



UNR Universidad
Nacional de Rosario

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

TESIS DE DOCTORADO

***“BIOMASA COMO FUENTE DE NUEVOS COMPUESTOS
QUIRALES PARA UN DESARROLLO SUSTENTABLE”***

*Presentada por **Germán Francisco Giri***

ROSARIO-ARGENTINA

2015

***“BIOMASA COMO FUENTE DE NUEVOS COMPUESTOS
QUIRALES PARA UN DESARROLLO SUSTENTABLE”***

Germán Francisco Giri

Lic. En Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la División Química Orgánica perteneciente al Instituto de Química Rosario (IQUIR)-CONICET, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 4 de Junio del 2010 y el 20 de febrero del 2015, bajo la dirección del Dr. Rolando A. Spanevello.

Director: Rolando A. Spanevello

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por haber confiado en mí y seguir apoyándome hasta hoy.

Al Dr. Rolando A. Spanevello por hacer mi tesis en su laboratorio.

A la Dra. Alejandra G. Suárez por su interés en el trabajo y su colaboración en la realización de la presente tesis.

Al Instituto de Química Rosario (IQUIR).

Al Dr. Ricardo L. E. Furlán por haberme aceptado en su laboratorio para realizar los ensayos de esta tesis y por su colaboración con el trabajo.

A los Doctores Ayelén Ramallo y Mario Salazar por haber colaborado en los estudios realizados y haberme ayudado a resolver los problemas que surgieron. A Carlos y a Paulita por su compañerismo.

A la Dra. Eleonora García Véscovi del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR) y a su grupo de investigación, en especial al Dr. Gastón Viarengo, por su buena predisposición para que pueda hacer uso de su laboratorio y llevar a cabo los experimentos con *Salmonella*.

A la Dra. María Inés Mangione por ayudarme en el trabajo diario y haber aprendido de su conocimiento. Por su gran amistad.

A Pablo Duché y Sergio Tindiglia por su inmensa colaboración en la realización de los estudios de RMN y su muy buena predisposición en la elucidación de algunos compuestos. A Pablo además por los muy buenos momentos que hemos pasado y los litros de mate y cerveza compartidos.

Al Dr. Ariel Sarotti por la realización de los cálculos computacionales de la presente tesis.

Al Dr. Raúl Marinelli y al Lic. Mauro Danielli del Instituto de Fisiología Experimental (IFISE) por la colaboración con los ensayos de citotoxicidad.

A Guillermo Marcuzzi por la realización de los espectros de CG-EM.

A Gustavo Millán por la realización de los espectros de EMAR.

A mis compañeros de trabajo Celeste, David, Valeria por haber aprendido junto con ellos todos los días.

Al resto de los compañeros de planta alta por su colaboración siempre que lo he necesitado.

A la ANPCyT y a CONICET por haber financiado mis estudios.

A la Universidad Nacional de Rosario y a la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.

Por último, quiero agradecer a los contribuyentes que con su valioso aporte me han posibilitado continuar esta apasionante carrera.

ÍNDICE

RESUMEN	viii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	ix
ÍNDICE DE FÓRMULAS	xiii

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Desarrollo Sostenible y Química Verde	1
1.2. La biomasa	3
1.3. Los compuestos quirales	4
1.3.1. Importancia y aplicaciones de los compuestos quirales	4
1.3.2. Obtención de compuestos enantioméricamente puros	6
1.3.2.1. Resolución de mezclas racémicas	7
1.4. Amplificación quiral	8
1.5. Síntesis asimétrica	9
1.6. Biomasa como fuente de quiralidad	12
1.7. Celulosa como fuente de quiralidad	13
1.8. Obtención de levoglucosenona	14
1.9. Aplicaciones de levoglucosenona	17
1.9.1. Empleo de levoglucosenona en la resolución de mezclas racémicas	18
1.9.2. Empleo de levoglucosenona en amplificación quiral	18
1.9.3. Empleo de levoglucosenona en síntesis asimétrica: catalizadores quirales	20
1.9.4. Empleo de levoglucosenona en síntesis asimétrica: auxiliares quirales	21
1.10. Biomasa como fuente de compuestos bioactivos	23
1.11. Productos naturales <i>versus</i> compuestos de síntesis	24
1.11.1. Aprovechamiento de la diversidad química de los productos naturales	25
1.11.2. Pirólisis de biomasa y obtención de compuestos bioactivos	25
1.12. Ensayos biológicos apropiados	26
1.12.1. Métodos autográficos que emplean enzimas	28

1.12.1.1.	Detección de inhibidores de β -glucosidasa	28
1.12.1.2.	Detección de inhibidores de acetilcolinesterasa	29
1.12.1.3.	Detección de inhibidores de xantina oxidasa	31
1.12.2.	Métodos autográficos que emplean agentes químicos	33
1.12.2.1.	Detección de antioxidantes captadores de superóxido	33
1.12.2.2.	Detección de compuestos antioxidantes captadores de DPPH	34
1.12.3.	Métodos autográficos que emplean células enteras	35
1.12.3.1.	Detección de represores del sistema regulador de la virulencia de <i>Salmonella enterica</i> PhoP/PhoQ	35

CAPÍTULO II: OBJETIVOS Y PLANEAMIENTO DEL TRABAJO	38	
2.1.	Objetivos generales	38
2.2.	Objetivos específicos	38
2.3.	Planeamiento del trabajo	39

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	40	
3.1.	Condiciones generales	40
3.2.	Equipamiento y datos físicos	40
3.3.	Cromatografías	42
3.4.	Reactivos, gases y solventes	42
3.5.	Cálculos computacionales	43
3.6.	Obtención de levoglucosenona (1,6-anhidro-3,4-dideoxi- β -D-glicero-hex-3-enopiranos-2-ulososa)	43
3.6.1.	Tratamiento ácido de celulosa microcristalina	43
3.6.2.	Pirólisis de la celulosa tratada	43
3.7.	Síntesis de 3 y aductos de Diels-Alder de 1 y 3 con diferentes dienos	44
3.8.	Tratamiento ácido de cáscara y harina de soja	53
3.9.	Pirólisis de biomasa	53
3.10.	Extracciones con solventes de cáscara y harina de soja	54
3.11.	Experimentos de RMN ^1H	54
3.12.	Ensayo de inhibición de β -glucosidasa	54

3.13.	Ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa	55
3.13.1.	Método de Hostettmann	55
3.13.2.	Variante de Li del método de Hostettmann	56
3.13.3.	Método de Verpoorte	56
3.14.	Ensayo de inhibición de xantina oxidasa (XO)	56
3.15.	Ensayo de captación de superóxido empleando riboflavina	57
3.16.	Ensayo de captación de DPPH	58
3.16.1.	Ensayo autográfico	58
3.16.2.	Ensayo de cuantificación	59
3.17.	Ensayos de inhibición del sistema PhoP/PhoQ en <i>Salmonella</i>	60
3.17.1.	Cepas bacterianas empleadas en los distintos ensayos	60
3.17.2.	Ensayo autográfico	60
3.17.3.	Ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano	60
3.17.4.	Ensayos de actividad β -galactosidasa	61
3.18.	Síntesis de derivados de levoglucosenona para ensayos de sobre <i>Salmonella</i> Thyphimurium	62
3.19.	Ensayos de citotoxicidad	71
3.20.	Microscopía	72
3.21.	Análisis <i>in silico</i> de las proteínas del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ	72

CAPÍTULO IV: EMPLEO DE LEVOGLUCOSENONA EN SÍNTESIS ASIMÉTRICA 73

4.1.	Obtención de levoglucosenona	73
4.2.	Obtención de auxiliares quirales derivados de 4-cianolevoglucosenona	74
4.2.1.	Intentos de optimización del rendimiento en la obtención de 3	86
4.2.2.	Posible explicación del bajo rendimiento en la obtención de 3	87

CAPÍTULO V: PIRÓLISIS DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES 91

5.1.	Análisis Termogravimétrico	92
5.2.	Reacción de pirólisis: efecto del ácido y la temperatura sobre el rendimiento del crudo	93

5.3.	Efecto de las condiciones de pirólisis sobre la composición del crudo de reacción	96
5.4.	Evidencia de la obtención de levoglucosenona en bioaceites de cáscara de soja	99

CAPÍTULO VI: BÚSQUEDA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN BIOACEITES DE CÁSCARA Y HARINA DE SOJA

2

6.1.	Detección de inhibidores de β -glucosidasa	103
6.2.	Detección de inhibidores de acetilcolinesterasa	106
6.3.	Detección de inhibidores de xantina oxidasa	109
6.4.	Detección de antioxidantes captadores de superóxido	109
6.5.	Detección de compuestos antioxidantes captadores de DPPH	110
6.5.1.	Cuantificación de la actividad antioxidante	112
6.6.	Detección de inhibidores del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ de <i>Salmonella</i> Typhimurium	114
6.6.1.	Ensayo autográfico para detectar compuestos inhibidores de PhoP/PhoQ en bioaceites de cáscara y harina de soja	115
6.6.2.	Aislamiento e identificación del compuesto activo	116
6.6.3.	Caracterización del efecto de 1	119
6.6.3.1.	Efecto de 1 sobre el crecimiento bacteriano	119
6.6.3.2.	Efecto de 1 sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ de <i>Salmonella</i> Typhimurium	121
6.6.4.	Síntesis de derivados de 1 y evaluación de su actividad	123
6.6.4.1.	Efecto de los derivados sobre el crecimiento bacteriano	125
6.6.4.2.	Efecto de los derivados sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ de <i>Salmonella</i> Typhimurium	126
6.6.4.3.	Estudio de la actividad del derivado bromado 2	127
6.6.5.	Síntesis de derivados de 1 por adición de tioles al carbono 4	129
6.6.6.	Evaluación de la actividad biológica de los tioderivados sintetizados	145

6.6.7. Ensayos de citotoxicidad	147
6.6.8. Análisis de los resultados obtenidos	151

CAPÍTULO	VII:	CONCLUSIONES
3		15

CAPÍTULO	VIII:	REFERENCIAS
7		15

RESUMEN

En este trabajo de tesis se empleó levoglucosenona para sintetizar un dienófilo que resultó muy importante en reacciones de Diels-Alder. Los tiempos de reacción empleando este compuesto disminuyeron cuando se lo comparó con levoglucosenona. También se observó una modificación importante en las regioselectividades.

En otra etapa del trabajo se empleó la pirólisis de cáscara y harina de soja con el objetivo de generar diversidad estructural y buscar compuestos bioactivos en los bioaceites provenientes de estos tratamientos. En primer lugar se estudió el comportamiento pirolítico de estas materias primas, posteriormente se encontró que los bioaceites de cáscara de soja mostraron una interesante actividad antioxidante. Finalmente se halló que ciertos bioaceites de cáscara de soja mostraron un efecto antibacteriano sobre el patógeno *Salmonella* Typhimurium. La aplicación de fraccionamiento bioguiado permitió aislar a levoglucosenona como el compuesto responsable de la actividad.

Mediante amplificación quiral se obtuvieron derivados que mejoraron las actividades observadas y permitieron racionalizar que características presentes en la molécula son esenciales en desarrollar el efecto detectado. Los compuestos mostraron un efecto citotóxico importante, comparable a compuestos empleados en terapia de cáncer.

Estos resultados permiten incrementar el potencial sintético de levoglucosenona hacia la síntesis de compuestos novedosos con actividades biológicas interesantes.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abs	absorbancia
AchE	acetilcolinesterasa
AcOEt	acetato de etilo
AcONa	acetato de sodio
AcOH	ácido acético
Anh.	anhidro/a
Arom	aromático/s
ATG	análisis termogravimétrico
BB	<i>broad band</i>
BSA	albúmina sérica bovina
c	concentración
CCD	cromatografía en capa delgada
CG-EM	cromatografía de gases/espectrometría de masas
CHO	<i>Chinese Hamster Ovarian Cells</i>
CIM	concentración inhibitoria mínima
cm	centímetro/s
cm ⁻¹	unidad de número de onda de IR
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d	doblete
DAPI	<i>4',6-diaminidino-2-phenylindole</i>
dd	doble doblete
ddd	doble doblete de doblete
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DO	densidad óptica
DOXO	doxorrubicina
DPPH	<i>2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl free radical</i>

DTNB.....	<i>5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)</i>
EC	<i>Effective concentration</i>
EDTA.....	etilendiamino tetraacetato
EMAR	espectrometría de masa de alta resolución
ENO/NOE	Efecto Nuclear Overhauser
eq.	equivalente/s
eV	electrón voltios
g	gramo/s
gem	geminal
h	hora/s
HSQC-Ed.....	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Edited</i>
Hz	hercio/s
IR	infrarrojo
J	constante de acoplamiento (Hz)
Kcal/mol.....	kilocalorías por mol
L	litro/s
Lit.....	literatura
m	multiplete
MEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
mg	miligramo/s
min.....	minuto/s
mL	mililitro/s
mM	milimolar
mmol.....	milimol/es
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>
N.....	normal (eq. g de soluto/ L de solución)
nm	nanómetro
ON	<i>overnight</i>
ONPG.....	<i>orto-nitrofenilgalactopiranosido</i>

P.f..... punto de fusión
ppm partes por millón
q quinteto
Rend..... rendimiento
Rf..... relación/relaciones de frente
RMN ¹³C Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13
RMN ¹H Resonancia Magnética Nuclear de protones
s singlete
sa..... singlete ancho
sext..... sexteto
SV..... solvente
T temperatura
t triplete
TA..... temperatura ambiente
TC..... transferencia de carga
TEMED..... tetrametiletilendiamina
THF tetrahidrofurano
TMS grupo trimetilsililo
U..... unidades
UV ultravioleta
W..... watt
WT..... *wild type*
XO xantina oxidasa
°C grados centígrados
+, - dextrorrotatorio, levorrotatorio
δ desplazamiento químico
ΔE..... diferencia de energía
μg microgramo/s

μL microlitro/s

μM micromolar

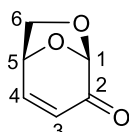
ν frecuencia

ν_{max} frecuencia máxima (IR)

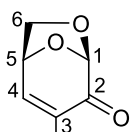
ω índice de electrofilia global

ω_k índice de electrofilia local

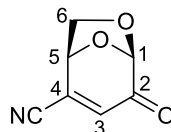
ÍNDICE DE FÓRMULAS



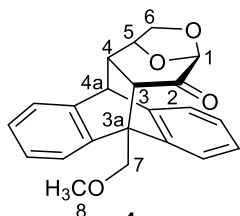
1



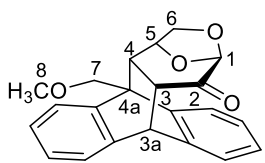
2



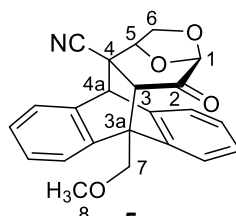
3



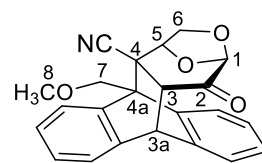
4a



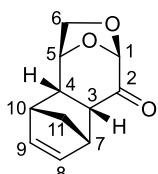
4b



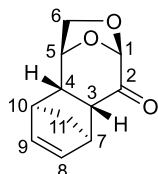
5a



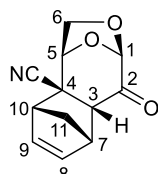
5b



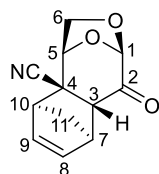
6a



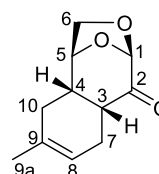
6b



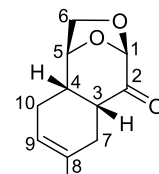
7a



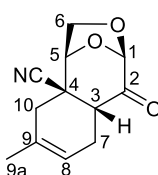
7b



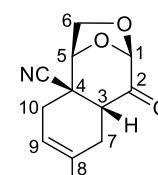
8a



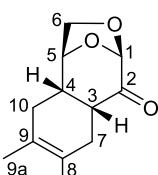
8b



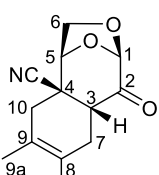
9a



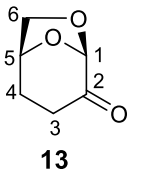
9b



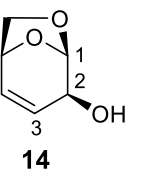
10



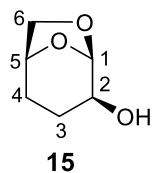
11



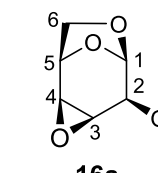
13



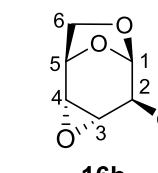
14



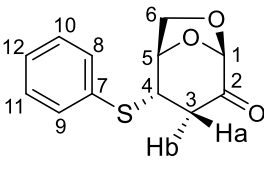
15



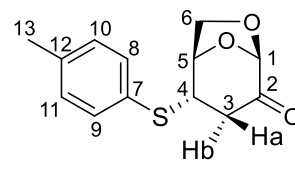
16a



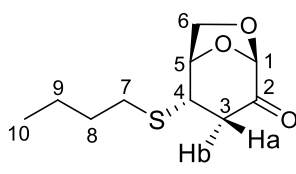
16b



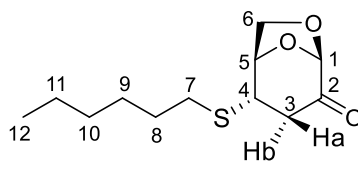
18



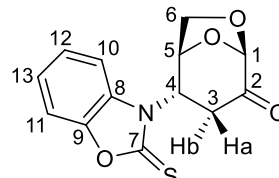
19



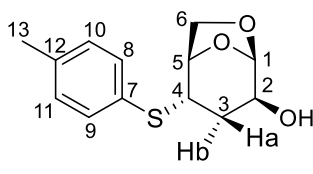
20



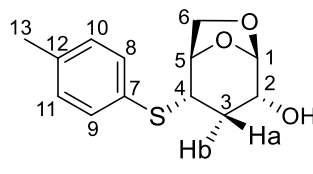
21



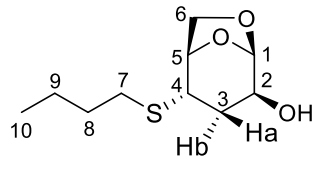
22-N



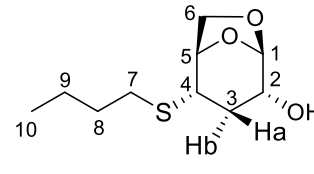
23a



23b



24a



24b

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Desarrollo Sostenible y Química Verde

"Los químicos tienen como responsabilidad profesional servir al interés público, al bienestar y al avance del conocimiento científico, preocuparse de la salud y el bienestar de sus compañeros, consumidores y la comunidad, comprender y anticiparse a las consecuencias medioambientales de su trabajo, evitar la polución y proteger el medioambiente". Estas premisas forman parte del Código de Conducta Profesional de Química de la Sociedad de Química Americana.¹ Bajo estos principios la química, como ciencia fundamental y como base científica para una variedad de tecnologías de diferentes ramas de la industria, está profundamente ligada al progreso de la civilización moderna, con un enorme potencial para contribuir positivamente al bienestar mundial y favorecer un desarrollo sostenible.

El término *desarrollo sostenible* o *sustentable* fue formalizado por primera vez en 1987 en el informe presentado por la Comisión Mundial sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo,² en donde fue definido como aquel que "satisface las necesidades de las generaciones presentes sin comprometer las posibilidades de las futuras generaciones para satisfacer sus propias necesidades". En otras palabras, un desarrollo que permita el crecimiento económico y el uso de los recursos naturales a nivel mundial sin menoscabar los aspectos medioambientales y sociales globales, para que en el largo plazo no se comprometa ni se degrade la vida en el planeta, ni la calidad de vida de la especie humana. En este contexto es que comienzan a emerger a nivel mundial, no sólo políticas o programas para promover el desarrollo sostenible,³ sino que además distintas áreas de las ciencias empiezan a incorporar las ideas de sostenibilidad, y un ejemplo de ello lo constituye lo que se ha dado en llamar Química Verde o Sustentable.

El término *Química Verde* fue acuñado por el químico estadounidense Paul Anastas a principio de los años 90.⁴ Desde su concepción y definitivo impulso, la Química Verde ha crecido a nivel internacional como un enfoque especial dentro de la Química, la cual tiene como objetivos el diseño, desarrollo, manufactura e implementación de productos y procesos que reduzcan o eliminen el uso y generación de sustancias peligrosas para la salud humana o el medio ambiente. De este modo

intenta prevenir o reducir la contaminación desde su origen, tanto a escala industrial como en los laboratorios de investigación o de carácter docente. Esto supone un paso más allá de lo que sería el correcto tratamiento de los residuos, ya que busca evitar la formación de desechos contaminantes y propiciar la economía de tiempos y recursos. Estos conceptos fueron reflejados a través de la formulación de doce principios, los cuales pueden ser enunciados de la siguiente manera:⁴

1. Prevenir o minimizar la generación de desechos, en lugar de tratarlos después de que se hayan generado.
2. Maximizar la economía de átomo de las reacciones y procesos químicos; es decir, incorporar la mayoría de los átomos de los reactivos y sustratos en el producto final.
3. Diseñar metodologías sintéticas que utilicen reactivos y generen sustancias con baja o nula toxicidad para la salud y el medio ambiente.
4. Generar productos y/o residuos químicos más seguros.
5. Reducir el uso de sustancias auxiliares (solventes, procesos cromatográficos, etc.) en reacciones y procesos químicos, y/o elegir cuando sea posible las más inocuas.
6. Disminuir el consumo de energía en las transformaciones y procesos químicos. Idealmente, las reacciones deben efectuarse a temperatura y presión ambientales.
7. Utilizar materias primas renovables, cuando sea factible.
8. Evitar la derivatización química innecesaria (formación de grupos protectores, etc.)
9. Preferir el uso de catalizadores sobre el empleo de reactivos estequiométricos.
10. Diseñar procesos químicos que generen productos biodegradables al final de su vida útil.
11. Desarrollar metodologías analíticas que permitan el monitoreo en tiempo real durante el proceso químico y el control previo a la formación de sustancias peligrosas.
12. Las sustancias y los procesos químicos deben ser elegidos de manera que sea mínimo el riesgo de accidentes.

Esta nueva visión de la química contrasta con el enfoque que se le ha venido dando a la petroquímica, la cual estuvo basada en la transformación de fuentes de carbono no renovables, como el petróleo o el gas natural, para la obtención de productos químicos, combustibles y materiales.

En virtud del potencial agotamiento de las fuentes fósiles, en este nuevo siglo resulta indispensable un cambio gradual en la utilización de fuentes de energía y materias primas derivadas del petróleo por aquellas obtenidas a partir de recursos renovables. En este contexto, si bien existen distintas fuentes de energía renovables

(eólica, solar, biocombustibles), para la obtención de compuestos químicos la única y abundante fuente renovable de carbono la constituye la biomasa.⁵

1.2. La biomasa

La biomasa es un recurso renovable que ha sido ampliamente utilizado como materia prima para el desarrollo de productos y procesos más amigables con el medio ambiente.⁵⁻⁷ Este término es utilizado para describir a toda materia que ha sido producida por sistemas biológicos, como son las estructuras celulares de plantas y animales, o los compuestos generados por éstos.⁸ La producción de combustibles y productos químicos a partir de biomasa no es un concepto nuevo ya que desde tiempos antiguos ha sido utilizada para fabricar pinturas, adhesivos, telas y solventes. Sin embargo, la búsqueda de nuevos métodos prácticos para obtener productos económicamente útiles a partir de este recurso constituye un desafío constante.⁵⁻⁷ De acuerdo a la situación mundial actual, tres factores son los principales responsables del renovado interés en biomasa: económicos, ambientales y políticos.

Los factores económicos son los de mayor gravitación, ya que con el desarrollo de nuevos procesos y tecnologías, actualmente muchos de los productos generados a partir de biomasa pueden competir ventajosamente con aquellos derivados de la petroquímica.

Segundo, los combustibles obtenidos de biomasa tienen menor impacto en el medio ambiente que los combustibles fósiles como carbón y petróleo, sumado al hecho de que la biomasa es un recurso renovable.

Tercero, desde el punto de vista político todo país desea tener un buen control de sus fuentes de energía e insumos básicos para su funcionamiento. Esto no siempre es posible de lograr con las materias primas provenientes de yacimientos fósiles ya que depende en gran medida de la ubicación geográfica de estos últimos. Sin embargo, es factible implementar políticas activas de producción de materias primas a partir de fuentes renovables.

Es de esperar que estos factores estén íntimamente relacionados: la aplicación de una nueva tecnología ecológicamente más benigna para cualquier proceso productivo no logrará imponerse en el mercado si no es económicamente rentable, de la misma manera cualquier nuevo proceso que no tenga en cuenta las pautas ambientales, no podrá prosperar por mucho tiempo.

En la actualidad se están realizando esfuerzos considerables en el área del aprovechamiento sustentable de biomasa, aunque en la mayoría de los casos la investigación se ha centrado en la producción de combustibles más que en la obtención de productos químicos. No obstante, esta conversión sería económicamente

más atractiva si en el proceso de transformación de biomasa se generaran además productos químicos de alto valor agregado.

1.3. Los compuestos quirales

En 1874, Jacobus E. van't Hoff y Joseph A. Le Bel postularon en forma independiente el arreglo tetraédrico de grupos alrededor de un átomo de carbono central. A partir de ese trabajo pionero, el área de la estereoquímica se convirtió en uno de los principales campos de investigación en química orgánica.⁹ Los estereoisómeros son compuestos que tienen la misma fórmula molecular y las mismas conexiones entre sus átomos, pero difieren en la orientación espacial de los mismos. Una propiedad que caracteriza a este tipo de compuestos es la quiralidad, la cual se manifiesta cuando una molécula no es superponible con su imagen especular. Los isómeros que son imágenes especulares recíprocas no superponibles se denominan enantiómeros, y una mezcla equimolar de ambos enantiómeros de un compuesto se conoce como mezcla racémica. Las propiedades fisicoquímicas de los enantiómeros son idénticas, exceptuando la dirección de rotación del plano de luz polarizada y la capacidad de interacción con medios quirales.

1.3.1. Importancia y aplicaciones de los compuestos quirales

La gran mayoría de las moléculas fundamentales para el desarrollo de la vida, como los péptidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, terpenos y alcaloides son quirales. Asimismo, los monómeros que constituyen las macromoléculas esenciales para los organismos vivos son compuestos ópticamente activos de los cuales la naturaleza ha seleccionado una única forma enantiomérica,¹⁰ como es el caso del ADN que está compuesto por unidades de 2-desoxirribosa pertenecientes a la serie D, mientras que las estructuras altamente ordenadas de proteínas derivan de L-aminoácidos.

En la literatura pueden hallarse cuantiosos ejemplos en los cuales la quiralidad juega un rol fundamental para la realización de una determinada función biológica, como por ejemplo en los procesos de reconocimiento molecular, los cuales requieren de un estricto ajuste estereoquímico. Las enzimas y sitios receptores en sistemas biológicos poseen la habilidad de diferenciar entre los enantiómeros de un compuesto quiral. Por esta razón no puede esperarse que ambos enantiómeros de una determinada molécula se unan de igual manera a un receptor específico, causando en muchos casos respuestas biológicas decididamente diferentes.¹¹

La producción de compuestos quirales fue adquiriendo día a día mayor relevancia en distintos sectores tales como el de aromas y sabores, agroquímico y farmacéutico.

Un ejemplo que demuestra la importancia de la quiralidad en la industria de esencias y aromas lo constituye el efecto desigual producido por los enantiómeros del linalool sobre los receptores olfativos. Cada enantiómero provoca sensaciones diferentes en los seres humanos, ya sea porque se fijan de distinto modo a un receptor olfativo o porque utilizan diferentes receptores. La molécula (*S*)-(+)-linalool o licareol produce un olor dulzón, floral y con un vestigio de limón. El (*R*)-(-)-linalool o coriandrol tiene un aroma entre madera y lavanda (Figura 1.1).¹² El (*S*)-linalool es uno de los constituyentes mayoritarios del aceite esencial del cilantro, la palmarosa y el naranja dulce. Por otro lado, el (*R*)-linalool está presente en la lavanda, el laurel y la albahaca.

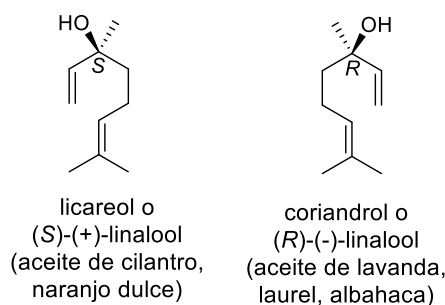


Figura 1.1

Otro ejemplo de la estereoespecificidad vinculada a diferentes características organolépticas es el caso del monoglutamato de sodio. Mientras que el isómero levógiro de este compuesto es un agente químico que se usa para dar sabor a la carne, el isómero dextrógiro no presenta sabor (Figura 1.2).¹³

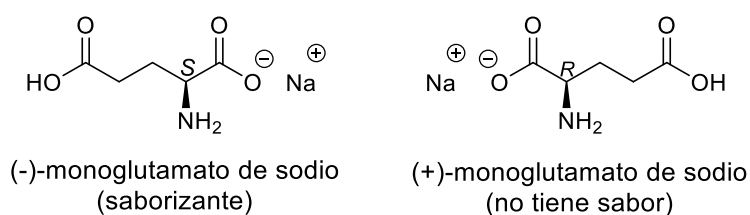


Figura 1.2

En la industria farmacéutica una gran proporción de los compuestos farmacológicamente activos poseen centros estereogénicos y por lo tanto pueden existir en distintas formas estereoisoméricas. Asimismo, dado que estos fármacos actúan sobre blancos quirales, la pureza enantiomérica se convierte en un factor sumamente importante en la eficacia de los medicamentos. Los dos enantiómeros de un compuesto activo pueden tener propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas

muy distintas, pueden ser absorbidos, distribuidos, metabolizados y excretados de manera diferente. Además, el enantiómero que no posee la actividad terapéutica puede incluso resultar tóxico para el organismo.¹⁴

Si bien el conocimiento de las moléculas orgánicas quirales remonta a siglos pasados, las implicancias farmacéuticas de los medicamentos racémicos sólo se han reconocido ampliamente en las últimas décadas.¹⁰ Como consecuencia, en los últimos años se ha manifestado una tendencia creciente al desarrollo de compuestos enantioméricamente puros, con el objetivo de reducir la dosis total del fármaco administrado y así simplificar las relaciones dosis-respuesta, aliviar la sobrecarga metabólica y minimizar los efectos secundarios o la toxicidad debida al isómero restante.¹⁵ Esto demuestra que la industria farmacéutica se encuentra inmersa en un proceso de transformación de la producción de fármacos de sus formas racémicas a sus estereoisómeros terapéuticamente efectivos, proceso que se ha dado en llamar *chiral switch* o viraje quiral.^{14,16}

Dado que la demanda de compuestos ópticamente activos continúa en constante aumento, se torna cada vez más necesario el desarrollo de nuevos métodos de síntesis química que permitan la producción de compuestos en sus formas enantioméricamente puras. Esto no sólo tendrá implicancias a nivel biológico, sino además a nivel económico y medioambiental si se tiene en cuenta la optimización de recursos que puede alcanzarse en las síntesis estereocontroladas de compuestos quirales. Es decir, que para la obtención de una determinada cantidad del compuesto activo en teoría deberían consumirse un 50% menos de materiales de partida, reactivos, solventes y demás sustancias implicadas en la preparación que aquellos métodos de generación de racematos. También repercute en otros aspectos como la reducción de los desechos generados, se evitan pasos de purificación, se minimizan los gastos asociados al transporte, entre otros.

1.3.2. Obtención de compuestos enantioméricamente puros

Las metodologías para la síntesis de productos ópticamente activos pueden agruparse básicamente en tres tipos de procedimientos:

- Resolución de mezclas racémicas
- Amplificación quiral
- Síntesis asimétrica

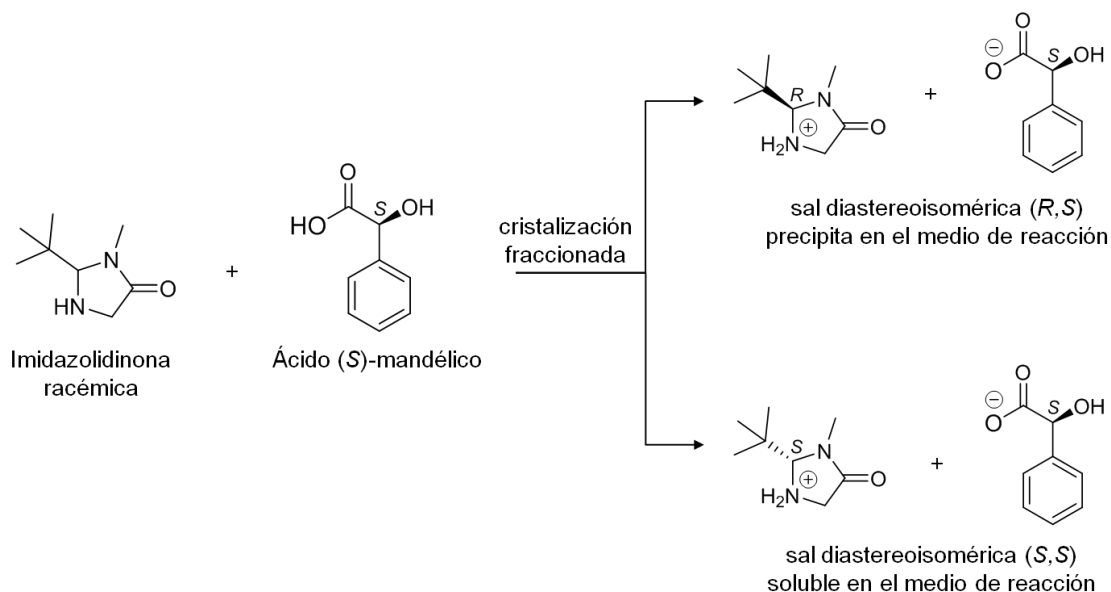
Cada una de estas estrategias tiene sus propios alcances y limitaciones, y la puesta en práctica de cada una de ellas dependerá de la cantidad y complejidad estructural del producto deseado, de la factibilidad económica, de los requerimientos

de tiempo, eficiencia sintética y seguridad medioambiental.^{17,18} Además, si bien cada una de estas metodologías emplea una estrategia particular para lograr la síntesis de compuestos enantioméricamente puros, en todos los casos es necesaria la utilización de un ente quiral, ya sea como auxiliar, catalizador, materia prima o agente de resolución.

1.3.2.1. Resolución de mezclas racémicas

La resolución de mezclas racémicas se puede considerar el método clásico de obtención de compuestos enantioméricamente puros, y durante mucho tiempo fue el método preferido para la obtención de productos ópticamente activos.¹⁶ Esta técnica se fundamenta en el hecho de que los diastereoisómeros, a diferencia de los enantiómeros, poseen propiedades físicas diferentes.

En la *resolución clásica*, el racemato a resolver se hace reaccionar con una molécula enantioméricamente pura, llamada agente de resolución, para dar dos diastereoisómeros que pueden ser separados mediante procedimientos comunes como la cristalización o la cromatografía. Posteriormente, cada isómero por separado es tratado químicamente permitiendo la liberación individual de cada uno de los enantiómeros originales y la recuperación del agente de resolución. Por ello, es importante que este último reaccione fácilmente y en buen rendimiento con la sustancia a resolver, pero además que sea fácilmente separable de dicha sustancia una vez que la resolución esté completa. Esta condición normalmente se cumple en la formación de sales diastereoisoméricas, que se forman rápidamente al mezclar el ácido con la base en algún disolvente apropiado, pero también se descomponen fácilmente después de la resolución mediante un cambio en el pH.¹³ Ejemplos de esta estrategia se encuentran en el empleo de ácidos orgánicos enantioméricamente puros para la resolución de racematos de aminas quirales.¹³ En el Esquema 1.1 se muestra la utilización del ácido (*S*)-mandélico en la resolución de una imidazolidinona racémica. En las condiciones empleadas, sólo cristaliza la sal diastereoisomérica (*R,S*), la cual es separada por filtración y luego sometida a un tratamiento alcalino para liberar la correspondiente amina enantioméricamente pura, mientras que el agente de resolución es recuperado mediante acidificación.^{13,19}



Esquema 1.1

Una técnica de separación de enantiómeros alternativa es la *resolución cinética* (enzimática o química). En este tipo de procedimientos, ambos enantiómeros reaccionan a velocidades diferentes con una entidad quiral usada generalmente en cantidades catalíticas. En algunos casos uno de los enantiómeros no puede recuperarse, mientras que en otros ambos enantiómeros son aprovechados después de la resolución.¹³

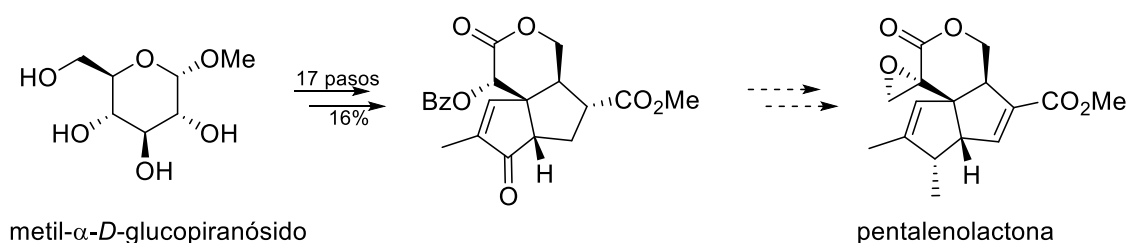
En las técnicas mencionadas anteriormente, el rendimiento teórico máximo que puede alcanzarse de un enantiómero es del 50%, a menos que el enantiómero no deseado pueda ser reciclado o que el sistema permita la inversión de la configuración del sustrato durante el proceso de resolución, pudiendo conseguirse la conversión cuantitativa del material de partida a un único producto estereoisomérico en un proceso conocido como *resolución cinética dinámica*.²⁰ Dado que existen pocos ejemplos en los que es posible aplicar esta estrategia, en las últimas décadas se han dirigido grandes esfuerzos hacia el diseño y desarrollo de nuevos procesos que permitan la síntesis directa e individual de cada enantiómero, entre ellos se encuentran la amplificación quiral y la síntesis asimétrica.

1.4. Amplificación quiral

Esta metodología se basa en la manipulación química de un material de partida quiral, el cual es consumido estequiométricamente para obtener compuestos estructuralmente más complejos en forma enantioméricamente pura. En esta estrategia todas las transformaciones sintéticas deben ser llevadas a cabo con un alto

grado de estereoselectividad, quedando la estereoquímica del producto determinada por la configuración absoluta de los centros estereogénicos presentes en el material de partida. Una limitación de este procedimiento recae en que no siempre están disponibles las materias primas en sus formas enantioméricamente apropiadas para la síntesis de una determinada molécula objetivo. Igualmente, existe una vasta gama de materiales ópticamente activos y con estructuras moleculares adecuadas para ser transformados en moléculas más complejas enantioméricamente puras, con lo cual se logra la denominada *amplificación quiral*.²¹

Por ejemplo, en nuestro laboratorio partiendo de metil- α -D-glucopiranosido se desarrolló la síntesis estereocontrolada de un intermediario avanzado para la obtención de pentalenolactonas que poseen actividad tripanocida (Esquema 1.2).²²



Esquema 1.2

1.5. Síntesis asimétrica

La *síntesis asimétrica* se refiere a la conversión de un material de partida aquiral en un producto ópticamente activo efectuada por medio de un entorno quiral.²³ Es en la actualidad un método muy poderoso para la preparación de moléculas quirales, tanto a nivel de laboratorio como industrial. Esto ha propiciado que los estándares de evaluación de dicha metodología sean cada vez más rigurosos, lo cual ha devenido en la exigencia de varias condiciones para que una síntesis asimétrica sea de utilidad. Entre estas condiciones debe priorizarse que la síntesis sea muy selectiva y con buen rendimiento y que el producto quiral obtenido pueda separarse fácilmente del agente quiral. Este último además debe ser accesible en alto exceso enantiomérico y debe recuperarse al final del proceso con buen rendimiento y sin racemizarse.¹³

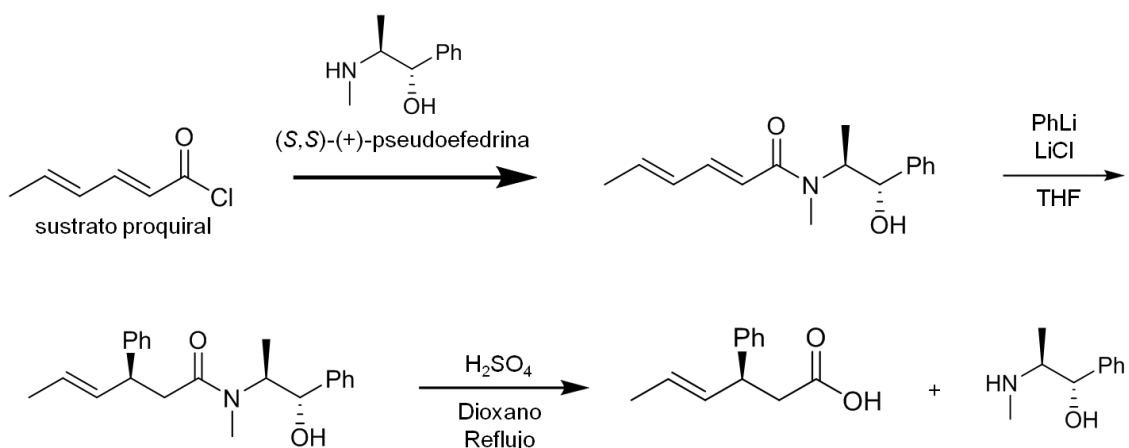
Dado que la síntesis asimétrica involucra la formación de nuevos centros estereogénicos en un sustrato determinado mediante la influencia de un grupo enantioméricamente puro, los métodos pueden ser divididos teniendo en cuenta cómo dicha influencia es ejercida:²³

- *Métodos controlados por auxiliares quirales*
- *Métodos controlados por reactivos quirales*

- *Métodos controlados por catalizadores quirales*

En las *reacciones controladas por auxiliares quirales* el control asimétrico se logra intramolecularmente por un grupo director o auxiliar quiral, el cual es deliberadamente unido en forma covalente a un material de partida proquiral en una etapa previa con el objetivo de llevar a cabo una reacción química de interés con elevada diastereoselectividad. Una vez que ha cumplido con su propósito, el auxiliar es removido del producto y recuperado, pudiendo ser utilizado nuevamente.²³

La (S,S)-(+)-pseudoefedrina ha sido empleada exitosamente como auxiliar quiral en reacciones de adición conjugada de reactivos organolíticos a amidas conjugadas poliinsaturadas (Esquema 1.3).²⁴ En una primera etapa, la pseudoefedrina es unida al sustrato proquiral para generar la correspondiente amida quiral, cuya reacción con el reactivo organolítico permite obtener el producto de adición conjugada con elevados excesos diastereoisoméricos. Finalmente, se lleva a cabo la remoción y recuperación del auxiliar obteniéndose el producto de adición con excelente pureza enantiomérica.



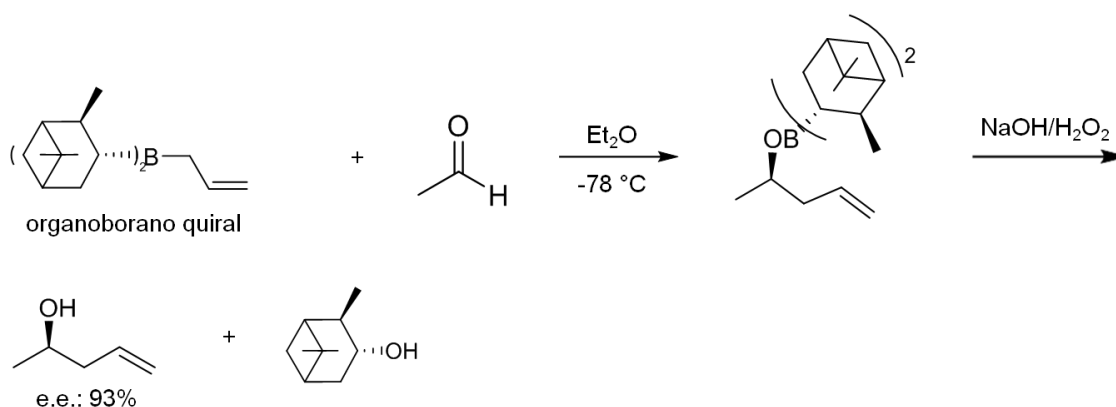
Esquema 1.3

El hecho de que el inductor pueda ser reutilizado en reiteradas ocasiones hace que estas metodologías sean sumamente atractivas para fines industriales. Otra ventaja adicional de este sistema es que los productos de la reacción son diastereoisómeros. Por lo tanto, incluso en aquellos casos donde la selectividad lograda no sea muy elevada, el compuesto no deseado puede ser eliminado por métodos convencionales como la recristalización o la cromatografía. De esta manera, una vez removido el auxiliar, el producto final puede ser obtenido con una altísima pureza enantiomérica. Esta es la razón por la cual estos métodos han sido exitosamente empleados en los últimos 30 años tanto a nivel académico como industrial. Sin embargo, la necesidad de

adicionar dos pasos extras a la secuencia sintética, la unión del auxiliar y su remoción, constituye una de sus principales desventajas.

En los *métodos controlados por reactivos quirales* un sustrato aquiral es convertido directamente en el producto enantioméricamente enriquecido mediante el uso de un reactivo quiral. En contraste con el método anterior, en este caso el stereocontrol se logra intermolecularmente.²³ Si bien este procedimiento es sumamente atractivo para fines sintéticos, el rango de reacciones que pueden llevarse a cabo eficientemente mediante reactivos quirales es aún relativamente limitado.

Un ejemplo de aplicación de esta metodología lo constituye la síntesis de alcoholes homoalílicos enantioméricamente puros vía reactivos organoboranos quirales. En el Esquema 1.4 se representa el empleo de *B*-alildiisopinocanfenilborano en alilboraciones de aldehídos para la obtención de alcoholes homoalílicos con alta pureza enantiomérica.²⁵

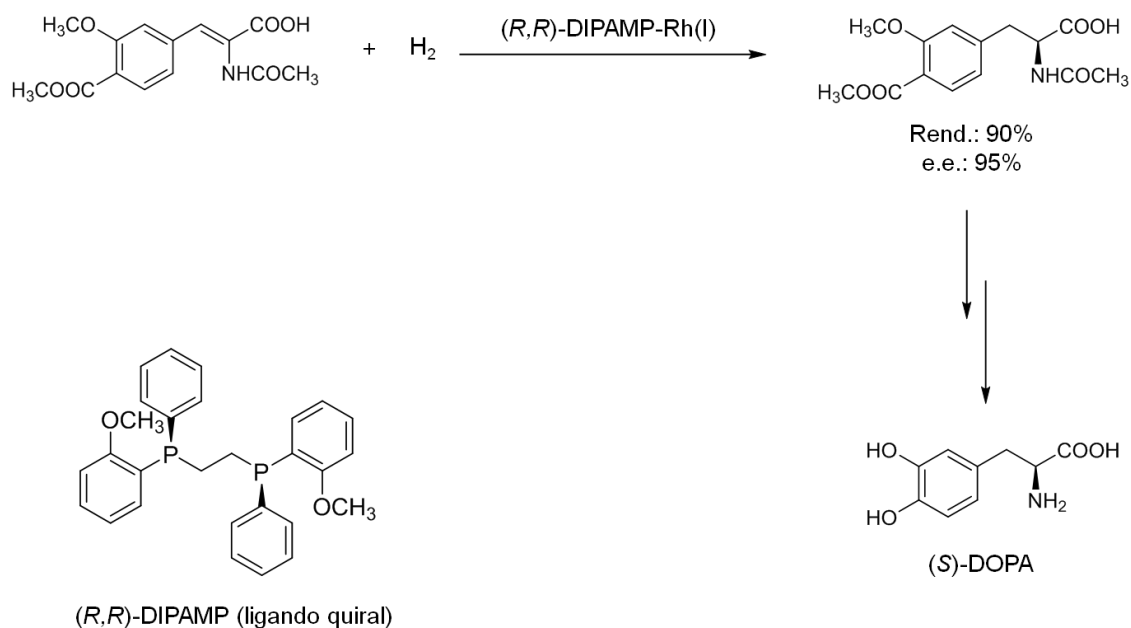


Esquema 1.4

En los métodos mencionados anteriormente se requieren cantidades estequiométricas de un compuesto enantioméricamente puro, ya sea como reactivo o auxiliar quiral, aunque en el segundo los auxiliares quirales pueden recuperarse para su reutilización. A diferencia de estos, los *métodos controlados por catalizadores quirales* consisten en la utilización de un catalizador quiral para dirigir la conversión de un material de partida proquiral en un producto enantioméricamente enriquecido empleando reactivos aquirales. El principal atractivo de esta metodología radica en la formación de una gran cantidad de producto ópticamente activo mediante el empleo de una pequeña cantidad de agente quiral.²³ Por definición, un catalizador es una especie que introducida en pequeña cantidad disminuye la energía de activación del estado de transición de una reacción química, recuperándose estructural y funcionalmente intacto al final del proceso.²⁶ Sin embargo, esto no siempre se cumple y cantidades

mayores de catalizador deben ser usadas para lograr velocidades de conversión razonables y/o para minimizar las pérdidas debido a reacciones colaterales.

Un ejemplo de aplicación de esta estrategia se encuentra en la síntesis industrial de (S)-DOPA, un aminoácido utilizado para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Un paso clave en la preparación de dicho compuesto es una reacción de hidrogenación enantioselectiva en la cual se utiliza un catalizador de rodio y (*R,R*)-1,2-bis-[(2-metoxifenil)fenilfosfino]etano (DIPAMP) como ligando quiral (Esquema 1.5).²⁶



Esquema 1.5

1.6. Biomasa como fuente de quiralidad

Las fuentes de quiralidad requeridas en cualquier proceso de síntesis asimétrica provienen de la naturaleza. Las sustancias naturales que más se han explotado dentro de este marco son terpenos (alcanfor, α -pineno, β -pineno, 2-careno, 3-careno, mentol), alcaloides (brucina, efedrina, estricnina, quinina, quinidina, esparteína, emetina), aminoácidos (prolina, valina, fenilalanina, hidroxiprolina, cisteína, metionina), hidroxiácidos (ácido tartárico, ácido láctico, ácido mandélico, ácido málico) y carbohidratos (glucosa, xilosa, galactosa, manitol, ramnosa, fructosa). Sin embargo, una limitación es que algunos de estos compuestos no se caracterizan por su abundancia, por lo que su valor de mercado suele ser elevado. Por este motivo, la búsqueda de alternativas económicas y sustentables para la obtención de productos enantioméricamente puros es de suma importancia.

Los carbohidratos son los productos naturales con mayor cantidad de centros estereogénicos y átomos potencialmente ligantes por molécula. Dada su abundancia,

estas biomoléculas, son además de bajo costo y fácil acceso. Desde el punto de vista de la búsqueda de fuentes alternativas de materias primas económicas y sustentables, los carbohidratos son por lo tanto un modelo ejemplar para el desarrollo de herramientas sintéticas dirigidas a la obtención de compuestos enantioméricamente puros.

1.7. Celulosa como fuente de quiralidad

La celulosa es un biopolímero producido por los vegetales mediante el proceso de fotosíntesis, siendo la unidad monomérica la celobiosa la cual está formada por unidades de D-glucosa unidas mediante enlace glicosídico β entre el carbono 1 de una unidad y el grupo hidroxilo del carbono 4 de la unidad siguiente (Figura 1.5). La misma tiene una estructura lineal en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas de glucosa yuxtapuestas, haciéndola impenetrable al agua y originando fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales.²⁷

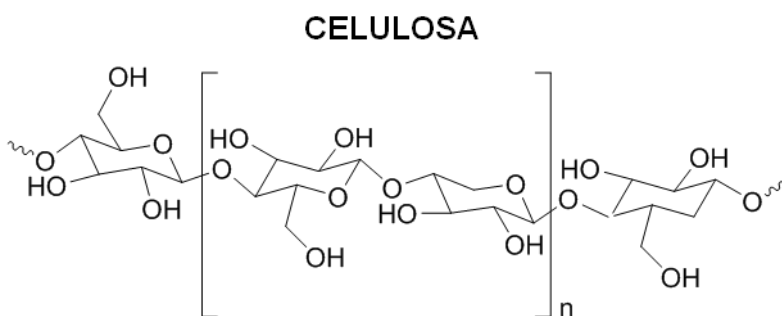
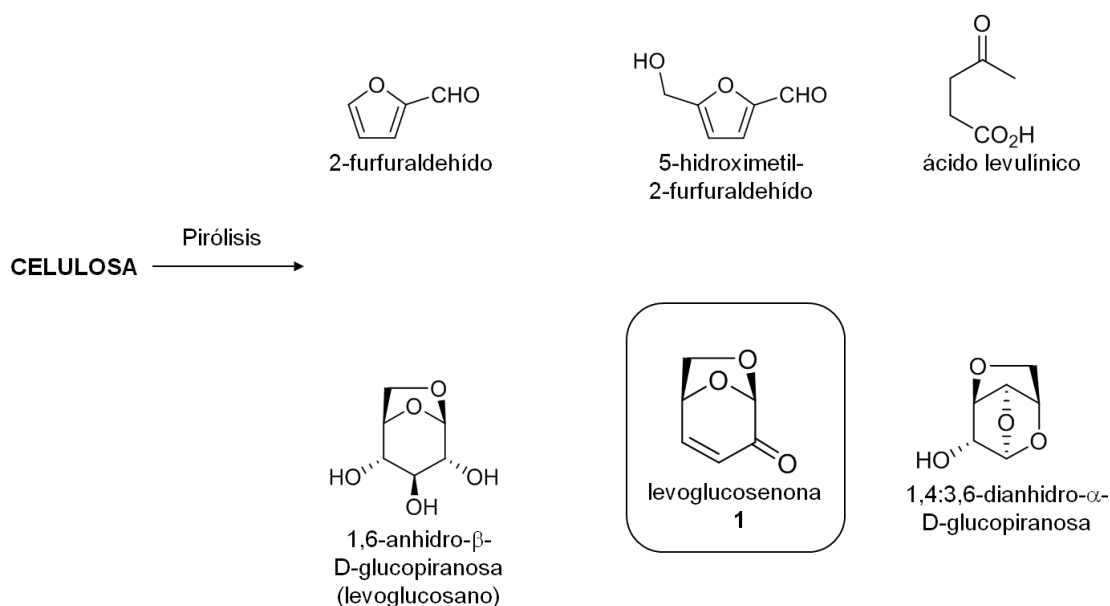


Figura 1.5

Una de las maneras de aprovechar parte de la celulosa es sometiénola a procesos de pirólisis. Esta técnica que desempeña un rol fundamental en la conversión de biomasa,²⁸ consiste en aplicar calor a materia orgánica generándose en el proceso carbón, líquidos orgánicos condensables y gases no condensables, entre otros compuestos. Cuando esta técnica se aplica a material celulósico se produce la degradación de la cadena polimérica y pueden obtenerse distintos productos con rendimientos variables en función de las condiciones experimentales empleadas (Esquema 1.6).⁸



Esquema 1.6

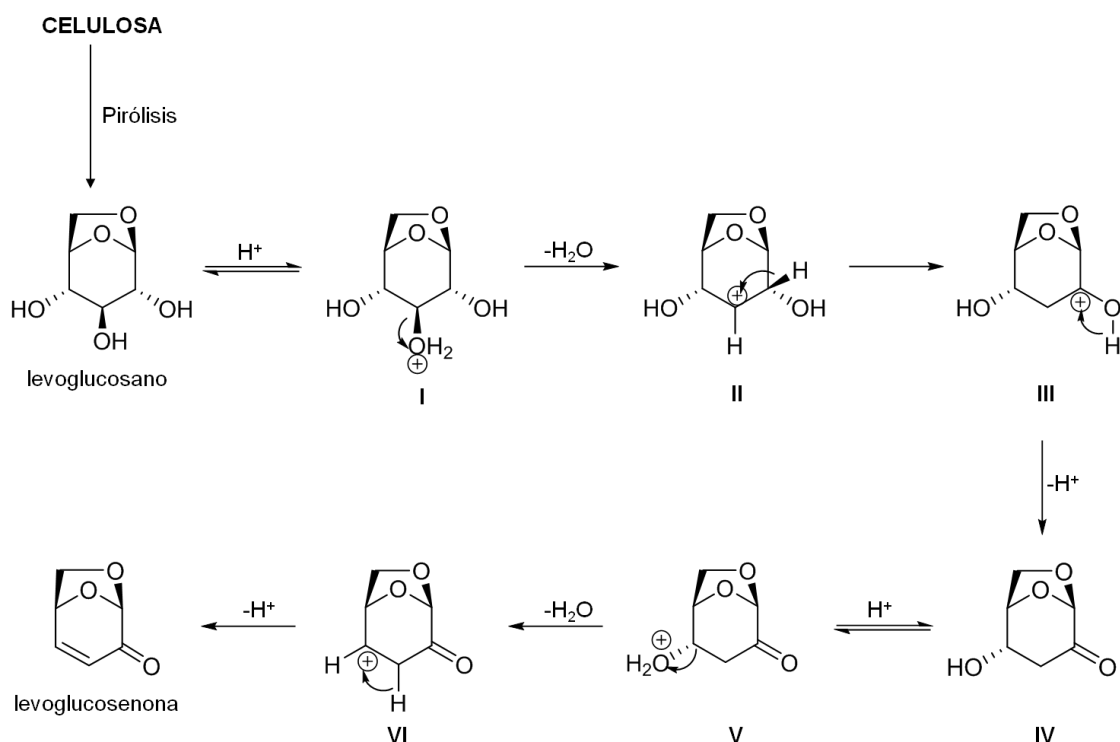
Entre los distintos productos que se obtienen ha resultado de especial interés levoglucosenona, debido a que se trata de un compuesto quiral obtenido en forma enantioméricamente pura cuya funcionalización permite llevar a cabo diversas transformaciones químicas con un alto grado de selectividad.²⁹

1.8. Obtención de levoglucosenona

A principios de 1970 los grupos de Yoshio Tsuchiya - Kikuo Sumi y Frank Wodley demostraron en forma independiente y simultánea la obtención de un compuesto nuevo y desconocido generado mediante la pirólisis de celulosa tratada con retardantes de ignición ácidos.³⁰⁻³¹ Sin embargo, no fue hasta 1973 que el grupo de A. Broido asignó la estructura de este compuesto como 1,6-anhidro-3,4-dideoxi-β-D-glicero-hex-3-enopiranos-2-ulosa, más conocido como levoglucosenona (1).³²

El proceso de degradación térmica de celulosa consiste en una serie de reacciones de transglucosidación intramoleculares, en las cuales los grupos hidroxilos libres presentes en la celulosa pueden participar en la ruptura de la unión (1→4)-glicosídica, generándose subproductos que eventualmente podrían propagar el proceso de pirólisis.³³ En el curso de estas transformaciones químicas se obtiene una notable variedad de compuestos, siendo el producto predominante la 1,6-anhidro-β-D-glucopiranososa o levoglucosano.³³ Por otro lado, cuando en el proceso de pirólisis se emplean retardantes de ignición ácidos, el producto mayoritario resulta ser levoglucosenona.

Estas diferencias en los resultados llevaron a investigar de manera más minuciosa lo que estaba ocurriendo en estos procesos. Se observó que tanto la pirólisis ácida de celulosa como de levoglucosano conducían a la obtención de levoglucosenona.^{31,32} En base a estos resultados se sugirió que en medio ácido el levoglucosano generado por degradación térmica de celulosa podría sufrir una reacción de deshidratación seguida de un reordenamiento del catión inicialmente formado para transformarse en la hidroxicetona **IV** (Esquema 1.7). Dicha especie se transformaría en levoglucosenona luego de experimentar un proceso de deshidratación y posterior deprotonación.³²



Esquema 1.7

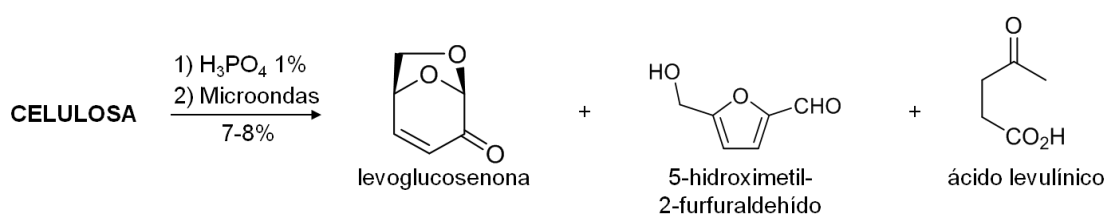
Fred Shafizadeh y colaboradores realizaron importantes estudios metodológicos con el propósito de optimizar las condiciones experimentales de pirólisis para la obtención de levoglucosenona.³⁴⁻³⁶ Investigaron el efecto que producían las distintas variables del proceso (presión, temperatura, tipo y concentración de ácido) en el rendimiento del producto deseado, encontrando que los mejores resultados se lograban con el uso de ácido fosfórico a una concentración entre el 0,5 y 1%. Asimismo observaron experimentalmente que el rango óptimo de temperatura estaba entre 300 y 400 °C. La transferencia de calor jugaba un rol vital en el éxito de estas transformaciones químicas, lo cual se evidenció en la notable disminución de los rendimientos a medida que se incrementó la cantidad de celulosa a pirolizar.³⁴⁻³⁶ El

rendimiento reportado de levoglucosenona en escala preparativa estuvo en el rango del 2 al 4%, conteniendo aproximadamente un 5% de 2-furfuraldehído como única impureza.

Prakash Bahté y Derek Horton también informaron una metodología en escala de laboratorio para el aislamiento y purificación de levoglucosenona a partir de la pirólisis de papel de desecho.³⁷

Si bien el proceso pirolítico es un procedimiento sustentable, ya que se lleva a cabo en condiciones libres de solvente, la búsqueda de procesos aún más amigables con el medio ambiente para la obtención de levoglucosenona dirigió el interés hacia el desarrollo de métodos alternativos que permitieran realizar esta transformación química.

El uso de radiación de microondas para acelerar reacciones orgánicas ha tenido una utilidad creciente como proceso beneficioso para el medio ambiente, dado que el efecto de calentamiento ultra rápido posibilita un mayor aprovechamiento energético.^{38,39} La evaluación de los requerimientos de energía en las transformaciones químicas es un factor muy importante que debe ser tenido en cuenta al diseñar un proceso que pregone los principios de la sostenibilidad. A raíz de ello, en nuestro laboratorio se ha desarrollado y optimizado una técnica de pirólisis de material celulósico asistida por radiación de microondas.⁴⁰ Las metodologías ensayadas mostraron ser rápidas, sencillas y reproducibles, posibilitando la obtención de un crudo de pirólisis con rendimientos entre 7-8% conteniendo levoglucosenona y como únicas impurezas ácido levulínico (11-13%) y 5-hidroximetilfurfuraldehído (2-3%), siendo ambas fácilmente removibles en el proceso de purificación (Esquema 1.8).⁴⁰



Esquema 1.8

El rendimiento de levoglucosenona alcanzado tanto en los procesos pirolíticos por calentamiento convencional como en los asistidos por radiación de microondas puede parecer bajo. Sin embargo, si se considera que es un procedimiento en una única etapa que proporciona un producto con un elevado potencial sintético y que puede obtenerse incluso de material de desecho, el mismo se convierte en ecológica y económicamente muy atractivo.

También se ha reportado la síntesis de levoglucosenona partiendo de D-galactosa por transformaciones químicas en varias etapas,⁴¹ a partir de D-glucosa mediante una reacción de deshidratación en condiciones vigorosas,²⁹ o empleando furfural como material de partida,⁴² pero el método más simple y económico sigue siendo la pirólisis de material celulósico.

1.9. Aplicaciones de levoglucosenona

Levoglucosenona es un compuesto bicíclico enantioméricamente puro cuyas características estructurales más significativas son la presencia de un sistema carbonílico α,β -insaturado muy reactivo y un puente 1,6-anhidro que fija la conformación del sistema y esconde estéricamente la cara β (*endo*) de la molécula. Esta característica sobresaliente actúa como elemento de estereocontrol permitiendo inducir selectividad facial en diversas reacciones desarrolladas sobre la enona. Levoglucosenona presenta tres grupos funcionales reactivos: unión anhidro glicosídica, grupo cetona y doble enlace, tal como se indica en la Figura 1.6.

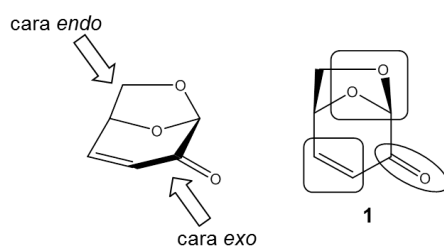


Figura 1.6

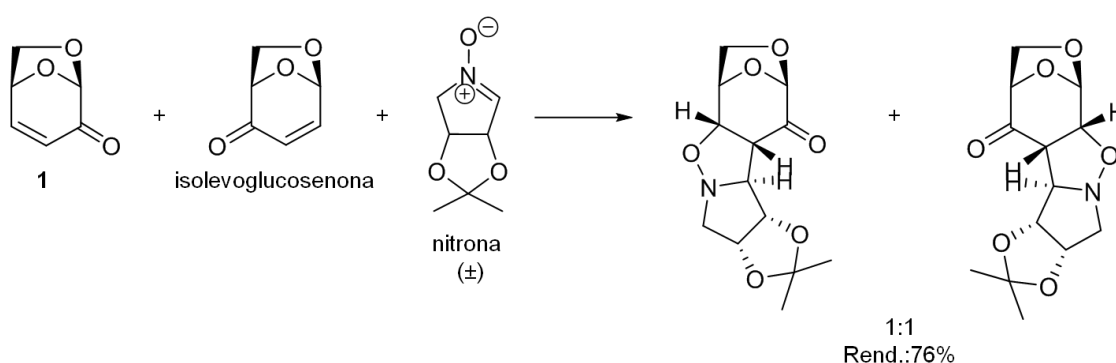
Cada uno de estos grupos funcionales puede reaccionar selectivamente dependiendo de las condiciones de reacción empleadas. Algunos ejemplos de la variedad de transformaciones químicas que pueden realizarse con éxito sobre este sustrato quiral son: adiciones nucleofílicas al grupo carbonilo, adiciones conjugadas al sistema carbonílico α,β -insaturado, el uso de esta estructura como dienófilo en reacciones de cicloadición [4+2] para producir derivados de ciclohexanos polifuncionalizados y en reacciones de cicloadición 1,3-dipolares para la formación de heterociclos, adiciones electrofílicas sobre el doble enlace, hidrólisis del acetal intramolecular, reacciones de anelación con cianofталuros y procesos de extrusión fotoquímica del C-1 como dióxido de carbono.^{8,29}

Desde el primer reporte sobre la preparación de levoglucosenona hace 40 años, se han llevado a cabo diversas investigaciones en diferentes centros científicos para desarrollar una amplia variedad de aplicaciones de este sintón quiral en síntesis de

compuestos enantioméricamente puros, algunos de ellos con interesantes actividades biológicas.⁴³

1.9.1. Empleo de levoglucosenona en la resolución de mezclas racémicas

Se ha reportado el empleo de una mezcla de levoglucosenona y su cuasi-enantiómero isolevoglucosenona en la resolución de mezclas racémicas de nitronas mediante reacciones de cicloadición (Esquema 1.9).⁴⁴ De este modo, ambas enonas son capaces de adicionarse simultánea y selectivamente a cada enantiómero de nitrona, con velocidades similares y selectividades opuestas, actuando como agentes de resolución en un procedimiento denominado Resolución Cinética Paralela (Parallel Kinetic Resolution-PKR). Mediante este procedimiento se demostró que pueden formarse los dos aductos cuasi-enantioméricos con elevados niveles de doble inducción asimétrica.



Esquema 1.9

1.9.2. Empleo de levoglucosenona en amplificación quiral

En la literatura se pueden encontrar varios ejemplos del empleo de levoglucosenona en diferentes estrategias sintéticas estereoselectivas para la construcción de distintos productos ya sean de origen natural o sintético.⁴³

Entre los diversos compuestos que se han obtenido utilizando este sintón quiral se encuentra la (-)-tetrodotoxina, una toxina presente en el veneno del pez globo.⁴⁵ La tetrodotoxina es un producto natural conocido no sólo por su potente toxicidad sino también por su novedosa y compleja arquitectura molecular (Figura 1.7). Otros ejemplos del empleo de levoglucosenona como sintón quiral lo constituyen la síntesis de feromonas como el (+)-grandisol⁴⁶ y de inhibidores de la proliferación de ciertas células cancerígenas (Figura 1.7).⁴⁷

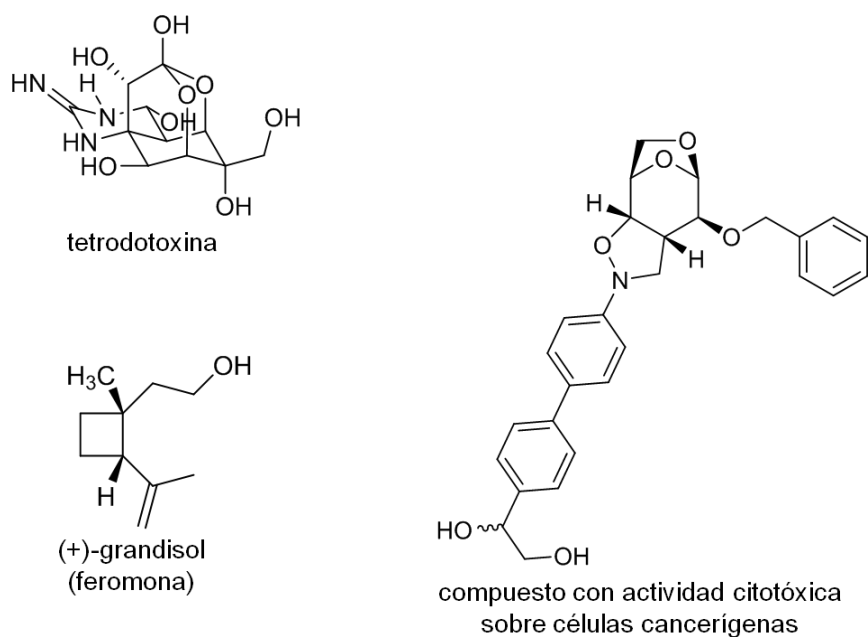
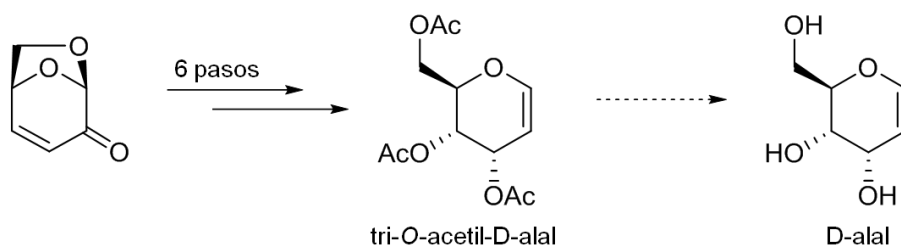


Figura 1.7

En nuestro laboratorio se empleó levoglucosenona para sintetizar un derivado triacetilado del D-alal, el glical derivado del azúcar raro D-alosa.⁴⁸ Un glical es un enol éter cíclico derivado de un azúcar que contiene un doble enlace entre el carbono anomérico y el carbono adyacente. Los glicales presentan una amplia versatilidad en la síntesis de oligosacáridos, C-glicósidos, C-nucleósidos y otras moléculas de importancia biológica destinadas, entre otras cosas, al desarrollo de vacunas sintéticas.⁴⁹ La síntesis del tri-O-acetil-D-alal se logró en 6 pasos con un 55% de rendimiento global a partir de levoglucosenona (Esquema 1.10). Este procedimiento para la preparación del D-alal sustituido es simple y eficiente, y con un rendimiento global que es significativamente más alto que los obtenidos en las metodologías previamente informadas.⁴⁸



Esquema 1.10

1.9.3. Empleo de levoglucosenona en síntesis asimétrica: catalizadores quirales

Los aminoalcoholes quirales son estructuras moleculares versátiles que han sido ampliamente utilizados en síntesis asimétrica como catalizadores o auxiliares quirales.^{26,50} En este contexto, levoglucosenona ha sido empleada como sintón quiral para el desarrollo de 1,2-aminoalcoholes quirales, algunos de los cuales fueron inmovilizados sobre la resina de Wang con el propósito de ser utilizados como catalizadores soportados (Figura 1.8).⁵¹

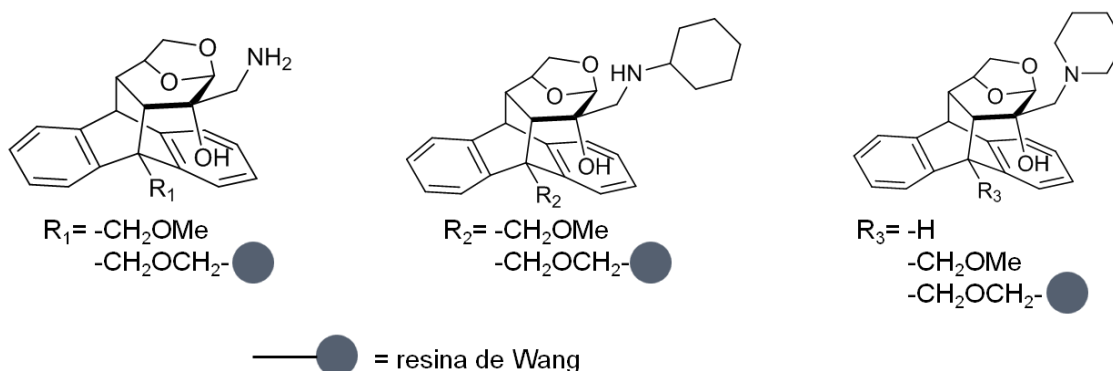
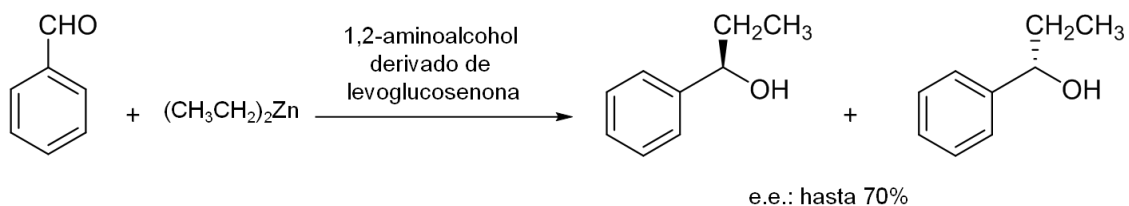


Figura 1.8

La capacidad inductiva de estos aminoalcoholes derivados de levoglucosenona fue evaluada en la adición enantioselectiva de dietilzinc a benzaldehído. En todos los casos, se obtuvo el 1-fenilpropanol con excelentes rendimientos y buenos excesos enantioméricos (hasta 70%) (Esquema 1.11). Además, los aminoalcoholes pudieron ser reciclados y reutilizados sin pérdida de la actividad catalítica.⁵¹



Esquema 1.11

Recientemente ha adquirido gran interés el empleo de pequeñas moléculas orgánicas libres de metales como catalizadores quirales, procedimiento conocido como organocatálisis.⁵² Dentro de este marco, en nuestro laboratorio se ha desarrollado una familia de pirrolidinas derivadas de levoglucosenona para ser

utilizadas como organocatalizadores en transformaciones orgánicas asimétricas (Figura 1.9).⁵³

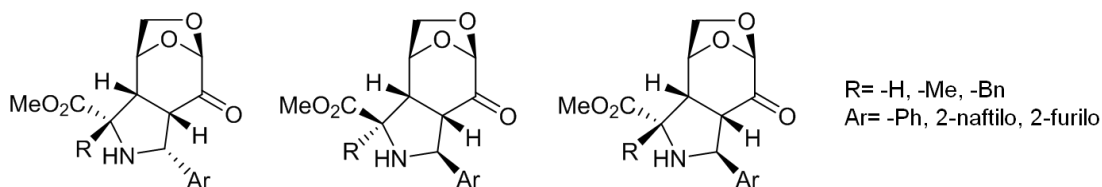
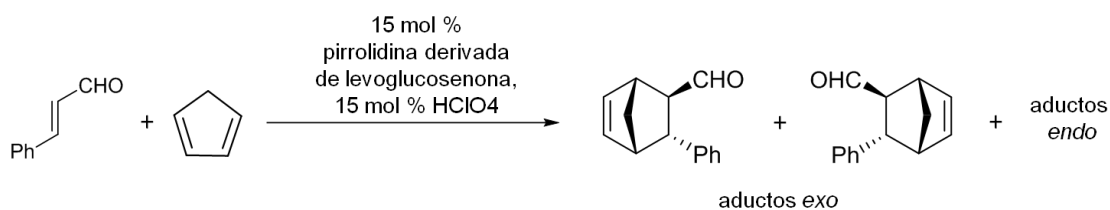


Figura 1.9

Estas pirrolidinas quirales fueron empleadas exitosamente en reacciones de Diels-Alder vía iones iminio entre (*E*)-cinamaldehído y ciclopentadieno (Esquema 1.12), alcanzándose selectividades *exo/endo* hasta 85:15 y excesos enantioméricos hasta 90%.⁵¹



Esquema 1.12

1.9.4. Empleo de levoglucosenona en síntesis asimétrica: auxiliares quirales

En los últimos años se han dedicado numerosos esfuerzos con el objeto de diseñar herramientas quirales para síntesis asimétrica basadas en la estructura de levoglucosenona. Desde el primer ejemplo de aplicación de derivados de levoglucosenona como auxiliares quirales,⁵⁴ quedó manifiesta la potencial aplicación de este sintón quiral en este campo de la química.

En nuestro grupo de investigación se han sintetizado distintos alcoholes a partir de levoglucosenona para ser empleados como auxiliares quirales en reacciones orgánicas asimétricas (Figura 1.10).

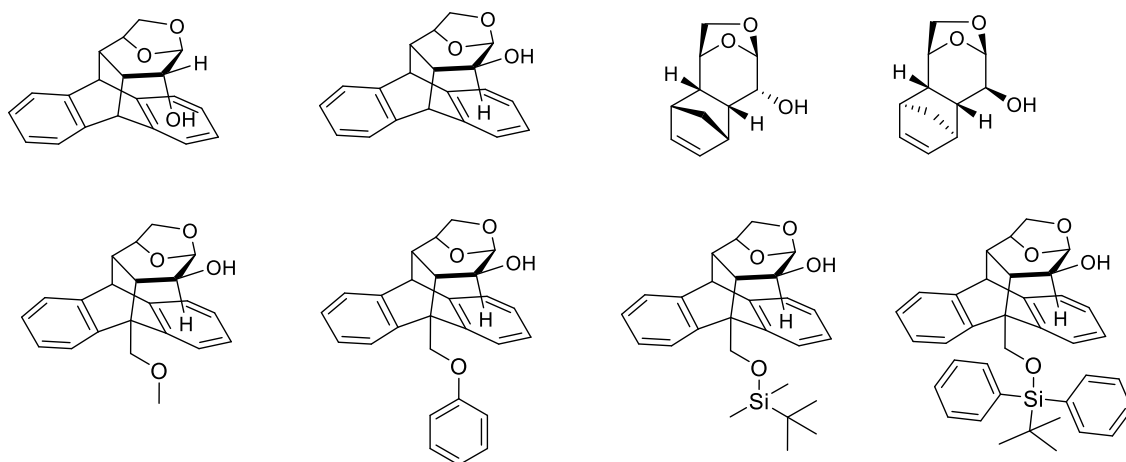
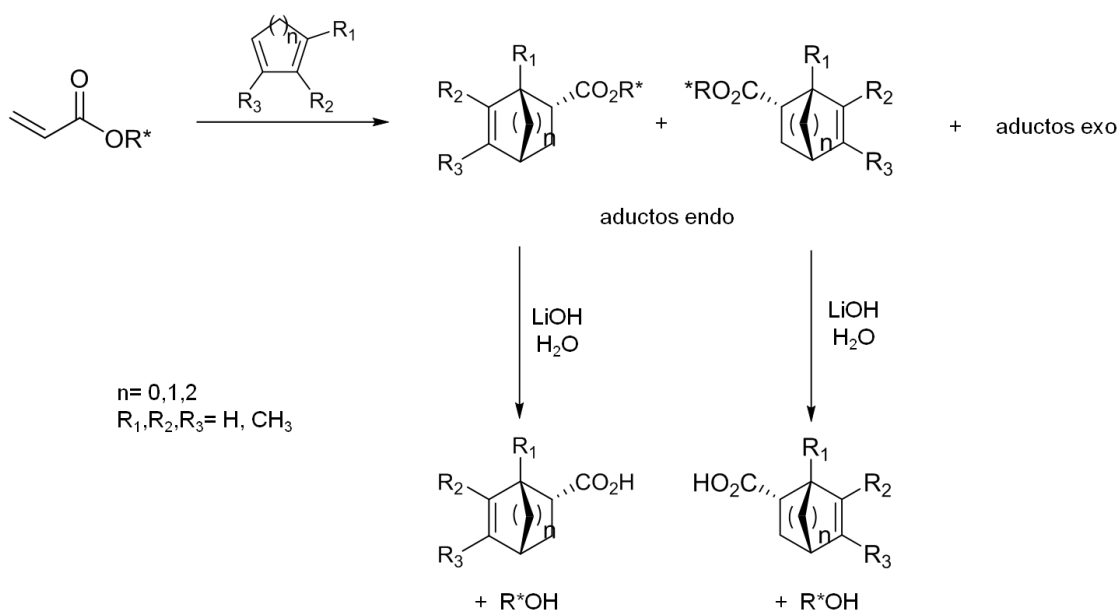


Figura 1.10

Estos alcoholes fueron evaluados como inductores asimétricos en reacciones de Diels-Alder entre los correspondientes ésteres acrílicos y diferentes dienos (Esquema 1.13).⁵⁴⁻⁵⁸ La totalidad de las reacciones evaluadas mostraron ser *endo* selectivas, observándose en algunas experiencias valores de relación *endo/exo* hasta 98:2. La selectividad facial entre los aductos *endo* dependió del auxiliar quiral y de las condiciones experimentales empleadas, lográndose excesos diastereoisoméricos hasta el 98%. La hidrólisis de los aductos de Diels-Alder generó los correspondientes ácidos carboxílicos libres junto con la recuperación de los auxiliares quirales, los cuales pudieron ser reutilizados.



Esquema 1.13

1.10. Biomasa como fuente de compuestos bioactivos

A lo largo de los siglos la naturaleza ha cubierto las necesidades básicas de la humanidad, siendo una no menor la provisión de medicinas para el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades. Las plantas en particular han jugado un rol predominante en el desarrollo de los sistemas de medicina tradicional. Como ejemplo se puede citar el “papiro Eber”, uno de los tratados médicos más antiguos y mejor conservados de la historia que data aproximadamente del 1500 AC. En él se hallan unas 700 fórmulas y remedios, la mayoría derivados de plantas. También se hallan registros del uso de sustancias obtenidas de fuentes vegetales por parte de las civilizaciones de la Mesopotamia para tratar una cantidad importante de dolencias, algunas de las cuales se utilizan hoy en día. Más conocido es el empleo de hierbas en la medicina tradicional china y en la medicina ayurvédica india.⁵⁹

En el mundo occidental los griegos y romanos han hecho un aporte sustancial al uso de hierbas medicinales con los trabajos de Dioscórides y Galeno, siendo éste último un médico conocido a lo largo y ancho del imperio romano por sus fórmulas empleando fuentes vegetales y que además influyó hondamente en el posterior desarrollo de la medicina moderna. La preservación de gran parte de la experiencia greco-romana durante la edad media es atribuida a los árabes, quienes posteriormente la expandieron agregando su propio conocimiento en la materia.⁵⁹ Desde la implementación del método científico y, más importante aún, desde los principios del siglo XX hasta nuestros días resulta difícil si no imposible hablar de descubrimiento de compuestos bioactivos sin hacer mención a los productos naturales (PNs) y a la investigación en este campo.

Si bien las contribuciones de los metabolitos secundarios o PNs a la medicina moderna son abundantemente claras, hay aún cierto debate acerca de la función por la cual estos compuestos son producidos por los organismos. Inicialmente se los ha pensado como productos de desecho; sin embargo, estudios posteriores han revelado que los organismos han evolucionado estos complejos y a menudo tóxicos químicos con propósitos de defensa, comunicación y predación. Un ejemplo fascinante es aportado por las pupas del escarabajo *Epilachna borealis*, las cuales como mecanismo contra la predación secretan de sus glándulas capilares pequeñas gotas de veneno conteniendo casi 100 poliaminas macrocíclicas sintetizadas todas a partir de sólo 3 precursores. Esto constituye además un ejemplo de que la química combinatoria ha sido ya empleada por la naturaleza para sus propios fines.⁵⁹

Más allá de las razones evolutivas y de supervivencia, puede resultar ilógico pensar que un microorganismo o una planta puedan producir un compuesto que pueda tener un efecto sobre una especie que no se halla presente en su nicho ecológico.⁶⁰

Sin embargo, el ser humano ha sacado provecho de esta peculiar característica y es así que ha surgido el enorme arsenal de fármacos actual para tratar diferentes patologías, desde infecciones hasta cáncer. Un ejemplo lo constituye las altamente exitosas estatinas, empleadas en el tratamiento de pacientes con hipercolesterolemia al ser inhibidoras de la HMG-CoA reductasa.⁶¹ Las razones para esta eficaz coincidencia probablemente recaigan en la naturaleza finita del espacio biológico. La mayoría de los blancos biológicos (proteínas y ácidos nucleicos) están compuestos de los mismos bloques de construcción en todas las especies. De esta forma, aunque los blancos biológicos originales por los cuales el PN se generó y aquellos terapéuticos no estén evolutivamente relacionados, comparten dominios estructurales cuya arquitectura es similar.^{60,62}

1.11. Productos naturales versus compuestos de síntesis

La química combinatoria es un set de técnicas desarrolladas para la síntesis simultánea de grandes colecciones de compuestos (bibliotecas químicas), para llevar a cabo cribado de alto rendimiento o "*High-throughput screening*" (HTS) contra blancos biológicos. La tecnología fue rápidamente incorporada dentro de la industria farmacéutica y usada para generar colecciones extensas de compuestos con el propósito de explorar un espacio químico diferente al abarcado por los PNs. Las expectativas de que el HTS de un vasto número de compuestos debería ser más eficiente y menos costoso que los acercamientos tradicionales hacia el descubrimiento de compuestos bioactivos condujeron a un abandono paulatino de la investigación sobre PNs en varias compañías. Mientras hay quienes sostienen que la química combinatoria ha resultado útil en la generación de nuevos líderes, el número decreciente de nuevas entidades químicas (NEQs) indica que los desarrollos combinatorios *de novo* en los últimos años han sido desalentadores.⁵⁹ De hecho, sólo el 36% de los nuevos fármacos de bajo peso molecular obtenidos en el período comprendido entre 1981 y 2010 fueron sintéticos en origen. Y si se cuentan las vacunas y fármacos peptídicos ese porcentaje desciende al 29%. Quiere decir esto que la mayoría de los medicamentos generados en las últimas décadas son PNs o están inspirados en los mismos.⁶³

La región restringida del espacio químico explorada por los compuestos de síntesis combinatoria, comparada a los PNs y sus derivados, puede explicar por qué la naturaleza ha sido una fuente productiva de compuestos para el desarrollo de medicinas.^{63,64}

Cuando se comparan a los compuestos preparados mediante técnicas combinatorias, los PNs poseen en promedio, pesos moleculares mayores y estructuras

más complejas que los productos de síntesis presentes en las colecciones analizadas. Esto último implica que los PNs poseen más átomos cabeza de puente con hibridación sp^3 , más anillos y más centros estereogénicos por molécula que los compuestos de síntesis. Además, los compuestos naturales poseen mayor cantidad de oxígeno y menor cantidad de nitrógeno, de azufre y de halógenos que los sintéticos. Por otro lado, los PNs tienden a ser más rígidos que los combinatorios, es decir poseen mayor número de insaturaciones y de sistemas de anillos, presentando consecuentemente menor número de enlaces rotables. Tienden además a ser menos hidrofóbicos, y a poseer más átomos dadores y aceptores de puente hidrógeno.⁶³⁻⁶⁵

1.11.1. Aprovechamiento de la diversidad química de los productos naturales

Los PNs generalmente se caracterizan por tener altas afinidades de unión por sistemas de receptores específicos. El conocimiento de la química medicinal indica que la remoción de los centros quirales, la introducción de flexibilidad adicional en la molécula y disminución de su tamaño generalmente llevan a una pérdida de especificidad y a una actividad biológica débil. En vista de estos hechos, es interesante considerar que en muchas oportunidades las investigaciones orientadas a reemplazar compuestos naturales por sintéticos utilizan exactamente estos tipos de modificaciones desfavorables.⁶⁶

Por tal motivo se han estado desarrollando estrategias innovadoras que aprovechan la diversidad química de los productos naturales. Tales estrategias incluyen: la preparación de colecciones de compuestos inspiradas en PNs,^{67,68} la síntesis *de novo* de productos naturales por biosíntesis combinatoria y técnicas relacionadas incorporando para ello conocimiento genético derivado de los proyectos de secuenciación genómica,⁶⁹⁻⁷¹ o la modificación química de extractos por reacciones químicas.⁷²

1.11.2. Pirólisis de biomasa y obtención de compuestos bioactivos

La pirólisis de biomasa ha surgido como una alternativa adicional a las mencionadas anteriormente con el propósito de desarrollar herramientas tendientes a obtener nuevos compuestos bioactivos. Si bien la metodología de pirólisis es muy conocida y viene siendo empleada desde tiempos remotos, sólo recientemente se empezó a estudiar el efecto de bioaceites obtenidos mediante pirólisis de diversas fuentes naturales con el objetivo de encontrar compuestos bioactivos.

Entre los ejemplos se cuentan el efecto antifúngico de bioaceites provenientes de la pirólisis de corteza de pino y roble.⁷³ Además en este trabajo se informa que estos

crudos actuaron como impermeabilizantes del agua cuando se aplicaron a madera de pino. Las actividades mencionadas se potenciaron cuando se extrajeron compuestos fenólicos generados por la descomposición de lignina. Estos resultados resaltan la importancia de la aplicación de estos bioaceites en la preservación de la madera luego de su producción.⁷³

Por otro lado, se ha informado la actividad antimicrobiana de los bioaceites obtenidos de pirólisis de hojas de tabaco frente a microorganismos patógenos de cultivos hortícolas. También se destacó el potencial efecto pesticida de estos crudos ya que afectaron el crecimiento poblacional de un escarabajo causal de graves daños a los cultivos de papa en Estados Unidos y Canadá.⁷⁴

Como último ejemplo cabe mencionar los trabajos del grupo de Martin Friedman en lo que respecta a las actividades biológicas de los crudos de pirólisis de cáscara de arroz. Entre los efectos proporcionados por estos bioaceites se destacan: propiedades antioxidantes, antiinflamatorias en ratones y una importante actividad antidiabética en ratones con diabetes inducida por aloxano o con una dieta alta en grasas. En el último caso además se lograron revertir a valores normales los niveles de triglicéridos y colesterol total. Por último, los crudos de pirólisis inhibieron el crecimiento de *Salmonella Typhimurium* *in vitro* y en un modelo de infección en ratones.⁷⁵

Estos trabajos destacan la pirólisis de biomasa no sólo como generadora de compuestos bioactivos sino también como medio para reciclar y agregar valor a subproductos agroindustriales. Lo llamativo de los ejemplos mencionados en los párrafos precedentes es que si bien se han observado efectos bioactivos interesantes, en ningún caso se logró aislar el compuesto responsable de las actividades observadas. Es lógico pensar que este resultado se deba a una dificultad en la purificación de una mezcla compleja de productos. Sería deseable, sin embargo, determinar la identidad de un compuesto responsable de una actividad biológica presente en una mezcla, no sólo con fines de elucidación sino además para poder realizar posteriormente ensayos biológicos más detallados y obtener compuestos adicionales a partir de la estructura de origen que puedan mejorar las actividades observadas.

1.12. Ensayos biológicos apropiados

El éxito de cualquier investigación orientada a la búsqueda de compuestos bioactivos en mezclas de productos requiere utilizar bioensayos adecuados para poder monitorear grandes cantidades de compuestos simultáneamente en función de la actividad biológica y herramientas poderosas de aislamiento y análisis con el propósito de determinar la identidad del compuesto activo.

Con respecto al primer punto, las herramientas autográficas resultan de gran ayuda para tal fin. Éstas combinan la capacidad separativa de la cromatografía en capa delgada con la determinación *in situ* de una actividad biológica de alguno de los compuestos presentes en una mezcla.⁷⁶

La metodología consta principalmente de dos etapas: la primera consiste en separar por cromatografía en capa delgada (CCD) los componentes de un extracto o crudo (Figura 1.11, paso 1). La segunda etapa involucra varios pasos y consiste en revelar la placa cromatográfica utilizando un método de tinción adecuado que permita reportar alguna actividad biológica (Figura 1.11, pasos 2 y 3). De esta manera, los componentes activos de la mezcla son detectados a través de los halos de inhibición que ellos producen. Los compuestos adsorbidos en la fase estacionaria de una placa cromatográfica difunden hacia un medio líquido (gelificado o no) que contiene una enzima, microorganismo o reactivo químico (generalmente acompañado de un revelador), ejerciendo su actividad biológica (Figura 1.12).⁷⁶

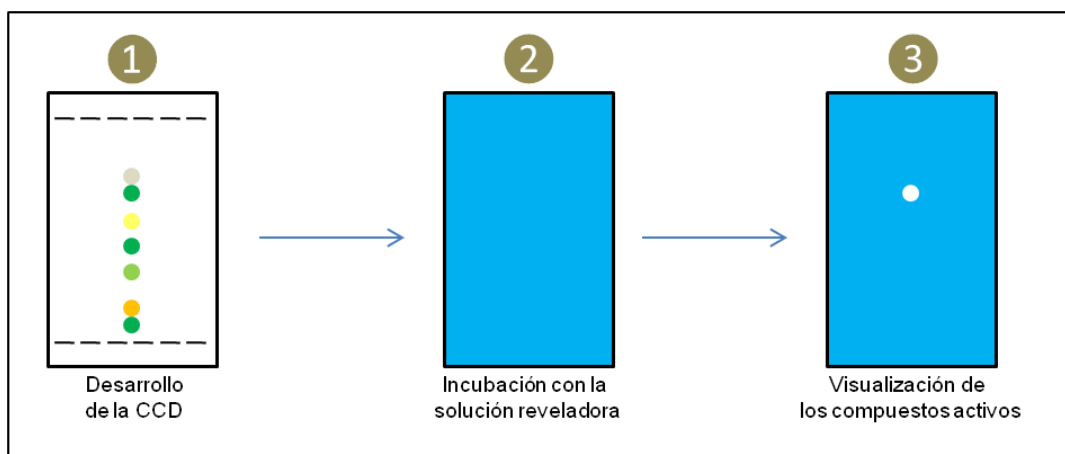


Figura 1.11

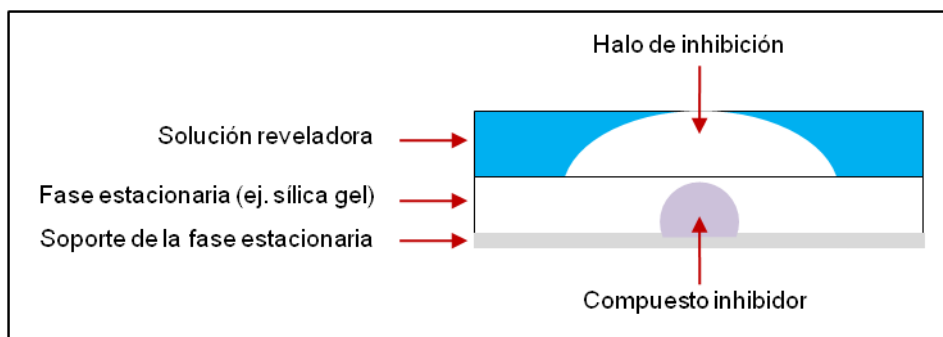


Figura 1.12

En el presente trabajo, los crudos obtenidos por las diferentes reacciones de pirólisis fueron sometidos a diversos ensayos biológicos en busca de compuestos activos. Los métodos autográficos que se emplearon se pueden clasificar como:

- Métodos autográficos que emplean enzimas:
 - Ensayo para la detección de inhibidores de β -glucosidasa
 - Ensayo para la detección de inhibidores de acetilcolinesterasa
 - Ensayo para la detección de inhibidores de xantina oxidasa
- Métodos autográficos que emplean agentes químicos:
 - Ensayo para la detección de antioxidantes basado en la captación de superóxido
 - Ensayo antioxidante basado en la captación del radical DPPH
- Métodos autográficos que emplean células enteras:
 - Ensayo para la detección de inhibidores del sistema regulador de la virulencia de *Salmonella* PhoP/PhoQ

1.12.1. Métodos autográficos que emplean enzimas

1.12.1.1. Detección de inhibidores de β -glucosidasa

Las glicosidasas son enzimas responsables de la hidrólisis de poli- y oligosacáridos en monómeros. Están involucradas en procesos biológicos tales como digestión, biosíntesis de glicoproteínas y catabolismo lisosomal de glicoconjugados. Los inhibidores de glicosidasas han sido sujeto de extenso interés por su potencial como fármacos para el tratamiento de diabetes, cáncer, infecciones virales, por citar algunas.⁷⁷ El método bioautográfico para la búsqueda de inhibidores de β -glucosidasa consiste en el depósito sobre la CCD de un gel conteniendo a la enzima y una solución de FeCl_3 . Una vez que el gel se enfría, se sumerge la placa en una solución del sustrato esculina. La enzima escinde el enlace glucosídico del sustrato esculina generando esculetina que en presencia de FeCl_3 forma un complejo marrón.⁷⁸ La reacción se ilustra en la Figura 1.13. Si un compuesto presente en la mezcla es un inhibidor de β -glucosidasa la esculina no será hidrolizada y por lo tanto no se formará el complejo coloreado observándose un halo más claro en el R_f correspondiente.

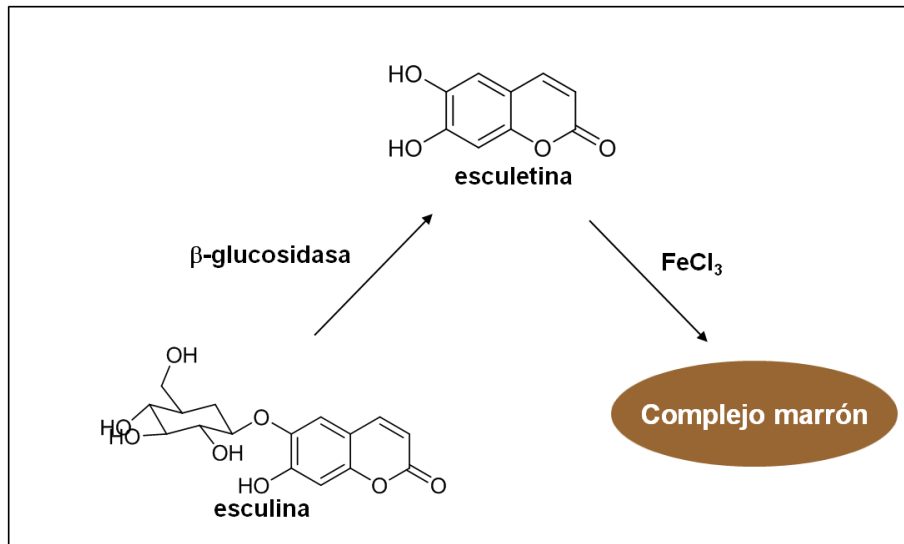


Figura 1.13

1.12.1.2. Detección de inhibidores de acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE) es un blanco terapéutico para el tratamiento de la conocida enfermedad de Alzheimer. Una de las estrategias para el tratamiento de esta enfermedad es contrarrestar el deterioro de la actividad colinérgica en el cerebro usando inhibidores de AChE. Estos compuestos no curan ni previenen la enfermedad, pero estabilizan la cantidad de acetilcolina en las sinapsis de la corteza cerebral al impedir su hidrólisis. De esta manera se prolonga el tiempo de acción de la acetilcolina en las sinapsis.⁷⁹

Existen dos bioensayos sobre placa cromatográfica disponibles para la búsqueda de inhibidores de AChE. El primero fue desarrollado por Verpoorte⁸⁰ de acuerdo al método de Ellman,⁸¹ y el segundo, por Hostettmann⁸² de acuerdo al método de van Asperen.⁸³ En el método de Ellman se emplea yoduro de acetil tiocolina (ATCI) como sustrato enzimático. El producto generado, tiocolina, es revelado por reacción con 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) para dar 5-tio-2-nitrobenzoato (color amarillo). (Figura 1.14)

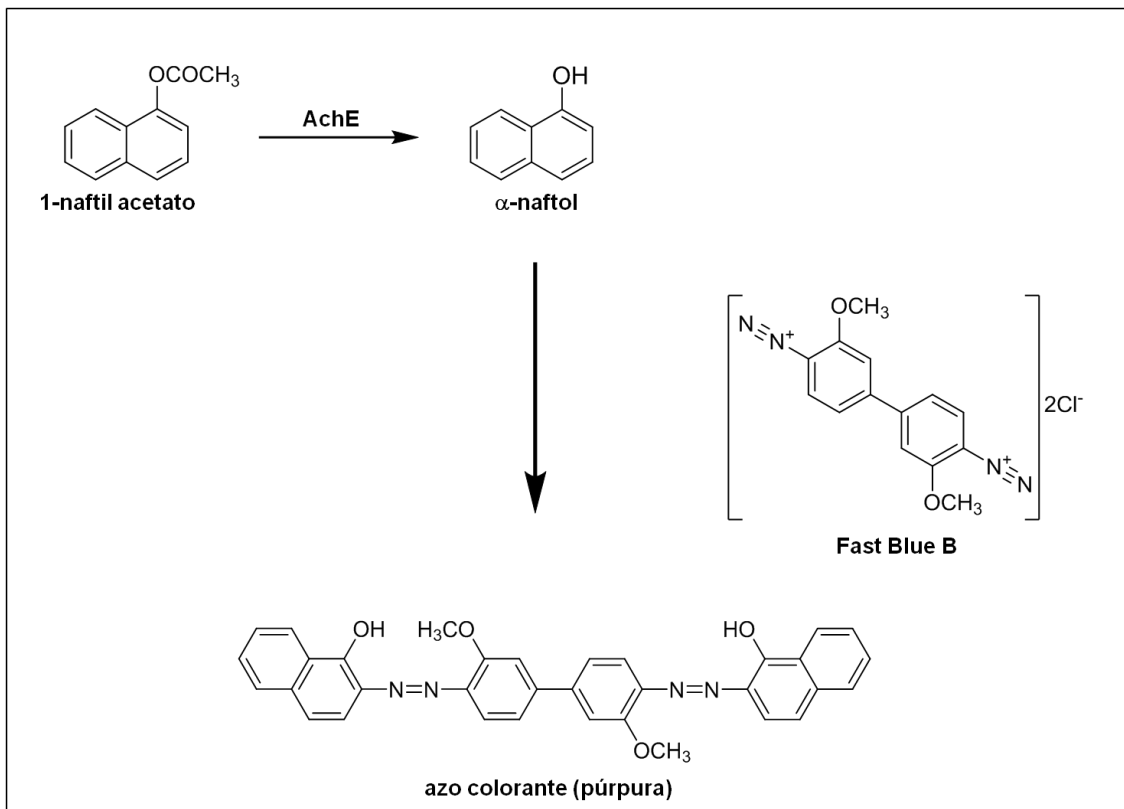


Figura 1.15

1.12.1.3. Detección de inhibidores de xantina oxidasa

La xantina oxidasa (XO) cataliza la hidroxilación *in vivo* de hipoxantina a xantina y subsecuentemente, de xantina a ácido úrico. Durante la reacción de la XO, el oxígeno molecular actúa como aceptor de electrones. La reducción parcial del oxígeno genera simultáneamente los intermediarios radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2).⁸⁴ La sobreproducción de cualquiera de los productos de la reacción catalizada por la XO (ácido úrico, H_2O_2 , o $O_2^{\cdot-}$) ha sido relacionada con varias condiciones patológicas. En otros términos, la actividad incrementada de XO es considerada como una fuente principal de estrés oxidativo. Esto es, el desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y las defensas antioxidantes del organismo.

El ácido úrico a pH fisiológico se encuentra como urato, el cual tiene una solubilidad limitada en agua. Este hecho, sumado a una producción en exceso, lleva a la formación de depósitos de cristales en varios lugares, particularmente en las articulaciones y en los riñones, desencadenando diferentes procesos patológicos.⁸⁵

Por otra parte el H_2O_2 , el $O_2^{\cdot-}$ y otros radicales libres derivados de ellos están implicados en diferentes tipos de desórdenes vasculares, incluyendo daño por hipoxia y por isquemia-reperfusión, infarto de miocardio, hipertensión y aterosclerosis.⁸⁶ Las

EROs oxidan proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y otros componentes celulares.⁸⁶ En situaciones de isquemia-reperfusión, las EROs son las principales responsables del daño en órganos transplantados o reperfundidos.^{87,88} Por todo lo mencionado, la inhibición de esta ruta enzimática tiene un importante interés terapéutico.

Una de las formas de realizar el seguimiento de la actividad de la XO es a través de la determinación de los productos de la oxidación de la xantina: ácido úrico, H_2O_2 o $O_2^{\cdot-}$. La bioautografía desarrollada para la búsqueda de inhibidores de XO se basa en la detección del $O_2^{\cdot-}$ generado empleando como revelador azul de tetrazolio (NBT). El método consiste en el depósito sobre la placa cromatográfica de un gel conteniendo una mezcla de XO y NBT. Luego, el sistema es sumergido en una solución del sustrato xantina, el cual es oxidado por la XO a ácido úrico generando $O_2^{\cdot-}$ como subproducto. Este radical reacciona con el NBT, de color amarillo transformándolo a su forma reducida formazán, de color violeta (Figura 1.16). Por lo tanto en aquellos lugares de la placa cromatográfica en donde haya ausencia de $O_2^{\cdot-}$ se observarán halos más claros respecto al resto de la bioautografía.⁸⁹

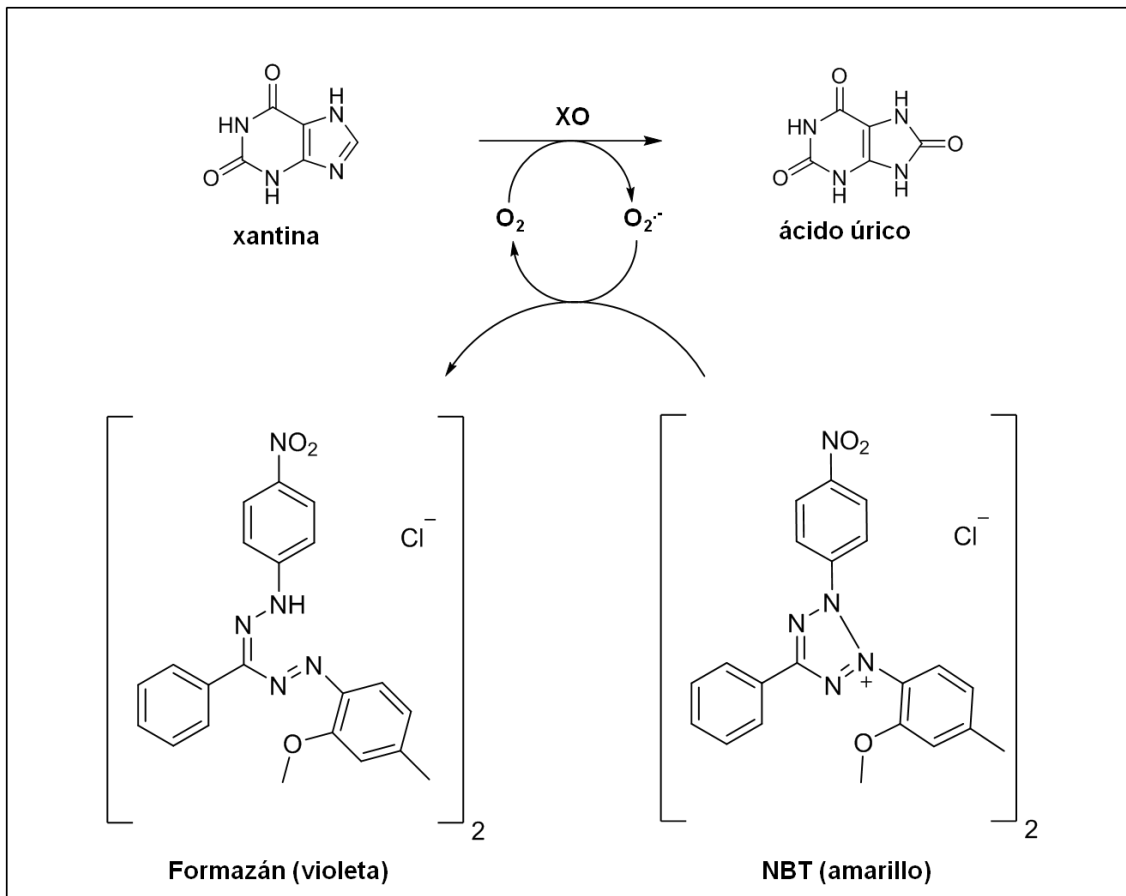


Figura 1.16

Si bien el $O_2^{\cdot-}$ es un buen indicador de la actividad de la XO, su utilización puede llevar a falsos positivos: un compuesto presente en la placa cromatográfica que sea capaz de reaccionar con $O_2^{\cdot-}$ a una velocidad similar o mayor que NBT también quedará evidenciado como una mancha clara. En este caso, el halo observado no correspondería a una disminución de la actividad enzimática sino a una disminución de la cantidad de $O_2^{\cdot-}$ del medio de reacción.

Para poder diferenciar compuestos inhibidores de XO de compuestos no inhibidores de la enzima que reaccionan con $O_2^{\cdot-}$ se puede utilizar, en paralelo al ensayo de inhibición de XO, un ensayo control en el cual el $O_2^{\cdot-}$ sea generado químicamente.

1.12.2. Métodos autográficos que emplean agentes químicos

1.12.2.1. Detección de antioxidantes captadores de superóxido

La riboflavina (RF) es un conocido fotosensibilizador que puede ser excitado con luz hacia su estado triplete $^3RF^*$. Esta última especie reacciona con oxígeno triplete (3O_2) generando superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y 1RF como productos (Figura 1.17).⁹⁰

La bioautografía basada en el sistema riboflavina/luz consiste en el depósito sobre la placa cromatográfica de un gel conteniendo una mezcla de riboflavina, colorante NBT y el catalizador N,N,N',N'-Tetrametilendiamina (TEMED). Posteriormente la placa con el gel es expuesta a la luz durante unos minutos. De esta forma la luz inicia el proceso de generación de $O_2^{\cdot-}$, cuya presencia es detectada por reacción con NBT al igual que sucedía en el ensayo de XO. Aquellos compuestos que secuestren el $O_2^{\cdot-}$ del medio se observarán en la bioautografía como puntos claros en una matriz violeta.

Por lo tanto, la bioautografía de riboflavina presenta dos utilidades:

- la primera, como ensayo de detección de compuestos antioxidantes y
- la segunda, como control del ensayo de XO. La comparación directa de este ensayo con el de XO permite diferenciar compuestos captadores de $O_2^{\cdot-}$ de inhibidores de XO. Los captadores de $O_2^{\cdot-}$ presentarán halos en el ensayo de riboflavina y en el de XO, mientras que los inhibidores lo harán solo en el ensayo de XO.

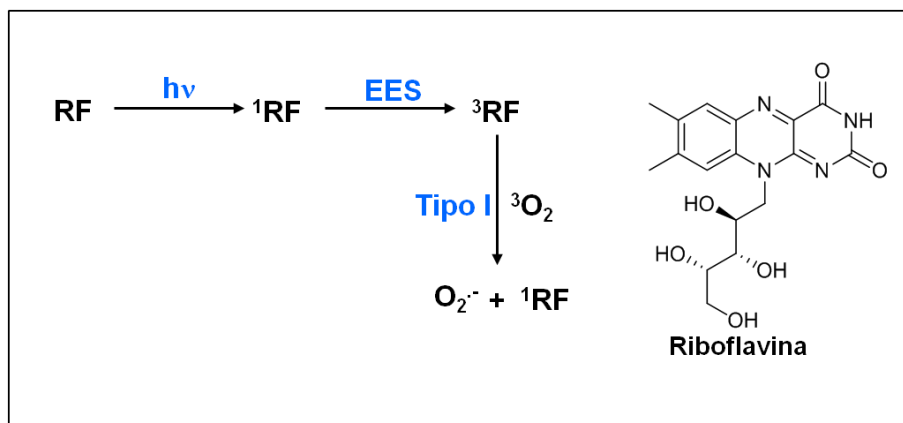


Figura 1.17

1.12.2.2. Detección de compuestos antioxidantes captadores de DPPH

El 2,2-Di (4-tert-octilfenil)-1-picril-hidrazilo (DPPH) es un radical sintético estable. Esta estabilidad es debida a la deslocalización del electrón desapareado por toda la molécula que impide la dimerización, como sucede para la mayoría de los otros radicales libres (Figura 1.18). Esta deslocalización es la responsable de originar el color violeta que lo caracteriza. Cuando una solución de DPPH se mezcla con una sustancia capaz de donar un átomo de hidrógeno, se origina la forma reducida del DPPH. La coloración violeta se pierde y prevalece la coloración amarilla del grupo picrilo presente.⁹¹

La autografía consiste en aplicar sobre el cromatograma en forma de aspersión una solución etanólica de DPPH. Luego de un determinado tiempo los compuestos antioxidantes se observarán como puntos amarillos en una matriz violeta⁹¹ (Figura 1.18).

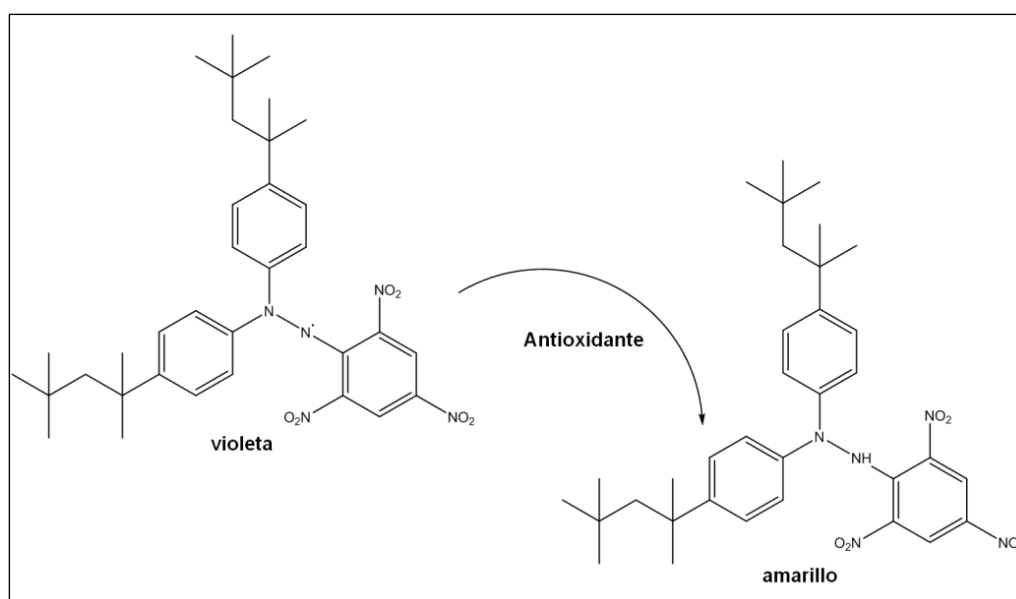


Figura 1.18

1.12.3. Métodos autográficos que emplean células enteras

1.12.3.1. Detección de represores del sistema regulador de la virulencia de *Salmonella enterica* PhoP/PhoQ

La virulencia de un patógeno debe ser entendida como todos aquellos procesos fisiológicos y moleculares que dan por resultado la invasión de un organismo hospedador llevando en última instancia al desarrollo de la enfermedad con la concomitante aparición de sus síntomas respectivos. Estos eventos suelen estar regulados mediante la expresión de diversos genes en respuesta a señales del ambiente.

Ciertos serotipos de la bacteria *Salmonella enterica* son patógenos del tracto gastrointestinal responsables de numerosas internaciones y que en algunos casos han resultado ser fatales. La capacidad de sobrevivir y replicarse en un entorno hostil por parte de este organismo recae principalmente en un sistema proteico de dos componentes conocido como PhoP/PhoQ. Estos sistemas de dos componentes consisten de una proteína localizada en la membrana de la bacteria (sensor) la cual es responsable de detectar una señal del ambiente y de una segunda proteína (regulador de respuesta) localizada en el interior celular que desencadena la activación de genes específicos. De esta manera se asocia una respuesta celular determinada a una situación externa enfrentada por un organismo. Estos sistemas están muy extendidos entre las bacterias y en eucariotas inferiores pero no están presentes en seres humanos. En nuestro caso, PhoQ es la proteína sensora, la cual se autofosforila en un residuo de histidina al sensar entornos con bajos niveles de Mg^{2+} y pH ácido. PhoQ luego fosforila a PhoP en un residuo de ácido aspártico, lo que conduce a esta proteína a participar en la expresión de un número importante de genes y en la represión de otros. Entre los genes activados por PhoP se cuentan aquellos implicados en la supervivencia en el interior de macrófagos, resistencia a pH ácido, sales biliares y péptidos microbicidas, entre otros. Esta cascada de eventos de señalización celular y regulación de la expresión génica dan como resultado el fenotipo de virulencia de la bacteria (Figura 1.19).⁹²

Resulta interesante, por lo tanto, estudiar con detalle estos sistemas dado que al no haber correlación en humanos sería posible interrumpir un proceso bacteriano de manera específica (en nuestro caso el desarrollo de virulencia) disminuyendo en gran medida interacciones con el hospedador. Hasta la fecha, se han encontrado moduladores de PhoQ como lo son ciertos ácidos grasos insaturados⁹³ y cationes divalentes⁹⁴.

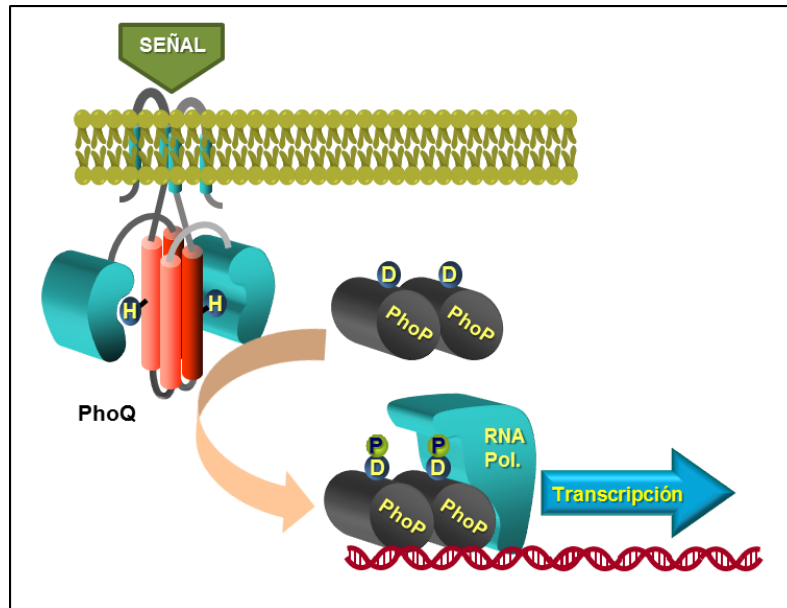


Figura 1.19

Para poder evidenciar la presencia de un compuesto inhibidor de PhoP/PhoQ en una mezcla compleja se emplea un ensayo autográfico desarrollado por los grupos de investigación de Ricardo Furlán y Eleonora García Véscovi respectivamente. En el mismo se utiliza una cepa de *Salmonella* que posee una fusión transcripcional del gen *virK*, uno de los tantos genes activados por el sistema de dos componentes, al gen *lacZ* empleado como gen reportero de la función de PhoP/PhoQ.⁹⁵ *LacZ* codifica una enzima β -galactosidasa que hidroliza el compuesto X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) en galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol. Este último se oxida espontáneamente para formar 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo insoluble, el cual presenta una coloración azul característica. La intensidad del color será mayor o menor dependiendo de la cantidad de enzima que se esté expresando. Si un compuesto de los adsorbidos en la placa cromatográfica es un inhibidor de alguno de los pasos en la ruta de señalización mediada por PhoP/PhoQ la expresión del gen reportero *lacZ* se verá afectada, observándose en el R_f del compuesto un halo de inhibición incoloro en un fondo azul (Figura 1.20).

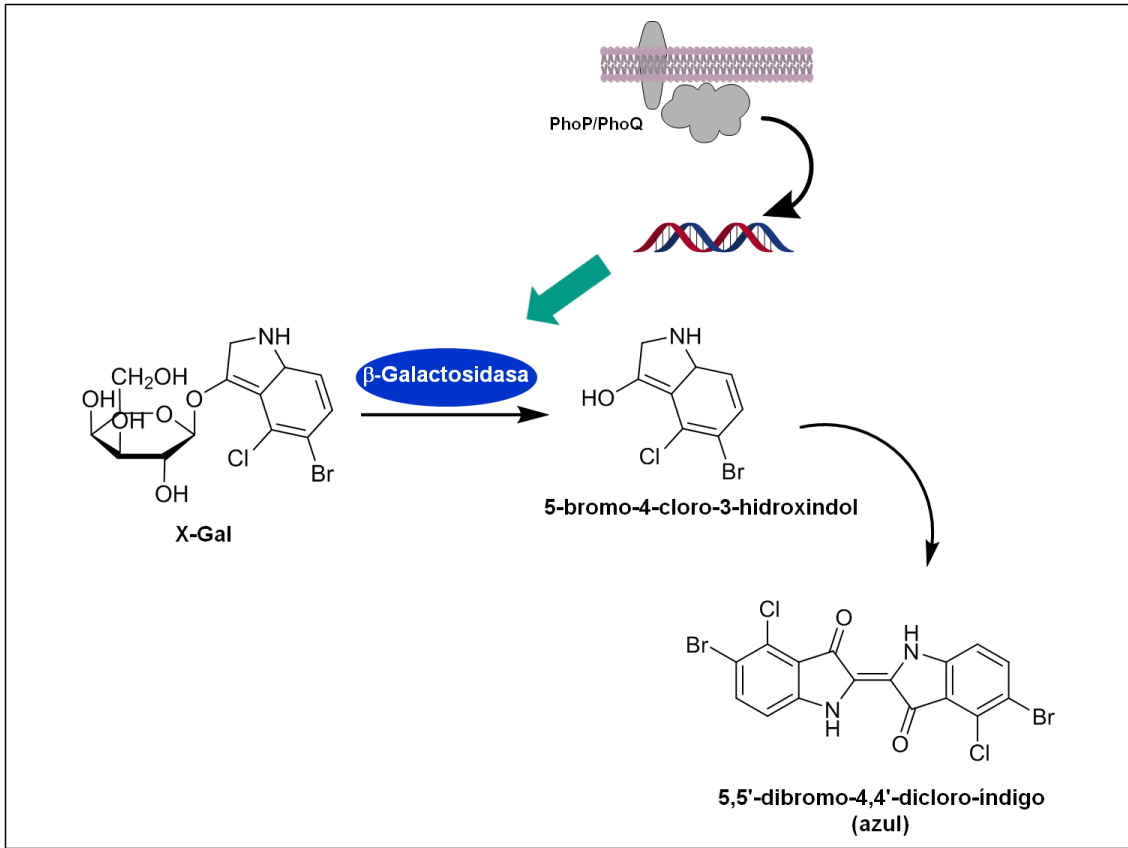


Figura 1.20

CAPÍTULO II

OBJETIVOS Y PLANEAMIENTO DEL TRABAJO

2.1. Objetivos generales

La quiralidad está íntimamente ligada a la vida, por ende la producción de sustancias enantiomericamente puras es una importante necesidad actual ya sea para su estudio en la interacción con medios biológicos, como en etapas previas en el desarrollo de unidades estructurales para su aplicación en síntesis asimétrica.

Por este motivo, definimos dos objetivos generales para este proyecto:

a.- pirólisis de biomasa como método de obtención de sustancias quirales para su aplicación en síntesis asimétrica.

b.- pirólisis de biomasa como método de obtención de estructuras moleculares para su estudio en ensayos bioguiados de actividad biológica.

Ambos objetivos se enmarcan dentro de un programa de investigación más amplio basado en la conversión de desechos o subproductos industriales en compuestos de alto valor agregado, lo que aportará una nueva alternativa a la conversión de residuos.

2.2. Objetivos específicos

La celulosa, pectina y quitina entre otros, son biopolímeros muy abundantes presentes en la biomasa, cuyas estructuras poliméricas pueden ser degradadas con el fin de obtener productos quirales de menor peso molecular.

Basados en la experiencia adquirida por el grupo de investigación en los procesos de pirólisis de materiales celulósicos, nuestros objetivos específicos en cada uno de los objetivos generales previamente definidos son:

1- síntesis de un dienófilo derivado de levoglucosenona y evaluación en reacciones de Diels-Alder. Estudio de la reacción de obtención.

2- estudio del comportamiento pirolítico de fuentes de biomasa tales como lo son cáscara y harina de soja, dos subproductos derivados de la actividad agroindustrial.

3- análisis a través de ensayos autográficos de los crudos de pirólisis para la detección de compuestos bioactivos.

4- empleo de fraccionamiento bioguiado para intentar aislar los compuestos con actividad biológica.

2.3. Planeamiento del trabajo

Para poder llevar a cabo la obtención de dienófilos derivados de **1** se planteó la introducción de un grupo nitrilo en posición 4 de la molécula. El cianoderivado resultante se evaluó por su potencial dienofílico en presencia de distintos dienos en reacciones de Diels-Alder. Se emplearon cálculos computacionales para apoyar los datos experimentales.

La obtención de los bioaceites de cáscara y harina de soja se realizó mediante pirólisis variando la temperatura y la concentración de ácido empleada para tratar las muestras antes del proceso pirolítico.

La evaluación de la actividad biológica de los bioaceites obtenidos empleando métodos enzimáticos y químicos se realizó en el laboratorio del Dr. Ricardo Furlán de la cátedra de farmacognosia de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

La evaluación del efecto represor de genes de virulencia de *Salmonella* de los bioaceites obtenidos se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra. Eleonora García Véscovi del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Condiciones generales

Las reacciones en atmósfera inerte se llevaron a cabo en ambiente de nitrógeno seco o de argón de alta pureza y se controlaron por CCD. La transferencia de los solventes y reactivos anhidros se realizó con jeringa o cánula con presión de nitrógeno seco o de argón de alta pureza. Las soluciones se evaporaron a presión reducida en evaporador rotatorio. Los criterios de pureza para las muestras fueron:

1) la aparición de una única mancha en CCD al desarrollar la muestra en diferentes sistemas de solventes.

2) el rango de punto de fusión para el caso de compuestos cristalinos.

Las transformaciones efectuadas a 0 °C se llevaron a cabo mediante el empleo de baños de hielo.

Las reacciones realizadas a altas temperaturas y a reflujo se realizaron empleando baños de silicona mediante calentamiento con planchas calefactoras. Las reacciones a reflujo se refrigeraron por circulación de agua.

3.2. Equipamiento y datos físicos

Los puntos de fusión fueron determinados en un microscopio con platina calefactora marca Ernst LeitzWetzlar modelo 350.

Los espectros de infrarrojo (IR) fueron registrados en un espectrofotómetro marca Perkin–Elmer SpectrumOne FT-IR. Las muestras sólidas se midieron como dispersiones en pastillas de bromuro de potasio (KBr), obtenidas por compresión de una mezcla sólida finamente pulverizada de aproximadamente 1 mg de muestra con 100 mg de KBr. Los aceites se determinaron formando una delgada película soportada en pastilla de cloruro de sodio (NaCl). Se informaron los valores de número de onda en unidades de cm^{-1} para las bandas más significativas del espectro. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) fueron registrados en un espectrómetro marca Bruker modelo Avance-300 DPX (300 MHz para RMN de ^1H ; 75,5 MHz para RMN de ^{13}C). Las mediciones se realizaron con la muestra disuelta en CDCl_3 a menos que se indique otro solvente. En los espectros de RMN de ^1H se utilizó la señal del tetrametilsilano como patrón de referencia interno $[\delta\text{H (TMS)}] = 0,00$ ppm. En los

espectros de RMN de ^{13}C se utilizó la señal del solvente como patrón de referencia interno [$\delta\text{C}(\text{CDCl}_3)$]= 76,9 ppm.

Los espectros de RMN de ^1H se informaron indicando los desplazamientos químicos de las señales (δ), y a continuación entre paréntesis y en este orden, se detalló la multiplicidad de la señal, las constantes de acoplamiento (J), la integración de la señal, y su asignación. Los espectros de RMN de ^{13}C se informaron indicando los desplazamientos químicos de las señales (δ) y a continuación, entre paréntesis, su asignación. Los desplazamientos químicos se informaron en unidades de partes por millón (ppm), relativas al patrón de referencia interno correspondiente, y las constantes de acoplamientos en hercios (Hz). Las abreviaturas utilizadas para indicar las multiplicidades de las señales fueron: s=singlete, sa=singlete ancho, d=doblete, dd=doble doblete, dt= doble triplete, t=triplete, q= quinteto, sext= sexteto y m=multiplote. Las señales intercambiables se identificaron con el símbolo: *.

La elucidación estructural de cada compuesto fue realizada en base a espectros de RMN de ^1H , espectros de RMN de ^{13}C y espectros en dos dimensiones de correlación homonuclear (COSY H–H, *Correlation Spectroscopy*) y heteronuclear (HSQC-Ed, *Heteronuclear Single Quantum Coherence Edited*) y HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*). Los espectros de RMN de ^{13}C corresponden a los totalmente desacoplados (BB, *Broad Band*). En varias ocasiones resultó imprescindible para la determinación certera de las estructuras moleculares, la realización de experimentos de Efecto Nuclear Overhauser (ENO ó NOE, *Nuclear Overhauser Effect*).

Los poderes rotatorios $[\alpha]_D$ fueron determinados a la longitud de onda de la línea D del sodio (589 nm) empleando un fotopolarímetro electrónico marca Jasco modelo DIP-1000. Las mediciones se realizaron con la muestra disuelta en CHCl_3 , utilizando celdas de 100 mm de longitud. Los valores de poder rotatorio se informaron precedidos del signo y seguidos de la concentración de la muestra en g/100 mL y el solvente utilizado, entre paréntesis y en este orden.

Las reacciones asistidas por radiación de microondas se llevaron a cabo en un equipo CEM Discover LabMate.

Los espectros de CG-EM fueron llevados a cabo en un equipo SHIMADZU GCMS-QP2010 Plus.

Los espectros de masa de alta resolución fueron obtenidos en un espectrómetro de masas marca Bruker modelo micrOTOF-Q II.

3.3. Cromatografías

Las cromatografías en capa delgada (CCD) se realizaron sobre placas comerciales de aluminio recubiertas con sílica gel Merck (60F254) y se desarrollaron con sistemas solventes adecuados a cada muestra. Las manchas se detectaron mediante revelado no destructivo con lámpara de luz ultravioleta (UV) de una longitud de onda de 254 nm y por rociado con solución de *p*-anisaldehído/ ácido acético/ácido sulfúrico/etanol 95% (9,2 mL; 3,75 mL; 12,5 mL; 338,0 mL) con posterior calentamiento.

Las separaciones cromatográficas en columna se realizaron sobre sílica gel Merck 60H, eluyendo con cantidades crecientes de acetato de etilo en hexano con ayuda de presión de aire comprimido. La preparación de la siembra se realizó adsorbiendo la muestra sobre sílica gel Merck 60 a partir de soluciones de diclorometano.

3.4. Reactivos, gases y solventes

Los reactivos utilizados fueron productos comerciales analíticamente puros, el manejo y disposición de los mismos se realizó de acuerdo a normas recomendadas tanto por el fabricante como por el proveedor, o lo aconsejado por las buenas prácticas de laboratorio.

Los solventes empleados como eluyentes en CCD o cromatografía en columna fueron purificados por destilación fraccionada. Los solventes usados en las reacciones químicas fueron de calidad proanálisis y en los casos necesarios se sometieron a posterior purificación⁹⁶tal como se describe a continuación:

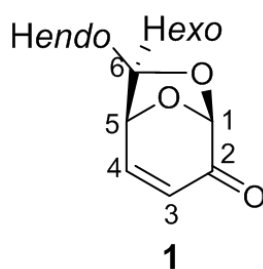
- Acetonitrilo (CH_3CN) anhidro: estacionado y destilado sobre hidruro de calcio bajo atmósfera de nitrógeno seco.
- Diclorometano (CH_2Cl_2) anhidro: destilado sobre hidruro de calcio bajo atmósfera de nitrógeno seco.
- *N,N*-Dimetilformamida (CH_3)₂NCHO) anhidra: secada sobre óxido de calcio y destilada a presión reducida.
- Éter etílico (CH_3CH_2)₂O anhidro: calentamiento a reflujo sobre sodio bajo atmósfera de nitrógeno seco en presencia de benzofenona como indicador y destilado.
- Tolueno anhidro: calentamiento a reflujo sobre sodio bajo atmósfera de nitrógeno seco en presencia de benzofenona como indicador y destilado.
- Trietilamina anhidra: secada sobre KOH y destilada bajo atmósfera de nitrógeno seco.

Los solventes anhidros se conservaron bajo atmósfera de nitrógeno seco en ampollas de Young, las que se manipularon mediante las técnicas de Schlenk.

3.5. Cálculos computacionales

Los cálculos teóricos del tipo DFT fueron realizados por el Dr. Ariel Sarotti de la Universidad Nacional de Rosario, empleando el programa Gaussian 09⁹⁷. Los valores de índice de electrofilia global (ω) y local (ω_k) fueron calculados al nivel B3LYP/6-31G*.⁹⁸ Las barreras energéticas y selectividades fueron calculados al nivel MPW1K/6-31G*, una vez localizados todos los estados de transición correspondientes a las reacciones en estudio.

3.6. Obtención de levoglucosenona (1,6-anhidro-3,4-dideoxi- β -D-glicero-hex-3-enopiranos-2-ulosa)



3.6.1. Tratamiento ácido de celulosa microcristalina

La celulosa microcristalina es sometida a un tratamiento ácido previo a la pirólisis, en el cual 120 gramos de celulosa microcristalina se suspenden en una solución de 3,2 gramos de H_3PO_4 en 600 mL de metanol, y se mantiene en agitación durante una hora y media.

Los materiales volátiles se remueven en un evaporador rotatorio bajo presión reducida y posteriormente se seca en una estufa de vacío, hasta obtener un polvo blanco fino.²⁹

3.6.2. Pirólisis de la celulosa tratada

La pirólisis se llevó a cabo de acuerdo a un protocolo publicado en la literatura.²⁹ El mismo consiste en realizar el proceso en partidas o batchs. Para cada una de ellas se pesaron 12 g de celulosa tratada con ácido en una nave de papel de aluminio la cual se introdujo en un tubo de vidrio colocado dentro del horno de pirólisis precalentado a 270 °C. Todo el sistema fue sometido a presión reducida con una trompa de agua. El tubo se colocó con una inclinación de 20° para ayudar a remover el líquido pirolizado, el cual fue recogido en un balón de vidrio colocado a la salida del horno sumergido en un baño de hielo. Al finalizar cada partida se equilibró la presión del sistema y se retiró la nave del horno. Se repitió el procedimiento para cada una de las partidas. Una vez

finalizadas las pirólisis se dejó enfriar el sistema, se desarmó el equipo y se lavaron las partes con acetato de etilo. La fase orgánica obtenida fue lavada con una solución de NaHCO₃ 5% recientemente preparada y luego con agua destilada. Posteriormente se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida, obteniéndose un condensado conteniendo levoglucosenona con un 7% de furfuraldehído. El rendimiento del crudo fue del 10% respecto a la masa de celulosa pirolizada. El crudo obtenido de la pirólisis de varias partidas fue posteriormente purificado mediante destilación a presión reducida, la cual permitió obtener levoglucosenona con un rendimiento del 70% y una pureza superior al 90%.

1: líquido amarillo

$[\alpha]_D^{25} = -562,3$ (*c* 1,04; CHCl₃). [Lit. -460,0 (*c* 1,00; CHCl₃)].³⁴

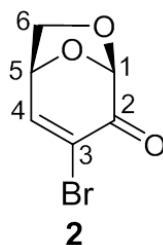
IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3631, 2966, 2899, 1712 (CO), 1693, 1379, 1107, 972, 891, 854, 831.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 7,29 (dd, $J_{3-4}=10,0$ Hz, $J_{4-5}=4,7$ Hz, 1H, H-4); 6,12 (dd, $J_{3-4}=10,0$ Hz, $J_{1-3}=1,6$ Hz, 1H, H-3); 5,36 (d, $J_{1-3}=1,6$ Hz, 1H, H-1); 5,02 (dd, $J_{4-5}=J_{5-6_{exo}}=4,7$ Hz, 1H, H-5); 3,91 (dd, $J_{gem}=6,8$ Hz, $J_{5-6_{exo}}=4,7$ Hz, 1H, H-6_{exo}); 3,78 (d, $J_{gem}=6,8$ Hz, 1H, H-6_{endo}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz), δ (ppm): 188,7 (C, C-2); 147,9 (CH, C-4); 126,7 (CH, C-3); 101,5 (CH, C-1); 71,6 (CH, C-5); 66,4 (CH₂, C-6).

3.7. Síntesis de 3 y aductos de Diels-Alder de 1 y 3 con diferentes dienos

3-bromolevoglucosenona (2)⁹⁹



Levoglucosenona (0,86 g, 6,86 mmol) se disolvió en diclorometano (17 mL) y se colocó en un baño de hielo. Luego se agregó Br₂ (aproximadamente 150 μ L) gota a gota hasta que la solución se tornó roja indicando exceso de Br₂. Seguido de esto se agregó Et₃N (1,4 mL) y se dejó que la mezcla reaccione por 30 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con agua destilada (20 mL) y se extrajo varias veces con volúmenes

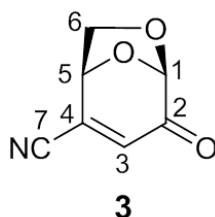
de 15 mL de diclorometano. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna para dar **2** (1,30 g, 6,34 mmol, 92%).

2: sólido incoloro. P.f.: 45-46 °C (éter etílico). [Lit.: 47-48 °C].¹⁰⁰

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 7,62 (d, $J_{4-5}= 4,7$ Hz, 1H, H-4); 5,55 (d, $J_{1-3}= 1,6$ Hz, 1H, H-1); 5,04 (dd, $J_{4-5}=J_{5-6\text{exo}}= 4,7$ Hz, 1H, H-5); 3,89 (dd, $J_{\text{gem}}= 6,8$ Hz, $J_{5-6\text{exo}}= 4,7$ Hz, 1H, H-6 exo); 3,83 (d, $J_{\text{gem}}= 6,8$ Hz, 1H, H-6 endo).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz), δ (ppm): 182,3 (C, C-2); 147,6 (CH, C-4); 122,5 (CH, C-3); 100,9 (CH, C-1); 73,5 (CH, C-5); 66,6 (CH_2 , C-6).

4-cianolevogluosenona (**3**)¹⁰¹



3-bromolevogluosenona (0,32 g, 1,57 mmol) se disolvió en agua destilada (15 mL) con agitación vigorosa. Una vez que el material de partida se disolvió completamente se agregó KCN a la solución (120,4 mg, 1,80 mmol). La reacción se completó luego de aproximadamente 10 minutos de agregada la sal de cianuro. La mezcla de reacción se extrajo varias veces con volúmenes de 15 mL de diclorometano. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. No hubo necesidad de purificación posterior para obtener **3** (88,4 mg, 0,59 mmol, 37%).

3: sólido amarillo. P.f.: 71-72 °C (éter etílico).

$[\alpha]_{\text{D}}^{19} = -410,0$ (c 1,1; CHCl_3).

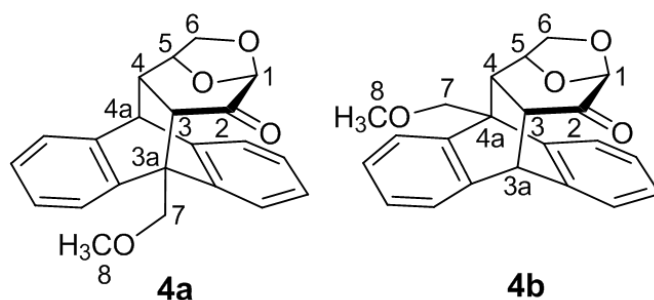
IR (KBr) ν_{max} : 2995, 2371, 2234 (CN), 1717 (CO), 1308, 1101, 1055, 970, 893, 731, 621, 559.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 6,65 (d, $J_{1-3}=1,5$ Hz, 1H, H-3); 5,43 (d, $J_{1-3}=1,5$ Hz, 1H, H-1); 5,11 (d, $J_{5-6\text{exo}}=4,3$ Hz, 1H, H-5); 4,01 (dd, $J_{\text{gem}}= 7,5$ Hz, $J_{5-6\text{exo}}= 4,3$ Hz, 1H, H-6 exo); 3,95 (d, $J_{\text{gem}}= 7,5$ Hz, 1H, H-6 endo).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz), δ (ppm): 185,3 (C, C-2); 136,5 (CH, C-3); 131,0 (C, C-4); 113,6 (C, C-7); 100,9 (CH, C-1); 73,1 (CH, C-5); 67,5 (CH_2 , C-6).

EMAR. Calculada: $[\text{M}+\text{Na}]^+174,0167$. Encontrada: $[\text{M}+\text{Na}]^+174,0172$.

Cicloadductos **4a** y **4b**⁵⁸



Una solución de levoglucosenona (**1**) (1101 mg, 8,72 mmol) y 9-metoximetilantraceno (5400 mg, 24,09 mmol) en tolueno (40 mL) se calentó a reflujo durante 6 días con agitación vigorosa. Una vez que se comprobó por CCD el consumo total de levoglucosenona, se evaporó el solvente a presión reducida y el crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna, obteniéndose **4a** (2221 mg, 6,38 mmol, 73%) y **4b** (353 mg, 1,01 mmol, 12%) con un rendimiento total de 85 % (2574 mg, 7,39 mmol). El exceso del dienose recuperó cuantitativamente y pudo ser reutilizado. La relación de aductos **4a** y **4b** fue 87/13.

4a: Sólido cristalino blanco. P.f.: 251-252 °C (CHCl₃/Hexano).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 7,50 (d, 1 H, *J*= 7,4 Hz, H-arom); 7,39 (da, 1 H, *J*= 6,8 Hz, H-arom); 7,24-7,02 (m, 6 H, H arom); 4,91 (d, 1 H, *J*_{gem}= 9,4 Hz, H-7); 4,83 (d, 1 H, *J*_{5-6exo}= 5,2 Hz, H-5); 4,63 (d, 1 H, *J*_{gem}= 9,4 Hz, H-7); 4,57 (s, 1 H, H-1); 4,30 (s, 1 H, H-4a), 3,78 (dd, 1 H, *J*_{gem}= 7,2 Hz, *J*_{5-6exo}= 5,2 Hz, H-6exo); 3,69 (d, 1 H, *J*_{gem}= 5,3 Hz, H-6endo); 3,68 (s, 3 H, H-8); 3,13 (d, 1 H, *J*₃₋₄= 9,7 Hz, H-3); 2,24 (d, 1 H, *J*₃₋₄= 9,7 Hz, H-4).

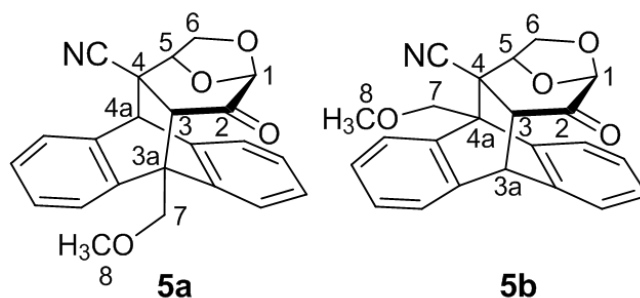
RMN ¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz), δ (ppm): 199,1 (C, C2); 145,2 (C, arom.); 141,3 (C, arom); 140,9 (C, arom); 140,6 (C, arom); 126,2 (CH, arom); 126,0 (CH, 2C, arom); 125,8 (CH, arom); 125,0 (CH, arom); 124,2 (CH, arom); 122,0 (CH, arom); 121,3 (CH, arom); 99,8 (CH, C-1); 77,1 (CH, C-5); 70,5 (CH₂, C-7); 68,7 (CH₂, C-6); 59,0 (CH₃, C-8); 50,3 (CH, C-4a); 49,8 (C, C-3a); 44,7 (CH, C-4); 44,0 (CH, C-3).

4b: Sólido cristalino blanco. P.f.: 237-238 °C (CHCl₃/Hexano).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 7,36-7,03 (m, 8H, arom); 4,88 (d, *J*_{5-6exo}= 5,4 Hz, 1H, H-5); 4,83 (d, *J*_{3-3a}= 3,4 Hz, 1H, H-3a); 4,69 (d, *J*_{gem}= 9,9 Hz, 1H, H-7); 4,64 (s, 1H, H-1); 4,62 (d, *J*_{gem}= 9,9 Hz, 1 H, H-7); 3,84 (dd, *J*_{gem}= 7,2 Hz, *J*_{5-6exo}= 5,4 Hz, 1H, H-6exo); 3,72-3,68 (m, 4H, H-6endo y H-8); 2,99 (dd, *J*₃₋₄= 9,9 Hz, *J*_{3-3a}= 3,4 Hz, 1H, H-3); 2,42 (d, *J*₃₋₄= 9,9 Hz, 1H, H-4).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz), δ (ppm): 199,0 (C, C-2); 144,5 (C, arom.); 141,5 (C, arom); 141,2 (C, arom); 140,3 (C, arom); 126,2 (CH, arom); 125,9 (CH, 3C, arom); 124,9 (CH, arom); 124,0 (CH, arom); 121,8 (CH, arom); 121,4 (CH, arom); 99,4 (CH, C-1); 72,7 (CH, C-5); 70,4 (CH_2 , C-7); 69,4 (CH_2 , C-6); 59,5 (CH_3 , C-8); 47,7 (C, C-4a); 46,3 (CH, C-3a); 45,4 (CH, C-4); 43,7 (CH, C-3).

Cicloadductos **5a** y **5b**



4-cianolevoglucosenona (**3**) (76,2 mg, 0,51 mmol) se disolvió en tolueno (2 mL). Luego 9-metoximetilantraceno (268,6 mg, 1,21 mmol) fueron agregados. La mezcla de reacción fue calentada a reflujo por 42 h. Después de completada la reacción el solvente fue evaporado a presión reducida. El crudo fue purificado por cromatografía para dar la mezcla de aductos **5a** y **5b** con unrendimiento global de 74% (139,7 mg, 0,37 mmol).

5a y **5b**: sólido amarillo

IR (film) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 2922, 2363, 2236 (CN), 1736 (CO), 1670, 1460, 1117, 980, 914, 733.

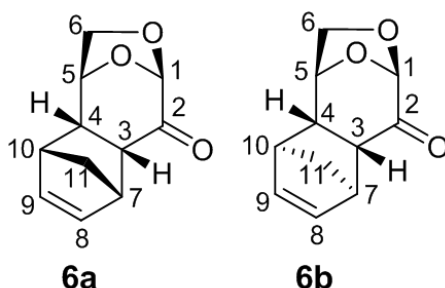
RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 7,59-7,01 (m, 16H, H-arom. de **5a** y **5b**); 5,47 (d, $J_{5-6\text{exo}} = 5,4$ Hz, 1H, H-5 de **5a**); 4,88-4,78 (m, 4H, H-3a de **5b**, H-5 de **5a**, H-7 de **5b**); 4,66-4,54 (m, 5H, H-1 de **5a**, H-4a de **5a**, H-7 de **5a**, H-1 de **5b**); 4,40-4,35 (m, 2H, H-6 endo de **5a** y **5b**); 3,95-3,90 (dd, $J_{\text{gem}} = 8,7$ Hz, $J_{5-6\text{exo}} = 5,5$ Hz, 1H, H-6 exo de **5b**); 3,88-3,84 (dd, $J_{\text{gem}} = 8,7$ Hz, $J_{5-6\text{exo}} = 5,5$ Hz, 1H, H-6 exo de **5a**); 3,75 (s, 3H, H-8 de **5b**); 3,69 (s, 3H, H-8 de **5a**); 3,34 (sa, 1H, H-3 de **5a**); 3,21 (d, $J_{3-3a} = 3,5$ Hz, 1H, H-3 de **5b**).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz), δ (ppm): 195,1 (C, C-2 de **5a** y **5b**); 141,5 (C, arom de **5b**); 141,4 (C, arom de **5a**); 141,0 (C, arom de **5a**); 140,7 (C, arom de **5b**); 140,5 (C, arom de **5b**); 139,6 (C, arom de **5a**); 138,8 (C, arom de **5a**); 138,3 (C, arom de **5b**); 127,5-121,5 (CH, arom de **5a** y **5b**); 120,3 (C, CN de **5b**); 120,2 (C, CN de **5a**); 99,1 (CH, C-1 de **5a**); 99,0 (CH, C-1 de **5b**); 77,8 (CH, C-5 de **5a**); 73,5 (CH, C-5 de **5b**); 71,2 (CH_2 , C-7 de **5b**); 69,8 (CH_2 , C-7 de **5a**); 67,9 (CH_2 , C-6 de **5b**); 67,3 (CH_2 , C-6 de

5a); 59,8 (CH₃, C-8 de **5b**); 59,2 (CH₃, C-8 de **5a**); 53,8 (CH, C-4a de **5a**); 53,4 (CH, C-3 de **5b**); 51,0 (CH, C-3 de **5a**); 50,7 (C, C-4a de **5b**); 50,3 (C, C-3a de **5a**); 48,3 (C, C-4 de **5b**); 46,7 (CH, C-3a de **5b**); 46,0 (C, C-4 de **5a**).

EMAR. Calculada: [M+Na]⁺ 396,1212. Encontrada: [M+Na]⁺ 396,1197

Cicloadductos **6a** y **6b**⁵⁷



1 (42,4 mg, 0,29 mmol) fue disuelto en diclorometano (0,6 mL) y luego se agregó ciclopentadieno (120 μ L, 1,46 mmol). La mezcla fue agitada por 4 días a temperatura ambiente y luego de ello el solvente fue evaporado a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía para dar los aductos **6a** y **6b** (40,8 mg, 0,21 mmol, 72%).

6a: sólido blanco. P.f.: 67-68 °C (éter etílico/hexano).

RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 6,23 (dd, J_{8-9} = 5,6 Hz, J_{9-10} = 3,0 Hz, 1H, H-9); 6,01 (dd, J_{8-9} = 5,6 Hz, J_{7-8} = 2,9 Hz, 1H, H-8); 4,80 (s, 1H, H-1); 4,62 (d, $J_{5-6\text{exo}}$ = 4,3 Hz, 1H, H-5); 3,84 (d, J_{gem} = 6,9 Hz, 1H, H-6 endo); 3,78 (dd, J_{gem} = 6,9 Hz, J_{5-6} = 4,3 Hz, 1H, H-6 exo); 3,38 (sa, 1H, H-7); 3,03 (sa, 1H, H-10); 3,00 (dd, J_{3-4} = 9,2 Hz, J_{3-7} = 4,5 Hz, 1H, H-3); 2,38 (dd, J_{3-4} = 9,2 Hz, J_{4-10} = 3,2 Hz, 1H, H-4); 1,46 (td, J_{gem} = 8,6 Hz, J_{7-11} = 1,8 Hz, J_{10-11} = 1,8 Hz, 1H, H-11 anti); 1,30 (d, J_{gem} = 8,6 Hz, 1H, H-11 sin).

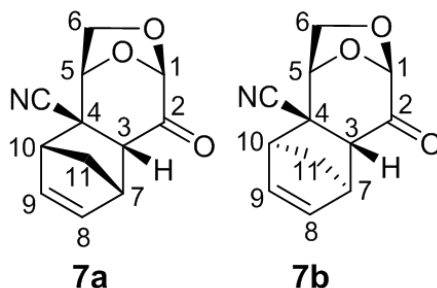
RMN¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz), δ (ppm): 200,2 (C, C-2); 135,5 (CH, C-8); 134,1 (CH, C-9); 99,3 (CH, C-1); 74,8 (CH, C-5); 70,2 (CH₂, C-6); 49,4 (CH₂, C-11); 46,9 (CH, C-7 y C-3); 46,3 (CH, C-10); 42,3 (CH, C-4).

6b: aceite incoloro; $[\alpha]_D^{21}$ = -220,8 (c 1,15; CHCl₃)

RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 6,31 (dd, J_{8-9} = 5,6 Hz, J_{9-10} = 3,0 Hz, 1H, H-9); 6,20 (dd, J_{8-9} = 5,6 Hz, J_{7-8} = 3,0 Hz, 1H, H-8); 5,05 (s, 1H, H-1); 4,81 (d, $J_{5-6\text{exo}}$ = 4,7 Hz, 1H, H-5); 3,88 (dd, J_{gem} = 7,0 Hz, J_{5-6} = 4,7 Hz, 1H, H-6 exo); 3,81 (d, J_{gem} = 7,0 Hz, 1H, H-6 endo); 3,30 (s, 1H, H-7); 2,90 (s, 1H, H-10); 2,26 (d, J_{3-4} = 8,4 Hz, 1H, H-3); 1,74-1,59 (m, 2H, H-4 y H-11 anti); 1,26 (td, J_{gem} = 9,0 Hz, J_{7-11} = 1,5 Hz, J_{10-11} = 1,5 Hz, 1H, H-11 sin).

RMN¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz), δ (ppm): 201,1 (C, C-2); 139,4 (CH, C-8); 136,3 (CH, C-9); 99,1 (CH, C-1); 76,8 (CH, C-5); 69,9 (CH₂, C-6); 48,2 (CH, C-10); 46,9 (CH, C-7); 44,9 (CH, C-3); 44,5 (CH₂, C-11); 41,9 (CH, C-4).

Cicloadductos **7a** y **7b**



3 (71,4 mg, 0,47 mmol) se disolvió en diclorometano (1 mL) y luego se agregó ciclopentadieno (200 μ L, 2,43 mmol). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente. Luego de dos horas la reacción se completó y posteriormente a ello el solvente fue evaporado a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía para dar la mezcla de los aductos **7a** y **7b** (86,8 mg, 0,40 mmol, 85%). La relación de los aductos **7a** y **7b** determinada por RMN ¹H fue **7a/7b**= 94/6.

El aducto **7a** pudo ser posteriormente recristalizado.

7a y **7b**: sólido blanco.

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 2968, 2880, 2230 (CN), 1734 (CO), 1335, 1123, 1109, 978, 908, 839, 677.

7a: sólido blanco. P.f.: 111-111,5 °C (éter etílico/hexano).

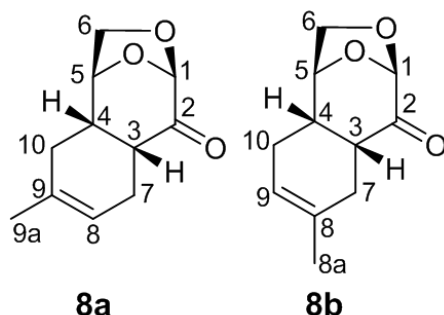
$[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -173,0$ (c 0,8, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 6.29-6,26 (m, 1H, H-9); 6,15-6,12 (m, 1H, H-8); 4,86 (s, 1H, H-1); 4,69 (d, $J_{5-6\text{exo}} = 4,9$ Hz, 1H, H-5); 4,52 (d, $J_{\text{gem}} = 8,7$ Hz, 1H, H-6endo); 3,88-3,83 (dd, $J_{\text{gem}} = 8,7$ Hz, $J_{5-6\text{exo}} = 4,9$ Hz, 1H, H-6exo); 3,55 (s, 1H, H-7); 3,42 (s, 1H, H-10); 3,26 (d, 1H, H-3); 1,90 (d, 1H, H-11*); 1,68 (d, 1H, H-11*).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz), δ (ppm): 195,5 (1C, C-2); 137,7 (1C, C-8); 133,6 (1C, C-9); 122,4 (1C, -CN); 98,7 (1C, C-1); 74,7 (1C, C-5); 68,5 (1C, C-6); 53,6 (1C, C-10); 53,0 (1C, C-3); 49,4 (1C, C-11); 48,0 (1C, C-7); 43,9 (1C, C-4).

EMAR. Calculada: [M+Na]⁺ 240,0637. Encontrada: [M+Na]⁺ 240,0642

Cicloaductos **8a** y **8b**¹⁰²



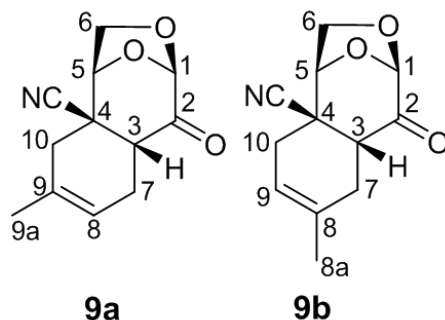
1 (0,5 mmol) se disolvió en diclorometano (1 mL) junto con el dieno (5,0 mmol) en un tubo de microondas bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción fue agitada a 150 °C hasta conversión completa de la enona (**3h**). El solvente fue reducido bajo presión reducida y el crudo fue purificado por cromatografía para dar los aductos.

8a y **8b**: sólido blanco

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 5,38-5,32 (m, 2H, H-8 de **8a** y H-9 de **8b**); 5,12 (s, 2H, H-1 de **8a** y **8b**); 4,50-4,45 (m, 2H, H-5 de **8a** y **8b**); 4,21-4,17 (m, 2H, H-6_{endo} de **8a** y **8b**); 4,05-4,00 (m, 2H, H-6_{exo} de **8a** y **8b**); 3,19 (dd, *J*=6,7 Hz, *J*=6,7 Hz, 1H, H-3 de **8b**); 3,12 (dd, *J*=7,3 Hz, *J*=6,8 Hz, 1H, H-3 de **8a**); 2,72-2,26 (m, 6H, H-4, H-7y H-10 de **8a** y **8b**), 2,08-1,84 (m, 4H, H-7y H-10 de **8a** y **8b**); 1,69 (s, 3H, H-8a de **8b**); 1,64 (s, 3H, H-9a de **8a**).

RMN¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz), δ (ppm): 202,1 (C, C-2 de **8a**); 202,0 (C, C-2 de **8b**); 131,5 (C, C-9 de **8a**); 130,9 (C, C-8 de **8b**); 118,6 (CH, C-9 de **8a**); 117,8 (CH, C-8 de **8b**); 101,6 (CH, C-1 de **8a**); 101,5 (CH, C-1 de **8b**); 77,1 (CH, C-5 de **8a**); 77,0 (CH, C-5 de **8b**); 67,2 (CH₂, C-6 de **8b**); 67,2 (CH₂, C-6 de **8a**); 41,0 (CH, C-4 de **8a**); 40,3 (CH, C-4 de **8b**); 38,7 (CH, C-3 de **8b**); 37,5 (CH, C-3 de **8a**); 28,9 (CH₂, C-10 de **8a**); 25,0 (CH₂, C-7 de **8b**)*; 24,4 (CH₂, C-10 de **8b**)*; 23,5 (CH₃, C-9a de **8a**); 23,2 (CH₃, C-8a de **8b**); 20,6 (CH₂, C-7 de **8a**).

Cicloaductos **9a** y **9b**



3 (51,9 mg, 0,344 mmol) se disolvió en diclorometano (0,9 mL) junto con el dieno (350 μ L, 3,5 mmol) en un tubo de microondas bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción fue agitada a 150 °C hasta conversión completa de la enona (20 minutos). El solvente fue evaporado bajo presión reducida y el crudo fue purificado por cromatografía para dar la mezcla de aductos **9a** y **9b** (51,5 mg, 0,23 mmol, 68%).

9a y **9b**: aceite incoloro.

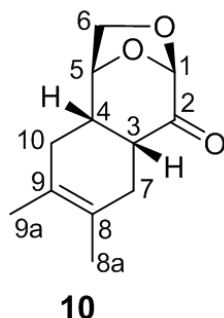
IR (film) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 2970, 2911, 2356, 2239 (CN), 1788 (CO), 1744, 1721, 1445, 1117, 1101, 968, 889.

RMN¹H (CDCl_3), δ (ppm): 5,47 (sa, 1H, H-9 de **9b**); 5,34 (sa, 1H, H-8 de **9a**); 5,17 (s, 2H, H-1 de **9a** y **9b**); 4,58-4,53 (m, 4H, H-5 y H-6*endo* de **9a** y **9b**); 4,17-4,12 (m, 2H, H-6*exo* de **9a** y **9b**); 3,32 (d, $J=7,62$ Hz, 1H, H-3 de **9b**); 3,26 (d, $J=7,56$ Hz, 1H, H-3 de **9a**); 2,76-2,60 [(m, 4H, H-7 de **9a**, H-7 de **9b**; H-10 de **9a**, H-10 de **9b**)]*; 2,37-2,16 [(m, 4H, H-7 de **9a**, H-7 de **9b**, H-10 de **9a**, H-10 de **9b**)]*; 1,74 (s, 3H, H-8a de **9b**); 1,69 (s, 3H, H-9a de **9a**).

RMN¹³C (CDCl_3 , 75,5 MHz), δ (ppm): 196,6 (C, C-2 de **9a** y **9b**); 131,8 (C, C-8 de **9b**); 128,5 (C, C-9 de **9a**); [119,9 (C, -CN de **9a**); 119,8 (C, -CN de **9b**)]*; 118,3 (CH, C-8 de **9a**); 115,4 (CH, C-9 de **9b**); [101,3 (CH, C-1 de **9a**); 101,2 (CH, C-1 de **9b**)]*; [77,4 (CH, C-5 de **9a**); 77,2 (CH, C-5 de **9b**)]*; 66,3 (2CH₂, C-6 de **9a** y **9b**); 43,0 (C, C-4 de **9a**); 42,2 (C, C-4 de **9b**); 41,8 (CH, C-3 de **9b**); 40,7 (CH, C-3 de **9a**); 32,7 (CH₂, C-10 de **9a**); 28,5 (CH₂, C-10 de **9b**); 23,6 (CH₂, C-7 de **9b**); 23,2 (CH₃, C-8a de **9b**); 23,1 (CH₃, C-9a de **9a**); 19,3 (CH₂, C-7 de **9a**).

EMAR. Calculada: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 254,0793. Encontrada: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 254,0799

Cicloadducto **10**¹⁰²



1 (0,5 mmol) se disolvió en diclorometano (1 mL) junto con el dieno (5,0 mmol) en un tubo de microondas bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción fue agitada a 150 °C hasta conversión completa de la enona (2h). El solvente fue reducido bajo presión reducida y el crudo fue purificado por cromatografía para dar **10**.

10: sólido blanco. P.f.: 65-66 °C (hexano/acetato de etilo).

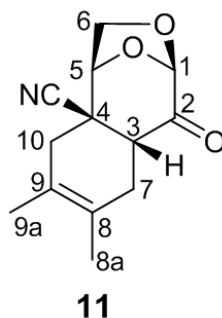
$[\alpha]_{D=}$ -1,7 (c 1,3; CHCl₃).

IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 2967, 2905, 2860, 1737 (CO), 1443, 1281, 1115, 1076, 981, 951, 908, 895, 828, 690.

RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 5,10 (s, 1H, H-1); 4,47 (d, $J_{5-6exo}=5,0$ Hz, 1H, H-5); 4,17 (dd, $J_{gem}=7,5$ Hz, $J=0,8$ Hz, 1H, H-6endo); 4,01 (dd, $J_{gem}=7,5$ Hz, $J_{5-6exo}=4,9$ Hz, 1H, H-6exo); 3,12 (dd, $J=6,8$ Hz, $J=6,8$ Hz, 1H, H-3); 2,55 (d, $J=18,1$ Hz, 1H, H-7); 2,48-2,30 (m, 2H, H-4 y H-10); 2,04-1,85 (m, 2H, H-7y H-10); 1,64 (s, 3H, H-8a); 1,60 (s, 3H, H-9a).

RMN¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz), δ (ppm): 202,2 (C, C-2); 123,2 (C, C-9); 122,6 (C, C-8); 101,5 (CH, C-1); 77,0 (CH, C-5); 67,2 (CH₂, C-6); 41,1 (CH, C-4); 38,8 (CH, C-3); 30,5 (CH₂, C-10); 26,7 (CH₂, C-7); 19,0 (CH₃, C-9a); 18,6 (CH₃, C-8a).

Cicloadducto 11



3 (61,4 mg, 0,4 mmol) se disolvió en diclorometano (0,7mL) junto con el dieno (2,12mmol) en un tubo de microondas bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción fue agitada a 150 °C hasta conversión completa de la enona (10 minutos). El solvente fue reducido bajo presión reducida y el crudo fue purificado por cromatografía para dar **12** (78,5 mg, 0,34 mmol, 79%).

11: aceite marrón.

$[\alpha]_{D=20} +2,6$ (*c* 1,0; CHCl₃).

IR (film) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 2913, 2237 (CN), 1790, 1746 (CO), 1447, 1115, 957, 907.

RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 5,16 (s, 1H, H-1); 4,57 (d, $J_{5-6\text{exo}} = 4,9$ Hz, 1H, H-5); 4,54 (d, $J_{\text{gem}} = 8,7$ Hz, 1H, H-6_{endo}); 4,14 (dd, $J_{\text{gem}} = 8,7$ Hz, $J_{5-6\text{exo}} = 4,9$ Hz, 1H, H-6_{exo}); 3,26 (d, $J_{3-7} = 7,6$ Hz, 1H, H-3); 2,77 (d, $J_{\text{gem}} = 17,6$ Hz, 1H, H-10); 2,63 (d, $J_{\text{gem}} = 18,0$ Hz, 1H, H-7*); 2,28-2,15 (m, 2H, H-7*, H-10); 1,70 (s, 3H, H-8a); 1,64 (s, 3H, H-9a).

RMN¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz), δ (ppm): 196,7 (C, C-2); 123,5 (C, C-9); 120,4 (C, C-8); 120,0 (C, -CN); 101,2 (CH, C-1); 77,2 (CH, C-5); 66,3 (CH₂, C-6); 43,1 (C, C-4); 41,7 (CH, C-3); 34,1 (CH₂, C-10); 25,2 (CH₂, C-7); 18,9 (CH₃, C-8a); 18,7 (CH₃, C-9a).

EMAR. Calculada: [M+Na]⁺ 256,0950. Encontrada: [M+Na]⁺ 256,0954.

3.8. Tratamiento ácido de cáscara y harina de soja

Aproximadamente 100 g de cáscara o harina de soja (Bunge) se disolvieron en aproximadamente 1 L de solución acuosa de H₃PO₄ 1% o 10%.

3.9. Pirólisis de biomasa

Las muestras fueron pirolizadas de acuerdo a un protocolo ya empleado anteriormente²⁹. 6 lotes de aproximadamente 2g de cada muestra empleada se depositaron en un contenedor de aluminio y luego en un tubo que fue colocado dentro

de un horno eléctrico marca O.R.L. modelo Apolo. A su vez se efectuó vacío al tubo con una trompa de agua.

Las muestras se mantuvieron por un lapso de 15 a 20 minutos a cada una de las temperaturas preestablecidas.

3.10. Extracciones con solventes de cáscara y harina de soja

Aproximadamente 12g de muestra se suspendieron en 70 mL de solvente, comenzando con hexano, siguiendo con cloroformo y terminando con metanol. La muestra se colocó a reflujo por 40 minutos, repitiéndose el procedimiento tres veces para cada solvente.

3.11. Experimentos de RMN ¹H

A fin de poder efectuar mejores comparaciones, los espectros de RMN ¹H de cada una de las muestras se obtuvieron disolviendo aproximadamente 30 mg de las mismas en 0,5mL de CDCl₃. Además, todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando el mismo número de escaneos (64) y el mismo ancho espectral (13 ppm).

3.12. Ensayo de inhibición de β-glucosidasa^{78,103}

Soluciones de trabajo

_ *Buffer acetato de sodio 100 mM; pH 5,00*: 4,08 g de AcONa se disolvieron en 500mL de agua destilada, se ajustó a pH 5,00 con ácido acético glacial y se llevó a volumen con agua destilada. La solución se almacenó a 2°C.

_ *Solución de FeCl₃.6H₂O (5% P/V)*: 5 g de FeCl₃.6H₂O se disolvieron en 100 mL de buffer AcONa (pH 5,00) 100 mM.

_ *Solución de esculina (0,2 mg/mL)*: 160 mg de esculina se sonicaron hasta disolución en 80 mL de buffer AcONa (pH 5,00) 100 mM.

_ *Solución de β-glucosidasa (2,5 U/mL)*: 25 U de β-glucosidasa se disolvieron en 10 mL de buffer AcONa (pH 5,00) 100 mM. La solución se almacenó refrigerada a 2°C.

Solución reveladora

0,0525 g de agar se disolvieron a 80°C en 7,5 mL de buffer AcONa (pH 5,00) 100 mM. La solución resultante se enfrió hasta 50 °C. A esta temperatura se agregaron 0,9 mL de solución de FeCl₃.6H₂O 5% P/V, y 25 μL de solución de β-glucosidasa (2,5 U/mL) mezclando por inversión suave.

Procedimiento

La solución reveladora, a una temperatura de 55 °C, se distribuyó homogéneamente sobre toda la superficie del cromatograma generando una capa de espesor uniforme. Una vez gelificada la placa se incubó durante 120 minutos a 37 °C en cajas de Petri cerradas para evitar la deshidratación del gel.

Transcurrido ese tiempo se sumergió en una solución de esculina a 37 °C durante otros 120 minutos.

3.13. Ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa¹⁰³

Soluciones de trabajo

_ *Buffer fosfato Tris-HCl; 50 mM; pH 8,00*: 6,06 g de Tris-HCl se disolvieron en 800mL de agua destilada, se ajustó a pH 8,00 con HCl 0,1 N y se llevó a volumen de 1000mL con agua destilada. Se almacenó a -20 °C.

_ *Solución de acetato de naftilo (2,5 mg/mL)*: 7,5 mg de acetato de naftilose disolvieron en 3 mL de etanol. La solución se preparó antes de usar.

_ *Solución de AchE (3 U/mL) - BSA (1 mg/mL) para rociado*: 10 mg de BSA y 30 U de AChE se disolvieron en 10 mL de Tris-HCl. Se almacenó a -20 °C.

_ *Solución de 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (1 mM)*: 3,9 mg de DTNB se disolvieron en 10mL de Tris-HCl. La solución se preparó momentos antes de ser utilizada.

_ *Solución de Fast Blue B (FB) (2,5 mg/mL)*: 30 mg de FB se disolvieron en 12 mL de agua destilada. La solución se preparó momentos antes de ser utilizada.

_ *Solución de ioduro de acetiltiocolina (ATCI) (1 mM)*: 2,7 mg de ATCI se disolvieron en 10 mL de Tris-HCl. La solución se preparó momentos antes de ser utilizada.

_ *Solución de α -naftol (1,7 mg/mL)*: 1mg de α -naftol se disolvió en 0,6 mL de agua destilada con una gota de etanol.

3.13.1. Método de Hostettmann^{82,103}

Solución reveladora

0,0875 g de agar se disolvieron a 80 °C en 8,2 mL de buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8,00). La solución resultante se enfrió hasta 50 °C y se agregaron 260 μ L de la solución de AChE 50,35 U/mL mezclando por inversión suave.

Procedimiento

La placa cromatográfica se roció con una mezcla 1:4 de acetato de naftilo:FB. Luego de 5 minutos los 13,6 mL de la solución reveladora, a una temperatura de 50 °C, se distribuyeron homogéneamente sobre toda la superficie del cromatograma (8,0 cm x 10 cm) generando una capa de espesor uniforme. La placa se incubó por 20 minutos a 37 °C en cajas de Petri cerradas.

3.13.2. Variante de Li del método de Hostettmann¹⁰⁴

Solución reveladora

0,0875 g de agar se disolvieron a 80 °C en 8,2 mL de buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8,00). La solución resultante se enfrió hasta 50 °C y se agregaron 260 µL de la solución de AChE 50,35U/mL mezclando por inversión suave.

Procedimiento

La placa cromatográfica se roció con una mezcla 3:1 de acetato de naftilo:FB. Luego de 5 minutos los 13,6 mL de la solución reveladora, a una temperatura de 50°C, se distribuyeron homogéneamente sobre toda la superficie del cromatograma (8,0 cm x 10 cm) generando una capa de espesor uniforme. La placa se incubó por 20 minutos a 37 °C en cajas de Petri cerradas.

3.13.3. Método de Verpoorte^{80,103}

La placa cromatográfica se roció con una mezcla 1:1 de ATCI/DTNB y luego de 5 minutos se roció con la solución de AChE-BSA. La placa se leyó luego de 15 minutos de iniciada la reacción enzimática.

Control de falsos positivos

La placa cromatográfica se roció con DTNB y posteriormente con ioduro de tiocolina. La placa se leyó luego de 5 minutos de iniciada la reacción.

3.14. Ensayo de inhibición de xantina oxidasa (XO)^{89,103}

Soluciones de trabajo

_ *Buffer fosfato (K_2HPO_4/KH_2PO_4) 200 mM; pH 8,00:* 38,84 g de K_2HPO_4 se disolvieron en 800 mL de agua destilada, el pH de la solución se ajustó a 8,00 con HCl 0,1 N y el volumen de la solución se llevó a 1000mL con agua destilada (solución stock 200 mM). Una solución 50 mM se preparó diluyendo 1:4 la solución 200 mM con agua destilada. La solución se almacenó a 2 °C.

_ *Solución de EDTA (10 mM)*: 380 mg de EDTA se disolvieron en 100 mL de buffer fosfato (pH 7,90) 50 mM. La solución se almacenó a 2 °C.

_ *Solución de NBT (5,58 mg/mL)*: 558 mg de NBT se disolvieron en 100 mL de buffer fosfato (pH 7,90) 50 mM. La solución se almacenó en la oscuridad y refrigerada a 2 °C.

_ *Solución de xantina (1,5 mM)*: 22,8 mg de xantina se agregaron a 50 mL de buffer fosfato (pH 8,00) 50 mM en ebullición. La mezcla se dejó en ebullición hasta disolución completa de la xantina y se diluyó con 50 mL de buffer fosfato (pH 7,90) 50mM. La solución de xantina se preparó momentos antes de usarse.

_ *Solución de XO (5 U/mL)*: 9 µL de XO 23,44 U/mL se diluyeron en 100 µL de buffer fosfato (pH 8,00) 200 mM.

Solución reveladora

0,044 g de agar se disolvieron a 80 °C en una mezcla compuesta por 1,2 mL de buffer fosfato (pH 8,00) 200 mM, 0,45 mL de solución de EDTA 10 mM y 2,4 mL de agua destilada. La solución resultante se enfrió hasta 55°C. A esta temperatura se agregaron 187,5 µL de solución de NBT 5,58 mg/mL mezclando por inversión suave. Se dejó enfriar la solución hasta 50 °C y se agregó la solución de xantina oxidasa y 9 µL de TEMED mezclando nuevamente por inversión suave.

Procedimiento

La solución reveladora, a una temperatura de 50 °C, se distribuyó homogéneamente sobre toda la superficie del cromatograma (8,0 cm x 10 cm) generando una capa de espesor uniforme. Una vez gelificada la placa se sumergió en una solución de xantina 1,5 mM y se mantuvo a 37 °C por 30 minutos.

3.15. Ensayo de captación de superóxido empleando riboflavina^{90,103}

Soluciones de trabajo

_ *Buffer fosfato (K_2HPO_4/KH_2PO_4) 200 mM; pH 8,00*: 38,84 g de K_2HPO_4 se disolvieron en 800 mL de agua destilada, se ajustó a pH 8,00 con HCl 0,1 N y se llevó hasta un volumen de 1000 mL con agua destilada (solución stock 200 mM).

Una solución 50 mM se preparó diluyendo 1:4 la solución 200 mM con agua destilada. La solución se almacenó a 2 °C.

_ *Solución de EDTA (10 mM)*: 380 mg de EDTA se disolvieron en 100 mL de buffer fosfato (pH 8,00) 50 mM. La solución se almacenó a 2 °C.

_ *Solución de NBT (5,58 mg/mL)*: 558 mg de NBT se disolvieron en 100 mL de buffer fosfato (pH 8,00) 50 mM. La solución se almacenó en la oscuridad y refrigerada a 2 °C.

_ *Solución de riboflavina (3,75 mg/mL)*: 375 mg de riboflavina se suspendieron en 100 mL de agua destilada. La solución se almacenó en la oscuridad y refrigerada a 2°C.

Solución reveladora

0,044 g de agar se disolvieron a 80 °C en una mezcla compuesta por 1,2 mL de buffer fosfato (pH 8,00) 200 mM, 0,45 mL de solución de EDTA 10 mM y 2,4 mL de agua destilada. La solución resultante se enfrió hasta 55°C. A esta temperatura se agregaron 187,5 µL de solución de NBT 5,58 mg/mL, 16 µL de suspensión de riboflavina 3,75 mg/mL y 9 µL de TEMED mezclando por inversión suave.

Procedimiento

La solución reveladora, a una temperatura de 55 °C, se distribuyó homogéneamente sobre toda la superficie del cromatograma (8,0 cm x 10 cm) generando una capa de espesor uniforme. Una vez gelificada en la oscuridad la reacción se inició situando la placa a 10 cm de una lámpara fluorescente 20-W donde se dejó por 5 minutos.

3.16. Ensayo de captación de DPPH

3.16.1. Ensayo autográfico^{91,103}

Solución reveladora

_ *Solución de DPPH (0,4 mg/mL)*: 1,6 mg de DPPH se disolvieron en 4 mL de etanol. La solución se preparó momentos antes de usarse.

Procedimiento

La solución de DPPH se roció hasta saturación sobre las placas cromatográficas. Inmediatamente después del rociado las mismas se situaron bajo corriente de aire para eliminar el etanol y evitar la desorción de los compuestos de la CCD por eventuales gotas que quedaran sobre la superficie. La lectura del ensayo se realizó a los 5 minutos de iniciada la reacción.

3.16.2. Ensayo de cuantificación^{91b}

A 210 μL de solvente (metanol) se agregaron 50 μL de crudo o estándar de diferente concentración. Se midió la absorbancia de la mezcla o estándar (Abs blanco). Luego se agregaron 10 μL de DPPH 1,55 mM para alcanzar una concentración de DPPH de 57 μM en cada uno de los pocillos de la microplaca. Se incubó a 37 °C por 30 minutos en la oscuridad y se midió nuevamente Abs. Se realizaron 3 mediciones por cada concentración y se incluyó un control reemplazando el volumen de crudo o estándar por igual volumen de metanol.

Concentraciones finales (en pocillo) de muestra empleadas ($\mu\text{g/mL}$): 1, 5, 10, 20, 50, 100.

Concentraciones finales (en pocillo) de estándar empleadas ($\mu\text{g/mL}$): 1, 5, 10, 20, 50, 92,5.

Variante por incremento de la concentración de reactivo

A 260 μL de una solución 133 μM de DPPH en metanol se agregaron 10 μL de crudo o estándar de diferente concentración (concentración final de DPPH: 128 μM). Se incubó a 37 °C por 30 minutos en la oscuridad y se midió absorbancia. Se realizaron 3 mediciones por cada concentración y se incluyó un control reemplazando el volumen de crudo o estándar por igual volumen de metanol.

Para el caso de los blancos se reemplazó el volumen de solución de DPPH por igual volumen de metanol.

Concentraciones finales (en pocillo) de muestra y estándar empleadas ($\mu\text{g/mL}$): 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200.

Los resultados se expresan como medias de dos ensayos independientes.

3.17. Ensayos de inhibición del sistema PhoP/PhoQ en *Salmonella*

3.17.1. Cepas bacterianas empleadas en los distintos ensayos

CEPA	GENOTIPO
MS14028s	<i>Salmonella entericaserovar</i> Typhimurium
PB2069 ⁹⁴	14028s Δ phoPQ:: <i>Sp</i> ^R
PB2790 ¹⁰⁵	14028s <i>virK</i> ::MudJ (14028s <i>virK</i> ::lacZ)
PB3062 ¹⁰⁶	14028s <i>tppB</i> ::MudJ (14028s <i>tppB</i> ::lacZ)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsd SB(rB ⁻ mB ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
<i>Serratiamarcescens</i> RM66262 ¹⁰⁷	Aislado clínico no pigmentado.
<i>Bacillus subtilis</i>	trpC2 pheA1 amyE:: <i>[pdes(-269 to +31)-lacZ]</i>

3.17.2. Ensayo autográfico⁹⁵

Solución reveladora

Se preparó un *overlay* con agar *soft* (medio LB 0,6% agar) con agregado de X-gal (*bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside*) conteniendo 5.10⁶ UFC.mL⁻¹ de la cepa empleada de *Salmonella* Typhimurium. Esta cepa expresa una fusión transcripcional a *lacZ* del gen representativo *virK* activado por PhoP (14028s *virK*::lacZ).

Procedimiento

La solución reveladora, se distribuyó homogéneamente sobre toda la superficie del cromatograma (8,0 cm x 10 cm) generando una capa de espesor uniforme. Una vez gelificada, las placas se incubaron en placas de Petri estériles a 37 °C por 18 h.

La inhibición de la expresión del gen reportero de PhoP se detectó como halos incoloros en un fondo celeste (otorgado por la hidrólisis de X-gal) con una turbidez propia del crecimiento bacteriano. La inhibición del crecimiento bacteriano se detectó como un halo incoloro sobre un fondo celeste pero sin turbidez.

3.17.3. Ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano

El efecto sobre el crecimiento ejercido por los distintos compuestos ensayados fue determinado creciendo una cepa "*wild type*" de las cepas indicadas en cada caso en caldo Luria Bertani (LB). El ensayo fue llevado a cabo en microplacas de 96 pocillos estériles. Las placas fueron incubadas por 18 h con agitación a 37 °C y la densidad óptica fue medida a 630 nm (*A*₆₃₀) empleando el lector de microplacas BioTek Synergy 2. El efecto sobre el crecimiento fue observado monitoreando la *A*₆₃₀ durante el tiempo de estudio a las concentraciones de compuesto indicadas.

3.17.4. Ensayos de actividad β -galactosidasa

Soluciones y solventes de trabajo

- Buffer Z:
 - 16,1 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 5,5 g/L de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 - 0,75 g/L de KCl
 - 0,246 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 0,27 % v/v de β -mercaptoetanol
- SDS 0,1%
- ONPG (4 mg/mL en buffer Z)
- Na_2CO_3 1 M
- CHCl_3

Las bacterias con fusiones transcripcionales de *lacZ* a diversos genes fueron crecidas durante toda la noche con agitación a 37 °C en medio LB y cada uno de los compuestos a las concentraciones indicadas.

En un tubo de hemólisis se agregaron:

- 275 μL de buffer Z
- 14 μL de SDS 0,1%
- 24 μL de CHCl_3
- 30 μL de cultivo bacteriano
- 60 μL de ONPG 4 mg/mL en buffer Z

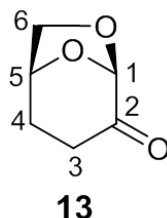
Estos agregados se hicieron por duplicado para cada experimento. Luego de los mismos, los tubos se agitaron en vórtex y se determinó el tiempo al cual apareció coloración amarilla debida a la hidrólisis de ONPG por parte de la enzima β -galactosidasa. A este tiempo se agregaron 150 μL de Na_2CO_3 para terminar la reacción.

Posteriormente se determinó la absorbancia de 200 μL de la mezcla de reacción a 405 nm y además la absorbancia a 600 nm de 200 μL de los cultivos bacterianos crecidos ON en las condiciones indicadas en cada caso.

La actividad β -galactosidasa fue determinada teniendo en cuenta estos valores de abs y el tiempo al cual se desarrolló la coloración amarilla producto de la reacción en acuerdo a lo descrito en la literatura.¹⁰⁸

3.18. Síntesis de derivados de levoglucosenona para ensayos de sobre *Salmonella Thyphimurium*

Cetona **13**^{110a}



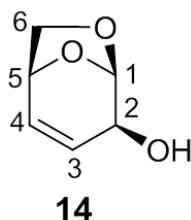
A una solución de **1** (1100 mg, 8,73 mmol) en AcOEt (15 mL), Pd/C 10% fue agregado (110 mg). El sistema fue purgado tres veces con ciclos de vacío-H₂. La reacción fue mantenida bajo atmósfera de H₂ durante 5h hasta el consumo total del material de partida revelado por CCD. La solución resultante fue filtrada sobre celite y el solvente fue evaporado a presión reducida, obteniéndose **13** (1100 mg, 8,59 mmol) con un rendimiento de 98%.

3: aceite incoloro. $[\alpha]_D^{25} = -224,9$ (c 0,6, CHCl₃). [Lit. $[\alpha]_D = -253,6$ (c 0.01; CHCl₃)]. ^{110b}

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 5,09 (s, 1H, H-1); 4,70 (sa, 1H, H-5); 4,04 (d, 1H, $J_{5-6} = 6,0$ Hz, H-6_{endo}); 3,96 (dd, 1H, $J_{6-6} = J_{5-6} = 6,0$ Hz, H-6_{exo}); 2,76-1,93 (m, 4H, H-3 y H-4).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz), δ (ppm): 200,0 (C, C-2); 101,3 (CH, C-1); 72,9 (CH, C-5); 67,3 (CH₂, C-6); 30,9 (C-3); 29,7 (C-4).

Alcohol alílico **14**⁴⁸



1 (910,0 mg, 7,22 mmol) fue disuelto en metanol (24 mL) a 0 °C. CeCl₃·7H₂O (3,2 g, 8,59 mmol) y NaBH₄ 98% (111,0 mg, 2,94 mmol) se agregaron posteriormente. Transcurridas 3h la reacción se completó. Luego de ese tiempo se adicionaron 5 mL de acetona y el solvente fue evaporado hasta casi sequedad. Se agregaron 10 mL de agua destilada y la mezcla fue extraída con volúmenes de 15 mL de AcOEt. La fase

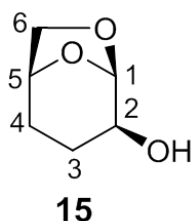
orgánica fue secada con Na₂SO₄ y el solvente fue evaporado a presión reducida, obteniéndose 812,5 mg de **14** (6,43 mmol) con 88% de rendimiento.

14: sólido blanco. P.f.: 67-68 °C. [Lit. 67-69°C].¹¹¹

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 6.10 (dd, $J_{3-4} = 9.8$ Hz, $J_{4-5} = 4.2$ Hz, 1H, H-4); 5.70 (ddd, $J_{3-4} = 9.8$ Hz, $J_{1-3} = 2.2$ Hz, 1H, H-3); 5.51 (dd, $J_{1-3} = J_{1-3} = 2.2$ Hz, 1H, H-1); 4.64 (dd, $J_{4-5} = 4.2$ Hz, $J_{5-6_{exo}} = 4.2$ Hz, 1H, H-5), 4.32 (m, $J_{2-OH} = 11.9$ Hz, 1H, H-2), 3.82 (d, $J_{gem} = 6.6$ Hz, 1H, H-6_{endo}); 3.74 (dd, $J_{gem} = 6.6$ Hz, $J_{5-6_{exo}} = 4.2$ Hz, 1H, H-6_{exo}); 2.18 (d, $J_{2-OH} = 11.9$ Hz, 1H, OH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz), δ (ppm): 130.6 (CH, C-4); 129.0 (CH, C-3); 101.1 (CH, C-1); 71.1 (CH, C-2); 70.5 (CH₂, C-6), 68.6 (CH, C-5).

Alcohol **15**^{110a}



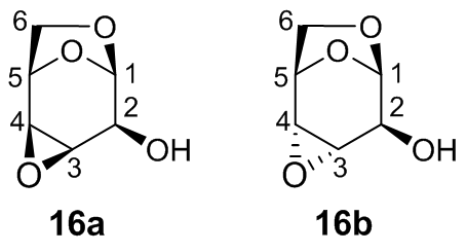
13 (38,0 mg, 0,30 mmol) fue disuelto en metanol (1 mL) a 0 °C. CeCl₃·7H₂O (111,7 mg 0,30 mmol) y NaBH₄ 98% (8 mg, 0,20 mmol) fue agregado. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente por 1 h seguido por la adición de 1 mL de acetona. El solvente fue evaporado hasta casi sequedad. 5 mL de agua destilada fueron agregados y la mezcla fue extraída con acetato de etilo (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos combinados fueron secados con Na₂SO₄ y el solvente fue evaporado a presión reducida. Se obtuvieron 25,0 mg de **15** (0,19 mmol) con un rendimiento de 65%.

15: aceite incoloro. [α]_D²⁵ = -117.3 (c 2,0, CHCl₃). [Lit. -130 (c 0,7, H₂O)].¹¹²

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 5,32 (s, 1H, H-1); 4,50 (sa, 1H, H-5); 3,83 (m, 2H, H-6); 3,60 (m, 1H, H-2); 2,48 (s, 1H, OH); 2,11-1,42 (m, 4H, H-3 y H-4).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz), δ (ppm): 102,7 (C-1); 72,6 (C-5); 68,8 (C-2); 67,9 (C-6); 27,6 y 25,7 (C-3 y C-4).

Epóxidos **16a** y **16b**¹¹³



14 (73,8 mg, 0,58 mmol) fue disuelto en diclorometano (3 mL) a temperatura ambiente. *m*-CPBA 57% (382,3 mg, 1,26 mmol) fue agregado. La reacción se completó a las 40 h de iniciada. Luego, se evaporó el solvente a presión reducida. Los productos de la reacción fueron separados por cromatografía en columna. **16a** (31,7 mg, 0,22 mmol, 38%) y **16b** (24,7 mg, 0,17 mmol, 29%) fueron obtenidos con un rendimiento global de 67% y la relación **16a/16b** fue 1,3/1.

16a: sólido incoloro. P.f.: 75-76 °C [Lit. 74,0-75,2 °C].¹¹⁴

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 5,33 (d, *J*= 3,4 Hz, 1H, H-1); 4,73 (dd, 1H, H-5); 4,05 (d, *J*= 6,9 Hz, 1H, H-2); 3,89-3,82 (m, 2H, H-6); 3,14 (dd, 1H, H-4); 3,02-3,00 (dd, 1H, H-3); 2,25 (d, 1H, -OH).

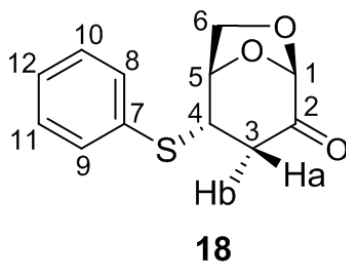
RMN¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz), δ (ppm): 98,2 (C-1); 72,1 (C-5); 68,9 (C-2); 64,3 (C-6); 57,6 (C-4); 50,6 (C-3).

16b: sólido blanco. P. f.: 159-160 °C. [Lit.¹¹⁵ 159 °C].

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 5,29 (d, *J*= 3,7 Hz, 1H, H-1); 4,81 (dd, *J*= 4,7 Hz, 1H, H-5); 3,94 (d, *J*= 6,6 Hz, 1H, H-2); 3,78 (dd, 2H, H-6); 3,55 (dd, 1H, H-4); 2,57 (dd, 1H, H-3); 2,08 (sa, 1H, -OH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz), δ(ppm): 99,4 (C-1); 69,7 (C-5); 66,8 (C-6); 65,4 (C-2); 51,0 (C-3); 50,1 (C-4).

Feniltioéter 18



1 (52,1 mg, 0,41 mmol) se disolvió en CHCl_3 (5,5 mL) y se agregó tiofenol (50 μL , 0,50 mmol) de acuerdo a lo reportado en literatura.¹¹⁶ Posteriormente se adicionaron 20 μL de una dilución 1:10 de Et_3N en CHCl_3 (0,01 mmol de Et_3N , 0,035 eq.). La reacción se completó 75 minutos después de iniciada. Luego de ese tiempo el solvente se evaporó a presión reducida y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna. Se obtuvo **18** (76,2 mg, 0,32 mmol) con un rendimiento de 78%.

18: aceite incoloro. $[\alpha]_D^{28}$: -77,4 (c 0,6, CHCl_3).

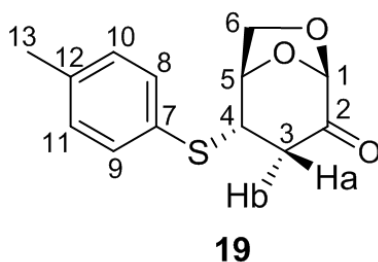
IR (Film) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3048, 2992, 2961, 2920, 2903, 2897, 1734 (CO), 1408, 1215, 1115, 1022, 997, 959, 912, 870, 752.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 7,49-7,31 (m, 5H, H-arom.); 5,17 (s, 1H, H-1); 4,69 (sa, 1H, H-5); 4,01-4,00 (m, 2H, H-6); 3,71 (d, $J=7,2$ Hz, 1H, H-4); 3,03-2,95 (dd, $J=7,2$ Hz, $J=17,5$ Hz, 1H, H-3a); 2,55-2,49 (d, $J=17,5$ Hz, 1H, H-3b).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 197,4 (C, C-2); 138,7 (C, C-10)*; 132,9 (C, C-7); 128,4 (C, C-12); 129,2 (C, C-11)*; 101,6 (C, C-1); 76,6 (C, C-5); 67,7 (C, C-6); 49,3 (C, C-4); 37,4 (C, C-3).

EMAR. Calculada: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 259,0405. Encontrada: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 259,0399.

p-metilfeniltioéter 19



1 (127,7 mg, 1,01 mmol) se disolvió en CHCl_3 (15 mL) y se agregó *p*-metiltiofenol (145,1 mg, 1,17 mmol). Luego de esto se adicionaron 5 μL de Et_3N (0,036 mmol, 0,035

eq.). La reacción se completó después de 90 minutos de iniciada. Posteriormente el solvente se evaporó a presión reducida y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna. Se obtuvo **19** (189,4 mg, 0,76 mmol) con un rendimiento de 75%.

19: sólido blanco. P.f.: 55-56 °C (CHCl₃).

$[\alpha]_D^{28}$: -48,7 (c1,1, CHCl₃).

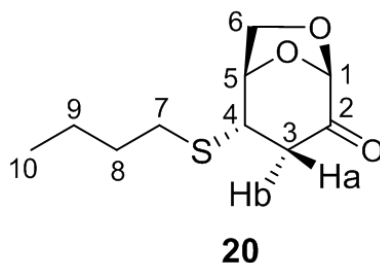
IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3443, 2968, 2918, 1732 (CO), 1495, 1416, 1209, 1113, 910, 874, 812.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 7,35 (d, J = 8,1 Hz, 2H, H-arom.); 7,13 (d, J =7,9 Hz, 2H, H-arom.); 5,12 (s, 1H, H-1); 4,66-4,62 (m, 1H, H-5); 3,99-3,92 (m, 2H, H-6); 3,63 (d, J = 6,8 Hz, 1H, H-4); 2,99-2,89(dd, J = 6,8 Hz, J = 16,7 Hz, 1H, H-3a); 2,51-2,42(d, J = 16,7 Hz, 1H, H-3b); 2,32 (s, 3H, H-13).

RMN ¹³C (CDCl₃,300 MHz), δ (ppm): 197,7 (C, C-2); 138,7 (C, arom.); 133,8 (C, arom.); 130,2 (C, arom.); 129,2 (C, arom.); 101,6 (C, C-1); 75,3 (C, C-5); 67,7 (C, C-6); 49,6 (C, C-4); 37,3 (C, C-3); 21,2 (CH₃, C-13).

EMAR. Calculada: [M+Na]⁺ 273,0561. Encontrada: [M+Na]⁺ 273,0556.

***n*-butiltioéter 20**



1 (52,9 mg, 0,42 mmol) se disolvió en CHCl₃ (5,5 mL) y se agregó butanotiol (55 μ L, 0,50 mmol). Luego de esto se adicionaron 36 μ L de una dilución 1:10 de DIPEA en CHCl₃ (0,02 mmol de DIPEA, 0,05 eq.). La reacción se completó luego de 4 días de iniciada. Luego de ese tiempo el solvente se evaporó a presión reducida y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna. Se obtuvo **20** (77,5 mg, 0,36 mmol) con un rendimiento de 85%.

20: aceite incoloro. $[\alpha]_D^{30}$: -387,6 (c 0,9, CHCl₃).

IR (Film) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 2959, 1734 (CO), 1458, 1411, 1213, 1113, 995, 910, 874.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 5,11 (s, 1H, H-1); 4,71 (sa, 1H, H-5); 4,00 (dd, 2H, H-6); 3,28 (d, $J_{3a-4} = 7,4$ Hz, 1H, H-4); 3,03 ($J_{\text{gem}} = 16,9$ Hz, $J_{3a-4} = 7,4$ Hz, 1H, H-3a); 2,57 (td, $J_{7-8} = 7,2$ Hz, 2H, H-7); 2,49 (d, $J_{\text{gem}} = 16,9$ Hz, 1H, H-3b); 1,55 (q, $J_{7-8} = J_{8-9} = 7,2$ Hz, 2H, H-8); 1,39 (sext, $J_{8-9} = J_{9-10} = 7,2$ Hz, 2H, H-9); 0,89 (t, $J_{9-10} = 7,2$ Hz, 3H, H-10).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz), δ (ppm): 197,9 (C, C-2); 101,6 (CH, C-1); 76,6 (CH, C-5); 67,8 (CH_2 , C-6); 45,7 (CH, C-4); 38,4 (CH_2 , C-3); 31,4 (CH_2 , C-8); 31,1 (CH_2 , C-7); 21,9 (CH_2 , C-9); 13,6 (CH_3 , C-10).

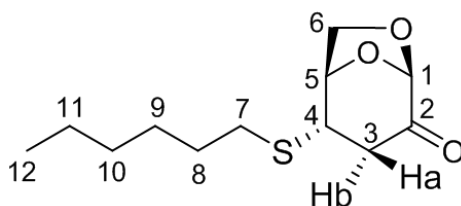
EMAR. Calculada: $[\text{M}+\text{Na}]^+239,0718$. Encontrada: $[\text{M}+\text{Na}]^+239,0712$.

Reemplazo del solvente en la reacción de obtención de **20**

Se decidió utilizar AcOEt en reemplazo de CHCl_3 en la síntesis de **20** para demostrar la factibilidad del uso de solventes no clorados en estas reacciones.

1 (51,5 mg, 0,41 mmol) se disolvió en AcOEt (5,5 mL) y se agregó butanotiol (53 μL , 0,49 mmol). Luego de esto se adicionaron 144 μL de una dilución 1:10 de DIPEA en CHCl_3 (0,08 mmol de DIPEA, 0,2 eq.). La reacción se dejó transcurrir durante 4 días. Luego de ese tiempo el solvente se evaporó a presión reducida y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna. Se obtuvo **20** (73,6 mg, 0,34 mmol) con un rendimiento de 83%.

n*-hexiltioéter **21*



21

1 (51,1 mg, 0,41 mmol) se disolvió en CHCl_3 (5,5 mL) y se agregó hexanotiol (69 μL , 0,49 mmol). Luego de esto se adicionaron 72 μL de una dilución 1:10 de DIPEA en CHCl_3 (0,04 mmol de DIPEA, 0,1 eq.). La reacción se completó después de 7,5 h de iniciada. Posteriormente el solvente se evaporó a presión reducida y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna. Se obtuvieron 81,9 mg de **21** (0,34mmol) con un rendimiento de 83%.

21: aceite incoloro. $[\alpha]_{\text{D}}^{28}$: -116,3 (c 0,9, CHCl_3).

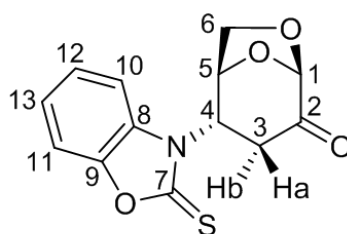
IR (Film) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 2957, 2926, 1734 (CO), 1113, 995, 910, 756.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 5,15 (s, 1H, H-1); 4,74 (sa, 1H, H-5); 4,02 (dd, 2H, H-6); 3,29 (d, J_{3a-4} = 7,4 Hz, 1H, H-4); 3,05 (J_{gem} = 16,9 Hz, J_{3a-4} = 7,4 Hz, 1H, H-3a); 2,67-2,50 (m, 3H, H-7 y H-3b); 1,63-1,54 (m, 2H, H-8); 1,43-1,28 (m, 6H, H-9, H-10 y H-11); 0,89 (t, J_{11-12} = 7,2 Hz, 3H, H-12).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz), δ (ppm): 197,9 (C, C-2); 101,6 (CH, C-1); 76,6 (CH, C-5); 67,8 (CH₂, C-6); 45,7 (CH, C-4); 38,3 (CH₂, C-3); 31,5 (CH₂, C-7); 31,4 (CH₂, C-10); 29,4 (CH₂, C-8); 28,6 (CH₂, C-9), 22,5 (CH₂, C-11), 14,0 (CH₃, C-12).

EMAR. Calculada: [M+Na]⁺ 265,0874. Encontrada: [M+Na]⁺ 265,0798.

Aducto 22-N



22-N

1 (49,5 mg, 0,39 mmol) se disolvió en CHCl₃ (5,5 mL) y se agregó 2-mercaptobenzoxazol (71,9 mg, 0,48 mmol). Posteriormente se adicionaron 30 μ L de una dilución 1:10 de Et₃N en CHCl₃ (0,02 mmol de DIPEA, 0,05 eq.). Luego de 2,5 días el solvente se evaporó a presión reducida y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna. Se obtuvo **22** (62,2 mg, 0,22 mmol) con un rendimiento de 57%.

22: sólido incoloro. P.f.: 141-142 °C (CHCl₃).

$[\alpha]_{\text{D}}^{27}$: -52,1 (c 0,8, CHCl₃).

IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 2984, 1734 (CO), 1477, 1382, 1311, 1144, 1101, 978, 912, 870, 739.

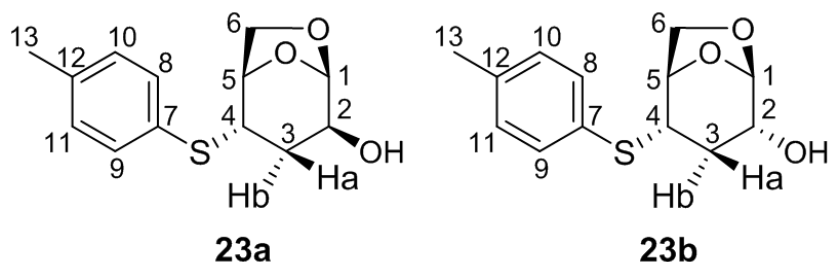
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 7,41-7,20 (m, 4H, H-arom.); 5,74 (d, J_{3a-4} = 9,6 Hz, 1H, H-4); 5,39 (s, 1H, H-1); 4,97 (d, $J_{5-6\text{exo}}$ = 5,5 Hz, 1H, H-5); 4,23 (d, J_{gem} = 8,2 Hz, 1H, H-6endo); 4,11 (dd, J_{gem} = 8,2 Hz, $J_{5-6\text{exo}}$ = 5,5 Hz, 1H, H-6exo); 3,22 (dd, J_{gem} = 18,8 Hz, J_{3a-4} = 9,6 Hz, 1H, H-3a); 2,83 (d, J_{gem} = 18,7 Hz, 1H, H-3b).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz), δ (ppm): 197,2 (C, C-2); 180,5 (C, C-7); 147,0 (C, C-9); 129,7 (C, C-8); 125, (CH, Carom); 124,8 (CH, Carom); 111,4 (CH, arom); 110,8

(CH, Carom); 100,9 (CH, C-1); 75,9 (CH, C-5); 67,5 (CH₂, C-6); 57,8 (CH, C-4); 33,9 (CH₂, C-3).

EMAR. Calculada: [M+Na]⁺ 298,0150. Encontrada: [M+Na]⁺ 298,0162.

Alcoholes **23a** y **23b**



19 (106,6 mg, 0,43 mmol) se disolvieron en MeOH (1,4 mL) a temperatura ambiente. Luego se agregaron 12,0 mg de NaBH₄ 98% (0,31 mmol). Transcurridas 3 h de estos agregados se adicionaron 0,5 mL de acetona y se filtró la mezcla sobre celite. El solvente finalmente se evaporó a presión reducida. La mezcla de alcoholes **23a** y **23b** se purificó mediante cromatografía en columna. Se obtuvo **23a** (49,0 mg, 0,19 mmol, 45%) y **23b** (49,9 mg, 0,20 mmol, 46%). El rendimiento global fue de 92% y la relación de los alcoholes **23a/23b** fue 1/1.

23a: sólido blanco. P.f.: 133-133,5 °C (CHCl₃).

[α]_D³⁰: -64,1 (c 0,9, CHCl₃).

IR (KBr) ν_{máx} (cm⁻¹): 3410 (OH), 2955, 2926, 2891, 2367, 1489, 1447, 1132, 1082, 1030, 962, 908, 876, 799.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 7,37 (d, 2H, H-arom); 7,14 (d, 2H, H-arom); 5,39 (s, 1H, H-1); 4,52 (dd, 1H, H-5); 3,95-3,80 (m, 3H, H-6 y H-2); 3,26 (dd, 1H, H-4); 2,34 (t, 3H, H-13); 2,25-2,16 (m, 1H, H-3); 1,91 (dd, 1H, H-3); 1,60 (s, 1H, -OH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz), δ (ppm): 138,1 (C, C-12); 133,2 (2CH, C-8 y C-9); 130,6 (2 CH, C-10 y C-11); 130,0 (C, C-7); 103,3 (CH, C-1); 75,0 (CH, C-5); 68,6 (CH₂, C-6); 66,6 (CH, C-2); 48,2 (CH, C-4); 31,6 (CH, C-3); 21,1 (CH₃, C-13).

EMAR. Calculada: [M+Na]⁺ 275,0718. Encontrada: [M+Na]⁺ 275,0701.

23b: sólido blanco. P.f.: 95,5-96 °C (CHCl₃).

[α]_D²⁸: -48,7 (c 0,8, CHCl₃).

IR (KBr) ν_{máx} (cm⁻¹): 3501 (OH), 2951, 2891, 1491, 1400, 1130, 1038, 924, 858, 812, 507, 492.

IR (Film) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3447 (OH), 2957, 2925, 1134, 1077, 1028, 964, 905, 876.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ (ppm): 5,41 (s, 1H, H-1); 4,57 (sa, 1H, H-5); 3,89 (dd, 2H, H-6); 3,57 (d, $J= 11,8$ Hz, 1H, H-2); 3,34 (d, $J= 11,8$ Hz, 1H, -OH); 2,87 (d, $J_{3a-4}= 7,4$ Hz, 1H, H-4); 2,57 (t, $J_{7-8}= 7,2$ Hz, 2H, H-7); 2,25 (m, 1H, H-3a); 1,94 (d, $J_{\text{gem}}= 16,9$ Hz, 1H, H-3b); 1,59 (q, $J_{7-8}= J_{8-9}= 7,2$ Hz, 2H, H-8); 1,42 (sext, $J_{8-9}= J_{9-10}= 7,2$ Hz, 2H, H-9); 0,92 (t, $J_{9-10}= 7,2$ Hz, 3H, H-10).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz), δ (ppm): 103,0 (CH, C-1); 75,5 (CH, C-5); 67,5 (CH, C-2, CH_2 , C-6); 41,7 (CH, C-4); 31,3 (CH_2 , C-8); 31,1 (CH_2 , C-7); 27,6 (CH_2 , C-3); 22,0 (CH_2 , C-9); 13,6 (CH_3 , C-10).

EMAR. Calculada: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 241,0874. Encontrada: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 241,0869.

3.19. Ensayos de citotoxicidad

Este ensayo estuvo basado en el protocolo desarrollado por Mossman para determinar viabilidad celular evitando el empleo de sustancias radiactivas.¹⁰⁹ El experimento involucra la utilización del colorante MTT, el cual al ser reducido por un cultivo celular se transforma en su derivado formazán insoluble que presenta una coloración violeta intensa. Por lo tanto, la abs es proporcional al número de células viables presentes en el cultivo.

En nuestro caso, células Huh7 de cáncer hepático humano fueron crecidas en medio α -MEM ("*Eagle's Minimum Essential Medium*") suplementado con 10% de suero fetal bovino a 37 °C y 5% de CO_2 . Las células fueron sembradas en microplacas de 96 pocillos ($4 \cdot 10^3$ células/pocillo) y crecidas por aproximadamente 24 h con 200 μL de medio. Luego de ese tiempo, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco y las células fueron tratadas por triplicado con distintas concentraciones de los compuestos evaluados disueltos en DMSO e incubadas por aproximadamente 48 h más.

Luego del tratamiento con los compuestos, se agregaron 15 μL de la solución colorante del kit *CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega) conteniendo MTT en cada pocillo y se dejó incubar por un lapso de 2,5-3 h a 37 °C en atmósfera de 5% de CO_2 . Siguiendo a esta incubación se adicionaron 100 μL de la solución *Solubilization Solution/Stop Mix* del kit y se dejó 1 h más a 37 °C en atmósfera de 5% de CO_2 para finalizar la reacción y permitir la solubilización de los cristales de formazán.

Finalmente, los cristales se terminaron de resuspender en la misma microplaca con micropipeta y se midió la abs a 570 nm correspondiente al producto formazán. Se restó la abs del "*background*" a 630 nm como lo establecía el fabricante en el protocolo

para lograr una medida más precisa. Todos los valores se refirieron a un control de células sin tratamiento alguno.

Estos experimentos fueron llevados a cabo en el Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET).

3.20. Microscopía

Células CHO fueron incubadas con **1** o **2** a distintas concentraciones por 24 horas en medio α -MEM y sobre cubreobjetos. Luego de ese tiempo se fijaron las células con *p*-formaldehído 3% en la oscuridad durante 15 minutos. Finalmente, los cubreobjetos fueron depositados en un portaobjetos sobre 3,5 μ L de *4',6-diaminidino-2-phenylindole* (DAPI) 1 μ g/mL junto con el reactivo "*SlowFade antifade*" (Invitrogen) diluido en glicerol. Las células así fijadas fueron observadas bajo un microscopio de fluorescencia (OLYMPUS BX60, 100X). Al menos 10 campos fueron visualizados para cada condición.

3.21. Análisis *in silico* de las proteínas del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ

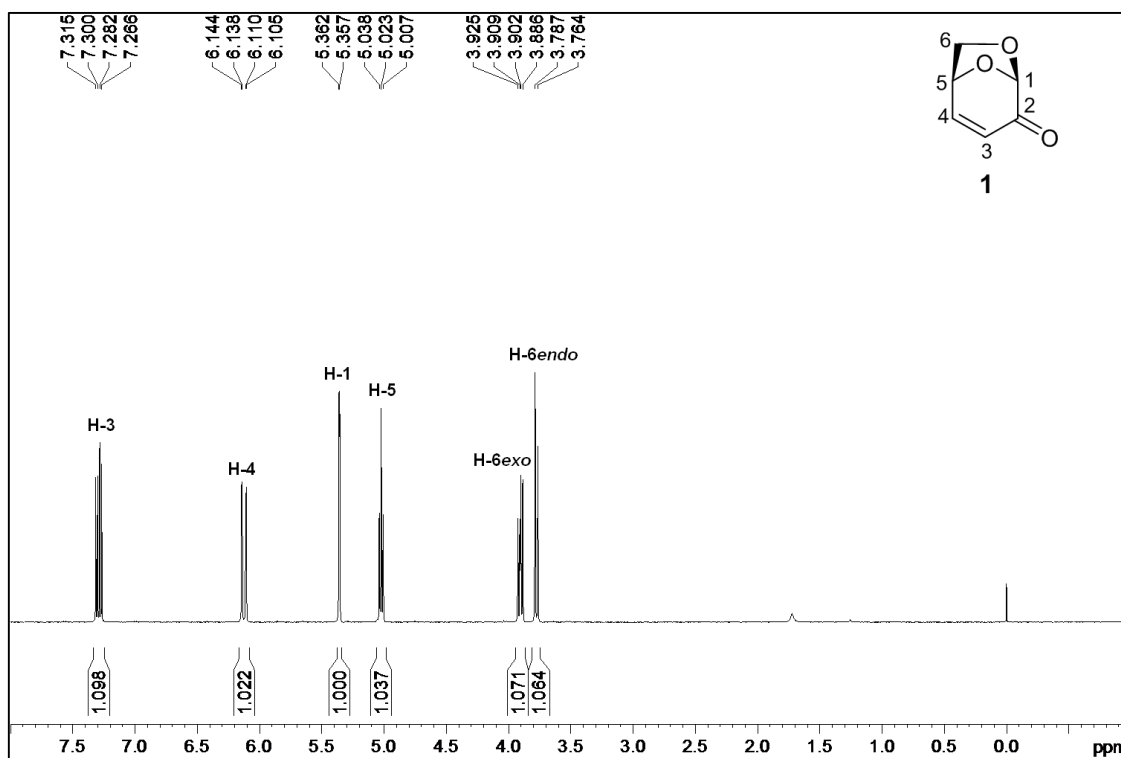
Se efectuó un análisis de las secuencias de proteínas PhoQ y PhoP de *Salmonella* Typhimurium empleando las bases de datos del NCBI ("*National Center for Biotechnology Information*")^{59b} y del sitio Pfam¹¹⁷.

CAPÍTULO IV

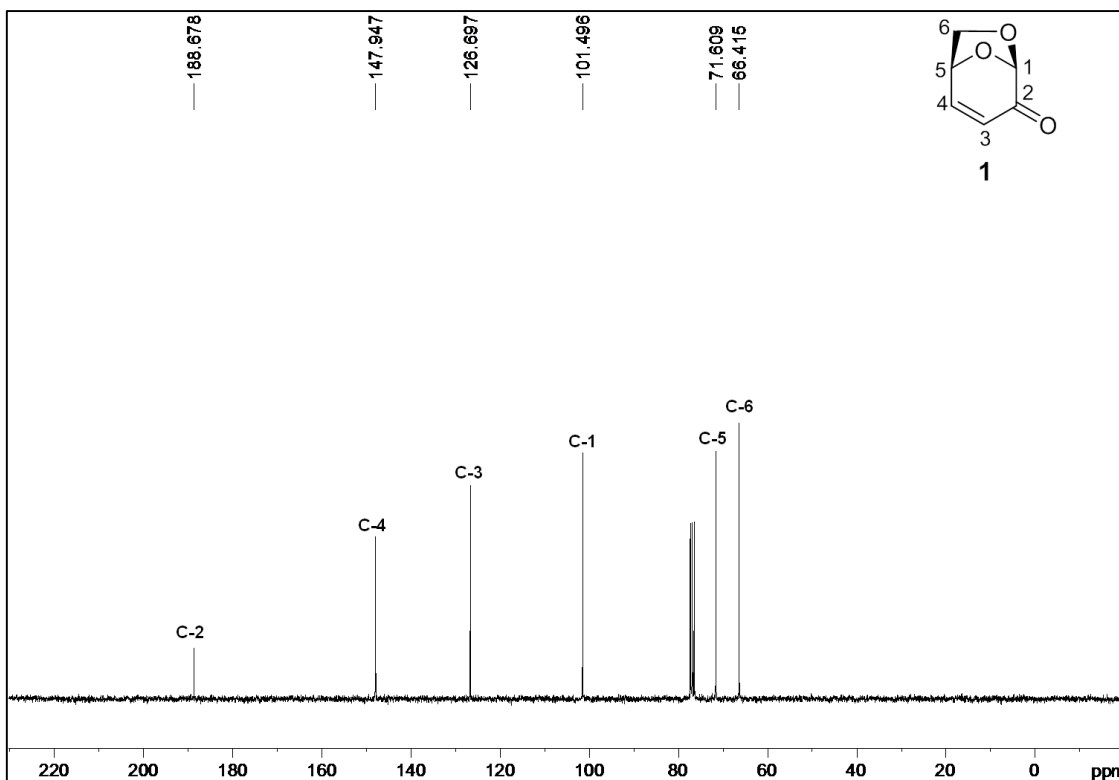
EMPLEO DE LEVOGLUCOSENONA EN SÍNTESIS ASIMÉTRICA

4.3. Obtención de levoglucosenona

Empleando el protocolo desarrollado por Fred Shafizadeh optimizado por nuestro grupo de investigación, se sintetizó levoglucosenona con rendimientos entre el 8-10%, conteniendo aproximadamente un 3-7% de 2-furfural como única impureza detectada en base a los espectros de RMN ^1H y a estudios de CG-EM.³³



Espectro de RMN ^1H de 1 (300 MHz, CDCl_3)



Espectro de RMN de ^{13}C de **1** (75,5 MHz, CDCl_3)

4.4. Obtención de auxiliares quirales derivados de 4-cianolevoglucosenona

La reacción de Diels-Alder ha sido ampliamente aplicada a la síntesis total de productos naturales. La reacción se ha vuelto una herramienta valiosa en el desarrollo de conceptos sintéticos, mecanísticos y teóricos; y este importante rol podría ser atribuido a su remarcable regio y estereoselectividad.¹¹⁸

Es generalmente aceptado que la adición de dienos cíclicos a dienófilos cíclicos sigue la regla *endo* de Alder, si bien hay ejemplos en la literatura de reacciones de Diels-Alder que violan esta regla.¹¹⁹ Por otro lado, el uso de carbohidratos como fuente de quiralidad ha sido extensamente descrito en la literatura,¹²⁰ y han probado ser además materiales de partida útiles para la preparación de dienos o dienófilos¹²¹ como intermediarios en la síntesis de compuestos ópticamente puros. A pesar de unas pocas excepciones, se ha establecido que los dienófilos derivados de azúcares cíclicos usualmente siguen la regla de Alder.¹²² Otra característica importante de esta transformación química es la formación regioselectiva de productos cuando se usan dienos y dienófilos no simétricos. En muchos casos, el resultado regioquímico puede ser predicho por la regla *orto/para*.

Como parte de nuestro interés en la conversión pirolítica de biomasa en compuestos químicos útiles, hemos estado interesados en las aplicaciones sintéticas

de levoglucosenona (**1**) como un bloque de construcción quiral útil para el desarrollo de nuevos métodos de síntesis asimétrica.^{43,48,51} Levoglucosenona ha sido utilizada como dienófilo en la construcción de nuevos y eficientes auxiliares quirales mediante el empleo de reacciones de Diels-Alder. Sin embargo frente a ciertos tipos de dienos de baja reactividad derivados de antraceno, se ha observado la necesidad de largos tiempos de reacción.

Con el fin de desarrollar un nuevo derivado de levoglucosenona que incremente su carácter nucleofílico y confiera una mayor versatilidad química a los auxiliares quirales derivados de este último consideramos que la sustitución con un grupo ciano en C-4 de la molécula en analogía a una *trans*-3-cianoacroleína¹²³ podría incrementar la dienofilicidad pero también ofrece la posibilidad de crear un centro cuaternario siguiente a una funcionalidad nitrogenada y podría subsiguientemente ser transformada de manera sencilla en otros derivados. Sin embargo, una cuestión principal que surge con este nuevo dienófilo es como el grupo atractor de electrones exocíclico podría afectar la regioselectividad. Una ventaja que consideramos al reemplazar el protón vinílico en C-4 por un grupo ciano fue su geometría lineal, una característica que debería evitar cualquier especulación con respecto al impedimento estérico y permitir comparar la influencia de los efectos estereoelectrónicos sobre el resultado de la reacción de Diels-Alder entre diferentes dienos con ambos dienófilos.

Se efectuaron cálculos computacionales comparando las dienofilidades de **1** y **3** frente a diversos dienos en reacciones de Diels-Alder y los resultados permiten justificar las predicciones efectuadas en el párrafo anterior. El índice de electrofilia global (ω) permite ordenar series de dienos y dienófilos normalmente usados en reacciones de Diels-Alder dentro de una misma escala.⁹⁸ Los valores de ω calculados para **1** y **3** al nivel B3LYP/6-31G* son de 1,83 eV y 3,14 eV, respectivamente, sugiriendo que **3** constituye un dienófilo mucho más poderoso que **1**. Como resultado, se espera que las cicloadiciones empleando a **3** tengan un carácter polar más pronunciado, esto es, mayor transferencia de carga (TC) desde el dieno hacia el dienófilo con la consecuente disminución de las barreras energéticas.^{98b} La diferencia en el valor de ω entre los carbonos C-3 y C-4 es menor en **3** que en **1**. Esto, por otro lado, indicaría que esta molécula es menos regioselectiva que levoglucosenona.

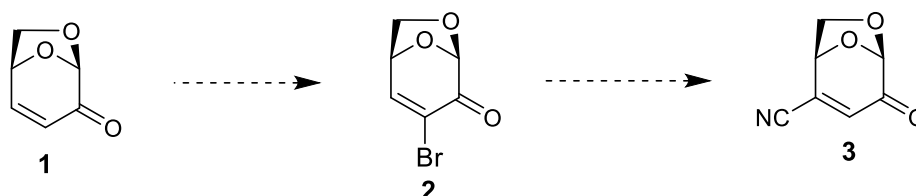
Entrada	Dienófilo	Dieno	TC (eV)	ΔE^\ddagger (Kcal/mol)	$\Delta\Delta E^\ddagger$ (Kcal/mol)	Selectividad
1	1	Ciclopentadieno	0,16	13,8	3,1	95:5
2	3	Ciclopentadieno	0,25	10,7		93:7
3	1	Isopreno	0,15	14,9	2,2	68:32
4	3	Isopreno	0,22	12,7		41:59
5	1	2,3-dimetilbutadieno	0,16	15,1	2,5	-
6	3	2,3-dimetilbutadieno	0,23	12,6		-

Tabla 4.1

Dienófilo	ω_k (C-3) (eV)	ω_k (C-4) (eV)	$\Delta\omega_k$ (eV)
1	0.15	0.44	0.29
3	0.38	0.55	0.17

Tabla 4.2

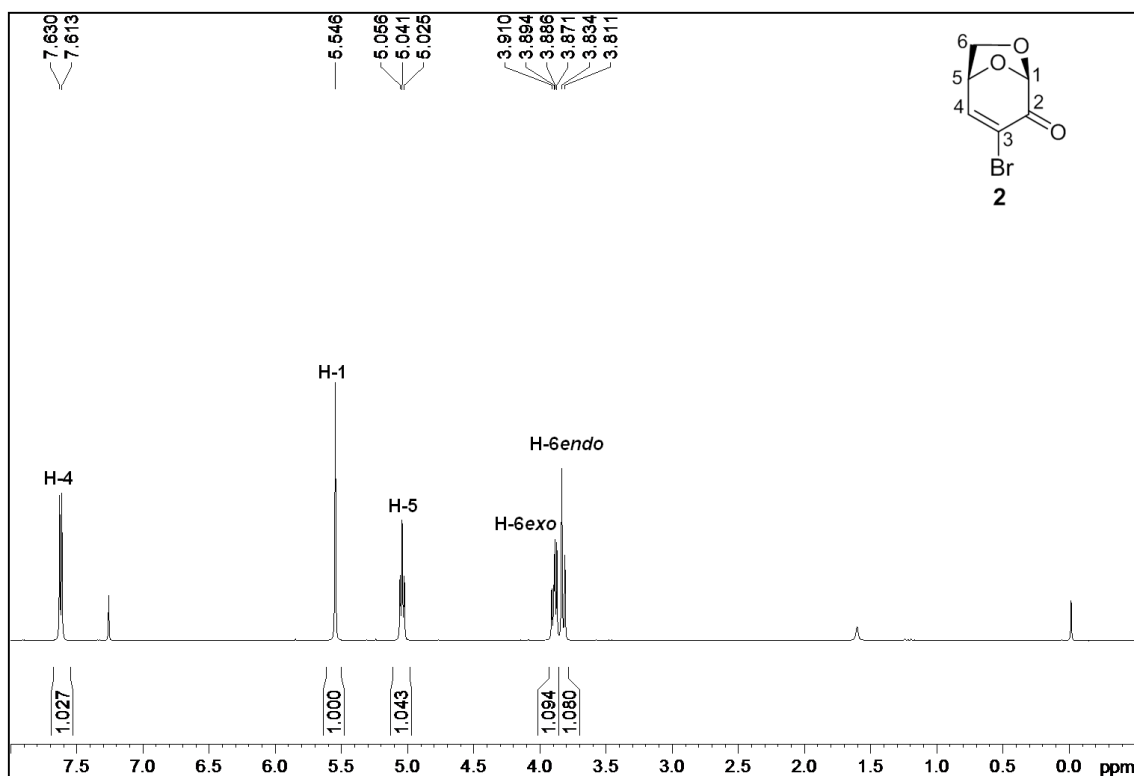
La estrategia sintética elegida para incorporar el grupo ciano en posición 4 estuvo basada en la dibromación del doble enlace presente en **1** con la concomitante eliminación de bromo. La eliminación del átomo de halógeno unido a C-4 toma ventaja de la acidez del protón unido al C- α de la cetona; el uso de una base no nucleofílica hace posible la regeneración del sistema α,β -insaturado en una reacción *en* una sola etapa conduciendo a 3-bromolevoglucosenona (**2**). Para introducir el grupo nitrilo, una secuencia similar de adición-eliminación fue pensada, pero en este caso la eliminación del átomo de bromo debería comenzar por la sustracción del H-4 para reconstruir el doble enlace y extender la conjugación entre ambos grupos atractores de electrones. Esto daría como resultado la obtención de 4-cianolevoglucosenona (**3**). Esto se resume en el Esquema 4.1.



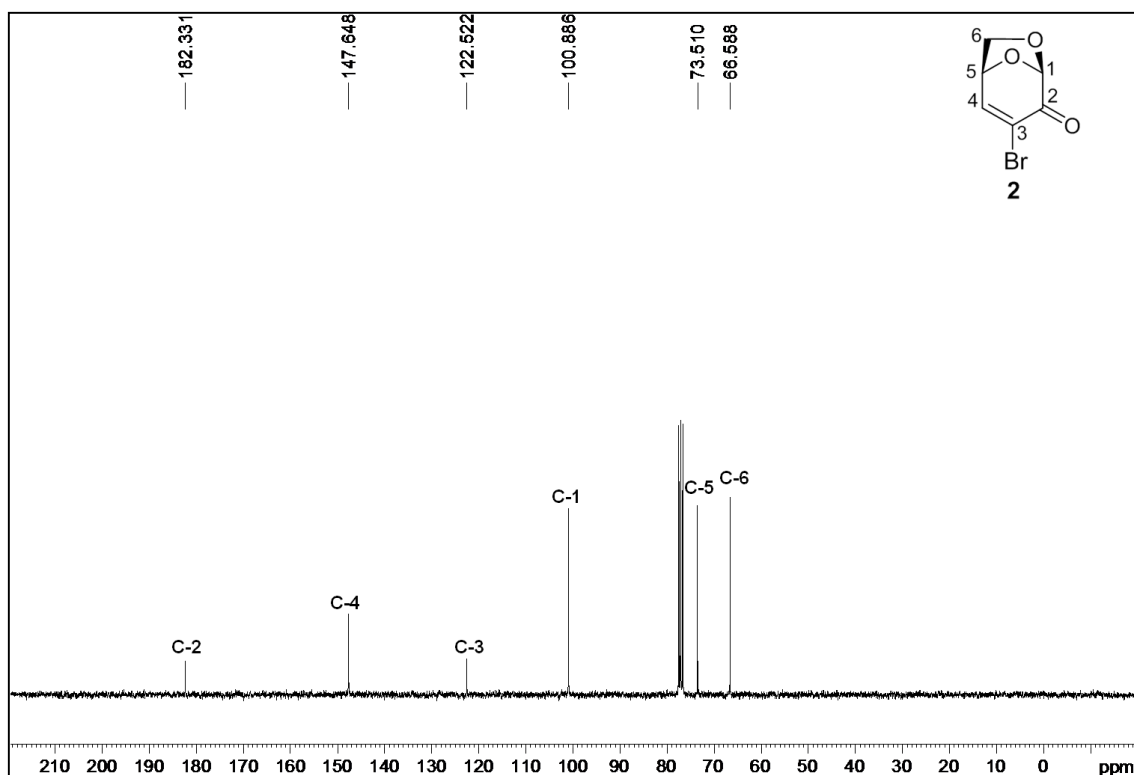
Esquema 4.1

La reacción de levoglucosenona con Br_2 en diclorometano a 0°C seguida por la adición de Et_3N dio **2** con 92% de rendimiento. La adición de KCN a **2** en presencia de

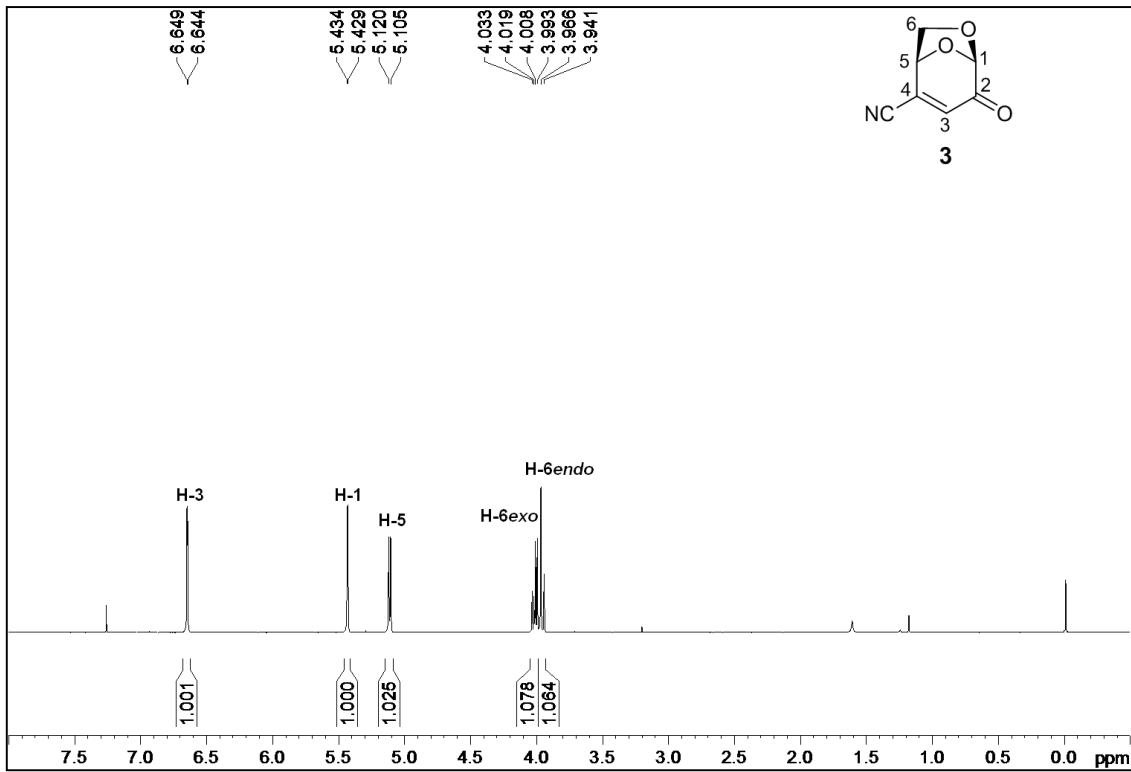
la resina Amberlite IR-120 y Et₃N en una primera reacción permitió obtener a **3** con 31%.



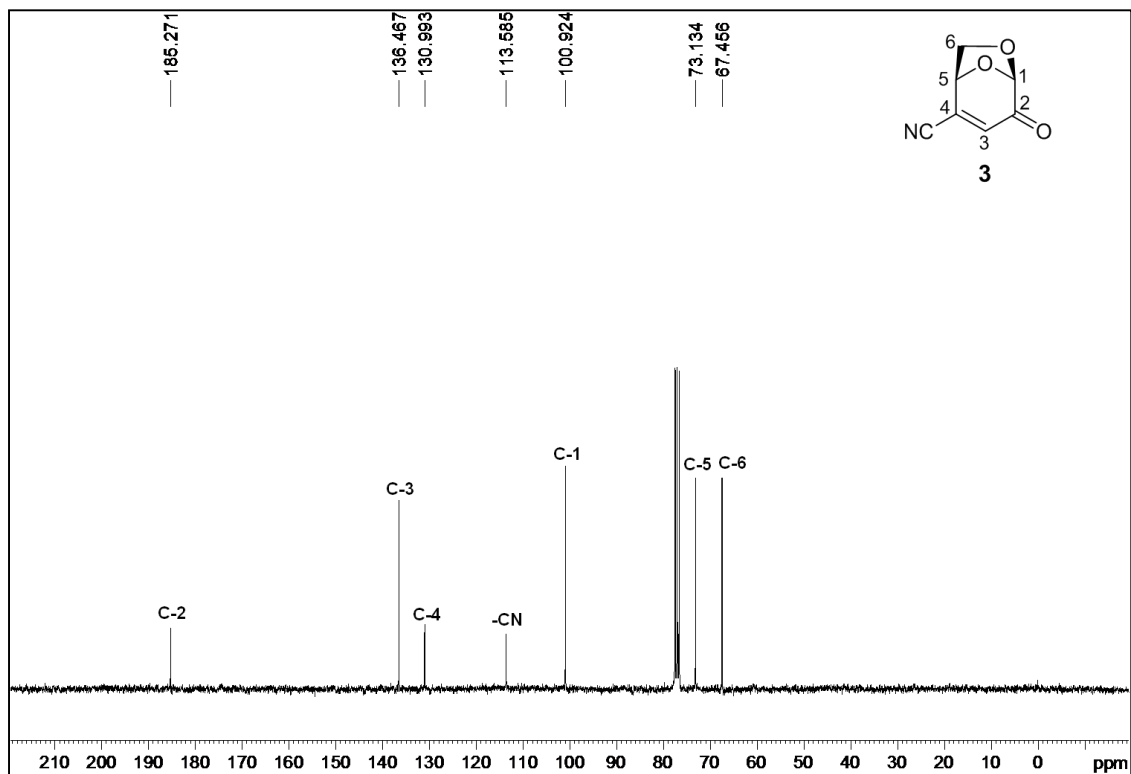
Espectro de RMN ¹H de **2** (300 MHz, CDCl₃)



Espectro de RMN ¹³C de **2** (75,5 MHz, CDCl₃)



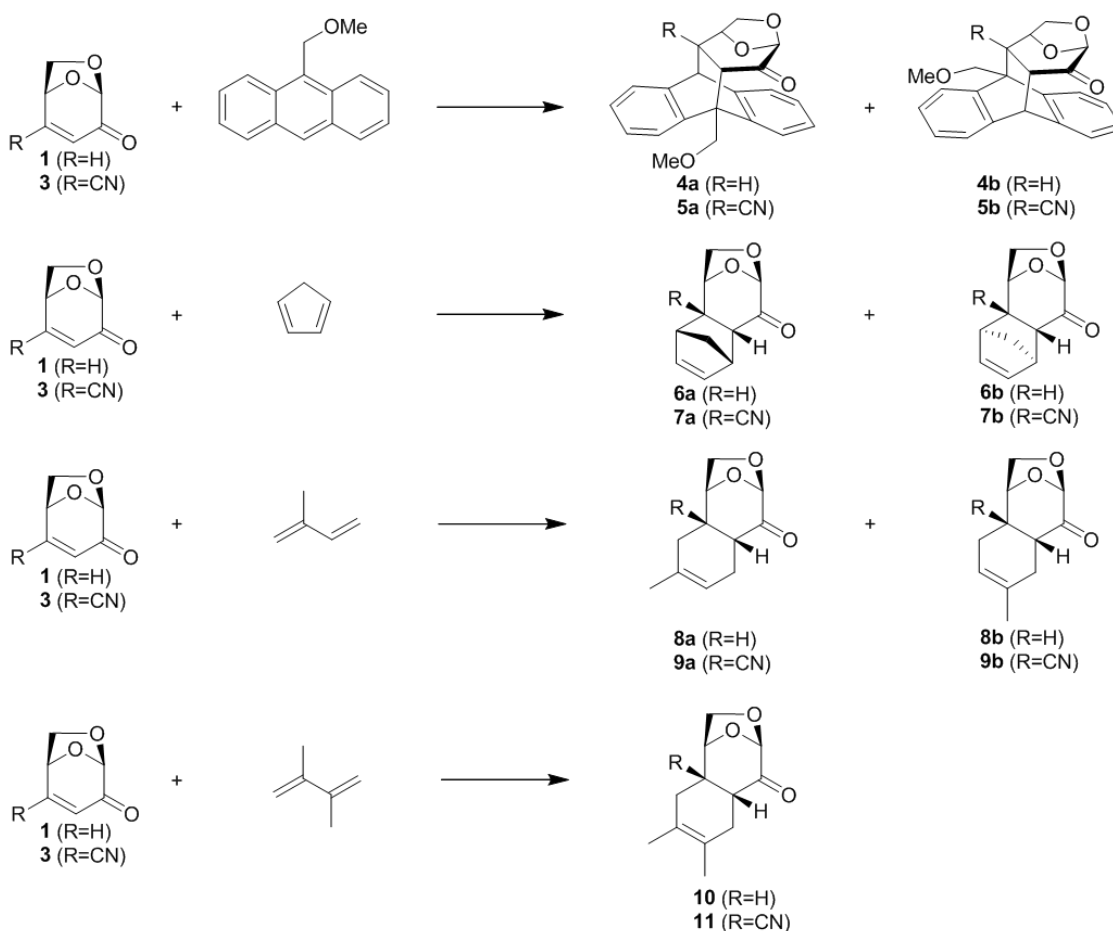
Espectro de RMN ¹H de 3 (300 MHz, CDCl₃)



Espectro de RMN ¹³C de 3 (75,5 MHz, CDCl₃)

Los espectros de RMN de **3** muestran la pérdida del H-4 con respecto a levoglucosenona y la aparición del grupo ciano en el espectro de ^{13}C . Además, en este último se observa la transformación del C-4 en cuaternario.

No obstante el bajo rendimiento obtenido de **3**, se efectuó un estudio tendiente a evaluar de manera experimental la dienofilicidad de este compuesto con base en el estudio computacional precedente. Se llevó a cabo una comparación de reactividad y selectividad de los dienófilos **1** y **3** en reacciones de Diels-Alder usando diferentes dienos (Esquema 4.2). Los dienos fueron elegidos en base a reportes previos sobre resultados de las reacciones empleando **1**^{57,102,124}. La tabla 4.3 muestra las condiciones de reacción empleadas y los rendimientos obtenidos. Los rendimientos fueron de buenos a muy buenos con ambos dienófilos, no observándose variaciones muy grandes en los mismos si bien hubo un incremento cuando se empleó **3** como dienófilo en las reacciones con 9-metoximetilantraceno y ciclopentadieno.



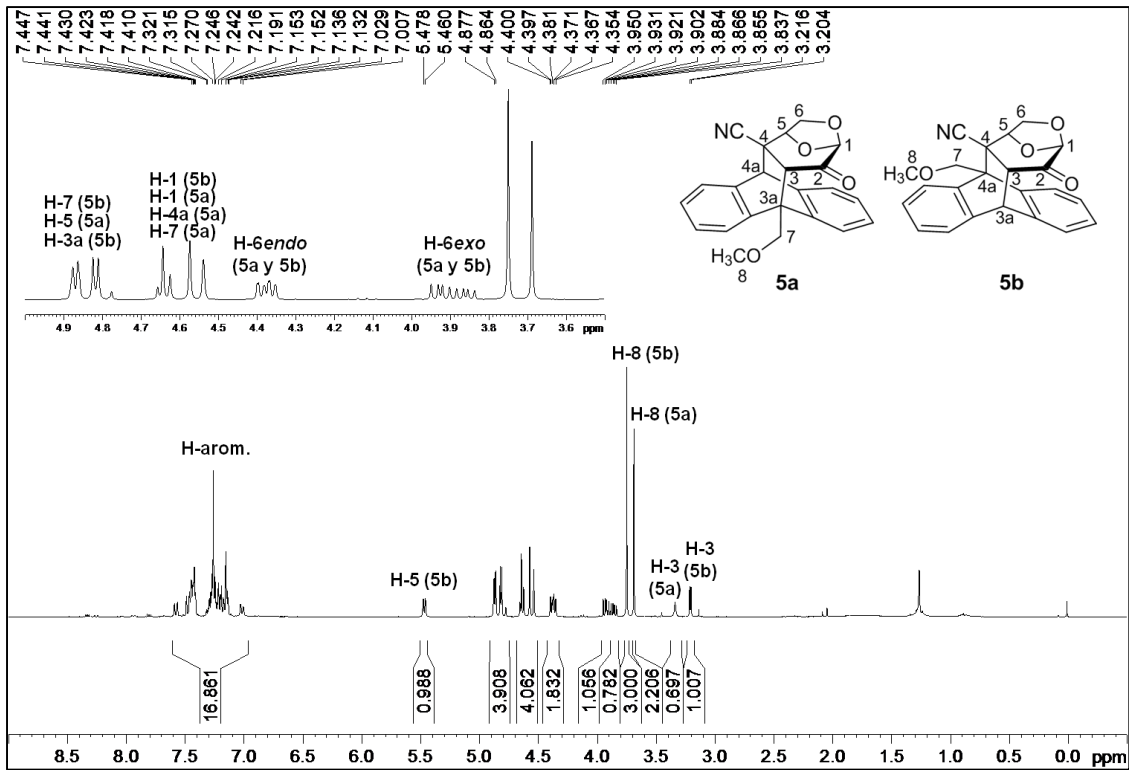
Esquema 4.2

Entrada	Sustrato	Reactivo	Temp.(°C)	Solvente	Rend. (%)
1	1	9-metoximetilantraceno	110	Tolueno	63
2	1	Ciclopentadieno	25	DCM	72
3	1	Isopreno	150 MO	DCM	73
4	1	2,3-dimetilbutadieno	150 MO	DCM	84
5	3	9-metoximetilantraceno	110	Tolueno	77
6	3	Ciclopentadieno	25	DCM	85
7	3	Isopreno	150 MO	DCM	68
8	3	2,3-dimetilbutadieno	150 MO	DCM	79

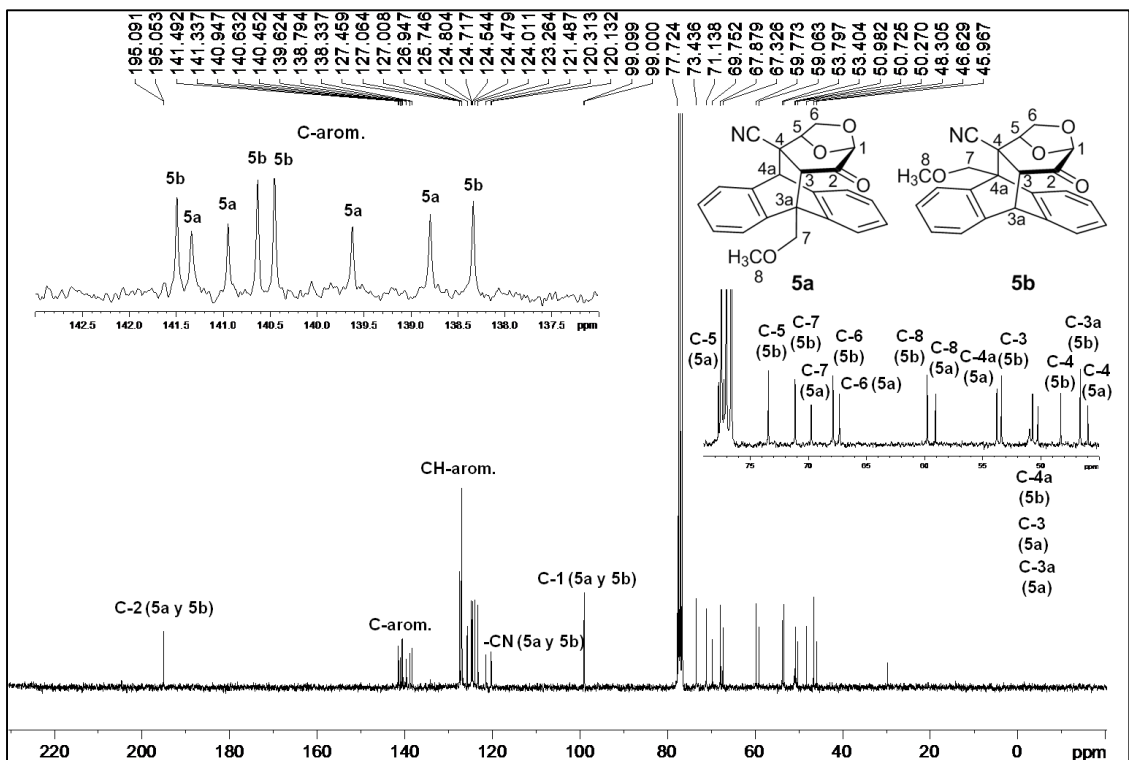
Tabla 4.3

Los compuestos **5a** y **5b** no pudieron ser separados por cromatografía en columna como sí es posible de hacer cuando se usa **1** como dienófilo. Esto hizo que para determinar la relación de los aductos se recurra al espectro de RMN ¹H. La asignación fue un tanto complicada pero se basó en que el C-4a de **5a** es metínico mientras que en **6b** es cuaternario. El grupo nitrilo en **5a** presenta correlación con dos protones en el espectro de HMBC mientras en **5b** hay una sola correlación. Una vez identificado este protón se pudo determinar la relación de los aductos en base al espectro de RMN ¹H. La asignación de las señales de ambos compuestos, por otro lado, requirió un análisis extenso de los espectros en 2 dimensiones.

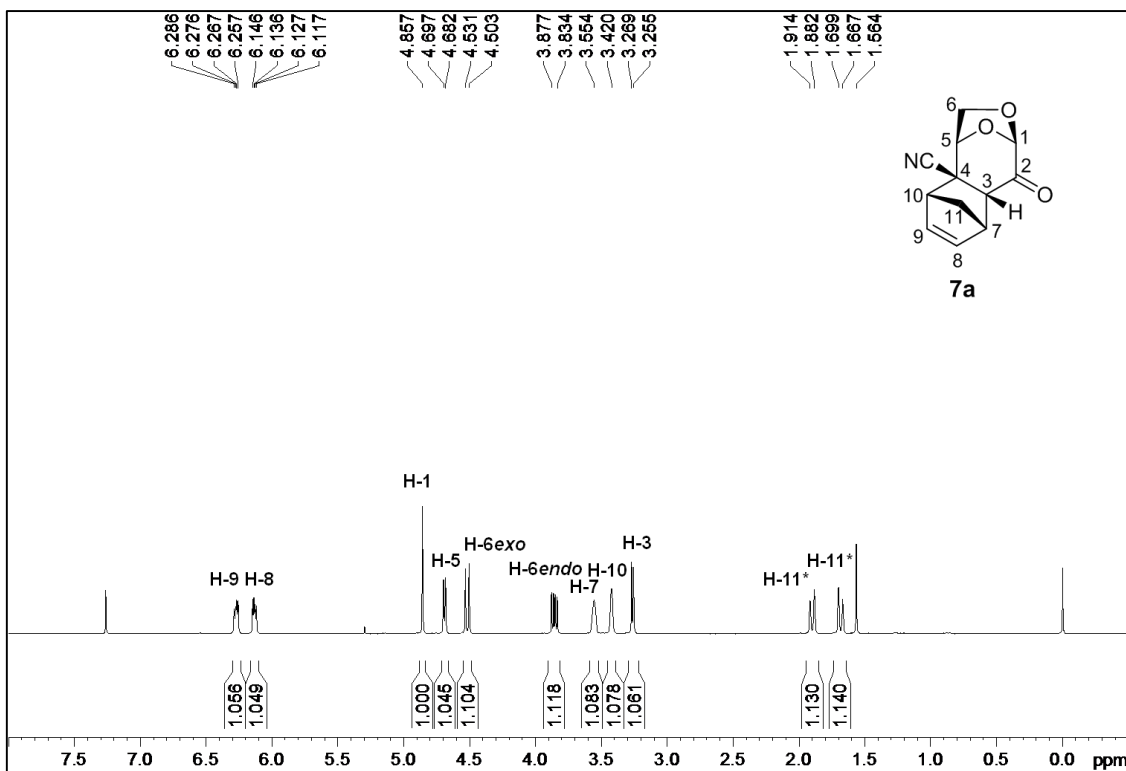
En el caso de los aductos de **3** con ciclopentadieno, la relación entre los aductos **7a** y **7b** se determinó por RMN ¹H de manera sencilla. Adicionalmente, se pudo purificar **7a** por recristalización con éter etílico/hexano y pudo ser caracterizado. Se observa también un importante acoplamiento de los H-6 (8,7 Hz).



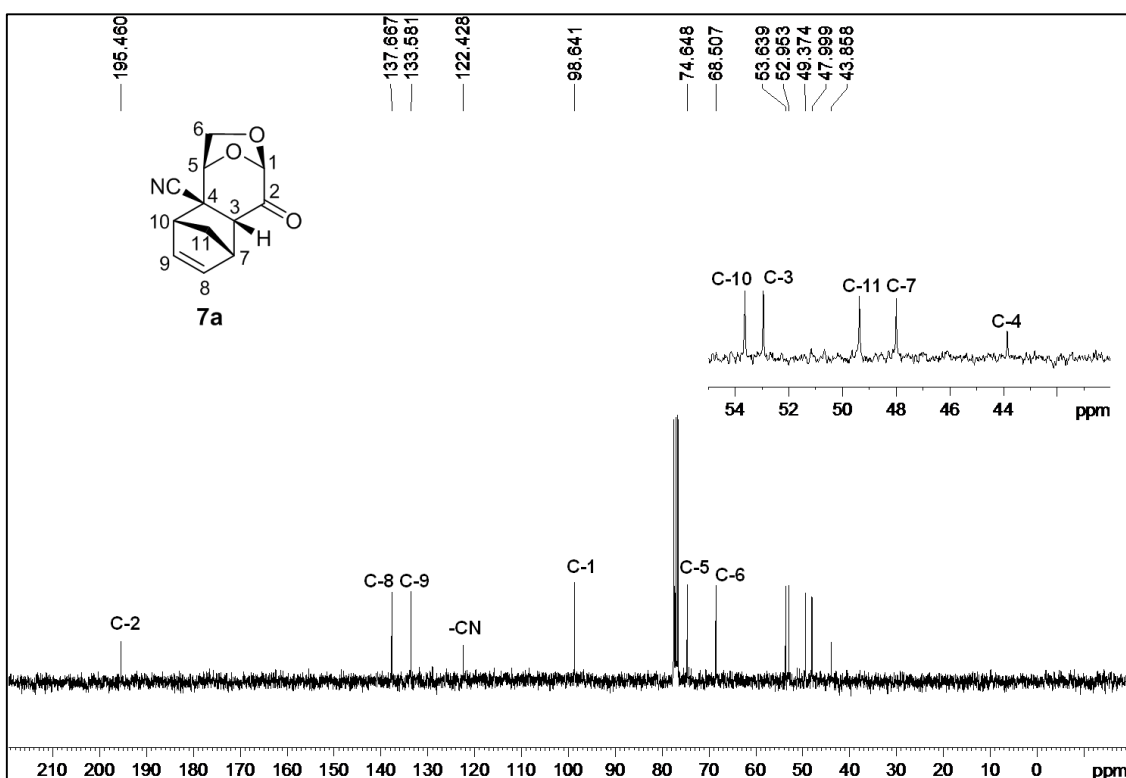
Espectro de RMN ¹H de 5a y 5b (300 MHz, CDCl₃)



Espectro de RMN ¹³C de 5a y 5b (75,5 MHz, CDCl₃)



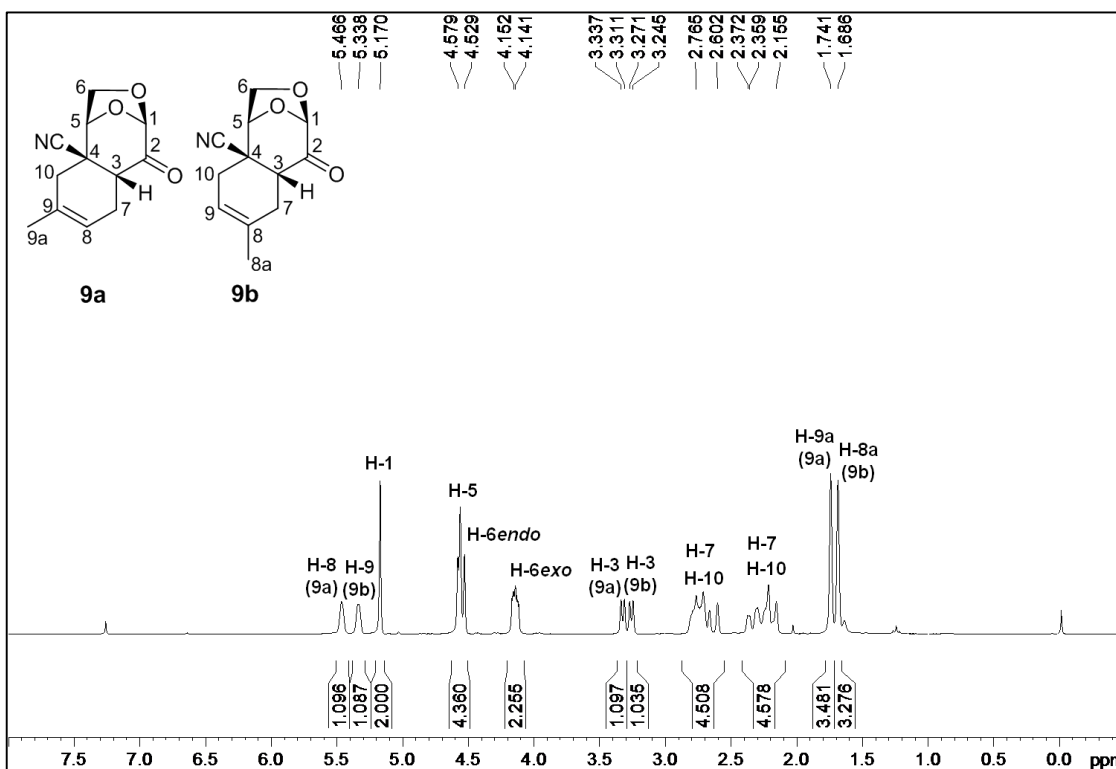
Espectro de RMN ^1H de 7a (300 MHz, CDCl_3)



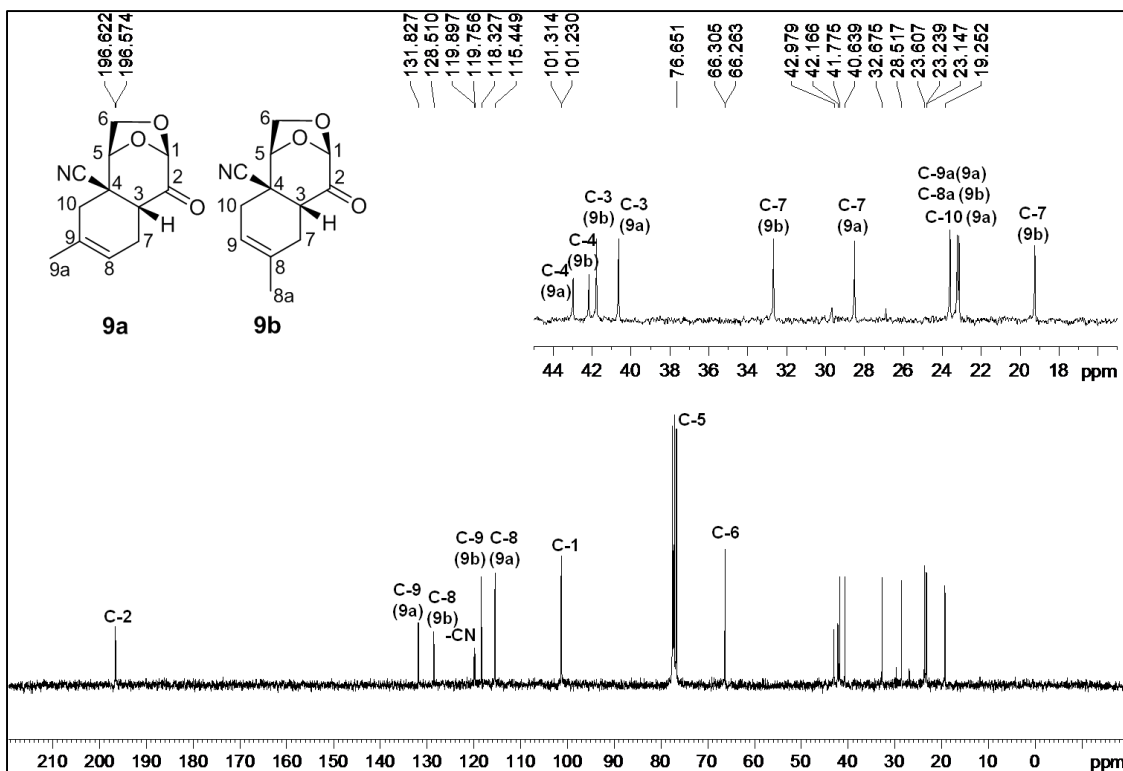
Espectro de RMN ^{13}C de 7a (75,5 MHz, CDCl_3)

En la reacción de cicloadición con isopreno, la mezcla de aductos **9a** y **9b** no pudo ser separada por cromatografía, algo que también se observa cuando se emplea a **1**

como dienófilo. La asignación estuvo basada en que el C-8 en **9a** es metínico y cuaternario en **9b**. Una vez identificados los carbonos en posición 3 el espectro de HMBC permitió observar una correlación con uno de los protones en la región de dobles enlaces del espectro, el cual correspondió al compuesto **9a**. Esto permitió obtener la proporción relativa de ambos aductos. El posterior análisis de los espectros llevó a la asignación de los compuestos presentes en la mezcla.

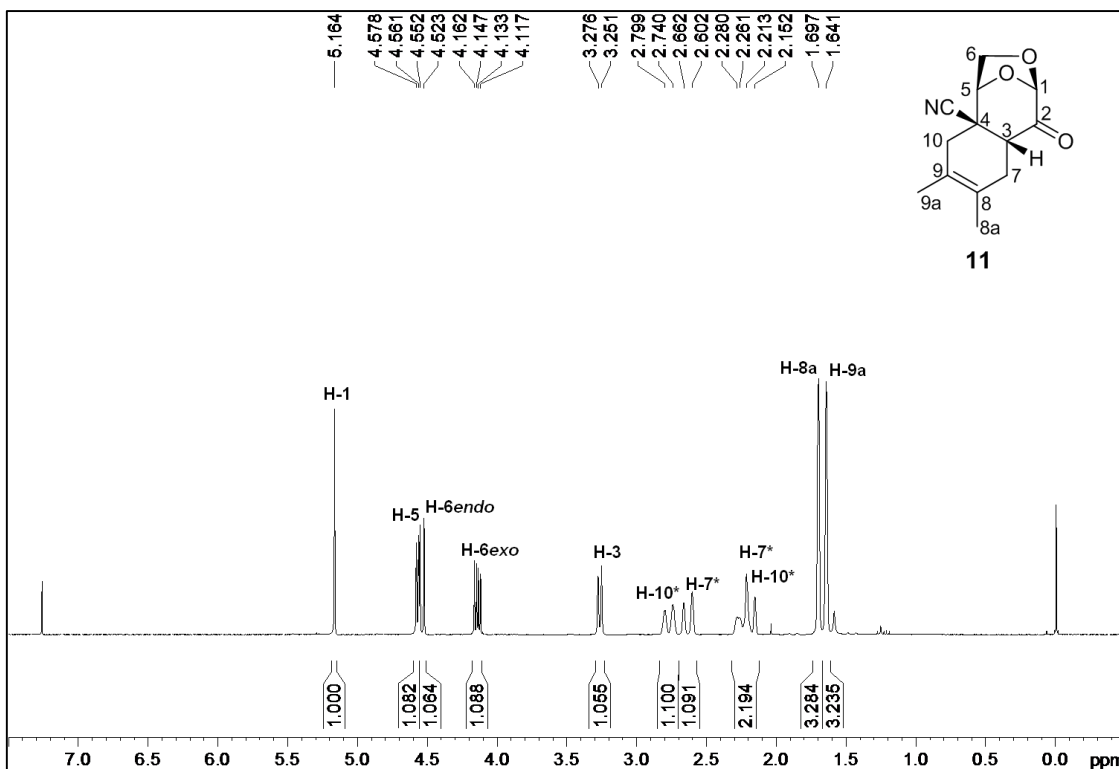


Espectro de RMN ^1H de **9a** y **9b** (300 MHz, CDCl_3)

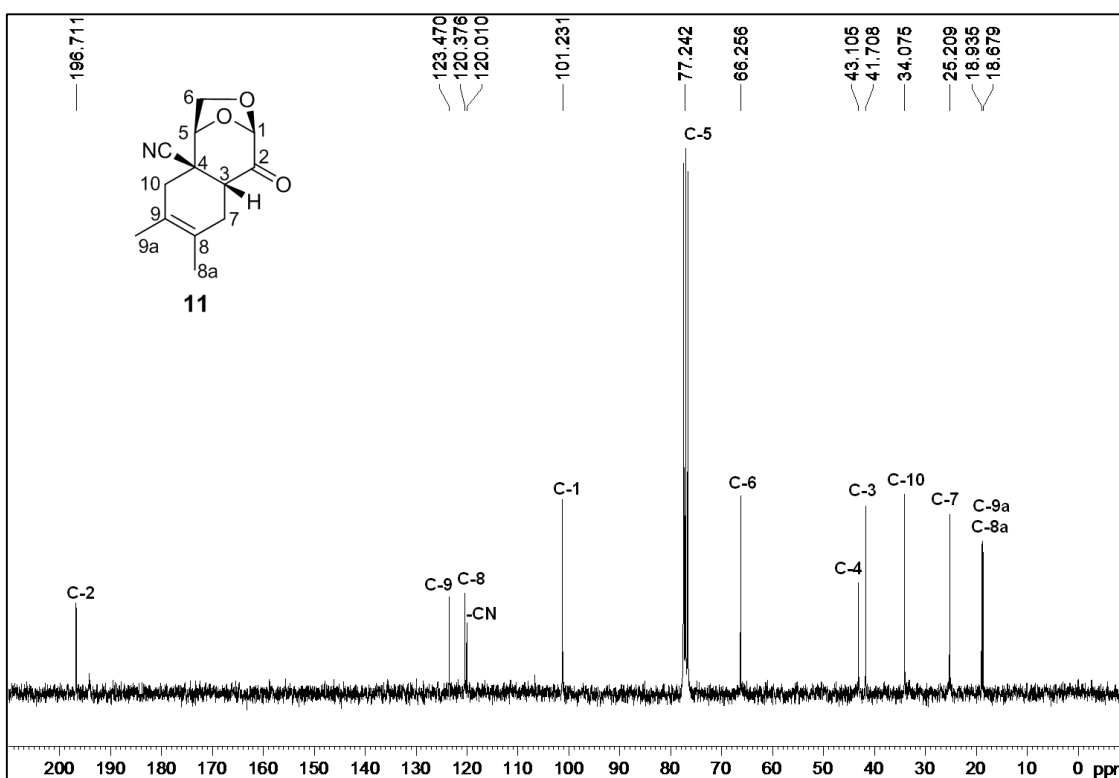


Espectro de RMN ^{13}C de 9a y 9b (75,5 MHz, CDCl_3)

Por último, para la asignación del compuesto **11** se tuvo en cuenta nuevamente el hecho de que el C-4 es cuaternario. Esto permitió identificar el C-3 mediante los espectros de HMBC y HSQC. La correlación en el espectro de HMBC de estos carbonos permitió definir las posiciones metilénicas en C-7 y C-10. Las posteriores correlaciones en estos espectros en dos dimensiones permitieron definir las posiciones del anillo de 6 miembros generado por la reacción de Diels-Alder.



Espectro de RMN ¹H de 11 (300 MHz, CDCl₃)



Espectro de RMN ¹³C de 11 (75,5 MHz, CDCl₃)

La tabla 4.4 muestra los tiempos de reacción y las selectividades observadas. Como era de esperarse, es evidente a partir de las entradas 2, 4, 6 y 8 los mejoramientos en los tiempos de reacción de uno o más órdenes de magnitud con el dienófilo **3**. La inversión de la regioselectividad *orto/para* observada con 9-metoximetilantraceno e isopreno, si bien el último es un dieno que no tiene un grupo funcional que pueda ejercer un control efectivo, muestra en que extensión el grupo ciano afecta el resultado de la reacción.

Es importante destacar además la excelente correlación entre los resultados experimentales y los cálculos computacionales efectuados, resaltando el gran poder predictivo de estos últimos en este tipo de sistemas.

Entrada	Dienófilo	Dieno	Tiempo	Selectividad	
				Experimental	Calculada
1	1	9-metoximetilantraceno	7 días	80:20 5a/5b	
2	3	9-metoximetilantraceno	1,5 días	30:70 6a/6b	
3	1	Ciclopentadieno	4 días	<i>endo/exo</i> 95:5	95:5
4	3	Ciclopentadieno	2 horas	<i>endo/exo</i> 94:6	93:7
5	1	Isopreno	3 horas	<i>para/meta</i> 65:35	68:32
6	3	Isopreno	20 min.	<i>para/meta</i> 48:52	41:59
7	1	2,3-dimetilbutadieno	2 horas	-	-
8	3	2,3-dimetilbutadieno	10 min.	-	-

Tabla 4.4

4.4.1. Intentos de optimización del rendimiento en la obtención de **3**

Posteriormente a esto, y dada la muy buena reactividad de **3**, se procedió a ensayar otras condiciones de reacción tendientes a mejorar el rendimiento en la obtención de este dienófilo.

Los resultados descritos en la tabla 4.5 permiten apreciar que los tiempos de reacción de los ensayos realizados en acetonitrilo (entradas 2 a 6) son mayores que aquellos llevados a cabo en solventes alcohólicos o agua (entradas 12 a 15) con excepción de la reacción en la cual se utiliza la resina ácida Amberlite IR-120 (entrada 1). La temperatura parece también ser una variable a tener en cuenta, ya que sólo las reacciones a temperatura ambiente dieron los mejores rendimientos. En la mayoría de los casos se utilizó KCN como reactivo nucleofílico. La disminución de los tiempos de reacción utilizando alcoholes o agua como solvente podría racionalizarse asumiendo la mayor solubilidad de KCN en estos solventes comparados con el acetonitrilo. En el

caso de la reacción en H₂O (entrada 15) además de la disminución en el tiempo de reacción nos permitió reducir hasta un 70% los equivalentes de KCN utilizados en el caso de las reacciones en acetonitrilo. Adicionalmente no se ha requerido el empleo de cromatografía para su purificación.

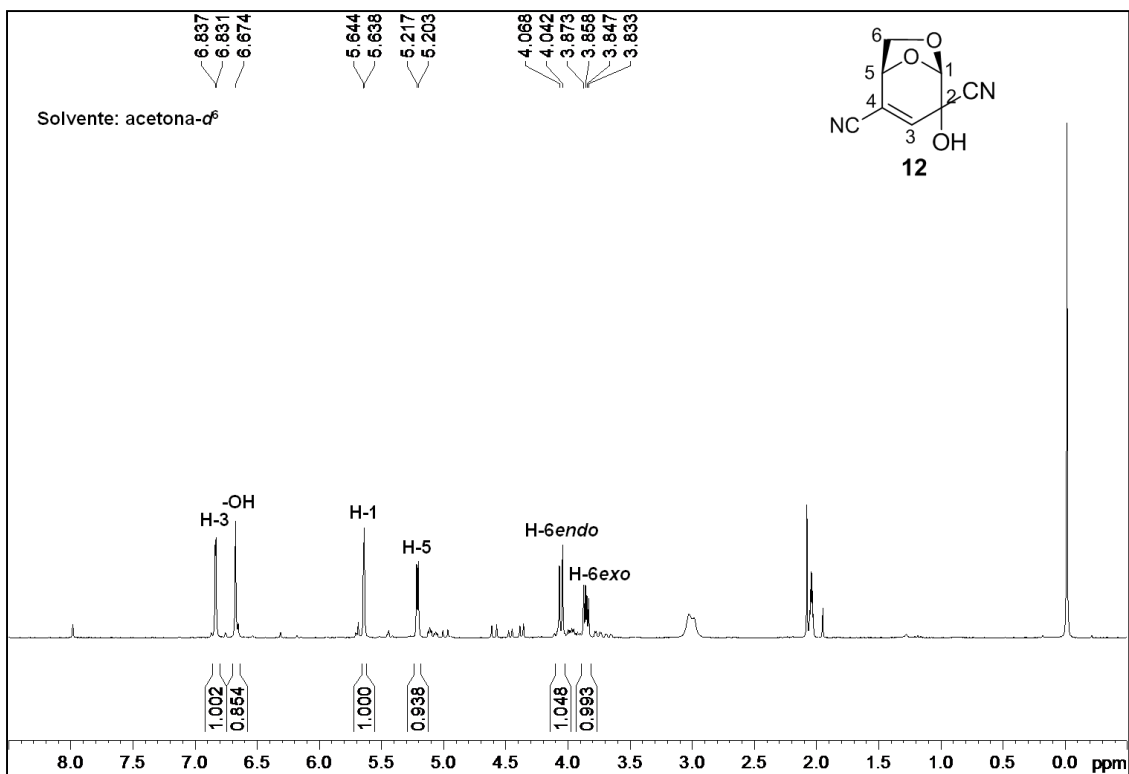
Entrada	Reactivo	Solvente	Temperatura (°C)	Eq. CN ⁻	Tiempo	Rendimiento (%)
1	KCN, Amberlite IR-120, Et ₃ N	Acetonitrilo	Ambiente	1,15	30 minutos	31
2	KCN, Et ₃ N	Acetonitrilo	Ambiente	7,12	2 días	34
3	KCN, Et ₃ N	Acetonitrilo	0	8,20	9 días	4
4	KCN, CuCN, Et ₃ N	Acetonitrilo	Ambiente	3,34	2 días	42
5	KCN, CuCN, (Bu ₄ N)CN	Acetonitrilo	Ambiente	4,95	4 días	41
6	KCN, 18-crown-6	Acetonitrilo	Ambiente	1,50	2 días	33
11	LiCN (0,5 M en DMF)	DMF	0	5,37	24 horas	Descomposición
12	KCN	EtOH 96°	50	2,19	30 minutos	Descomposición
13	KCN	EtOH 96°	Ambiente	1,23	15 minutos	25
14	KCN	EtOH absoluto	Ambiente	1,09	5 días	31
15	KCN	H ₂ O	Ambiente	1,15	7 minutos	37
16	CNSi(CH ₃) ₃ , Et ₂ AlCl	Tolueno	0	2,36	1,5 horas	Reversión al MP

Tabla 4.5.

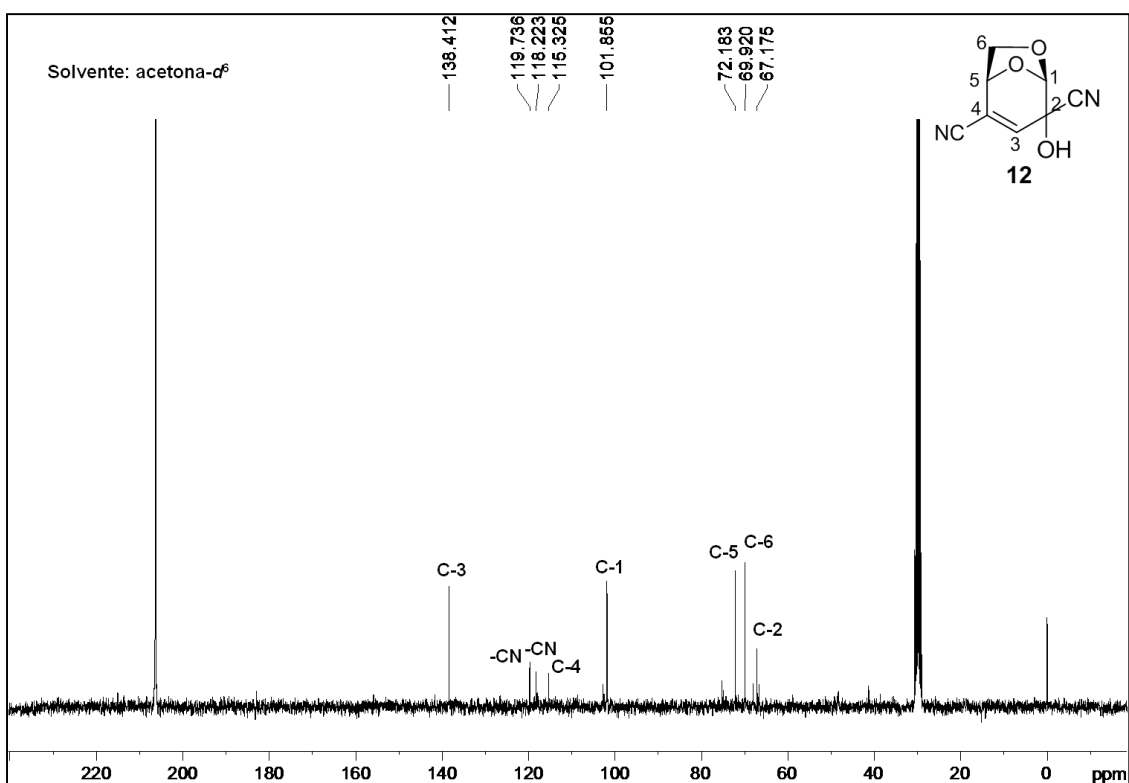
4.4.2. Posible explicación del bajo rendimiento en la obtención de 3

Dadas las dificultades encontradas para mejorar el rendimiento de **3**, abarcando un gran número de condiciones, procedimos a estudiar con mayor de detalle este resultado. Por cromatografía de capa delgada del crudo de la reacción se observó una mancha considerablemente más polar que el producto deseado y difícil de purificar. Esto podría deberse a la generación del hidrato en posición 2 o la correspondiente α -cianhidrina, lo cual explicaría la alta polaridad de dicho subproducto en detrimento de la recuperación de material y el rendimiento de la reacción.

Luego de algunos intentos se logró aislar una pequeña cantidad de dicho producto y se analizó por RMN ¹H y RMN ¹³C (espectros a continuación).



Espectro de RMN ^1H de 12 (300 MHz, acetona- d_6)



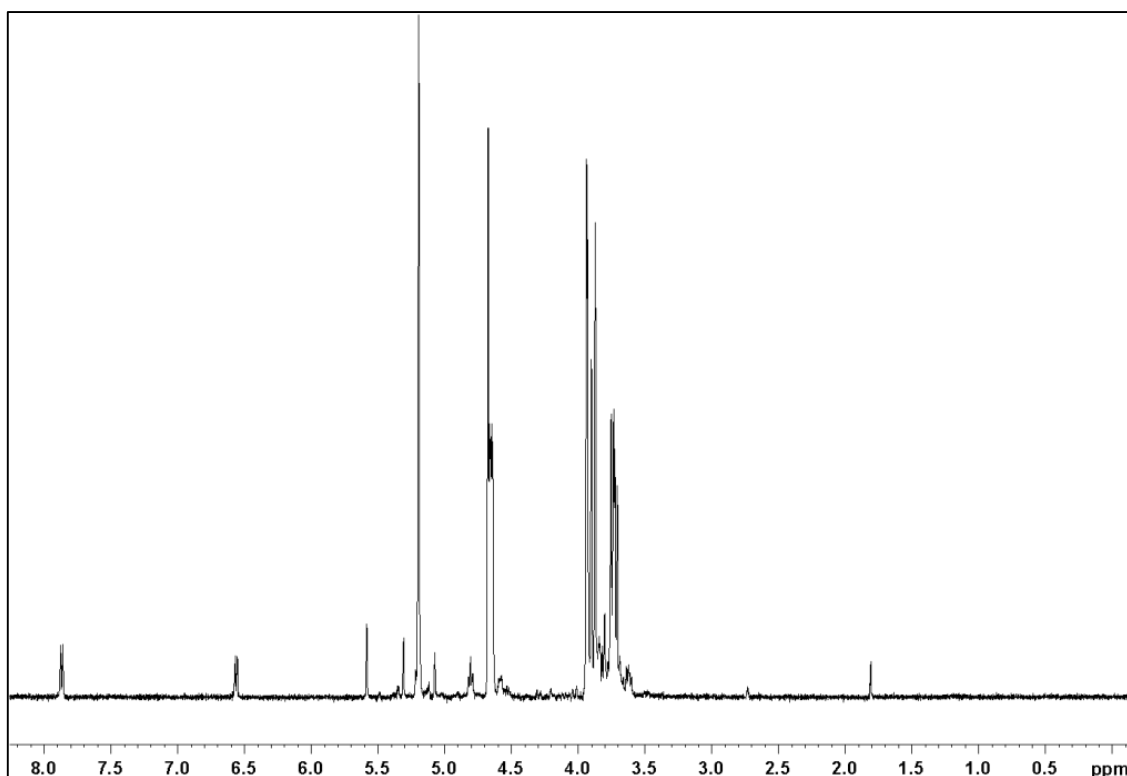
Espectro de RMN ^{13}C de 12 (75,5 MHz, acetona- d_6)

Dada la polaridad del mismo, éste no pudo ser disuelto en CDCl_3 por lo que los espectros se realizaron en acetona- d^6 .

Se pudo determinar que este nuevo compuesto (**12**) corresponde a la cianhidrina de **3**, resultante de una segunda adición de cianuro en posición 2. Éste se genera si los tiempos de reacción se prolongan y además si se incrementan los equivalentes de KCN utilizados en la reacción, siendo esto último independiente del solvente empleado.

Por otro lado la presencia del átomo de Br hace que el carbono en posición 4 de la molécula incremente notoriamente su electrofilia. Esto hizo que al disolver a **2** en agua, luego de un tiempo se observe la formación de un compuesto diferente tal como se evidencia por el espectro de RMN ^1H .

Se puede ver que el espectro de RMN ^1H de **2** en D_2O presenta un patrón de señales completamente diferente con respecto al espectro en CDCl_3 (Figura 4.1). Notoriamente se observa una disminución de la señal del H-4 y un cambio en el patrón de señales entre 3,5 y 4 ppm, además de algunas señales menores que aparecen en el espectro en D_2O (Figura 4.2).



Espectro de RMN ^1H de **2** al disolverse en D_2O

La formación de la cianhidrina **12** y la elevada electrofilia del C-4 de **2** permiten racionalizar los bajos rendimientos obtenidos de **3** en las diversas condiciones

ensayadas y dan indicio de la complejidad de dicha síntesis en este tipo de sistemas. En la sección 6.6.4.3 se estudió este efecto con más detalle realizando estudios adicionales por RMN ^1H en D_2O .

CAPÍTULO V

PIRÓLISIS DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES

Es generalmente reconocido que los recursos del mundo son limitados y la sustentabilidad se ha vuelto un punto crucial para el desarrollo de productos químicos. Estas circunstancias imponen una gran urgencia en la búsqueda de nuevas fuentes de materiales para su transformación en productos útiles dentro de áreas como la química fina y los combustibles, que puedan reemplazar las enormes demandas de suministros derivados del petróleo. El uso de materiales naturales renovables con el objetivo de incrementar su valor usando procesos biológicos, químicos y térmicos constituye una interesante opción para lograr una transición paulatina desde una economía basada en petróleo hacia una economía más sustentable, además de constituir una forma de hacer frente al cambio climático.¹²⁵

Los productos derivados de biomasa toman la forma de tallos, hojas, bagazo, raíces, cáscaras, madera, desechos municipales, etc.¹²⁵ Ampliamente accesible, renovable, y virtualmente gratis, este tipo de biomasa es un recurso importante, si bien podría causar problemas ambientales si no es usada o desechada apropiadamente. El reto, por lo tanto, es convertir estos desechos en una fuente de energía, productos químicos u otros usos productivos. Hay varias ventajas en el uso de biomasa además de ser un recurso renovable, especialmente de los subproductos provenientes de la actividad agrícola: además de tener el potencial de desplazar a los combustibles fósiles como fuente de energía, ayuda a reducir las emisiones de gases de efecto invernadero mientras cierra el ciclo de carbono. Mientras que el debate entre alimentación versus energía se intensifica, uno de los principales potenciales industriales de los desechos o subproductos provenientes de biomasa es que ellos no interfieren con la producción de alimentos o la biodiversidad¹²⁶ y pueden a su vez aportar un ingreso adicional a los agricultores. Más aún, desde un punto de vista químico, su naturaleza oxigenada, diversidad química y quiralidad hace a la biomasa un material altamente adecuado para manufacturar una amplia variedad de compuestos con alto valor agregado.⁵¹

Una manera de intentar agregar valor a los productos derivados de biomasa es mediante pirólisis. Como se mencionó en la introducción, el proceso es conocido desde hace tiempo y muchos investigadores han estudiado la pirólisis de diferentes tipos de biomasa. Dependiendo de las condiciones de pirólisis el proceso puede ser

clasificado en dos categorías principales: pirólisis convencional o lenta y pirólisis “flash” o rápida.¹²⁷ La primera se da a bajas temperaturas y con tiempos prolongados (en el rango de minutos) y favorece la obtención de productos químicos y carbón. La segunda ocurre a temperaturas elevadas y con tiempos de reacción muy cortos (menos de 1 segundo) y se emplea para poder obtener principalmente combustible líquido. La biomasa consiste principalmente de tres componentes: celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales tienen diferente comportamiento térmico. Los productos de la pirólisis de biomasa pueden ser considerados el resultado global de la pirólisis de estos tres componentes principales.^{128,129}

Por otro lado, el grano de soja (*Glycine max*) es una fuente principal de energía y alimento para la población mundial. La producción mundial de soja para la campaña 2014/2015 es estimada en 314,4 millones de toneladas.¹³⁰ Las cáscaras son un subproducto del procesamiento postcosecha del cultivo y constituyen el 5% de la producción del cereal. Las cáscaras de soja constan principalmente de celulosa (38%), hemicelulosas (10%), lignina (2,8%), proteínas (10%) y ceniza (1-4%).¹³¹

Estos subproductos constituyen una fuente importante de materiales de bajo valor en países productores de soja como es el caso de Argentina.¹³² Como ya fue mencionado, una forma de agregar valor a estos desechos es a través de un proceso térmico. Por estas razones decidimos estudiar en primer término el comportamiento pirolítico de cáscara y harina de soja en condiciones de pirólisis lenta.

5.1. Análisis Termogravimétrico

Previamente a la reacción de pirólisis se procedió a estudiar el efecto de la temperatura sobre el proceso de descomposición térmica. Para ello se realizó un análisis termogravimétrico de las muestras a pirolizar. Éste es un experimento dinámico en el cual se registra, de manera continua, la masa de cada muestra colocada en una atmósfera controlada en función de la temperatura; en nuestro caso la temperatura se incrementó de forma lineal con el tiempo.

La figura 5.1 ilustra la descomposición térmica por etapas de cáscara y harina de soja sin tratamiento ácido previo a la reacción de pirólisis y con los tratamientos con H₃PO₄ al 1% y al 10%. Se observa en primer lugar que hay una disminución de la pérdida de masa al incrementarse el tratamiento ácido para ambos materiales.

Analizando con más detalle los termogramas se pueden sacar algunas conclusiones para cada una de las muestras en particular. En el caso de cáscara de soja la temperatura a la cual la máxima pérdida de masa ocurre disminuye con el incremento de la concentración de ácido usada en el tratamiento previo a la pirólisis. Esta temperatura corresponde a la degradación de hemicelulosa. Similarmente, la

temperatura a la cual la celulosa comienza a descomponerse disminuye con el tratamiento ácido (alrededor de 300 °C para la muestra sin tratamiento ácido y 210 °C para la muestra tratada con H₃PO₄ 10%).¹²⁹ En el caso de la harina si bien la pérdida de masa disminuye con el tratamiento ácido empleado como se mencionó en el párrafo anterior, no hay una relación tan clara entre la degradación de ciertos tipos de biopolímeros presentes en este material y el tratamiento ácido al que fue sometido como se puede evidenciar para las muestras de cáscara de soja. El hecho de que la harina presente un contenido importante de ácidos grasos en su composición podría tal vez ser el responsable de las diferencias observadas en los termogramas de este material con respecto a la cáscara. Este análisis permite evidenciar el efecto de la concentración de ácido empleada previo a la reacción de pirólisis tanto para cáscara como para harina de soja.

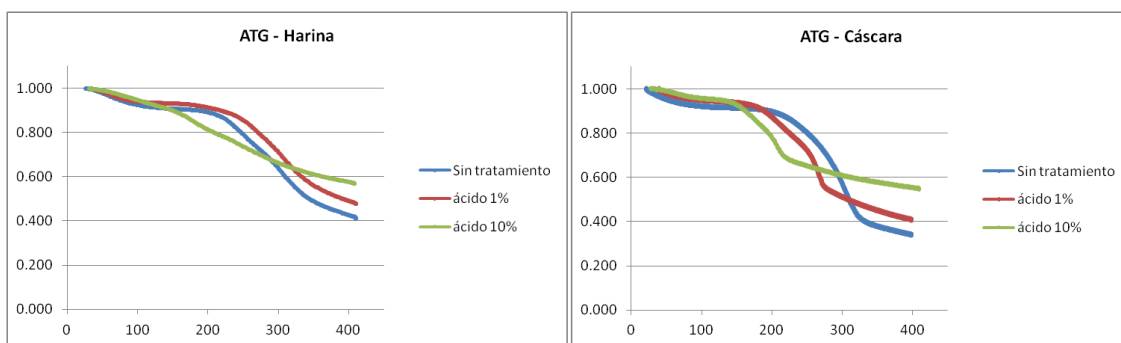


Figura 5.1

5.2. Reacción de pirólisis: efecto del ácido y la temperatura sobre el rendimiento del crudo

Del análisis termogravimétrico precedente se escogieron 3 temperaturas de pirólisis: 250°C, 300°C y 350°C, importantes en el proceso de degradación térmica y que abarcan un rango significativo de pérdida de masa de las muestras. Las 6 muestras empleadas en el estudio anterior fueron pirolizadas a estas temperaturas con el fin de evaluar en principio el efecto de estas variables sobre el rendimiento del crudo resultante de las pirólisis.

La tabla 5.1 muestra el rendimiento del crudo de pirólisis en comparación con el porcentaje de carbón obtenido en las condiciones ensayadas, ambos calculados a partir de la masa de material pirolizado. Se observa en primera instancia una relación directa entre la temperatura y el porcentaje de bioaceite obtenido para todas las muestras en las condiciones evaluadas en este estudio. En general también se evidencia una disminución del rendimiento de bioaceite al emplear la máxima

concentración de ácido; esta relación es más clara cuando se analizan los valores de rendimiento a 350 °C. Estas tendencias se observan mejor en los gráficos 5.1 y 5.2, donde se muestra el rendimiento de crudo como función de la temperatura y de la concentración de ácido empleada como tratamiento previo a la pirólisis tanto para cáscara como para harina de soja. Existe una relación creciente entre porcentaje de crudo de pirólisis con la temperatura para ambos materiales. Por otro lado, al analizar la concentración de ácido se evidencia que para cáscara de soja los mayores rendimientos se observan para la región del gráfico correspondiente a una concentración de ácido cercana al 1%, mientras que para harina los rendimientos más elevados se encuentran entre 0 y 1% de H₃PO₄. De todos modos, una concentración de H₃PO₄ de 10% provoca una fuerte disminución de rendimientos de crudo para ambas materias primas.

Muestra	Ácido (%)	Temp. (°C)	Rend. crudo (%)	Carbón (%)
Cáscara	-	250	0,69	65,31
		300	2,40	40,44
		350	6,69	30,99
	H ₃ PO ₄ 1 %	250	3,17	54,46
		300	4,72	46,03
		350	5,39	39,24
	H ₃ PO ₄ 10 %	250	1,17	63,57
		300	1,46	59,58
		350	1,87	59,96
Harina	-	250	3,39	62,60
		300	6,34	47,54
		350	12,92	37,59
	H ₃ PO ₄ 1 %	250	1,79	68,71
		300	8,21	54,46
		350	10,22	46,78
	H ₃ PO ₄ 10 %	250	1,71	58,02
		300	2,45	52,90
		350	3,29	54,15

Tabla 5.1

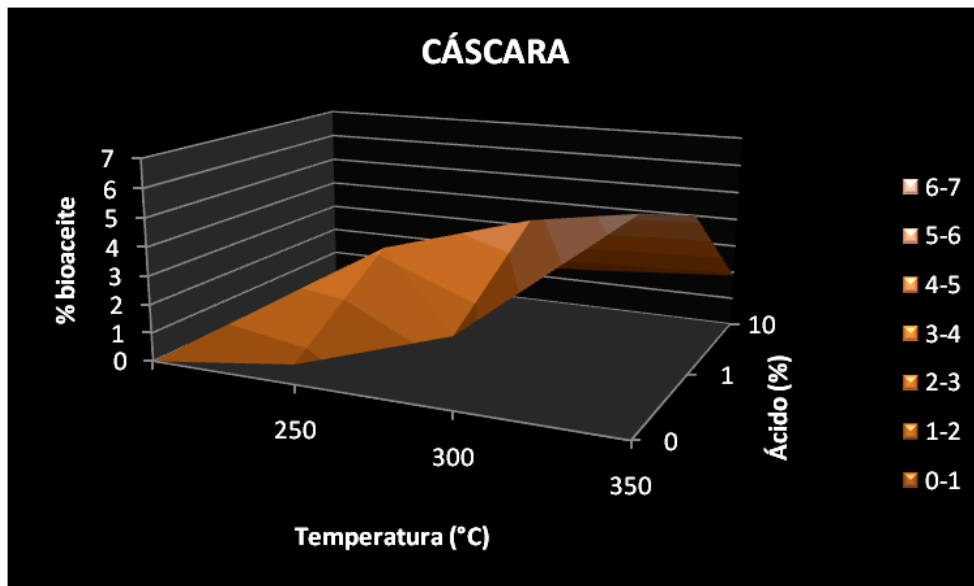


Gráfico 5.1

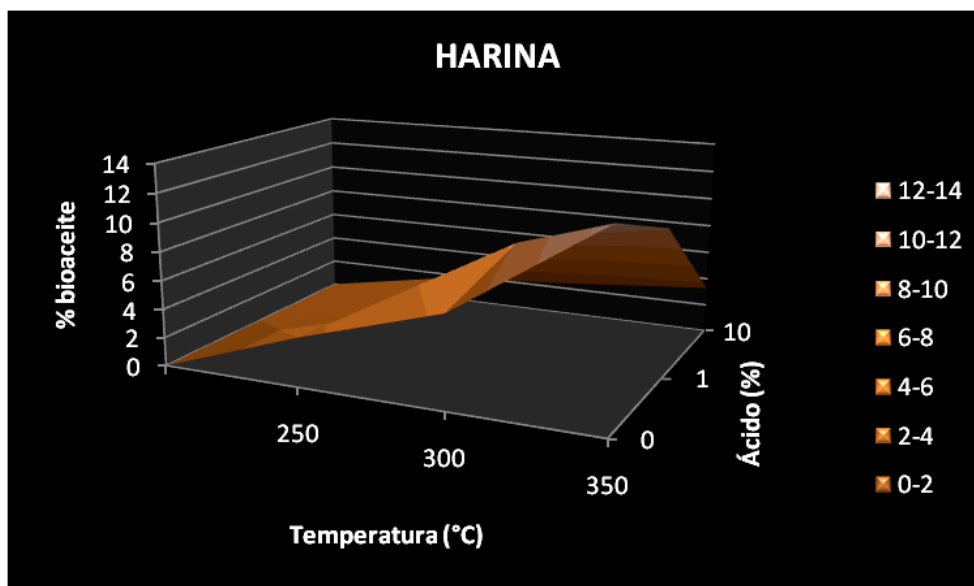


Gráfico 5.2

Por otro lado, la tabla 5.1 también muestra que hay una disminución en el porcentaje de carbón obtenido al incrementarse el rendimiento del crudo, sugiriendo que a las temperaturas más altas hubo una transformación más eficiente de material en bioaceite, en detrimento de la cantidad de residuo. Asimismo, el contenido de agua varió entre 20-40%, siendo mayor la variación cuando las muestras de cáscara y harina fueron pre-tratadas con ácido. Estos experimentos mostraron adicionalmente una recuperación de masas de hasta el 90%, indicando que sólo un bajo porcentaje de gases fue perdido.

Este análisis sugiere que las variables estudiadas influyen notoriamente sobre el rendimiento del condensado obtenido luego del tratamiento térmico. Se desprende que concentraciones bajas de H_3PO_4 y altas temperaturas permiten obtener los mayores porcentajes de bioaceite para cáscara y harina de soja y reducir las emisiones de gases.

5.3. Efecto de las condiciones de pirólisis sobre la composición del crudo de reacción

Se estudiaron posteriormente los efectos que la concentración de ácido en el tratamiento de la muestra previo a la pirólisis y la temperatura de la misma tienen sobre el perfil de compuestos obtenidos tanto para cáscara como para harina de soja. La extensión de las modificaciones se evaluó por RMN¹H.

Efecto de la concentración de ácido

Se comparó el efecto que tiene el tratamiento previo de la muestra con distintas concentraciones de ácido fosfórico (1% y 10%) sobre la composición de los bioaceites obtenidos a las distintas temperaturas de pirólisis comparadas con las muestras sin tratar.

Efecto de la temperatura de pirólisis

Se comparó luego el efecto que tiene la temperatura de la reacción de pirólisis (250, 300, y 350 °C) sobre la composición de los bioaceites de las muestras tratadas con las distintas concentraciones de ácido fosfórico y aquellas sin tratamiento.

La Figura 5.2 muestra los espectros de RMN ¹H obtenidos de bioaceites de cáscara de soja bajo las diferentes temperaturas de pirólisis y pre-tratamiento ácido de las muestras. La comparación de los espectros mostró que el tratamiento ácido previo a las reacciones de pirólisis causó cambios notorios en la composición del bioaceite. Es digno de mencionar la aparición de señales de aldehído aproximadamente a 10 ppm, correspondientes a derivados de furfuraldehído en muestras pre-tratadas con ácido y la modificación del patrón de señales entre 1-3 ppm y 4-5 ppm. Por otro lado, la temperatura de pirólisis no indujo un cambio sustancial de los espectros de RMN ¹H de los bioaceites. Estos resultados sugirieron que sólo el tratamiento ácido previo de la muestra tiene un efecto importante en modificar el perfil de compuestos de los bioaceites de cáscara de soja.

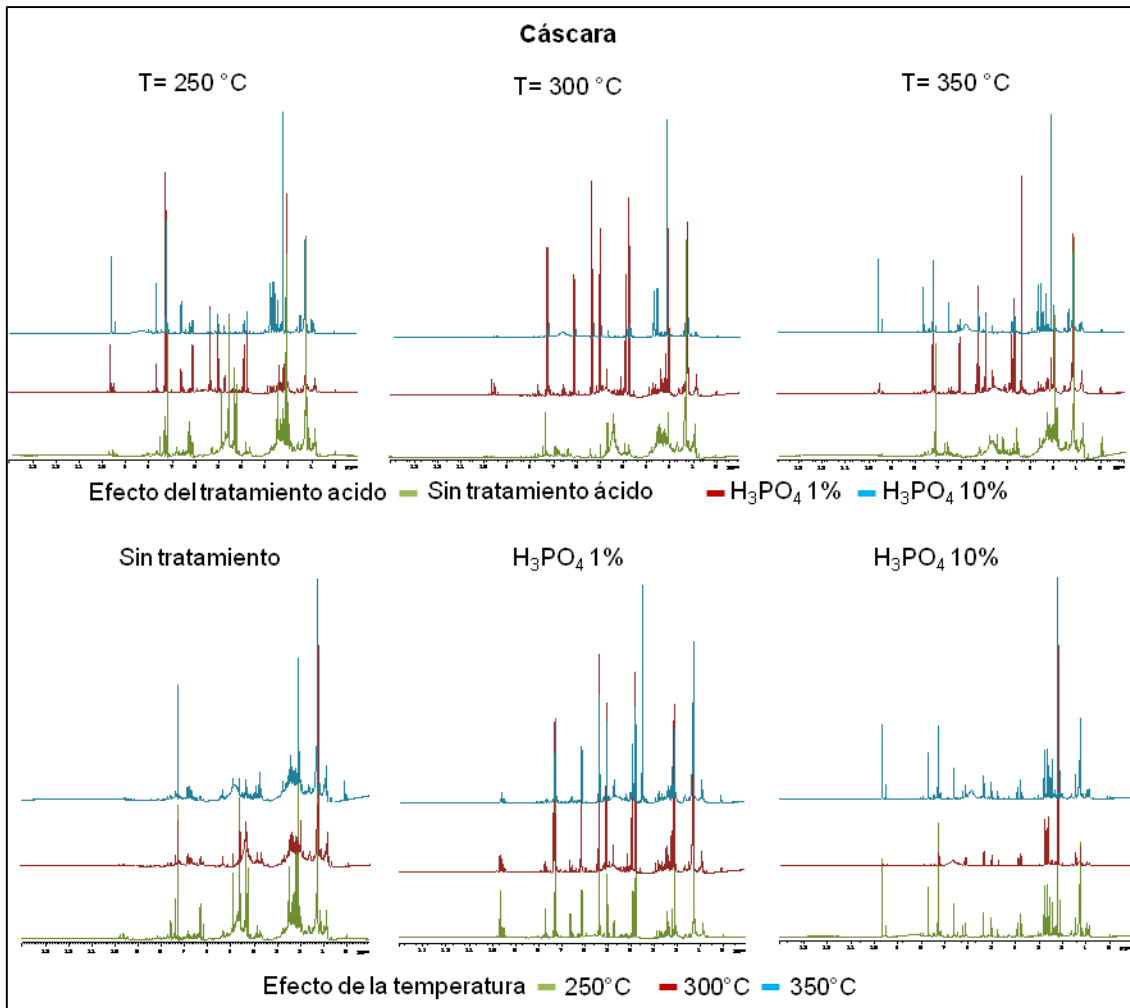


Figura 5.2

La figura 5.3 muestra los espectros de RMN ^1H obtenidos de bioaceites de harina de soja bajo las diferentes condiciones de pirólisis y pre-tratamiento ácido de las muestras. En este caso no hubo una evidencia clara de alteración de los espectros ya sea con el pre-tratamiento ácido de la muestra o con la temperatura de la reacción de pirólisis. Los espectros muestran el patrón de señales típico de los ácidos grasos; es decir, señales entre 1-3 ppm correspondiente a protones alifáticos y la señal alrededor de 5 ppm indicando la presencia de dobles enlaces correspondientes a ácidos grasos insaturados. Dada las bajas temperaturas empleadas y el hecho de que las pirólisis se efectuaron en ausencia de oxígeno, es lógico pensar que los ácidos grasos no sufrieron combustión y de esta manera fueron capaces de permanecer sin cambios durante todo el proceso pirolítico.

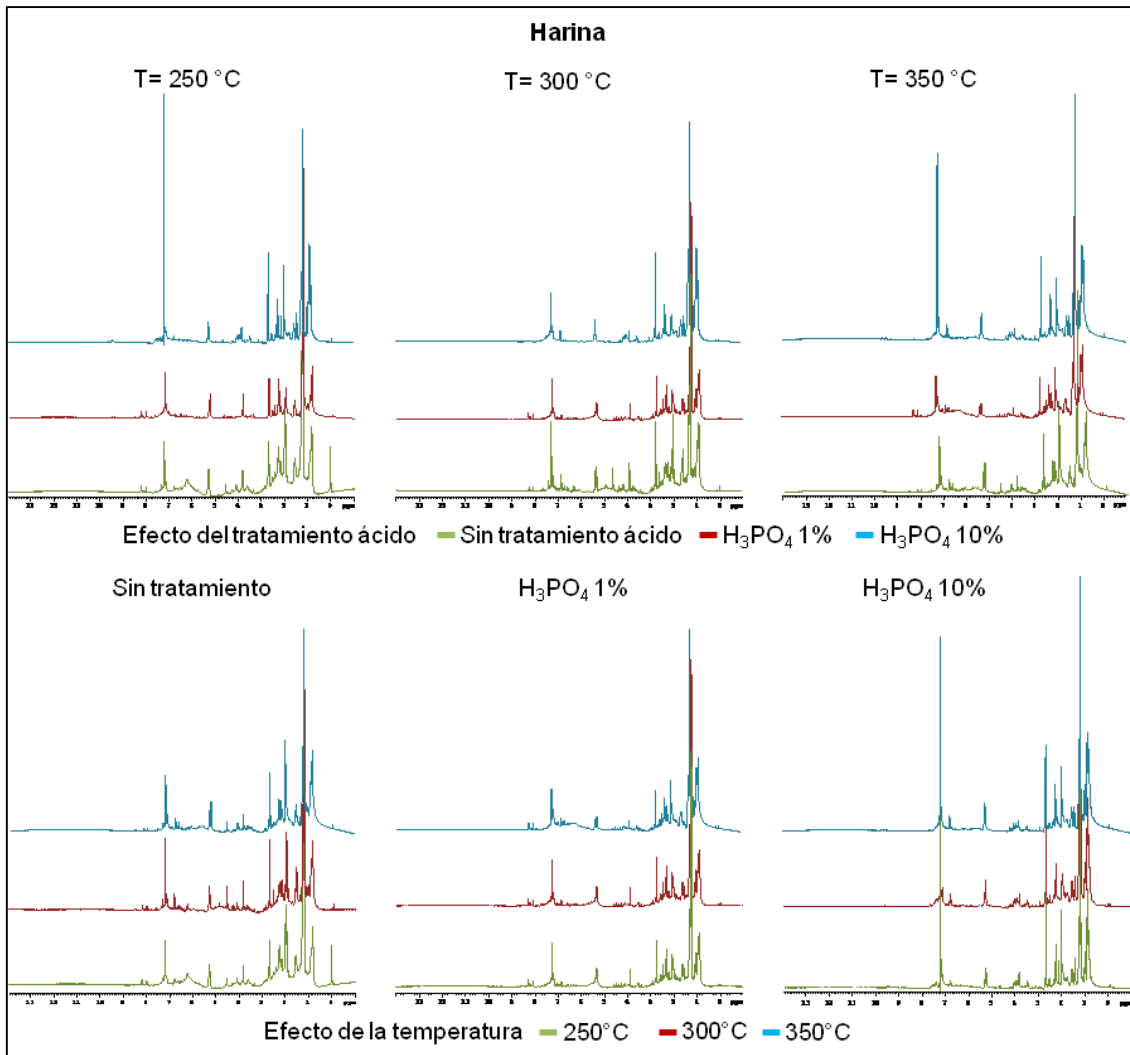


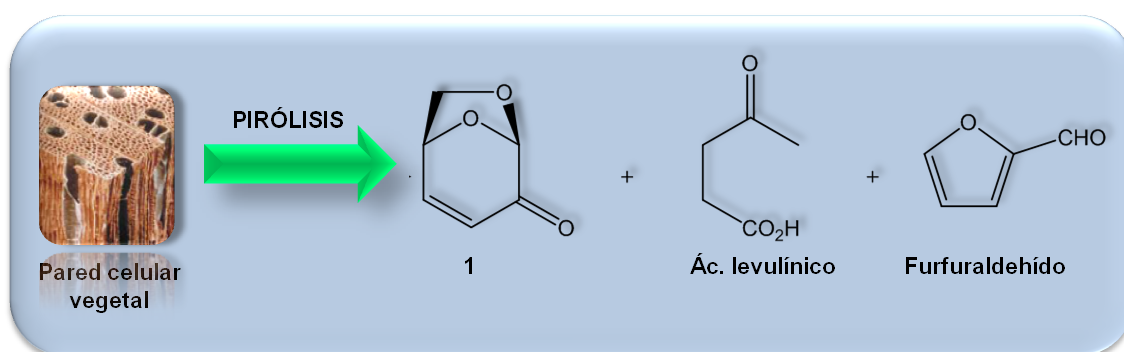
Figura 5.3

Con este sencillo estudio se puede inferir que, de las dos variables implicadas en el procesamiento de la muestra, sólo la concentración de ácido fosfórico utilizada en el tratamiento pre-pirólisis fue la que alteró de manera más apreciable la composición de los crudos de reacción para el caso de cáscara de soja. En el caso de harina no se pudo determinar una influencia destacable de alguna de las dos variables en estudio. Estos resultados, junto con los mostrados en la Tabla 5.1, resaltan la influencia del pre-tratamiento ácido de la muestra y la temperatura de pirólisis como variables clave en el resultado del proceso pirolítico. Mientras la primera afectó la distribución de productos en muestras de cáscara de soja, la segunda modificó los rendimientos en ambos materiales.

5.4. Evidencia de la obtención de levoglucosenona en bioaceites de cáscara de soja

Adicionalmente a las conclusiones mencionadas en el apartado anterior, el análisis espectroscópico nos permitió determinar la presencia de levoglucosenona en algunas muestras. Observando los espectros de RMN ^1H de las muestras de cáscara de soja se ve claramente que aquellas que fueron tratadas previamente con ácido presentan los desplazamientos químicos típicos de **1**. Las señales son más intensas para el espectro de la muestra tratada con H_3PO_4 1%. Por el contrario, no se observan señales de levoglucosenona en el espectro de la muestra sin tratar con ácido. Esto fue posible debido al contenido de celulosa que presenta la cáscara de soja y también es evidencia clara de que bajas concentraciones de ácido favorecen la degradación térmica de la cadena polimérica de celulosa hacia **1**, de la misma manera que cuando se utiliza ese biopolímero como único material de partida. Por otro lado no se observó levoglucosenona en los espectros de harina de soja. Esto posiblemente se deba a la muy baja proporción de celulosa en este material y a la presencia de ácidos grasos como se evidenció en el análisis por RMN del apartado anterior.

Además de levoglucosenona, la celulosa (el biopolímero mayoritario en las paredes celulares vegetales) permite obtener ácido levulínico y/o furfuraldehído cuando es pirolizada en presencia de cantidades catalíticas de ácido (Esquema 5.1). La presencia de estos compuestos es dependiente tanto de la cantidad de ácido empleada como del tipo de calentamiento (convencional o asistido por microondas).⁴⁰



Esquema 5.1

Un análisis por CG-EM (Figura 5.4) nos permitió evidenciar estos productos en distintos bioaceites. Los cromatogramas de los bioaceites obtenidos a partir de muestras pre-tratadas con H_3PO_4 mostraron una señal con un $t_R = 8$ min correspondiente a levoglucosenona. En algunos cromatogramas también se observaron señales provenientes de ácido levulínico ($t_R = 7$ min) y furfuraldehído ($t_R =$

4,5 min). En líneas generales puede decirse que el tratamiento ácido más fuerte causó la generación de los subproductos de la pirólisis de celulosa mencionados en detrimento de la obtención de **1**. Además se pudo observar la aparición de una señal proveniente de dianhidro- α -D-glucopiranososa ($t_R = 11,5$ min) en todos los cromatogramas. Por otro lado, no se observó levoglucosenona en las muestras sin tratar con ácido en concordancia con el análisis por RMN ^1H .

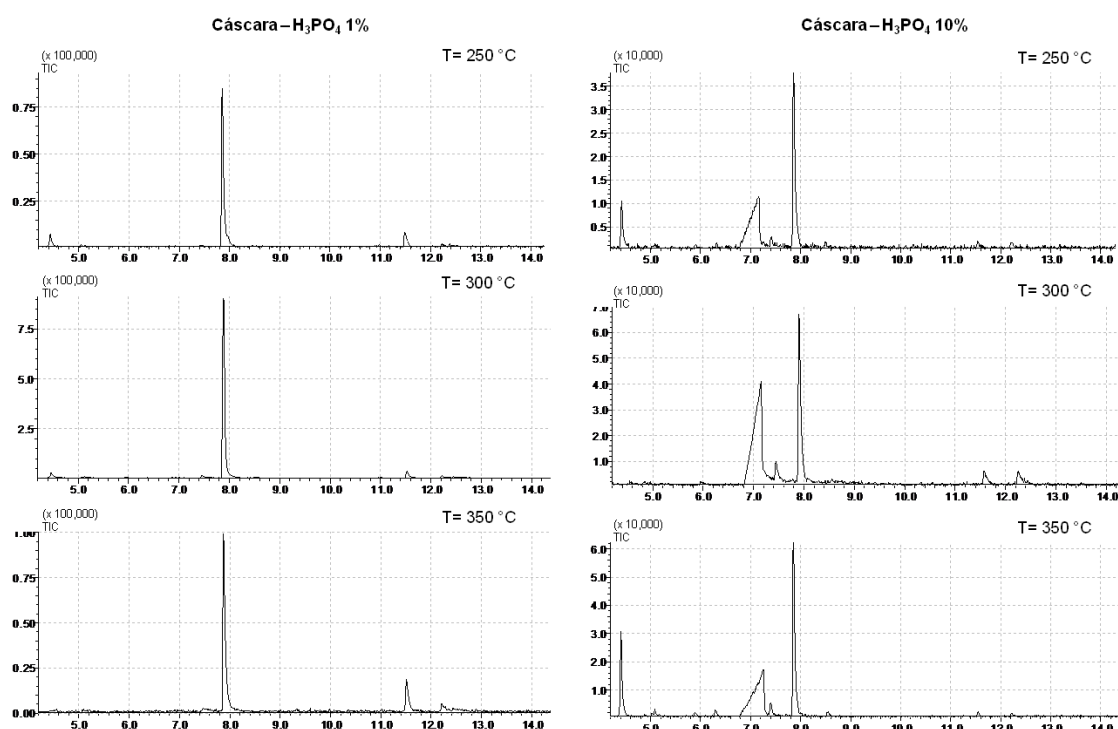


Figura 5.4

Estas relaciones se pudieron determinar más claramente a partir de los espectros de RMN ^1H de todas estas muestras (Tabla 5.2). Se observa sin lugar a dudas que el tratamiento con bajas concentraciones de ácido permite obtener mayoritariamente **1** con una menor proporción de subproductos en comparación al tratamiento ácido más fuerte.

H_3PO_4 (%)	T (°C)	Relación 1:levulínico:furfuraldehído
1	250	83:10:7
1	300	78:12:10
1	350	87:9:4
10	250	36:43:21
10	300	48:48:4
10	350	43:50:7

Tabla 5.2

Hasta aquí se ha demostrado que es posible obtener levoglucosenona a partir de cáscara de soja y que el tratamiento del material con concentraciones de ácido elevadas genera la aparición de subproductos de la pirólisis de celulosa. Por último, resta estudiar la cantidad relativa de **1** entre muestras provenientes de los distintos tratamientos ácidos antes de la reacción de pirólisis. La figura 5.5 muestra la presencia de levoglucosenona en los bioaceites evidenciada por las señales de los protones H-1 y H-5. Se puede determinar de manera adicional y complementaria a los resultados precedentes que la relación máxima de levoglucosenona entre distintos bioaceites dada por las integraciones de las señales se obtuvo a 300 °C y fue de 3,4 a 1 mayoritariamente para la muestra proveniente del tratamiento con ácido al 1% con respecto a aquella pre-tratada con una concentración de ácido de 10% basado en un estudio comparativo por RMN 1H. Para tal análisis todas las muestras contuvieron la misma cantidad de material disuelto en igual volumen de solvente.

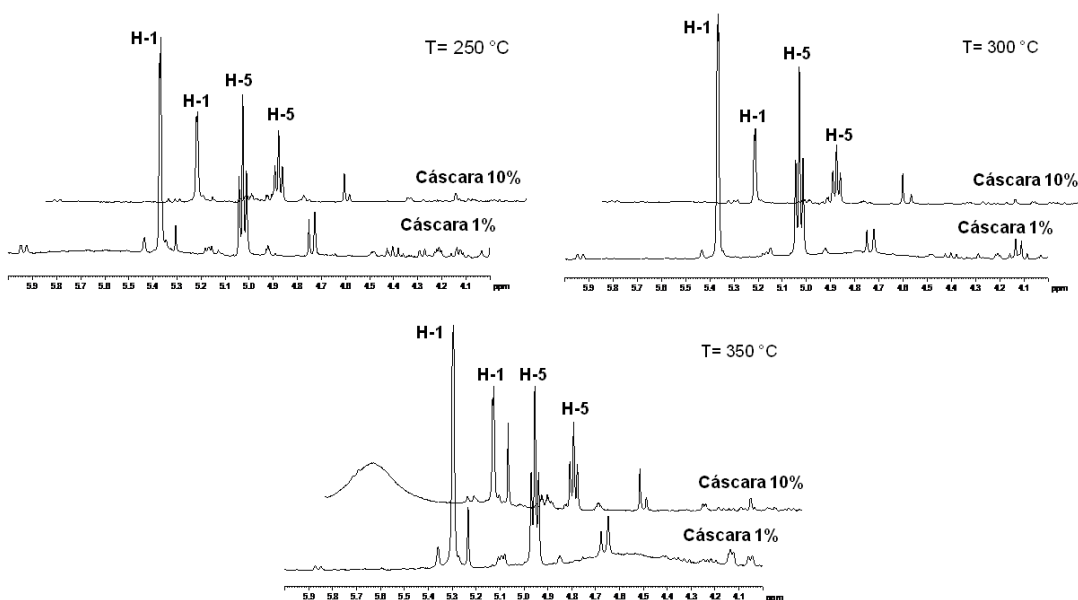


Figura 5.5

Como conclusión de esta sección, todos estos resultados demuestran que condiciones suaves de tratamiento ácido son efectivas para obtener levoglucosenona como producto mayoritario con sólo cantidades menores de productos secundarios a partir de pirólisis de cáscara de soja. Por último, el hecho de encontrar **a1** en este subproducto agroindustrial destaca que es posible la reutilización de esta materia prima obteniéndose un importante sintón quiral, con la potencialidad de agregar valor a un material de escasa valía.

CAPÍTULO VI

BÚSQUEDA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN BIOACEITES DE CÁSCARA Y HARINA DE SOJA

Una vez concluido el estudio acerca del comportamiento pirolítico de cáscara y harina de soja se procedió a evaluar las muestras mediante distintos ensayos para determinar la presencia de compuestos que puedan poseer determinadas actividades biológicas. En el capítulo anterior se menciona que en líneas generales el tratamiento ácido afecta en mayor grado la composición de los condensados obtenidos mediante pirólisis en el caso de cáscara de soja al observarse cambios importantes en los espectros de RMN ^1H . Tomando como base esa observación se han escogido las 3 muestras de cáscara de soja pirolizadas a 300°C , dos de ellas tratadas previamente a la pirólisis con H_3PO_4 al 1% y al 10% y la tercera sin tratamiento, a las cuales se las denominó **C1p**, **C10p** y **C0p** respectivamente; reservándose la letra “p” para designar “pirolizado”. Para el caso de harina de soja se eligió la muestra tratada con H_3PO_4 al 1% y pirolizada a 300°C a la que se denominó **H1p**.

Los ensayos utilizados ya se han descrito en el capítulo introductorio. A modo de repaso se mencionan a continuación:

- Métodos autográficos que emplean enzimas:
 - Ensayo para la detección de inhibidores de β -glucosidasa
 - Ensayo para la detección de inhibidores de acetilcolinesterasa
 - Ensayo para la detección de inhibidores de xantina oxidasa
- Métodos autográficos que emplean agentes químicos:
 - Ensayo para la detección de antioxidantes basado en la captación de superóxido
 - Ensayo antioxidante basado en la captación del radical DPPH
- Métodos autográficos que emplean células enteras:
 - Ensayo para la detección de inhibidores del sistema regulador de la virulencia de *Salmonella* PhoP/PhoQ

6.1. Detección de inhibidores de β -glucosidasa

Los inhibidores de glicosidasas han sido sujeto de extenso interés por su potencial como fármacos para el tratamiento de diabetes, cáncer, infecciones virales, entre otras.⁷⁷ Por ello se ensayaron en primer lugar las muestras elegidas para detectar inhibidores de la enzima β -glucosidasa según el ensayo descrito en el capítulo introductorio.

El método bioautográfico tiene en cuenta la capacidad de la enzima de escindir el enlace glucosídico del sustrato esculina generando esculetina que en presencia de FeCl_3 forma un complejo marrón.⁷⁸ Si un compuesto presente en la mezcla es un inhibidor de β -glucosidasa la esculina no será hidrolizada y por lo tanto no se formará el complejo coloreado observándose un halo más claro en el R_f correspondiente.

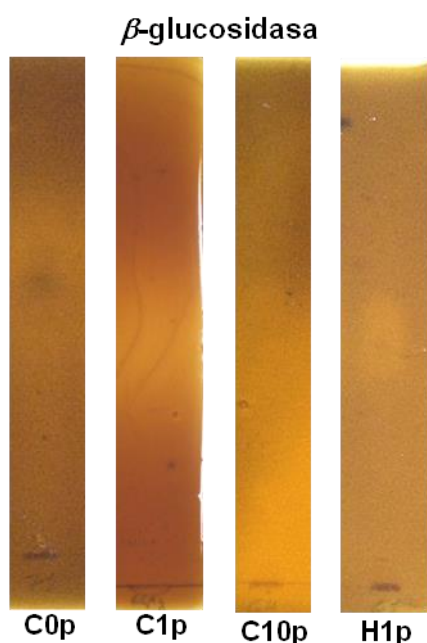


Figura 6.1

Se observa en la figura 6.1 que las muestras **C1p** y **H1p** generaron halos de inhibición con R_f similares.

Se escogió la muestra de cáscara **C1p** con el objetivo de detectar el compuesto activo. En primer lugar se realizó un ensayo autográfico sembrando distintas cantidades de bioaceite y se observó que la actividad es dependiente de la cantidad de muestra sembrada (Figura 6.2)

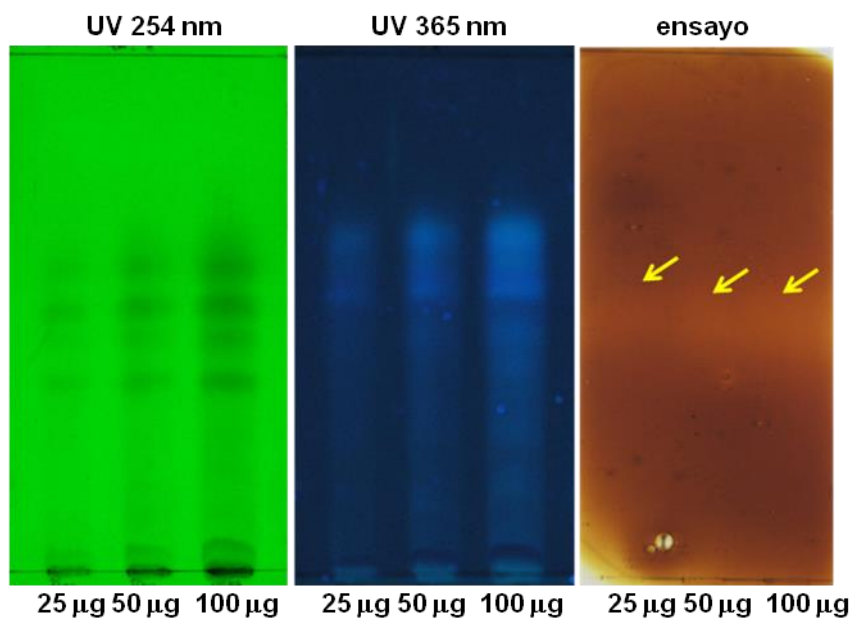


Figura 6.2

Luego se procedió a realizar el fraccionamiento bioguiado a fin de poder aislar el o los componentes activos de la mezcla.

Se hizo una primera separación empleando un gradiente de hexano:acetato de etilo obteniéndose 4 fracciones (Figura 6.3), de las cuales las fracciones A y B resultaron activas. Ambas presentaron el halo de inhibición al mismo valor de R_f .

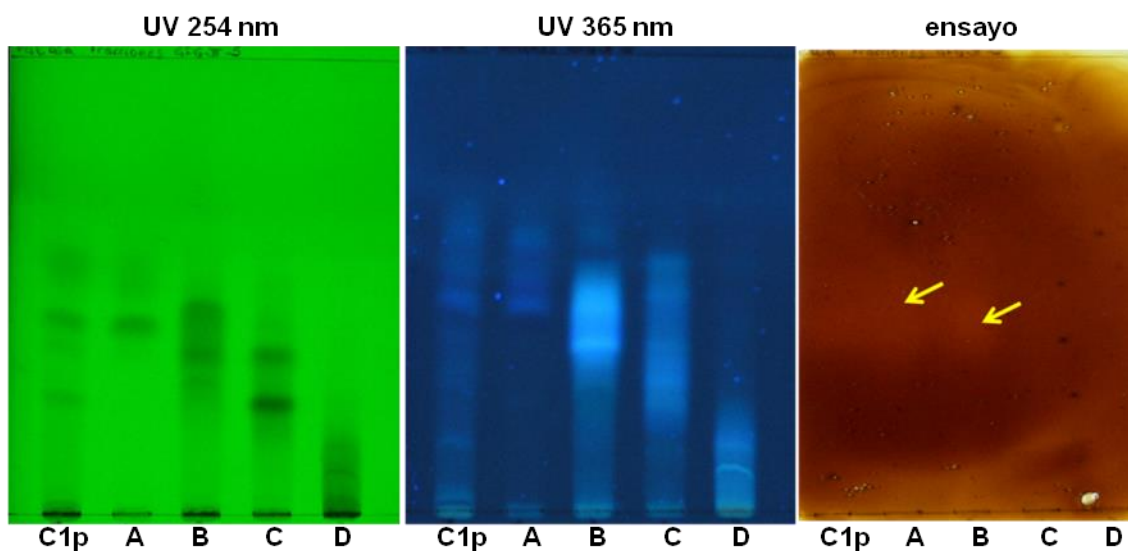


Figura 6.3

Posteriormente se escogió a la fracción A para continuar con la purificación. Se realizó nuevamente una cromatografía utilizando gradiente de hexano:acetato de etilo

como fase móvil. Se separaron 4 fracciones de las cuales sólo las fracciones G y H conservaron la actividad. Llamativamente, la actividad del testigo no es apreciable en esta autografía (Figura 6.4).

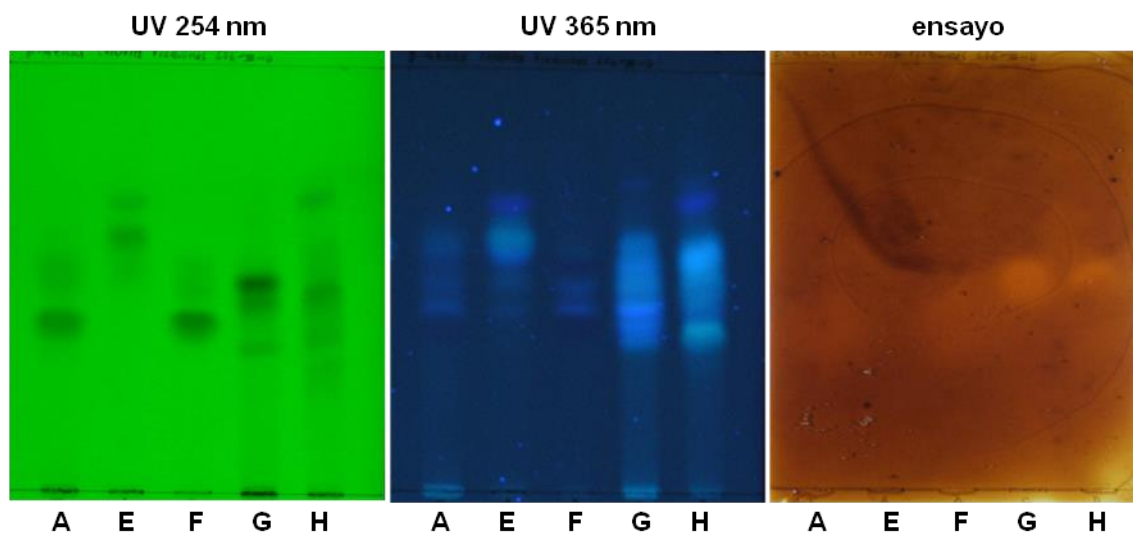


Figura 6.4

Con la fracción G se llevó a cabo una nueva cromatografía en capa delgada empleando hexano:acetato de etilo (6:4) como fase móvil y se raspó la sílica en donde aparecía el halo de inhibición para analizar los compuestos activos por espectrometría de masas.

El análisis por EM mediante ionización por electrospray (ESI) en modo negativo de la muestra arrojó la presencia de un ion de masa 279,2316 y fórmula $C_{18}H_{31}O_2$ (Figura 6.5). Esta masa es característica del ácido linoleico, un inhibidor ya conocido de esta enzima y que ha logrado soportar las condiciones de pirólisis.

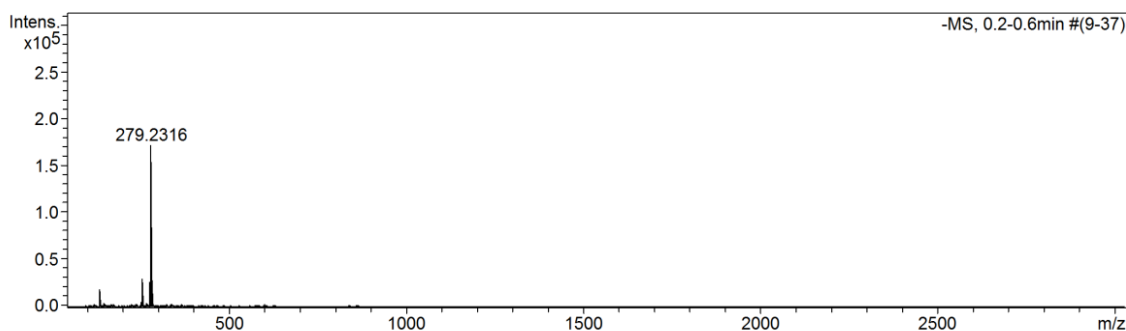


Figura 6.5

Estos resultados muestran que el único inhibidor de β -glucosidasa detectado en las muestras ensayadas resultó ser ácido linoleico, un inhibidor ya conocido de esta enzima y además no generado por la reacción de pirólisis.

6.2. Detección de inhibidores de acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE) es un blanco terapéutico para el tratamiento de la conocida enfermedad de Alzheimer. Una de las estrategias para el tratamiento de esta enfermedad es contrarrestar el deterioro de la actividad colinérgica en el cerebro usando inhibidores de AchE. Se procedió por lo tanto a ensayar las muestras elegidas para detectar inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa según los métodos descritos en el capítulo introductorio.

Se ensayaron en primer lugar los bioaceites en busca de inhibidores de acetilcolinesterasa empleando la variante de Li¹⁰⁴ del método de Hostettmann. Mediante esta variante los autores sostienen que se incrementa la sensibilidad del método al disminuirse la proporción del colorante Fast Blue B. Los resultados se muestran en la Figura 6.6.



Figura 6.6

Todas las muestras dieron positivo el ensayo mostrando una actividad muy fuerte. Esto hizo pensar si este resultado pudo ser debido a un falso positivo producto de la modificación introducida en el ensayo autográfico.

Se eligió la muestra de cáscara tratada con H₃PO₄ 1% **C1p** para testear esta hipótesis mediante el empleo del método de Hostettmann.⁸² Por medio de esta técnica por inmovilización de la enzima en gel de agar no se detectaron compuestos inhibidores presentes en la muestra (Figura 6.7).

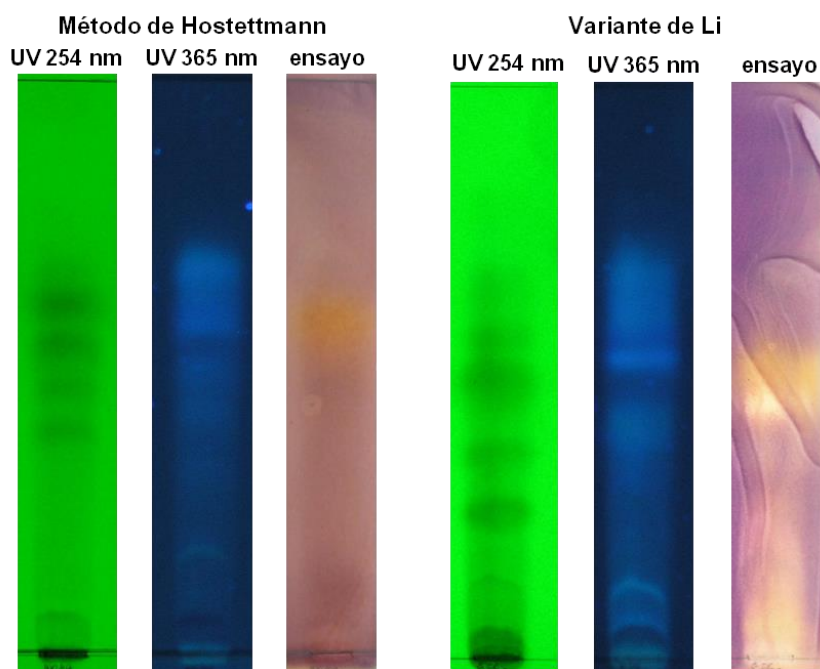


Figura 6.7

Para poder esclarecer de manera definitiva este resultado se decidió emplear el método de Verpoorte⁸⁰ para encontrar compuestos inhibidores. Este método permite además, de una manera fácil, detectar falsos positivos en el ensayo rociando la placa con yoduro de tiocolina (producto de la reacción enzimática).

Adicionalmente y en base a la experiencia con el ensayo de inhibición de β -glucosidasa, para el caso de las muestras de cáscara y harina tratadas con ácido fosfórico 1% y pirolizadas a 300 °C se realizaron extracciones previas a la pirólisis a fin de poder determinar la presencia de compuestos activos que puedan no estar siendo generados durante el proceso térmico. Las extracciones se llevaron a cabo con hexano, cloroformo y metanol a reflujo en ese orden y se recogieron cada una de las fracciones (llamadas **C1h**, **C1c** y **C1m** respectivamente para cáscara y **H1h**, **H1c** y **H1m** para harina respectivamente). Con el sólido remanente se llevó a cabo la reacción de pirólisis a 300 °C (muestra **C1p'** para cáscara y **H1p'** para harina). Los resultados de los ensayos autográficos para cáscara de soja se muestran en la Figura 6.8 y para el caso de harina en la Figura 6.9.

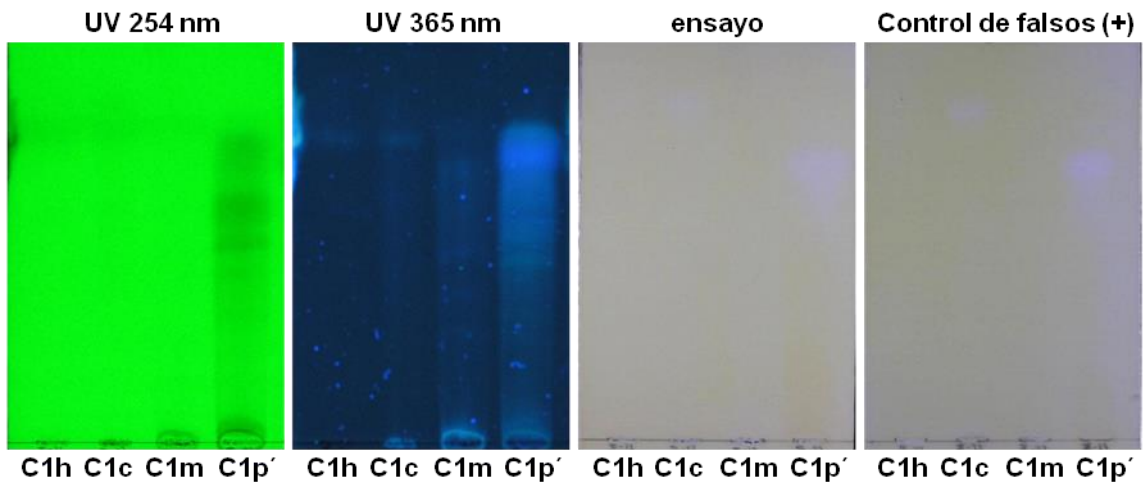


Figura 6.8

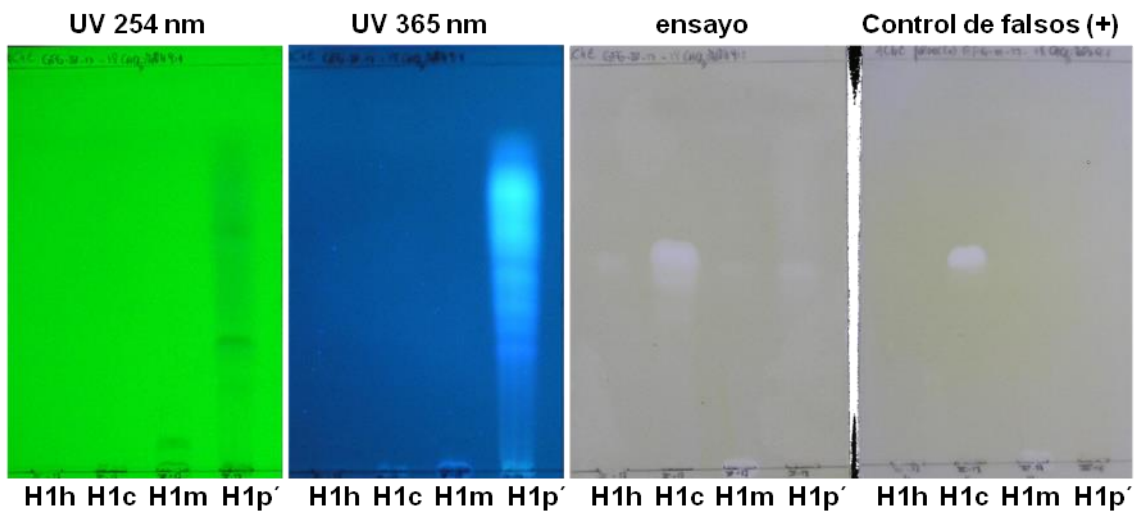


Figura 6.9

Tanto en la Figura 6.8 como en la Figura 6.9 se observan los mismos halos de inhibición en el ensayo y en el control de falsos positivos. En el caso de cáscara se observa actividad en la fracción clorofórmica y en el crudo de pirólisis mientras que en el caso de harina se observa sólo en la fracción clorofórmica. Esto estaría demostrando, por lo tanto, que los posibles compuestos activos serían en realidad falsos positivos.

Este último ensayo sumado a los anteriores descarta por completo la presencia de compuestos inhibidores de acetilcolinesterasa provenientes de la pirólisis tanto de cáscara como de harina de soja. Además, tampoco hay compuestos inhibidores de esta enzima en las fracciones provenientes de las extracciones con solvente.

6.3. Detección de inhibidores de xantina oxidasa

La xantina oxidasa (XO) cataliza la hidroxilación *in vivo* de hipoxantina a xantina y subsecuentemente, de xantina a ácido úrico. Durante la reacción de la XO, el oxígeno molecular actúa como aceptor de electrones. La reducción parcial del oxígeno genera simultáneamente los intermediarios radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2).⁸⁴ La sobreproducción de cualquiera de los productos de la reacción catalizada por la XO (ácido úrico, H_2O_2 , o $O_2^{\cdot-}$) ha sido relacionada con varias condiciones patológicas. En otros términos, la actividad incrementada de XO es considerada como una fuente principal de estrés oxidativo. Esto es, el desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y las defensas antioxidantes del organismo.

El ácido úrico a pH fisiológico se encuentra como urato, el cual tiene una solubilidad limitada en agua. Este hecho, sumado a una producción en exceso, lleva a la formación de depósitos de cristales en varios lugares, particularmente en las articulaciones y en los riñones, desencadenando diferentes procesos patológicos.⁸⁵

Una de las formas de realizar el seguimiento de la actividad de la XO es a través de la determinación de los productos de la oxidación de la xantina: ácido úrico, H_2O_2 o $O_2^{\cdot-}$. La bioautografía desarrollada para la búsqueda de inhibidores de XO se basa en la detección del $O_2^{\cdot-}$ generado empleando como revelador azul de tetrazolio (NBT) como se detalló en el capítulo introductorio.

Las muestras de cáscara y de harina tratadas con H_3PO_4 1% y pirolizadas a 300 °C se ensayaron para buscar inhibidores de xantina oxidasa mediante ese método autográfico. Ninguna de las muestras evidenció actividad apreciable mediante el método autográfico empleado.

6.4. Detección de antioxidantes captadores de superóxido

La riboflavina (RF) es un conocido fotosensibilizador que puede ser excitado con luz hacia su estado triplete $^3RF^*$. Esta última especie reacciona con oxígeno triplete (3O_2) generando superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y 1RF como productos (Figura 1.17).⁹⁰

La bioautografía basada en el sistema riboflavina/luz consiste en el depósito sobre la placa cromatográfica de un gel conteniendo una mezcla de riboflavina, colorante NBT y el catalizador N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED). Posteriormente la placa con el gel es expuesta a la luz durante unos minutos. De esta forma la luz inicia el proceso de generación de $O_2^{\cdot-}$, cuya presencia es detectada por reacción con NBT al igual que sucedía en el ensayo de XO. Aquellos compuestos que secuestran el $O_2^{\cdot-}$ del medio se observarán en la bioautografía como puntos claros en una matriz violeta. Esta autografía además de detectar compuestos que reaccionan con el anión

superóxido sirve como ensayo control de la inhibición de XO como se mencionó en la introducción.

Las muestras de cáscara y de harina tratadas con H₃PO₄ 1% y pirolizadas a 300 °C se ensayaron para buscar compuestos captadores de superóxido. Ninguna de las muestras evidenció actividad apreciable mediante el método autográfico empleado.

6.5. Detección de compuestos antioxidantes captadores de DPPH

El método autográfico para detectar compuestos antioxidantes que reaccionen con el radical DPPH consiste en aplicar sobre el cromatograma en forma de aspersion una solución etanólica del radical. Luego de un determinado tiempo los compuestos antioxidantes se observarán como puntos amarillos en una matriz violeta⁹¹ (Figura 1.18).

Las 3 muestras de cáscara y la correspondiente a la de harina se ensayaron a fin de detectar compuestos antioxidantes por reacción con DPPH. Se puede ver en el caso de cáscara de soja que hay variaciones en el perfil de compuestos activos al variar el pre-tratamiento ácido. Esto implicaría que probablemente el ácido fosfórico tendría una participación catalizando distintos tipos de reacciones que conducen a compuestos diferentes responsables de la actividad (Figura 6.10).

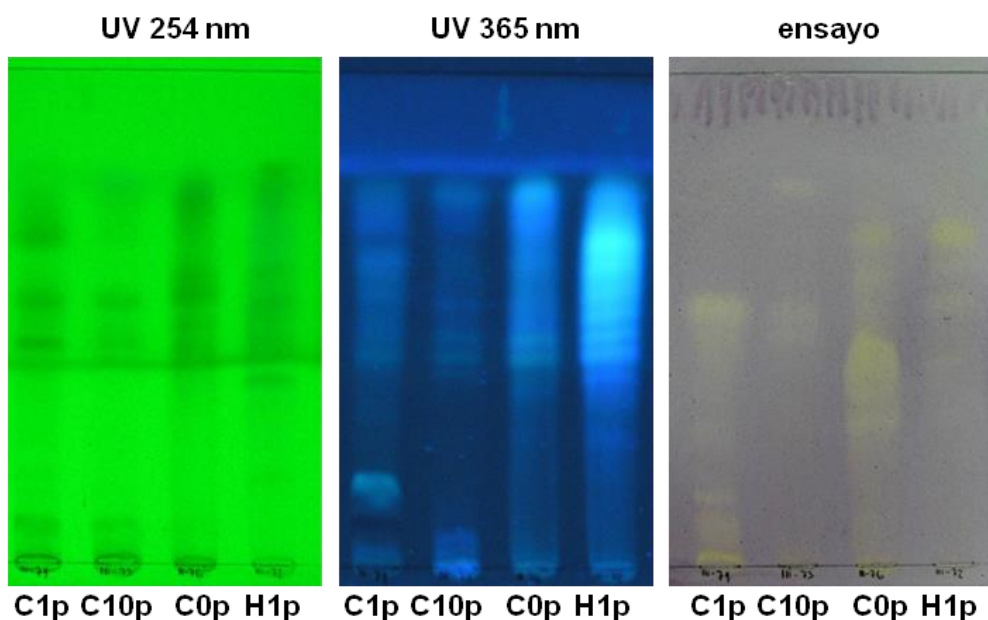


Figura 6.10

De la misma manera que en el caso del ensayo para detectar inhibidores de acetilcolinestera, para el caso de las muestras de cáscara y harina tratadas con ácido

fosfórico 1% y pirolizadas a 300 °C se realizaron extracciones previas a la pirólisis a fin de poder determinar la presencia de compuestos activos que puedan no estar siendo generados durante el proceso térmico. Las extracciones se llevaron a cabo con hexano, cloroformo y metanol a reflujo en ese orden y se recogieron cada una de las fracciones (llamadas **C1h**, **C1c** y **C1m** respectivamente para cáscara y **H1h**, **H1c** y **H1m** para harina respectivamente). Con el sólido remanente se llevó a cabo la reacción de pirólisis a 300 °C (muestra **C1p'** para cáscara y **H1p'** para harina). Los resultados de los ensayos autográficos para cáscara de soja se muestran en la Figura 6.11 y para el caso de harina en la Figura 6.12.

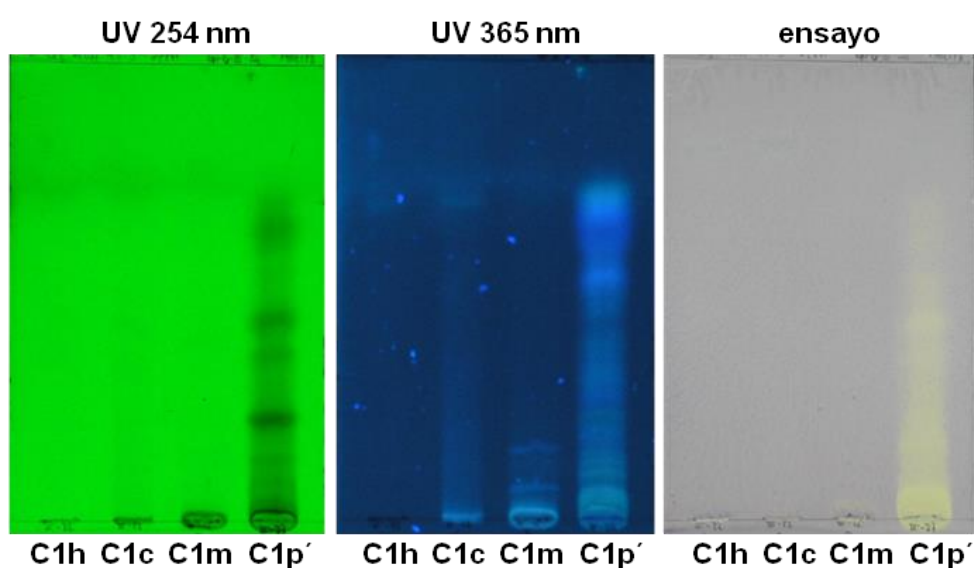


Figura 6.11

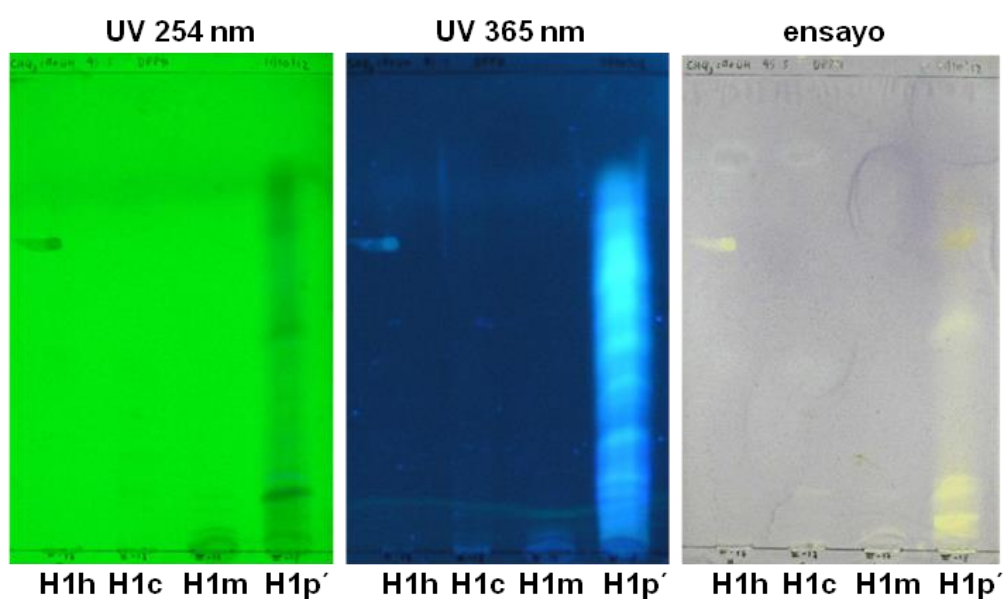


Figura 6.12

En ambas figuras se observa que las fracciones obtenidas de la extracción con solventes no muestran compuestos activos mientras que el crudo de pirólisis sí lo hace. Esto demuestra que al contrario de lo que sucedía en el ensayo de β -glucosidasa la pirólisis es la generadora de los compuestos con actividad antioxidante.

6.5.1. Cuantificación de la actividad antioxidante

En base a este alentador resultado se decidió emplear un método para cuantificar la actividad observada en el ensayo autográfico.

Uno de los ensayos utilizados de manera habitual implica medir la disminución en absorbancia del radical DPPH luego de reaccionar con un antioxidante o mezcla de ellos (Figura 1.18).⁹¹

En nuestro caso se empleó una microplaca de 96 pocillos para hacer las mediciones. En primer lugar se hizo el experimento empleando la muestra C1p' y el estándar ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico.

Al hacer los experimentos se encontró una inusual variación en la absorbancia del radical DPPH al incrementarse la concentración de muestra ensayada. En el caso del estándar, este comportamiento se manifiesta con las concentraciones más bajas. Esta tendencia se mantuvo cuando se cambió el solvente del experimento de metanol a etanol por lo cual esta variable no era la responsable de la variabilidad en los datos. Es lógico pensar, por tanto, que una pequeña absorción de la muestra sería la responsable de este fenómeno. (Figura 6.13)

Para intentar superar este inconveniente se incrementó la concentración del reactivo del ensayo (DPPH) esperando ahora que la pequeña variación en absorbancia generada por la muestra no tenga influencias en la interpretación de los resultados.

De manera satisfactoria se encontró una buena correlación entre la disminución de absorbancia del radical DPPH y la concentración de la muestra (Figura 6.14).

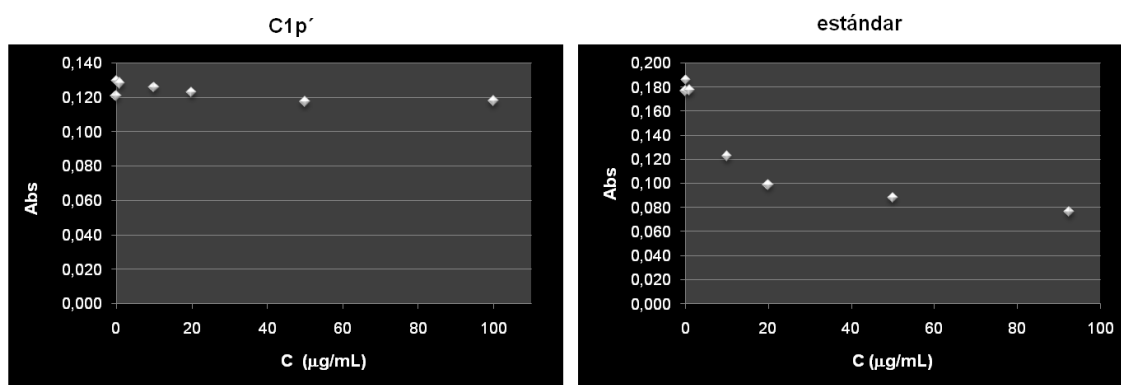


Figura 6.13

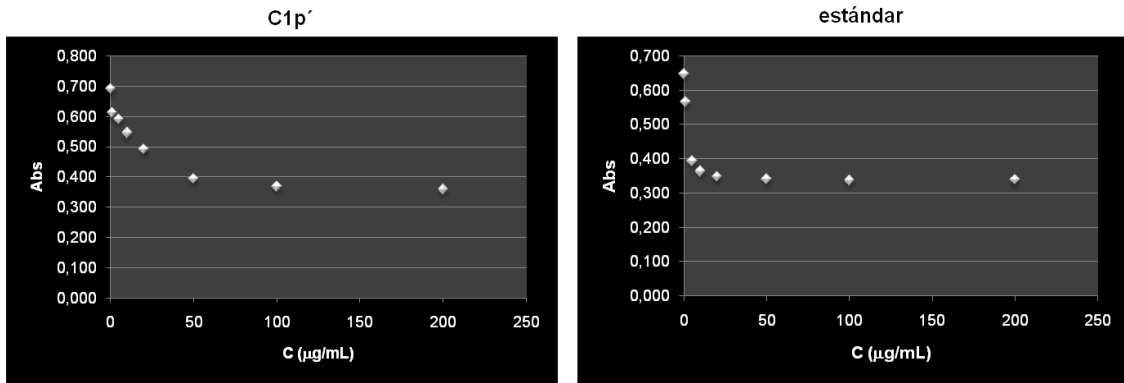


Figura 6.14

Una de las formas de expresar el resultado de este tipo de experimentos consiste en calcular el valor EC_{50} (de “*effective concentration*”), es decir, la concentración de compuesto o mezcla que disminuye la absorbancia del radical DPPH a un 50% del valor inicial. Para este fin se procedió a realizar un ajuste no lineal de los datos previa normalización de los mismos utilizando el software GraphPad Prism 5. En los gráficos de la Figura 6.15 se expresa este resultado como porcentaje de disminución del poder oxidante del radical (% inhibición). A partir de ellos el valor de EC_{50} calculado para el estándar fue de 0,97 µg/mL mientras que para la muestra C1p' fue de 20,45 µg/mL. El estudio precedente destaca la aplicabilidad de este método en la determinación del valor de EC_{50} de las muestras de cáscara y harina de soja.

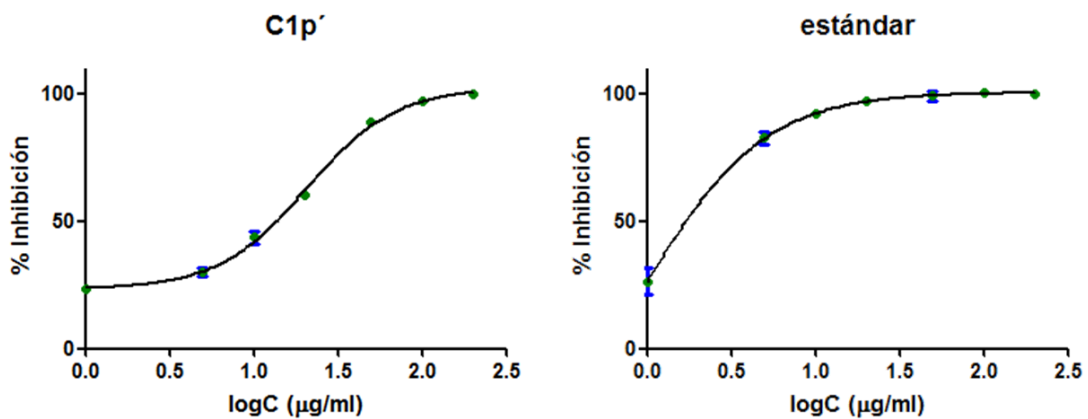


Figura 6.15

Muestra	Tratamiento previo	T pirolisis (°C)	EC ₅₀
Ascórbico			9.29
BHT			14.47
Cáscara	H ₃ PO ₄ 1%	300	46.36
Cáscara	H ₃ PO ₄ 1%, extracción SV	300	20.45
Cáscara	H ₃ PO ₄ 10%	300	34.48
Cáscara	H ₃ PO ₄ 10%, extracción SV	300	30.92
Cáscara	sin tratamiento ácido	300	13.13
Cáscara	sin tratamiento ácido, extracción SV	300	13.02
Harina	H ₃ PO ₄ 1%	300	82.42
Harina	H ₃ P _O ₄ 1%, extracción SV	300	38.61

Tabla 6.1

Posteriormente se determinó la actividad de las demás muestras y de antioxidantes comerciales como BHT y ácido ascórbico. De la Tabla 6.1 se observa que las muestras de cáscara de soja sin tratamiento ácido previo a la pirólisis presentaron una actividad antioxidante mejor que BHT, un antioxidante comercial usado como aditivo alimentario entre otras aplicaciones, y algo cercana a la de ácido ascórbico. Se observó además que en el caso de la muestra de cáscara pretratada con ácido al 1%, luego de las extracciones con solvente se logra un notorio incremento en la potencia antioxidante.

Estos resultados muestran que el tratamiento pirolítico de cáscara de soja es capaz de generar mezclas con una más que interesante actividad antioxidante, abriendo la posibilidad de aplicar estas mezclas como aditivos a diversos materiales de uso industrial.

6.6. Detección de inhibidores del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ de *Salmonella Typhimurium*

Salmonella es un patógeno gastrointestinal y el agente etiológico de la enfermedad llamada salmonelosis. El estilo de vida de los patógenos bacterianos requiere que ellos establezcan la infección en la cara del sistema inmunitario del hospedador. Para hacer esto, *Salmonella* pone en juego una batería de mecanismos que están bajo el control del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ. Entre los genes activados por PhoP se cuentan aquellos implicados en la invasión celular y en la resistencia a péptidos microbicidas. Estos sistemas están muy extendidos entre las bacterias y en eucariotas inferiores pero no están presentes en seres humanos. Esto los convierte en blancos terapéuticos atractivos para la búsqueda de nuevos antibióticos. Con respecto

a esto último, la inhibición de la virulencia de un patógeno representa una nueva estrategia en el diseño de fármacos antibacterianos en el sentido de que estos compuestos no afectan el crecimiento bacteriano en cultivo sino que su actividad será evidente en presencia de efectores del sistema inmunitario.

Para poder evidenciar la presencia de compuesto inhibidores de PhoP/PhoQ en las muestras escogidas se empleó el ensayo autográfico descrito en la introducción. En el mismo se utiliza una cepa de *Salmonella* que posee una fusión transcripcional del gen *virK*, representativo de los genes activados por el sistema de dos componentes, al gen *lacZ* empleado como gen reportero de la función de PhoP/PhoQ.⁹⁵ *LacZ* codifica una enzima β -galactosidasa que hidroliza el compuesto X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) en galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol. Este último se oxida espontáneamente para formar 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo insoluble, el cual presenta una coloración azul característica. La intensidad del color será mayor o menor dependiendo de la cantidad de enzima que se esté expresando. Si un compuesto de los adsorbidos en la placa cromatográfica es un inhibidor de alguno de los pasos en la ruta de señalización mediada por PhoP/PhoQ la expresión del gen reportero *lacZ* se verá afectada, observándose en el R_f del compuesto un halo de inhibición incoloro en un fondo azul (Figura 1.20).

6.6.1. Ensayo autográfico para detectar compuestos inhibidores de PhoP/PhoQ en bioaceites de cáscara y harina de soja

Los crudos de pirólisis de cáscara y harina de soja se ensayaron para esta actividad biológica, sembrándose 100 μ g de cada una de las muestras (Figura 6.16).

Se observaron halos de inhibición en dos de las muestras con R_f idénticos, aquellas provenientes del tratamiento con H_3PO_4 1% y H_3PO_4 10% antes de la pirólisis; siendo el halo más grande en la primera que en la segunda.



Figura 6.16

6.6.2. Aislamiento e identificación del compuesto activo

La muestra **C1p** se fraccionó por cromatografía en columna con gradiente de hexano:acetato de etilo para poder identificar al compuesto activo.



Figura 6.17

Del fraccionamiento efectuado, sólo la fracción A conserva la actividad (Figura 6.17). Una posterior purificación cromatográfica de la fracción **C1pA** permitió revelar la

identidad del compuesto responsable del efecto inhibitorio sobre PhoP/PhoQ (Figura 6.18).

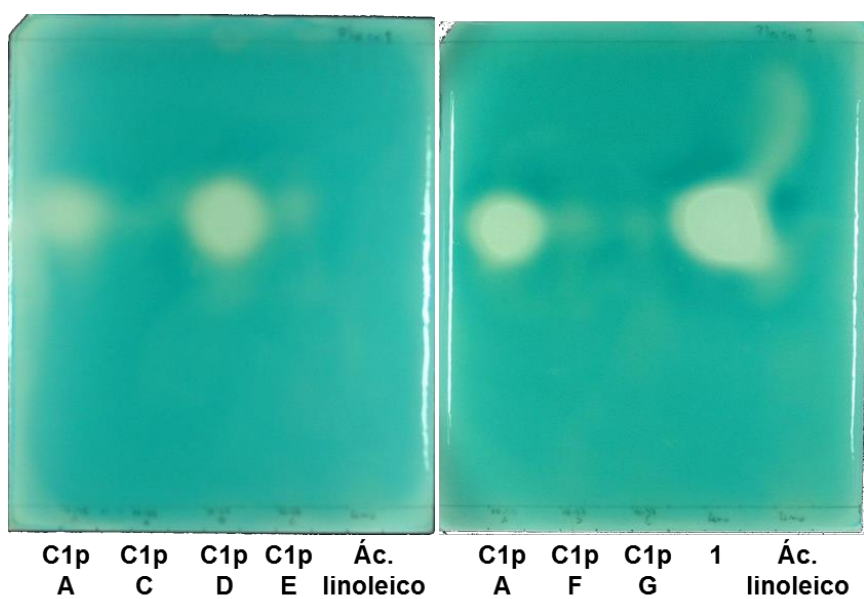


Figura 6.18

Para nuestra sorpresa, en la autografía se observa que el halo de inhibición de la fracción **C1pD** tiene un R_f idéntico al de levoglucosenona. Esto está de acuerdo con el halo de inhibición más grande de esta muestra comparado al de la muestra **C10p**, ya que la primera presenta un mayor contenido de levoglucosenona que la segunda como se demostró en el capítulo V. El análisis por espectroscopía de RMN ^1H terminó de corroborar la presencia mayoritaria de **1** en la fracción **C1pD** (Figura 6.19).

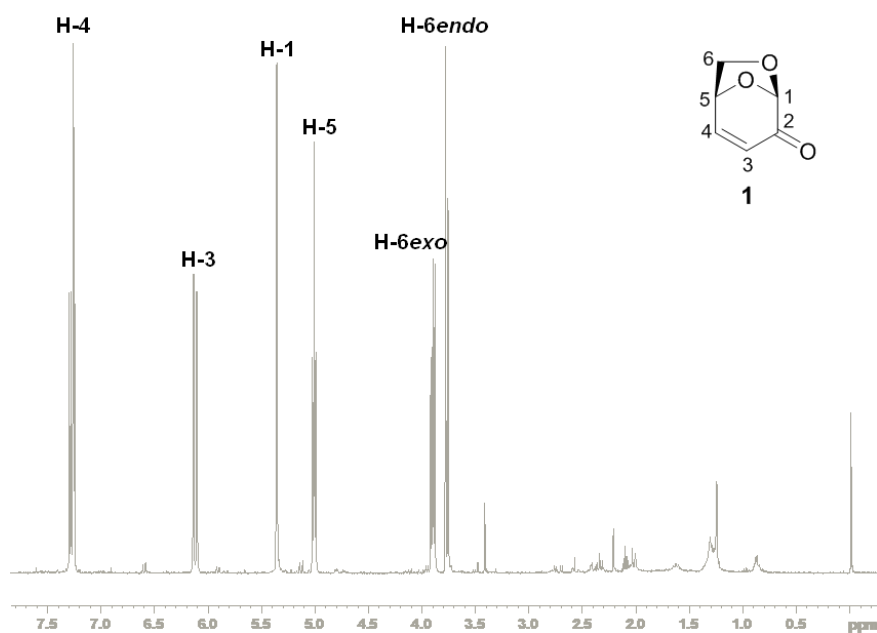


Figura 6.19

El hecho de que **1** sea el compuesto responsable de la actividad detectada significa que sólo la pirólisis fue la responsable de generar el compuesto bioactivo dado que las cáscaras de soja no contienen levoglucosenona naturalmente. Del mismo modo, la harina de soja no posee levoglucosenona y a juzgar por los espectros de RMN ¹H se detecta principalmente ácidos grasos. Por otro lado, el tratamiento ácido jugó un papel importante en la aparición de la actividad dado que **1** se obtiene por pirólisis de celulosa en condiciones ácidas (Figura 6.20); esto resalta el hecho de que este tratamiento no sólo es capaz de provocar una modificación en la composición de los bioaceites como ya se comentó en el capítulo V sino también de modificar la actividad como también se observó en el caso de la actividad antioxidante de los bioaceites ensayados.

Un comentario aparte merece el ensayo autográfico empleado dado que resultó ser una herramienta clave en la identificación de levoglucosenona como el compuesto bioactivo, mostrando su poder como herramienta bioanalítica y demostrando además por primera vez su uso en el análisis de bioaceites provenientes de la pirólisis de componentes de la biomasa.

Por último, este resultado representa el primer reporte de una actividad antibacteriana para levoglucosenona; un compuesto originalmente reportado hace más de 40 años y ampliamente empleado entre los químicos orgánicos pero cuya bioactividad había pasado desapercibida.

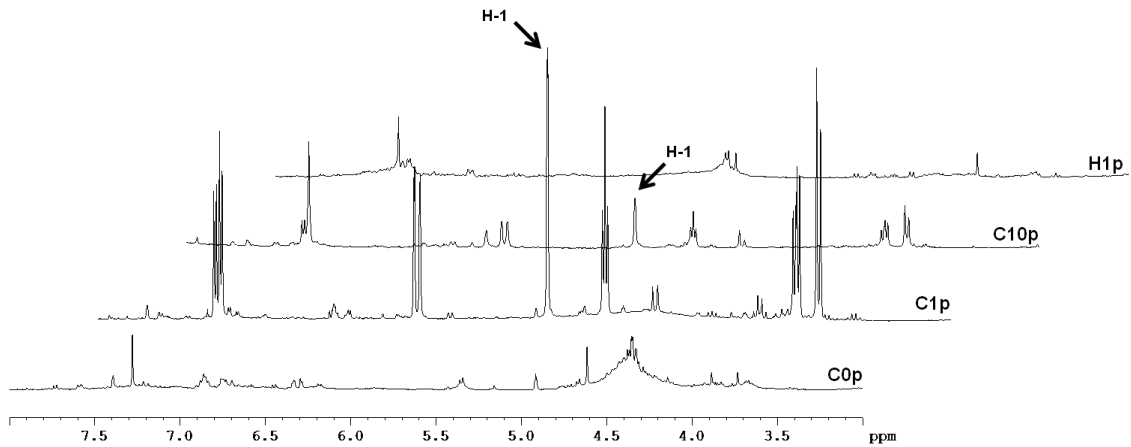


Figura 6.20

6.6.3. Caracterización del efecto de 1

6.6.3.1. Efecto de 1 sobre el crecimiento bacteriano

Los resultados precedentes fueron muy útiles para hallar un compuesto bioactivo pero representan solamente un análisis cualitativo de la actividad observada. Por ello se procedió posteriormente a estudiar con más detalle la actividad de 1. Concretamente, se intentó determinar si hay un efecto específico sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ o simplemente hay un efecto bactericida sobre *Salmonella*. Para comenzar a responder estas preguntas en primer lugar se midió como el compuesto afectaba el crecimiento de una cepa salvaje de *Salmonella* Typhimurium y de una cepa mutante en el sistema de dos componentes (*Salmonella* Typhimurium Δ PhoPQ) tal como se muestra en la Figura 6.21. Las curvas representan la densidad óptica del cultivo bacteriano en función del tiempo luego del tratamiento con distintas concentraciones del compuesto (en $\mu\text{g/mL}$) indicadas en la parte inferior de cada gráfica.

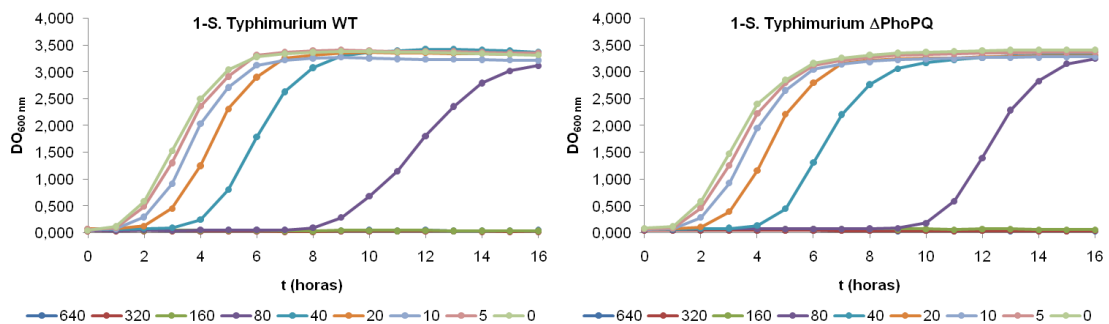


Figura 6.21

Se observa a partir de la Figura 6.21 que **1** afecta por igual a la cepa salvaje de *S. Typhimurium* y a la mutante en el sistema de dos componentes. Se evidencia un efecto de retraso en la fase lag de crecimiento; siendo más notorio a 80 $\mu\text{g/mL}$. Esto equivale a 634 μM . La CIM estimada a partir de las curvas es de 160 $\mu\text{g/mL}$ o 1,3 mM. Se puede decir según este estudio que la actividad bactericida es baja o moderada.

Dado que la integridad del sistema no afecta la viabilidad bacteriana, es razonable que la cepa mutante responda de igual manera que la salvaje. Es decir, la ausencia del sistema de dos componentes no genera un cambio en la sensibilidad de la bacteria al tratamiento con el compuesto.

Luego de este primer estudio se procedió a evaluar el efecto que **1** tiene sobre el crecimiento de otras especies bacterianas para determinar si el retraso en la fase lag de crecimiento ocurre específicamente con *Salmonella* o es extendible a otras bacterias. La Figura 6.22 muestra el mismo ensayo de crecimiento efectuado con *Salmonella* pero en este caso llevado a cabo con *S. marscecens*, *E. coli* y *B. subtilis*.

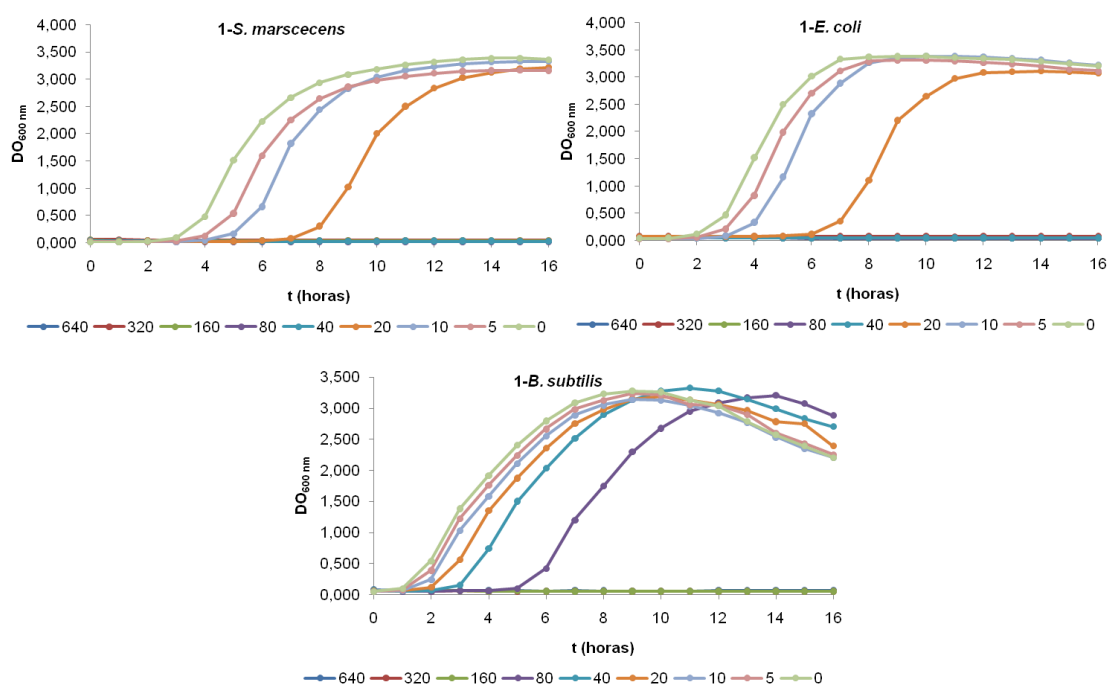


Figura 6.22

Las curvas permiten deducir que el compuesto afecta de manera similar a otras enterobacterias Gram (-) como *S. marscecens* y *E. coli*. Ambas especies bacterianas son más sensibles al compuesto que *S. Typhimurium* a juzgar por el valor de CIM estimado a partir de las gráficas (40 $\mu\text{g/mL}$ en ambos casos). Además *B. subtilis*, una bacteria Gram (+), también exhibe el mismo comportamiento. Por lo tanto, con

respecto al efecto sobre el crecimiento bacteriano el compuesto parece no discriminar entre organismos Gram (-) y Gram (+). Esto puede ser indicativo de un efecto inhibitorio de levoglucosenona sobre un proceso conservado en estos dos grupos bacterianos separados filogenéticamente.

6.6.3.2. Efecto de 1 sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ de *Salmonella Typhimurium*

Una vez estudiado como 1 afecta el crecimiento bacteriano se evaluó si este compuesto puede ejercer una inhibición del sistema de dos componentes regulador de la virulencia de *Salmonella*, objeto de interés de esta parte del trabajo. Para ello se trabajó en un rango de concentraciones donde no se ve afectado en gran medida el crecimiento, en concordancia con lo mencionado acerca de que un compuesto inhibidor de estos sistemas no debe afectar la viabilidad bacteriana en cultivo. Las concentraciones elegidas estuvieron por debajo de 40 µg/mL.

Para llevar a cabo este experimento se empleó la misma cepa de *Salmonella Typhimurium* empleada en el ensayo autográfico que posee el gen lacZ fusionado al gen virK regulado por el sistema PhoP/PhoQ. Se crecieron ON cultivos de esta cepa en presencia de distintas concentraciones de los compuestos y luego se determinó la actividad β-galactosidasa medida en este caso por la capacidad de esta enzima de hidrolizar el compuesto ONPG. Una disminución de la actividad enzimática indica una baja en la expresión del gen virK y por lo tanto es un indicio de inhibición del sistema de dos componentes. Los resultados se muestran en la Figura 6.23.

Se sabe por estudios de represión de este sistema de dos componentes con ácido linoleico que una disminución de aproximadamente el 50% de la actividad β-galactosidasa es suficiente para inhibir por completo a PhoP/PhoQ. Esto se determinó mediante la observación de la disminución de los niveles de mRNA de PhoP cuando las bacterias fueron crecidas en presencia de ácido linoleico. Esto ocurrió dado que el sistema de dos componentes también controla la expresión de sus propios genes. La expresión del gen de PhoP fue prácticamente nula con una concentración de ácido linoleico que disminuyó al 50% la actividad β-galactosidasa.⁹³ En nuestro caso se alcanzó una inhibición de la actividad enzimática del 43% a 25 µg/mL o 198 µM. Además se llevó a cabo un ensayo control midiendo la expresión del gen tppB como fusión a lacZ como gen reportero. El gen tppB no está bajo el control regulatorio de PhoP/PhoQ por lo que la evaluación de la expresión del mismo constituye un control de falsos positivos. Como la actividad enzimática no se ve afectada en este segundo caso se puede decir que el efecto observado proviene de una inhibición del sistema de

dos componentes y no de la β -galactosidasa empleada en el ensayo por lo que se descarta que el compuesto constituya un falso positivo. Por último, en el gráfico superior de la Figura 6.23 se observa que la densidad óptica al final del experimento permaneció prácticamente constante indicando que el crecimiento no se vio alterado durante el ensayo tal como se espera para compuestos que puedan actuar sobre este tipo de sistemas reguladores de la virulencia de patógenos bacterianos.

El resultado mostrado es por demás de interesante dado que permite decir que a bajas concentraciones levoglucosenona es capaz de lograr la represión de la expresión del gen *virK*.

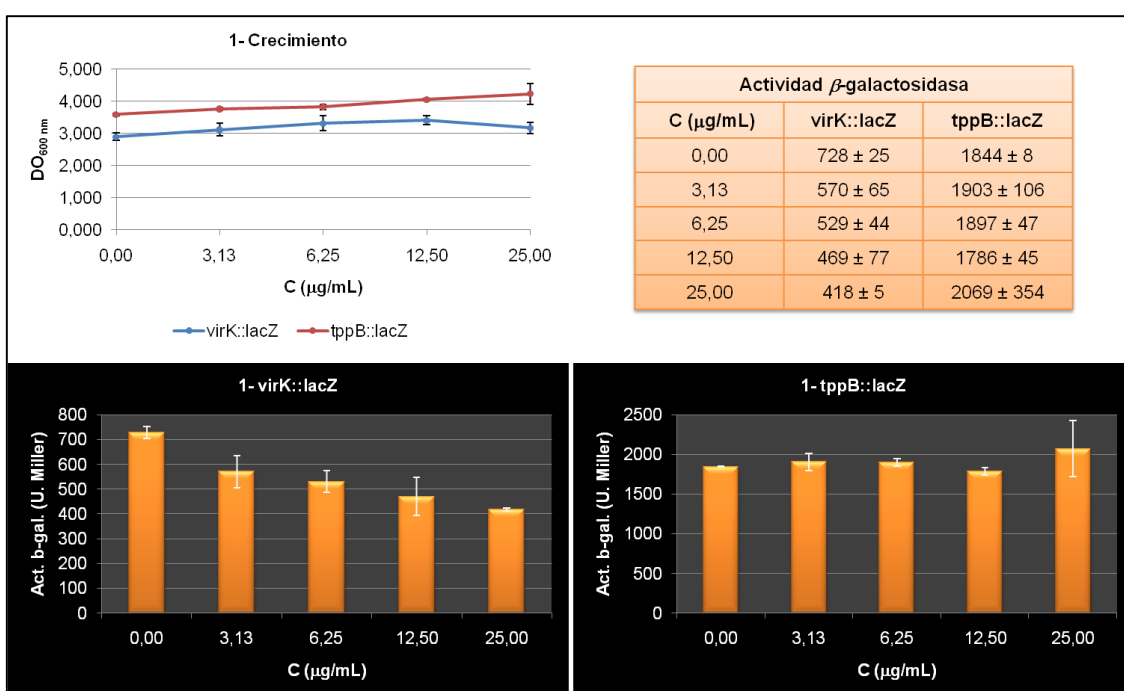


Figura 6.23

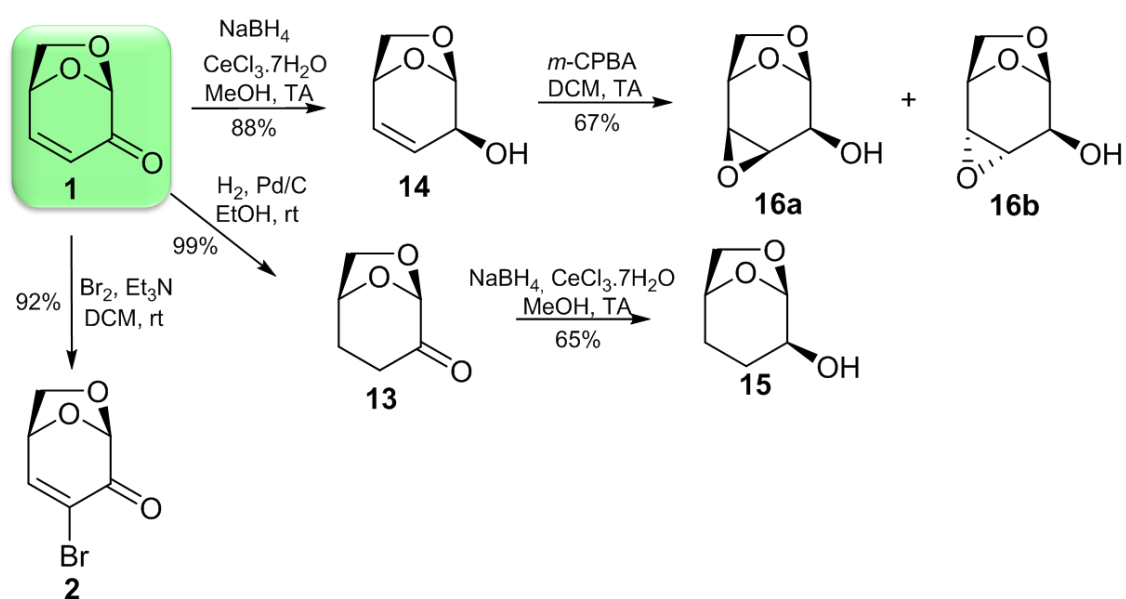
6.6.4. Síntesis de derivados de 1 y evaluación de su actividad

El hecho de detectar una actividad biológica específica en crudos de pirólisis de cáscara de soja previamente tratada con ácido fue una virtud de la estrategia empleada. Además, el fraccionamiento bioguiado cumplió con su función y nos permitió alcanzar el objetivo planteado dado que se pudo aislar el compuesto bioactivo. De hecho hay que resaltar que es la primera vez que se aplica esta herramienta analítica para el caso de bioaceites provenientes de la pirólisis de componentes de la biomasa.

Ahora bien, dado que se cumplió el objetivo hacia el cual fue dirigida la estrategia y teniendo en cuenta que el compuesto responsable de la actividad resultó ser

levoglucosenona, esto nos hizo desviar un poco del camino que veníamos transitando y se decidió volver a la síntesis. Dada la versatilidad de **1** como sintónquiral y el hecho de que constituye el material de partida de toda la química que se desarrolla en nuestro grupo de investigación, resultó muy tentador obtener derivados de este compuesto y evaluar sus actividades. Concretamente, en primer lugar se buscaron compuestos que no sólo pudieran mejorar la actividad hasta aquí observada sino también que permitan evaluar la presencia de características en la molécula que resulten importantes para causar los efectos evidenciados.

Tomando esto en consideración diseñamos el set conciso de derivados de **1** mostrado en el esquema 6.1. Ha sido demostrado que la bromación de dobles enlaces puede mejorar ciertas actividades biológicas de productos naturales.¹³³ Por esta razón se eligió el compuesto **2** sintetizado en el capítulo IV. La reducción del grupo carbonilo o del doble enlace en **1** podría darnos una idea de la participación de estos grupos funcionales en la bioactividad observada (compuestos **13** a **15**). Para generar la cetona saturada **13** se llevó a cabo una reacción de hidrogenación del doble enlace de **1** empleando cantidades catalíticas de Pd/C. El alcohol alílico **14** fue sintetizado reduciendo **1** con NaBH₄ en presencia de CeCl₃·7H₂O. El compuesto **15** se obtuvo por reducción de **13**. Finalmente, los epóxidos son conocidos por interactuar con biomoléculas como proteínas y DNA.¹³⁴ La epoxidación de **14** con *m*-CPBA dio los epóxidos isoméricos **16a** y **16b**. Todos los derivados sintetizados se obtuvieron con buenos a excelentes rendimientos.



Esquema 6.1

Una vez obtenidos los compuestos se ensayaron empleando el método autográfico utilizado en el análisis de los bioaceites pero en este caso se llevó a cabo un ensayo en puntosembrando distintas cantidades de cada derivado (Figura 6.24).

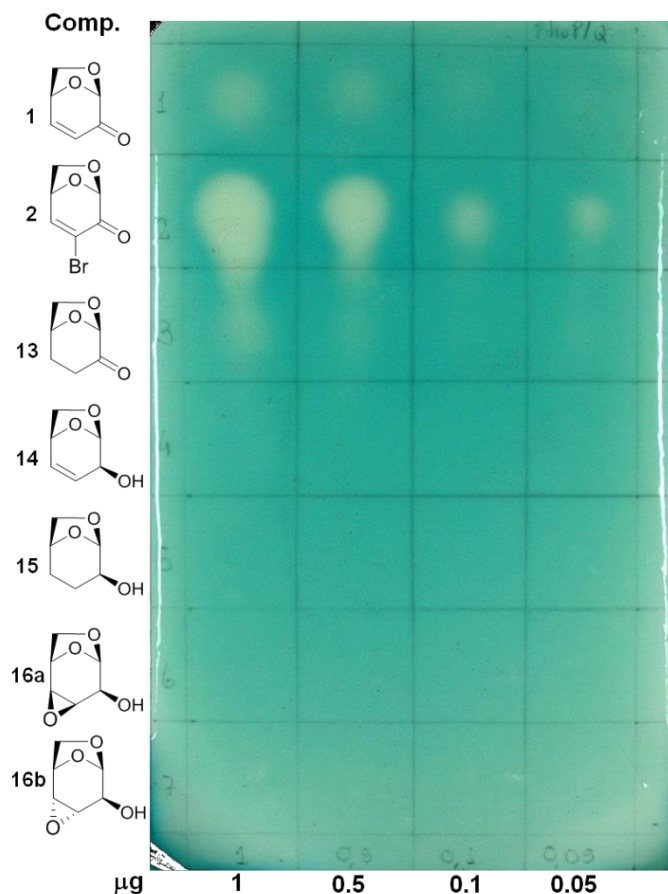


Figura 6.24

Se puede observar que según este ensayo **2** presenta una mayor actividad que **1**, detectándose el efecto incluso con 50 ng de compuesto. Una característica interesante revelada por este experimento es que los dos compuestos activos conservan la funcionalidad enona en su estructura. Tanto la pérdida del doble enlace como la reducción del grupo carbonilo conducen a una disminución de la actividad. Esto es más notorio con la pérdida del grupo carbonilo. Mientras que la reducción del doble enlace deja una actividad remanente (aunque débil) como se observa por el halo tenue a 1 μg , la reducción del grupo carbonilo elimina por completo la actividad (ausencia del halo de inhibición con **14**). Por último, la introducción de la funcionalidad epóxido no tiene efecto alguno sobre la actividad biológica.

6.6.4.1. Efecto de los derivados sobre el crecimiento bacteriano

Como se hizo en el caso de **1**, en primer lugar se procedió a cuantificar el efecto sobre el crecimiento de la bacteria (Figura 6.25).

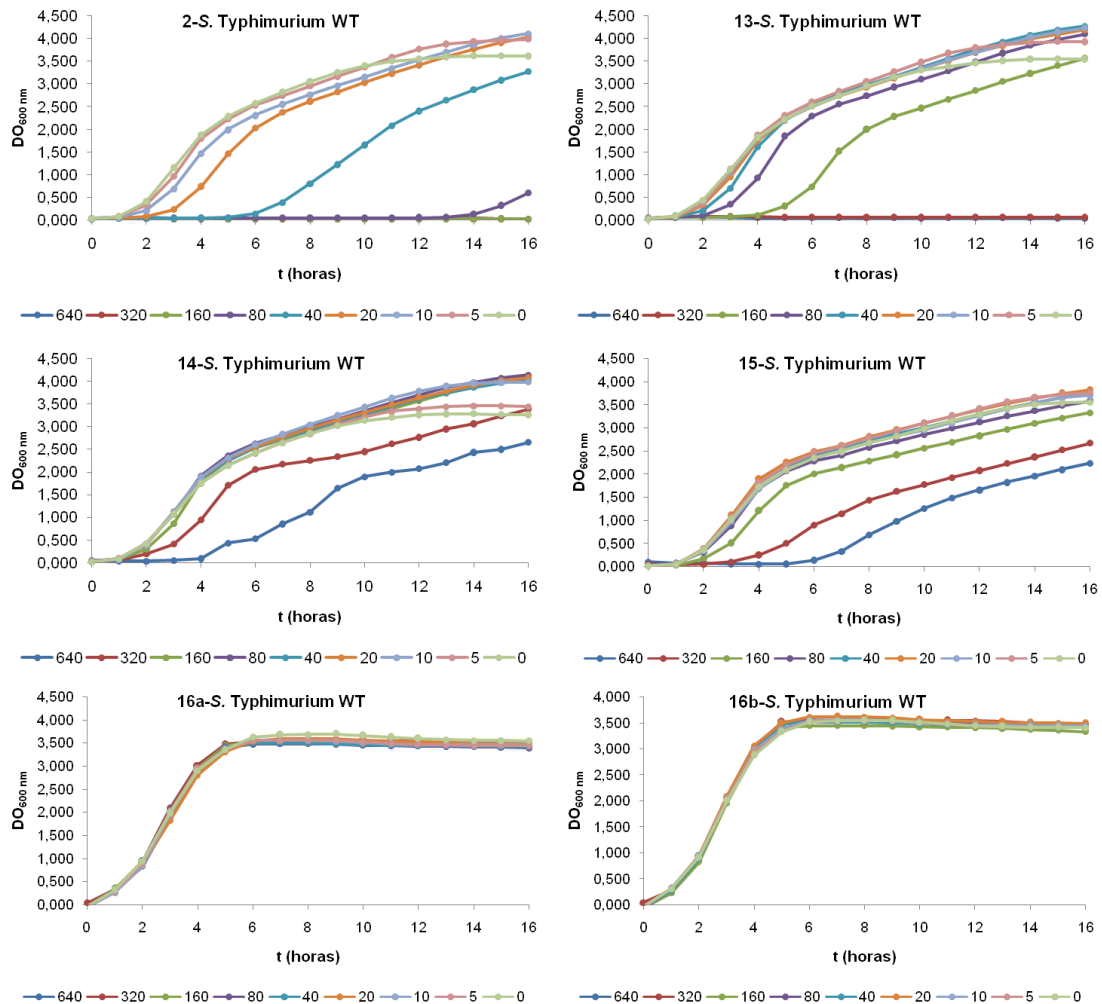
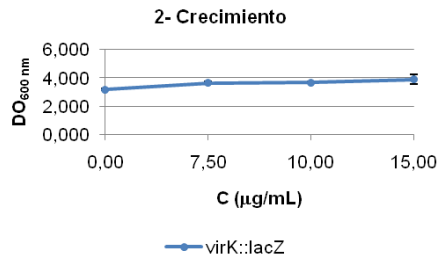


Figura 6.25

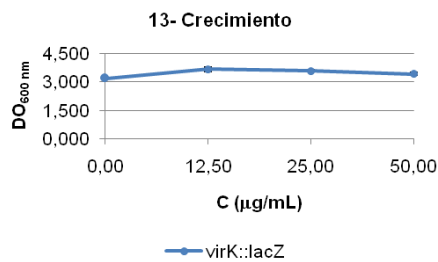
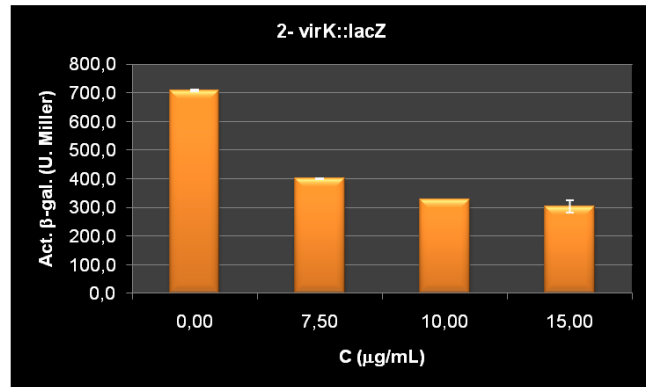
Se puede inferir de la figura que el retraso en la fase lag de crecimiento y el efecto bactericida para el caso de **2** se da a una concentración más baja que para **1**. El compuesto **13** parece presentar una actividad bactericida más baja incluso que **1**. De los restantes compuestos se puede decir que no afectan la viabilidad de *Salmonella* de manera significativa.

6.6.4.2. Efecto de los derivados sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ de *Salmonella Typhimurium*

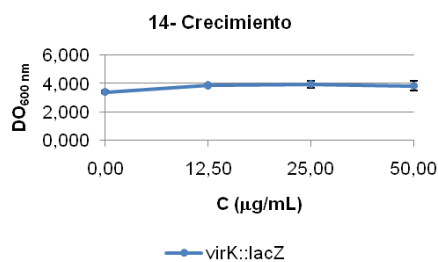
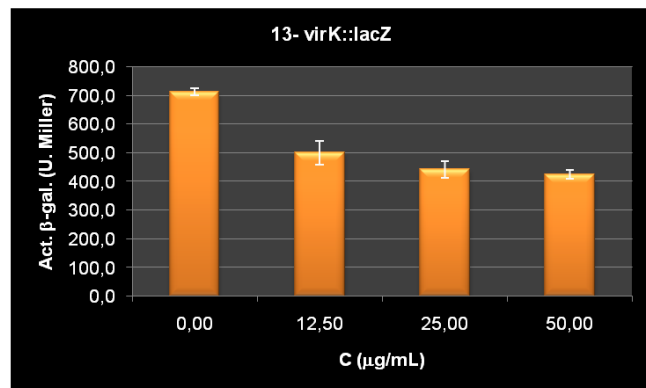
Al igual que para el caso de 1 se determinó el efecto inhibitorio de 2 y 13 sobre el sistema de dos componentes en base al ensayo autográfico a concentraciones a las cuales el crecimiento no se ve afectado.



2- Actividad β -galactosidasa	
C ($\mu\text{g/mL}$)	virK::lacZ
0,00	707,8 \pm 3,7
7,50	400,2 \pm 1,0
10,00	328,9 \pm 0,3
15,00	303,3 \pm 20,4



13- Actividad β -galactosidasa	
C ($\mu\text{g/mL}$)	virK::lacZ
0,00	714,4 \pm 12,0
12,50	501,0 \pm 40,4
25,00	443,6 \pm 29,0
50,00	424,7 \pm 14,5



14- Actividad β -galactosidasa	
C ($\mu\text{g/mL}$)	virK::lacZ
0,00	722,6 \pm 13,7
12,50	660,1 \pm 19,8
25,00	607,2 \pm 33,2
50,00	522,7 \pm 21,9

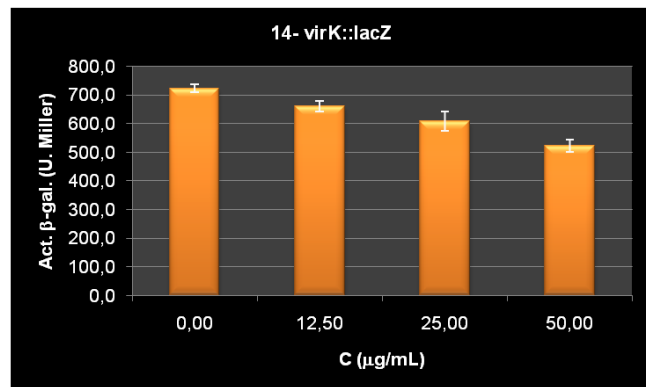


Figure 6. 26

Hay una disminución de la actividad β -galactosidasa dependiente de la concentración en ambos casos, siendo mayor con el compuesto **2** (Figura 6.26) como era de esperarse teniendo en cuenta el resultado del ensayo autográfico. Con respecto al compuesto **2**, a 10 $\mu\text{g/mL}$ ya se observa una disminución de la actividad enzimática del 54%. Esta concentración equivale a 49 μM , por lo que se puede decir que la inhibición del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ ocurre a una concentración 4 veces menor que la empleada con levoglucosenona. Por otro lado, el compuesto **13** provoca una caída en la actividad β -galactosidasa del 40% a 50 $\mu\text{g/mL}$. Esta concentración corresponde a 390 μM , el doble que en el caso de **1**, reflejando el hecho de que el doble enlace tiene cierta implicancia en la inhibición de PhoP/PhoQ. Por último, el compuesto **14** sólo produce una disminución del 28% de la actividad enzimática a la misma concentración que **13**, indicando que el grupo carbonilo es más importante a la hora de determinar la inhibición sobre el sistema PhoP/PhoQ.

Hasta este punto se determinó que la bromación del doble enlace en **1** aumenta notoriamente la actividad inhibitoria sobre el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ y además que el doble enlace y principalmente el grupo carbonilo determinan mayoritariamente esta actividad biológica. Sin embargo, también se observa una correlación entre el efecto inhibitorio sobre PhoP/PhoQ y la capacidad de afectar el crecimiento de *Salmonella* a concentraciones más altas para los compuestos testeados. Cabe preguntarse entonces si existe una relación entre estos dos efectos; es decir, si ambos pueden explicarse asumiendo una actividad inhibitoria particular o si cursan por mecanismos de acción diferentes. Por el momento y con estos estudios esa pregunta queda sin respuesta.

6.6.4.3. Estudio de la actividad del derivado bromado 2

Antes de continuar con la discusión de esta parte del trabajo conviene estudiar con un poco más de detalle la actividad del compuesto **2**. En el capítulo IV se mostró que al ser colocado en agua este derivado es capaz de reaccionar con el solvente. Es conveniente analizar por lo tanto si la actividad biológica observada de **2** es debida a su estructura o a la derivada de la reacción con agua dado que los experimentos se realizan en medios acuosos. Para comenzar a responder esta pregunta se realizó en primer lugar un estudio por RMN ^1H a distintos tiempos luego de preparar una solución de **2** en D_2O . Efectivamente, y como se propuso en el capítulo IV, a las 6 horas de disuelto prácticamente no se observa la señal del H-3 indicando reacción con agua deuterada (Figura 6.27). Se pudo determinar en base a espectros de RMN en dos dimensiones que el compuesto formado se trata del hidrato **17-D**, que resulta de la

adición de dos moléculas de D₂O. Una molécula se adiciona en posición 4 y la otra ataca al grupo carbonilo en posición 2 en clara analogía con lo que ocurre en la formación de la cianhidrina **12**. El compuesto parece formarse en un 100% a las 9 horas.

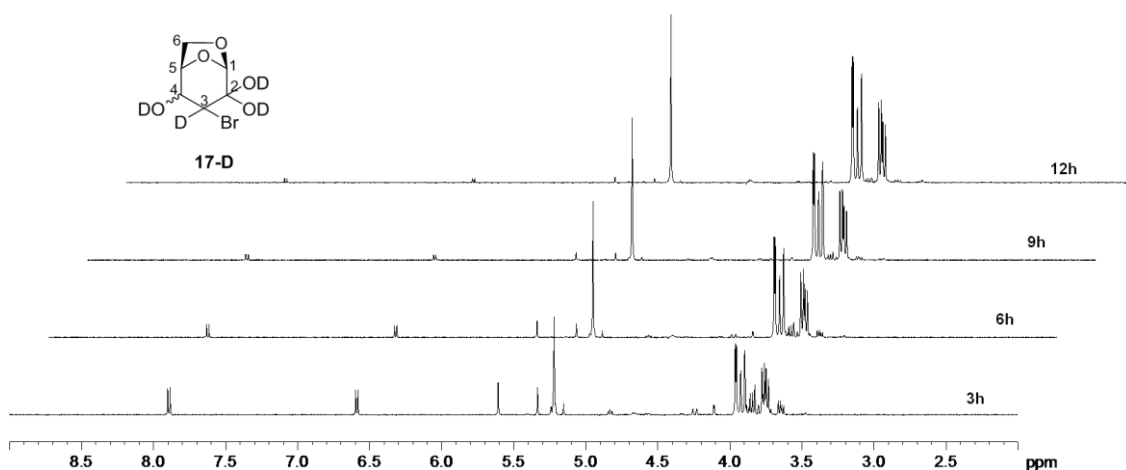


Figura 6.27

Este resultado abre la posibilidad de que el análogo protonado de **17-D** (**17-H**) sea el responsable de causar el efecto tanto sobre el crecimiento como sobre la inhibición de PhoP/PhoQ dado que este compuesto se forma en una proporción importante durante el intervalo de tiempo en el que se llevan a cabo los experimentos.

Primero se estudió como **17-H** afecta el crecimiento de *Salmonella*.

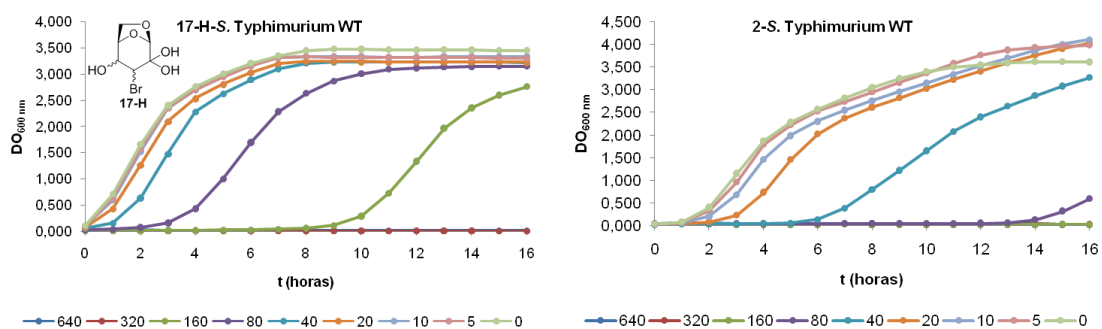


Figura 6.28

La Figura 6.28 muestra que **17-H** afecta la viabilidad de *Salmonella* en menor medida que **2**, lo que sugiere una menor potencia del primero en comparación con el segundo compuesto.

Por otro lado, la actividad sobre el sistema de dos componentes también es menor en el caso de **17-H** demostrando que **2** es más activo que el hidrato como es demostrado en la Figura 6.29.

El análisis de estos resultados permite deducir lo siguiente: a.- tanto la actividad sobre el crecimiento bacteriano como el efecto sobre la represión del gen *virK* son debidos a la estructura presente en **2** y no en **17**. b.- el derivado bromado debe de ejercer su acción tempranamente en el experimento antes de que se convierta al hidrato **17-H** o bien que con el tiempo la eficacia del primero vaya disminuyendo.

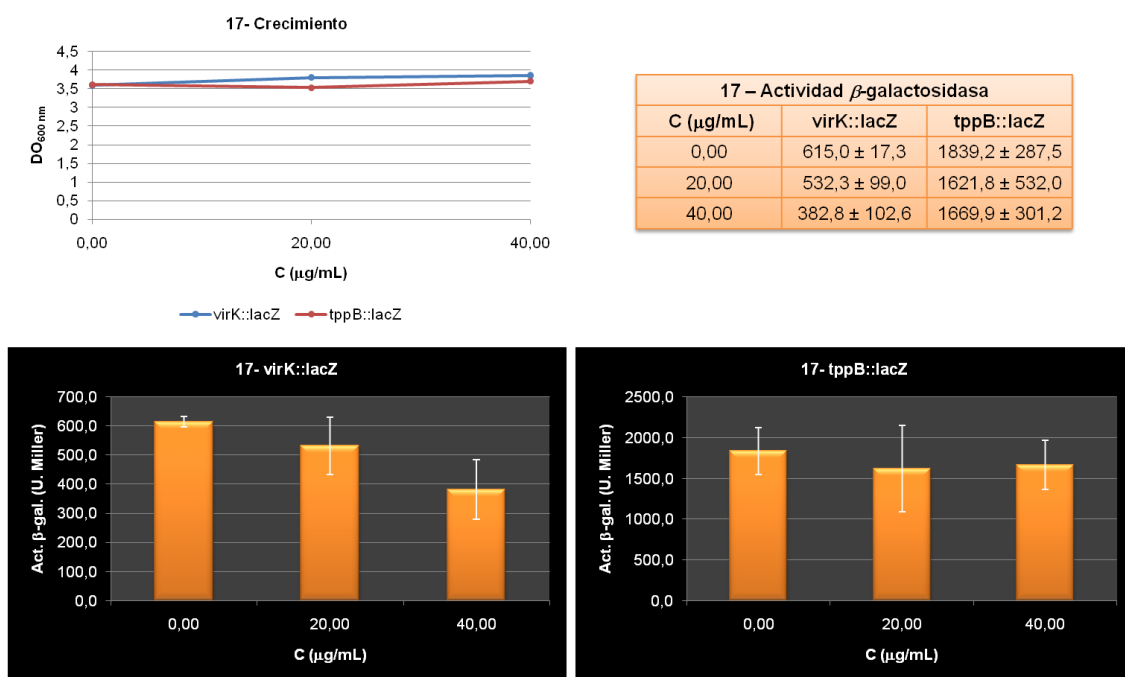
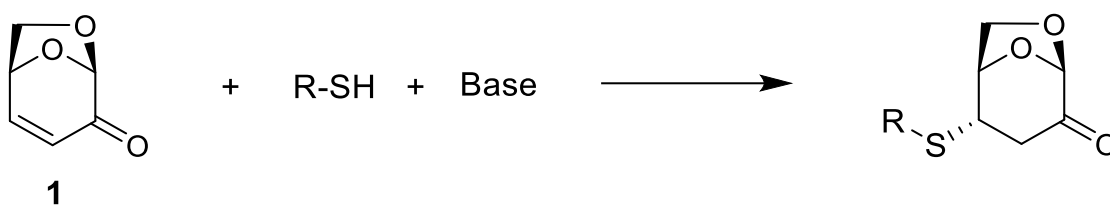


Figura 6.29

6.6.5. Síntesis de derivados de **1** por adición de tioles al carbono **4**

Se observó a partir de los resultados precedentes que la sustitución del carbono **3** resultó ser importante para incrementar la actividad biológica. Con esto en mente se pensó obtener una nueva serie de derivados por reacciones de sustitución. Observando la estructura de **1** una manera fácil de hacer esto es sustituir el carbono **4** mediante reacciones de adición de Michael. Si bien con este tipo de transformaciones el doble enlace se pierde aun queda el grupo carbonilo, el cual demostró ser más influyente que el doble enlace en el desarrollo de la actividad. La estrategia elegida fue la adición de Michael de tioles al carbono **4** de levoglucosenona (Esquema 6.2). Los rendimientos, tiempos de reacción y condiciones empleadas en la síntesis de estos compuestos se resumen en la Tabla 6.2.



Esquema 6.2

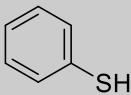
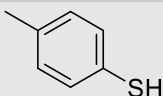
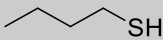
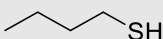
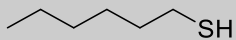
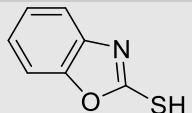
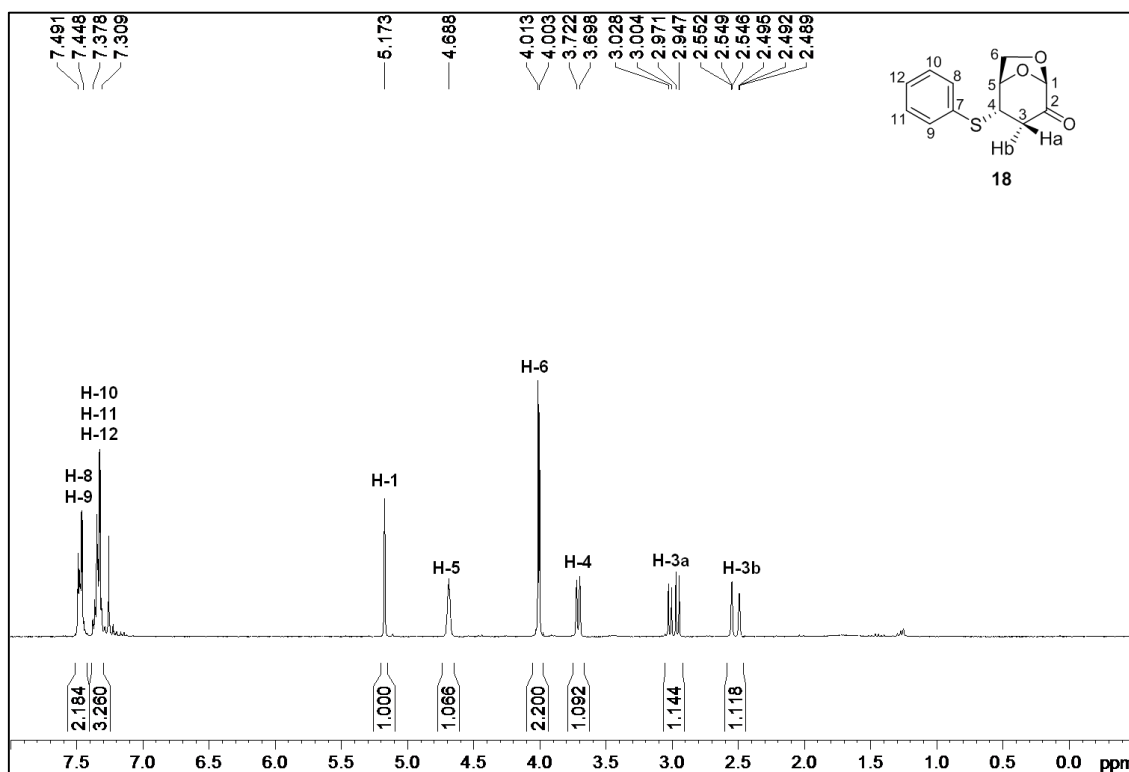
Reactivo	Base	Eq. Base	Solvente	t (horas)	Rend. (%)	Producto
	Et ₃ N	0,035	CHCl ₃	1,25	78	18
	Et ₃ N	0,035	CHCl ₃	1,5	75	19
	DIPEA	0,05	CHCl ₃	96	85	20
	DIPEA	0,20	AcOEt	96	83	20
	DIPEA	0,04	CHCl ₃	7,5	83	21
	DIPEA	0,05	CHCl ₃	60	57	22

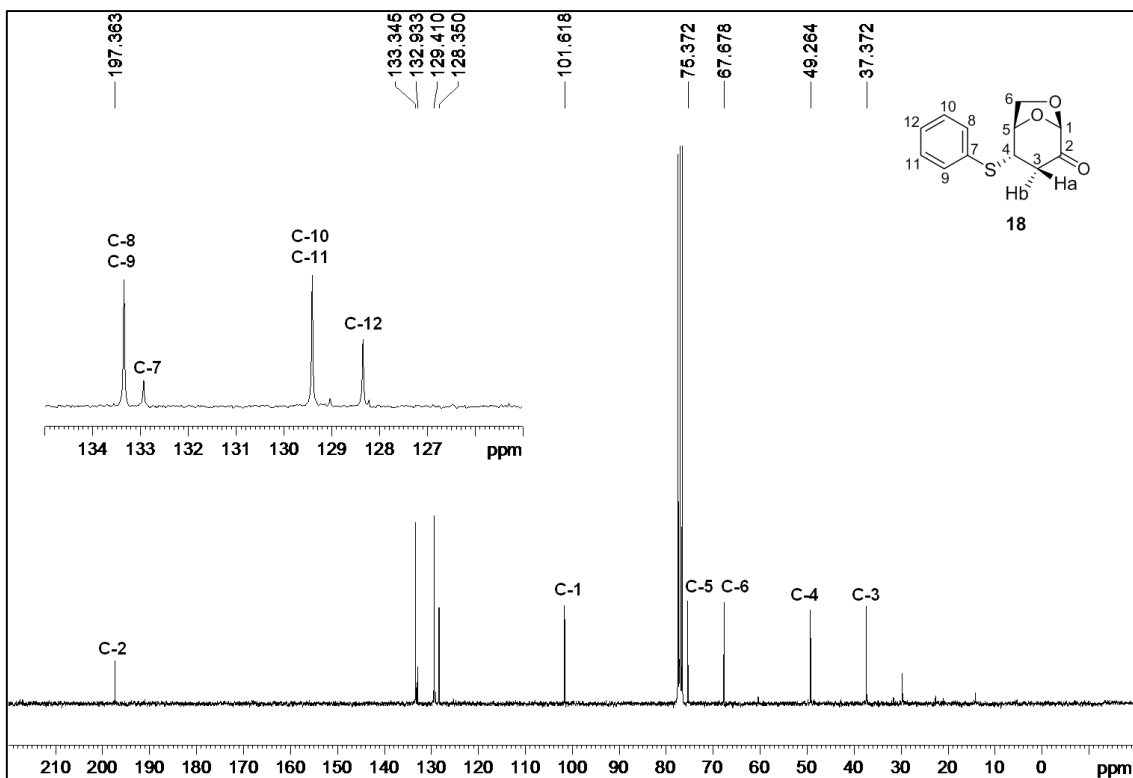
Tabla 6.2

La reacción de **1** con los tioles aromáticos tiofenol y *p*-metiltiofenol dieron los correspondientes aductos **18** y **19** con rendimientos muy buenos. Con estos compuestos se pudieron resolver cuestiones estereoquímicas derivadas de la reacción. En primer lugar, la configuración del H-4 y de los H-3 en estos aductos se determinó a partir del espectro de NOE. Al irradiar H-4 se observó un incremento en la señal correspondiente a los H-6 como se ejemplifica en la Figura 6.30 para **19**, manifestando que H-4 presenta orientación beta. También se ve un efecto INDOOR con el H-3a. La irradiación de H-4 además mostró una señal aromática correspondiente a H-8 y H-9. Adicionalmente, la irradiación del H-6 manifestó un incremento de la señal de H-3a, indicando que este último protón también se encuentra en orientación beta. Además, la configuración de los H-3 se puede

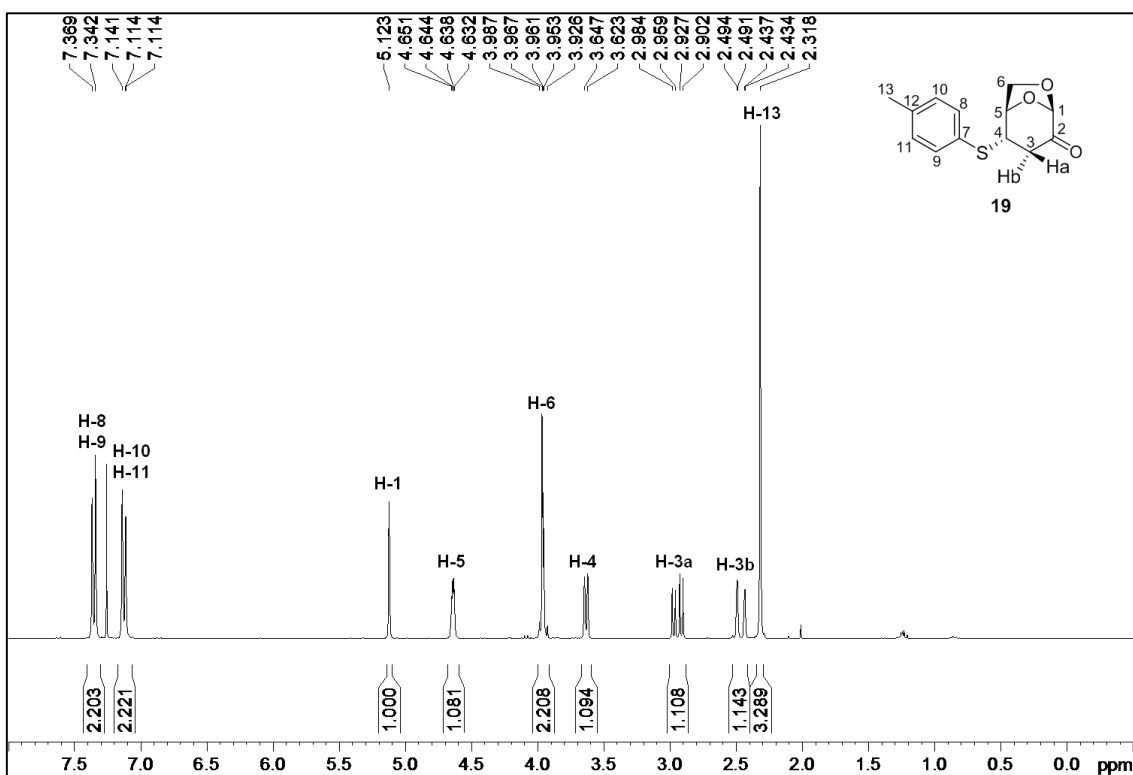
determinar fácilmente del análisis de los espectros de RMN ^1H una vez definida la configuración de H-4. El protón H-3a aparece como un doble doblete a aproximadamente 3,0 ppm debido al acoplamiento con H-4 mientras que el protón H-3b sólo presenta el acoplamiento geminal por lo que se evidencia como el doblete a casi 2,5 ppm. Por otro lado, es notorio como se perdió el acoplamiento de los H-6. La señal de estos protones es prácticamente un singlete ancho y no se aprecia ni el acoplamiento geminal ni el acoplamiento entre H-6_{exo} y H-5. Adicionalmente se observó un cambio en el patrón de señales aromáticas dado por la sustitución del anillo bencénico con el grupo metilo en **19**.



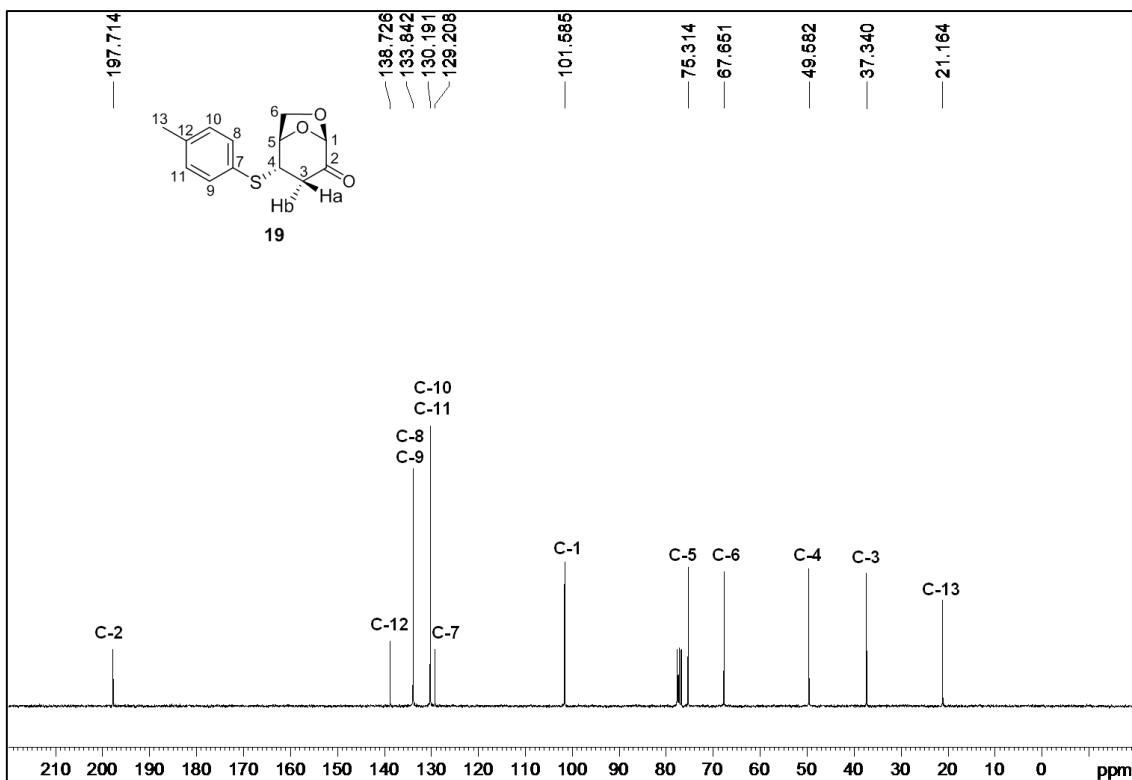
Espectro de RMN ^1H de 18



Espectro de RMN ^{13}C de 18



Espectro de RMN ^1H de 19



Espectro de RMN ^{13}C de 19

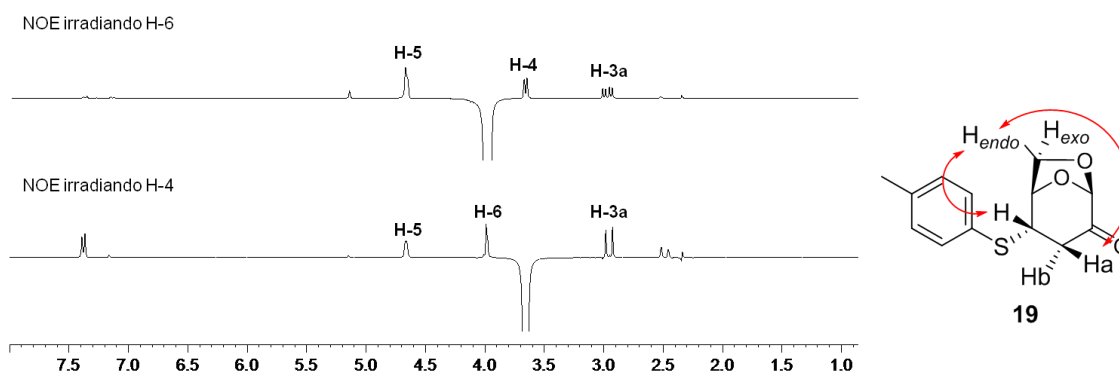
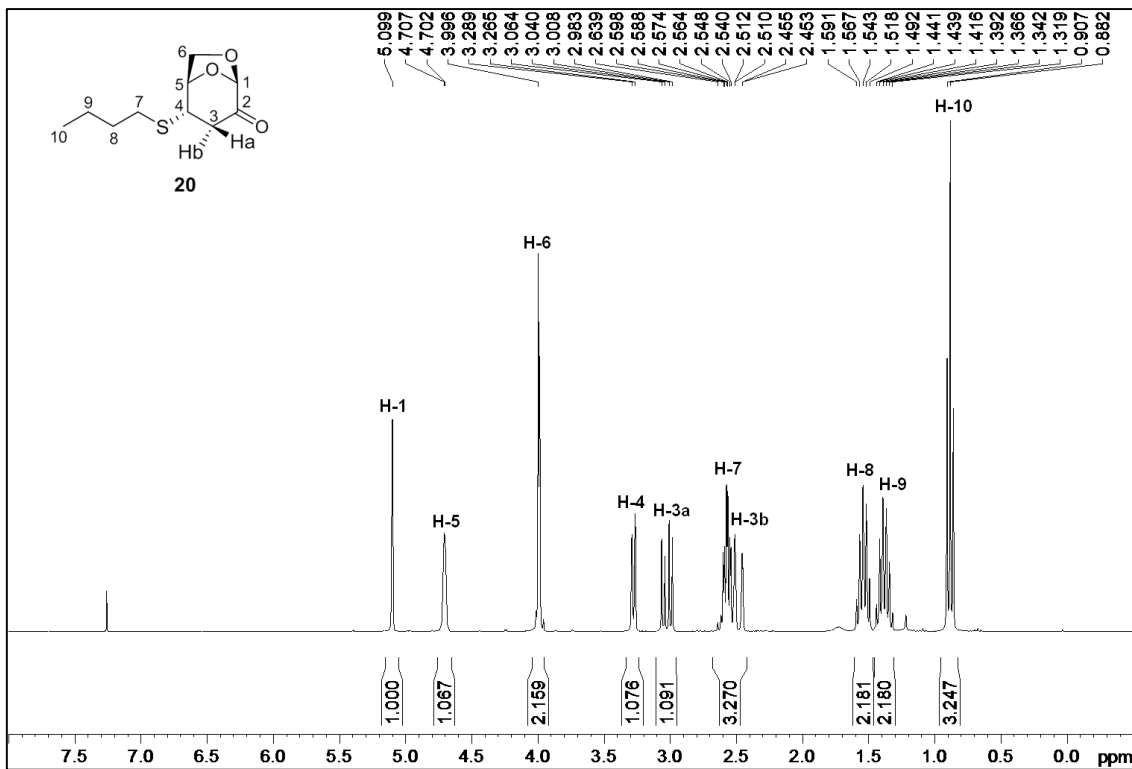
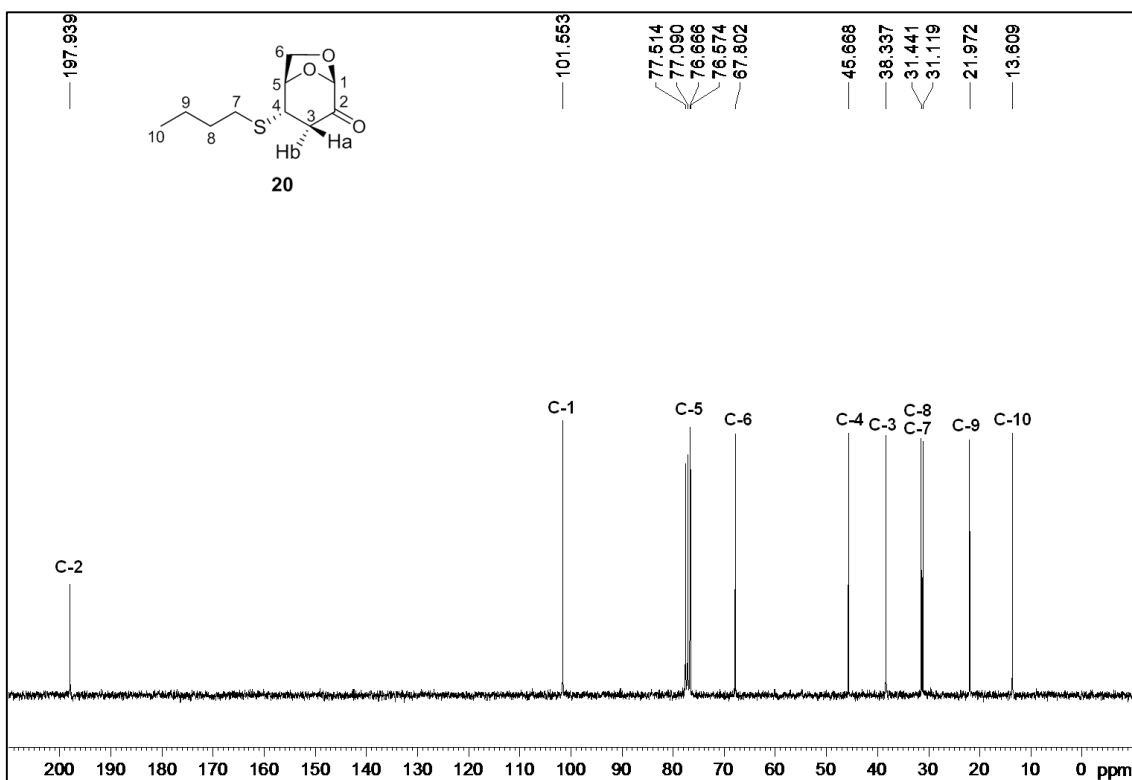


Figura 6.30

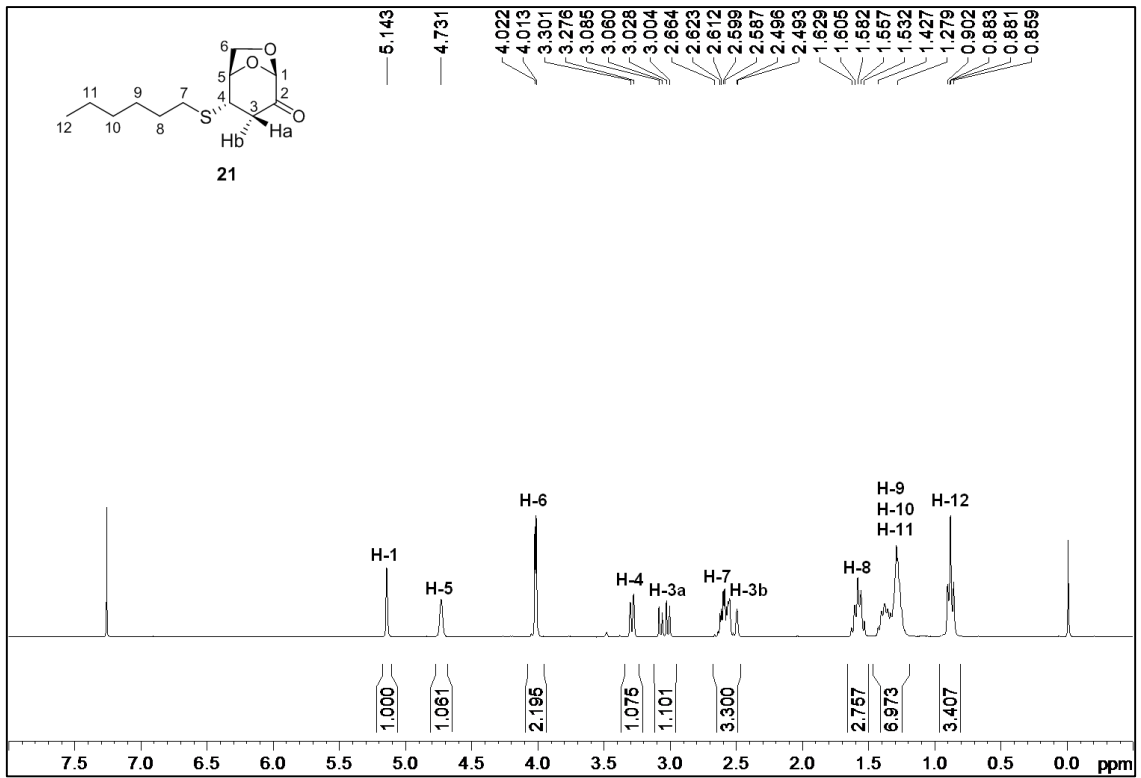
Con respecto a las reacciones de adición con los tioles alifáticos los productos **20** y **21** se obtuvieron con rendimientos superiores al 80%. Se requirió en estos casos el uso de una base un poco más fuerte y las reacciones requirieron mayor tiempo. Con el objetivo de evaluar la posibilidad de reemplazar CHCl_3 como solvente de estas reacciones se efectuó la reacción entre **1** y butanotiol en AcOEt sin afectarse el rendimiento. Este resultado permite demostrar que es posible reemplazar un solvente clorado por uno menos contaminante. Con referencia a los espectros de RMN en ambos casos se aprecian las señales típicas de protones alifáticos a campos altos como característica principal.



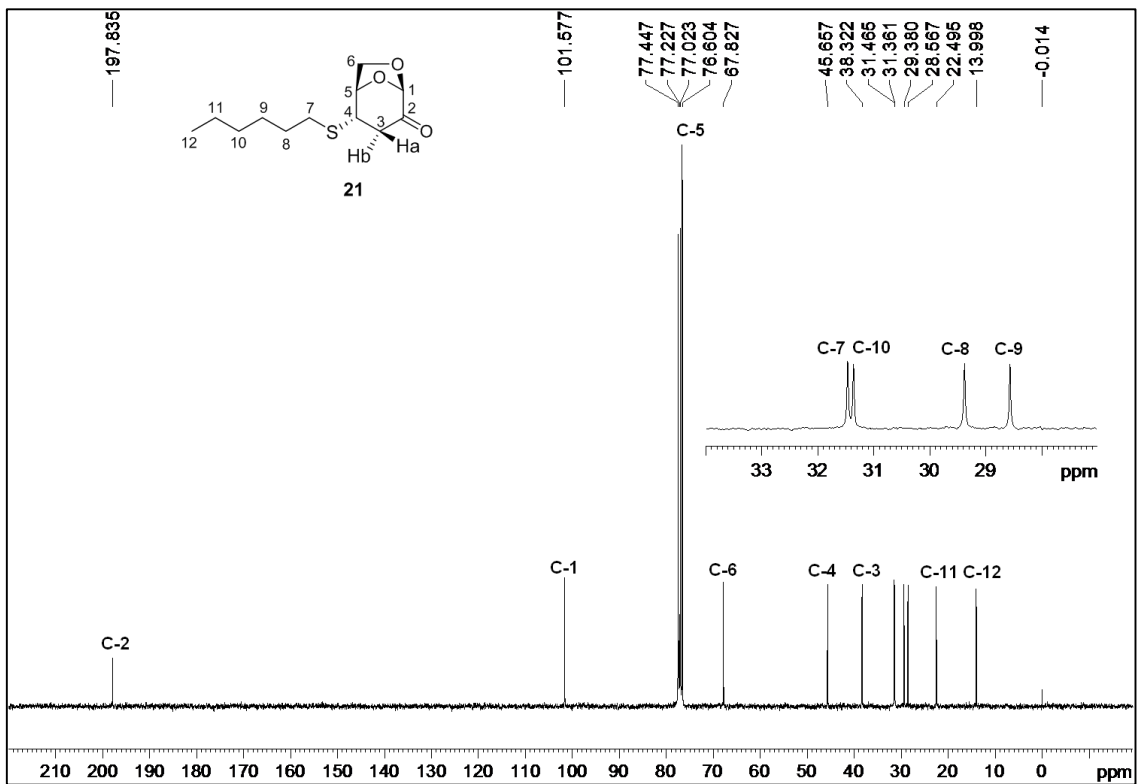
Espectro de RMN ¹H de 20



Espectro de RMN ¹³C de 20



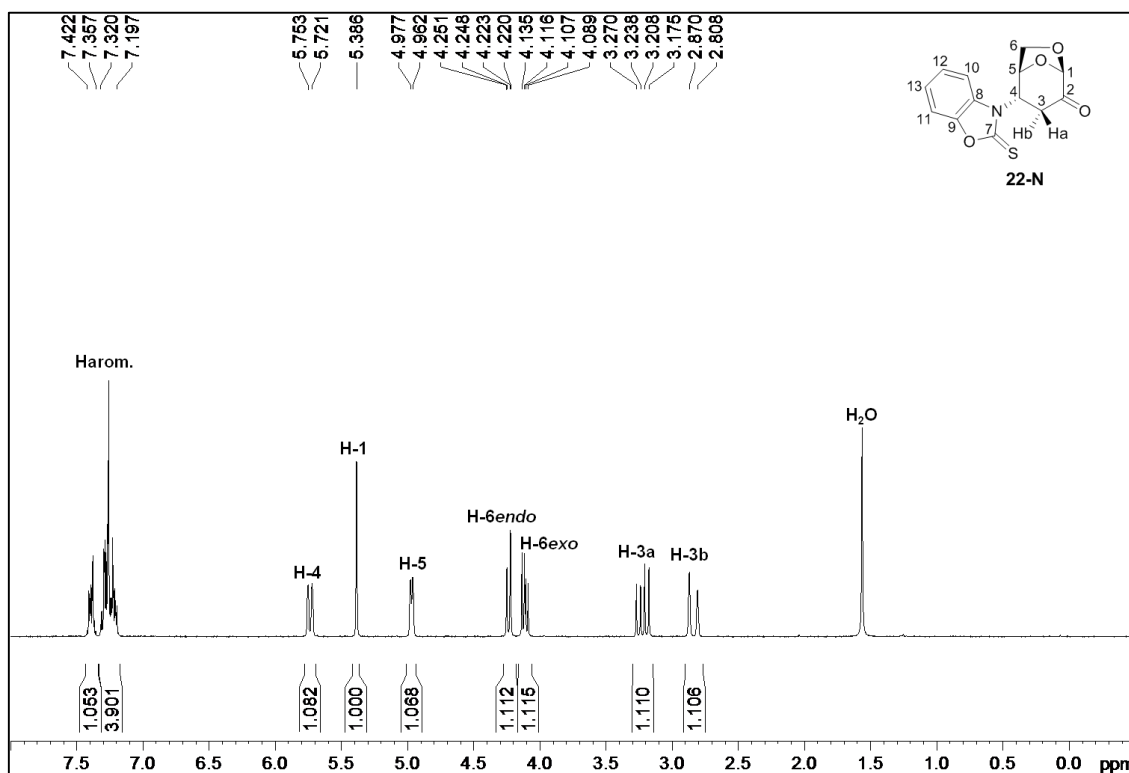
Espectro de RMN ^1H de 21



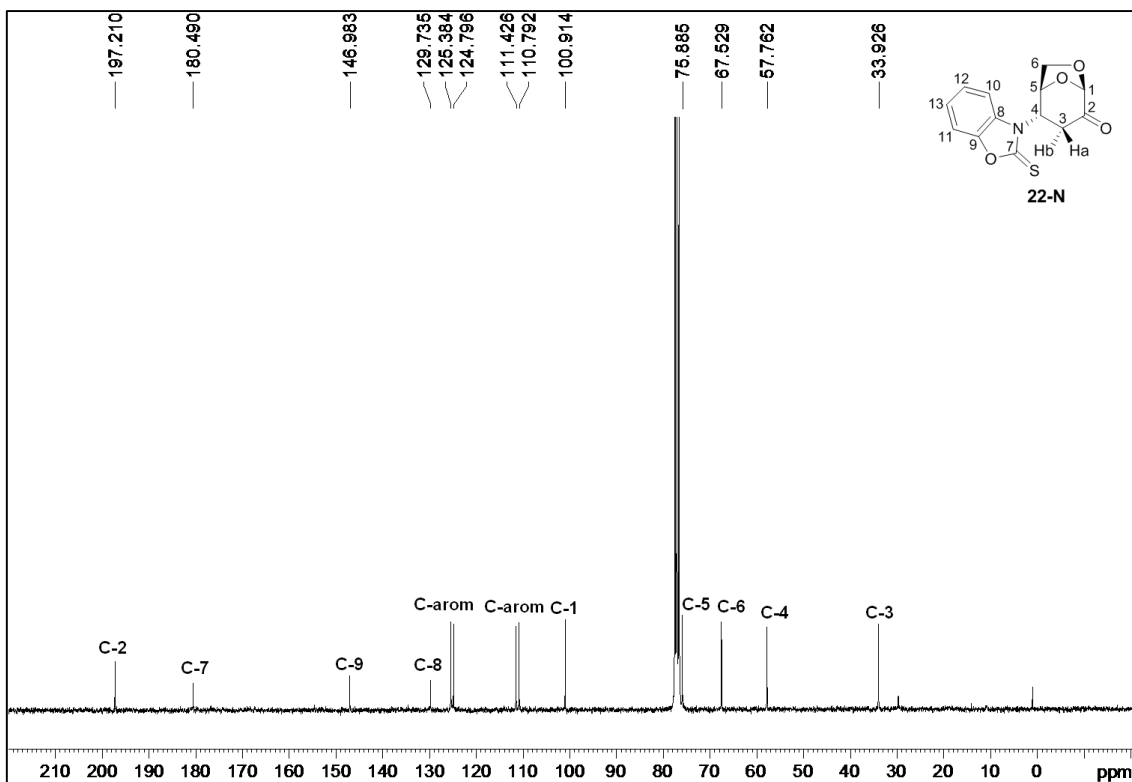
Espectro de RMN ^{13}C de 21

Por último, se hizo reaccionar levoglucosenona y 2-mercaptobenzoxazol para obtener **22**, pensando en conseguir el aducto correspondiente por reacción del grupo tiol con C-4 de acuerdo a lo establecido en el Esquema 6.2. El producto se obtuvo con un 57% de rendimiento, siendo la reacción que dio el rendimiento más bajo.

Con respecto a la discusión espectroscópica se pueden hacer algunas apreciaciones. En primer lugar se observa nuevamente el patrón de acoplamiento típico de los H-6 en el espectro de RMN ^1H , ausente en los aductos anteriores. En segundo lugar el H-4 aparece a campos más bajos en el espectro de lo que debería esperarse dado que se trata de un protón alifático como se observa con los compuestos precedentes. Además, el C-7 al no tratarse de un carbono bencénico aparece en una región diferente del espectro cuando se lo compara con los dos aductos con sustitución aromática.

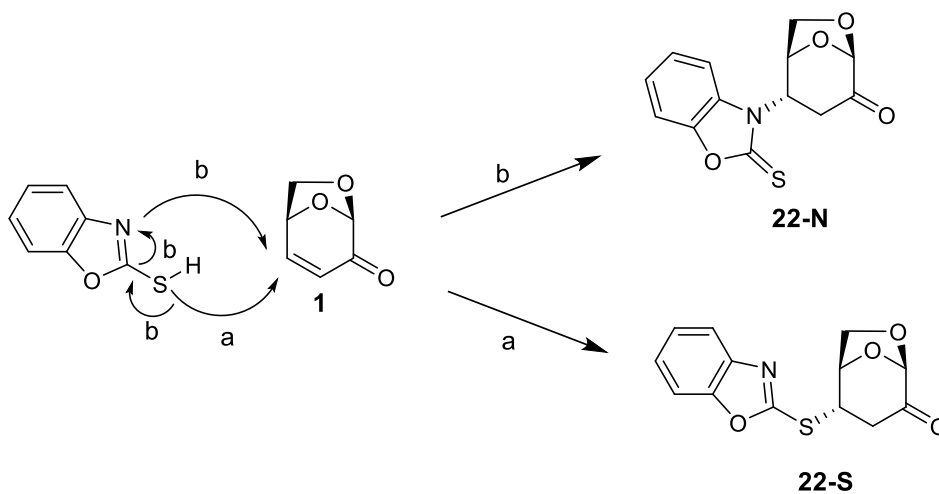


Espectro de RMN ^1H de **22-N**



Espectro de RMN ^{13}C de **22-N**

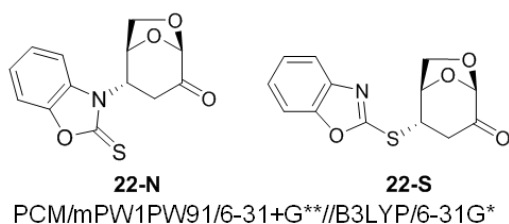
Esta característica vista en los espectros de RMN hace preguntarse si la estructura de **22** es la esperada por reacción del grupo sulfidrido con el C-4 de **1** (de ahora en más llamado **22-S**) o por la reacción del átomo de N en el reactivo generada por una isomerización del grupo tiol catalizada por la base DIPEA (aducto **22-N**) como se muestra en el Esquema 6.3.



Esquema 6.3

La suposición hecha en el párrafo precedente está basada en datos espectroscópicos para compuestos similares en los cuales el átomo de carbono del grupo tiocarbonilo posee un desplazamiento químico de 180 ppm mientras que el átomo de C del grupo tioéter presenta un desplazamiento de 170 ppm.¹³⁵

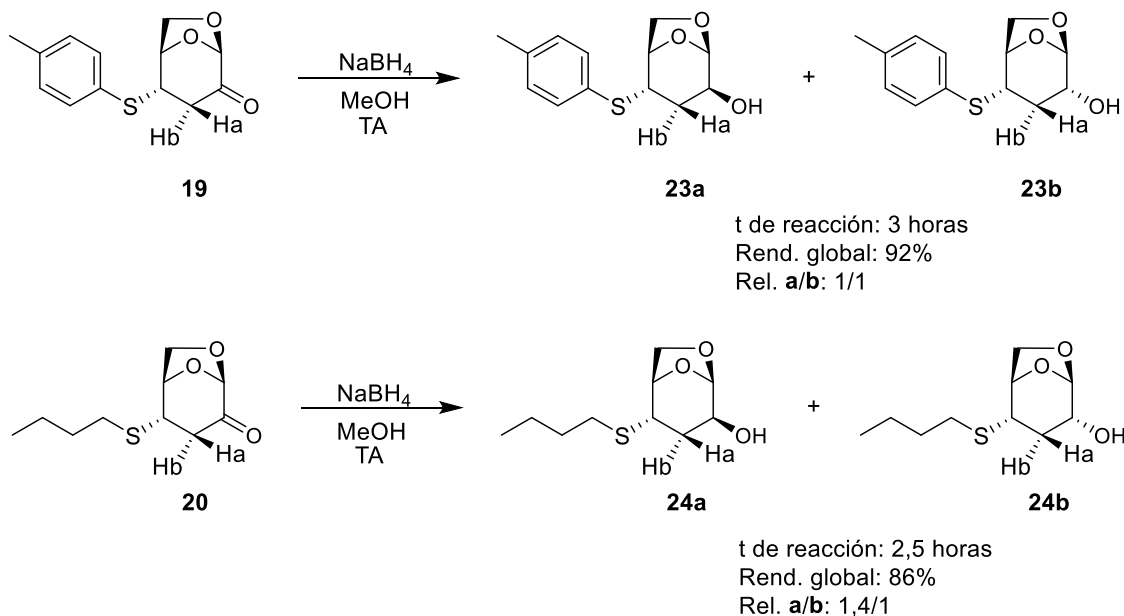
Un espectro en dos dimensiones HMBC permitió observar una correlación entre la señal de protones a 5,74 ppm y la señal de carbono a 129,7 ppm correspondiendo a H-4 y a C-8 respectivamente. Esto es posible sólo para el compuesto **22-N** y no para **22-S** ya que en este último no debería observarse una correlación a *J*-2 o *J*-3 en este experimento. Como complemento a este dato experimental se efectuaron cálculos computacionales para determinar si los desplazamientos químicos teóricos para **22-N** o **22-S** coinciden con los obtenidos experimentalmente. La Tabla 6.3 muestra que hay una menor diferencia entre los desplazamientos químicos calculados y los obtenidos experimentalmente para el caso del compuesto **22-N**, fundamentalmente en los carbonos C-7 y C-8 y en el protón H-4 que fueron aquellos que hicieron surgir la inquietud respecto de la estructura del compuesto. Estos datos confirman por lo tanto que el aducto obtenido fue **22-N** y no **22-S** como se pretendía originalmente.



Desplazamientos químicos				Errores (Calc. – Exp.)	
Experimentales		Calculados			
¹³ C	Exp	22-N	22-S	22-N	22-S
C-1	100,9	101,0	101,9	0,1	1,0
C-2	197,2	200,6	201,6	3,4	4,4
C-3	33,9	34,4	36,1	0,5	2,2
C-4	57,8	58,2	53,4	0,4	4,4
C-5	75,9	77,2	75,1	1,3	0,8
C-6	67,5	67,4	64,9	0,1	2,6
C-7	180,5	179,7	167,9	0,8	12,6
C-8	129,7	127,7	139,3	2,0	9,6
C-9	147,0	144,1	150,3	2,9	3,3
<i>Error promedio</i>				1,3	4,5
¹ H	Exp	22-N	22-S	22-N	22-S
H-1	5,37	5,37	5,61	0,00	0,24
H-3ax	3,22	3,21	3,25	0,01	0,03
H-3eq	2,84	2,74	2,27	0,10	0,57
H-4	5,74	5,71	4,86	0,03	0,88
H-5	4,97	4,84	5,43	0,13	0,46
H-6endo	4,23	4,39	4,56	0,16	0,33
H-6exo	4,11	4,22	4,49	0,11	0,38
<i>Error promedio</i>				0,08	0,41

Tabla 6.3

Por último, adicionalmente a estos aductos se sintetizaron los alcoholes derivados de **19** y **20** por reducción del grupo carbonilo (Esquema 6.4).



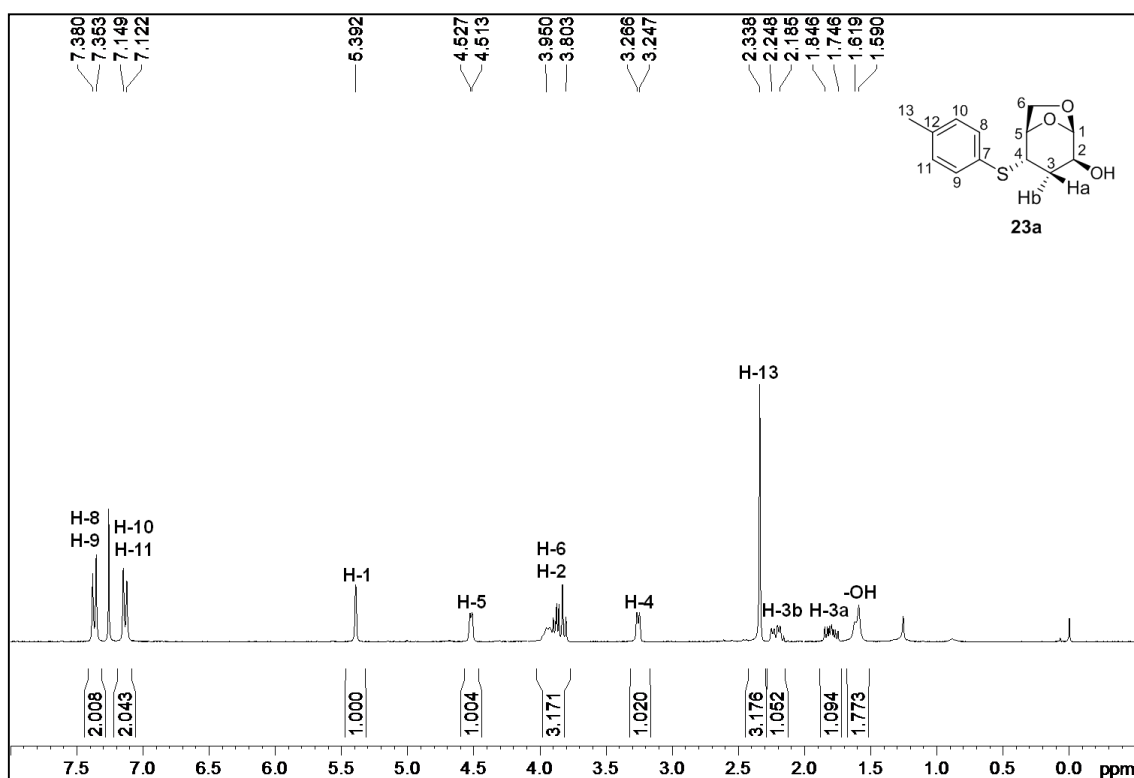
Esquema 6.4

Las reducciones con NaBH_4 permitieron obtener los alcoholes epiméricos en ambos casos con excelentes rendimientos. En el estudio por RMN se observa para todos los compuestos el corrimiento de la señal correspondiente a C-2 a campos más altos en el espectro de RMN ^{13}C y la aparición del protón del grupo oxhidrilo y de H-2.

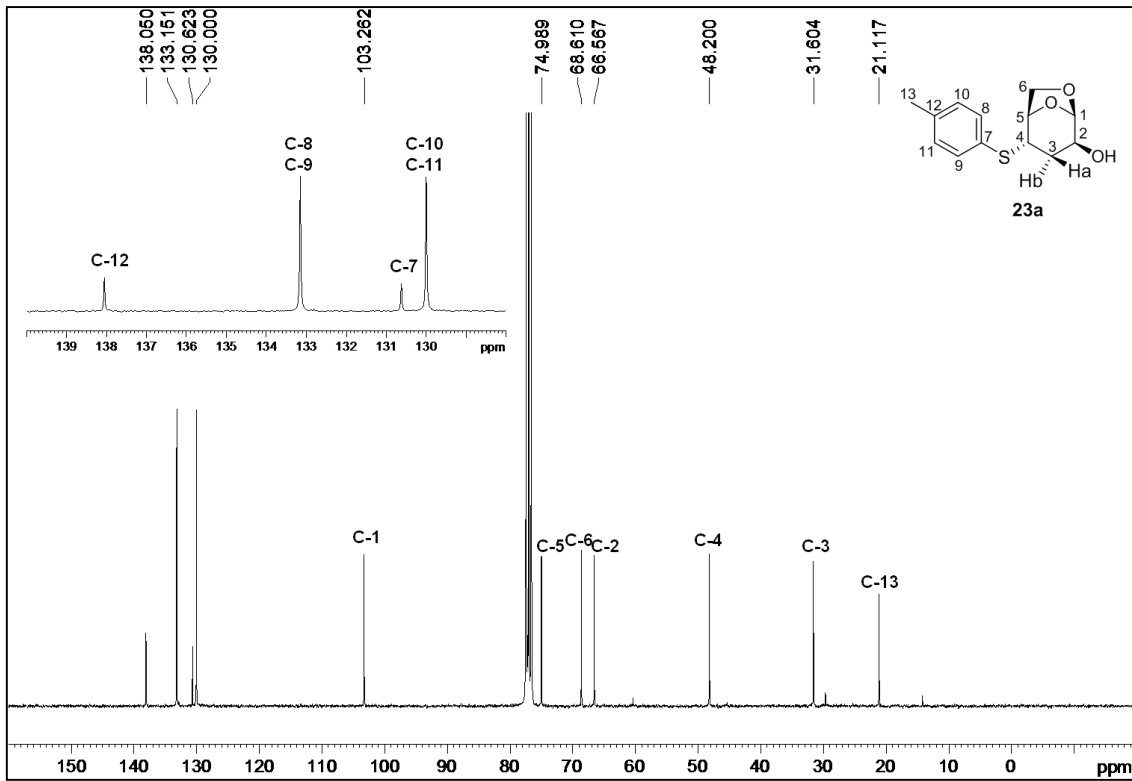
Resta ahora identificar a cada uno de los productos, lo que implica definir la configuración en el carbono 2. Esto se pudo resolver empleando nuevamente experimentos NOE como se ejemplifica para los alcoholes **23a** y **23b** en la Figura 6.31. Se intentó en primer lugar la irradiación de H-4 en **23b** en busca de un efecto NOE con H-2. La señal de NOE en H-2 se observa como si proviniera de un efecto INDOOR. Esto es debido a que al irradiar H-4 también se excitó la frecuencia de resonancia del grupo oxhidrilo como se puede deducir por el solapamiento de las señales de ambos protones en el espectro de RMN ^1H . Sin embargo, esto último hizo que apareciera un incremento en la señal de H-1. Esto sólo pudo ser debido al efecto NOE con el grupo oxhidrilo. La irradiación posterior de H-1 permitió confirmar este resultado. Se observa luego de la misma un incremento en la señal de -OH además del efecto INDOOR con H-2. Por el contrario, la irradiación de H-1 en **23a** sólo permite apreciar efecto INDOOR con H-2. De esta manera se pudo determinar la configuración de cada uno de los alcoholes epiméricos.

Por otro lado, para el caso de los alcoholes alfa el protón del grupo -OH se aprecia como un doblete bien definido en los espectros de RMN ^1H . Esto puede ser debido a que ese protón forme un enlace de hidrógeno con el átomo de azufre unido a C-4, formando un anillo de 6 miembros y permitiendo evidenciar por lo tanto el acoplamiento con el H-2 responsable del desdoblamiento de la señal. Esta característica pudo ser evidenciada cuando se hizo un experimento de RMN ^1H agregando D_2O a la muestra de **23b** disuelta en CDCl_3 . Es evidente a partir de la Figura 6.32 que luego del agregado de D_2O ya no se puede ver el acoplamiento del H-2 con el protón del grupo oxhidrilo, el cual se genera debido al puente hidrógeno intramolecular.

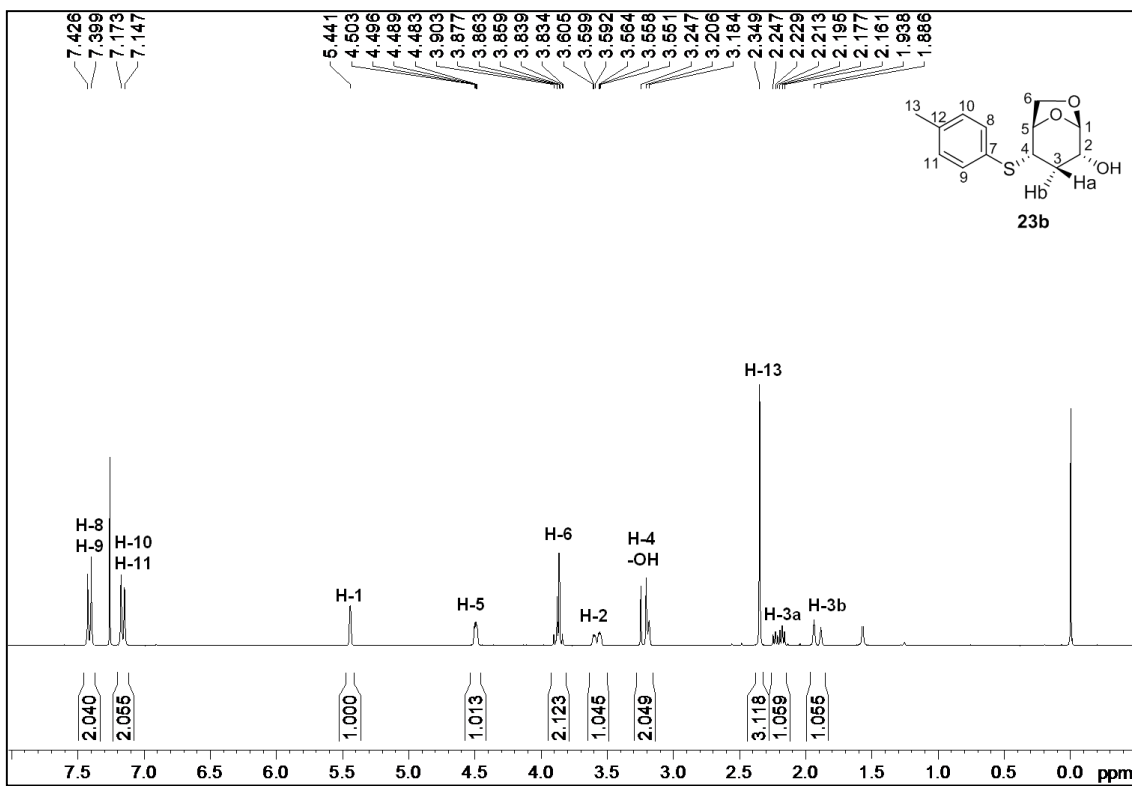
Por último, las señales correspondientes a los H-3 fueron diferentes respecto de los materiales de partida debido a que ahora la presencia de los H-2 genera un acoplamiento adicional con los protones en posición 3.



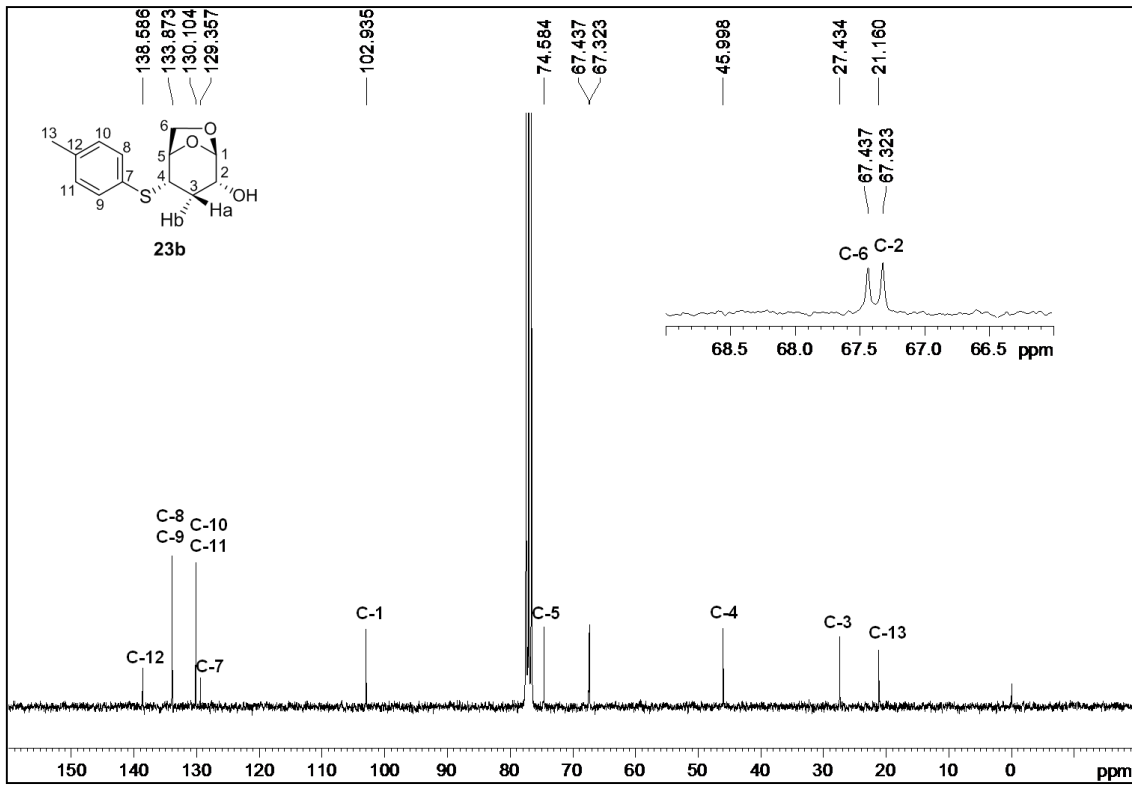
Espectro de RMN ^1H de **23a**



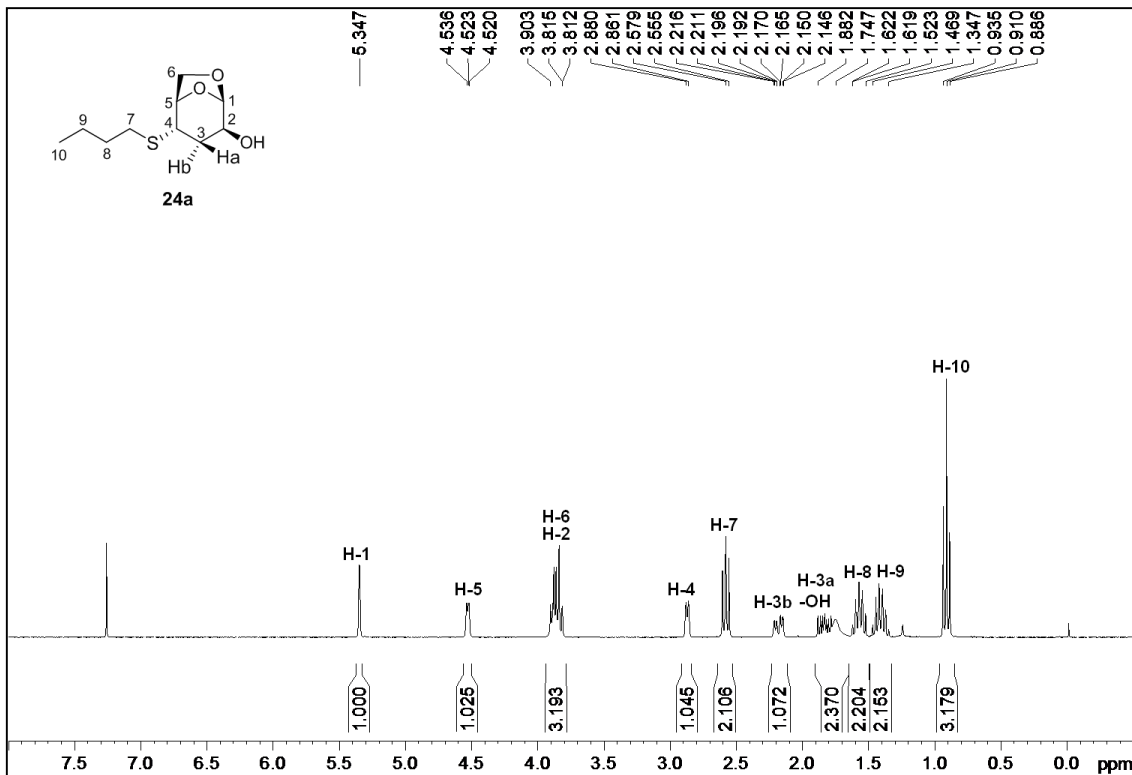
Espectro de RMN ¹³C de 23a



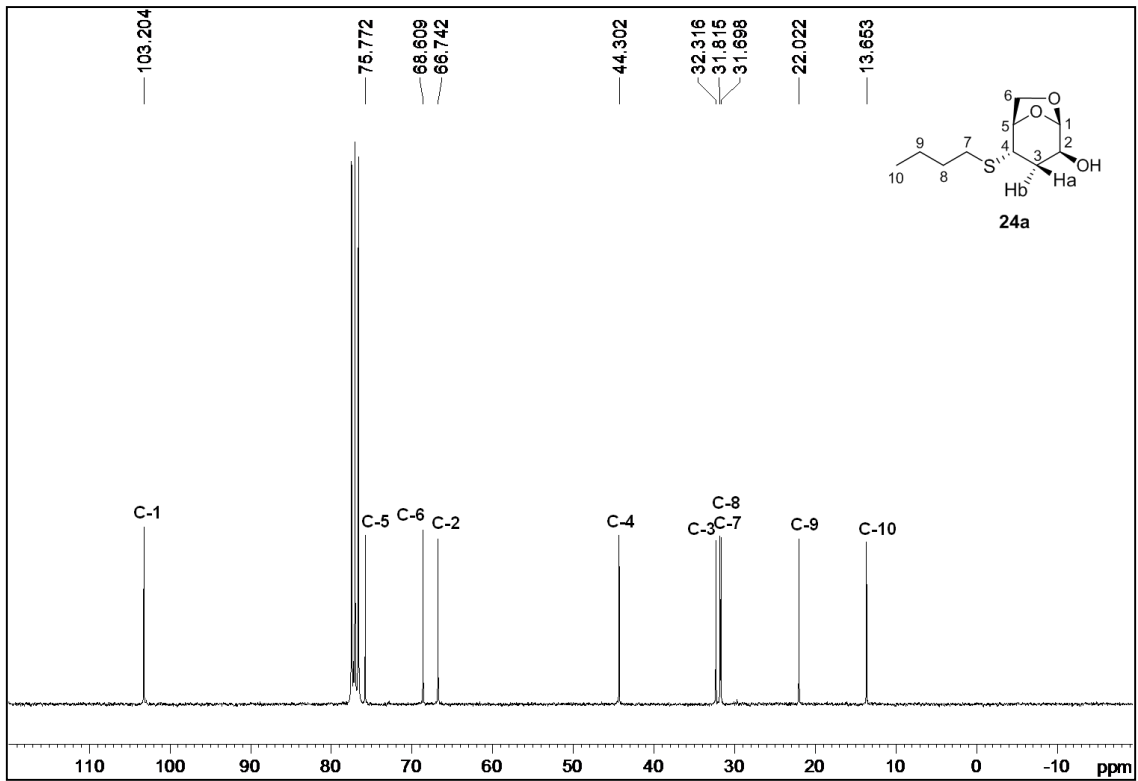
Espectro de RMN ¹H de 23b



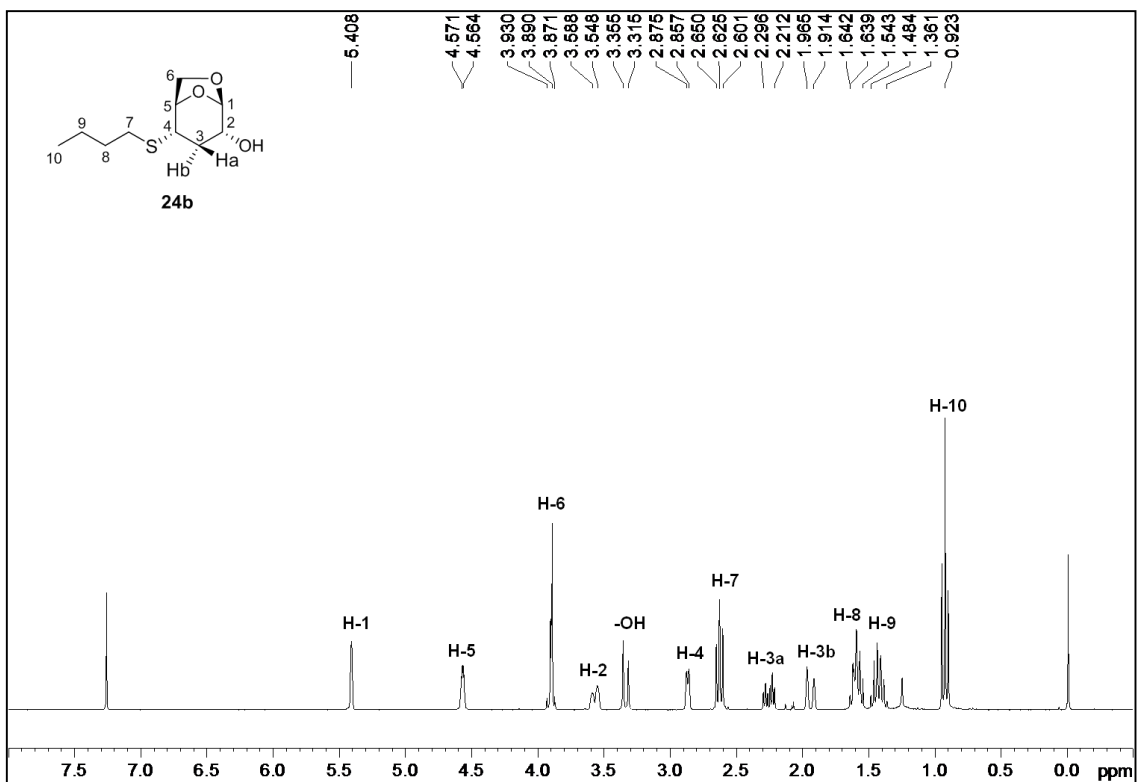
Espectro de RMN ^{13}C de 23b



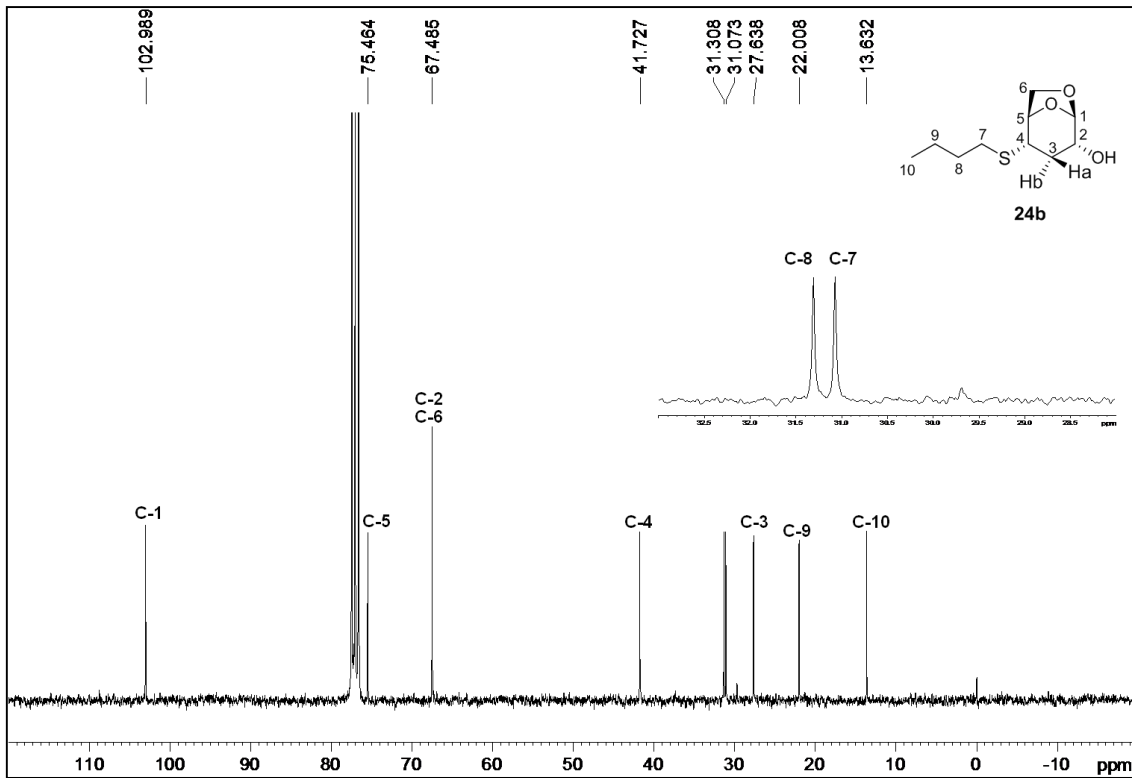
Espectro de RMN ^1H de 24a



Espectro de RMN ^{13}C de 23b



Espectro de RMN ^1H de 24b



Espectro de RMN ^{13}C de 24b

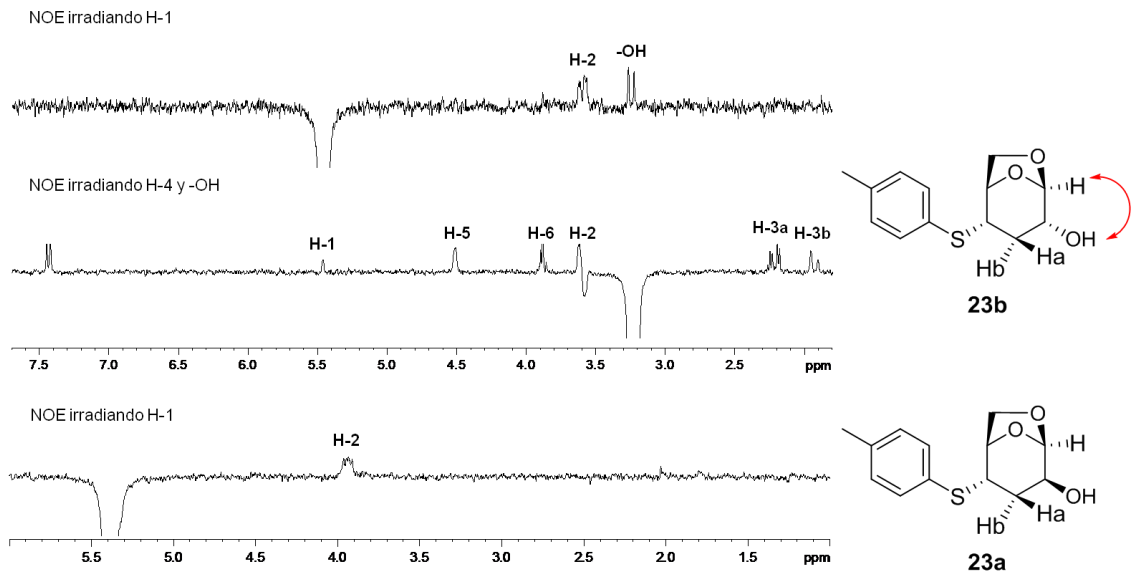


Figura 6.31

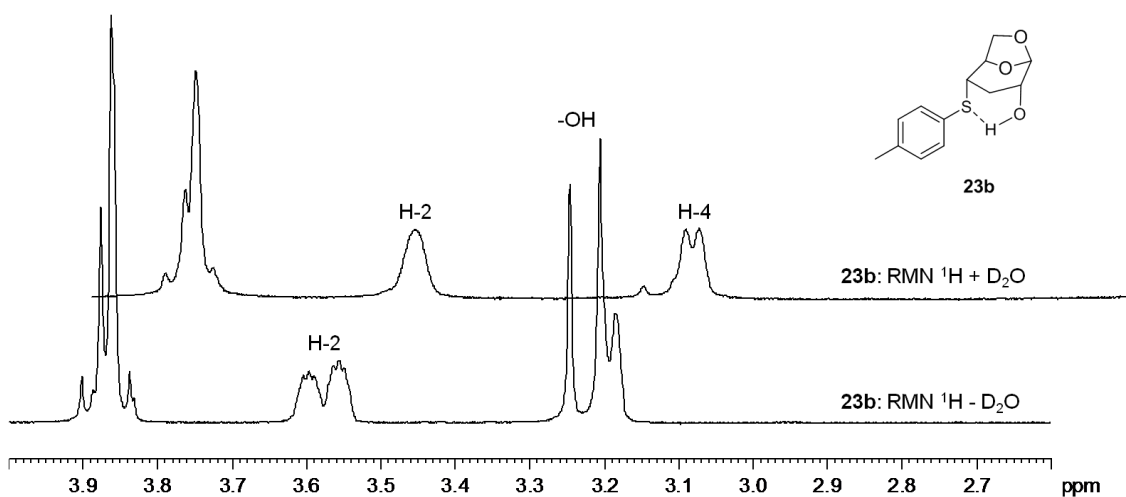


Figura 6.32

6.6.6. Evaluación de la actividad biológica de los tioderivados sintetizados

Una vez obtenidos los compuestos se estudió su actividad biológica empleando el ensayo en punto de la misma manera que con el primer set de compuestos ensayados mostrado en la sección 6.6.4 (Figura 6.33).

Se observa en la figura que 3 de los 9 compuestos evaluados dieron positivo el ensayo. Hay dos cuestiones a remarcar de este estudio: en primer lugar, los compuestos activos poseen sustitución con un grupo aromático en posición 4; esto no ocurre para los compuestos que poseen un sustituyente alifático. En segundo lugar, la reducción del grupo carbonilo disminuye la actividad observada. Esto es evidente cuando se compara la actividad de los alcoholes **23a** y **23b** con respecto a **19**. Esto coincide con la tendencia vista con el anterior set de derivados sintetizados, remarcando la importancia del grupo carbonilo en la actividad evaluada.

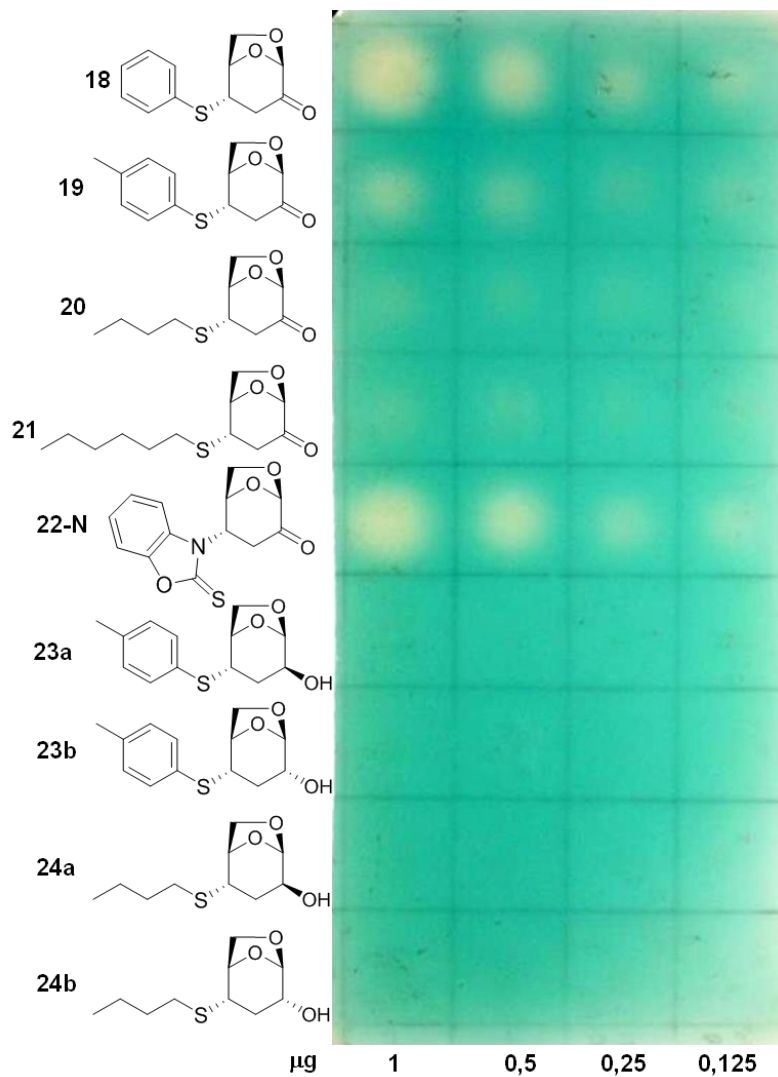


Figura 6.33

Como se ha mencionado en las discusiones precedentes, se estudió el efecto que tienen los compuestos sobre el crecimiento bacteriano. En este caso, para hacer más sencillo el análisis se trabajó con los compuestos que dieron positivo el ensayo autográfico. Se puede ver en la Figura 6.34 que los derivados **18**, **19** y **22-N** provocan un efecto importante sobre la viabilidad bacteriana a partir de 160 $\mu\text{g/mL}$. Esto corresponde a 683, 644 y 581 micromolar respectivamente.

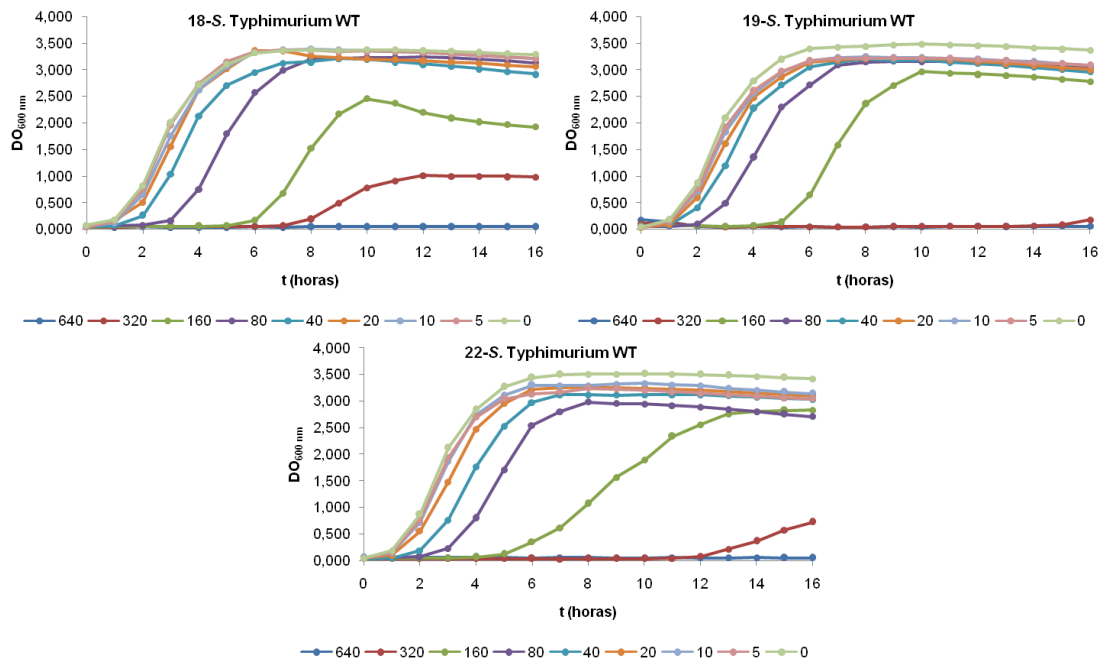


Figura 6.34

Posteriormente se estudió como estos compuestos afectan al sistema de dos componentes PhoP/PhoQ.

Se puede apreciar a partir de la Figura 6.35 que de los tres compuestos en cuestión el menos activo resultó ser **19**. Los restantes provocaron una disminución de la actividad β -galactosidasa muy similar. De todos estos compuestos, **22-N** fue el más activo con 73 μ M provocando una caída del 55% de la actividad enzimática.

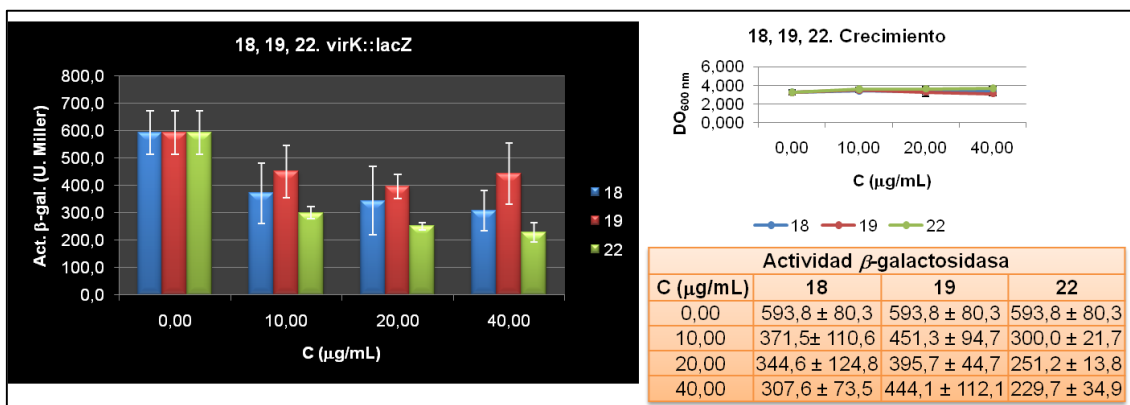


Figura 6.35

6.6.7. Ensayos de citotoxicidad

En esta sección se halló mediante un ensayo autográfico que levoglucosenona fue responsable de la actividad evaluada. Una búsqueda bibliográfica acerca de los

efectos biológicos de esta molécula arroja sólo dos reportes del mismo grupo de investigación.¹³⁶ En primer lugar se demostró que el compuesto provoca una interrupción del ciclo celular en células de hámster.^{136a} Por otro lado también se halló que el mismo no tiene la capacidad de inducir tumores en ensayos modelo en ratones cuando se administró 3 mg de levoglucosenona tópicamente dos veces por semana durante un lapso de 5 semanas de estudio.^{136b}

Estos resultados se suman a observaciones propias acerca del efecto citotóxico sobre células CHO (Figura 6.36) luego del tratamiento con **1** y con el derivado bromado **2** durante 24 h. Esto se llevó a cabo tiñendo los núcleos de las células con el colorante DAPI (que se une específicamente a ADN) luego de la incubación con ambos compuestos. Se puede observar una actividad citotóxica a una dosis de 4 $\mu\text{g/mL}$ de cada derivado. Además, a partir de esta concentración se observa una forma y tamaño diferentes de los núcleos respecto del control; incluso se visualizan fragmentaciones en algunos casos. Esto podría estar indicando que los compuestos podrían provocar la muerte de las células induciendo un proceso de apoptosis.

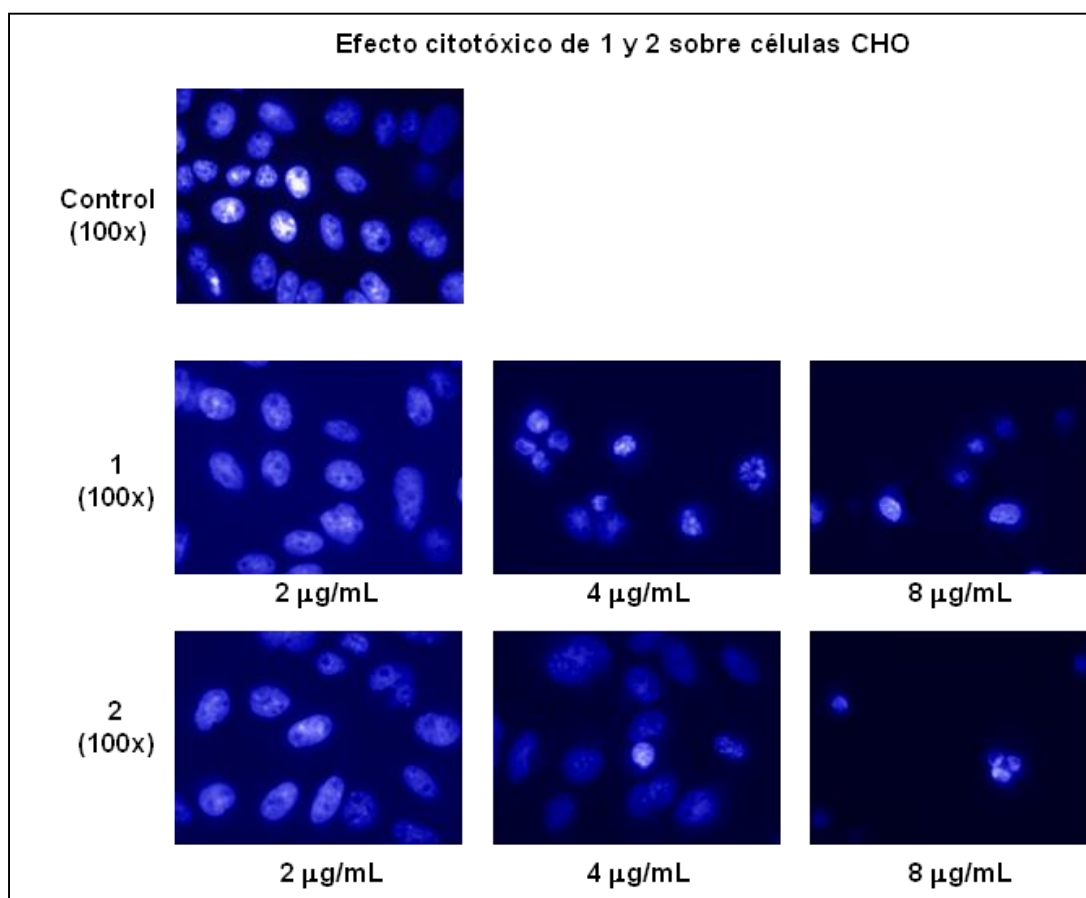


Figura 6.36

En cuanto a la síntesis de compuestos bioactivos se sabe que levoglucosenona sirve de material de partida para obtener productos naturales conocidos por poseer una actividad biológica determinada como es el caso de la tetrodotoxina. Sin embargo poco hay hecho acerca de compuestos con estructura novedosa a partir de **1** que sean biológicamente activos. El grupo de Peri sintetizó inhibidores de la proteína Ras como potenciales agentes anticancerígenos empleando como estrategia sintética reacciones de adición 1,3 dipolar sobre el doble enlace de **1**⁴⁷; uno de tales compuestos se mencionó en la introducción (Figura 1.7). En ese trabajo los autores propusieron que los anillos bencénicos fueron los principales responsables de la actividad mientras que menos clara fue la participación de la estructura de levoglucosenona en determinación del efecto inhibitorio observado.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se evaluó la citotoxicidad de los compuestos **1**, **2** y **22-N** en células Huh7 de carcinoma hepático humano mediante el ensayo con el compuesto MTT.¹⁰⁹ Los resultados se muestran en la Figura 6.37. Los compuestos presentaron una actividad citotóxica muy alta frente a esta línea celular. Los IC₅₀ calculados a partir de los datos empleando el software GraphPad Prism fueron 1,63, 0,96 y 2,44 µg/mL para **1**, **2** y **22-N** respectivamente lo que equivale a 12,93, 4,68 y 8,87 µM respectivamente (Tabla 6.4). A modo de comparación los IC₅₀ para cisplatino y doxorubicina (DOXO), dos anticancerígenos comerciales, frente a la misma línea celular durante idéntico tiempo de incubación son 3,09 y 0,24 µM respectivamente.¹³⁷ Por otro lado, el epóxido **16a** el cual demostró no poseer actividad alguna tampoco afecta la viabilidad celular a las concentraciones evaluadas.

Este resultado es muy interesante y permite hacer dos comentarios. En primer lugar, las concentraciones de compuestos empleadas están muy por debajo de aquellas utilizadas en los estudios de inhibición de PhoP/PhoQ, enfocando ahora la atención en la actividad citotóxica por sobre una eventual actividad antibacteriana. En segundo lugar, los IC₅₀ calculados son comparables a los de antitumorales comerciales convirtiéndolos en compuestos prometedores con potencial actividad anticancerígena.

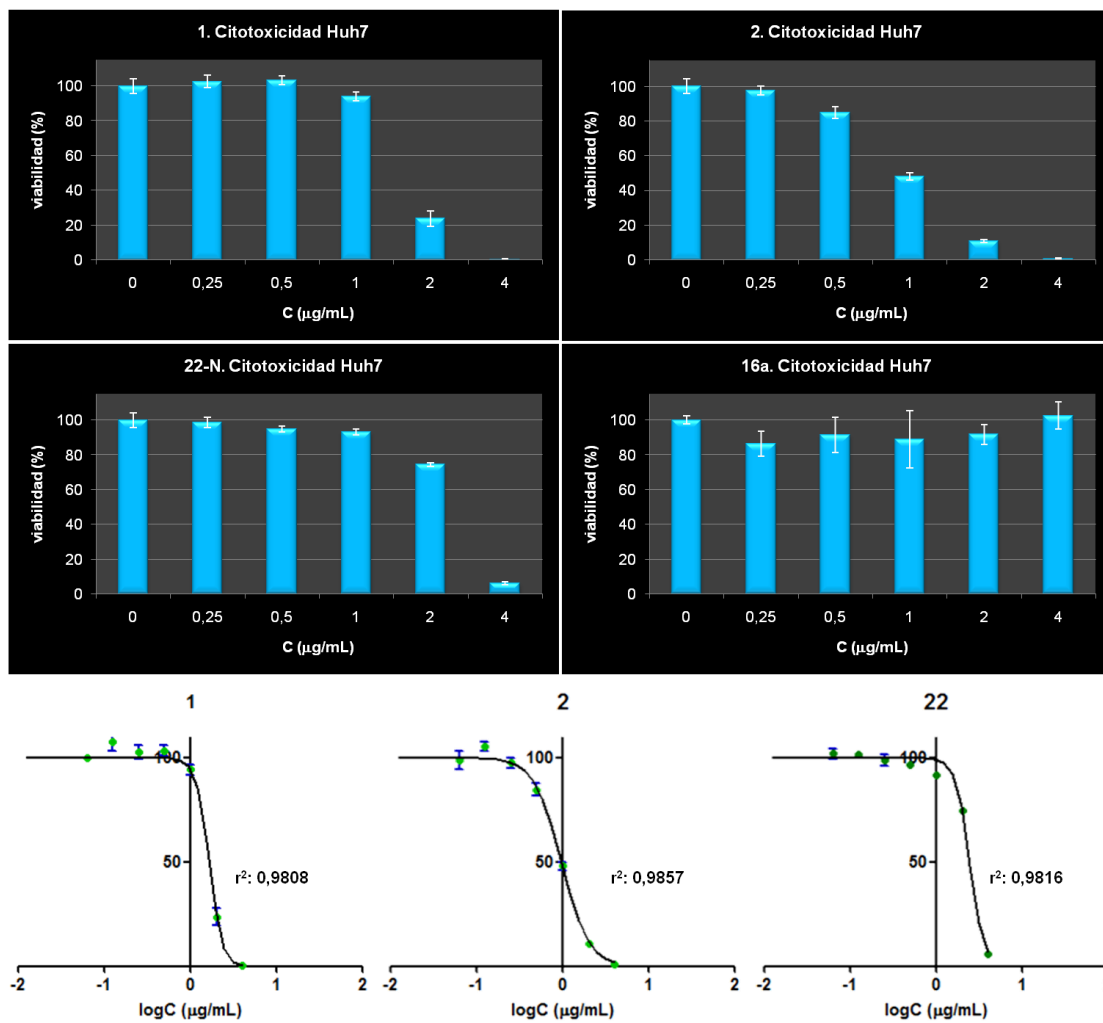


Figura 6.37

Comp.	IC ₅₀ (µM)
1	12,94
2	4,68
22	8,85
Cisplatino ¹³⁷	3,09
DOXO ¹³⁷	0,24

Tabla 6.4

Al momento de la preparación de este manuscrito un último ejemplo de compuestos bioactivos a partir de **1** fue publicado por parte del grupo de Witczak.¹³⁸ En estos trabajos se informó el efecto citotóxico de derivados de levoglucosenona sobre ciertos tipos de células tumorales (compuestos **25** a **28**; Figura 6.38). De manera muy sorprendente el compuesto **27** es muy parecido a los derivados con sustitución aromática en carbono 4 que se sintetizaron en este trabajo. En este caso además, sí se puede apreciar que características presentes en levoglucosenona fueron determinantes de la actividad descrita. Un hecho importante remarcado en el mismo fue que la muerte celular causada por los compuestos se debió a la inducción de un proceso de apoptosis; algo que se ha evidenciado en este trabajo en el estudio de microscopía para el caso de levoglucosenona y el compuesto **2**. Por último, nuestros resultados en coincidencia con aquellos publicados por el grupo de Witczak resaltan que la sustitución del doble enlace de levoglucosenona es un paso importante en la obtención de compuestos con una muy interesante actividad citotóxica frente a células inmortales.

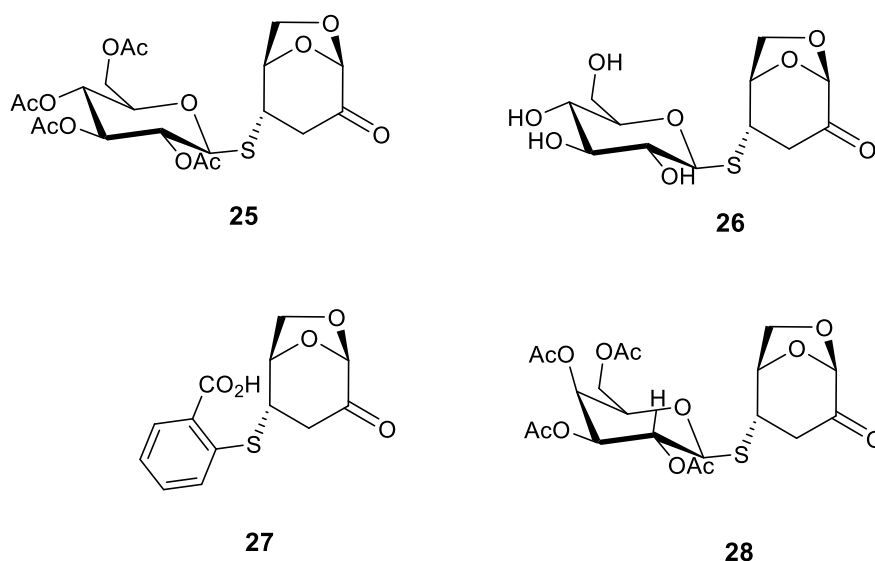


Figura 6.38

6.6.8. Análisis de los resultados obtenidos

Desde la detección de la actividad en los bioaceites provenientes de la pirólisis de cáscara de soja y el aislamiento de levoglucosenona como responsable del efecto observado se han obtenido una serie de resultados diferentes. Una pregunta que uno podría hacerse es si todos estos efectos están relacionados de alguna manera o son producidos de forma independiente. El grupo de Witczak mencionó en su trabajo que

dada la naturaleza glucídica de los compuestos evaluados una explicación posible de esta actividad es que se esté inhibiendo alguna enzima de la ruta glucolítica o del metabolismo de azúcares en general.¹³⁸

Por otro lado, un análisis de las secuencias proteicas de PhoP y PhoQ revela que la segunda posee un sitio de hidrólisis de ATP y autofosforilación que está muy conservado evolutivamente, conocido como dominio GHKL.¹¹⁷ Este último está presente en proteínas como las topoisomerasas de tipo II y la chaperona Hsp90 humana¹³⁹. Es sabido que estas proteínas son blancos para la terapia del cáncer¹⁴⁰ y hace pensar si es posible que los compuestos activos inhiban a miembros de esta familia de proteínas que hidrolizan ATP. Como ejemplo, se ha demostrado que el compuesto radicicol (un inhibidor conocido de la Hsp90 humana) se une a la proteína PhoQ de *Salmonella Typhimurium* e inhibe su actividad de hidrólisis de ATP.¹⁴¹

Si bien es cierto que la evidencia es aún incipiente y todavía no es correcto hacer mayores comentarios, el estudio del efecto sobre la represión de la expresión del gen *virK* podría ser un punto de partida para intentar identificar el mecanismo de acción de los compuestos dado que la inhibición de la hidrólisis de ATP de miembros de la superfamilia de ATPasas/quinasas GHKL podría ser una explicación interesante de los efectos observados en este trabajo.

Para finalizar, estos resultados muestran que el *core* presente en levoglucosenona es importante en establecer una actividad biológica determinada. Además, la estructura de estos compuestos es novedosa en cuanto a su actividad biológica dado que al escribir este manuscrito no había ejemplos en la literatura de compuestos similares. En tercer lugar, las actividades sobre células tumorales han sido muy buenas y comparables a antitumorales comerciales. Por último, todo esto permite ampliar el potencial sintético de esta molécula y alienta a seguir trabajando en pos de mejorar las actividades, evaluar selectividad y develar el mecanismo de acción.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

El progreso de la humanidad desde la revolución industrial hasta nuestros días es innegable. Sin embargo, tal desarrollo ha dejado consecuencias también evidentes. Los altos niveles de consumo sumado a los estándares de vida elevados en ciertos países desarrollados provocan la generación de enormes cantidades de desechos que impactan negativamente en el ambiente. La situación es más crítica si se tiene en cuenta que la economía mundial y el desarrollo socio-económico se basan mayoritariamente en un sólo producto: el petróleo. Con el correr del tiempo la demanda energética mundial ha ido en aumento de la mano de un incremento en el consumo de petróleo como combustible. Esto, sumado a la pérdida de vastos territorios de bosques nativos en todo el mundo, ha provocado un incremento de los niveles de CO₂ y otros gases de efecto invernadero. Se estima que desde principios del siglo XIX hasta la actualidad los niveles de CO₂ en el aire aumentaron un 40%, mientras que en millones de años anteriores a este período los niveles de este gas se mantuvieron prácticamente estables. Este cambio brusco en las condiciones ambientales provoca la alteración del delicado equilibrio de los ecosistemas, afectando la vida dentro de ellos. Adicionalmente, el calentamiento global y las alteraciones climáticas derivadas del mismo que han sido observadas en estas últimas décadas se presume que tienen su origen en los niveles cada vez más altos de CO₂.

Este panorama no ha pasado desapercibido en la comunidad científica y en la política internacional. Por ello, se ha tomado conciencia de que tiene que haber un cambio de paradigma en lo que se refiere al equilibrio entre el progreso de nuestra especie y el consumo de los recursos naturales y la alteración del medioambiente, siendo altamente desfavorable esto último. Las ideas de sustentabilidad han ido ganando terreno como forma de hacer frente a esta problemática. Como se definió en la introducción, el desarrollo sustentable pretende “satisfacer las necesidades de las generaciones presentes sin comprometer las posibilidades de las futuras generaciones”. Si uno presta atención a la definición, el término encierra las ideas de preservar y asegurar la supervivencia de nuestra especie. Sin embargo, es absurdo pensar en lograr este objetivo sin hacer un uso eficiente y racional de los recursos presentes en la naturaleza.

Una forma de contribuir con las nociones de sustentabilidad es idear maneras de reciclar o reutilizar las enormes cantidades de desechos y/o subproductos industriales generadas año a año, lo que llevaría a disminuir la polución ambiental; y además, permitiría convertir un desecho o subproducto en un recurso de valor haciendo más parejo el equilibrio progreso-cuidado ambiental. En esta dirección es que se intentaron dirigir los capítulos del presente trabajo de tesis. Los resultados obtenidos permiten elaborar algunas conclusiones que se detallan en los párrafos siguientes.

La pirólisis de celulosa en determinadas condiciones permite obtener levoglucosenona, un compuesto muy empleado en síntesis asimétrica. En este sentido, en el capítulo IV se sintetizó un derivado sustituido en carbono 4 (**3**) que permitió reducir los tiempos de reacción y alterar las regioselectividades en reacciones de Diels-Alder con dienos estructuralmente diversos cuando se lo compara a **1**.

Los siguientes dos capítulos se dedicaron a la potencialidad de reutilizar desechos provenientes de la industria. En el capítulo V se estudió el comportamiento pirólítico de cáscara y harina de soja (dos subproductos derivados de la actividad agroindustrial) en condiciones de pirólisis a baja temperatura. Se demostró que tanto la temperatura como el tratamiento ácido del material previo a la reacción de pirólisis son variables claves del proceso. La primera influyó sobre el rendimiento de los bioaceites provenientes del tratamiento térmico de ambas materias primas mientras que la segunda permitió evidenciar cambios apreciables a simple vista en los espectros de RMN ¹H de bioaceites de cáscara, indicando que influye en modificar la composición química de los mismos en este material. Con relación a esto último, se pudo obtener levoglucosenona en crudos de pirólisis de cáscara de soja pre-tratada con ácido. La cantidad de **1** se pudo demostrar que fue mayor en aquellas muestras que fueron tratadas con una baja concentración de ácido. Un tratamiento ácido más fuerte generó una mayor proporción de subproductos de la pirólisis de celulosa como ácido levulínico y furfuraldehído.

Por último, en el capítulo VI se testearon algunos de los bioaceites obtenidos con el objetivo de encontrar compuestos con actividad biológica en un intento por ampliar el uso y agregar valor a las materias primas empleadas. Los crudos de pirólisis mostraron una interesante actividad antioxidante siendo bastante mayor para el caso de cáscara de soja que para harina. Se demostró que fue la pirólisis la que generó la actividad dado que los extractos con solventes no evidenciaron compuesto activo alguno. El pre-tratamiento ácido provocó una disminución de la actividad evaluada. Además, el ensayo autográfico permitió observar un patrón de compuestos activos diferente entre muestras de cáscara, lo que indica que el ácido generó una diversidad molecular diferente entre las distintas muestras lo que condujo a distintos compuestos

activos, en concordancia con lo expuesto en el capítulo V. Por otro lado, los bioaceites de cáscara pre-tratada con ácido dieron positivo el ensayo para detectar compuestos activos frente al patógeno entérico *Salmonella* Typhimurium. La aplicación de fraccionamiento bioguiado resultó ser una herramienta esencial para poder aislar el compuesto responsable de lo observado. Sorpresivamente, la actividad se debió a levoglucosenona, y el hecho de que el halo de inhibición fuera mayor en el caso de la muestra tratada con H₃PO₄ 1% se corresponde con la mayor proporción de levoglucosenona en esta muestra como se destacó en el capítulo V. Se estudió el efecto sobre el crecimiento de la bacteria y se encontró un efecto bactericida de moderado a bajo (CIM en el rango de mM). Sin embargo, a bajas concentraciones se pudo detectar un efecto de represión de la expresión del gen virK el cual se halla bajo el control del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ regulador de la virulencia del patógeno. El hecho de que **1** fuera el compuesto activo permitió obtener derivados del mismo como el compuesto bromado **2** y los tioderivados **18**, **19** y **22-N** con sustitución aromática en el carbono 4 que también fueron activos y que en algunos casos mejoraron notoriamente la actividad (compuestos **2** y **22-N**). Adicionalmente, los compuestos mostraron una prometedora actividad antitumoral cuando se los utilizaron frente a células de carcinoma hepático humano. Los IC₅₀ fueron comparables a aquellos de antitumorales comerciales, lo que los hace atractivos como potenciales drogas anticancerígenas. Este último resultado junto con la represión de la expresión del gen virK permiten proponer continuar con los experimentos comenzados en *Salmonella* para determinar si es posible que los compuestos inhiban enzimas que hidrolizan ATP como por ejemplo las Topoisomerasas de tipo II y la Hsp90, proteínas ampliamente validadas como blancos quimioterápicos. Los compuestos activos presentan una estructura novedosa en cuanto a su actividad dado que durante la elaboración de este trabajo no se hallaron antecedentes similares de derivados de levoglucosenona con alguna actividad biológica que pueda ser atribuida a su estructura. Esto permite vislumbrar un nuevo horizonte en el desarrollo de la química de este particular sintón quiral permitiendo la síntesis de compuestos bioactivos con características originales y únicas. Además, dado que **1** se pudo aislar de crudos de pirólisis de cáscara de soja destaca que es posible reutilizar este material de escaso valor comercial y generado por toneladas en nuestro país con la finalidad de obtener compuestos con actividades biológicas relevantes, incrementando su valor e introduciéndolo en la cadena productiva al mismo tiempo que se recicla. Finalmente, dado que la cáscara de soja es componente de la biomasa, este trabajo permite demostrar que es posible reemplazar al menos en parte compuestos provenientes de

la industria petroquímica por aquellos derivados de biomasa cumpliendo de este modo con las directrices de un desarrollo sustentable.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS

- 1- <http://www.acs.org/content/acs/en/careers/profdev/ethics/the-chemical-professionals-code-of-conduct.html>.
- 2- World Commission on Environment and Development, "Our Common Future", Oxford University Press, Oxford, **1987**.
- 3- a) Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, "Declaración de Río sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo", Río de Janeiro, **1992**. <http://www.un.org/spanish/esa/sustdev/agenda21/riodeclaration.htm>. b) Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, "Programa 21", Río de Janeiro, **1992**. <http://www.un.org/spanish/esa/sustdev/agenda21/>.
- 4- Anastas, P. T.; Warner, J. C. "Green Chemistry: Theory and Practice". Oxford University Press Inc., Nueva York, 1998.
- 5- Klass, D. L. "Biomass for renewable energy, fuels and chemicals". Academic Press, Nueva York, **1998**.
- 6- Corma, A.; Iborra, S.; Velty, A. "Chemical Routes for the Transformation of Biomass into Chemicals". *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 2411-2502.
- 7- Huber, G. W.; Iborra, S.; Corma, A. "Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts, and Engineering". *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 4044-4098.
- 8- Spanevello, R. A.; Suárez, A. G. "Química verde en latinoamérica: Conversión de papel de desecho en productos de alto valor agregado". Eds. Tundo, P.; Hoyos de Rossi, R. Green Chemistry Series N° 11. IUPAC: Córdoba, **2004**, 204-217.
- 9- Eliel, E. L. "Topics in Stereochemistry", Wiley & Sons Inc., Nueva York, **1969**.
- 10- a) Davies, N. M.; Teng, X. W. "Importance of Chirality in Drug Therapy and Pharmacy Practice: Implications for Psychiatry". *Advances in Pharmacy*, **2003**, *1*,

- 242-252. b) Bonner, W. A. "Chirality and life". *Orig. Life Evol. Biosph.*, **1995**, 25, 175-190.
- 11- Patocka, J.; Dovorák, A. "Biomedical aspects of chiral molecules". *J. Appl. Biomed.*, **2004**, 2, 95-100.
- 12- Brenna, E.; Fuganti, C.; Serra, S. "Enantioselective perception of chiral odorants". *Tetrahedron: Asymm.*, **2003**, 14, 1-42.
- 13- Juaristi, E. "Introducción a la estereoquímica y al análisis conformacional". El Colegio Nacional, México, D. F. **2007**.
- 14- Nguyen, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. "Chiral drugs. An overview". *Int. J. Biomed. Sci.*, **2006**, 2, 85-100.
- 15- Campo, V. L.; Bernardes, L. S. C.; Carvalho, I. "Stereoselectivity in Drug Metabolism: Molecular Mechanisms and Analytical Methods". *Curr. Drug Metab.*, **2009**, 10, 188-205.
- 16- a) Caner, H.; Groner, E.; Levy, L. "Trends in the development of chiral drugs". *DDT*, **2004**, 9, 105-107. b) Agranat, I.; Caner, H.; Caldwell, J. "Putting chirality to work: the strategy of chiral switches". *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2002**, 1, 753-768.
- 17- Kotha, S. "Opportunities in Asymmetric Synthesis: An Industrial Prospect". *Tetrahedron*, **1994**, 50, 3639-3662.
- 18- Anastas, P. T.; Williamson, T. C. "Green chemistry. Frontiers in benign chemical syntheses and processes". Oxford University Press: Oxford, **1998**.
- 19- Fitz, R.; Seebach, D. "Enantiomer Separation of (*R,S*)-2-(*tert*-Butyl)-3-methyl-4-imidazolidinone, Chiral Building Block for Amino Acid Synthesis". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1986**, 25, 345-346.
- 20- a) Martín-Matute, B.; Bäckvall, J.-E. "Dynamic kinetic resolution catalyzed by enzymes and metals". *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2007**, 11, 226-232. b) Ward, R. S. "Dynamic kinetic resolution". *Tetrahedron: Asymm.*, **1995**, 6, 1475-1490.
- 21- Klar, U.; Röhr, B.; Kuczynski, F.; Schwede, W.; Berger, M.; Skuballa, W.; Buchmann, B. "Efficient chiral pool synthesis of the C1-C6 fragment of opothilones". *Synthesis*, **2005**, 301-305.

- 22- Testero, S. A.; Spanevello, R. A. "Enantiospecific approach toward pentalenolactone". *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 3793-3796.
- 23- Lin, G. Q.; Li, Y. M.; Chan, A. S. C. "Principles and applications of asymmetric synthesis". John Wiley & Sons. Nueva York, **2001**.
- 24- Ocejo, M.; Carrillo, L.; Badía, D.; Vicario, J. L.; Fernández, N.; Reyes, E. "Highly Regio- and Stereoselective Addition of Organolithium Reagents to Extended Conjugate Amides Using (S,S)-(+)-Pseudoephedrine as Chiral Auxiliary". *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 4404-4407.
- 25- Brown, H. C.; Jadhav, P. K. "Asymmetric carbon-carbon bond formation via *B*-allyldiisopinocampheylborane. Simple synthesis of secondary homoallylic alcohols with excellent enantiomeric purities". *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 2092-2093.
- 26- Noyori, R. "Asymmetric catalysis in organic synthesis". John Wiley & Sons. Nueva York, **1994**.
- 27- Akerholm, M.; Hinterstoisser, B.; Salem, L. "Characterization of the crystalline structure of cellulose using static and dynamic FT-IR spectroscopy". *Carbohydr. Res.*, **2004**, *339*, 569-578.
- 28- Yang, H.; Yan, R.; Chen, H.; Lee, D. H.; Zheng, C. "Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis". *Fuel*, **2007**, *86*, 1781-1788.
- 29- Witczak, Z. J. "Levoglucosenone and Levoglucosans, Chemistry and Applications". ATL Press, Inc. Science Publishers, **1994**, 3-16 y referencias allí citadas.
- 30- Tsuchiya, Y.; Sumi, K. "Thermal decomposition products of cellulose". *J. Appl. Polym. Sci.*, **1970**, *14*, 2003-2013.
- 31- Wodley, F. A. "Pyrolysis products of untreated and flame retardant-treated α -cellulose and levoglucosan". *J. Appl. Polym. Sci.*, **1971**, *15*, 835-851.
- 32- Halpern, J.; Riffer, R.; Broido, A. "Levoglucosenone (1,6-anhydro-3,4- Δ^3 - β -D-Pyranosen-2-one). A major product of the acid-catalyzed pyrolysis of cellulose and related carbohydrates". *J. Org. Chem.*, **1973**, *38*, 204-209.
- 33- Shafizadeh, F.; Fu, Y. L. "Pyrolysis of cellulose". *Carbohydr. Res.*, **1973**, *29*, 113-122.

- 34- Shafizadeh, F.; Chin, P. P. S. "Preparation of 1,6-anhydro-3,4-dideoxy- β -glycero-hex-3-enopyranos-2-ulose (levoglucosenone) and some derivatives thereof". *Carbohydr. Res.*, **1977**, *58*, 79-87.
- 35- Shafizadeh, F.; Furneaux, R. H.; Stevenson, T. T. "Some reactions of levoglucosenone". *Carbohydr. Res.*, **1979**, *71*, 169-191.
- 36- Shafizadeh, F.; Chin, P. P. S. "Pyrolytic production and decomposition of 1,6-anhydro-3,4-dideoxy- β -D-glycero-hex-3-enopyranos-2-ulose". *Carbohydr. Res.*, **1976**, *46*, 149-154.
- 37- Bahté, P.; Horton, D. "Stereoselective synthesis of functionalized carbocycles by cycloaddition to levoglucosenone". *Carbohydr. Res.*, **1983**, *122*, 189-199.
- 38- a) Martínez Palau R. "Química en microondas". CEM Publishing, Mattheus, NC. **2006**, Capítulo 3. b) Hayes, B. L. "Microwave synthesis. Chemistry at the speed of light". CEM Publishing, Mattheus, NC. **2002**, Capítulo 4.
- 39- a) Kappe, C. O. "Microwave dielectric heating in synthetic organic chemistry". *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 1127-1139. b) Kappe, C. O. "The Use of Microwave Irradiation in Organic Synthesis. From Laboratory Curiosity to Standard Practice in Twenty Years". *CHIMIA*, **2006**, *60*, 308-312. c) Kappe, C. O. "Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 6250-6284.
- 40- a) Sarotti, A. M.; Spanevello, R. A.; Suárez, A. G. "An efficient microwave-assisted green transformation of cellulose into levoglucosenone. Advantages of the use of an experimental design approach". *Green Chem.*, **2007**, *9*, 1137-1140. b) Suárez, A. G.; Spanevello, R. A.; Sarotti, A. M. "Procedimiento para la obtención de levoglucosenona mediante pirólisis asistida por microondas". Argentina INPI Acta: P 080102939, Fecha: 08/07/2008.
- 41- Shibagaki, M.; Takahashi, K.; Kuno, H.; Honda, I.; Matsushita, H. "Synthesis of levoglucosenone". *Chem. Lett.*, **1990**, 307-310.
- 42- Takeuchi, M.; Taniguchi, T.; Ogasawara, K. "Back to the sugars: A new enantio and diastereocontrolled route to hexoses from furfural". *Synthesis*, **1999**, 341-358.

- 43- Sarotti, A. M.; Zanardi, M. M.; Spanevello, R. A.; Suárez, A. G. "Recent Applications of Levoglucosenone as Chiral Synthons". *Curr. Org. Synth.*, **2012**, *9*, 439-459.
- 44- Cardona, F.; Lalli, D.; Faggi, C.; Goti, A.; Brandi, A. "Quasienantiomeric levoglucosenone and isolevoglucosenone allow the parallel kinetic resolution of a racemic nitron". *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 1999-2002.
- 45- Urabe, D.; Nishikawa, T.; Isobe, M. "An efficient total synthesis of optically active tetrodotoxin from levoglucosenone". *Chem. Asian J.*, **2006**, *1*, 125-135.
- 46- Okano, K.; Ebata, T.; Koseki, K.; Kawakami, H.; Matsumoto, K.; Matsushita, H. "Formal synthesis of (+)-grandisol from levoglucosenone". *Chem. Pharm. Bull.*, **1993**, *41*, 861-865.
- 47- Müller, C.; Gómez-Zurita Frau, M. A.; Ballinari, D.; Colombo, S.; Bitto, A.; Martegani, E.; Airoidi, C.; van Neuren, A.S.; Stein, M.; Weiser, J.; Battistini, C.; Peri, F. "Design, synthesis, and biological evaluation of levoglucosenone derived ras activation inhibitors". *Chem. Med. Chem.*, **2009**, *4*, 524-528.
- 48- Giordano, E. D. V.; Frinchaboy, A.; Suárez, A. G.; Spanevello, R. A. "Synthesis of Tri-*O*-acetyl-D-allal from Levoglucosenone". *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 4602-4605.
- 49- Giordano, E. D. V.; Corne, V.; Botta, M. C.; Giri, G. F.; Llompert, D. F.; Sarotti, A. M.; Spanevello, R. A.; Suárez, A. G. "Actas del Segundo Taller Argentino de Ciencias Ambientales: Nuevas tendencias en el aprovechamiento de biomasa". Ed. Sala, L. F. Editorial Zeus. Rosario, **2013**, 296-305.
- 50- a) Lait, S. M.; Rankic, D. A.; Keay, B. A. "1,3-Aminoalcohols and Their Derivatives in Asymmetric Organic Synthesis". *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 767-796.
b) Juaristi, E.; Anaya de Parrodi, C. "Chiral 1,2-Amino Alcohols and 1,2-Diamines from Cyclohexene Oxide: Recent Applications in Asymmetric Synthesis". *Synlett*, **2006**, *17*, 2699-2715.
- 51- Corne, V.; Botta, M. C.; Giordano, E. D. V.; Giri, G. F.; Llompert, D. F.; Biava, H. D.; Sarotti, A. M.; Mangione, M. I.; Mata, E. G.; Suárez, A. G.; Spanevello, R. A. "Cellulose recycling as a source of raw chirality". *Pure Appl. Chem.*, **2013**, *85*, 1683-1692.
- 52- List, B. "Organocatalysis". *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 5413-5415.

- 53- Sarotti, A. M.; Spanevello, R. A.; Suárez, A. G.; Echeverría, G. A.; Piro, O. E. "1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions of Azomethine Ylides with a Cellulose-Derived Chiral Enone. A Novel Route for Organocatalysts Development". *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 2556-2559.
- 54- a) Sarotti, M. A.; Spanevello, R. A.; Suárez, A. G. "A chiral auxiliary derived from levoglucosenone in asymmetric Diels-Alder transformations". *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 6987-6990. b) Sarotti, M. A.; Spanevello, R. A.; Suárez, A. G. "A novel design of a levoglucosenone derived chiral auxiliary". *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 8203-8206.
- 55- Sarotti, A. M.; Spanevello, R. A.; Suárez, A. G. "Second generation levoglucosenone-derived chiral auxiliaries. Scope and application in asymmetric Diels-Alder reactions". *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 3502-3508.
- 56- Sarotti, A. M.; Fernández, I.; Spanevello, R. A.; Sierra, M. A.; Suárez, A. G. " π -Stacking Effect on Levoglucosenone Derived Internal Chiral Auxiliaries. A Case of Complete Enantioselectivity Inversion on the Diels-Alder Reaction". *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 3389-3392.
- 57- Sarotti, A. M.; Spanevello, R. A.; Duhayon, C.; Tuchagues, J. P.; Suárez, A. G. "Exploring structural effects of levoglucosenone derived chiral auxiliaries in asymmetric Diels-Alder cycloadditions". *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 241-251.
- 58- Sarotti, M. A.; Spanevello, R. A.; Suárez, A. G. "Highly diastereoselective Diels-Alder reaction using a chiral auxiliary derived from levoglucosenone". *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 1487-1490.
- 59- a) Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J. "Impact of natural products on developing new anti-cancer agents". *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 3012-3043. b) <http://www.nlm.nih.gov/hmd/index.html>
- 60- Breinbauer, R.; Vetter, I. R.; Waldmann, H. "From protein domains to drug candidates-natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2002**, *41*, 2879-2890.
- 61- Endo, A. "The origin of the statins". *Int. Congr. Ser.*, **2004**, *1262*, 3-8.
- 62- Rouhi, A. M. "Rediscovering natural products". *Chem. Eng. News*, **2003**, *82*, 77-91.

- 63- Newman, D. J.; Cragg, G. M. "Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010". *J. Nat. Prod.*, **2012**, *75*, 311-335.
- 64- Szychowski, J.; Truchon, J-F.; Bennani, Y. L. "Natural Products in Medicine: Transformational Outcome of Synthetic Chemistry". *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, 9292-9308.
- 65- a) Lachance, H.; Wetzel, S.; Kumar, K.; Waldmann, H. "Charting, Navigating, and Populating Natural Product Chemical Space for Drug Discovery". *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 5989-6001. b) Feher, M.; Schmidt, J. M. "Property distributions: Differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry". *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, **2003**, *43*, 218-227.
- 66- Böhm, H. J.; Klebe, G.; Kubinyi, H. *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp. 153. **1996**
- 67- a) van Hattum, H.; Waldmann, H. "Biology-Oriented Synthesis: Harnessing the Power of Evolution". *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 11853-11859. b) Kaiser, M.; Wetzel, S.; Kumar, K.; Waldmann, H. "Biology-inspired synthesis of compound libraries". *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**, *65*, 1186-1201. c) Koch, M. A.; Schuffenhauer, A.; Scheck, M.; Wetzel, S.; Casaulta, M.; Odermatt, A.; Ertl, P.; Waldmann, H. "Charting biologically relevant chemical space: A structural classification of natural products (SCONP)". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 17272-17277.
- 68- Harvey, A. "Natural products as a screening resource". *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2007**, *11*, 480-484.
- 69- Zhang, W.; Tang, Y. "Combinatorial Biosynthesis of Natural Products". *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 2629-2633.
- 70- Walsh, C. T.; Fischbach, M. A. "Natural Products Version 2.0: Connecting Genes to Molecules". *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 2469-2493.
- 71- Williams, R. B.; Henrikson, J. C.; Hoover, A. R.; Lee, A. E.; Cichewicz, R. H. "Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome". *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 1895-1897.
- 72- López, S. N.; Ramallo, I. A.; González Sierra, M.; Zacchino, S. A.; Furlán, R. L. E. "Chemically engineered extracts as an alternative source of bioactive natural product-like". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 441-444.

- 73- Mohan, D.; Shi, J.; Nicholas, D. D.; Pittman Jr., C. U.; Steele, P. H.; Cooper, J. E. "Fungicidal values of bio-oils and their lignin-rich fractions obtained from wood/bark fast pyrolysis". *Chemosphere*, **2008**, 456-465.
- 74- Booker, C. J.; Bedmutha, R.; Vogel, T.; Gloor, A.; Xu, R.; Ferrante, L.; Yeung, K.K.-C.; Scott, I.M.; Cohn, K.L.; Berruti, F.; Briens, C. "Experimental Investigations into the Insecticidal, Fungicidal, and Bactericidal Properties of Pyrolysis Bio-oil from Tobacco Leaves Using a Fluidized Bed Pilot Plant". *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2010**, 49, 10074-10079.
- 75- a) Kim, S. H.; Yang, J. Y.; Kang, M. Y.; Park, J. C.; Nam, S. H.; Friedman, M. "Composition of liquid rice hull smoke and anti-inflammatory effects in mice". *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, 59, 4570-4581. b) Yang, J. Y.; Kang, M. Y.; Nam, S. H.; Friedman, M. "Antidiabetic effects of rice hull smoke extract in alloxan-induced diabetic mice". *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, 60, 87-94. c) Yang, J. Y.; Moon, E.; Nam, S. H.; Friedman, M. "Antidiabetic effects of rice hull smoke extract on glucose-regulating mechanism in type 2 diabetic mice". *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, 60, 7442-7449. d) Kim, S. H.; Kang, M. Y.; Park, J. C.; Nam, S. H.; Friedman, M. "Rice hull smoke extract inactivates *Salmonella* Typhimurium in laboratory media and protects infected mice against mortality". *J. Food Sci.* **2012**, 71, 80-85. e) Friedman, M. "Rice brans, rice bran oils, and rice hulls: composition, food and industrial uses, and bioactivities in humans, animals, and cells". *J. Agric. Food Chem.*, **2013**, 61, 10626-10641.
- 76- a) Marston, A. "Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry". *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, 2676-2683. b) Choma, I. M.; Grzelak, E. M. "Bioautography detection in thin-layer chromatography". *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, 2684-2691.
- 77- a) Lillelund, V. H.; Jensen, H. H.; Liang, X.; Bols, M. "Recent developments of transition-state analogue glycosidase inhibitors of non-natural product origin". *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 515-553. b) Wagman, A. S.; Nuss, J. M. "Current therapies and emerging targets for the treatment of diabetes". *Curr. Pharm. Design.*, **2001**, 7, 417-450. c) Asano, N.; Kato, A.; Watson, A. A. "Therapeutic applications of sugar-mimicking glycosidase inhibitors". *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2001**, 1, 145-154. d) Wen, Y. M.; Lin, X.; MaCurrent, Z. M. "Exploiting new potential targets for anti-hepatitis B virus drugs". *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, **2003**, 3, 241-246. e) Robina, I.; Moreno-Vargas, A. J.; Carmona, A. T.;

- Vogel, P. "Glycosidase inhibitors as potential HIV entry inhibitors". *Curr. Drug Metab.*, **2004**, 5, 329-361.
- 78- Salazar, M. O.; Furlán, R. L. E. "A Rapid TLC autographic method for the detection of glucosidase inhibitors". *Phytochem. Anal.*, **2007**, 18, 209-212.
- 79- Perry, E. K. "The cholinergic hypothesis-ten years on". *Brit. Med. Bull.*, **1986**, 42, 63-69.
- 80- a) Rhee, I. K.; Van de Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. "Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining". *J. Chromatogr. A.*, **2001**, 915, 217-223. b) Rhee, I. K.; Van de Meent, M.; Verpoorte, R. "Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography". *Phytochem. Anal.*, **2003**, 14, 127-131.
- 81- Ellman, G. L.; Courtney, D.; Andies, V.; Featherstone, R. M. *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, 7, 88-95.
- 82- Marston, A.; Kissling, J.; Hostettmann, K. "A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants". *Phytochem. Anal.*, **2002**, 13, 51-54.
- 83- Van Asperen, K. "A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method". *J. Insect Physiol.*, **1962**, 8, 401-416.
- 84- a) Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J. P.; Cimanga, K.; Van Poel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J.; Berghe, D. V. "Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and peroxide scavengers". *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 71-77. b) Olson, J. S.; Ballou, D. P.; Palmer, G.; Massey, V. "The reaction of xanthine oxidase with molecular oxygen". *J. Biol. Chem.*, **1974**, 249, 4350-4362. c) Borges, F.; Fernandes, E.; Roleira, F. "Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors". *Curr. Med. Chem.*, **2002**, 9, 195-217.
- 85- Haliwell, B. "Uric acid: an example of antioxidant evaluation". Handbook of antioxidants, Cadenas, E. y Packer L. (Eds), Marcel Dekker, Inc, New York, **1996**, 243-256.
- 86- a) Houston, M.; Estevez, A.; Chumley, P.; Aslan, M.; Marklund, S.; Parks, D. A.; Freeman, B. A. "Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling". *J.*

- Biol. Chem.*, **1999**, 274, 4985-4994. b) Das, D. K.; Engelman, R. M.; Clement, R.; Otani, H.; Prasad, M. R.; Rao, P.S. "Role of xanthine oxidase inhibitor as free radical scavenger: a novel mechanism of action of allopurinol and oxypurinol in myocardial salvage". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1987**, 148, 314-319. c) Gariboldi, E.; Mascetti, D.; Galli, G.; Caballion, P.; Bosisio, E. "LCUV-electrospray-MS-MS mass spectrometry analysis of plant constituents inhibiting xanthine oxidase". *Pharm. Res.*, **1998**, 15, 936-943.
- 87- Cross, C. W.; Halliwell, B.; Borish, E. T.; Pryor, W. A.; Amen, B. N.; Saul, R. L.; McCord, J.M.; Harman, D. "Oxygen radicals and human disease". *Ann. Intern. Med.*, **1987**, 107, 526-545.
- 88- Chambers, D. E.; Parks, D. A.; Patterson, G.; Roy, R.; McCord, J. M.; Yoshida, S.; Parmley, L.F.; Downey, J.M. "Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia". *J. Mol. Cell Cardiol.*, **1985**, 17, 145-152.
- 89- Ramallo, I. A.; Zacchino, S. A; Furlán, R. L. E. "A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers". *Phytochem. Anal.*, **2006**, 17, 15-19.
- 90- a) McGinnis, B. D.; Adams, V. D.; Middlebrooks, E. J. "Evaluation of methylene blue and riboflavin for the photosensitized degradation of ethylene glycol". *Environ Int*, **1999**, 25, 953-9. b) Hyun Jung Kim, M. S. "Oxidation mechanism of riboflavin destruction and antioxidant mechanism of tocotrienols". Tesis Doctoral en Filosofía. School of the Ohio State University, **2007**, 14-15.
- 91- a) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity". *LWT-Food Sci. Technol.*, **1995**, 28, 25-30. b) Hussein, M. R.; Shahein, Y. E.; El Hakim, A. E.; Awad, H. M. "Biochemical and molecular characterization of three colored types of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)". *J. Am. Sci.*, **2010**, 6, 726-733. c) Molyneux, P. "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity". *Songklanakarín J. Sci. Technol.*, **2004**, 26, 211-219. d) Blois, M. S. "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical". *Nature*, **1958**, 181, 1199-1200.
- 92- a) Garai, P., Gnanadhas, D.P., Chakravorty, D. "*Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi as model organisms. Revealing paradigm of host-pathogen interactions". *Virulence*, **2012**, 4, 377-388. b) Fábrega, A.; Vila, J.

"*Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation". *Clin. Microb. Rev.*, **2013**, *26*, 308-341.

- 93- a) Viarengo, G.; Sciara, M. I.; Salazar, M. O.; Kieffer, P. M.; Furlán, R. L. E.; García Véscovi, E. "Unsaturated long chain free fatty acids are input signals of the *Salmonella enterica* PhoP/PhoQ regulatory system". *J. Biol. Chem.*, **2013**, *288*, 22346-22358.
- 94- García Véscovi, E.; Soncini F. C.; Groisman, E. A. "Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence". *Cell*, **1996**, *84*, 165-174.
- 95- Salazar, M. O.; Viarengo, G.; Sciara, M. I.; Kieffer, P. M.; García Véscovi, E.; Furlán, R. L. E. "A thin-layer chromatography autographic method for the detection of inhibitors of the *Salmonella* PhoP-PhoQ regulatory system". *Phytochem. Anal.*, **2014**, *25*, 155-160.
- 96- a) Perrin, D. A.; Armarengo, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals". Pergamon Press, Oxford, England. 3^o Edition. **1998**. b) Vogel, A.I. "A Text Book of Practical Organic Chemistry". Logman, Londres. 4^o Edición. **1978**.
- 97- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Najai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian 09, Revision B.01, Gaussian, Inc., Wallingford Ct, **2009**.
- 98- a) Domingo, L.R.; Aurell, M.J.; Perez, P.; Contreras, R. "Quantitative characterization of the global electrophilicity power of common diene/dienophile pairs in Diels-Alder reactions". *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 4417-4423. b) Domingo, L.R.; Sáez, J. A. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3576.

- 99- Nishikawa, T.; Asai, M.; Ohyabu, N.; Yamamoto, N.; Fukuda, Y.; Isobe, M. "Synthesis of a common key intermediate for (-)-Tetrodotoxin and its analogs". *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 3875-3883.
- 100- Ward, D.; Shafizadeh, F. "Bromination of levoglucosenone". *Carbohydr. Res.*, **1981**, *93*, 284-287.
- 101- a) Mangione, M. I.; Suárez, A. G.; Spanevello, R. A. "Synthesis of methyl 4,6-O-benzylidene-2,3-dideoxy-2-C-formyl- α -D-erythro-hex-2-enopyranoside". *Carbohydr. Res.*, **2005**, *340*, 149-153. b) Utsugi, M.; Kamada, Y.; Miyamoto, H.; Nakada, M. "Construction of the taxane skeleton via the stereoselective conjugate addition of cyanide and the intramolecular B-alkyl Suzuki-Miyaura coupling reaction". *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 6868-6872.
- 102- Sarotti, A. M.; Spanevello, R. A.; Suárez, A. G. "Assessing the halogen effect in Diels-Alder reactions involving chiral α -halo enones. A combined experimental and DFT computational approach". *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 4145-4148.
- 103- Ramallo, I.A. **2009**. "Reciclado de extractos naturales por modificación de los grupos carbonilo". Tesis Doctoral en Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.
- 104- Yang, Z., Zhang, X., Duan, D., Song, Z., Yang, M., Li, S. "Modified TLC bioautographic method for screening acetylcholinesterase inhibitors from plant extracts". *J. Sep. Sci.*, **2009**, *32*, 3257-3259.
- 105- Aguirre, A.; Cabeza, M. L.; Spinelli, S. V.; McClelland, M.; García, Véscovi., E.; Soncini, F. C. "PhoP-Induced Genes within *Salmonella* Pathogenicity Island 1". *J. Bacteriol.*, **2006**, *188*, 6889-6898.
- 106- Gibson, M. M.; Ellis, E. M.; Graeme-Cook, K. A.; Higgins, C. F. "OmpR and EnvZ are pleiotropic regulatory proteins: positive regulation of the tripeptide permease (tppB) of *Salmonella typhimurium*". *Mol. Gen. Genet.*, **1987**, *207*, 120-129.
- 107- Castelli, M. E.; Fedrigo, G. V.; Clementín, A. L.; Ielmini, M. V.; Feldman, M. F.; García Véscovi, E. "Enterobacterial common antigen integrity is a checkpoint for flagellar biogenesis in *Serratia marcescens*". *J. Bacteriol.*, **2008**, *190*, 213-220.
- 108- Miller, J. H. "Experiments in molecular genetics". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, **1972**.

- 109- Mossmann, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *J. Immunol. Meth.* **1983**, 65, 55-63.
- 110- a) Zanardi, M. M.; Suárez, A. G. "Synthesis of a simple chiral auxiliary derived from levoglucosenone and its application in a Diels-Alder reaction". *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 50, 999-1002. b) A. L. Flourat, A. L.; Peru, A. A. M.; Teixeira, A. R. S.; Brunissen, F.; Allais, F. "Chemo-enzymatic synthesis of key intermediates (S)- γ -hydroxymethyl- α,β -butenolide and (S)- γ -hydroxymethyl- γ -butyrolactone via lipase-mediated Baeyer–Villiger oxidation of levoglucosenone". *Green Chem.*, **2015**, 17, 404-412.
- 111- Brimacombe, J. S.; Hunedy, F.; Mather, A. M.; Tucker, L. C. N. "Studies related to the synthesis of derivatives of 2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy-D-erythro-hexose (Purpurosamine C), a component of Gentamicine C_{1a}". *Carbohydr. Res.*, **1979**, 68, 231-238.
- 112- Trnka, T.; Cerny, M. "Synthesis with anhydro sugars. XIII. Preparation of the deoxy derivatives of the 1,6-anhydro- β -D-hexopyranoses by catalytic reduction of 1,6:2,3- and 1,6:3,4-dianhydro- β -D-hexopyranoses". *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1972**, 37, 3632-3639.
- 113- Trnka, T.; Cerny, M. "A ¹³C NMR study of 1,6:2,3- and 1,6:3,4-dianhydro- β -D-hexopyranoses and their O-acetyl and deoxy derivatives". *Carbohydr. Res.*, **1979**, 76, 39-44.
- 114- Matsumoto, K.; Ebata, T.; Koseki, K.; Okano, K.; Kawakami, H.; Matsushita, H. "A novel synthesis of 4-deoxy-D-lyxo-hexose ("4-deoxy-D-mannose") from 1,6-anhydro-3,4-dideoxy- β -D-glycero-hex-3-enopyranose-2-ulose (levoglucosenone)". *Carbohydr. Res.*, **1993**, 246, 345-352.
- 115- Krohn, K.; Gehle, D.; Flörke, U. "New Chiral Building Blocks and Branched 1,6-Anhydro Sugars from Regio- and Stereoisomeric Cerný Epoxides". *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 4557-4562.
- 116- Becker, B.; Thimm, J.; Thiem, J. "Synthesis of Functionalized Thiodisaccharides by Conjugate Addition". *J. Carbohydr. Chem.*, **1996**, 15, 1179-1181.
- 117- <http://pfam.xfam.org>.

- 118- Fringuelli, F.; Taticchi, A. "The Diels-Alder Reaction. Selected Practical Methods ". John Wiley & Sons, Inc. New York, **2002**.
- 119- Fotiadu, F.; Archavlis, A.; Buono, G. "High exoselectivity in Diels-Alder additions of α -vinylidene and α -methylene- γ -butyrolactones to cyclopentadiene". *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 4863-4866.
- 120- a) Collins, P.; Ferrier, R. "Monosaccharides". John Wiley & Sons, Inc. New York, 1995. b) Bols, M. "Carbohydrate Building Blocks". John Wiley & Sons, Inc. New York, 1996.
- 121- Giuliano, R. M. "Cycloaddition Reactions in Carbohydrate Chemistry". Ed. ACS Symposium Series 494, American Chemical Society, Washington DC, **1992**.
- 122- a) Rehnberg, N.; Sundin, A.; Magnusson, G. "Carbohydrate-Derived Chiral Furanosidic α,β -Unsaturated Aldehydes in Conjugate and Diels-Alder additions Reactions. Steric Hindrance by the Anomeric Substituent". *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 5477-5483. b) Kim, K. S.; Cho, I. H.; Joo, Y. H.; Yoo, I. Y.; Song, J. H.; Ko, J. H. "Synthesis of a Highly Substituted Cyclopentane: Completely Exo- and Face-Selective Diels-Alder Reaction". *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 4029-4032. c) Pellegrinet, S. C.; Spanevello, R. A. "Diels-Alder Reaction of Sugar-Derived Cyclic Dienophiles with Cyclopentadiene. Factors Affecting the Reactivity and Stereoselectivity". *Org. Lett.* **2000**, 2, 1073-1076.
- 123- Fariña, F.; Victory, P. "Synthesis and Diels-Alder reaction of trans-3-cyanoacrolein and its acetal". *Tetrahedron Lett.*, **1969**, 3219-3222.
- 124- a) Sarotti, A. M.; Suárez, A. G.; Spanevello, R. A. "DFT calculations induced a regiochemical outcome revision of the Diels-Alder reaction between levoglucosenone and isoprene". *Tetrahedron Lett.*, **2011**, 52, 3116-3119. b) Sarotti, A. M.; Joulié, M. M.; Spanevello, R. A.; Suárez, A. G. "Microwave-Assisted Regioselective Cycloaddition Reactions between 9-Substituted Anthracenes and Levoglucosenone". *Org. Lett.*, **2006**, 8, 5561-5564.
- 125- Converting Waste Agricultural Biomass into a Resource, Compendium of Technologies. Compiled United Nations Environmental Programme, Division of Technology, Industry and Economics **2009**. <http://www.unep.org>.
- 126- Trautmann, M.; Löwe, A.; Traa, Y. "An alternative method for the production of second-generation biofuels". *Green Chem.*, **2014**, 16, 3710-3714.

- 127- Yanik, J.; Kornmayer, C.; Saglam, M.; Yüksel, M. "Fast pyrolysis of agricultural wastes: Characterization of pyrolysis products". *Fuel Process. Technol.*, **2007**, *88*, 942-947.
- 128- a) Qu, T.; Guo, W.; Shen, L.; Xiao, J.; Zhao, K. "Experimental Study of Biomass Pyrolysis Based on Three Major Components: Hemicellulose, Cellulose, and Lignin". *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2011**, *50*, 10424-10433. b) Zhang, J.; Choi, Y.; Yoo, C.G.; Kim, T.H.; Shanks, B.H. "Cellulose-Hemicellulose and Cellulose-Lignin Interactions during Fast Pyrolysis". *ACS Sustainable. Chem Eng.*, **2015**, *3*, 293-301. c) Cao, Q.; Xie, K-C.; Bao, W-R.; Shen, S-G. "Pyrolytic behaviour of waste corn cob". *Bioresour. Technol.*, **2004**, *94*, 83-89. d) Bridgwater, A.V.; *Biomass Bioenergy*, **2012**, *38*, 68-94 y referencias allí citadas.
- 129- Yang, H.; Yan, R.; Chen, H.; Zeng, C.; Lee, D.H.; Liang, D.T. "In-Depth Investigation of Biomass Pyrolysis Based on Three Major Components: Hemicellulose, Cellulose and Lignin". *Energy Fuels*, **2006**, *20*, 388-393.
- 130- USDA (United States Department of Agriculture), World Agricultural Supply and Demand Estimates. WASDE-537 – January 12, 2015. <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/wasde/wasde-01-12-2015.pdf>.
- 131- Mielenz, J.R.; Bardsley, J.S.; Wyman, C. E. "Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value". *Bioresour. Technol.*, **2009**, *100*, 3532–3539.
- 132- Kornegay, E. T. "Feeding value and digestibility of soybean hulls for swine". *J. Anim. Sci.*, **1978**, *47*, 1272-1280.
- 133- Méndez, L.; Salazar, M. O.; Ramallo, I. A.; Furlán, R. L. E. "Brominated Extracts As Source of Bioactive Compounds". *ACS Comb. Sci.*, **2011**, *13*, 200-204.
- 134- González-Pérez, M.; Gómez-Bombarelli, R.; Arenas-Valgañón, J.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. "Connecting the Chemical and Biological Reactivity of Epoxides". *Chem. Res. Toxicol.*, **2012**, *25*, 2755-2762.
- 135- a) Xie, J-G.; Quan, J.; Li, S-B.; Zheng, Y.; Zhu, L-M. "SH-Methylation of SH-Containing Heterocycles with Dimethyl Carbonate via Phase-Transfer Catalytic Reaction". *Synth. Commun.*, **2011**, *41*, 871-878. b) Melzig, L.;

Metzger, A.; Knochel, P. "Pd- and Ni-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Functionalized Organozinc Reagents with Unsaturated Thioethers". *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 2948-2956. c) Kamat, M. N.; Nigam P. Rath, N. P.; Demchenko, A. V. "Versatile Synthesis and Mechanism of Activation of S-Benzoxazolyl Glycosides". *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 6938-6946.

- 136- a) Nishi, Y.; Miyakawa, Y.; Kato, K. "Chromosome aberrations induced by pyrolysates of carbohydrates in Chinese hamster V79 cells". *Mutat. Res.*, **1989**, *227*, 117-123. b) Miyakawa, Y.; Nishi, Y.; Kato, K.; Sato, H.; Takahashi, M.; Hayashi, Y. "Initiating activity of eight pyrolysates of carbohydrates in a two-stage mouse skin tumorigenesis model". *Carcinogenesis*, **1991**, *12*, 1169-1173.
- 137- Brito, A. F.; Abrantes, A. M.; Pinto-Costa, C.; Gomes, A. R.; Mamede, A. C.; Casalta-Lopes, J.; Gonçalves, A. C.; Sarmiento-Ribeiro, A. B.; Tralhão, J. G.; Botelho, M.F. "Hepatocellular Carcinoma and Chemotherapy: The Role of p53". *Chemotherapy*, **2012**; *58*, 381-386.
- 138- a) Witczak, Z. J.; Poplawski, T.; Czubatka, A.; Sarnik, J.; Tokarz, P.; VanWert, A. L.; Bielski, R. "A potential CARB-pharmacophore for antineoplastic activity: Part 1". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*, 1752-1757. b) Witczak, Z. J.; Sarnik, J.; Czubatka, A.; Forma, E.; Poplawski, T. "Thio-sugar motif of functional CARB-pharmacophore for antineoplastic activity. Part 2". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*, 5606-5611.
- 139- Dutta, R.; Inouye, M. "GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily". *Trends Biochem. Sci.*, **2000**, *1*, 24-28.
- 140- a) Pommier, Y. "Drugging Topoisomerases: Lessons and Challenges". *ACS Chem. Biol.*, **2013**, *8*, 82-95. b) Neckers, L. "Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents". *Trends Mol. Med.*, **2002**, *8*, S55-S61.
- 141- Guarnieri, M. T.; Zhang, L.; Shen, J.; Zhao, R. "The Hsp90 Inhibitor Radicicol Interacts with the ATP-Binding Pocket of Bacterial Sensor Kinase PhoQ". *J. Mol. Biol.*, **2008**, *329*, 83-93.