportado= 66°C⁵). El compuesto se identificó por IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN.⁵

IR (cm^{-1}) ν : 3428, 2965, 1739, 1246; ^1H -RMN (CDCl_3) δ : 4.46 (m, 1H), 3.8 (m, 2H), 3.6 (m, 1H), 2.86 (t, 1H), 2.32 (m, 2H), 1.60 (m, 4H), 1.46 (s, 9H); ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 158.01, 79.64, 61.50, 52.30, 39.89, 28.36, 25.17, 19.55.

6.9 Preparación del acetato del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol (11):

Al *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol (1 g, 4.6 mmol) se le adicionó anhídrido acético (5 mL) y trietilamina (0.6 mL), la mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente, posteriormente, se le adicionó diclorometano (5 mL), la solución resultante se lavó con una solución saturada de carbonato de sodio, después con agua, la capa orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. Se obtuvo un líquido viscoso color ámbar, rend=70%. El compuesto se identificó por IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN.⁷

IR (cm⁻¹) v: 2931, 1739, 1684, 1311, 1223; ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 4.49 (s, 1H), 4.24 (t, 1H), 4.10 (m, 2H), 2.80 (t, 1H), 2.05 (s, 3H), 1.65 (m, 6H), 1.45 (s, 9H); ¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 170.55, 154.73, 79.30, 61.67, 28.34, 25.31, 25.17, 20.93, 19.27.

6.10 Intento de preparación del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico (13):

El ácido pipericólico (200 mg, 1.55 mmol respectivamente) se disolvió en diclorometano (8 mL) y se le adicionó trietilamina (0.12 mL) la mezcla se enfrió en baño de hielo. Bajo agitación magnética, se agregó lentamente una solución de cloruro de *p*-toluensulfonilo (398 mg, 2.08 mmol) en diclorometano (8 mL), la mezcla se mantuvo en frío 30 minutos; posteriormente, se agitó 24 horas a temperatura ambiente. Después de ese tiempo la mezcla se filtró y el disolvente se evaporó a sequedad. El producto semisólido color ámbar resultante corresponde a la materia prima, es decir, no hubo reacción en estas condiciones.

6.11 Preparación de los ésteres metílico y butílico del ácido pipericólico (14a, 14b):

El ácido pipericólico (2 g, 15.50 mmol) se suspende en metanol o butanol (20 mL), las suspensiones se enfriaron en baño de hielo y a cada reacción se le adicionó bajo agitación magnética, gota a gota cloruro de tionilo (2.6 mL). La mezcla se dejó en agitación durante 168 horas a temperatura ambiente.

Después se adicionó trietilamina (1.8 mL) y se dejó en agitación 20 minutos, se agregan 30 mL de cloroformo y se lava con 5x10 mL de agua. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, luego se concentró a sequedad.

El éster metílico se recrystalizó con metanol-éter etílico. Se obtuvo un sólido blanco, pf= 190-193°C. El compuesto se identificó por IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN.

Éster metílico del ácido piperidínico (14a).

IR (cm⁻¹) ν : 3500, 2904, 1743; ¹H-RMN (CDCl₃) δ : 4.05 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.4 (m, 1H), 3.05 (m, 1H), 2.25 (m, 1H), 1.9 (m, 2H), 1.68 (m, 3H); ¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 169.9, 57.7, 53.6, 45.0, 27.1, 22.8, 22.7.

El éster butílico obtenido fue un sólido blanco, pf= 138-140°C. El compuesto se identificó por IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN.

Éster butílico del ácido piperidínico (14b).

IR (cm⁻¹) ν : 3411, 2929, 1746; ¹H-RMN (CDCl₃) δ : 4.2 (m, 2H), 3.90 (m, 1H), 3.6 (m, 1H), 3.1 (m, 1H), 2.3 (m, 1H), 2.0 (m, 4H), 1.6 (m, 3H), 1.4 (m, 2H), 0.90 (m, 3H); ¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 168.2, 66.2, 56.4, 46.0, 30.6, 25.9, 21.9, 21.8, 19.3, 13.9.

6.12 Preparación de los ésteres metílico y butílico del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico (15a, 15b):

El éster metílico (500 mg, 3.49 mmol) o butílico del ácido piperidínico (500mg, 2.7 mmol) se disolvió en diclorometano (20 mL) y se le adicionó trietilamina (0.30 mL) la mezcla se enfrió en baño de hielo. Bajo agitación magnética, se agregó lentamente una solución de cloruro de *p*-toluensulfonilo (993 mg, 5.20 mmol) en diclorometano (20 mL), la mezcla se mantuvo en frío 30 minutos; posteriormente, se agitó 24 horas a temperatura ambiente. Después de ese tiempo la mezcla se filtró y el disolvente se evaporó a sequedad para ambos sustratos.

El producto obtenido, éster metílico del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico, es un sólido blanco, rend=60%, pf=62-64°C. El compuesto se identificó por IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN.

Éster metílico del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico(15a).

IR (cm⁻¹) ν : 2946, 1739, 1596, 1335; ¹H-RMN (CDCl₃) δ : 7.67 (d, 2H), 7.29 (d, 2H), 4.74 (d, 1H), 3.81 (m, 1H), 3.54 (s, 3H), 3.19 (m, 3H), 1.60 (m, 7H); ¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 170.85, 142.78, 136.58, 129.10, 126.87, 54.86, 51.86, 42.48, 27.70, 24.57, 21.50, 19.98.

El producto obtenido, éster butílico del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico, se purificó por cromatografía en columna de sílica gel. Se emplearon hexano y mezclas de hexano:acetato de etilo (empezando con una proporción de 90:10, aumentando gradualmente de 10 en 10 partes la cantidad de acetato de etilo hasta llegar al 100% del mismo). Se obtuvo un líquido viscoso color ámbar, rend=62%. El compuesto se identificó por IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN.

Éster butílico del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico (15b).

IR (cm⁻¹) ν : 2941, 1735, 1596, 1335; ¹H-RMN (CDCl₃) δ : 7.67 (d, 2H), 7.26 (d, 2H), 4.74 (d, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.20 (m, 1H), 2.41 (m, 3H), 2.10 (m, 1), 1.70 (m, 3H), 1.50 (m, 3H), 1.30 (m, 3H), 0.90 (m, 3H); ¹³C-RMN (CDCl₃) δ : 170.85, 142.78, 136.58, 129.10, 126.87, 54.86, 51.86, 42.48, 27.70, 24.57, 21.50, 19.98.

6.13 Procedimiento general para la hidrólisis enzimática de derivados de la piperidina: (8, 11, 15a y 15b)

Los acetatos o ésteres derivados de la piperidina (8, 11, 15a y 15b) (5 mg) se disolvieron en un codisolvente (0.05 mL) se les adicionó (0.45 mL) de una solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, a pH 6.0, 7.0 y 8.0); posteriormente, se adicionó el polvo acetónico o liofilizado correspondiente, en una relación

polvo:sustrato de 2:1, la mezcla se agitó a 24°C durante 24 horas. La mezcla se extrajo 2 veces con diclorometano (0.5 mL), la fase orgánica se filtró sobre celita y se secó con Na₂SO₄ anhidro, el disolvente se evaporó a sequedad. El % de conversión se determinó por CG y el % de exceso enantiomérico (ee), se determinó por CLAR usando una columna Chiracel OJ-H.

6.14 Determinación del porcentaje de conversión.

El porcentaje de conversión se determinó por cromatografía de gases (CG), utilizando una columna HP-5 (5% HP ME Siloxano, 30000 X 0.25 mm L X ID). Las condiciones cromatográficas se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas empleadas para determinar el % de conversión por CG.

Compuesto	Veloc. flujo (mL/min)	Temp. horno (°C)	Tiempo de Retención (min)
<i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonyl)-2-piperidinmetanol	1.2	220	7.3
Acetato del <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonyl)-2-piperidinmetanol	1.2	220	9.2
<i>N</i> -(<i>t</i> -butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol	0.8	200	2.2
Acetato del <i>N</i> -(<i>t</i> -butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol	0.8	200	2.7
Éster metílico del ácido <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonyl)-2-piperidincarboxílico.	1.2	210	9.4
Éster butílico del ácido <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonyl)-2-piperidincarboxílico.	1.2	210	18.3

*Temperatura del inyector y detector 250°C; Gas acarreador N₂.

6.15 Determinación del porcentaje de relación enantiomérica.

La separación de los enantiómeros de los derivados *N*-protegidos del 2-piperidinmetanol y derivados del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) equipado con una columna Chiracel OJ-H o una OD. Las condiciones cromatográficas se muestran en la **Tabla 2**.

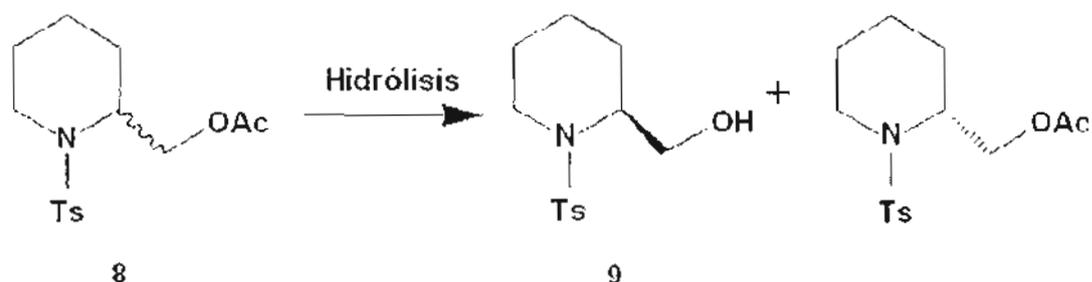
Tabla 2. Condiciones cromatográficas empleadas para el % de ee por CLAR.

Compuesto	Columna Chiracel	Veloc. flujo (mL/min)	Fase móvil	Tiempo de retención (min) <i>R/S</i>	λ Detección (nm)
<i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)-2-piperidinmetanol	OJ-H	0.65	Hexano/ isopropanol 80:20	14,15	250,220, 210
Acetato del <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)-2-piperidinmetanol	OJ.H	0.65	Hexano/ isopropanol 80:20	22, 32	250,220, 210
<i>N</i> -(<i>t</i> -butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol	OJ-H	0.65	Hexano/ isopropanol 99:1	12.5, 13.2	220,210, 205,200
Acetato del <i>N</i> -(<i>t</i> -butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol	OJ-H	0.65	Hexano/ isopropanol 99:1	8.8, 9.5	220,210, 205,200
Éster metílico del ácido <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico.	OD	0.8	hexano/ isopropanol 97:3	15, 16	220,230
Éster butílico del ácido <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico.	OD	1.0	hexano/ isopropanol 93:7	9, 11	220, 230

*Temperatura de 25°C.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Evaluación de la influencia de los polvos acetónicos de hígado y las condiciones de reacción sobre la hidrólisis de **8**.

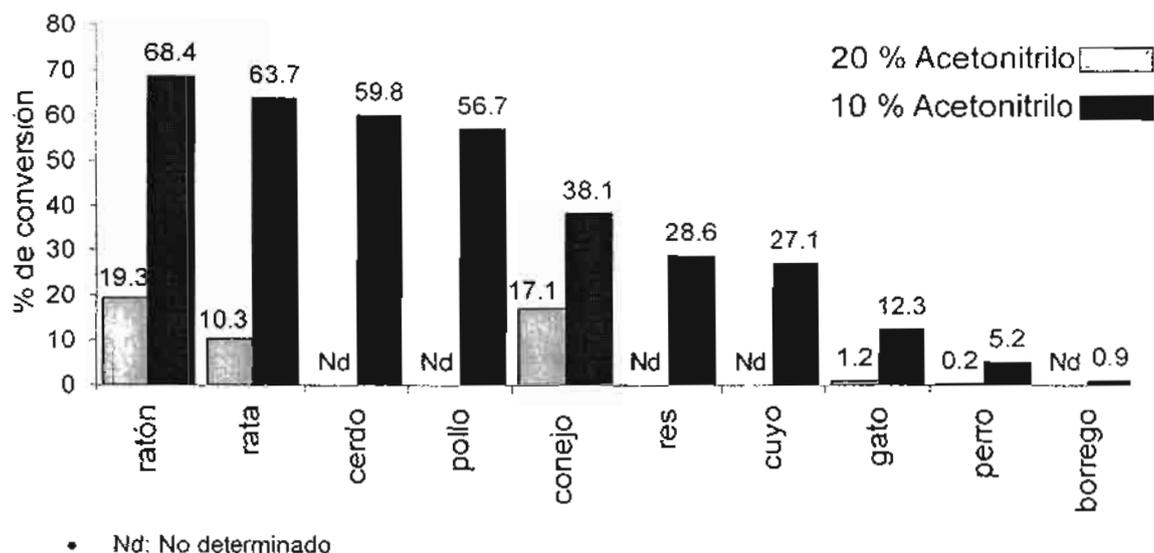


A) Evaluación del PAH y cantidad de codisolvente.

Se evaluó la actividad hidrolítica de los PAH de ratón, rata, cerdo, pollo, conejo, res, cuyo, gato, perro y borrego a pH de 7.0 a 35°C por 24 horas. Debido a que el compuesto **8** es insoluble en agua, fue necesario utilizar un codisolvente miscible al agua en el cual se disolviera, por lo que se seleccionó al acetonitrilo. Se conoce que la actividad biocatalítica de las enzimas se ve afectada por los disolventes orgánicos, por lo que también se evaluó el efecto de la cantidad de codisolvente en la capacidad hidrolítica de los PAHs seleccionados, por lo que se usaron concentraciones de 10 y 20% (v/v) codisolvente.

En la **Gráfica 1** se muestra el % de conversión de la hidrólisis de **8**, con diversos PAHs y diferentes cantidades de codisolvente (La configuración absoluta de **9** se analiza en el capítulo 7.7).

Gráfica 1. % de conversión de la hidrólisis biocatalizada de **8** utilizando PAHs.

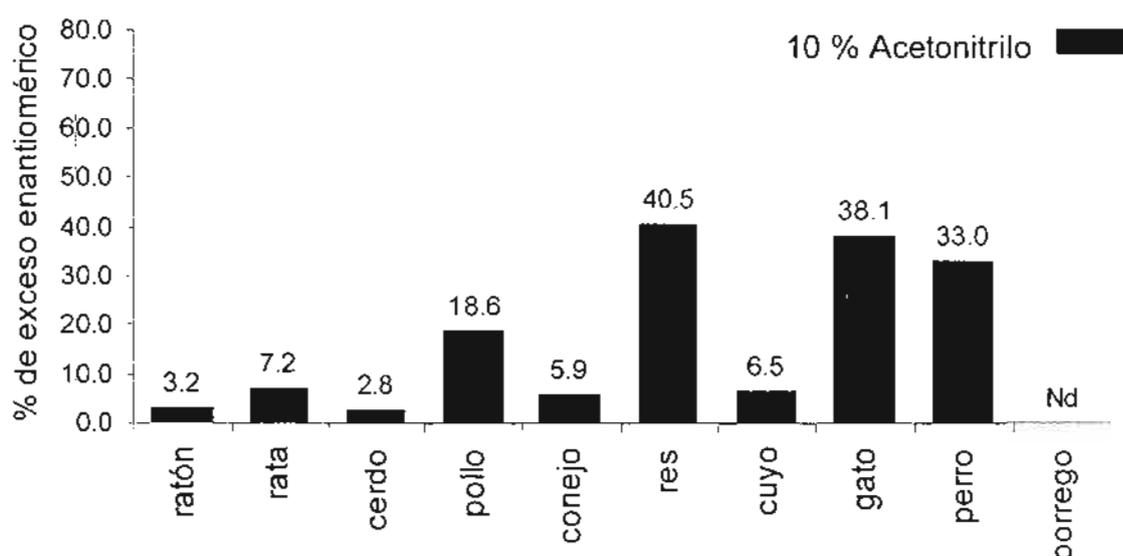


En la **Gráfica 1** se observa que el tipo de enzima es muy importante en la hidrólisis del acetato (**8**). Con los PAHs de ratón, rata, cerdo y pollo se obtuvieron porcentajes de conversión por arriba del 50% de su correspondiente alcohol (**9**).

Con conejo, res y cuyo, las conversiones fueron moderadas (30-40%), con los PAHs de gato y perro las conversiones disminuyeron (12-5%), El único PAH que prácticamente no mostró actividad biocatalítica en estas condiciones para la hidrólisis del acetato (**8**) fue el de borrego.

Es interesante observar el efecto que provocó la proporción del codisolvente en el medio de reacción, ya que se vio disminuida de forma dramática la conversión a su correspondiente alcohol (**9**) al incrementar la proporción del codisolvente (**Gráfica 1**). Como se observa, los mejores resultados obtenidos de hidrólisis del acetato (**8**) se mostraron al utilizar 10% (v/v) de acetonitrilo como codisolvente, sin embargo al aumentar al 20% (v/v) de acetonitrilo disminuyó la hidrólisis con todos los PAHs, incluso se suprimió prácticamente la actividad catalítica en los PAHs de cerdo, pollo, res, cuyo, gato, perro. En los casos de los PAHs de ratón y rata aunque no se suprimió la actividad catalítica, si se observó que disminuyó hasta un 70% con respecto a los experimentos usando el 10% de codisolvente.

Gráfica 2. % de exceso enantiomérico del compuesto **9** obtenido por la hidrólisis biocatalizada de **8** utilizando PAHs.



Conociendo que el exceso enantiomérico de **9** también depende del tipo de PAH utilizado, se procedió a analizar la enantioselectividad de la reacción de hidrólisis con 10% (v/v) de acetonitrilo. Usando los PAHs de ratón, rata y puerco donde las conversiones fueron muy buenas (68, 64 y 60%, respectivamente, **Gráfica 1**), resultó que la enantioselectividad con estos polvos fue muy baja (menor al 7 % ee, **Gráfica 2**). Los PAHs que mostraron los más altos excesos enantioméricos de **9** son el de res, gato y perro (41, 38, 33%, respectivamente, **Gráfica 2**).

B) Evaluación de la disminución de la temperatura con diversos PAHs.

Debido a que los % de ee del producto **9** fueron bajos en todos los casos se probó el efecto de disminuir la temperatura de reacción de 35 a 24°C, como estrategia para incrementar la enantioselectividad, manteniendo las mismas condiciones de reacción con los PAHs de res, gato, pollo, rata, ratón y cerdo; y el 10% v/v de acetonitrilo, ya que con esta proporción de codisolvente se observaron mejores conversiones (**Gráfica 1**). Los resultados se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. % de ee del compuesto **9** y % de conversión de la hidrólisis biocatalizada de **8** utilizando PAHs.

PAHs	% conv (8) ^a	% ee (9) ^b
Res	41.0	37.1
Gato	12.3	20.2
Pollo	74.4	8.1
Rata	79.7	1.5
Ratón	85.2	7.2
Cerdo	81.0	5.2

^aDeterminada por CG; ^bdeterminada por CLAR quiral.

Condiciones de reacción: solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.0, 10% v/v de acetonitrilo como codisolvente, 24 h, 24°C.

En la **Tabla 3** se observa que con el cambio de temperatura de reacción (35 a 24°C) mejoró la conversión de **8** en un 20 a 25% con todos los PAHs utilizados, pero los % de ee del alcohol continuaron bajos en todos los experimentos pero con PAH de res se obtiene la mayor enantioselectividad, por lo tanto los siguientes experimentos se realizaron con el PAH de res.

C) Influencia del codisolvente con el PAH de res.

Se analizó la influencia del codisolvente sobre la hidrólisis biocatalizada del acetato **8**, por lo que se trabajó con el 10 % v/v de los siguientes codisolventes: DMSO, dioxano, DMF, acetonitrilo y éter etílico para determinar como afecta la conversión y la enantioselectividad de la reacción hidrolítica utilizando como biocatalizador el PAH de res, por ser el que mejor resultado de % ee mostró en las **Gráficas 1 y 2** y en la **Tabla 3**. Los resultados se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. % de ee del compuesto **9** y % de conversión de la hidrólisis biocatalizada de **8** con PAH de res con diferentes codisolventes.

Codisolvente	% conv (8) ^a	% ee (9) ^b
DMSO	72.3	11.2
dioxano	71.0	16.3
DMF	38.6	30.2
éter etílico	38.6	34.3
acetonitrilo	38.7	36.2

^aDeterminada por CG; ^bdeterminada por CLAR quiral.

Condiciones de reacción: solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.0, 10 % v/v de codisolvente, 24 h, 25°C.

Se observó que al utilizar DMSO y dioxano se tienen los porcentajes de conversión más altos, pero con ambos codisolventes se observaron los más bajos ee del alcohol (**Tabla 4**). La actividad hidrolítica del PAH es similar en presencia del DMF, éter etílico y acetonitrilo (39% de conversión, **Tabla 4**), pero el porcentaje de ee de **9** con estos codisolventes es bajo (30-36%, **Tabla 4**).

De acuerdo a los resultados en la **Tabla 4**, se escoge al acetonitrilo para determinar el efecto de el pH en la hidrólisis biocatalítica de **8**, usando nuevamente el PAH de res como biocatalizador.

D) Influencia del pH con el PAH de res.

Se ha observado que el pH tiene un efecto importante en la conversión y la enantioselectividad, por lo que se estudió el efecto de este, utilizando las mejores condiciones de reacción obtenidas en los experimentos anteriores. Los resultados se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. % de ee del compuesto **9** y % de conversión de la hidrólisis biocatalizada de **8** utilizando PAH de res a diferentes pHs.

pH	t (h)	% conv (8) ^a	% ee (9) ^b
6	3:30	22.7	36.9
7	3:30	38.5	34.0
8	7:00	54.1	19.2

^aDeterminada por CG; ^bdeterminada por CLAR quiral.

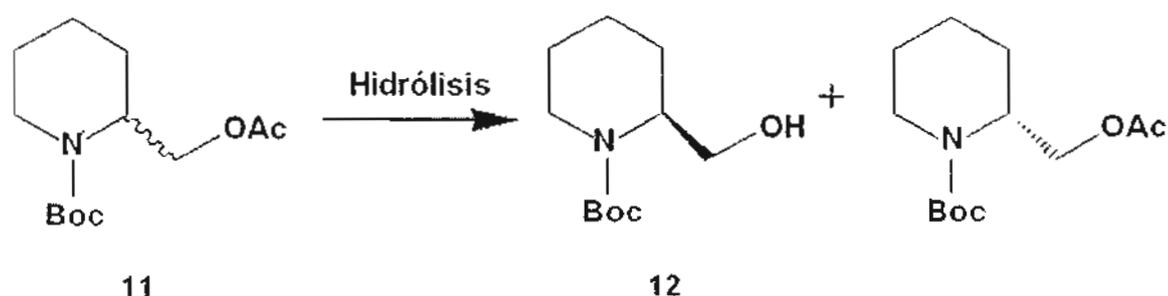
Condiciones de reacción: 10 % v/v de codisolvente, 25°C.

En la **Tabla 5** se observa que a pH 8.0 se tiene la mayor conversión, pero también mostró la más baja enantioselectividad de **9** (54 y 19% respectivamente), a pH 7.0 mostró una conversión menor en comparación al anterior, pero en cuanto a la enantioselectividad a este pH superó casi al doble a los resultados a pH 8.0, en tanto que a pH 6.0 la conversión fue la más baja que se encontró en los pH estudiados, pero su enantioselectividad es mejor.

Con base en los resultados anteriores, se observó que a pH de 7.0 se obtienen los mejores resultados con el PAH de res.

Después de analizar los resultados obtenidos de la hidrólisis del acetato del *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidinmetanol y observar que la enantioselectividad fue baja con los diferentes PAHs, y bajo las diferentes condiciones de reacción probadas, se decidió evaluar el efecto del grupo *N*-protector por lo que se preparó el acetato del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol (**11**), el cual se sometió a la hidrólisis biocatalítica utilizando las mejores condiciones de reacción encontradas en los experimentos anteriores.

7.2 Hidrólisis enzimática del acetato del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol (11).



La hidrólisis del acetato **11** se llevó a cabo utilizando el 10% (v/v) de acetonitrilo como codisolvente, en una solución amortiguadora de fosfatos (0.1M, pH 7.0) con los PAHs de res, ratón y cuyo, con diferentes relaciones polvo:sustrato a 25°C por 24 horas. Los resultados se muestran en la **Tabla 6** (La configuración absoluta de **12** se analiza en el capítulo 7.7).

Tabla 6. % de ee del compuesto **12** y % de conversión de la hidrólisis biocatalizada de **11** utilizando PAHs.

PAHs	Relación Polvo:Sustrato	Tiempo (h)	% conv (11) ^a	% ee (12) ^b
res	2:1	24	10.6	22.0
	6:1	24	21.8	24.3
ratón	2:1	24	81.8	33.7
	6:1	24	96.2	Nd
cuyo	2:1	24	37.8	52.3
	6:1	72	66.6	13.4

^aDeterminada por CG; ^bdeterminada por CLAR quiral.

Condiciones de reacción: solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.0, 10% v/v de acetonitrilo como codisolvente, 25°C.

Nd: No determinado

En la **Tabla 6** se observa que los PAHs de res, ratón y cuyo incrementan casi al doble la conversión del compuesto **11**, cuando se incrementa la proporción polvo: sustrato (2:1 a 6:1, respectivamente), el PAH de res mostró los resultados más bajos en cuanto a la enantioselectividad del alcohol **12** (24%), seguido por el PAH de ratón que mostró los mejores % de conversión de **11**, pero en cuanto a enantioselectividad, se vio superada por el PAH de cuyo que obtuvo un 52% de exceso enantiomérico de **12** aunque con un 38 % de conversión con la proporción 2:1, polvo:sustrato. No se determinó la enantioselectividad con el polvo de ratón ya que el 96% de conversión obtenido disminuiría considerablemente la enantioselectividad de **12**.

Debido a que los excesos enantioméricos de los alcoholes **9** y **12** fueron bajos, se probaron fuentes vegetales de hidrolasas para biocatalizar la hidrólisis de los acetatos **8** y **11**. Las plantas se trabajaron en tres diferentes preparaciones, frescas molidas, polvos liofilizados y polvos acetónicos. La ventaja de estos últimos radica en que pueden ser almacenados por periodos largos de tiempo a temperaturas bajas, contrario a las plantas frescas las cuales pueden ser almacenadas por un periodo corto de tiempo.

7.3 Evaluación de la influencia de material fresco de origen vegetal en la hidrólisis de 8.

La hidrólisis del compuesto **8** se llevó a cabo utilizando el 10% (v/v) de acetonitrilo como codisolvente, en una solución amortiguadora de fosfatos (0.1M, pH 7.0) con vegetales frescos molidos: nopal, calabaza, chayote y tomate a 25°C por 24 horas. Los porcentajes de conversión de la hidrólisis del acetato **8** son muy bajos, y ninguno de ellos supera el 3% de conversión, por lo que a ninguno de ellos se les determinó la enantioselectividad. La causa de resultados tan bajos es por que las enzimas se encuentran diluidas, ya que más del 90% del material biológico es agua, por lo que la relación enzima: sustrato es muy baja.

7.4 Evaluación de la influencia de los polvos liofilizados de origen vegetal en la hidrólisis de **8** y **11**.

A) Influencia de los polvos liofilizados de vegetales.

Debido a los bajos resultados que mostraron los vegetales frescos molidos, se procedió a evaluar los polvos liofilizados en la hidrólisis biocatalítica del compuesto **8**, la cual se llevó a cabo utilizando el 10% (v/v) de acetonitrilo como codisolvente, en una solución amortiguadora de fosfatos (0.1M, pH 7.0), con los polvos liofilizados de vegetales de calabaza, nopal, tomate y chícharo, con diferentes relaciones polvo:sustrato, a 25°C por 24 horas. Los resultados se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. % de ee del compuesto **9** y % de conversión de la hidrólisis biocatalizada de **8** utilizando polvos liofilizados de vegetales.

Polvo Liofilizado Vegetal	Relación Polvo:Sustrato	Tiempo (h)	% conv (8) ^a	% ee (9) ^b
calabaza	6:1	24	60.9	24.3
nopal	2:1	24	1.5	Nd
	3:1	72	9.1	62.0
	6:1	24	5.8	Nd
tomate	3:1	72	5.2	46.5
	6:1	24	19.3	36.6
chícharo	2:1	24	14.2	44.0
	6:1	72	16.5	38.1

^aDeterminada por CG; ^bdeterminada por CLAR quiral.

Condiciones de reacción: solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.0,

10% v/v de acetonitrilo como codisolvente, 25°C.

Nd: No determinado.

En la **Tabla 7** se observa que los porcentajes de conversión fueron bajos, pero al aumentar la proporción polvo: sustrato la conversión se incrementa pero no

de manera significativa. Solo el polvo de calabaza, en la proporción 6:1 mostró un 60% de conversión, pero en cuanto a la enantioselectividad fue menor que con los polvos liofilizados de chicharo, tomate y nopal. El mayor exceso enantiomérico del alcohol **9** (62%) se obtuvo con el polvo de nopal aunque el porcentaje de conversión fue de 9.1%. No se realizaron determinaciones de enantioselectividad a los polvos que mostraron baja conversión (**Tabla 7**).

B) Influencia del codisolvente con el Polvo liofilizado de nopal.

Se analizó la influencia del codisolvente sobre la hidrólisis biocatalizada de **8**, por lo que se trabajó con el 10% v/v de los siguientes codisolventes: DMSO, DMF, dioxano, acetonitrilo, THF y AcOEt, para determinar como afecta la conversión y la enantioselectividad de la reacción hidrolítica utilizando como biocatalizador el polvo liofilizado de nopal, por ser el que mejor resultado de ee mostró en la **Tabla 7**, solo que se aumentó la proporción polvo: sustrato (3:1 a 6:1) y el tiempo de reacción (24 a 48 horas) manteniendo la temperatura de 25°C. Estos cambios con el fin de mejorar la hidrólisis biocatalítica. Los resultados se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. % de ee del compuesto **9** y % de conversión de la hidrólisis biocatalizada de **8** utilizando polvo liofilizado de nopal con diferentes codisolventes.

Codisolvente	% conv (8) ^a	% ee (9) ^b
DMSO	16.4	55.4
DMF	8.7	57.6
Dioxano	7.7	57.0
Acetonitrilo	6.7	62.6
THF	4.8	55.0
AcOEt	1.5	Nd

^aDeterminada por CG; ^bdeterminada por CLAR quiral.

Condiciones de reacción: solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.0, 10% v/v de codisolvente, durante 48 horas a 25°C.

Nd: No determinado

Se observó que al utilizar DMSO el porcentaje de conversión de **8** es el más alto (16.4%) en la **Tabla 8**. La actividad hidrolítica y enantioselectividad del polvo liofilizado de nopal es similar en presencia del DMF y dioxano. Con acetonitrilo la enantioselectividad es mayor, aunque su conversión fue baja. No se determinó el % de enantioselectividad con AcOEt ya que su conversión fue baja. De acuerdo a los resultados en la **Tabla 8**, se observó que la reacción de hidrólisis con acetonitrilo mostró la mejor enantioselectividad con respecto al alcohol (**9**) por lo que se continuó trabajando con este codisolvente.

C) Hidrólisis de **11** con polvos liofilizados de vegetales.

Debido a que todos los polvos liofilizados utilizados mostraron actividad hidrolítica sobre el compuesto **8** se procedió a evaluar el efecto del grupo *N*-protector, por lo que se sometió a hidrólisis el derivado *N*-boc (**11**). Los resultados se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. % de ee del compuesto **12** y % de conversión de la hidrólisis biocatalizada de **11** utilizando polvos liofilizados de vegetales.

Polvo Liofilizado Vegetal	Relación Polvo:Sustrato	Tiempo (h)	% conv (11) ^a	% ee (12) ^b
calabaza	2:1	24	31.0	61.5
	6:1	24	56.7	50.4
nopal	2:1	24	1.6	Nd
	3:1	72	7.1	44.7
	6:1	24	9.0	27.0
tomate	3:1	72	2.5	Nd
	6:1	24	2.5	Nd
chícharo	2:1	72	12.3	33.1

^aDeterminada por CG; ^bdeterminada por CLAR quiral.

Condiciones de reacción: solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.0, 10% v/v de acetonitrilo como codisolvente, 25°C.

Nd: No determinado.

En la **Tabla 9** se observó que al cambiar el grupo *N*-protector, con el polvo liofilizado de tomate se obtiene la más baja conversión en las dos diferentes proporciones polvo:sustrato 3:1, 6:1 ya que ninguna de las dos superó el 2.5% de conversión, por este motivo no se midió la enantioselectividad. En cuanto al polvo liofilizado de nopal las conversiones obtenidas no superaron el 9%, con la relación polvo:sustrato (3:1) se obtuvo el 44.7% del compuesto **12**. Con el polvo de chícharo se obtuvo el 12% de conversión, el exceso enantiomérico fue bajo (33%). Con el polvo liofilizado de calabaza se obtuvieron los mejores resultados, con la proporción polvo sustrato 6:1 la conversión fue del 56.7% pero el ee fue de 50.4%, mientras que con la relación 2:1, bajó la conversión (31%) pero la enantioselectividad fue mayor (61.5% ee).

7.5 Evaluación de la influencia de los polvos acetónicos de origen vegetal en la hidrólisis de 8 y 11.

Se procedió a evaluar la actividad hidrolítica de polvos deshidratados con acetona de calabaza, chícharo, nopal y mamey con los sustratos **8 y 11**, la cual se llevó a cabo utilizando el 10% (v/v) de acetonitrilo como codisolvente, en una solución amortiguadora de fosfatos (0.1M, pH 7.0) a 25°C. Los resultados se muestran en las **Tablas 10 y 11**.

Tabla 10. % de ee del compuesto **9** y % de conversión de la hidrólisis biocatalizada de **8** utilizando polvos acetónicos de vegetales.

Polvo Acetónico Vegetal	Relación Polvo:Sustrato	Tiempo (h)	% conv (8) ^a	% ee (9) ^b
calabaza	2:1	24	47.2	6.9
chicharo	2:1	72	6.7	55.0
mamey	2:1	24	13.2	54.9
	2:1	48	17.2	50.7
nopal	2:1	24	23.2	67.4
	2:1	48	29.1	55.8

^aDeterminada por CG; ^bdeterminada por CLAR quiral.

Condiciones de reacción: solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.0, 10% v/v de acetonitrilo como codisolvente, 25°C.

En la **Tabla 10**, se observa que la conversión de **8** fue baja, sin embargo, el ee de **9** mostró resultados superiores al 50%. Con el polvo acetónico de calabaza se obtuvo la mejor conversión de **8** (47%), pero su enantioselectividad resultó ser la menor (6.9% ee). El polvo del chícharo mostró la más baja actividad hidrolítica ya que, en 72 horas, su conversión de **8** fue solamente de 6.7%, pero el ee de **9** fue de un 55%. Con el polvo de mamey la conversión fue del 17% en 48 h pero el % de ee fue mayor a las 24 h (54.9%). Estos resultados fueron superados por el polvo acetónico de nopal ya que mostró mayor actividad hidrolítica en cuanto al % de conversión de **8** (29.1%), en cuanto a la enantioselectividad los resultados obtenidos en 24 y 48 horas fueron de 67 y 56% respectivamente (**Tabla 10**).

Tabla 11. % de ee del compuesto **12** y % de conversión de la hidrólisis biocatalizada de **11** utilizando polvos acetónicos de vegetales.

Polvo Acetónico Vegetal	Relación Polvo:Sustrato	Tiempo (h)	% conv (11) ^a	% ee (12) ^b
calabaza	2:1	24	29.0	46.2
chícharo	2:1	72	8.0	0.1
nopal	2:1	24	14.2	66.4
mamey	2:1	24	12.0	80.1
	2:1	48	16.4	77.6

^aDeterminada por CG; ^bdeterminada por CLAR quiral.

Condiciones de reacción: solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.0, 10% v/v de acetonitrilo como codisolvente, 25°C.

La **Tabla 11**, muestra de manera general % de conversión bajos, solamente con el polvo acetónico de calabaza se obtuvo el 29% de conversión de **11** y un 46% de ee de **12**. Destaca la poca actividad catalítica por parte del polvo acetónico de chícharo con 8 % de conversión y una nula enantioselectividad en 72 h, el polvo acetónico de nopal también muestra baja conversión (14.2%) pero mejor enantioselectividad de (66% ee). Con el polvo de mamey, aunque su conversión fue baja a 24 y 48 horas (12 y 16%, respectivamente), la enantioselectividad de la reacción mejoró considerablemente con respecto a la obtenida para el compuesto **9** que fue de 55 (**Tabla 10**), mientras que para **11** fue de 80% en 24 horas.

7.6 Comparación de los resultados de la hidrólisis de **8** y **11**, polvos liofilizados o polvos acetónicos de vegetales.

Los polvos liofilizados de vegetales no mostraron afinidad por el compuesto **8** (**Tabla 7**), la conversión fue baja con los polvos de nopal, tomate y chícharo (no mayor al 20%), pero con el polvo liofilizado de calabaza se obtuvo el 61% de conversión; sin embargo, la enantioselectividad fue la más baja (24%). En cuanto a la enantioselectividad con tomate y chícharo (**Tabla 7**) se obtuvieron

bajos excesos enantioméricos (36-46%), sólo con el polvo liofilizado de nopal se obtuvo el 62%.

Con respecto a la hidrólisis de **8** usando los polvos acetónicos de vegetales (**Tabla 10**), nuevamente la conversión fue baja con los polvos acetónicos de chicharo, nopal y mamey que obtuvieron menos del 23% de conversión, sólo con el polvo de calabaza se obtuvo el 47% de conversión, sólo que su enantioselectividad fue de 7%. La enantioselectividad con los demás polvos acetónicos fue mayor a las obtenidas con los liofilizados, ya que los valores fueron superiores al 50%, el polvo acetónico de nopal fue el mejor, ya que obtuvo el 67% de ee (**Tabla 10**).

Los polvos liofilizados de vegetales presentaron una baja aceptación por el compuesto **11** (**Tabla 9**), ya que los porcentajes de conversión con los polvos de nopal, tomate y chicharo fueron muy bajos, donde sólo con el polvo liofilizado de calabaza se obtuvo un 31%, y el mejor resultado de ee (61%).

Se observa que el compuesto **11** (**Tabla 11**), también muestra una baja conversión con los polvos acetónicos chicharo, nopal y mamey, sólo con el polvo de calabaza se obtuvo un 29%. Sin embargo, el polvo de mamey aunque obtuvo una baja conversión (12 y 16% en 24 y 48 horas respectivamente), en cuanto a la enantioselectividad mostró 80 y 77% de ee (**Tabla 11**), datos que superan significativamente todos los resultados obtenidos con los diferentes biocatalizadores.

7.7 Purificación y medición de la rotación óptica de **8**, **9**, **11** y **12**.

Se procedió a separar por cromatografía en columna los productos obtenidos de la hidrólisis biocatalítica, utilizando los polvos acetónicos de nopal y mamey como biocatalizadores, debido a que con esos polvos se obtuvo la mayor enantioselectividad de **8** y **12** (**Tablas 10 y 11**).

La configuración de los enantiómeros mayoritarios de los compuestos **9** y **12**, obtenidos por la hidrólisis biocatalítica de **8** y **11**, se asignó como "S" por la comparación de la rotación óptica de los compuestos aislados con respecto a las rotaciones ópticas reportadas en la literatura, también acorde a los tiempos

de retención de (*R*)-2 y (*S*)-2 usando la columna quiral OJ-H.⁶⁰ Los resultados se muestran en la **Tabla 12**.

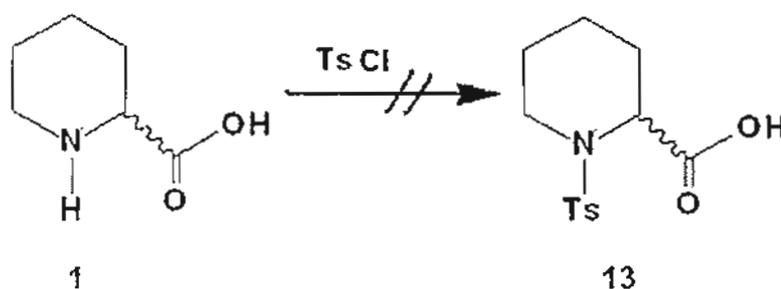
Tabla 12. Medición de la rotación óptica de los derivados piperidínicos *N*-protegidos obtenidos.

Polvo Acetónico	Compuesto	$[\alpha]^{20}$
nopal	<i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonyl)-2-piperidinmetanol (9)	-15.53
	Acetato del <i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonyl)-2-piperidinmetanol (8)	2.62
mamey	<i>N</i> -(<i>t</i> -butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol (12)	2.78
	Acetato del <i>N</i> -(<i>t</i> -butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol (11)	-1.14

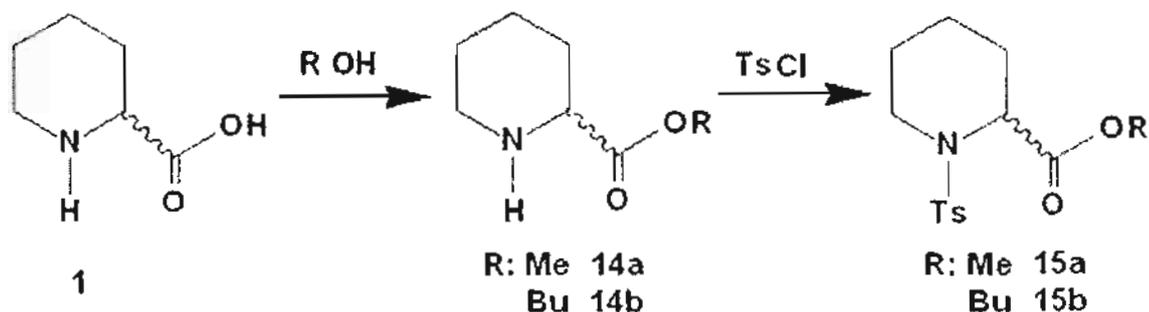
Los resultados de la **Tabla 12** indican que la hidrólisis del acetato del *N*-(*p*-toluensulfonyl)-2-piperidinmetanol utilizado polvo acetónico de nopal favorece la formación del enantiómero (-)-**9**, mientras que la hidrólisis del acetato del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol utilizando polvo acetónico de mamey favorece al enantiómero (+)-**12**.

7.8 Evaluación de los PAHs y vegetales en la hidrólisis de 15a y 15b.

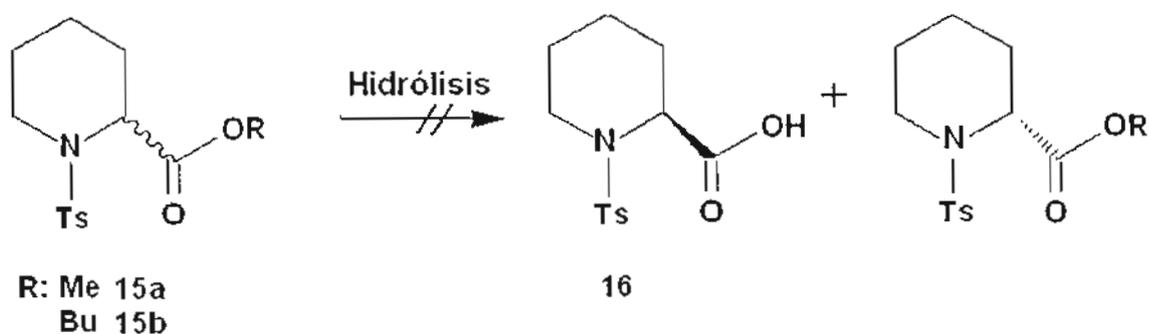
Con la finalidad de tener las materias primas para lograr los objetivos de esta investigación, se intentó la preparación de **13**, de la misma manera que la preparación de *N*-(*p*-toluensulfonyl)-2-piperidinmetanol (**7**), pero no se observaron cambios en la materia prima.



Por lo que primero se prepararon los correspondientes ésteres **14a** y **14b**; posteriormente, se procedió a la tosilación del nitrógeno obteniéndose los productos deseados.



Finalmente, se intentó hidrolizar de manera enzimática a **15a** y **15b**, utilizando la misma metodología propuesta con lipasas de *Aspergillus Niger*, ya que existen reportes de hidrólisis de ésteres de derivados del ácido piperólico con esta fuente.⁴⁴ También se utilizó polvo liofilizado y acetónico de nopal, y los PAHs de pollo, cerdo y rata. Pero no se logró detectar el producto **16** de la hidrólisis de **15a** o **15b**, ya que no hubo hidrólisis en las condiciones de reacción empleadas con ninguno de los biocatalizadores.



8. CONCLUSIONES

Durante el desarrollo del presente trabajo, se logró implementar un método de resolución por medio de la hidrólisis enantioselectiva de los acetatos del *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidinmetanol (**8**) y el acetato del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol (**11**) utilizando hidrolasas.

Donde todos los PAHs catalizaron la hidrólisis de **8**, excepto el PAH de borrego que no cataliza la reacción. Sin embargo, el exceso enantiomérico observado fue de moderado a bajo en todos los casos, los valores más altos fueron obtenidos con PAH de res. La proporción del codisolvente en el medio de reacción tuvo un gran impacto en la reacción de biocatálisis; se trabajó con el 10% v/v ya que un incremento al 20% v/v prácticamente suprimió la reacción. El tipo de codisolvente también tuvo gran influencia en la reacción, el acetonitrilo mostró los mejores resultados. El pH en el medio de reacción afectó la reacción biocatalítica; a pH 7.0 se tuvo mayor conversión y enantioselectividad. Por otro lado, la naturaleza del grupo *N*-protector cambió el comportamiento del PAH de res, usando como sustrato al *N*-ts (**8**) la enantioselectividad de la reacción es moderada; sin embargo, utilizando como sustrato el *N*-boc (**11**) la enantioselectividad es baja.

También se usaron como biocatalizadores vegetales frescos molidos, polvos liofilizados vegetales y polvos acetónicos de vegetales, con estos últimos mejoró la enantioselectividad de la reacción de hidrólisis de **8** y **11**. Con el polvo acetónico de la semilla de mamey se obtuvo 80% de ee de **12**, mientras que en la hidrólisis de **8** usando polvo acetónico de nopal se obtuvo un 67% de ee de **9**. Es importante resaltar el uso de hidrolasas de origen vegetal, ya que son fuente de enzimas que han sido poco estudiadas y las que se seleccionaron no se han utilizado previamente en la resolución de alcoholes.

Finalmente se prepararon, identificaron y caracterizaron los ésteres metílico y butílico del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico (**15a** y **15b**), pero no se logró la hidrólisis correspondiente con las diferentes fuentes de enzima estudiadas, después de aplicar las mejores condiciones de biotransformación encontradas.

9. REFERENCIAS

1. Sheldon, R. *Chirotechnology*. Edit. Marcel Dekker, Inc. NY. **1993**, 39-67.
2. Tomaszewski, J.; Rumore, M. *Drug . Dev. Ind. Pharm.* **1994**, *20*, 119-139.
3. Carracedo, E. *Farmacia de Atención Primaria*. **2005**, *3*, 6-10.
4. Solís, A. "Estudio de Nuevas Fuentes de Oxinitrilasas y su Aplicación en Síntesis Orgánica", Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencias Bioólicas. UAM-Xochimilco. México, **1999**.
5. Calmes, M.; Escale, F.; Rolland, M.; Martínez, J. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2003**, *14*, 1685-1689.
6. Keenan ,T. P.; Yaeger, D.; Holt, D.A. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1999**, *10*, 4331-4341.
7. Solís, A.; Pérez, H.I.; Manjarrez, N.; Luna, H.; Aquino, F.; Nava, A. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **2006**, *37*, 23-28.
8. Basavaiah, D. *Arkivoc*. **2001**, 70-82.
9. Cordell, G. A.; Lemos, T. L. ; Monte, F. J.; Mattos, M. C. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 478-492.
10. Schwartz, H. M.; Biedron, S. I.; Holdt, M. M.; Rehm, S. *Nat. Chem. Res. Lab.* **1964**, *3(2)*, 189-200.
11. Bruni, R.; Fantin, G.; Medici, A.; Pedrini, P.; Sacchetti, G. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43(18)*, 3377-3379.

12. Stark, A.; Lundholm, A. K; Meijer, J. *Swedish Univ. Agricultural Sci.* **1995**, 38(1), 31-3.
13. Teixeira, G.; Santana, A. R.; Pais, M. S.; Clemente, A. *App. Biochem. Biotechn.* **2000**, 88 (1-3), 299-312.
14. Avendaño, C. *Introducción a la Química Farmacéutica*, segunda edición. Edit. Mc Graw-Hill Interamericana, España, **2001**, p. 1-42, 777-799.
15. Lehninger, A. *Bioquímica*, segunda edición. Edit. Omega, Barcelona, **1985**, p. 223, 258.
16. Margolin, A. *Enzym. Microb. Technol.* **1993**, 15, 266-271.
17. Luna, H. *Rev.Soc. Quím. Méx.* **2004**, 48, 211-219.
18. Adam, W.; Lazarus, M. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 837-845.
19. Lalonde, J. *Chem. Eng.* **1997**, 42, 108-113.
20. Gotor, V. *Org. Proc. Res. Develop.* **2002**, 6, 420-426.
21. Badorrey, R.; Cativiela, C.; Díaz, M.; Galvez, J. *Tetrahedron.* **2002**, 58, 341-354.
22. Rasor, J, P; Voss, E. *App. Cat. A: General.* **2001**, 221,145-158.
23. Panke, S.; Wubbolts, M. C. *Curr. Opin. Biotech.* **2002**, 13, 111-116.
24. Fersht, A. W. *Enzyme structure and mechanism*, second edition. Freeman & Co. NY., **1977**.

25. Zandbergen, P.; Brussee, J. *Synth. Commun.* **1991**, *21*, 1387-1394.
26. Griengl, H.; Schwab, H.; Fechter, M. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 252-258.
27. Pérez, H. I.; Luna, H.; Manjarrez, N.; Solís, A.; Sánchez, R. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **1998**, *29*, 23-26.
28. Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1882-1886.
29. Dordick, J. *Biotechnol. Prog.* **1992**, *8*, 259-263.
30. Natarajan, K. R. *J. Chem. Educ.* **1991**, *68*, 13-17.
31. Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Grisetti, P.; Manzocchi, A. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1071-1075.
32. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, fourth edition. Edit. Springer, Berlin, **1995**, p. 1- 24, 267-270, 300-367.
33. Lilly, M. *Chem. Eng. Sci.* **1994**, *49*, 151-154.
34. Tao, J.; Zhao, L.; Ran, N. *Org. Proc. Res. Develop.* **2007**, *11*, 259-267.
35. Weon, J.; Yokoigawa, K.; Esaki, N. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**, *56*, 2081-2082.
36. Ginesta, X.; Pericas, M. A.; Riera, A. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 779-782.
37. Rutjes, F.; Veerman, J.; Meester, W.; Hiemstra, H.; Schoemaker, H. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, *9*, 1127-1135.

38. Budavari, S. The Merck Index an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Twelfth edition, Ed Merk & Co. NY., **1996**, p. 7615.
39. Aldrich. Catalogo de Químicos Finos. Sigma-Aldrich Química, **2005-2006**, p.1886.
40. Rostein, S, E. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Edición 52, Ed. PLM. **2005** p. 2995.
41. Watanabe, L. A.; Haranaka, S.; Jose, B.; Yoshida, M. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2005**, *16*, 903-908.
42. Nasabadioko, S.; Pérez, R.; Brieva, R.; Gotor, V. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1998**, *9*, 1597-1604.
43. Wu, X.; Dubois, K.; Rogiers, J. *Tetrahedron*. **2000**, *56*, 3043-3051.
44. Ng-Youn-Chen, M. C.; Serreqi, A.; Huang, Q.; Kazlauskas, R. *J. Org. Chem*. **1994**, *59*, 2075-2081.
45. Lundell, K.; Lehtinen, P.; Kanerva, L. T. *Adv. Synth. Catal*. **2003**, *345*, 790-796.
46. Lyle, G. G.; Lyle, R. E. In *Asymmetric Synthesis*; Morrison, J. D., Ed. Academic Press, NY., **1983**, p. 19-26.
47. Dale, J. A.; Mosher, H. S. *J. Am. Chem. Soc*. **1973**, *95*, 512-514.
48. Moullin, M.; Deleu, C.; Larher, F. *Anal. Biochem*. **2002**, *308*, 320-327.
49. Solís, A.; Luna, H.; Pérez, H. I.; Manjarrez, N.; Sánchez, R. *Tetrahedron Lett*. **1998**, *39*, 8759-8762.

50. Chen, C-S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299.
51. Ader, U.; Andersch, P.; Berger, M.; Georgens, U.; Seemayer, R.; Schneider, M. *Pure Appl. Chem.* **1992**, *64*, 1165-1170.
52. Bornscheuer, U.T. *FEMS Microb. Rev.* **2002**, *26*, 73-81.
53. Lloyd, R.; Lloyd, M.; Smith, M. *Tetrahedron.* **2004**, *60*, 717-728.
54. Bornscheuer, U. T. *Curr. Opin. Biot.* **2002**, *13*, 543- 547.
55. Salvatore, R. *Tetrahedron.* **2001**, *57*, 7785-7811.
56. Van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Tetrahedron.* **2004**, *60*, 501-519.
57. Hendrickson, J.; Bergeron, R. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *5*, 345-348.
58. Xue, C-B.; He, X.; Rodericks, J. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 865-870.
59. Shuman, R.; Ornstein, P.; Pascual, J.; Gesellchen, P. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 738-741.
60. Solís, A.; García, S.; Pérez, H.I.; Manjarrez, N.; Luna, H. *Tetrahedron: Asymmetry.* **2008**, *19*, 549-553.

10. ANEXOS

Figura 1. Espectro de Infrarrojo del *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidinmetanol (7).

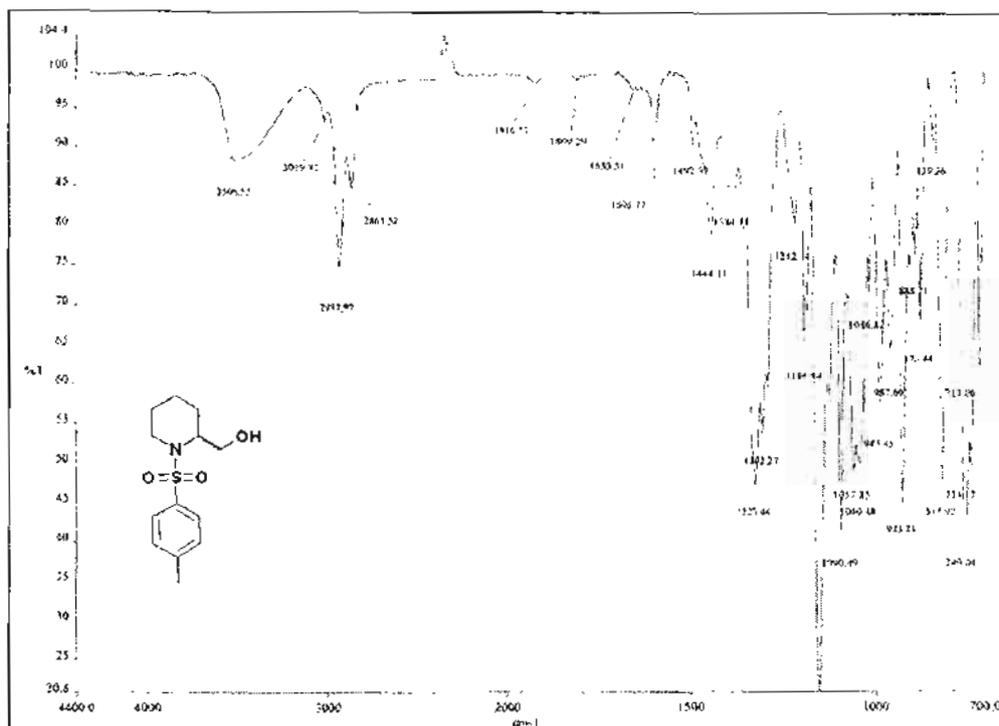


Figura 2. Espectro de ¹H-RMN del *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidinmetanol (7).

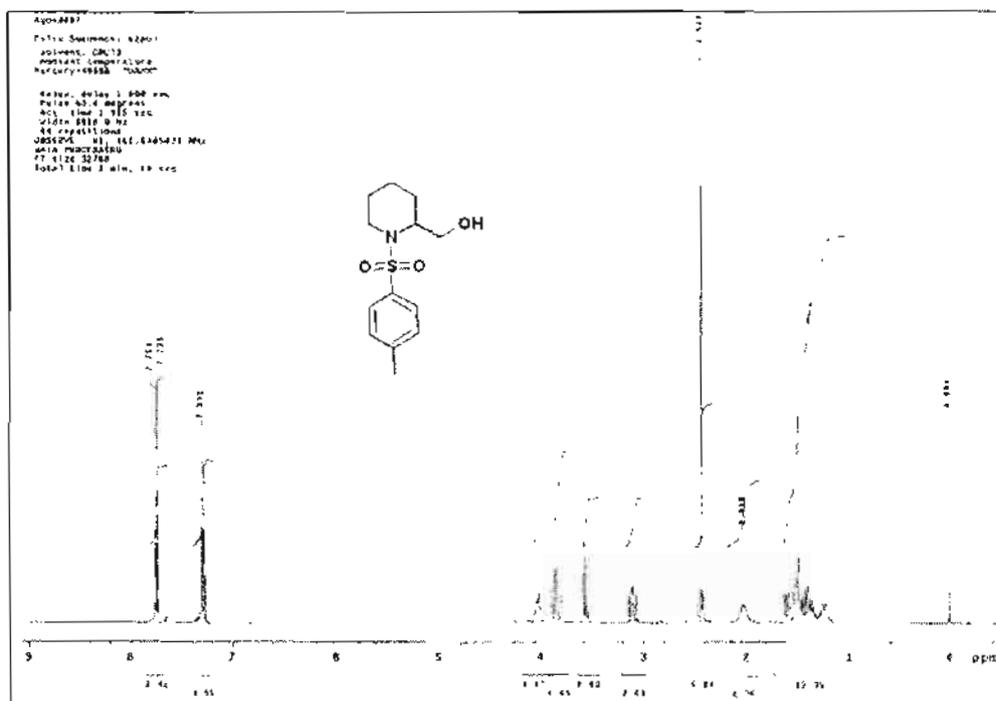


Figura 5. Espectro de ^1H -RMN del acetato del *N*-(*p*-toluensulfonil)-2 piperidinmetanol (8).

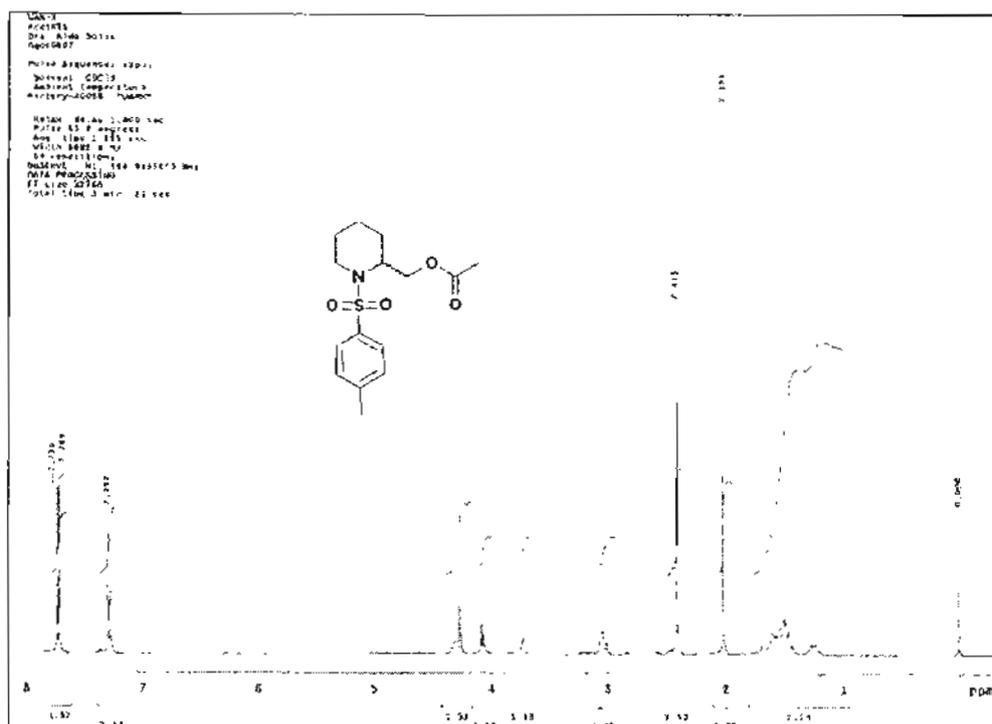


Figura 6. Espectro de ^{13}C -RMN del acetato del *N*-(*p*-toluensulfonil)-2 piperidinmetanol (8).

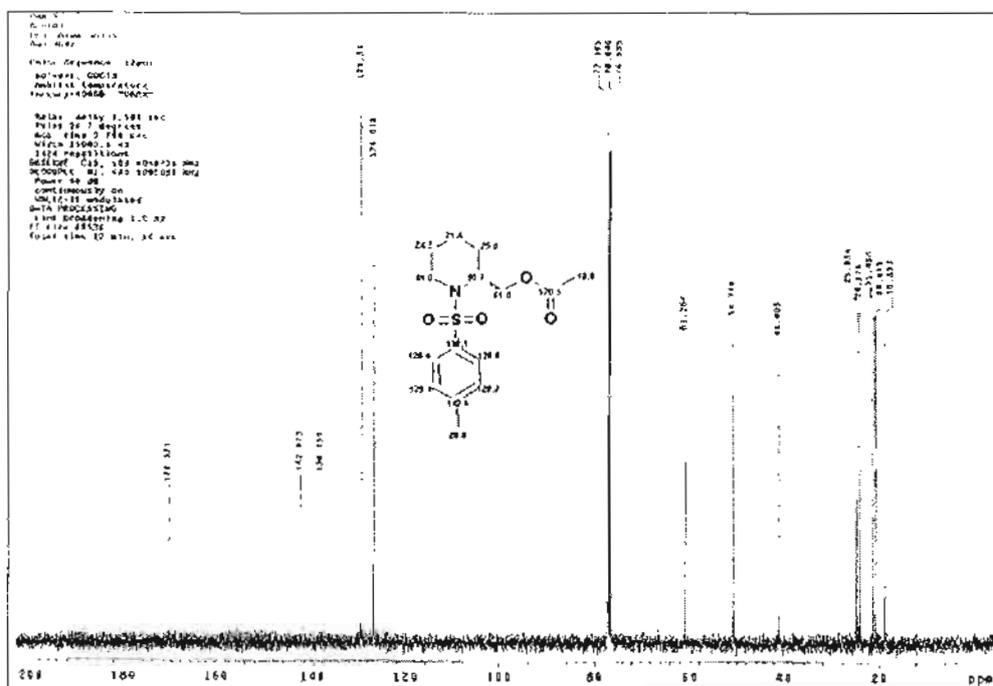


Figura 7. Espectro de Infrarrojo del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol (10).

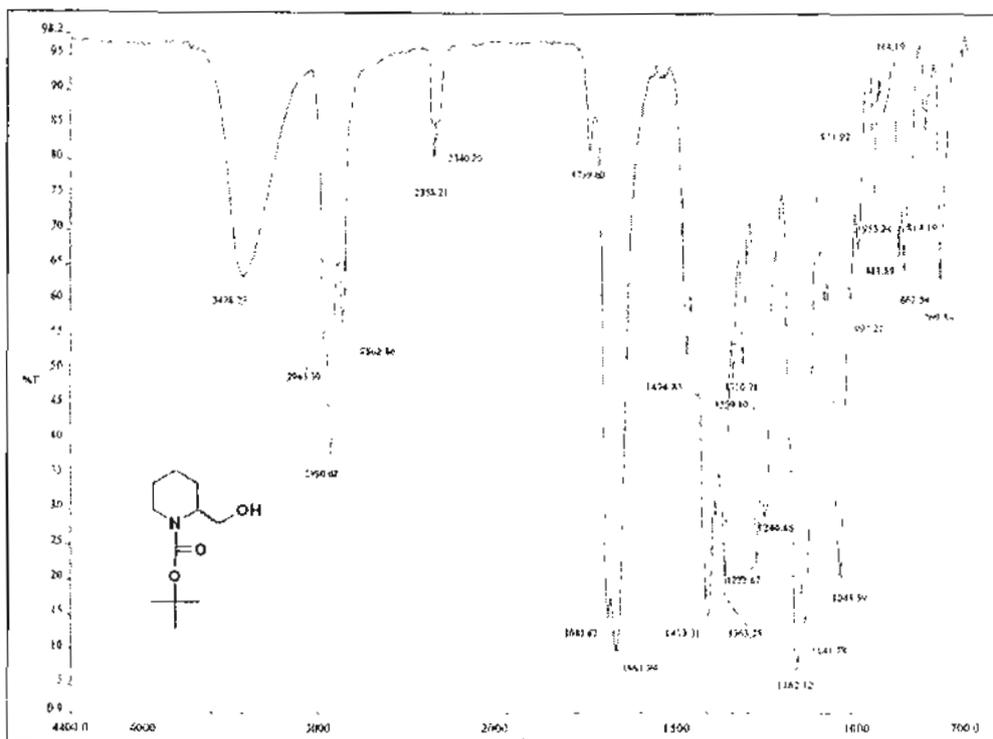


Figura 8. Espectro de ¹H-RMN del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol (10).

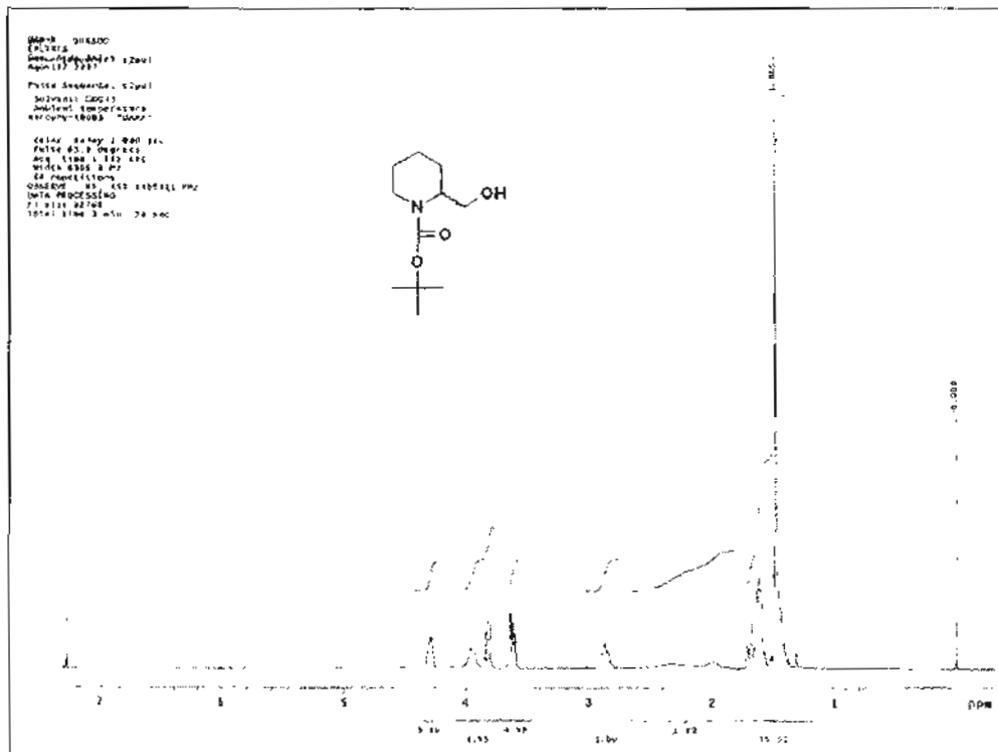


Figura 9. Espectro de ^{13}C -RMN del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol (10).

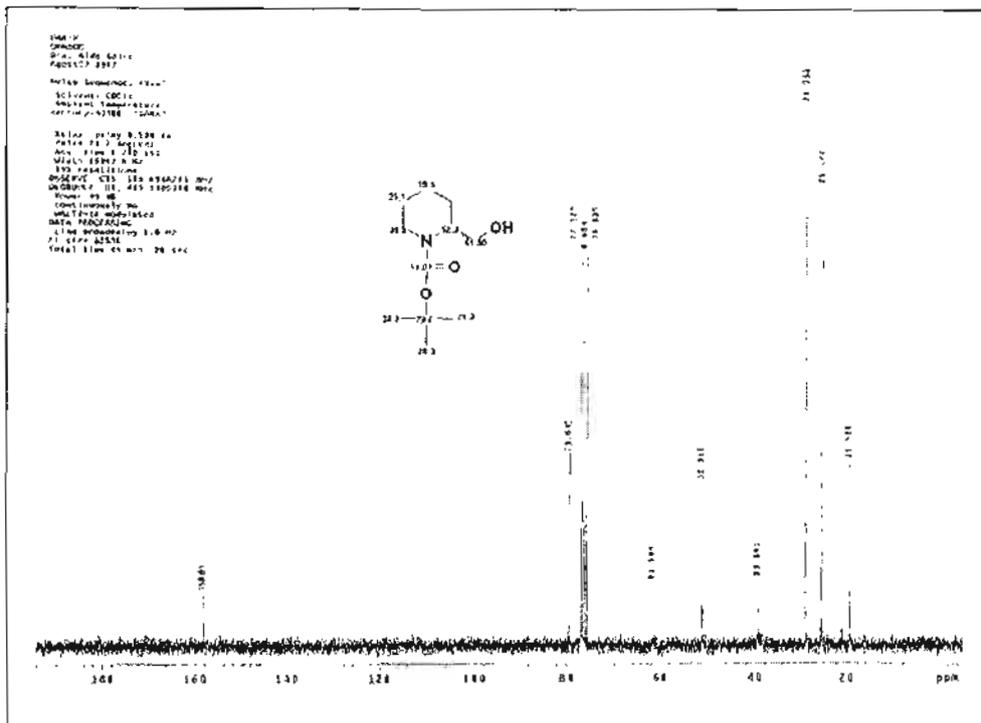


Figura 10. Espectro de Infrarrojo del acetato del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol (11).

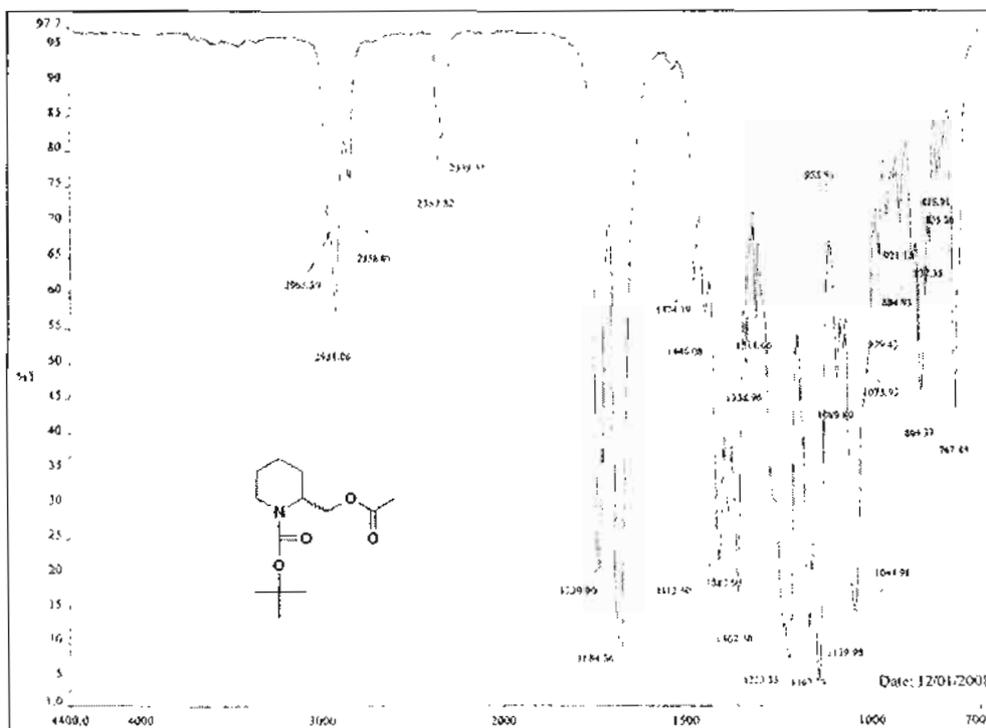


Figura 11. Espectro de ^1H -RMN del acetato del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol (**11**).

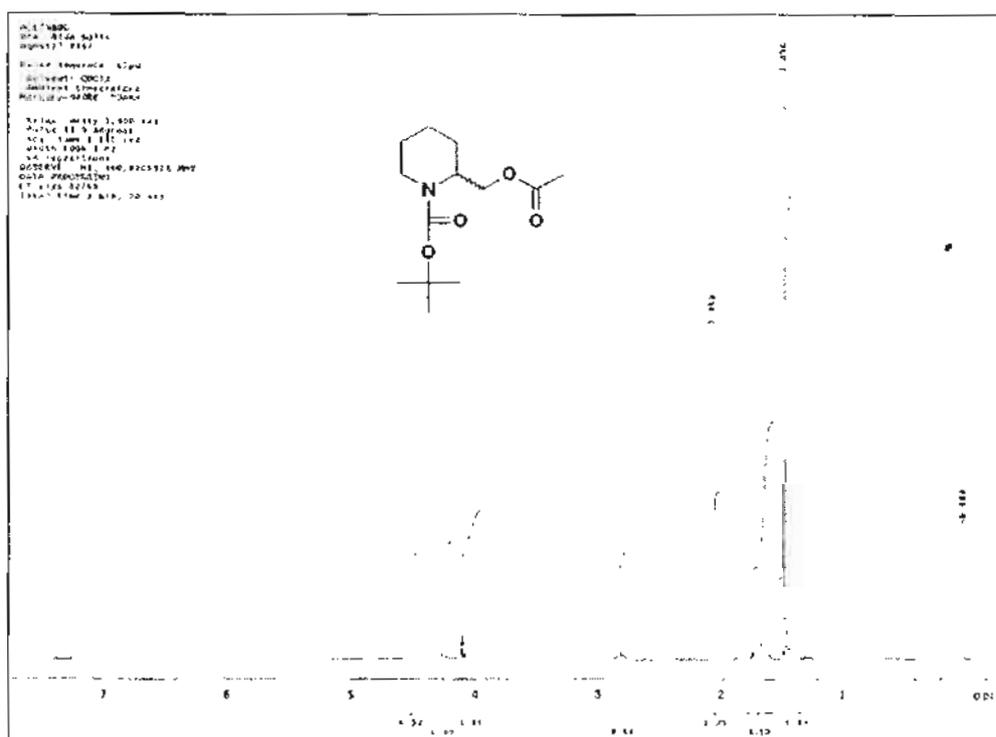


Figura 12. Espectro de ^{13}C -RMN del acetato del *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-piperidinmetanol (**11**).

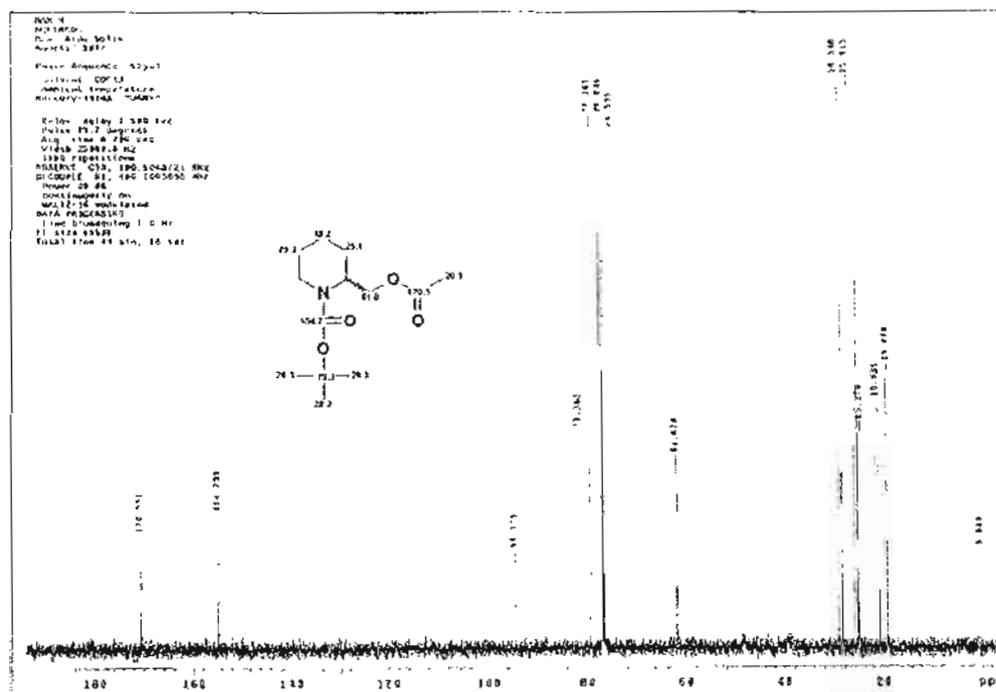


Figura 13. Espectro de Infrarrojo del éster metílico del ácido piperólico (14a).

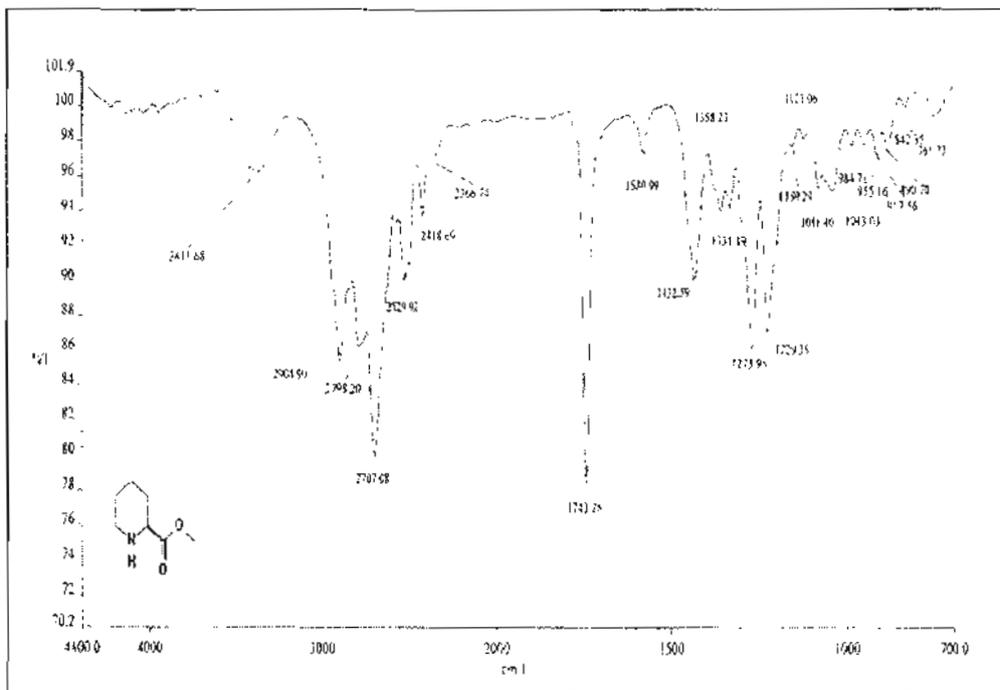


Figura 14. Espectro de ¹H-RMN del éster metílico del ácido piperólico (14a).

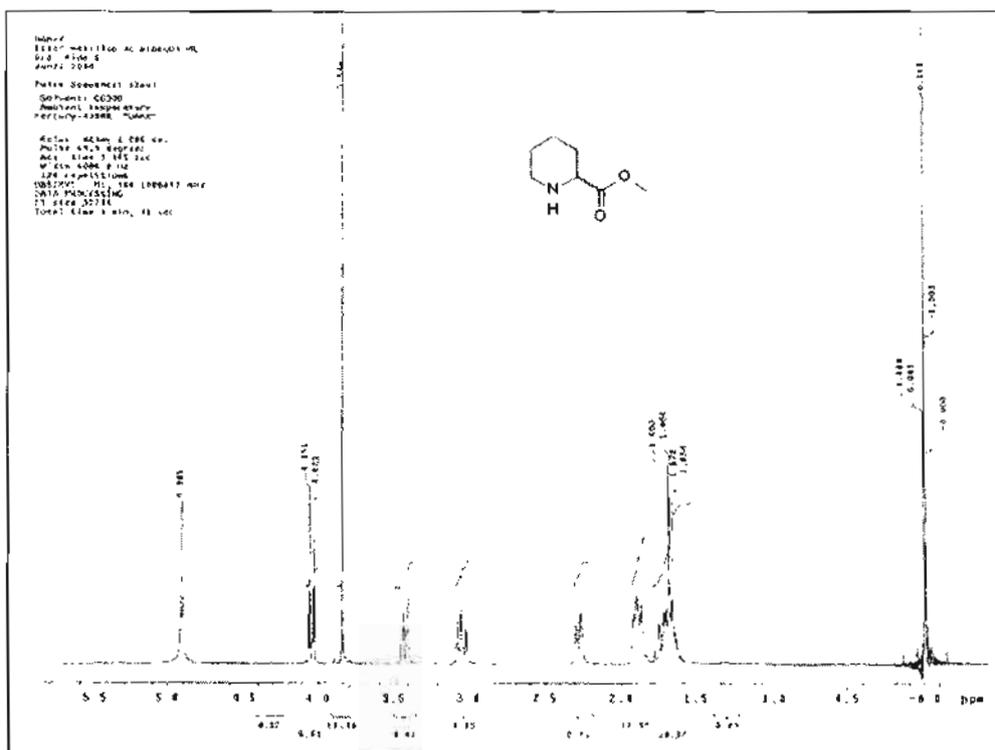


Figura 19. Espectro de Infrarrojo del éster metílico del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico (**15a**).

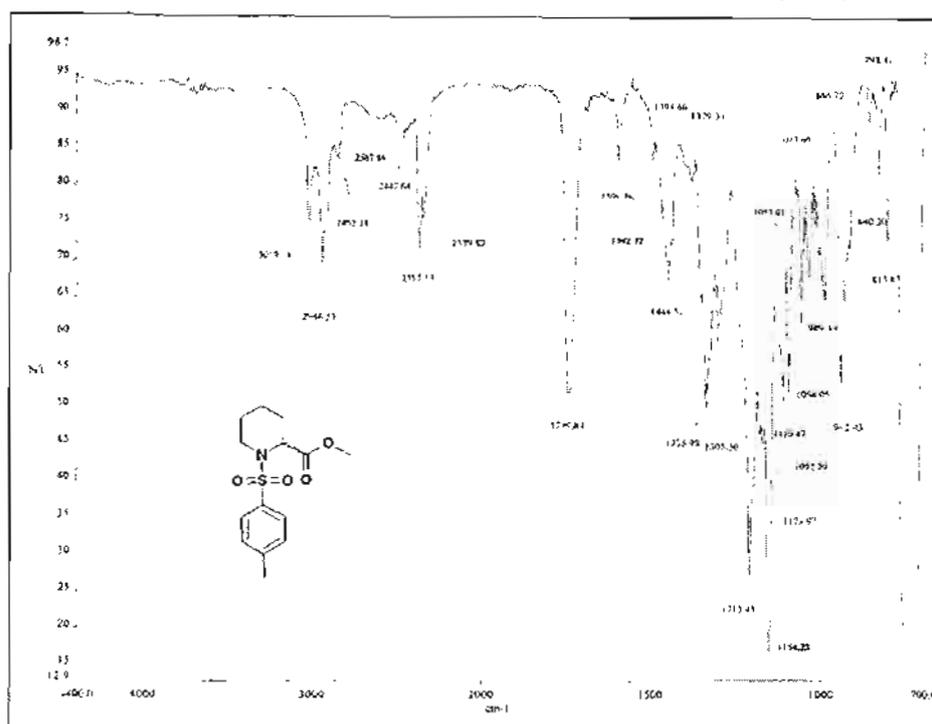


Figura 20. Espectro de ^1H -RMN del éster metílico del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico (**15a**).

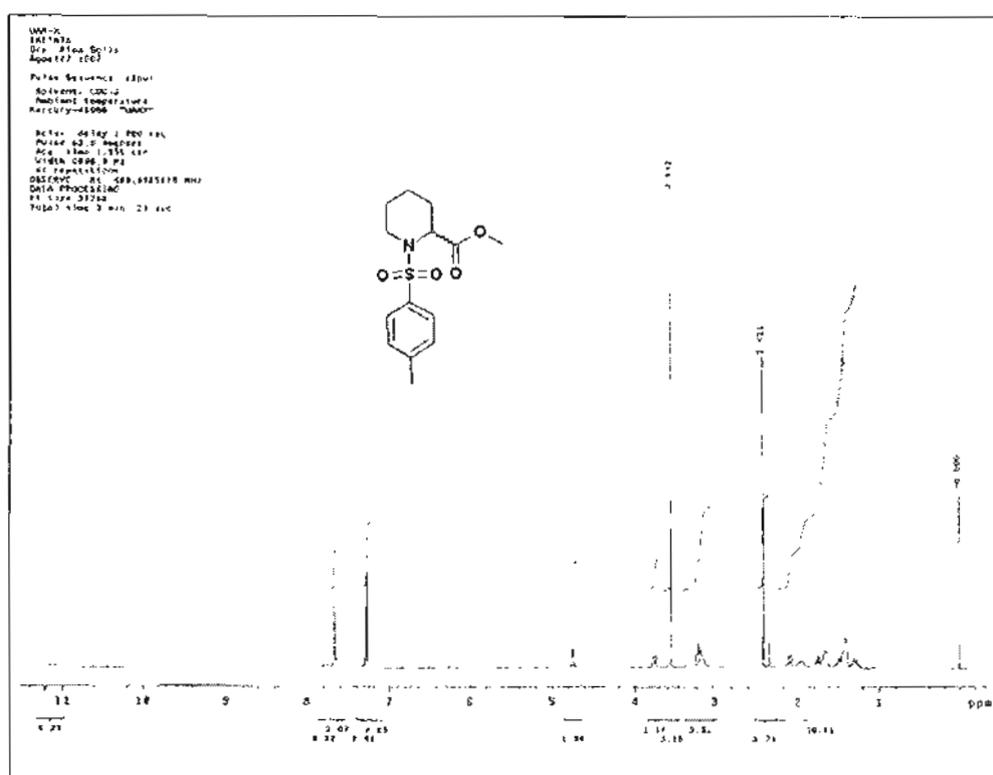


Figura 21. Espectro de ^{13}C -RMN del éster metílico del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico (15a).

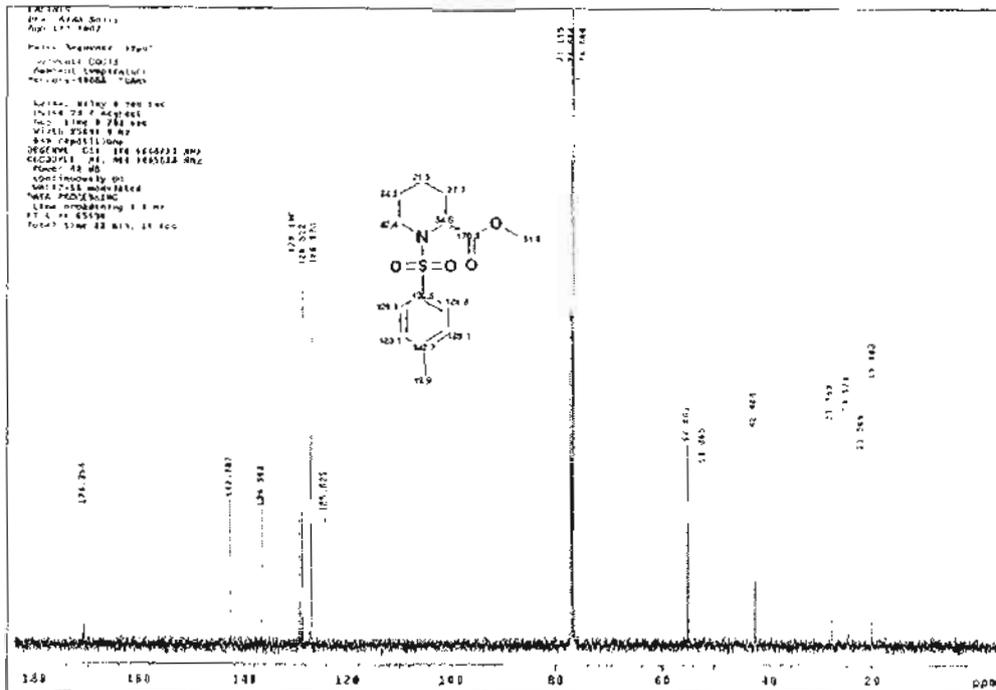


Figura 22. Espectro de Infrarrojo del éster butílico del ácido *N*-(*p*-toluensulfonil)-2-piperidincarboxílico (15b).

