

Investigación

Efecto del grupo protector en la especificidad de sustrato de la lipasa de *Candida antarctica* en la aminólisis de amino ésteres en disolvente orgánico

Raquel Gallardo Rivera, Araceli Rojas Cruz y Gerardo Valerio-Alfaro*

UNIDA, Instituto Tecnológico de Veracruz, Av. Miguel A. de Quevedo # 2779, Veracruz, Veracruz 91897.
Tel. 2299-34-57-01 Ext. 105, Fax: 2299-34-57-01-Ext. 201. E-mail: geval@itver.edu.mx

Recibido el 3 de septiembre del 2004; aceptado el 6 de diciembre del 2004

Dedicado a la memoria del Dr. Raymundo Cruz Almanza

Resumen. Para analizar la especificidad hacia el sustrato de la lipasa de *Candida antarctica* fracción B (CAL-B), se probó una serie de amino ésteres seleccionados con diferentes grupos protectores para la síntesis de las amidas *N*-protegidas, utilizando *n*-butilamina como nucleófilo y dioxano como disolvente. La lipasa estudiada mostró una mayor preferencia hacia los sustratos protegidos con benziloxycarbonylo. Un incremento en la temperatura de la reacción de 28 a 40 °C aumentó la aminólisis biocatalizada.

Palabras clave: Amino ésteres, aminólisis, lipasa, CAL-B, grupo protector.

Abstract. A series of model amino esters containing different protective groups were tested to study the substrate specificity of the lipase from *Candida antarctica* fraction B lipase (CAL-B) to perform the synthesis of *N*-protected amino ester amides using *n*-butylamine as the nucleophilic agent in dioxane as solvent. The lipase showed a major preference toward substrates protected with the benzylloxycarbonyl group. An increase of reaction temperature from 28 to 40 °C increased reaction rate and yield of biocatalysed aminolysis.

Key words: Amino esters, aminolysis, lipase, CAL-B, protective group.

Introducción

Hace algunas décadas, se pensaba que las enzimas solamente podían ser utilizadas en soluciones acuosas. Sin embargo, Dastoli y Price en 1966 [1], observaron por primera vez que algunas enzimas son activas en disolventes orgánicos. A principios de la década de los ochentas, Klivanov demostró que algunas hidrolasas pueden ser más activas y estables en disolventes no acuosos, y que en éstos pueden catalizar nuevos procesos químicos [2, 3].

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son hidrolasas que pueden catalizar diversas reacciones orgánicas y son adecuadas para la resolución cinética de alcoholes, ácidos carboxílicos y ésteres en agua como en disolventes orgánicos [4]. Por otro lado, la química de amidas involucra condiciones de reacción drásticas, que no son compatibles con compuestos funcionalizados, como aminoácidos, sus ésteres y compuestos relacionados. Por su parte, las lipasas pueden catalizar la condensación de ésteres simples y funcionalizados con aminas en disolventes orgánicos con buenos rendimientos y en condiciones suaves [5]. Asimismo, la lipasa de *Candida antarctica* fracción B es un biocatalizador eficaz por su amplia especificidad hacia el sustrato y la que mejores resultados ha dado en la resolución de ésteres quirales y aminas a través de reacciones de aminólisis y aminólisis con una alta regio-, quimio- y estereoselectividad [5, 6]. No obstante, que los aminoácidos y sus ésteres tienen una gran importancia en la síntesis de compuestos naturales y farmacéuticos en forma racémica como quiral, son pocos los trabajos que muestran el uso de CAL-B en reacciones de ami-

nálisis de amino ésteres protegidos en el grupo amino. En la literatura se ha descrito efecto del grupo protector en la aminólisis de ésteres del ácido glutámico y derivados de este mismo sustrato [7, 8, 9,], con CAL-B, por lo que se propuso probar una más amplia especificidad de esta lipasa por diferentes amino ésteres conteniendo distintos grupos protectores, en la aminólisis con *n*-butilamina en dioxano.

Resultados y discusión

El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad catalítica de CAL-B en la aminólisis de amino ésteres *N*-protegidos con *n*-butilamina en dioxano. Como sustratos se utilizaron los amino ésteres de glicina, *DL*-alanina, β -alanina, *DL*-fenilglicina y *DL*-fenilalanina *N*-protegidos con uno de los siguientes grupos: (a) formilo, (b) ftaloilo (c) acetilo y (d) benziloxycarbonylo, adquiridos comercialmente o preparados de acuerdo con los procedimientos descritos en la literatura [10-13]. Los grupos protectores se seleccionaron con base en su disponibilidad, uso, tamaño y polaridad.

1) Efecto del grupo protector en la especificidad de sustrato de la lipasa de *Candida antarctica* en la aminólisis de amino ésteres.

Las reacciones de aminólisis de los amino ésteres *N*-protegidos (1 a 20) se muestran en la figura 1, y los resultados aparecen en la tabla 1. Del análisis de la tabla puede verse, que los

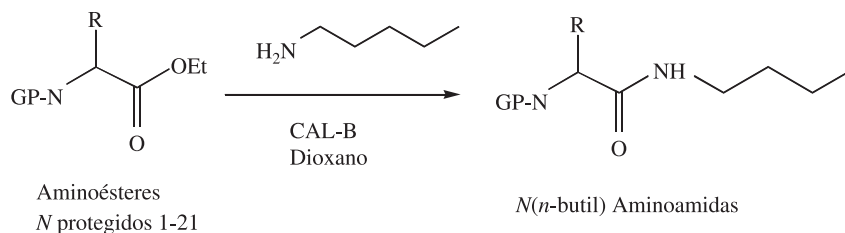


Fig. 1. Aminólisis de aminoésteres catalizada por CAL-B en dioxano.

Tabla 1. Aminólisis enzimática de amino ésteres utilizando diferentes grupos protectores en *N*.

No	Sustratos	Tiempo (h) ¹	R. Q. (%) ^{2,3}	No	Sustratos	tiempo (h) ¹	R. Q. (%) ^{2,3}
1		-	-	11		8	-
2		-	-	12		24	-
3		-	-	13		24	-
4		84	40%	14		192	-
5		84	20	15		168	-
6		84	11%	16		48	55
7		84	5%	17		504	72
8		84	5%	18		192	45
9		18	-	19		-	-
10		216	-	20		78	-

¹Tiempo en el que la reacción no enzimática empieza a ser apreciable por cromatografía en capa fina y/o cromatografía de gases-espectrometría de masas. ²Rendimiento químico. ³El producto se obtuvo a partir de la aminólisis enzimática de los sustratos (1 mmol) con *n*-butilamina (1.05 mmol) como nucleófilo, utilizando CAL-B (50 mg) en dioxano (2 mL) a 28 °C.

sustratos (1) a (3) protegidos con el grupo formilo, no dieron la aminólisis enzimática, posiblemente, debido a que éste es un grupo polar que presenta interacciones polares (como enlace de hidrógeno) con los sitios de naturaleza similar de la enzima (por ejemplo el mismo sitio activo); lo cual dificulta que realice su función catalítica [14]. Sin embargo, los sustratos (4) y (5), aunque contienen el grupo formilo, introducen un grupo fenilo y bencilo respectivamente, aumentando la hidrofobicidad de los mismos, pero disminuyendo las interacciones polares mencionadas, por lo que CAL-B cataliza la aminólisis de estos sustratos. Asimismo, con el aumento de la hidrofobicidad también aumenta el volumen molecular de los sustratos (4) y (5), introduciendo un efecto de interacción estérica sustrato-sitio activo de la enzima, que se refleja en los relativamente modestos porcentajes de conversión, así como en lo lento de la reacción [40% en (4) y 20 % en (5), respectivamente]. Similarmente, el efecto hidrofóbico y estérico mencionados también se observaron cuando se utilizó el grupo protector ftalimidoilo y, como puede notarse en los sustratos (6), (7) y (8), la aminólisis enzimática procedió muy lentamente y con bajos rendimientos de conversión, mientras que con los sustratos (9) y (10), altamente sustituidos en la posición α (ya que introducen un grupo fenilo y bencilo respectivamente), no hubo biotransformación.

En el mismo orden de ideas, se procedió a probar sustratos con grupos protectores acetilo (11-15) y benciloxicarbonilo [Cbz, (16-20)], ampliamente utilizados en la química de aminoácidos y sus derivados.

En el caso del grupo protector acetilo, solo se observa el proceso de aminólisis no enzimática con los amino ésteres alifáticos: glicina (11), β -alanina (12), *DL*-alanina (13) en 8, 24 y 24 h respectivamente, sin apreciarse el proceso de bioconversión. En el mismo orden de ideas, con el mismo grupo protector, los amino ésteres aromáticos (14 y 15) dan lugar a la aminólisis no enzimática mas lentamente (en 192 y 168 h respectivamente), sin apreciarse el proceso catalizado por la enzima; en ambos casos posiblemente se deba al aumento de volumen estérico alrededor del grupo acilo, debido a la introducción de un grupo fenilo y bencilo respectivamente.

Los amino ésteres alifáticos protegidos con el grupo Cbz [sustratos (16-18)] dan la aminólisis enzimática con rendimientos moderados antes de apreciarse el proceso no biocatalizado. El rendimiento de la aminólisis catalizada por CAL-B sobre (16-18), depende del sustrato: para el éster de glicina (16) fue de 55% en solo 48 h (apreciándose la aminólisis no catalizada en ese tiempo). No obstante, el derivado de β -alanina (17) mostró una reactividad más lenta, fue el mejor sustrato para la enzima (72% de conversión en 504 h). Finalmente, en el caso del éster de *DL*-alanina (18) más impedido estéricamente (por el grupo metilo en la posición α al éster), da la aminólisis enzimática en 45% a las 192 h, tiempo en el cual el proceso no biocatalizado empieza a apreciarse.

Asimismo, el aumento de volumen estérico en los sustratos (19 y 20) que contienen un sustituyente fenilo y bencilo en posición α , da como resultado que no sean biotransformados por CAL-B, lo cual puede atribuirse al aumento en las interac-

ciones estéricas de dichos sustituyentes alrededor del grupo acilo y el volumen crítico del sitio activo de la enzima. La influencia de factores estéricos en el sustrato acilante, aparentemente similares a los mencionados arriba se encuentran documentados en la literatura [8, 15].

2) Efecto del grupo protector en la especificidad de sustrato de la lipasa de *Candida antarctica* en la aminólisis de ésteres de β -alanina

En la Tabla 2, se compara el efecto de tres diferentes grupos protectores en la aminólisis enzimática de β -alanina con CAL-B y *n*-butilamina en dioxano. De acuerdo con los resultados, CAL-B acepta como sustratos a los amino ésteres protegidos con los grupos: acetilo (13), Cbz (17 y 21) y *t*-butoxicarbonilo (22). Cuando el grupo protector es acetilo, empieza a observarse la aminólisis no enzimática en 24 h, y el mismo proceso no biocatalizado es del 15% de conversión a las 216 h. De acuerdo con la tabla 2, los mejores sustratos de CAL-B fueron los ésteres etílico y *n*-propílico de β -alanina (17 y 18) con los cuales se obtuvieron los mejores porcentajes de conversión (72 y 74% respectivamente), concluyéndose que la naturaleza del alcoxi (etiloxi o *n*-propiloxi) no tiene influencia en la selectividad de la enzima por β -alanina N-Cbz.

Para el caso del grupo protector *t*-butoxicarbonilo el sustrato (22), mostró solo reacción enzimática con un bajo porcentaje de conversión (33%), probablemente por el volumen estérico introducido por el grupo *t*-Boc, que influyó en el acceso del sustrato al sitio activo de la lipasa; por lo cual podemos inferir que el grupo protector en el reactivo acilante (β -alanina en éste caso) debe ser no muy largo como el grupo ftalimidoilo, ni debe ser ramificado como el grupo *t*-butoxi carbonilo: el grupo benciloxicarbonilo cumple con esta condición por lo que resulta el mejor grupo protector para llevar a

Tabla 2. Aminólisis enzimática de éster etílico de β -alanina utilizando diferentes grupos protectores en *N*.

No	Sustratos	Tiempo de reacción (h) ¹	R. Q. (%) ^{2,3}
13		216	15
17		288	72
21		288	74
22		288	33

¹Tiempo en el que la reacción no enzimática empieza a ser apreciable por cromatografía en capa fina y/o cromatografía de gases-espectrometría de masas. ²Rendimiento químico. ³El producto se obtuvo a partir de la aminólisis enzimática de los sustratos (1 mmol) con *n*-butilamina (1.05 mmol), CAL-B (50 mg) dioxano (2 mL) a 28 °C.

cabo los procesos de aminólisis catalizados por la CAL-B mencionados. Similarmente, Conde menciona [14], que los volúmenes de los grupos protectores (*t*-Boc, de 92.79 \AA^3 , y Cbz de 109.82 \AA^3), no necesariamente están relacionados con la interacción estérica que ejercen en las reacciones de aminólisis de ésteres del ácido glutámico con CAL como catalizador. El grupo Cbz es un grupo más bien largo y por esto exhibe un mayor volumen que el *t*-Boc, pero ofrece menores interacciones estéricas que éste grupo, que aunque más pequeño, es más ramificado y susceptible a dichas interacciones. Es conocido que CAL-B muestra una hendidura no muy ancha, más bien alargada en el sitio enlazante donador de acilo y parece ser determinante en las interacciones enlazantes entre el grupo acilante del sustrato y la enzima, tanto para su especificidad como en la estereoselectividad del proceso que cataliza [16]. Similares resultados debidos a constricciones estéricas y geométricas han sido informados en la literatura para otras enzimas y sustratos [7,8,13,17].

Sánchez *et al.* reportan, la reacción de aminólisis análoga de *N*-Cbz-3-amino butirato de etilo (23), catalizada por CAL en tolueno (Fig. 2) [18]. La conversión química para este sustrato fue de 47% en 13 h, reportado como el mejor resultado; cuando se utilizó dioxano como disolvente los rendimientos fueron más bajos aún (no se indican [18]), debido posiblemente a la obtención del producto de la hidrólisis del éster (23). De acuerdo con esto y como puede apreciarse de los resultados obtenidos en este trabajo, la baja conversión obtenida de las reacciones de aminólisis de los distintos amino ésteres protegidos puede ser debida además de los efectos estéricos mencionados, a la proporción de agua que se encuentra asociada a la enzima y al disolvente dioxano hidrofílico, permitiendo la reacción competitiva de hidrólisis, a pesar del uso de mallas moleculares en los procedimientos experimentales para minimizar la reacción hidrolítica. Por otro lado, el átomo de oxígeno del carbamato juega un papel importante en las interacciones enzima-sustrato y debería producir un efecto positivo en la velocidad de reacción respecto de otros grupos protectores [7].

3) Efecto del aumento de la temperatura de 28 a 40 °C en la aminólisis enzimática de aminoésteres *N*-protegidos

Los aminoésteres protegidos con el grupo Cbz que dieron los mejores porcentajes de conversión enzimática en los experi-

mentos previos: ésteres etílicos de glicina (16), de β -alanina (17) y de *DL*-alanina (18), se sometieron a la aminólisis enzimática utilizando CAL-B y *n*-butilamina en dioxano como disolvente, a 40 °C. Se seleccionó esta temperatura para evitar la reacción de aminólisis química, ó no enzimática. En el caso del sustrato (16), la conversión enzimática se aumentó del 55% (28 °C) en 48 h, a 84% a las 24 h (40 °C), tiempo en el que ya se presenta el proceso no enzimático. En el caso del sustrato (17), derivado de β -Alanina se mejora la conversión enzimática del 72% (28 °C) a 86% (40 °C), acortándose el proceso de 504 a 49 h por efecto de aumentar en 12 °C la temperatura del proceso. En el caso del éster etílico de *DL*-alanina (18), la conversión enzimática del 45% a (28 °C) en 192 h, se aumentó a 60% (40 °C) en el mismo tiempo. En relación con el efecto de la temperatura sobre las reacciones de aminólisis y aminólisis mediante catálisis enzimática, los pocos trabajos reportados se encuentran dirigidas a incrementar la enantioselectividad de los procesos biocatalizados, en tanto que el enfoque del presente ha sido el de aumentar la conversión y reducir el tiempo de los bioprocesos [19, 20].

Conclusiones

Los resultados de este estudio de especificidad de CAL-B muestran que en las condiciones probadas, los sustratos protegidos con un grupo protector voluminoso como ftaloilo, no son sustratos adecuados para CAL-B. Con el grupo formilo polar, se observa que la enzima puede aceptar sustratos aromáticos fenilalanina y fenilglicina, pero no cataliza la aminólisis de los alifáticos: glicina, *DL*-alanina y β -alanina. Los sustratos protegidos con el grupo acetilo producen el proceso de aminólisis no biocatalizado con los amino ésteres alifáticos, mientras que los amino ésteres aromáticos protegidos con acetilo y Cbz no son sustratos para CAL-B. Son sustratos para la lipasa, *D,L*-alanina, glicina y β -alanina protegidos con Cbz y β -alanina con *t*-Boc, siendo este sustrato más favorablemente aceptado por la enzima. Finalmente, la aminólisis de los amino ésteres alifáticos se incrementó al aumentar la temperatura de la reacción catalizada por CAL-B de 28 °C a 40 °C. Un estudio más completo, deberá considerar la influencia del disolvente orgánico en el proceso de aminólisis biocatalizado de los sustratos arriba mencionados.

Parte experimental

La lipasa de *Candida antarctica* fracción B (CAL-B, Novozyme SP-435, 7,000 unidades de laureato de propilo), se obtuvo de Novo Nordisk (ciudad de México). La muestra a utilizar se almacenó bajo atmósfera de nitrógeno a 10 °C o menos. Todos los sustratos, disolventes y reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich. El dioxano se destiló de mallas moleculares de 4 \AA y se almacenó en un recipiente con mallas moleculares de 4 \AA previo a su uso. Las reacciones se siguieron mediante cromatografía en placa fina o cromatografía de

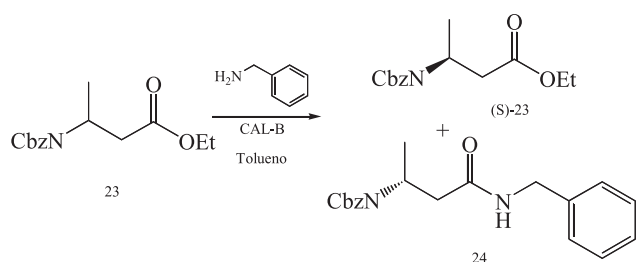


Fig. 2. Aminólisis de *N*-Cbz-3-aminobutirato de etilo con benzilamina catalizada por CAL en tolueno [17].

gases-espectrometría de masas. Para cromatografía en placa fina se utilizaron placas de aluminio recubiertas de silicagel 60 F₂₅₄ de Merck y para cromatografía en columna se utilizó silicagel 60/230-400 mallas de Merck. Los espectros de infrarrojo se realizaron en un FT-IR Paragón 500 de Perkin-elmer, adaptado con dispositivo HATR y placa de ZnSe. Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se realizaron en un equipo Varian de 300 MHz. Los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm respecto al TMS, usado como la referencia interna y como disolvente CDCl₃. Los espectros de masas se realizaron en un equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de Shimadzu GC-MS 5050, de 70 eV y un analizador cuadrupolar. La columna capilar utilizada fue Supelcowax 10, de 30 m de largo × 0.32 mm de diámetro interno.

Procedimiento general para la aminólisis enzimática de los aminoésteres 1-22

Para la preparación de las amidas de los aminoácidos 1-22, a un vial con la enzima (50 mg) y cada uno de los aminoésteres *N*-protegidos (1 mmol) se secaron al vacío y a través de un septum de hule sintético se adaptó un globo con N₂ de alta pureza, y mediante una microjeringa de silicato se adicionó 4 mL de dioxano. A la mezcla anterior se adicionó con microjeringa la *n*-butilamina (1.05 mmol). La mezcla de reacción se incubó a 30 °C con agitación orbital. El curso de la reacción se siguió, hasta el consumo completo del sustrato o la aparición incipiente del producto del proceso no biocatalizado, mediante CCF y/o CG-EM. Al cabo de la bioconversión, la mezcla de reacción se filtró y se lavó con porciones de diclorometano (3 × 10 mL). El filtrado se concentró en rotavapor y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna, utilizando como eluyente mezclas de hexano-acetato de etilo (desde 8:2, hasta 50:50) para obtener las amino amidas correspondientes. La determinación estructural de los productos se realizó mediante las técnicas espectroscópicas de FT-IR, RMN de ¹H y ¹³C y espectrometría de masas.

Agradecimientos

A la Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA) de la Universidad Veracruzana por la determinación de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C. Al COSNET por la asignación económica a los proyectos PROY-541.01 y P PROY-541.01 PR.

Referencias

1. Dastoli, F. R.; Musto, N. A.; Price, S. *Arch. Biochem. Biophys.* **1966**, *115*, 44-47; *ibid.* **1967**, *122*, 289-291.
2. Klibanov, A. M. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 114-120.
3. Zaks, A.; Klibanov, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1985**, *82*, 3192-3196.
4. Haraldsson, G.G. Patai S (ed) *The Chemistry of Functional Groups*, supplement B: *The Chemistry of Acid Derivatives*, Vol 2. Wiley, New York. **1992**, 1395-1473.
5. Gotor, V. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189-2197.
6. Gotor, V. *Org. Proc. Res. Dev.* **2002**, *6*, 420-426.
7. Conde, S.; López-Serrano, P.; Martínez, A. *Biotech. Lett.* **1998**, *20*, 261-263.
8. Conde, S.; López-Serrano, P.; Castro, A.; Martínez, A. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2835-2839.
9. Conde, S.; López-Serrano, P.; Martínez, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2537-2545.
10. Vogel, A. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 4th ed., Longman Group UK Limited, London **1989**, p 1281.
11. Laurent, P.; Hennig, L.; Burger, K.; Hiller, W.; Newmayer, M. *Synthesis* **1998**, 905-909.
12. Therisod, M.; Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5638-5640.
13. Quirós, M.; Astorga, C.; Rebolledo, F.; Gotor, V. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 7715-7720.
14. Conde, S.; López-Serrano, P.; Fierros, M.; Biezma, M. I.; Martínez, A.; Rodríguez-Franco M.I. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 11745-11752.
15. Rotticci, D.; Orrenius, C.; Hult, K.; Norin, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 359-362.
16. Bornscheuer, U.T.; Kazlauskas, R.J. *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*. Wiley-VCH, Weinheim, **1999**, p 1079.
17. Starman, W. A. J.; Doppen, R. G.; Thijs, L.; Zwanenburg, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 429-435.
18. Sánchez, V.; Rebolledo, F.; Gotor, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 37-40.
19. Wegman, M.A.; Hacking, M.A.P.J.; Rops, J.; Pereira, P.; van Rantwijk; Sheldon, R.A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1739-1750.
20. López-Serrano, P.; Wegman, M.A.; van Rantwijk, F.; Sheldon R.A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 235-240.