



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Estudio de las reacciones de isomerización, acilación
y eliminación de oximas de aldehídos aromáticos
catalizadas por lipasas de *Candida antarctica* (Novozyme435)**

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

Justino Aquino Santiago

Asesores:

Dr. Gerardo Valerio Alfaro

Dra. Rosa María Oliart Ros

PRESENTACIÓN

DEDICATORIAS

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología

Por el apoyo financiero que hizo posible la realización de este proyecto.

A mis asesores

RESUMEN

Aquino Santiago, Justino. Maestría en Ciencias de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Diciembre 2017. “Estudio de las reacciones de isomerización, acilación y eliminación de oximas de aldehídos aromáticos catalizadas por lipasas de *Candida antarctica* (Novozyme435)”. Asesores: Dr. Valerio Alfaro, Gerardo; Dra. Oliart Ros, Rosa María.

Las oximas son compuestos orgánicos de alto valor agregado con una amplia gama de aplicaciones: anticancerígenos, antimicrobianos, bloques de construcción en la producción de Nylon-6, antídotos para el tratamiento de intoxicaciones por compuestos organofosforados (plaguicidas, insecticidas y armas químicas).

Las oximas se obtienen a partir de aldehídos o cetonas e hidroxilamina y se convierten en diversos compuestos orgánicos. Recientemente se han desarrollado nuevos métodos para su obtención y la de sus derivados bajo los principios de la química verde (y la Biocatálisis). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue efectuar la síntesis mecanoquímica de oximas de aldehídos aromáticos y estudiar la actividad catalítica de la lipasa de *Candida antarctica* en reacciones de isomerización y acilación/eliminación de dichas oximas. Primeramente, se evaluó la síntesis mecanoquímica de oximas de aldehídos aromáticos con clorhidrato de hidroxilamina, utilizando uno de 4 materiales de soporte. Posteriormente, con las oximas de los aldehídos veratraldehído y vainillina, se estudió la isomerización ***Sin-Anti***, con y sin la enzima. Para ello se probaron 40, 50 y 60°C empleando como disolventes: acetato de etilo y metil tert-butil éter. En el tercer objetivo, se probaron las reacciones de acilación/eliminación enzimática con las oximas de 5 aldehídos aromáticos, utilizando acetato de etilo como medio de reacción y acetato de vinilo como agentes acilantes en 80°C. Todas las reacciones se siguieron mediante CCF y/o mediante GC-MS.

Los resultados indicaron que la conversión mecanoquímica es completa para los aldehídos aromáticos en oximas en 40 minutos con rendimientos del producto aislado de entre 75-90%. Para la isomerización de las oximas de veratraldehído y vainillina, no se observaron cambios mediante CCF en la proporción de los isómeros ***Sin/Anti***, en los disolventes probados. Respecto a las reacciones de acilación/eliminación, se obtuvieron los nitrilos correspondientes en presencia de la enzima con las 5 oximas probadas a las 160 horas. La estructura de los productos de todos los ensayos, se analizó mediante espectrometría de infrarrojo, espectrometría de resonancia magnética nuclear de ^1H y de ^{13}C y de Masas.

ABSTRACT

Aquino Santiago, Justino. Maestría en Ciencias de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Diciembre 2017. “Estudio de las reacciones de isomerización, acilación y eliminación de oximas de aldehídos aromáticos catalizadas por lipasas de *Candida antarctica* (Novozyme435)”. Asesores: Dr. Valerio Alfaro, Gerardo; Dra. Oliart Ros, Rosa María.

Oximes are high value-added organic compounds with a wide range of applications: anticancer, antimicrobial, building blocks in the production of Nylon-6, antidotes for the treatment of poisonings by organophosphorus compounds (pesticides, insecticides and chemical weapons).

Oximes are obtained from aldehydes or ketones and hydroxylamine and are converted into various organic compounds. Recently new methods have been developed for its production and its derivatives under the principles of green chemistry (and Biocatalysis). Therefore, the objective of the present work was to perform the mechanochemical synthesis of oximes of aromatic aldehydes and to study the catalytic activity of *Candida antarctica* lipase in isomerization and acylation/removal reactions of said oximes. Firstly, the mechanochemical synthesis of oximes of aromatic aldehydes with hydroxylamine hydrochloride was evaluated using one of 4 support materials. Subsequently, with the oximes of aldehydes veratraldehyde and vanillin, *Sin*-*Anti* isomerization was studied, with and without the enzyme. For this purpose, temperatures of 40, 50 and 60 ° C were tested in one of the solvents: ethyl acetate and methyl t-butyl ether (MTBE). In the third objective, enzymatic acylation/elimination reactions were tested with the oximes of 5 aromatic aldehydes, using ethyl acetate as the reaction medium and vinyl acetate as the acylating agent, at each of the temperatures: 30, 60 and 80°C. All reactions were followed by TLC and / or GC-MS.

The results indicated complete mechanochemical conversion of aromatic aldehydes to oximes in 40 minutes; with yields of the isolated product of between 75-90%. For the isomerization of veratraldehyde and vanillin oximes, no changes were observed by TLC in the proportion of the *Sin*/*Anti* isomers in the tested solvents. With respect to the acylation/removal reactions, the corresponding nitriles were obtained in the presence of the enzyme with the 4 oximes tested, in 180 hours at 80°C. The structure of the products of all the tests was made by Infrared spectrometry, ¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance and Mass Spectrometry.

CONTENIDO

RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
CONTENIDO	VI
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XIII
INTRODUCCIÓN	15
I. ANTECEDENTES	16
1.1 Oximas	16
1.1.1 Reacciones de las oximas.....	16
1.1.2 Isomería geométrica e interconversión <i>Sin/Anti</i>	19
1.1.3 Reacciones de las oximas en síntesis orgánica	21
1.1.4 Aplicación de las oximas	25
1.2 Métodos de la Química verde y sostenible para la obtención de oximas	28
1.2.1 Síntesis Mecanoquímica de Oximas.....	33
1.2.2 Conversión de aldehídos en nitrilos, a través de la oxima <i>In situ</i>	34
1.2.3 Conversión de oximas en nitrilos	36
1.3 Las lipasas.....	36
1.3.1 Aplicaciones de las lipasas	39
1.3.2 Mecanismo de la reacción catalizada por las lipasas	41
1.3.3 La lipasa de <i>Candida antarctica</i>	43
1.4 Síntesis enzimática de Ésteres de oxima	45
II. OBJETIVOS	50
2.1 Objetivo general	50
2.2 Objetivos específicos	50
III. MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1 Enzimas y reactivos de uso general	51
3.2 Técnicas instrumentales de uso general.....	52

3.3 Descripción de los métodos experimentales generales.....	52
3.4 Procedimiento para la síntesis mecanoquímica de oximas	54
3.4.1 Procedimiento para la extracción de las oximas.....	54
3.5 Estudio de Isomerización de las oximas <i>Sin/Anti</i> de vainillina y veratraldehído.....	55
3.6 Ensayos de acilación catalizada por lipasa CAL-B de oximas de vainillina, veratraldehído y acetofenona.....	56
3.7 Reacciones de acilación/eliminación catalizada por lipasa CAL-B de oximas de aldehídos aromáticos.....	57
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
4.1. Síntesis mecanoquímica de oximas.....	58
4.1.1. Evaluación del método de extracción en las reacciones mecanoquímicas de oximas.	59
4.1.2. Análisis de los espectros de infrarrojo de las aldoximas	61
4.2 Estudio de la Isomerización de las oximas <i>Sin/Anti</i> de vainillina y veratraldehído.....	63
4.3. Reacciones de acetilación de las oximas de veratraldehído y acetofenona con acetato de etilo como agente acetilante y disolvente de la reacción catalizadas por CAL-B a 40, 50 y 60°C.	64
4.4. Reacción de acilación/eliminación de las oximas de aldehídos aromáticos promovida por CAL-B a 80°C.....	67
4.4.1. Reacción de acilación/eliminación de la oxima de vainillina promovida por CAL-B a 80°C	68
4.4.2. Reacción de acilación/eliminación de la oxima de veratraldehído promovida por CAL-B a 80°C.....	69
4.4.3. Reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído promovida por CAL-B a 80°C.....	70
4.4.4 Reacción de acilación/eliminación de la oxima de 3-nitro benzaldehído promovida por CAL-B a 80°C.	71
4.4.5 Reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-dimetil amino benzaldehído promovida por CAL-B a 80°C.....	72
4.5. Interpretación Estructural de los resultados por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas	74
4.5.1 Cromatograma y espectro de masas del producto de la mezcla de reacción de acilación/eliminación de la oxima de vainillina catalizada por CAL-B a 80°C.....	74
4.5.2. Cromatograma y espectro de masas del producto de la mezcla de reacción de acilación/eliminación de la oxima de veratraldehído catalizada por CAL-B a 80°C.	76
4.5.3 Cromatograma y espectro de masas del producto de la mezcla de reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.	78
4.5.4 Cromatograma y espectro de masas del producto de la mezcla de reacción de acilación/eliminación de la oxima de 3-nitro benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.....	80

4.5.5 Cromatogramas y espectros de masas de los productos de las mezclas de reacción de acilación/ eliminación de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.	82
4.6. Interpretación de los resultados de los espectros de RMN de ¹ H	84
4.6.1 Interpretación de los espectros de RMN de ¹ H de 4-hidroxi-3-metoxi benzonitrilo	85
4.6.2 Interpretación de los espectros de RMN de ¹ H de 3,4-dimetoxi benzonitrilo	87
4.6.3 Interpretación de los espectros de RMN de ¹ H de 4-hidroxi benzonitrilo	89
4.6.4 Interpretación de los espectros de RMN de ¹ H de 3-nitro benzonitrilo	90
4.6.5 Interpretación de los espectros de RMN de ¹ H de 4-dimetilamino benzonitrilo	91
4.7.- Interpretación de los resultados de los espectros de Espectros de RMN de ¹³ C	93
4.7.1 Interpretación de los resultados de los espectros de Espectros de RMN de ¹³ C de 4-hidroxi-3-metoxi benzonitrilo	95
4.7.2 Interpretación de los resultados de los espectros de Espectros de RMN de ¹³ C de 3,4-dimetoxi benzonitrilo	96
4.7.3 Interpretación de los resultados de los espectros de Espectros de RMN de ¹³ C de 4-hidroxi benzonitrilo	97
4.7.4 Interpretación de los resultados de los espectros de Espectros de RMN de ¹³ C de 3-nitro benzonitrilo	97
4.7.5 Interpretación de los resultados de los espectros de Espectros de RMN de ¹³ C de 4-dimetilamino benzonitrilo	98
CONCLUSIONES	100
RECOMENDACIONES	101
BIBLIOGRAFÍA	102
APÉNDICES	108

LISTA DE TABLAS

TABLA 4.1 Rendimiento de los productos de las reacciones mecanoquímicas.....	60
TABLA 4.2 Análisis por GC-MS de las mezclas de reacción de la oxima de vainillina a 80°C	69
TABLA 4.3 Análisis por GC-MS de las mezclas de reacción de la oxima de veratraldehído a 80°C ...	70
TABLA 4.4 Análisis por GC-MS de las mezclas de reacción de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído a 80°C.....	71
TABLA 4.5 Análisis por GC-MS de las mezclas de reacción de la oxima de 3-nitro benzaldehído a 80°C.....	72
TABLA 4.6 Análisis por GC-MS de las mezclas de reacción de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído a 80°C.....	73
TABLA 4.7 Señales de ¹³ C de los nitrilos sintetizados en la literatura (δ=ppm).	95

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Estructura general de las oximas.	16
FIGURA 1.2 Reacción general para la síntesis de oxima de vainillina.	17
FIGURA 1.3 Reacciones de conversión de una oxima en otros grupos funcionales.	18
FIGURA 1.4 Isomería geométrica de la oxima de vainillina	19
FIGURA 1.5 Isomerización no catalizada de los isómeros Sin/Anti de la oxima de vainillina y reacción de acetilación (oximólisis) catalizada por lipasa del isómero Anti.	20
FIGURA 1.6 Reacciones características de las oximas	21
FIGURA 1.7 Reducción química de la oxima de ciclopentanona	22
FIGURA 1.8 Hidrólisis de las oximas	23
FIGURA 1.9 Formación de un nitrilo a partir de una reacción de eliminación de una oxima	24
FIGURA 1.10 Formación de amidas por transposición de oximas	24
FIGURA 1.11 Estructura de (a) perillaldehído y (b) perillartina	25
FIGURA 1.12 Estructuras base para la síntesis de los complejos en el estudio de actividad antimicrobiana	26
FIGURA 1.13 Inhibición y reactivación de AChE.	28
FIGURA 1.14 Síntesis Mecanoquímica de isoxazoles derivados de curcuminoides a través de una oximación mediante molienda mecánica.	34
FIGURA 1.15 Esquema de reacciones de conversión de la oxima de vainillina en vainillilamina	35
FIGURA 1.16 Deshidratación de (E)-2-Naphtaldoxima en 2-Naphtonitrilo usando $Fe(OTf)_3$ como catalizador	36
FIGURA 1.17. a) Formación del complejo acil-enzima y su ataque por diversos nucleófilos diferentes al agua, en un medio orgánico, b) Tipos de reacciones, incluida la oximólisis.	38
FIGURA 1.18 Mecanismo de la reacción de Oximólisis catalizada por lipasa (basado en Klivanov, 1989)	43
FIGURA 1.19 a) Vista lateral del sitio activo de CAL-B en el estado de transición con 2-octil hexanoato (Rotticci, 2000); b) Estructura tridimensional de la lipasa de Candida antarctica Fracción B.	44
FIGURA 1.20 Proceso general de oximólisis catalizada por CAL en disolvente orgánico (Gotor, 1992)	46
FIGURA 1.21 Proceso general de oximólisis catalizada por la lipasa P de Amano en acetato de vinilo.	47
FIGURA 1.22 Reacciones de alcóxicarbonilación regioselectiva de nucleósidos con alcóxicarbonil-O-acetoximas con la participación de PsL y CAL-B.....	48

FIGURA 1.23 Diferenciación catalizada por CAL entre grupos hidroxilo en nucleósidos	49
FIGURA 4.1. Reacción ácido-base oxima-soporte básico con formación de un par iónico	60
FIGURA 4.2 Estudio de las reacciones de Isomerización de las oximas Sin/Anti de vainillina y veratraldehído en MTBE y Acetato de etilo a 40,50 y 60°C.....	64
FIGURA 4.3 CCF de las reacciones enzimáticas de acilación a 40°C a las 120 h, (1) oxima de acetofenona, (2) oxima de veratraldehído y (3) oxima de vainillina en acetato de etilo, O=oxima, T= reacción testigo, I y II= reacciones enzimáticas.....	65
FIGURA 4.4 CCF de las reacciones enzimáticas de acilación a 50°C, (1) oxima de acetofenona; (2) oxima de veratraldehído y (3) oxima de vainillina en acetato de etilo, O=oxima, T= testigo, I y II= reacciones enzimáticas	66
FIGURA 4.5 CFF de las reacciones enzimáticas de acilación a 60°C, (1) oxima de acetofenona, (2) oxima de veratraldehído y (3) oxima de vainillina en acetato de etilo, O=oxima, T= testigo, I y II= reacciones enzimáticas.....	67
FIGURA 4.6 CCF de la reacción de acilación/eliminación de la OVa con acetato de vinilo como agente acilante [1:2] en acetato de etilo promovida por CAL-B. A= aldehído, O= reacción testigo, R= reacción enzimática.....	68
FIGURA 4.7 CCF de la reacción de Acilación/ Eliminación de la OVe con acetato de vinilo como agente acilante [1:2] en acetato de etilo promovida por CAL-B. A= aldehído, O= reacción testigo, R= reacción enzimática.....	69
FIGURA 4.8 CCF de las reacción de Acilación/ Eliminación de la O4-Hi con acetato de vinilo como agente acilante [1:2], en acetato de etilo promovida por CAL-B. A= aldehído, O= reacción testigo, R= reacción enzimática.	71
FIGURA 4.9 CCF de las reacción de Acilación/ Eliminación de la oxima de 3-Nitrobenzaldehído con acetato de vinilo como agente acilante [1:2], en acetato de etilo promovida por CAL-B. A= aldehído, O= reacción testigo, R= reacción enzimática.....	72
FIGURA 4.10 CCF de las reacción de Acilación/ Eliminación de la oxima de 4-Dimetilamino benzaldehído con acetato de vinilo como agente acilante [1:2], en acetato de etilo promovida por CAL-B. A= aldehído, O= reacción testigo, R= reacción enzimática.	73
FIGURA 4.11 Cromatograma del pico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de vainillina catalizada por CAL-B a 80°C.	75
FIGURA 4.12 Espectro de masas del pico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de vainillina catalizada por CAL-B a 80°C.....	75
FIGURA 4.13 Espectro de masas y estructura obtenidos en la biblioteca NIST por comparación con el Espectro de Masas del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de vainillina catalizada por CAL-B a 80°C. El producto es 3-hidroxi-4-metoxi benzonitrilo.....	76
FIGURA 4.14 Cromatograma del pico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de veratraldehído catalizada por CAL-B a 80°C.	77

FIGURA 4.15 Espectro de masas del pico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de veratraldehído catalizada por CAL-B a 80°C.	77
FIGURA 4.16 Espectro de masas y estructura obtenidos en la biblioteca NIST por comparación con el Espectro de Masas del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de veratraldehído catalizada por CAL-B a 80°C. El producto es 3,4-dimetoxi benzonitrilo.	78
FIGURA 4.17 Cromatograma de la mezcla de reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.	79
FIGURA 4.18 Espectro de masas del pico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.	79
FIGURA 4.19 Espectro de masas y estructura obtenidos en la biblioteca NIST por comparación con el Espectro de Masas del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C. El producto es 4-hidroxi benzonitrilo.	80
FIGURA 4.20. Cromatograma de la mezcla de reacción de acilación/eliminación de la oxima de 3-nitrobenzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.	81
FIGURA 4.21 Espectro de masas del pico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de 3-Nitrobenzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.	81
FIGURA 4.22 Espectro de masas y estructura obtenidos en la biblioteca NIST por comparación con el Espectro de Masas del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de 3-nitro benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C. El producto es 3-nitro benzonitrilo.	82
FIGURA 4.23. Cromatograma de la mezcla de reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.	83
FIGURA 4.24. Espectro de masas del pico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.	83
FIGURA 4.25. Espectro de masas y estructuras obtenidas en la biblioteca NIST por comparación con el Espectro de Masas del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C. El producto es 4-dimetilamino benzonitrilo.	83
FIGURA 4.26 Estructuras químicas de los nitrilos obtenidos a partir de las diferentes oximas empleadas con CAL-B, Novozyme 435 a 80°C. A) 4-hidroxi-3-metoxi benzonitrilo, B), 3,4-dimetoxi benzonitrilo C) 4-hidroxi benzonitrilo, D) 3-nitro benzonitrilo, E) 4-dimetilamino benzonitrilo.	85
FIGURA 4.27 Espectro de RMN- ¹ H de 4-hidroxi-3-metoxi benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de vainillina promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h. ...	87
FIGURA 4.28. Espectro de RMN- ¹ H de 3,4-dimetoxi benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de veratraldehído promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.	88
FIGURA 4.29 Espectro de RMN- ¹ H de 4-hidroxi benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.	90

FIGURA 4.30 Espectro de RMN- ¹ H de 3-nitro benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.....	91
FIGURA 4.31. Espectro de RMN- ¹ H de 4-dimetilamino benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.....	92
FIGURA 4.32 Espectro de RMN- ¹³ C de 4-hidroxi-3-metoxi benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de vainillina promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h. ...	96
FIGURA 4.33 Espectro de RMN- ¹³ C de 3,4-dimetoxi benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de veratraldehído promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.	97
FIGURA 4.34 Espectro de RMN- ¹³ C de 4-hidroxi benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.....	97
FIGURA 4.35 Espectro de RMN- ¹³ C de 3-nitro benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.....	98
FIGURA 4.36 Espectro de RMN- ¹³ C de 4-dimetilamino benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.....	99

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AcE	Acetato de Etilo
ACheE	Acetilcolinesterasa
AcV	Acetato de Vinilo
CAL-B	Lipasa de <i>Candida antartica</i> fracción B
Cbz-	Carbobenciloxi
CCF	Cromatografía de Capa Fina
CG-EM	Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas
eV	Electronvoltio
Fe(OTf) ₃	Trifluorometanosulfonato de hierro (III)
Fr	Factor de retención
kDa	Kilo Dalton
MTBE	Metil Tert-Butil Éter
O3-ni	Oxima de 3-nitro benzaldehído
O4-di	Oxima de 4-dimetilamino benzaldehído
O4-hi	Oxima de 4-hidroxi benzaldehído
OAce	Oxima de acetofenona
Ova	Oxima de vainillina
Ove	Oxima de veratraldehído
PLE	Esterasa de hígado de cerdo
RMN ¹³ C, ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogeno
Sin/Anti	2 Sustituyentes prioritarios sobre el mismo eje de un doble o triple enlace/ 2 sustituyentes opuestos en el eje de un doble o triple enlace
THF	Tetrahidrofurano
Z/E	<i>Zusammen</i> (juntos)/ <i>Entgegen</i> (opuesto) similar a la estereoquímica Cis-Trans para isómeros geométricos

INTRODUCCIÓN

Las oximas son compuestos orgánicos derivados de aldehídos y cetonas, que son materias primas o intermediarios de otros grupos funcionales como ésteres, nitrilos y amidas y tienen un amplio rango de aplicaciones: En la industria química, la oxima de ciclohexanona es el precursor de uno de los polímeros de mayor uso en el mundo: el nylon 66, una poliamida, sus ésteres son importantes agentes antimicrobianos, anticancerígenos y fragancias para alimentos. Las oximas se han usado como antidotos para el tratamiento de intoxicaciones con compuestos organofosforados. Las oximas denominadas aldoximas son compuestos que se obtienen de la reacción entre un aldehído alifático ó aromático con hidroxilamina (en forma de clorhidrato, la forma estable del reactivo). Los métodos clásicos para su preparación requieren como disolventes, agua, etanol ó metanol ó mezclas acuoso-alcohólicas, ó incluso otros disolventes como cloroformo, cloruro de metileno, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, tolueno o bases orgánicas como piridina o trietilamina. Las temperaturas y tiempos de reacción son muy variables; que pueden ser tan cortos como 10 minutos con disolventes a reflujo ó hasta tiempos prolongados a temperaturas moderadas (Greene y Wuts, 2002; Sandler y Karo, 2013). Por lo anterior, se han venido desarrollando nuevos métodos para la obtención de oximas, como los mecanoquímicos que resultan ser ambientalmente aceptables, en los que se promueve la reacción mediante la energía proporcionada por la fricción mecánica del proceso de molienda de los sustratos en estado sólido, sin la participación de disolventes de reacción. En el presente trabajo, se consideró la transformación mecanoquímica de aldehídos aromáticos, en las oximas respectivas con una alta pureza y excelentes rendimientos, a partir de la reacción de cada aldehído con clorhidrato de hidroxilamina y un soporte inorgánico sólido, principalmente de naturaleza básica, fácilmente separable y recuperable mediante filtración. Las oximas obtenidas en buen rendimiento y con una pureza alta se utilizaron en una segunda etapa, que consistió en la síntesis biocatalítica (mediante la acción de una lipasa) de los ésteres de las oximas produciéndose los nitrilos aromáticos correspondientes. Se utilizaron dos agentes acetilantes para la transesterificación como acetato de vinilo y de isopropenilo y acetato de etilo como disolvente de la reacción. Asimismo, se probó el efecto de la lipasa de *Candida antarctica* en la reacción de isomerización de los isómeros geométricos de las oximas, Por lo tanto el objetivo del presente trabajo consistió en Efectuar la síntesis mecanoquímica en fase sólida de oximas de aldehídos aromáticos y estudiar la actividad catalítica de la lipasa de *Candida antarctica* (Novozyme 435, CAL-B) en reacciones de isomerización, acilación/eliminación de las oximas mencionadas. Todas las reacciones probadas se analizaron mediante CCF y los productos se analizaron mediante espectrofotometría de Infrarrojo ó resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C ó GC-MS.

I. ANTECEDENTES

1.1 Oximas

Las oximas son compuestos orgánicos de fórmula estructural general ($R^1, R^2-C=N-OH$) en la FIGURA 1.1 se muestra la estructura general, donde ($-C=N-OH$) es el grupo funcional oximino u oxima y (R^1 y R^2) pueden representar grupos alquilo, arilo o hidrógeno. En los casos en los que uno de los grupos alquilo (R^1) ó (R^2) sea un (H), se tiene una aldoxima, es decir la oxima derivada a partir de un aldehído de fórmula: ($R^1-C(H)=O$) ó ($R^2-C(H)=O$). Las oximas son generalmente sólidos cristalinos, que históricamente, antes de la aparición de los métodos espectroscópicos, se usaron para caracterizar aldehídos y cetonas (Morrison y Boyd, 1998).

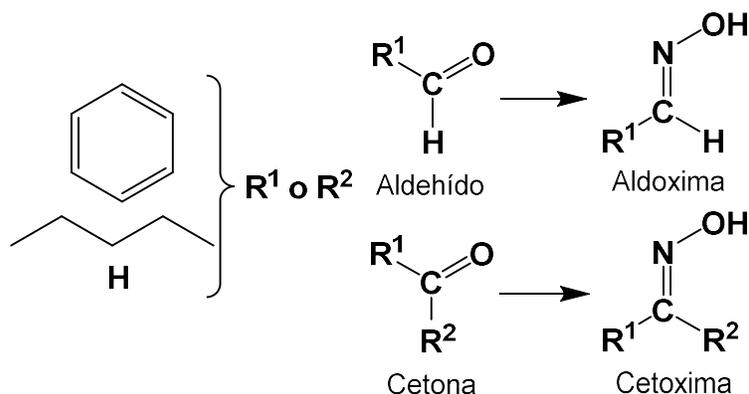


FIGURA 1.1 Estructura general de las oximas.

1.1.1 Reacciones de las oximas

Las oximas se obtienen haciendo reaccionar un compuesto carbonílico con hidroxilamina, que se condensa con el grupo carbonilo, con pérdida de una molécula de agua y formación del enlace $C=N$ de las oximas. Dado que la hidroxilamina es una

base, formará sales con los ácidos, y como en esta forma es fácil de conservar y manejar, lo habitual es que la hidroxilamina se utilice en forma de clorhidrato, liberándose de su forma salina cuando se requiere, mediante la adición de una base (que suele ser acetato de sodio, piridina o algún hidróxido alcalino). La reacción comienza con un ataque nucleofílico por parte del grupo amino al carbono carbonílico. La protonación del oxígeno carbonílico favorece el ataque nucleofílico, lo que implica que el proceso se vea favorecido por un pH bajo. Sin embargo, la hidroxilamina puede protonarse en el medio ácido para formar el ion ($\text{H}_3\text{N}^+\text{OH}$), que carece de electrones no compartidos y, en consecuencia, del carácter nucleófilo requerido para efectuar la reacción de condensación con el aldehído o la cetona. Por lo tanto, la mezcla de reacción debe ser lo suficientemente ácida como para que se protone el compuesto carbonílico, pero no tanto como para que la concentración de hidroxilamina libre resulte demasiado baja, que alente la reacción. En cada caso particular, las condiciones óptimas dependerán de las basicidades relativas del reactivo y del sustrato carbonílico de partida (FIGURA 1.2), (Pérez Castro, 2008).

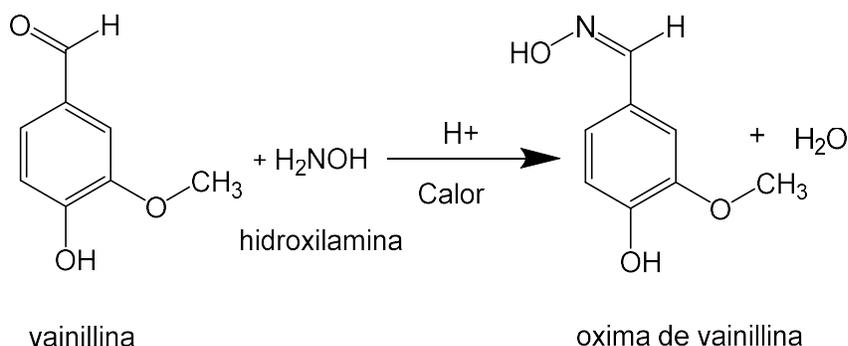


FIGURA 2.2 Reacción general para la síntesis de oxima de vainillina.

Las oximas son similares a un subgrupo de compuestos, formados a partir de aldehídos y cetonas, denominados bases de Schiff (que contienen un doble enlace carbono-nitrógeno, en los cuales el átomo de nitrógeno está enlazado con un grupo arilo o alquilo, ($\text{R}^1, \text{R}^2 \text{C}=\text{N}-\text{R}^3$)). El grupo hidroxilo infiere una mayor estabilidad

química a las oximas en comparación con las iminas, por ejemplo frente a la hidrólisis (Rosa, 2006)

Las oximas pueden sufrir diversas transformaciones. Primeramente, tienen un comportamiento anfótero, es decir, pueden actuar como ácidos ó bases; en presencia de ácidos minerales fuertes, presentan un comportamiento básico formando sales de oxima (FIGURA 1.3 a). Por otro lado, actúan como ácidos débiles, de manera que con hidróxidos alcalinos en medio acuoso forman alcóxidos de oxima (FIGURA 1.3 b), (Allinger, 1978). Las oximas también son intermediarios importantes para la obtención de otros compuestos nitrogenados, como aminas y nitrilos (FIGURA 1.3.c y d) y otros grupos funcionales como amidas, ésteres y éteres de oxima y compuestos heterocíclicos como oxazoles y quinoxalinas, entre otros (Karthikeyan *et al.*, 2011)

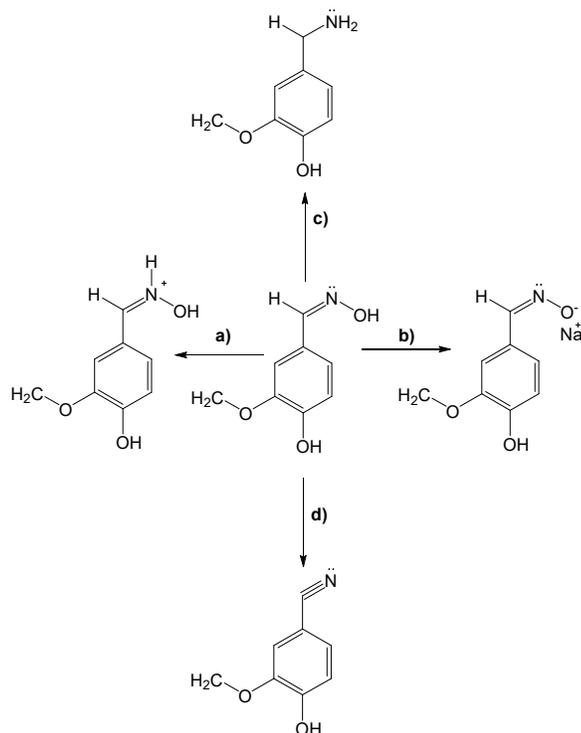


FIGURA 1.3 Reacciones de conversión de una oxima en otros grupos funcionales.

interconversión a una temperatura determinada, como el disolvente y la presencia de trazas de catalizadores. Sin embargo, también a una determinada temperatura, la interconversión **Sin-Anti** puede ocurrir espontáneamente mediante un mecanismo de isomerización no-catalizada. Este fenómeno también se ha observado con aldoximas o cetoximas **Sin-Anti**, aún en estado sólido, para el cual se han propuesto varios mecanismos (Dugave y Demange, 2003). Le Févre y Northcott (1949), utilizaron técnicas dilatométricas para medir la velocidad de la isomerización no catalizada de piperonal oxima en varios disolventes. Estos autores encontraron que el isómero **Anti** tenía una vida media de 3.6 horas en benceno a 25°C. Gawley y Garcia-Pons (1986), encontraron que la velocidad de isomerización de acetaldoxima en benceno correspondía muy estrechamente con la velocidad medida para la piperonal oxima. O'Ferrall y O'Brien (2004), observaron que después de 8 días, se llevó a cabo el equilibrio de los isómeros **Sin/Anti** de *p*-metoxibenzaldehído con una proporción de ambos de 8:1 (**Sin/Anti**) de acuerdo con mediciones realizadas por Resonancia Magnética Nuclear en (CDCl₃) como disolvente. Por lo tanto, es de esperarse que si el equilibrio de interconversión de ambos isómeros **Sin/Anti** es reversible y espontáneo, entonces debería ser posible efectuar una resolución cinética dinámica mediante la conversión biocatalítica del isómero **Anti**, más estable en el correspondiente éster mediante una reacción acetilación ú oximólisis, (FIGURA 1.5).

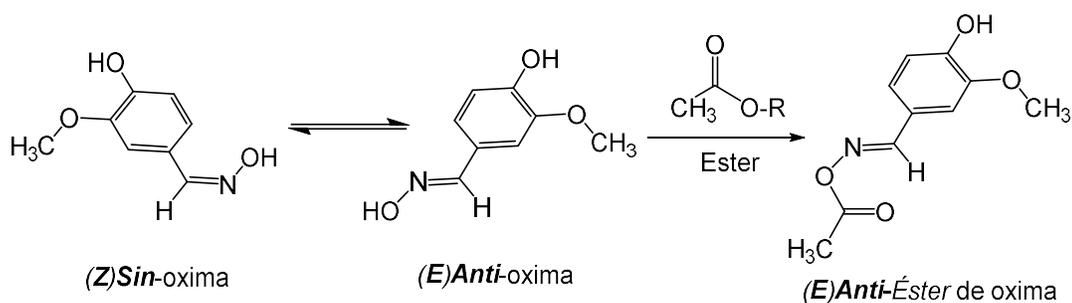


FIGURA 1.5 Isomerización no catalizada de los isómeros **Sin/Anti** de la oxima de vainillina y reacción de acetilación (oximólisis) catalizada por lipasa del isómero **Anti**.

1.1.3 Reacciones de las oximas en síntesis orgánica

Las oximas son sustancias de partida e intermediarios para la síntesis de una gran variedad de compuestos orgánicos. En la FIGURA 1.6, se muestran algunos ejemplos de reacciones en las que las oximas son participes, en particular, las que son relevantes para este trabajo como la acilación, la isomerización y la eliminación.

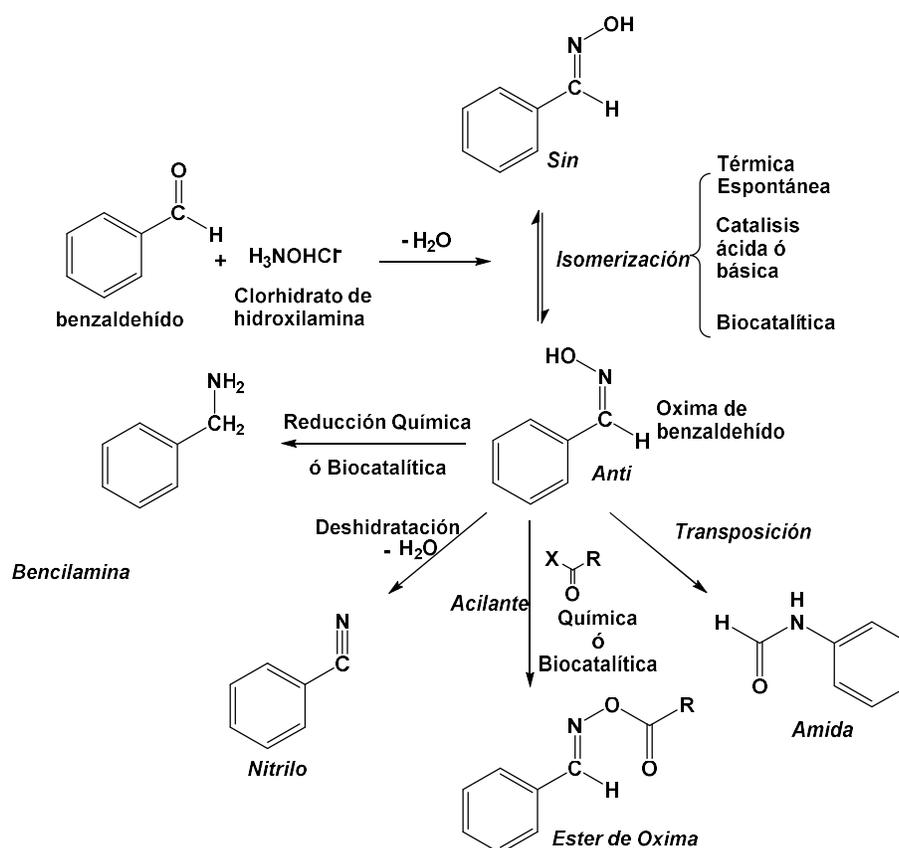


FIGURA 1.6 Reacciones características de las oximas

Una de las reacciones es la reducción de una oxima a amina primaria, la cual suele ser una reacción muy útil que puede llevarse a cabo mediante diferentes condiciones reductoras para su formación; por ejemplo, empleando metales como sodio ó zinc en

medio ácido (HCl) ó ácido acético. Se han utilizado reductores como hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4), ó la hidrogenación catalítica a presión, como los métodos más comunes (Mirón *et al.*, 2009), como se muestra en la FIGURA 1.7, para la reducción de la oxima de ciclopentanona en ciclopentilamina.

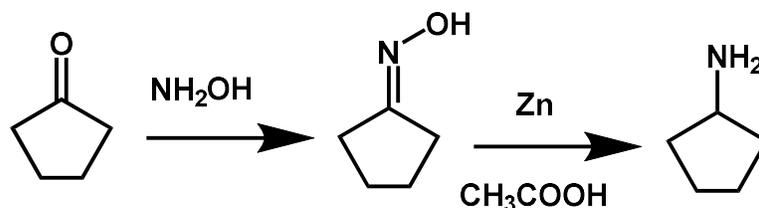


FIGURA 1.7 Reducción química de la oxima de ciclopentanona

Por otro lado, las oximas se pueden preparar por otras vías que no implican la función carbonilo, tales como la reacción de nitrosación con nitrito de butilo (FIGURA 1.8) en medio ácido. La oxima obtenida de esta manera, puede transformarse en otro grupo funcional, incluso carbonilo, como se indica en la FIGURA 1.8, mediante una reacción de hidrólisis que consiste en calentar la oxima con un ácido mineral en disolución acuosa. La hidrólisis resulta difícil en algunos casos debido a la reversibilidad de la formación de las oximas: la adición de formaldehído (CH_2O) facilita la obtención del aldehído ó cetona, debido a que se combina (reacción de trans-oximación) con la hidroxilamina liberada para dar una oxima especialmente estable a la hidrólisis (Chandrasekhar y Gopalaiah, 2002).

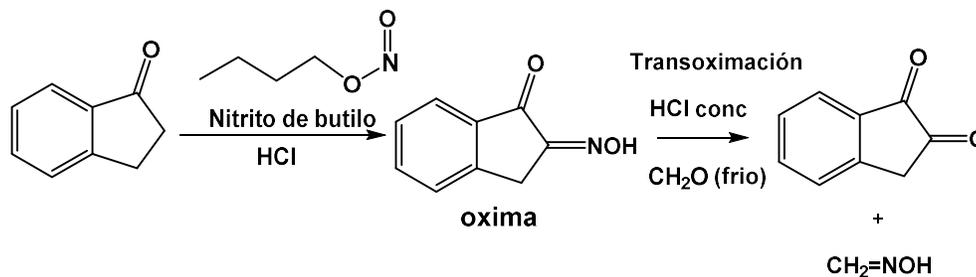


FIGURA 1.8 Hidrólisis de las oximas

Una conversión importante en química orgánica de las oximas es la deshidratación ó eliminación de agua para producir nitrilos, reacción que puede ser promovida por la temperatura, catálisis ácida ó básica, factores químicos como agentes deshidratantes y factores físicos como las microondas y el ultrasonido. Las aldoximas experimentan deshidratación con cloruro de tionilo o polivinilpirrolidona y en condiciones de reacción suaves para producir nitrilos con altos rendimientos (Tamami y Kiasat, 1999). Las oximas pueden ser aciladas en el grupo (-OH), para producir un éster de oxima, que funge como intermediario de la reacción de eliminación de un ácido orgánico como el acético, al utilizar una base como (NaOH) o piridina (FIGURA 1.9). El isómero que sufre la reacción de eliminación es el **Anti**, pero la reacción es completa por la interconversión **Sin-Anti** espontánea o promovida por las condiciones de la reacción (temperatura, disolvente ó catalizadores ácidos ó básicos) de las oximas o de sus ésteres.

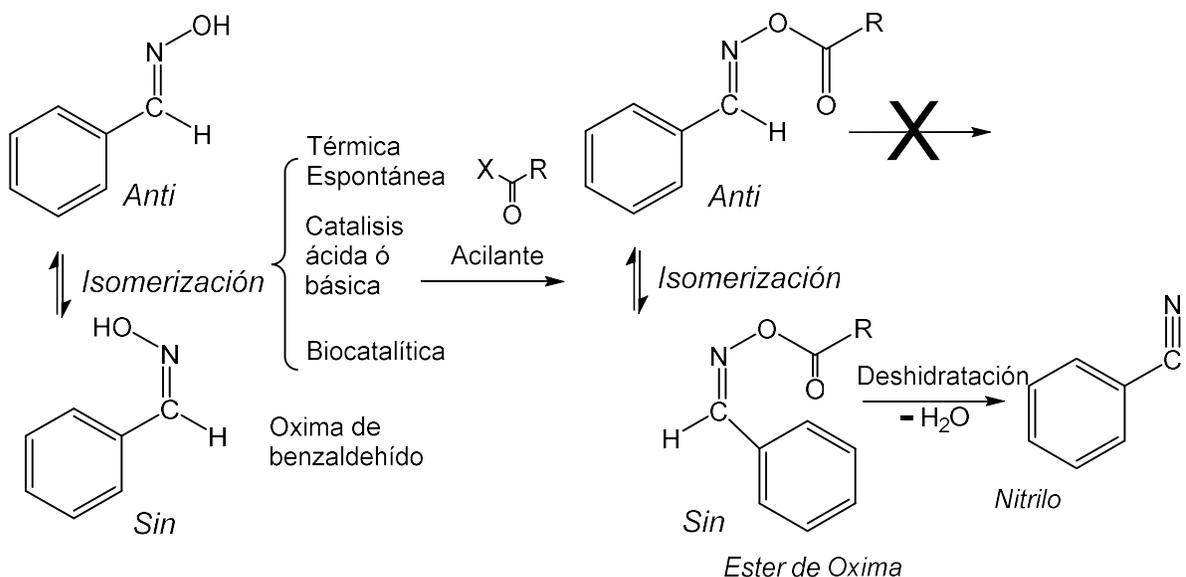


FIGURA 1.9 Formación de un nitrilo a partir de una reacción de eliminación de una oxima

Las oximas que parten de cetonas (cetoximas) son utilizadas principalmente para la obtención de amidas (FIGURA 1.10), debido a que sufren transposición cuando se les calienta junto con ácidos fuertes para más tarde ser tratados con agua, esta reacción se le denomina transposición de *Beckmann*, teniendo su principal uso en la industria textil con la transposición de la oxima de ciclohexanona a caprolactama, compuesto intermediario en la fabricación de la fibra sintética nylon 6 (Ronchin y Vavasori, 2009).



FIGURA 1.10 Formación de amidas por transposición de oximas

1.1.4 Aplicación de las oximas

Las aplicaciones de las oximas en el campo de la investigación son muy variadas. Tal es el caso de la perillartina (FIGURA 1.11 b), la α -**Sin**-oxima del perilaldehído, del cual se conoce su dulzor desde 1920 y se dice que es hasta 2000 veces más dulce que la sacarosa. Por el contrario su precursor perilaldehído (FIGURA 1.11 a), componente principal del aceite volátil de *Perilla frutescens* (L.) Britton (*Labiatae*), es sólo ligeramente dulce. Este compuesto es comercializado en Japón como sustituto del jarabe de maple o regaliz para el endulzamiento del tabaco, pero su uso como edulcorante se ha visto restringido por una solubilidad limitada en agua, un sabor apreciablemente amargo, así como un sabor mentolado desagradable que acompaña la dulzura (Nabors y Gelardi, 2001).

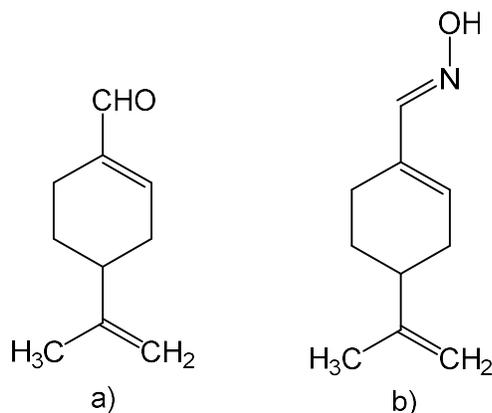


FIGURA 1.11 Estructura de (a) perilaldehído y (b) perillartina

Asimismo se ha estudiado el efecto de las oximas en cuanto a actividad antibacteriana se refiere, tal es el caso de Hania (2009), quien preparó los complejos de (Co), (Ni), (Co) con: 4-cloro benzaldehído oxima ($R^1=Cl$), 4-metil benzaldehído oxima ($R^1=CH_3$), 4-nitro benzaldehído oxima ($R^1=NO_2$), 4-cloro benzaldehído semicarbazona ($R^2=Cl$), 4-metil benzaldehído semicarbazona ($R^2=CH_3$), 4-nitro benzaldehído semicarbazona

($R^2=NO_2$), 4-cloro benzaldehído fenilhidrazona ($R^3=Cl$), 4-metil benzaldehído fenilhidrazona ($R^3=CH_3$) y 4-nitro benzaldehído fenilhidrazona ($R^3=NO_2$), comparándolos tanto en su forma libre como en complejo metálico en contra de *E. coli*. En la FIGURA 1.12 se muestra la estructura base de los compuestos anteriormente mencionados. Reportando que las oximas al dimerizar crean puentes de hidrogeno disminuyendo su densidad electrónica facilitando la entrada a la célula, esta característica se ve incrementada cuando se encuentra en complejo debido a que la polaridad del ion metálico se reduce por el reparto de la carga positiva al ligando disminuyendo aún más la densidad electrónica y facilitando la difusión en la bacteria.

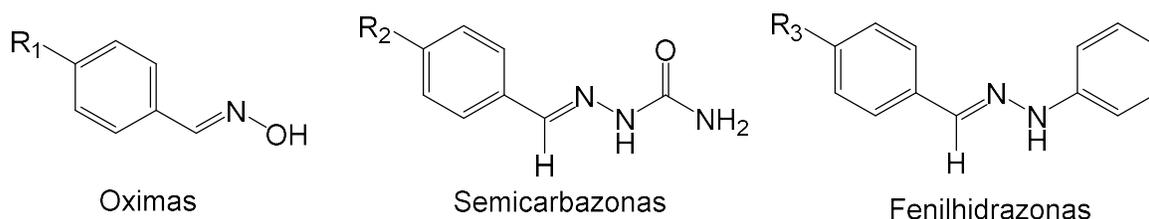


FIGURA 1.12 Estructuras base para la síntesis de los complejos en el estudio de actividad antimicrobiana

Otra aplicación muy importante de las oximas es la de reactivación de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) que es inhibida por efectos de compuestos organofosforados presentes en pesticidas e insecticidas y en compuestos que se han utilizado como armas de guerra química, tal es el caso del gas sarín (Laita *et al.*, 2001). En datos aportados por la Organización Mundial de la Salud se presentan más de 200 mil intoxicaciones y unas 20 mil muertes por pesticidas organofosforados alrededor del mundo.

En la FIGURA 1.13, se muestra la función de AChE (7), que inicia con a) formación del complejo acil-enzima. En el sitio activo AChE, un residuo de serina es responsable del ataque nucleofílico al grupo acetilo de la acetilcolina (neurotransmisor, cuya función es

participar en la actividad sináptica del sistema nervioso) y liberación de colina (9), b) hidrólisis del complejo acil-enzima y liberación de la enzima para reiniciar su función, c) efecto de inhibición de la enzima por el acomplejamiento de compuestos organofosforados en el sitio activo de la enzima y d) reactivación de la enzima por reacción de la oxima **pralidoxima** con el compuesto organofosforado, con el cual forma un complejo, desplazando y liberando a la enzima. Si un compuesto organofosforado (10) está presente, se puede producir la fosforilación de la serina de AChE, formando un complejo que conduce a la inhibición de la enzima (11). En el mecanismo de la reactivación de la AChE inhibida (11), se cree que las oximas funcionan como nucleófilo en el grupo hidroxilo. La pralidoxima que se encuentra en forma aniónica (2-PAM, 13), como otras oximas neutras, forman un complejo covalente organofosforado. Resulta interesante que la actividad de la enzima AChE es similar a la que realizan otras hidrolasas, como las lipasas, como podrá observarse en una sección posterior (Ribeiro *et al.*, 2012).

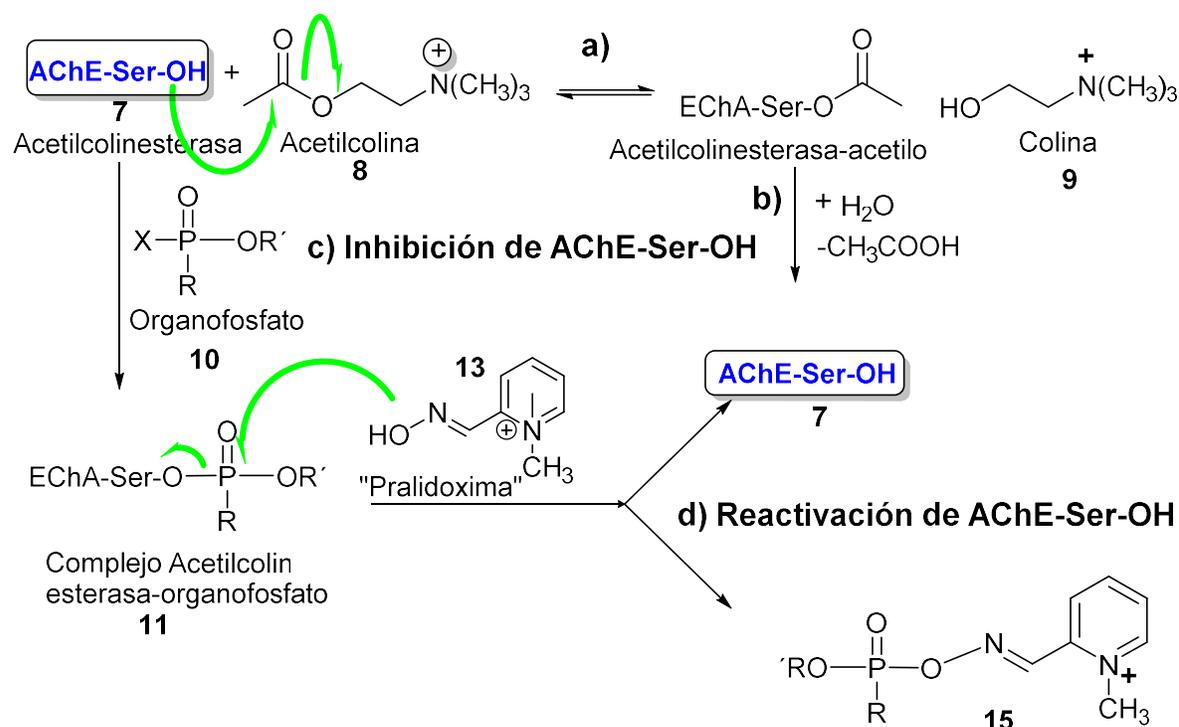


FIGURA 1.13 Inhibición y reactivación de AChE. a) Mecanismo de la función de la enzima AChE con acetilcolina, b) Hidrólisis y liberación de la enzima, c) inhibición de la enzima por compuestos organofosforados y d) reactivación de la enzima por reacción de la oxima pralidoxima con el compuesto organofosforado.

1.2 Métodos de la Química verde y sostenible para la obtención de oximas

La química ha aportado tantos beneficios a la sociedad que resulta difícil concebir el mundo actual sin ellos. Basta pensar, por ejemplo, en los nuevos materiales, los medicamentos, cosméticos, los productos alimentarios y fitosanitarios, así como su influencia en términos de economía y bienestar. Sin embargo, el evidente incremento de contaminantes en el planeta, así como los múltiples problemas que se derivan de ello, han obligado al ser humano a preocuparse por la conservación medioambiental. A finales de la década de 1960 y principios de la siguiente, comenzó a darse importancia al medio ambiente, tal como demuestra la creación de la Agencia de Protección Medioambiental (EPA de Estados Unidos de América) y la celebración del Primer Día de la Tierra. Desde entonces, se han aprobado más de cien leyes dirigidas

a controlar el riesgo y prevenir la exposición a productos tóxicos y peligrosos (Poliakoff y Licence, 2007). La química verde nació en la EPA a principios de los 1990, como un enfoque y una herramienta conceptual para la protección del medio ambiente ante la contaminación originada por la industria química, y fue expresada de manera explícita por medio de los 12 principios de Anastas y Warner (1998). Era evidente desde sus orígenes que no resultaría eficaz este instrumento a menos que la industria lo hiciera suyo. La experiencia en Norte América, Europa y Japón demuestra que su mensaje ha penetrado ya la mente del químico industrial por consideraciones no sólo éticas, sino también económicas. Por tal motivo, es necesario y un asunto de primordial importancia, apoyar la investigación tecnológica en este sentido; ya que facilitando los recursos para investigar y desarrollar metodologías que prevengan la polución ambiental, se favorecerá la puesta en práctica de tecnologías químicas innovadoras con buenos fundamentos, tanto científicos como económicos (Poliakoff y Licence, 2007).

Se puede resumir el pensamiento de Anastas y Warner que llevó a la formulación de sus principios en tres apartados fundamentales y distintivos: a) Prevención de la causa de riesgo; b) Metodologías químicas y c) Acción de acuerdo con un diseño. Los “12 principios” de la química verde de Anastas y Warner para valorar la sustentabilidad de un proceso, están dirigidos primordialmente a la química preparativa, y los mejores éxitos de su aplicación se han dado en las industrias de la química fina y farmacéutica (Anastas y Warner, 1998).

Estos principios se pueden resumir de la siguiente manera: Los productos químicos deberán ser diseñados con métodos de síntesis eficientes; de manera que incorporen al máximo, en el producto final, todos los materiales usados durante el proceso, y que éstos tengan mínima o ninguna toxicidad, tanto para el hombre y demás seres vivos, como para el medio ambiente (y que al finalizar su función no persistan en el medio ambiente sino que se transformen en productos de degradación inocuos). Evitar, en lo

posible, el uso de sustancias auxiliares (disolventes, reactivos de separación, etc.) y, en el caso de que se utilicen, deberán ser lo más inocuas posible, considerando preferentemente todo material del proceso renovable o bien reciclable en vez de agotable (así como técnica y económicamente viable). Evitar en lo posible la formación de derivados (grupos de bloqueo, de activación, de protección/desprotección), de residuos o minimizarlos. Los requerimientos energéticos deberán considerarse por su impacto medioambiental y económico, reduciéndolos lo más que se pueda, intentando llevar a cabo los procesos sintéticos a temperatura y presión ambientes. En este contexto, es conveniente el empleo de catalizadores (lo más selectivos posible) en vez de reactivos estequiométricos. Por todo ello, en la mayoría de estos principios, caben los conceptos y procedimientos de la Biocatálisis, como una (Bio) tecnología reciente y cada vez con mayores potenciales de empleo no solo en los laboratorios de investigación, sino a escala productiva.

Ya se han mencionado los “métodos tradicionales” para la obtención de oximas, basados en calentar soluciones acuosas, acuoso-alcohólicas ó en alcoholes y otros disolventes orgánicos, algunos tóxicos, de aldehídos y cetonas con clorhidrato de hidroxilamina y una base, durante un tiempo determinado, según el compuesto carbonílico. Recientemente, se han desarrollado nuevos métodos de síntesis de oximas en base a los principios de la “química verde y sostenible”, algunos de los cuales son los siguientes:

Las reacciones llamadas “**sin solvente**”, las cuales proporcionan ventajas como la reducción de agentes contaminantes, el aumento del área superficial debido al pequeño tamaño de las partículas entre los reactantes permitiendo una mayor cantidad de interacciones provocando la aceleración del proceso. Uno de los trabajos basados en este método fue el de Zeynizadeh y Karimkoshteh (2013), quienes sintetizaron oximas a partir de distintos aldehídos junto con clorhidrato de hidroxilamina y óxido de hierro como catalizador de la reacción sometido a molienda en un mortero para

después llevar la mezcla a agitación en un baño de aceite a 70-80°C, obteniendo rendimientos del 90-98% en tiempos de reacción de 15 min hasta 3 horas en algunos casos, lo que cabe destacar es el exceso de la presencia del isómero **E**-oxima que va del 96-100%.

Otros procedimientos para la obtención de oximas de aldehídos y cetonas consideran el uso de **ultrasonido** mediante el cual se pueden llevar a cabo un gran número de reacciones orgánicas teniendo las siguientes ventajas: rendimientos más altos en tiempos de reacción más cortos y condiciones de reacción más suaves. Li *et al.* (2006), utilizaron este método para la síntesis de oximas a partir de aldehídos aromáticos en etanol con clorhidrato de hidroxilamina y con sulfato de sodio, que redujo el tiempo de reacción de 240 (con etanol a reflujo sin ultrasonido) a solo 15 minutos con el uso de ultrasonido, resultando en rendimientos altos del 90-97% en los casos de benzaldehído, 2-clorobenzaldehído, 3-clorobenzaldehído, 4-cloro benzaldehído, 3-nitro benzaldehído, 4-nitro benzaldehído, 2-metoxi benzaldehído, 4-metoxi benzaldehído, 4-dimetilamino benzaldehído. En acetofenona, el rendimiento de la oxima obtenida fue del 73% en 120 minutos. Las temperaturas del proceso fueron de 25 a 35°C.

Similarmente, las reacciones asistidas por **microondas** proporcionan ventajas similares a las del ultrasonido y al igual que éste, no se requiere la purificación extensa de los productos de reacción, las cuales son más limpias y más rápidas. Kamakshi y Reddy (2005), sintetizaron oximas de aldehídos y clorhidrato de hidroxilamina y utilizando carbonato de potasio. Se probaron los siguientes aldehídos: benzaldehído, fenil acetaldehído, 4-metoxi benzaldehído, 4-dimetilamino benzaldehído, furfural, 2-indol carboxal benzaldehído. En estos casos, el tiempo de reacción fue de 1-2 minutos obteniéndose rendimientos de 90-92%.

Una metodología de la Química verde, la constituye el uso de **líquidos iónicos** que poseen una amplia gama de características importantes en síntesis orgánica, ya que pueden ser líquidos con punto de fusión alrededor de la temperatura ambiente, buena reciclabilidad, estabilidad en aire y humedad, muestran una alta solubilidad de compuestos inorgánicos, orgánicos e incluso poliméricos, con una presión de vapor despreciable, con la ventaja de no contribuir a la contaminación del ambiente con los denominados compuestos VOC (Bica y Gaertner, 2006). Karthikeyan *et al.* (2011) utilizaron el líquido iónico bromuro de L-asparaginil amido etil metil imidazolio (L-AAIL-2) para la condensación mecanoquímica mediante molienda con mortero y pistilo de varios aldehídos y clorhidrato de hidroxilamina para la síntesis de oximas a temperatura ambiente. Los rendimientos de las oximas de benzaldehído, 4-hidroxi benzaldehído, 4-metoxi benzaldehído fueron de 90, 95 y 94% de rendimiento respectivamente en aproximadamente 1 minuto de reacción.

En ocasiones estos métodos pueden ser utilizados de manera conjunta ya sea para mejorar el rendimiento del producto, reducir los tiempos de reacción o facilitar la purificación, tal es el caso de Hajipour *et al.* (2010), quienes utilizaron **líquidos iónicos** basados en sales cuaternarias de bromuro de alquil amonio como tribenzil amina, 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano y 1-benzil-4-aza-1-azoniabicyclo[2,2,2]octano como bases de la reacción combinándolo con **microondas** para la obtención de distintos tipos de oximas. Los sustratos se sometieron a molienda en un mortero con pistilo junto con una de las bases y clorhidrato de hidroxilamina, para después ser calentadas en un horno microondas. Reportando que sin el empleo de las bases y usando la irradiación en microondas el rendimiento de la oxima es de 20% en 6 min, mientras que la utilización de las bases pero sin la irradiación microondas el rendimiento fue menor al 30% en 15 min, por otra parte el beneficio de ambos métodos dio como resultado rendimientos mayores a 70% en menos de 4 min con mayoría del isómero **E**-oxima.

1.2.1 Síntesis Mecanoquímica de Oximas

A inicios del siglo pasado, W. Nernst clasificó los diferentes campos de la Química de acuerdo al tipo de energía suministrada al sistema: termoquímica, electroquímica, fotoquímica, etc. y se le dio el nombre de mecanoquímica al campo en que es la energía mecánica la que produce las reacciones. Dentro de este campo se encuentran las reacciones triboquímicas, que son las que tienen lugar cuando los sólidos se someten a procesos de molida más o menos prolongados (Fernández-Bertran, 1999).

Las ventajas que presenta el método son: 1) las reacciones pueden realizarse a temperatura ambiente, 2) en mezclas heterogéneas sólido-líquido, 3) la pulverización de los reactivos sólidos produce partículas muy pequeñas cuyas áreas superficiales en conjunto forman una gran superficie activa, que a través de una agitación con los otros componentes sólidos del sistema, se dispersan en ella aumentando el área interfacial que por acción del mezclado y la fricción mecánica se logra una buena transferencia de masa y un aumento en el calor del proceso, por lo que éste procede a una gran velocidad. 4) La fricción entre las interfaces deslizantes de los reactantes provoca estiramientos reversibles de los enlaces y una alta energía de vibración de los átomos de los reactivos en contacto, lo que propicia la ruptura de los enlaces activado energéticamente para la formación de los enlaces de los productos, 5) en las reacciones exotérmicas la agitación propicia el desprendimiento de calor y, por ende, el aumento en su velocidad de reacción (Melgar *et al.*, 2010).

Varios han sido los trabajos en los cuales se ha reportado el empleo de la síntesis mecanoquímica para la obtención de compuestos relacionados con oximas. Así por ejemplo, Sherin y Rajasekharan (2016), quienes reportaron la síntesis de 3,5-bis(estiril)isoxazoles a partir del empleo de una mezcla de curcuminoides, clorhidrato de hidroxilamina y ácido acético glacial como catalizador de la reacción todo sometido

a molienda en mortero de ágata durante 1-2 min obteniéndose un rendimiento del 83%, pareciendo que los derivados de oxima inicialmente formados procedieron a ciclarse dando lugar al anillo isoxazol, además de comparar el método tradicional a reflujo en etanol cuya duración de reacción fue de 16 horas con similar rendimiento (FIGURA 1.14).

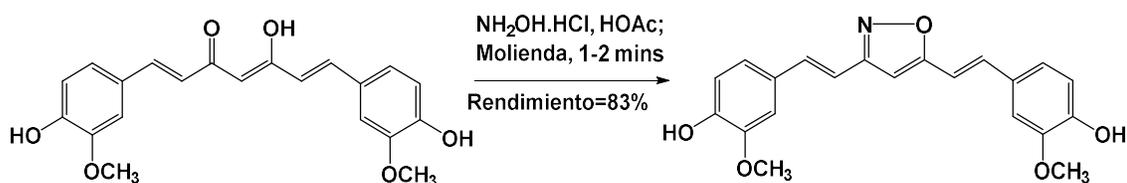


FIGURA 1.14 Síntesis Mecanoquímica de isoxazoles derivados de curcuminoides a través de una oximación mediante molienda mecánica.

1.2.2 Conversión de aldehídos en nitrilos, a través de la oxima *In situ*.

Los aldehídos pueden convertirse en nitrilos de dos maneras: **a)** A partir del aldehído, generando la oxima *In situ* y transformándose ésta en el nitrilo, sin aislar la oxima, ó bien, **b)** efectuar la obtención de la oxima a partir del aldehído, que se puede aislar y purificar y posteriormente proceder a una segunda etapa para realizar la deshidratación de la oxima en el nitrilo. En este trabajo, se procedió de acuerdo a la opción **b)**. En cualquier caso, ambas rutas de síntesis constituyen una transformación química muy importante de los aldehídos. Los compuestos nitrilo a su vez, pueden ser convertidos en un grupo amino primario, mediante una reacción de reducción, tal como se muestra en la FIGURA 1.15, para la transformación de la oxima de vainillina en vainillilamina, un producto de alto valor agregado, a través del nitrilo intermediario. (Esta reacción resulta ser una transformación alternativa a la mostrada en la página 8, FIGURA 1.7 para la obtención de aminas primarias mediante la reducción química de la oxima).

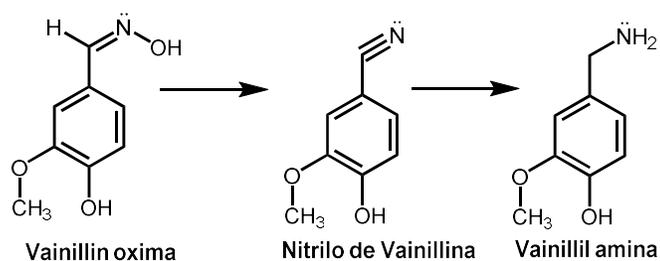


FIGURA 1.15 Esquema de reacciones de conversión de la oxima de vainillina en vainillilamina

De esta manera, los nitrilos pueden ser obtenidos a partir de aldehídos, en una sola etapa, utilizando clorhidrato de hidroxilamina con el aldehído que, mediante acción del calentamiento y agentes deshidratantes, promuevan la formación del nitrilo. Uno de ellos comprende el empleo de ácido fórmico, el cual en 30 minutos de reacción y calentamiento a reflujo, conduce a la transformación de aldehídos en nitrilos con rendimientos del 99% (Olah y Keumi, 1979). Movassagh y Shokri (2005), emplearon compuestos básicos como el fluoruro de potasio soportado en óxido de aluminio obteniéndose nitrilos a partir de aldehídos con rendimientos del 74 al 91% en tiempos de reacción entre 4-10 horas.

Métodos como el asistido por microondas, se han utilizado para convertir aldehídos en nitrilos a través de intermediación de la oxima. En estos métodos los aldehídos convertidos a las oximas se someten *in situ* a la acción deshidratante de sustancias como el sulfato de hidrogeno sódico soportado en sílice o acetato de amonio, obteniéndose los nitrilos con tiempos de reacción de 1-3 min con rendimientos de 81 a 95% (Das *et al.*, 2000). Srinivas *et al.* (2002), evaluaron el uso de HY-zeolita como catalizador de la conversión de las oximas de aldehídos en nitrilos, mediante dos procedimientos de reacción; uno consistió en el uso de microondas obteniendo rendimientos de 84-96% de los nitrilos con tiempos de reacción 1-2 min, mientras que con el método convencional a reflujo se obtuvieron los mismos compuestos, pero con tiempos de 6-8 horas y con rendimientos del 68 al 79%. Se han sintetizado nitrilos a

partir de aldehídos mediante el calentamiento de los mismos junto hidroxilamina o una variedad distinta de estas aminas, un ejemplo es la N-metil pirrolidina (Smith y March, 2007).

1.2.3 Conversión de oximas en nitrilos

Las oximas son las materias primas de partida más usuales en el proceso de obtención de nitrilos mediante la deshidratación de las oximas.

Hyodo *et al.* (2016) probaron distintos iones metálicos que pudieran promover la deshidratación de (*E*)-2-Naphtaldoxima (FIGURA 1.16), de los cuales con el $\text{Fe}(\text{OTf})_3$ se observaron los mejores resultados con una conversión del 99% y una selectividad del 92%.

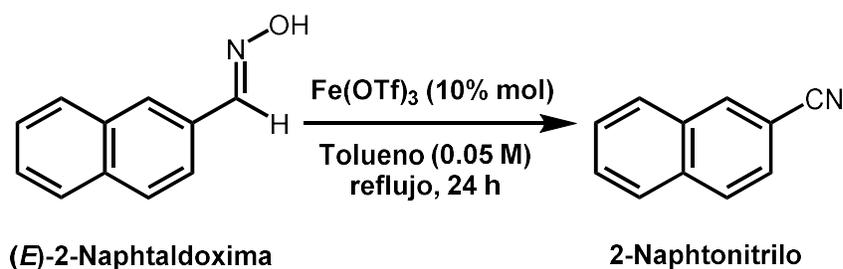


FIGURA 1.16 Deshidratación de (*E*)-2-Naphtaldoxima en 2-Naphtonitrilo usando $\text{Fe}(\text{OTf})_3$ como catalizador

1.3 Las lipasas

Las lipasas son triacilglicerolhidrolasas (EC 3.1.1.3) y su función natural es la hidrólisis de triglicéridos. Se han caracterizado un gran número de ellas y se ha visto que presentan amplia variedad tanto en eficiencia como en especificidad. Se ha obtenido

la estructura primaria de varias lipasas mediante secuenciación de sus aminoácidos o de sus ácidos nucleicos. Su tamaño varía entre los 270 y los 641 aminoácidos. Todas las estudiadas hasta el momento comparten secuencias homólogas, incluyendo la serina en el entorno del sitio activo (Gly-Y-Ser-Z-Gly, donde Z e Y denotan residuos de aminoácidos que pueden variar).

Se han determinado las estructuras de varias lipasas por rayos X. Sus estructuras tridimensionales son más parecidas entre sí de lo que podía esperarse por comparación de sus secuencias de aminoácidos. El patrón común de plegamiento hace que la disposición espacial de la maquinaria catalítica sea muy similar (Cygler *et al.*, 1994). Así, desde 1990 se publicó que la estructura terciaria de lipasas microbianas, como la de *Rhizomocor miehei* (RML) refinada en alta resolución, revelándose que la tríada catalítica de dichas enzimas es: serina-histidina-asparagina, similar a la tríada de las denominadas serino-proteinasas como α -quimiotripsina, tripsina y subtilisina. Esto implica que las proteinasas y las lipasas pueden compartir un mismo ancestro en el punto evolucionario, por lo cual las lipasas pueden ser prácticamente aplicables a sustratos característicos de las proteinasas, y realizar las reacciones típicas de éstas. Actualmente es bien conocido el mecanismo por el cual actúan las enzimas hidrolíticas del tipo de las serino-hidrolasas en medio acuoso (Fersht, 1985; Walsh, 1979), (tales como PLE, PPL y CCL, α -quimiotripsina, tripsina y papaína que contiene a la cisteína homóloga de serina en la tríada catalítica), y que se describe como sigue: en dichas enzimas, el centro activo está conformado por serina, histidina y ácido aspártico, la serina es el portador del grupo hidroxilo nucleofílico, y los demás son los encargados de promover una catálisis ácido-base: en primer lugar, la enzima y el sustrato se asocian de manera no covalente para formar el complejo enzima-sustrato (FIGURA 1.17 a), seguido por el ataque del grupo hidroxilo de la serina sobre el carbonilo del sustrato, formándose un intermedio tetraédrico de alta energía, que se estabiliza por interacciones con el esqueleto proteico. Lo anterior lleva a la liberación del grupo saliente y a la formación del intermediario covalente acil-

enzima. Este intermediario sufre el ataque del nucleófilo formando un nuevo intermediario tetraédrico, que elimina el grupo hidroxilo del aminoácido serina, para formar un complejo no covalente enzima-producto que finalmente se disocia en la enzima y el producto. Por otra parte en la FIGURA 1.17 b, se ejemplifica las diferentes reacciones en la cual la enzima puede ser participe debido a su amplia capacidad catalítica tanto en medios acuosos y no acuosos para la obtención de distintos productos a partir de un sustrato y distintas condiciones de reacción.

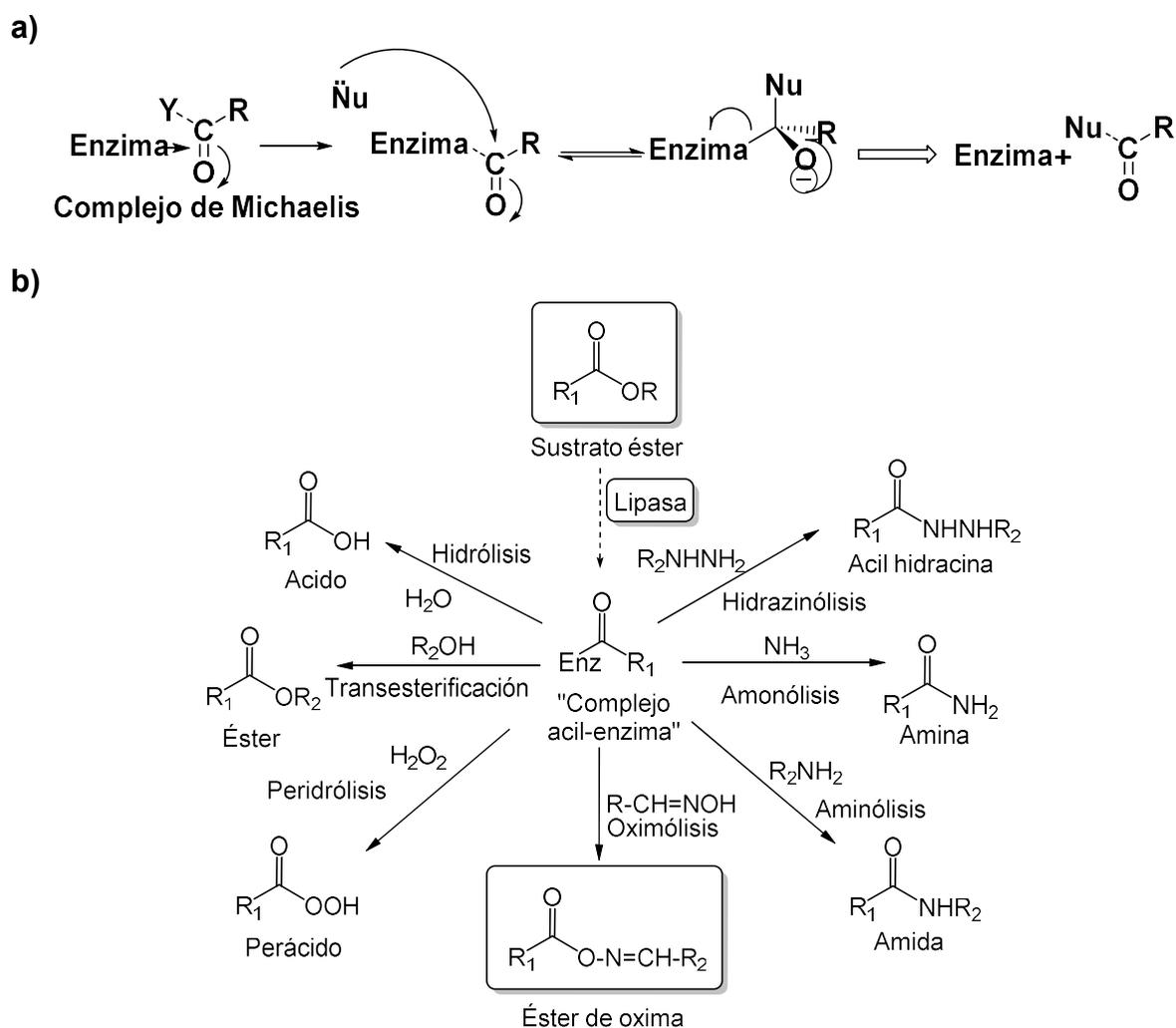


FIGURA 1.17. a) Formación del complejo acil-enzima y su ataque por diversos nucleófilos diferentes al agua, en un medio orgánico, b) Tipos de reacciones, incluida la oximólisis.

1.3.1 Aplicaciones de las lipasas

El crecimiento del mercado de enzimas para uso industrial ha continuado hasta alcanzar, en 1998, los 1,6 billones de dólares repartidos en las siguientes áreas: alimentación (45%), detergentes (34%), textil (11%), cuero (3%), papel (1.2%). Aproximadamente un 60% de las enzimas utilizadas en alimentación, formulación de detergentes e industrias de procesamiento del almidón son productos recombinantes (Adrio y Demian, 2003).

Las lipasas tienen numerosas aplicaciones debido a que poseen una amplia especificidad de sustrato y a su capacidad para llevar a cabo reacciones de hidrólisis y de síntesis, como las siguientes:

Industria de los alimentos: el amplio uso de enzimas en alimentación ha obligado a que diferentes organismos como la EFSA (*European Food Safety Authority*) en Europa, la FDA (*Food and Drug Administration*) en Estados Unidos, o la JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*) de la FAO/WHO a regular estos productos con la finalidad de garantizar la seguridad del consumidor (Torres, 2005).

Aplicaciones biomédicas: las lipasas también tienen aplicación en biomedicina debido a su excelente capacidad para catalizar reacciones con elevada regioespecificidad, en una gran variedad de disolventes orgánicos y con un amplio abanico de sustratos. Además, presentan una elevada enantioselectividad lo que les permite diferenciar entre isómeros **S** y **R**. La lipasa de *Candida rugosa* es altamente (**S**)-específica mientras que otras lipasas como las de *Mucor* y *Rhizopus* presentan la misma enantioselectividad pero de forma menos específica. La lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* se emplea en la obtención de compuestos enantioméricamente puros para síntesis en química orgánica (Torres, 2005). Las

lipasas se han utilizado en la preparación de intermediarios homoquirales ópticamente activos, para la síntesis de ninkomicina-B, antiinflamatorios no esteroidales (naproxeno, ibuprofeno, suprofeno, ketofreno), el lamivudina (un potencial agente antiviral, que puede ser usado contra el VIH), y la síntesis enantioespecífica de agentes antitumorales, alcaloides, antibióticos, vitaminas y para producir los intermediarios quirales en la síntesis de hipertensivos, entre otros (Jaeger y Eggert, 2002; Wei *et al.*, 2005).

Industria agroquímica: otras aplicaciones industriales de las lipasas incluyen, por ejemplo, el procesamiento del cuero para eliminar la grasa subcutánea, tratamiento de la pulpa en la industria papelera o síntesis orgánica de una gran variedad de insecticidas, herbicidas, fungicidas, o sus precursores, preparados mediante la aplicación de las lipasas. Un ejemplo es la producción del enantiómero (**S**)-indanofano, un herbicida utilizado contra la maleza en plantíos de arroz; otro ejemplo es la producción mediante la hidrólisis enantioselectiva del ácido acético α -ciano-3-fenoxibencil alcohol, un insecticida quiral (Jaeger y Eggert, 2002; Torres, 2005).

Biosensores: en la industria de grasas y aceites, en tecnología de alimentos y en diagnóstico clínico, la determinación cuantitativa de triacilglicéridos es de gran importancia. Un nuevo y promisorio método utiliza lipasas como biosensores, que se pueden usar para analizar el índice de contaminación, especialmente con pesticidas (Hassan *et al.*, 2006).

Industria cosmética: la producción de retinoides (vitamina A y sus derivados) son de gran potencial comercial, como productos del cuidado de la piel. Algunos derivados del retinol, solubles en agua, ya han sido preparados por reacciones catalizadas por lipasas inmovilizadas (Jaeger y Eggert, 2002; Hassan *et al.*, 2006). El factor de crecimiento vegetal (-) jasmonato de metilo es un importante constituyente en la

perfumería, que puede ser sintetizado por una reacción catalizada por lipasas para formar el intermediario quiral (+)-(6S)-metil-7-epicucurbato. El producto final del metil metacrilato puede ser polimerizado con el uso de lipasas para ser usado como una sustancia liberadora de perfume (Jaeger y Eggert, 2002).

Detergentes: actualmente, la utilización de enzimas en la formulación de detergentes constituye el ejemplo más exitoso de la aplicación de enzimas en la industria. Proteasas, lipasas, amilasas, oxidasas, peroxidasas y celulasas se añaden a detergentes, donde éstas catalizan la ruptura de enlaces químicos en presencia de agua (Torres, 2005).

Las lipasas también se han aplicado en la industria peletera para la remoción de grasas subcutánea, como surfactantes, en la producción de aromas y de biodiesel, para la reutilización de residuos industriales, entre otras aplicaciones (Gandhi, 1997; Jaeger y Eggert, 2002).

1.3.2 Mecanismo de la reacción catalizada por las lipasas

Desde 1990 se describió que la estructura terciaria de las lipasas microbianas posee una triada catalítica Ser-His-Asp, similar a la observada en las denominadas serin-proteasas. El mecanismo por el cual transcurren los procesos catalizados por este grupo de enzimas ha sido propuesto en base a datos cinéticos y estructurales, así como mediante estudios de difracción de rayos X (Jaeger *et al.*, 1999; Rotticci, 2000).

El mecanismo por el cual transcurren los procesos catalizados por las lipasas es el siguiente y puede dividirse en tres etapas diferentes (FIGURA 1.18):

1. Formación de IT_1 : una vez formado el complejo de Michaelis-Menten entre el sustrato y la enzima, tiene lugar el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la serina sobre el grupo carbonilo del éster que se hidroliza, dando lugar a un estado de transición conocido como intermediario tetraédrico (IT_1). Según indican los estudios de rayos X, la serina está colocada de tal forma en el sitio activo, que le permite llevar a cabo el ataque nucleofílico (efecto de proximidad y orientación). Por otro lado, el anillo de imidazol de la histidina acepta un protón (catálisis básica), formándose un catión, que se encuentra estabilizado por solvatación del grupo carboxilo del ácido aspártico (catálisis electrostática). Estos tres aminoácidos Ser-His-Asp, constituyen la mencionada triada catalítica del sitio activo.
2. Formación del intermediario acil-enzima: IT_1 se descompone para formar el intermediario covalente acil-enzima (o complejo de Michaelis), proceso que es favorecido por la protonación del grupo amino saliente por parte de la histidina (catálisis ácida). A continuación el nucleófilo es liberado y reemplazado por una molécula de agua.
3. Formación de IT_2 : el intermediario acil-enzima es desacilado a través de una secuencia de etapas similar a la anterior, pero en sentido opuesto, y el producto hidrolizado es liberado, con la consecuente regeneración del catalizador. En este paso, la molécula de agua actúa como nucleófilo, y la serina como grupo saliente (Kanerva y Klibanov, 1998).

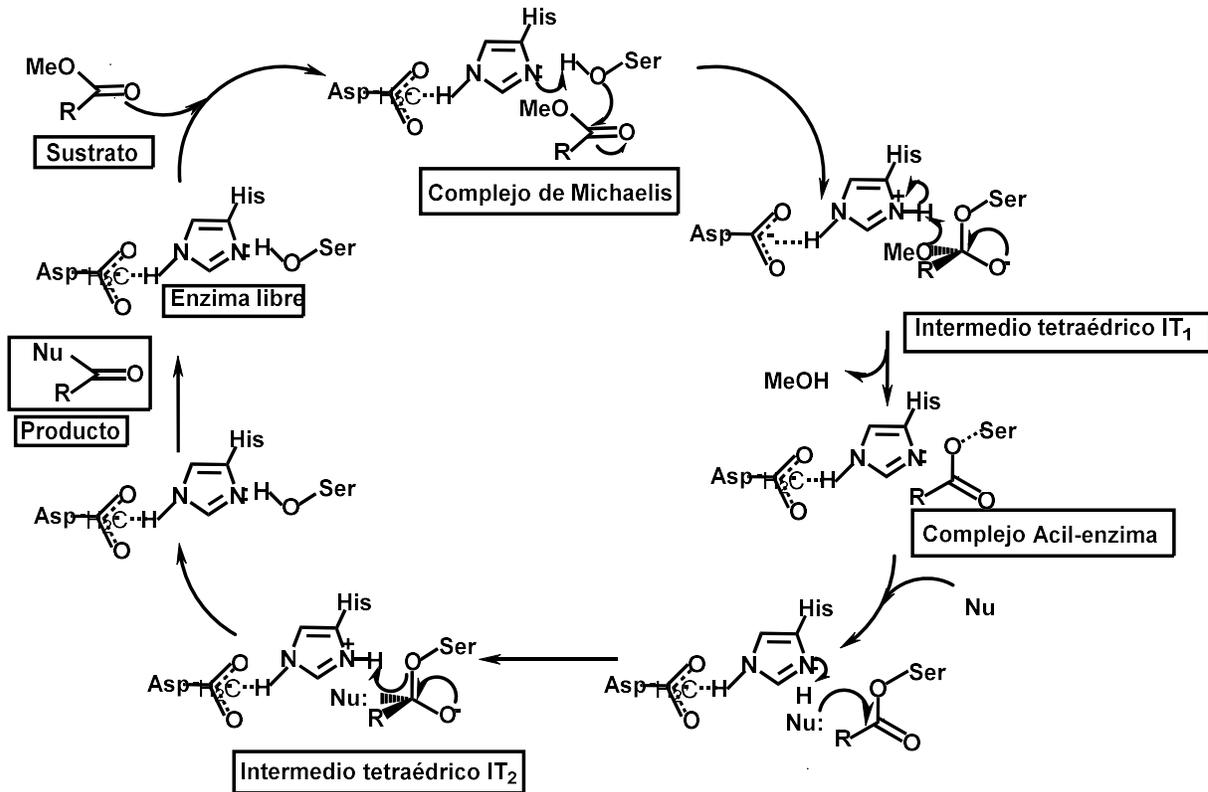


FIGURA 1.18 Mecanismo de la reacción de Oximólisis catalizada por lipasa (basado en Klivanov, 1989)

1.3.3 La lipasa de *Candida antarctica*

La lipasa es originaria de la levadura *Candida antarctica*, que produce dos lipasas: el componente o fracción A, que es diferente del componente B (fracción B). CAL-B ha sido clonada y sobre expresada en *Aspergillus oryzae* y ha sido patentada por Novo Nordisk. La estructura tridimensional de la enzima libre y los complejos de CAL-B se han determinado por cristalografía de rayos X, el sitio activo se encuentra en el interior del núcleo de la enzima y tiene una forma de embudo, la maquinaria catalítica está localizada en la parte interna del sitio activo y consiste en una tríada catalítica además de la cavidad oxianiónica. La tríada catalítica, está formada por un sistema de cargas, que consiste en Ser105, His224 y Asp187. La cavidad oxianiónica estabiliza al oxianión

formado en el estado de transición por tres puentes de hidrógeno: uno con Gly106 y dos con Thr40 (FIGURA 1.19) (Rotticci, 2000).

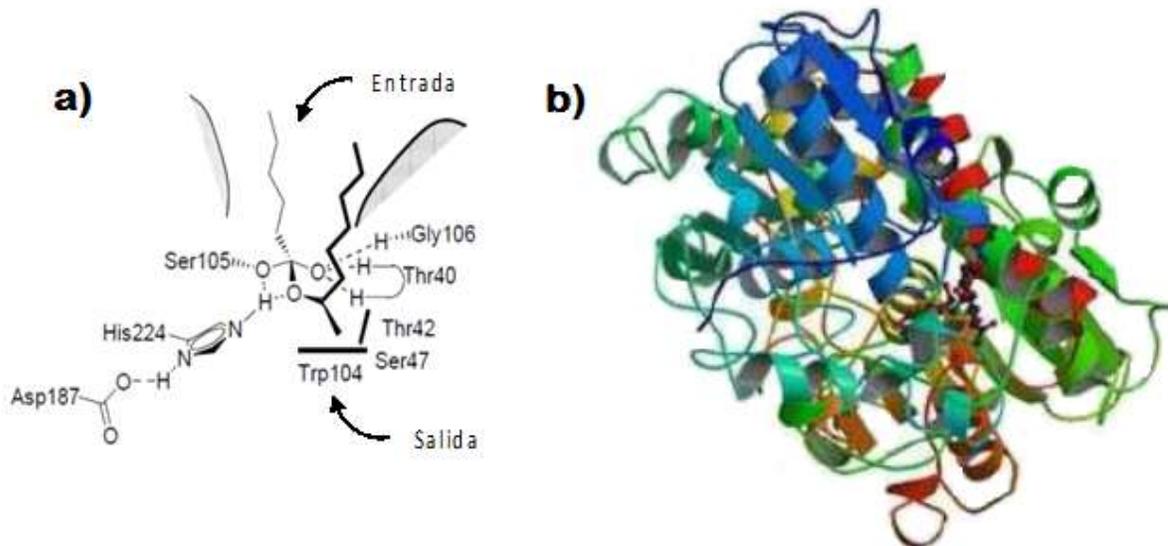


FIGURA 1.19 a) Vista lateral del sitio activo de CAL-B en el estado de transición con 2-octil hexanoato (Rotticci, 2000); b) Estructura tridimensional de la lipasa de *Candida antarctica* Fracción B.

La lipasa de CAL-B es un eficiente catalizador para la hidrólisis en agua y esterificación en disolventes orgánicos, esta enzima es utilizada en muchas aplicaciones industriales por su alta enantioselectividad, amplio rango de sustrato, estabilidad térmica, y estabilidad en disolventes orgánicos (Trodler y Pleiss, 2008). No exhibe activación interfacial, y es activa para sustratos solubles en agua, por estos motivos, puede considerarse también como una esterasa (Rotticci, 2000), aunque se considera carente de tapa se ha determinado la existencia de una pequeña cadena polipeptídica en alfa-hélice, la cual puede ser considerada como una potencial tapa. Presenta un peso molecular de 33 kDa, un punto isoeléctrico de 6, pH óptimo 7, actividad específica 435 LU/mg, especificidad posicional hacia triacilglicéridos Sn-3 (Palomo-Carmona, 2003). Se utiliza en la resolución de alcoholes racémicos, aminas y ácidos, o en la preparación de compuestos ópticamente activos de meso reactantes. Los compuestos

ópticamente activos resultantes son difíciles de obtener por rutas alternativas y pueden ser de gran valor sintético. La diversidad de productos sintetizados con éxito utilizando CAL-B como un biocatalizador robusto es muy amplio: comprende sustratos como carbohidratos, aminoácidos, lípidos y productos naturales como monoterpenos, triterpenos y estereoides, flavonoides, derivados del ácido hidroxicinámico, y una gran variedad de intermediarios sintéticos precursores de fármacos y productos de la química fina.

1.4 Síntesis enzimática de Ésteres de oxima

Las lipasas han sido utilizadas para la preparación y resolución de alcoholes quirales, ésteres y ácidos carboxílicos a través de la correspondiente esterificación asimétrica o reacciones de transesterificación. Sin embargo, hay pocos reportes sobre la preparación y resolución de compuestos orgánicos nitrogenados. Zaks y Klibanov (1988) reportaron que algunas enzimas podían catalizar reacciones de aminólisis, hidrazinólisis y oximólisis en solventes orgánicos. El equipo de trabajo de Gotor ha investigado intensamente procesos quimio-, regio- y enantioselectiva de aminólisis e hidrazinólisis con lipasas, en donde utilizan nucleófilos como las oximas e hidrazinas, en reacciones de oximólisis e hidrazinólisis catalizadas por las lipasas (Gotor-Fernández, Busto, *et al.*, 2006; Gotor, 1992; Gotor y Menéndez, 1990).

Las lipasas pueden catalizar muy eficientemente procesos relacionados con la aminólisis (usando variados nucleófilos nitrogenados como hidroxilamina, hidrazina, hidrazidas, aminoalcoholes y oximas) de ácidos y sus derivados en disolventes orgánicos, que incluyen diversos aceptores de acilo (ésteres de vinilo, de fenilo, de oxima, y ésteres tanto simples como no activados, carbonatos, pirocarbonatos, anhídridos mixtos y epóxidos), para producir compuestos de gran interés y diversidad estructural. Las reacciones enzimáticas de aminólisis, hidrazinólisis y oximólisis son de gran utilidad en la preparación de amidas quirales, hidrazidas, ésteres de oxima y

otros compuestos orgánicos nitrogenados, con control quimio-, regio- y estereoselectivo, de una gran variedad de reacciones, los cuales son difíciles de obtener por métodos convencionales. Gotor-Fernández, Brieva, *et al.* (2006), han estudiado las lipasas como biocatalizadores capaces de aceptar otros nucleófilos nitrogenados además de amoníaco y aminas, tales como oximas (164 a-c), hidrazinas (167 a, b), hidroxilamina y carbonatos mixtos de las mismas. La PPL (lipasa de *Pseudomonas cepacia*) y la CCL (lipasa de *Candida cylindracea*) muestran actividad catalítica similar en el proceso ilustrado en la FIGURA 1.20, y con las lipasas ANL (lipasa de *Aspergillus niger*) y la HLL (lipasa de *Humicola lanuginosa*), los oximinésteres (166 a-c) se obtuvieron en rendimientos moderados a buenos, con carbonato de alilo (165) como agente acilante.

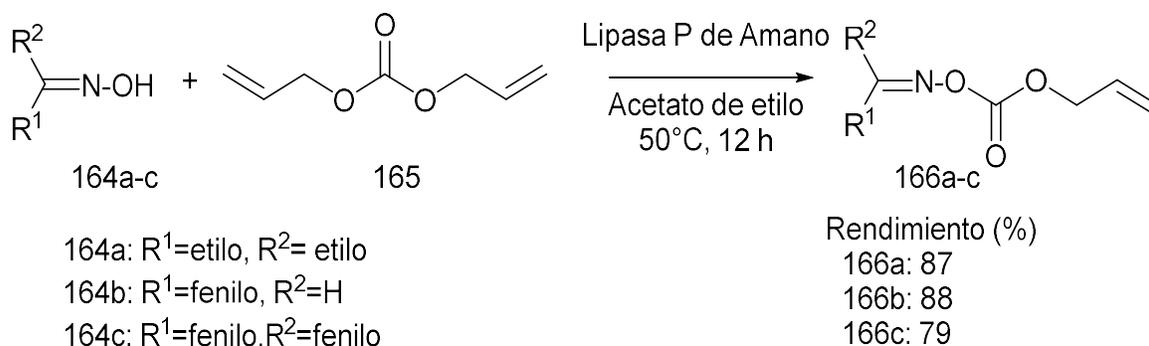


FIGURA 1.20 Proceso general de oximólisis catalizada por CAL en disolvente orgánico (Gotor, 1992)

Como puede observarse, las lipasas muestran actividad catalítica en los procesos de oximólisis. Así por ejemplo, las lipasas de *Candida cylindracea* o la lipasa pancreática porcina, que muestran una actividad catalítica poco menor a la de la lipasa P de Amano, y otras como las de *Aspergillus niger* o *Humicola lanuginosa*, también aceptan oximas como sustratos para producir los ésteres de oxima (Gotor y Menéndez, 1990). Las lipasas son capaces de aceptar otros sustratos acílicos como carbonatos de alquilo y alilo con oximas en la reacción de oximólisis, con carbonato de alilo como agente acilante se obtuvieron los carbonatos de oxima en rendimientos bajos (FIGURA 1.21).

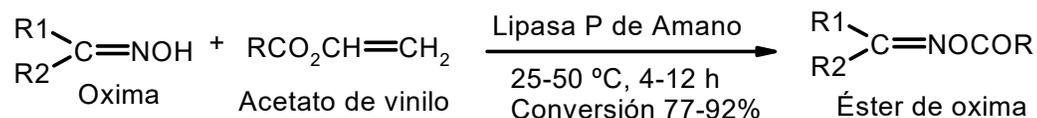


FIGURA 1.21 Proceso general de oximólisis catalizada por la lipasa P de Amano en acetato de vinilo.

Para obtener los ésteres de oxima utiliza éster de vinilo como agente de acilación irreversible, esta estrategia es usada por otros autores en reacciones enzimáticas de transesterificación. Cuando se eligió acetato de vinilo como agente de acilación irreversible, los rendimientos fueron los mejores, de 77-92% con la Lipasa P de Amano, temperatura 25 y 50°C, en 12 h de tiempo de reacción (FIGURA 1.20). Los compuestos fueron caracterizados por IR, RMN de ^1H , y RMN de ^{13}C , y EM. Los rendimientos de la preparación de estos compuestos, utilizando alquil ésteres (no activados) como aceptores de alquilo, se mejoran cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de mallas moleculares, las cuales remueven el metanol o etanol formado. Otras lipasas que exhiben actividad catalítica en los procesos de oximólisis son las lipasas de *Candida cylindracea* o la lipasa pancreática porcina, que muestran una actividad catalítica poco menor a la de la lipasa P de Amano. Con otras lipasas como la de *Aspergillus niger* o *Humicola lanuginosa*, los ésteres de oxima son obtenidos con bajos rendimientos.

Reacciones relacionadas son la alcoxicarbonilación regioselectiva de nucleósidos (169) con alcoxicarbonil-O-acetoximas (170a-c), con la participación de PsL (Lipasa de *Pseudomonas cepacia* y CAL-B. Esta última mostró mayor amplitud de sustrato, pero diferente regioselectividad. (FIGURA 1.22) (Ferrero y Gotor, 2000)

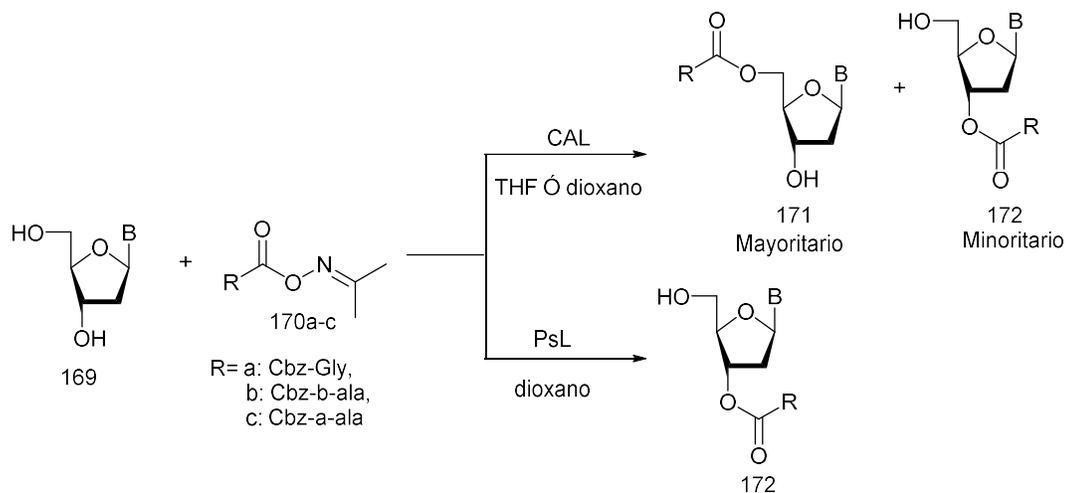


FIGURA 1.22 Reacciones de alcoxycarbonilación regioselectiva de nucleósidos con alcoxycarbonil-O-acetoximas con la participación de PsL y CAL-B

Otro tema de interés es la diferenciación enzimática entre el grupo hidroxilo con diferentes orientaciones espaciales, por lo cual $3'$ -O-acil y $5'$ -O-alcoxycarbonil derivados de U-, anhidro-, xilo- y arabino-nucleocidos son obtenidos por medio de una lipasa mediante la reacción con CAL usando butirato de cetoxima o anhidro butírico, y benciloxycarbonil-O-acetoxima o alcoxycarbonatos como agentes acilantes. (FIGURA 1.23) (Gotor *et al.*, 2008).

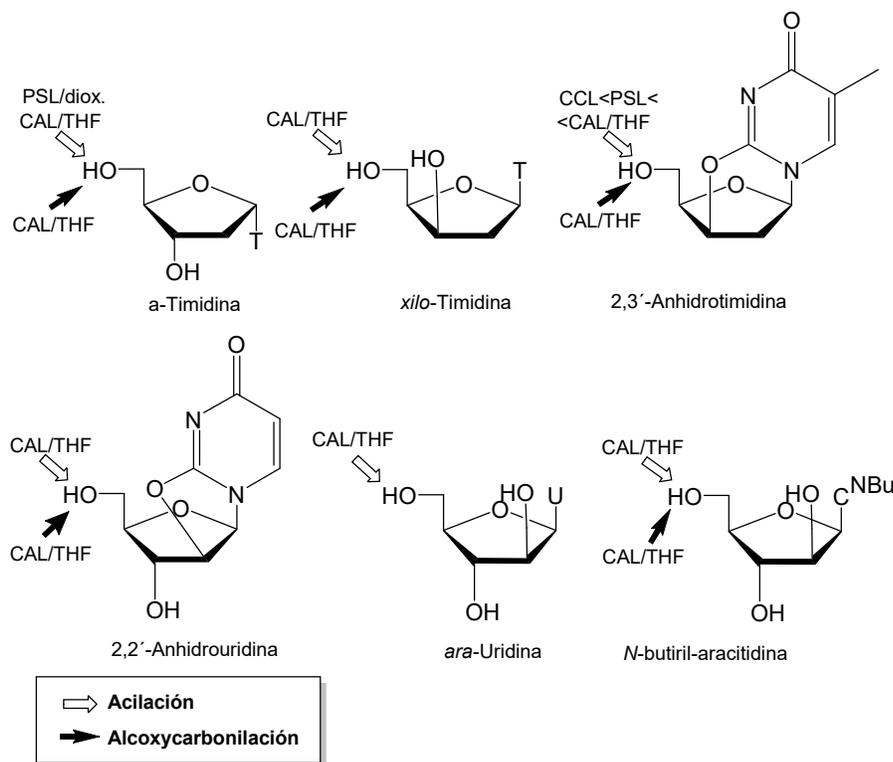


FIGURA 1.23 Diferenciación catalizada por CAL entre grupos hidroxilo en nucleósidos

Por lo anteriormente expuesto, la combinación de métodos químico-enzimáticos provee rutas eficientes para la obtención de productos naturales análogos no naturales, los que pueden ser de gran interés para su aplicación futura en aplicaciones médicas. Sin embargo, un problema importante a atender es el no contar con la tecnología propia para el desarrollo de procesos para la industria nacional, que considere la obtención de compuestos terapéuticamente útiles, de actividad biológica diversa y de alto valor agregado.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Estudiar la actividad catalítica de la lipasa de *Candida antarctica* (Novozyme 435) en reacciones de isomerización, acilación y eliminación de oximas de aldehídos aromáticos.

2.2 Objetivos específicos

1.- Estudiar las síntesis mecanoquímica de oximas a partir de aldehídos aromáticos usando diferentes materiales de soporte y mediante el método de molienda manual.

2.- Estudiar la isomerización enzimática de las oximas **Sin** y **Anti** de aldehídos aromáticos como el veratraldehído y vainillina.

3.- Estudiar la actividad catalítica de *Candida antarctica* (Novozyme 435) en reacciones de eliminación de oximas de aldehídos aromáticos.

4.- Elucidar la estructura de los productos obtenidos en cada etapa del proceso con métodos espectroscópicos como lo son FT-IR, RMN ^1H y ^{13}C , GC-MS.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Enzimas y reactivos de uso general

Cromatografía en capa fina: se utilizaron cromatofolios Merck de gel de sílice 60 F₂₅₄ (espesor 0.25 mm) que incorporan revelador para luz ultravioleta. Para el revelado de las placas se utilizó luz U.V.

Sustratos, disolventes y reactivos de uso general: fueron de grado reactivo (99% de pureza o más), de las compañías Sigma-Aldrich, Baker o Merck.

Los sustratos para las reacciones fueron los aldehídos de vainillina, veratraldehído, 4-hidroxi benzaldehído, 3-nitro benzaldehído y 4-dimetilamino benzaldehído. Las oximas utilizadas fueron sintetizadas a partir de los aldehídos antes mencionados.

Los materiales de soporte utilizados para la mecanoquímica fueron cafeína, carbonato de sodio, tetraborato de sodio, amonio oxalato y hexametilentetramina, estos fueron secados en una mufla 12 horas antes de cada experimento y colocados en desecador.

Los disolventes utilizados fueron: cloruro de metileno, hexano, acetato de etilo, acetona, y reactivo acilante: acetato de vinilo.

Enzimas: lipasa de *Candida antarctica* fracción B (EC 3.1.1.3). Novozyme 435, inmovilizada en resina macroporosa, diámetro 0.3-0.9 mm, 7000 PIU/g.

3.2 Técnicas instrumentales de uso general

Espectros de Infrarrojo: se determinaron con un equipo de Infrarrojo de espectro cercano (NIR) Perkin-Elmer, modelo Frontier 500, con transformada de Fourier, utilizando soluciones en una concentración de 5-10 mg/mL en acetona como disolventes.

Espectros de RMN de hidrógeno y carbono (RMN-¹H, ¹³C): se efectuaron en el equipo Oxford de 300 Mhz. Se analizaron 30 mg del producto obtenido de las oximas, los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm respecto al TMS, usado como la referencia interna y como disolvente cloroformo deuterado.

Las abreviaturas para la descripción de los espectros son las siguientes: s= singulete, d= doblete y m= multiplete.

Espectros de masas: se llevaron a cabo en un equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de la marca Perkin-Elmer, CG modelo: Clarus 580, EM modelo: Clarus SQ 8S, con sistema de auto-muestreador COMBI-xt PAL, mediante la técnica de impacto electrónico (70 eV), realizando inyecciones de 2 µL. El analizador empleado es del tipo cuadrupolar. Gas acarreador: Helio de ultra alta pureza. Columna: CP-WAX, 25 m x 0.25 mm x 0.25 µm. Temperatura del detector e inyector: 260°C. Temperatura de columna: 60°C (1 min)- 20°C/min- 260°C (10 min).

3.3 Descripción de los métodos experimentales generales

A) Purificación de los disolventes orgánicos: los disolventes requeridos para las reacciones químicas y catalizadas por enzimas se prepararon mediante el

siguiente procedimiento: purificación mediante destilación fraccionada y almacenamiento en recipientes ámbar, utilizando mallas moleculares de 3Å (5% v/v) para mantenerlos anhidros.

B) Tratamiento para mallas y materiales de soporte: Las mallas moleculares y los materiales de soporte se colocaron en una mufla a 100 °C, las mallas moleculares se activaron 12 horas antes de cada experimento, mientras que los materiales de soporte fueron secados 8 horas anticipadamente a cada experimento y puestos en desecador 30 min previos a su utilización.

C) Seguimiento de las reacciones de síntesis mecanoquímica, acilación y acilación/eliminación de las oximas de aldehídos aromáticos: se tomó 20 mg o 20 µl aproximadamente, de la mezcla de reacción y se suspendió en 2.5 µL de acetona. De la disolución se tomó con una micropipeta capilar 0.5 µL y se aplicó en una placa de 25 mm x 65 mm de sílica gel 60 soportada en placa de aluminio (Merck). También en la misma placa, se aplicaron 0.5 µL de solución del sustrato y producto dependiendo de la reacción que se realizó: síntesis mecanoquímica de oximas (aldehído y oxima), acilación (oxima y éster acetato de oxima), acilación/eliminación (oxima y nitrilo) respectivamente, preparadas con 5 mg de cada uno y disueltos en 0.5 mL de acetona. La placa se eluyó en una mezcla de hexano acetato de etilo (80/20 o 70/30) dependiendo de la naturaleza de las muestras. Para el revelado de las placas se utilizó luz U.V de 254 nm. y el avance de las transformaciones, se realizó mediante la observación de la desaparición de las materias primas o aparición de los productos.

3.4 Procedimiento para la síntesis mecanoquímica de oximas

Se pesó 1 g de cada uno de los aldehídos: vainillina, veratraldehído, 3-nitro benzaldehído, 4-hidroxi benzaldehído y 4-dimetilamino benzaldehído y se mezcló 1 g de hidroxilamina y 3 g de cada uno de los siguientes materiales de soporte: cafeína, carbonato de potasio, tetraborato de sodio, oxalato de amonio y hexametilentetramina, respectivamente. Las mezclas sólidas así obtenidas, fueron sometidas a un proceso de molienda a mano en mortero. El seguimiento de las reacciones se realizó de acuerdo con lo establecido en la sección: Descripción de los métodos experimentales generales párrafo C) (ver página 53) a intervalos de 10, 20, 30, 40, 50 minutos y/o hasta la desaparición completa de los sustratos.

Al término de la reacción, los productos de las síntesis mecanoquímica, se extrajeron de dos formas:

- i) Mediante extracción (maceración) directa de la oxima de la mezcla de reacción con 50 mL de acetato de etilo; la disolución resultante se filtró y se concentró en rotavapor. Posteriormente el producto sólido se secó y se pesó.
- ii) Mediante una extracción con un equipo soxhlet de la oxima de la mezcla de reacción con 100 mL con cloruro de metileno, a reflujo durante 4 horas. Al cabo de ese tiempo, la fase orgánica se filtró y el disolvente se removió con un rotavapor hasta la obtención de los cristales secos

3.4.1 Procedimiento para la extracción de las oximas.

1.- Modificación de pH: Finalizada la reacción de molienda, la mezcla de reacción contenida en el mortero se suspendió en agua destilada y el pH se justó a 6 con una solución de HCl 1 N. Posteriormente, la solución anterior se filtró con papel filtro y la solución resultante se extrajo mediante embudo de separación con acetato de etilo (2x100 mL). La fase acuosa se desechó, mientras que las fases orgánicas se concentraron en rotavapor para retirar el exceso de solvente en el producto.

2.-Extracción con acetato de etilo: Finalizada la reacción de molienda, la mezcla contenida en el mortero se suspendió en 25 mL de acetato de etilo y posteriormente se vertió en un matraz erlenmeyer con tapa roscada, que posteriormente se agitó durante 5 minutos en una agitadora orbital a 30°C. Después de esta operación, la mezcla se filtró a través de papel filtro. El residuo sólido obtenido se disolvió en 25 mL de acetato de etilo y se agitó en las condiciones anteriormente mencionadas. Las fases orgánicas obtenidas se mezclaron y se concentraron en rotavapor. La oxima obtenida se secó al vacío y se pesó para determinar el rendimiento de la reacción. Asimismo, se tomaron muestras de 50 mg para su posterior determinación y análisis estructural mediante NIR.

3.5 Estudio de Isomerización de las oximas *Sin/Anti* de vainillina y veratraldehído

Las reacciones de isomerización de las oximas de vainillina y veratraldehído se realizaron en viales de 4 mL con tapa roscadas con septa PTFE/ silicón. A cada vial se le agregaron 300 mg de mallas moleculares, 1 mmol de oxima y 50 mg de lipasa CAL-B. A esta mezcla con una jeringa se aplicó vacío con una bomba rotatoria durante 2 minutos. Posteriormente se introdujo nitrógeno a través del septum con una aguja hipodérmica conectada a un globo conteniendo el gas. A continuación se adicionaron 2 mL de disolvente ya sea acetato de etilo ó MTBE. Cada experimento se realizó por duplicado y se trabajó con un testigo que contaba con todos los componentes de la mezcla de reacción, excepto la enzima.

Los viales con las mezclas de reacción se agitaron a 250 rpm a 40, 50 y 60°C mediante una agitadora orbital. El seguimiento de las reacciones se realizó de acuerdo con lo establecido en la sección: Descripción de los métodos experimentales generales párrafo C) (ver página 53), a intervalos de tiempo de 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 y 168 horas, en las que se observó la desaparición parcial o completa en CCF.

3.6 Ensayos de acilación catalizada por lipasa CAL-B de oximas de vainillina, veratraldehído y acetofenona.

Las reacciones de acilación de las oximas de vainillina, veratraldehído y acetofenona, se realizaron en viales de 4 mL con tapa roscada y septa de PTFE/ silicón. A cada vial se le agregaron 300 mg de mallas moleculares, 1 mmol de oxima y 50 mg de CAL-B. La mezcla anterior se sometió a vacío, (30 mmHg aproximadamente) durante 2 minutos. Posteriormente, se suministró nitrógeno a través de un globo conectado a una aguja hipodérmica, que se introdujo en el vial a través de la septa. Posteriormente, con una jeringa de vidrio se adicionaron 2 mL de acetato de etilo como agente acetilante y como medio de reacción. Cada experimento se realizó por duplicado, y una reacción testigo, que contenía todos los reactivos y materiales, excepto la enzima.

Los viales con las mezclas de reacción se agitaron a 250 rpm, en una agitadora Thermo Scientific MaxQ450 con temperatura controlada por convección de aire, y se probó para cada reacción, una de las siguientes temperaturas: 40, 50, 60°C. El seguimiento de las reacciones en placa fina se realizó de acuerdo con lo establecido en la sección: Descripción de los métodos experimentales generales párrafo C), (ver página 53) a intervalos de tiempo de 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 horas hasta observar la transformación de la oxima-sustrato en el éster acetato de oxima.

3.7 Reacciones de acilación/eliminación catalizada por lipasa CAL-B de oximas de aldehídos aromáticos.

Las reacciones de acilación/eliminación de las oximas de vainillina, veratraldehído, 3-nitro benzaldehído, 4-hidroxi benzaldehído y 4-dimetilamino benzaldehído se realizaron en viales de 4 mL, con tapa roscada y septa de PTFE/ silicón. A cada vial se le agregaron 300 mg de mallas moleculares, 1 mmol de oxima y 50 mg de CAL-B. La mezcla anterior se sometió a vacío (30 mmHg aproximadamente) durante 2 minutos. Posteriormente, se suministró nitrógeno a través de un globo conectado a una aguja hipodérmica, que se introdujo en el vial a través de la septa. Consecutivamente, con una jeringa de vidrio se adicionaron 2 mL de acetato de etilo (como disolvente y medio de reacción), y se agregó 2 mmol acetato de vinilo como agente acilante. Cada experimento se realizó por duplicado, además de una reacción testigo, que contuvo todos los reactivos y materiales, excepto la enzima.

Los viales con las mezclas de reacción se agitaron a 250 rpm, a una temperatura de 80°C. El seguimiento de las reacciones se realizó de acuerdo con lo establecido en la sección: Descripción de los métodos experimentales generales párrafo C), (ver página 53) a intervalos de tiempo de 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 168 horas en las que se observó la desaparición parcial o completa (de acuerdo con la temperatura) de los sustratos.

Al término de la reacción, los productos de las reacciones de las síntesis enzimáticas, se secaron al vacío y se pesaron muestras de 50 mg para su posterior determinación análisis estructural mediante GC-MS y RMN de ^1H , ^{13}C .

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Síntesis mecanoquímica de oximas.

Los resultados obtenidos de la síntesis mecanoquímica de los distintos aldehídos: vainillina, veratraldehído, 3-nitro benzaldehído, 4-hidroxi benzaldehído y 4-dimetilamino benzaldehído utilizando los diferentes materiales de soporte se efectuó de acuerdo al método utilizado por Aakeröy *et al.* (2012) durante 30 minutos. Las oximas obtenidas indican la presencia de los dos isómeros (**Sin/Anti**), en proporciones similares a las obtenidas por síntesis química tradicional realizada en el laboratorio. El equilibrio favorece a la oxima **Anti**, en proporción 3:1, aproximadamente, de acuerdo a observaciones cualitativas por cromatografía en capa fina. Los rendimientos de las oximas obtenidas mecanoquímicamente fueron variables, como resultado del uso de diferentes soportes. La naturaleza química del soporte fue determinante, el cual no sólo actuó para promover la fuerza impulsora mecanoquímica durante la molienda. No obstante, cada uno de los materiales empleados se secó previamente a su uso y en la molienda se produjeron polvos de todos los utilizados, su naturaleza básica determinó la magnitud de la conversión, en virtud de que los materiales básicos actuaron como base para neutralizar el clorhidrato, con la liberación de la hidroxilamina nucleofílica, para favorecer la reacción de síntesis de la oxima. Así por ejemplo, el uso de carbonato de sodio, tetraborato de sodio y oxalato de amonio, especies básicas como materiales de soporte, permitieron que las reacciones fueran completas, en comparación con hexametilentetramina, con la cual aún se observó aldehído remanente, observado mediante CCF. En el caso del uso de cafeína, no obstante que fue seleccionado como material de soporte básico, el producto, la oxima obtenida, no pudo ser extraído selectivamente de la cafeína, debido a la solubilidad de la misma, en el disolvente orgánico utilizado.

Por otro lado, el método de extracción de la oxima a partir de la mezcla de reacción, principalmente del soporte, fue maceración a temperatura ambiente durante 10

minutos con 20 mL de acetato de etilo como disolvente. Por lo que otro factor que pudo determinar el rendimiento de la oxima recuperada, fue la diferente adsorción de la oxima por el soporte, afectando la cantidad extraída de la misma. Por lo anterior, se procedió a comparar dos métodos de extracción de la oxima de cada uno de los cinco aldehídos utilizados.

4.1.1. Evaluación del método de extracción en las reacciones mecanoquímicas de oximas.

Como puede observarse en la TABLA 4.1, el rendimiento del producto obtenido extraído de la mezcla de reacción, mediante modificación de pH, mejoró sustancialmente, comparado con el método de maceración, no obstante que el disolvente de extracción fue el mismo. Una explicación es que el pH de la mezcla de la reacción mecanoquímica es alcalino, toda vez que los materiales de soporte utilizados son de naturaleza básica, lo cual conduce a una reacción ácido-base de la oxima con el soporte básico conducente a un par iónico que produce una mayor retención por adsorción de la especie aniónica de la oxima por el soporte (FIGURA 4.1), con una disminución del rendimiento de la oxima en la extracción por maceración, comparada con la oxima no ionizada.

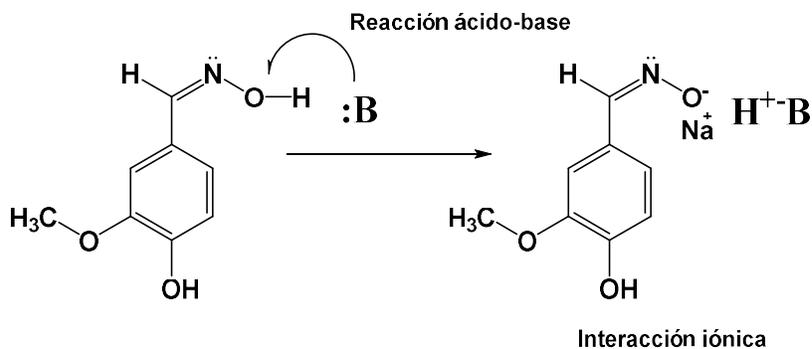


FIGURA 4.1. Reacción ácido-base oxima-soporte básico con formación de un par iónico

TABLA 4.1 Rendimiento de los productos de las reacciones mecanoquímicas

Aldehído	Material de soporte	(%R) oxima	
		Modificación pH	Maceración
vainillina	carbonato de sodio	80	21
	tetraborato de sodio	81	19
	amonio oxalato	84	55
	hexametilentetramina	85	14
veratraldehído	carbonato de sodio	72	61
	tetraborato de sodio	78	38
	amonio oxalato	74	44
	hexametilentetramina	78	69
4-hidroxi benzaldehído	carbonato de sodio	93	47
	tetraborato de sodio	87	41
	amonio oxalato	93	41
	hexametilentetramina	83	49
3-nitro benzaldehído	carbonato de sodio	80	76
	tetraborato de sodio	76	19
	amonio oxalato	68	41
	hexametilentetramina	90	89
4-dimetilamino benzaldehído	carbonato de sodio	82	52
	tetraborato de sodio	78	51
	amonio oxalato	64	41
	hexametilentetramina	74	40

Quando se utilizó el método de extracción por modificación de pH, que consistió en conducirlo a la neutralidad con HCl diluido, se redujeron sustancialmente las interacciones iónicas, con lo que el rendimiento del producto obtenido aumentó considerablemente en cada una de las reacciones mecanoquímicas realizadas, la

mayoría de ellas por arriba del 80% de rendimiento. Se eligió la oxima de cada grupo con el mejor rendimiento para realizarle análisis de IR.

4.1.2. Análisis de los espectros de infrarrojo de las aldoximas

Los productos de las reacciones de síntesis mediante el empleo de mecanoquímica y de extracción con modificación de pH, se analizaron por espectroscopía infrarroja, obteniéndose los siguientes resultados (en el apéndice A se muestran los espectros). Cabe destacar la presencia de las bandas características de absorción de las oximas: (C=N-OH) que revelan la obtención de este grupo funcional. A continuación se indican las frecuencias de absorción características de cada compuesto obtenido:

Oxima de vainillina

Las bandas características de absorción de la oxima de vainillina que se obtuvieron en el análisis fueron las siguientes: 3138 cm^{-1} (ν -**N-O-H**), $1028\text{-}969\text{ cm}^{-1}$ (ν **N-O**), 1642 cm^{-1} (ν -**C=N**), 1597 cm^{-1} , 1515 cm^{-1} , 852 cm^{-1} (ν -C=C del anillo aromático), 1287 cm^{-1} (**C-O-H**), 1428 cm^{-1} , 1374 cm^{-1} (ν -C-CH₃), 1155 cm^{-1} , 1117 cm^{-1} (ν C-O). Chauhan (2014), reportó valores de absorción similares en $3328\text{-}3160\text{ cm}^{-1}$ pertenecientes a la vibración del enlace **N-O-H**, $1012\text{-}984\text{ cm}^{-1}$ pertenecientes al estiramiento del enlace **N-O**, 1664 cm^{-1} otorgado por el estiramiento del enlace **C=N**, para las asignaciones al C-C del anillo aromático son $1609\text{-}1513\text{-}840\text{ cm}^{-1}$, para las flexiones provocadas por el **C-O-H** esta la señal 1279 cm^{-1} , para el estiramiento de -CH₃ se encuentran las señales $1362\text{-}1439\text{ cm}^{-1}$, Finalmente una vibración de estiramiento C-O $1111.3\text{-}1168\text{ cm}^{-1}$, que se presenta en 1117 cm^{-1} . Por lo anterior se puede considerar que la similitud entre las bandas obtenidas en el análisis y las reportadas obedecen a la misma estructura.

Oxima de veratraldehído

Para esta oxima se tienen las frecuencias siguientes: 3447 cm^{-1} (ν -**N-O-H**), 3015 cm^{-1} , 2924 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} , 1417 cm^{-1} , 1378 cm^{-1} , 1230 cm^{-1} , 1017 cm^{-1} , 913 cm^{-1} , 756 cm^{-1}

¹, mientras que lo reportado por Vijayendar *et al.* (2015), solo reporta la presencia de una banda de 3685 cm^{-1} perteneciente a la vibración del enlace **N-O-H** de la molécula, la cual se encuentra a una frecuencia mucho mayor a la de este trabajo, por otra parte el resto de las frecuencias coinciden con los resultados: 3020 cm^{-1} , 2928 cm^{-1} , 2400 cm^{-1} , 1515 cm^{-1} , 1424 cm^{-1} , 1383 cm^{-1} , 1215 cm^{-1} , 1025 cm^{-1} , 928 cm^{-1} , 760 cm^{-1} y 669 cm^{-1} .

Oxima de 4-hidroxi benzaldehído

En cuanto a la caracterización de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído se obtuvieron las siguientes bandas características del compuesto, que son: $3364\text{-}3052\text{ cm}^{-1}$ pertenecientes al estiramiento del enlace **-O-H**, 1631 cm^{-1} debido al enlace **C=N** y $1605\text{-}1516\text{ cm}^{-1}$ que pertenecen al enlace C=C del anillo aromático. Esto concuerda con lo reportado por Bezborodov *et al.* (2003), quienes solo mencionan las bandas importantes en las siguientes frecuencias: $3595\text{-}3040\text{ cm}^{-1}$ (ν -**O-H**), 1675 cm^{-1} (ν -**C=N**) y $1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ (ν -C=C del anillo aromático).

Oxima de 3-nitro benzaldehído

Los resultados de la oxima de 3-nitro benzaldehído fueron las siguientes: 3289 cm^{-1} (ν **N-OH**), 1294 cm^{-1} (γ **N-OH**), 1618 cm^{-1} (ν **C=N**), 2923 cm^{-1} (γ C-C anillo aromático), 1307 cm^{-1} (γ C-C anillo aromático), 939 cm^{-1} (δ C-C anillo aromático), 1098 cm^{-1} (ν C-H), 976 cm^{-1} (ν **N-O**), 1532 cm^{-1} (ν **O-N**), 1350 cm^{-1} (ν NO+ δ ONO), 841 cm^{-1} (τ HCCN+ τ HCNO), 806 cm^{-1} (δ ONO). El trabajo de Gokce y Bahceli (2011) reporta las siguientes bandas de absorción para el mismo compuesto: 3296 cm^{-1} en el que determina el estiramiento del enlace **N-O-H**, una flexión en el plano de 1251 cm^{-1} debido al **O-H**, 1620 cm^{-1} se encuentra la banda que representa el estiramiento del **C=N**, las señales correspondientes al anillo aromático se encuentran en 2925 cm^{-1} por vibración dentro del plano del enlace C-H y a $1350\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ fuera del plano, para las determinaciones del grupo nitro se encuentran las señales a 1107 cm^{-1} para la vibración del C-N, 983 cm^{-1} para la vibración del N-O, entre 1540 cm^{-1} y 1348 cm^{-1} se encuentran las características simétricas del grupo nitro mostrándose fuertes

vibraciones entre los enlaces N-O y O-N-O, en 850 cm^{-1} se encuentra el balanceo de tijeras del NO_2 dentro del plano y a 813 cm^{-1} fuera del plano.

Oxima de 4-dimetilamino benzaldehído

Las bandas obtenidas en el análisis de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído fueron las siguientes: 3202 cm^{-1} , 2913 cm^{-1} , 2802 cm^{-1} , 1601 cm^{-1} , 1523 cm^{-1} , 1359 cm^{-1} , 1301 cm^{-1} , 1224 cm^{-1} , 1185 cm^{-1} , 951 cm^{-1} , 867 cm^{-1} , 808 cm^{-1} , 727 cm^{-1} . Los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Safaei-Ghomi y Masoomi (2014) quienes determinaron la presencia de las siguientes frecuencias en el espectro de IR del compuesto obtenido 3239 cm^{-1} , 2911 cm^{-1} , 2803 cm^{-1} , 1605 cm^{-1} , 1524 cm^{-1} , 1359 cm^{-1} , 1303 cm^{-1} , 1224 cm^{-1} , 1176 cm^{-1} , 954 cm^{-1} , 865 cm^{-1} , 811 cm^{-1} , 730 cm^{-1} .

4.2 Estudio de la Isomerización de las oximas *Sin/Anti* de vainillina y veratraldehído

Las reacciones de isomerización de las oximas de vainillina y veratraldehído se siguieron por CCF. La proporción de las oximas *Sin/Anti* de ambos aldehídos permaneció constante cuando los ensayos de isomerización se realizaron en MTBE, a cualquiera de las temperaturas probadas, sin observar cambios en la proporción mediante CCF (FIGURA 4.2). Pero cuando los ensayos de isomerización se realizaron en acetato de etilo como disolvente, si bien no cambió la proporción cualitativa aparente de la mezcla *Sin/Anti*, se apreció la formación de un producto menos polar, que de acuerdo con las condiciones experimentales de la reacción sólo puede corresponder al éster acetato de las oximas de ambos sustratos (consistente con la única mancha posible, con mayor factor de retención que la oxima, a partir de la cual se formó, como podrá corroborarse con los resultados experimentales siguientes en el presente trabajo). Otro resultado consistente, al menos cualitativamente, es que al aumentar la temperatura aumenta la proporción de éster de oxima formado.

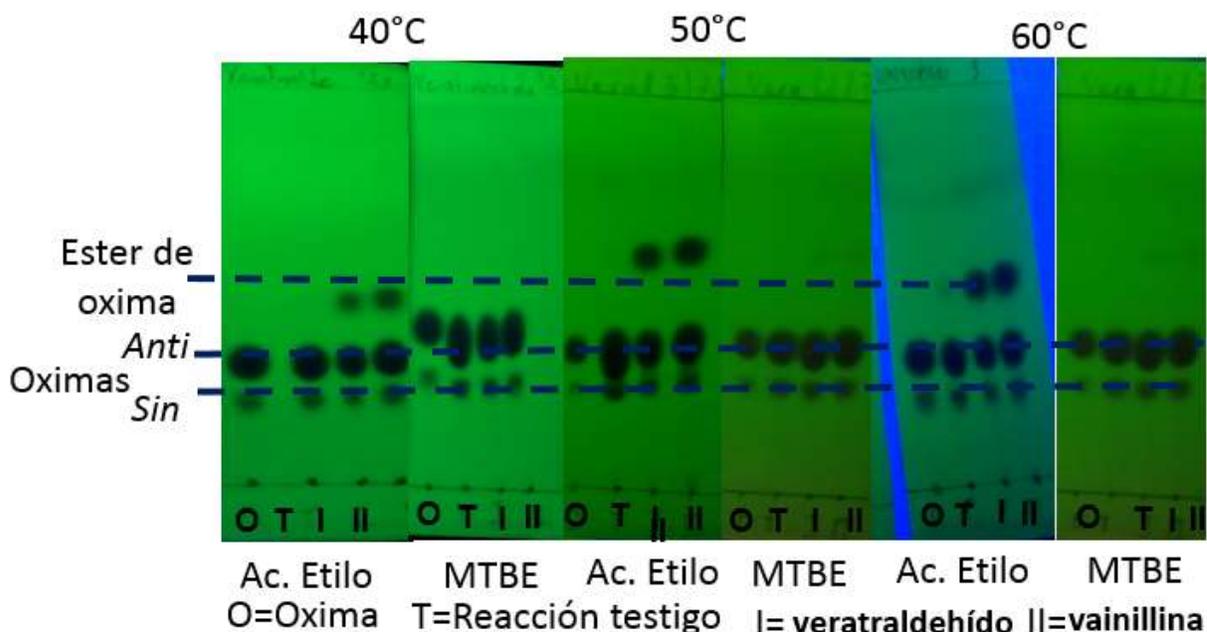


FIGURA 4.2 Estudio de las reacciones de Isomerización de las oximas **Sin/Anti** de vainillina y veratraldehído en MTBE y Acetato de etilo a 40,50 y 60°C.

Es decir, la proporción de la mezcla de oximas **Sin/Anti** no varía, al menos cualitativamente, en el disolvente MTBE a cualquier temperatura. Asimismo, aun cuando tampoco varía la proporción **Sin/Anti** de ambas oximas en acetato de etilo como disolvente, éste puede actuar como sustrato acilante para la enzima de *Candida antarctica* fracción-B y acetilar a la oxima, aumentando la proporción de éster en la mezcla, conforme la temperatura aumenta de 40 a 50 a 60°C.

4.3. Reacciones de acetilación de las oximas de veratraldehído y acetofenona con acetato de etilo como agente acetilante y disolvente de la reacción catalizadas por CAL-B a 40, 50 y 60°C.

Se probaron las oximas de vainillina, veratraldehído y acetofenona, dos aldehídos aromáticos y una cetona aromática, como sustratos de CAL-B, en la reacción de acetilación con acetato de etilo como agente acetilante y como medio de reacción.

En este ensayo la oxima de acetofenona no fue convertida en el éster acetato en las condiciones probadas. Por otra parte las oximas de veratraldehído y vainillina mostraron la formación parcial del producto con un Fr distinto en comparación con el Fr de la oxima usada como sustrato. La reacción se dio por terminada a las 120 horas ya que no se observaron cambios significativos posteriores (FIGURA 4.3).

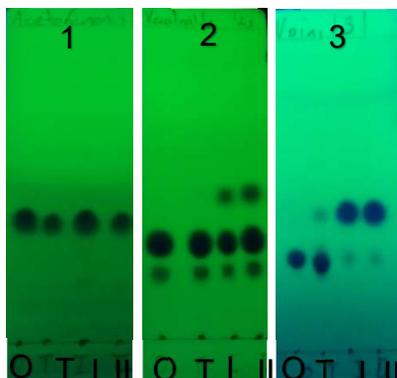


FIGURA 4.3 CCF de las reacciones enzimáticas de acilación a 40°C a las 120 h, (1) oxima de acetofenona, (2) oxima de veratraldehído y (3) oxima de vainillina en acetato de etilo, O=oxima, T= reacción testigo, I y II= reacciones enzimáticas.

Al aumentar la temperatura a 50°C, se observaron resultados similares respecto a la reacción a 40°C. La oxima de acetofenona no mostró transformación en 120 h, mientras que las oximas de veratraldehído y vainillina mostraron una mayor conversión cualitativa, catalizada por CAL-B con respecto a la observada mediante CCF a 40°C (FIGURA 4.4).

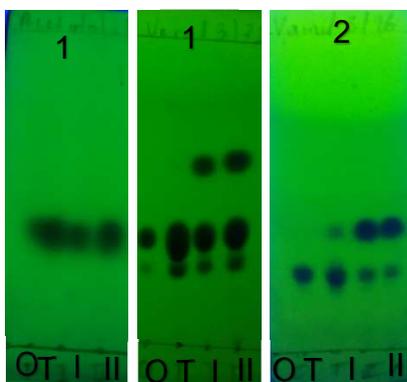


FIGURA 4.4 CCF de las reacciones enzimáticas de acilación a 50°C, (1) oxima de acetofenona; (2) oxima de veratraldehído y (3) oxima de vainillina en acetato de etilo, O=oxima, T= testigo, I y II= reacciones enzimáticas

Cuando se realizaron los experimentos de la misma reacción de acetilación de las oximas de acetofenona, veratraldehído y vainillina con acetato de etilo, utilizando CAL-B y aumentando la temperatura a 60°C, la oxima de acetofenona permaneció sin transformación, mientras que la oxima de veratraldehído fue biocatalíticamente convertida en el éster de la oxima en una mayor proporción que los ensayos anteriores a 40 y 50°C (FIGURA 4.5). En este caso, la reacción no fue completa y se dio por finalizada a las 72 horas, cuando ya no se vio un avance en la conversión por acción de la enzima. La oxima de vainillina fue transformada por CAL-B completamente en el éster, tras 72 horas de reacción a 60°C. De acuerdo a los resultados observados, la mejor temperatura para llevar a cabo la reacción de acilación de la oxima de vainillina es 60°C, ya que el tiempo de reacción es menor y se aprecia una conversión completa del sustrato.

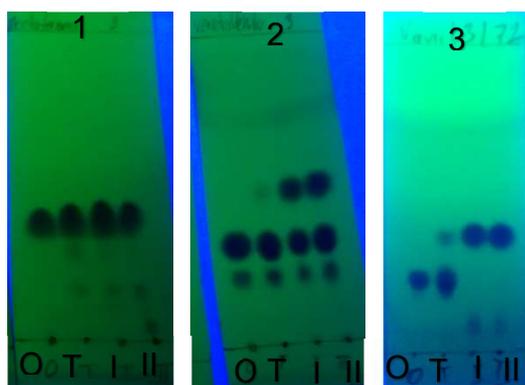


FIGURA 4.5 CFF de las reacciones enzimáticas de acilación a 60°C, (1) oxima de acetofenona, (2) oxima de veratraldehído y (3) oxima de vainillina en acetato de etilo, O=oxima, T= testigo, I y II= reacciones enzimáticas.

4.4. Reacción de acilación/eliminación de las oximas de aldehídos aromáticos promovida por CAL-B a 80°C.

De acuerdo con resultados preliminares, no adicionados al presente trabajo, la temperatura más adecuada para efectuar la reacción de acilación-eliminación de las oximas propuestas con acetato de vinilo como agente acetilante y acetato de etilo como el disolvente de la reacción, fue de 80°C. Como parte de la caracterización estructural de los productos, se analizó la mezcla de reacción de acilación/eliminación de las distintas oximas empleadas mediante GC-MS, al inicio y al final de la reacción, los resultados obtenidos de acuerdo con la información proporcionada por el cromatograma-espectro de masas que se muestran en las TABLAS 4.2.-4.6 contienen los siguientes datos: tiempo de retención, ión molecular y pico base corresponden con el sustrato y el producto de la reacción obtenida, que además es concordante con lo observado en CCF. Los resultados se muestran a continuación para cada uno de las oximas utilizadas.

4.4.1. Reacción de acilación/eliminación de la oxima de vainillina promovida por CAL-B a 80°C

En la FIGURA 4.6, se muestra la cromatoplaaca de CCF de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de vainillina a 80°C. Por comparación de Fr se observó la presencia de un producto similar al aldehído (puesto como referencia, al no contar con el nitrilo correspondiente), en la reacción enzimática (R), la conversión fue completa a las 160 horas, mientras que en la TABLA 4.2 se confirma la formación del nitrilo.

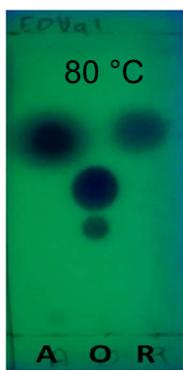


FIGURA 4.6 CCF de la reacción de acilación/eliminación de la OVa con acetato de vinilo como agente acilante [1:2] en acetato de etilo promovida por CAL-B. A= aldehído, O= reacción testigo, R= reacción enzimática.

TABLA 4.2 Análisis por GC-MS de las mezclas de reacción de la oxima de vainillina a 80°C

N° de pico	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Pico Base	Ion molecular (M ⁺)
1	Vainillina	3.6	151	152
2	4-hidroxi-3-metoxi benzonitrilo	4.2	134	149
3	Oxima de vainillina	7.3	167	167

4.4.2. Reacción de acilación/eliminación de la oxima de veratraldehído promovida por CAL-B a 80°C.

Similarmente a la oxima de vainillina, en la FIGURA 4.7, se muestra la cromatoplaaca de CCF de la reacción acilación/eliminación de la oxima de veratraldehído a 80°C, observándose la presencia de un producto similar al veratraldehído por comparación de su Fr en la reacción enzimática (R). De la misma manera, la conversión de la oxima fue completa en 160 horas.



FIGURA 4.7 CCF de la reacción de Acilación/ Eliminación de la OVe con acetato de vinilo como agente acilante [1:2] en acetato de etilo promovida por CAL-B. A= aldehído, O= reacción testigo, R= reacción enzimática.

Como puede observarse en la tabla 4.3, de acuerdo con los datos espectrométricos de masas, el nitrilo obtenido fue el propuesto para esta transformación de acilación/eliminación promovida por CAL-B.

TABLA 4.3 Análisis por GC-MS de las mezclas de reacción de la oxima de veratraldehído a 80°C

N° de pico	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Pico Base	Ion molecular (M ⁺)
1	veratraldehído	4.59	166	166
2	3,4-dimetoxi benzonitrilo	4.83	163	163
3	oxima de veratraldehído	9.37	181	181

4.4.3. Reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído promovida por CAL-B a 80°C.

De acuerdo con la FIGURA 4.8, la cromatoplaça de CCF de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído a 80°C, muestra la presencia de un producto similar al 4-hidroxi benzaldehído, por comparación de su Fr en la reacción enzimática (R). De la misma manera, la conversión de la oxima en el producto nitrilo esperado fue alta a las 160 horas. Esta biotransformación se corrobora con los resultados espectrométricos de masas de la oxima y el producto indicados en la TABLA 4.4.

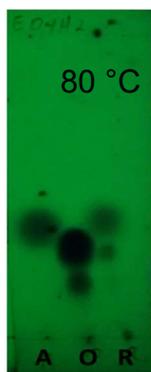


FIGURA 4.8 CCF de las reacción de Acilación/Eliminación de la O4-Hi con acetato de vinilo como agente acilante [1:2], en acetato de etilo promovida por CAL-B. A= aldehído, O= reacción testigo, R= reacción enzimática.

TABLA 4.4 Análisis por GC-MS de las mezclas de reacción de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído a 80°C

N° de pico	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Pico Base	Ion molecular (M ⁺)
1	4-hidroxi benzaldehído	3.15	121	122
2	4-hidroxi benzonitrilo	3.58	119	119
3	oxima de 4-hidroxi benzaldehído	5.31	137	137

4.4.4 Reacción de acilación/eliminación de la oxima de 3-nitro benzaldehído promovida por CAL-B a 80°C.

Como puede observarse, en la FIGURA 4.9, se muestra la cromatoplaça de CCF de la reacción acilación/eliminación de la oxima de 3-nitro benzaldehído a 80°C, observándose la presencia de un producto similar al 3-nitro benzaldehído por comparación de su Fr en la reacción enzimática (R). La conversión de la oxima en el nitrilo fue completa en 160 horas, tal como se observó con las oximas precedentes.

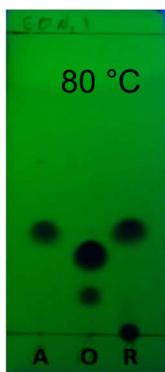


FIGURA 4.9 CCF de las reacción de Acilación/Eliminación de la oxima de 3-Nitrobenzaldehído con acetato de vinilo como agente acilante [1:2], en acetato de etilo promovida por CAL-B. A= aldehído, O= reacción testigo, R= reacción enzimática.

Como con las oximas precedentes, en este caso se comprueba la obtención del nitrilo propuesto, de acuerdo a los datos espectrométricos de masas de la TABLA 4.5.

TABLA 4.5 Análisis por GC-MS de las mezclas de reacción de la oxima de 3-nitro benzaldehído a 80°C

N° de pico	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Pico Base	Ion molecular (M^+)
1	3- nitro benzaldehído	2.8	151	152
2	3-nitro benzonitrilo	3.17	102	148
3	oxima de 3-nitro benzaldehído	8.00	166	166

4.4.5 Reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-dimetil amino benzaldehído promovida por CAL-B a 80°C.

Como puede observarse, en la FIGURA 4.10, se muestra la cromatopla de CCF de la reacción acilación-eliminación de la oxima de 4-dimetilaino benzaldehído a 80°C, observándose la presencia de un producto similar al 4-dimetilamino benzaldehído por

comparación de su Fr en la reacción enzimática (R). La conversión de la oxima en el nitrilo fue completa en 160 horas, tal como se observó con las oximas precedentes.



FIGURA 4.10 CCF de las reacción de Acilación/Eliminación de la oxima de 4-Dimetilamino benzaldehído con acetato de vinilo como agente acilante [1:2], en acetato de etilo promovida por CAL-B. A= aldehído, O= reacción testigo, R= reacción enzimática.

TABLA 4.6 Análisis por GC-MS de las mezclas de reacción de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído a 80°C

N° de pico	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Pico Base	Ion molecular (M ⁺)
1	4-dimetilamino benzaldehído	6.00	148	149
2	4-dimetilamino benzonitrilo	6.12	145	146
3	Oxima de 4-dimetilamino benzaldehído	9.69	164	164

Los resultados obtenidos de las reacciones de acilación/eliminación de las oximas probadas con acetato de vinilo como sustrato acetilante y acetato de etilo como disolvente, promovidas por CAL-B, permiten concluir que procedieron con alta conversión, de acuerdo con el análisis por CCF y CG-EM. De acuerdo con los resultados, la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído, fue la que mostró una conversión

no completa del 95%, de acuerdo con la cuantificación por CG-EM (ver en la sección 4.5). Esto puede atribuirse al fuerte efecto electrodonador del grupo dimetil amino en la posición **para** respecto al sitio reactivo de la oxima, en el anillo aromático, fuertemente estabilizante y que en consecuencia, disminuye la velocidad de la reacción de acetilación de la oxima, que precede a la de eliminación del éster de oxima intermediario, para dar el nitrilo esperado. En comparación con el grupo dimetil amino (en el cual el N es el átomo responsable del efecto estabilizante), los demás sustituyentes en los otros sustratos (oximas), tienen al oxígeno, un elemento también estabilizante y retardante de la reacción, pero en menor grado por ser un elemento más electronegativo.

4.5. Interpretación Estructural de los resultados por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

A continuación el análisis de los resultados de GC-MS muestran el producto de la reacción de acilación/eliminación, promovida por CAL-B, de cada una de las oximas estudiadas. El nitrilo observado de acuerdo con los datos espectrométricos de masas en cada caso (lón molecular, pico base y correlación con la base de datos de espectros de masas de la biblioteca NIST), corresponde al esperado de cada a oxima acetilada mediante la reacción de acilación con acetato de vinilo catalizada por CAL-B.

4.5.1 Cromatograma y espectro de masas del producto de la mezcla de reacción de acilación/ eliminación de la oxima de vainillina catalizada por CAL-B a 80°C.

En la FIGURA 4.11, se observa el pico cromatográfico con un tiempo de retención de 4.03 min y en la FIGURA 4.12, puede apreciar del espectro de masas del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de vainillina catalizada por CAL-B a 80°C. El producto es 4-hidroxi-3-metoxi benzonitrilo. Los datos espectrométricos de

masas (Ión molecular, pico base y correlación con la base de datos de espectros de masas de la biblioteca NIST) de la FIGURA 4.13, confirman la estructura esperada.

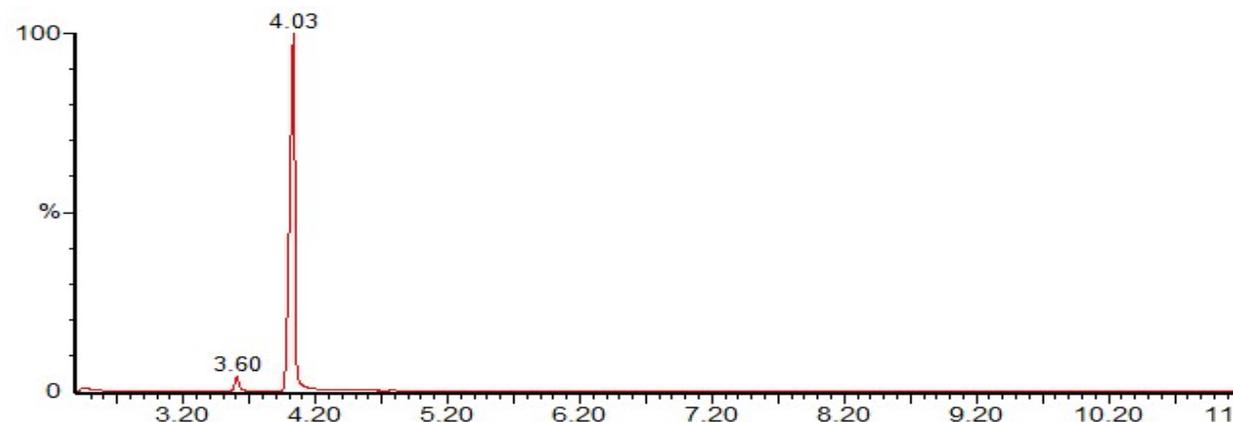


FIGURA 4.11 Cromatograma del pico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de vainillina catalizada por CAL-B a 80°C.

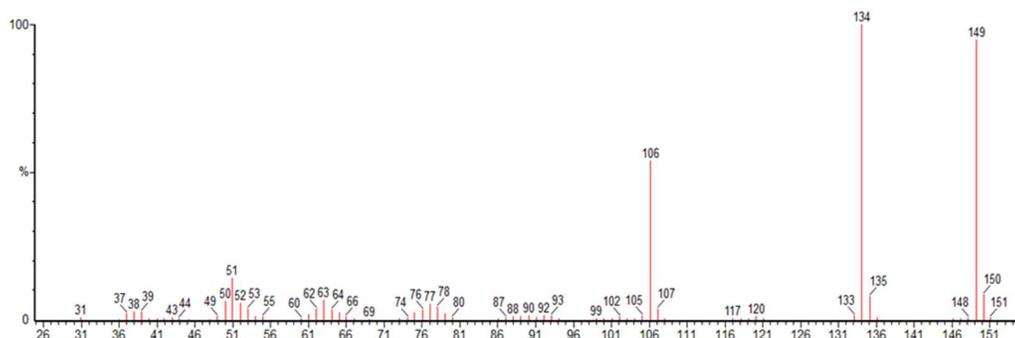


FIGURA 4.12 Espectro de masas del pico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de vainillina catalizada por CAL-B a 80°C.

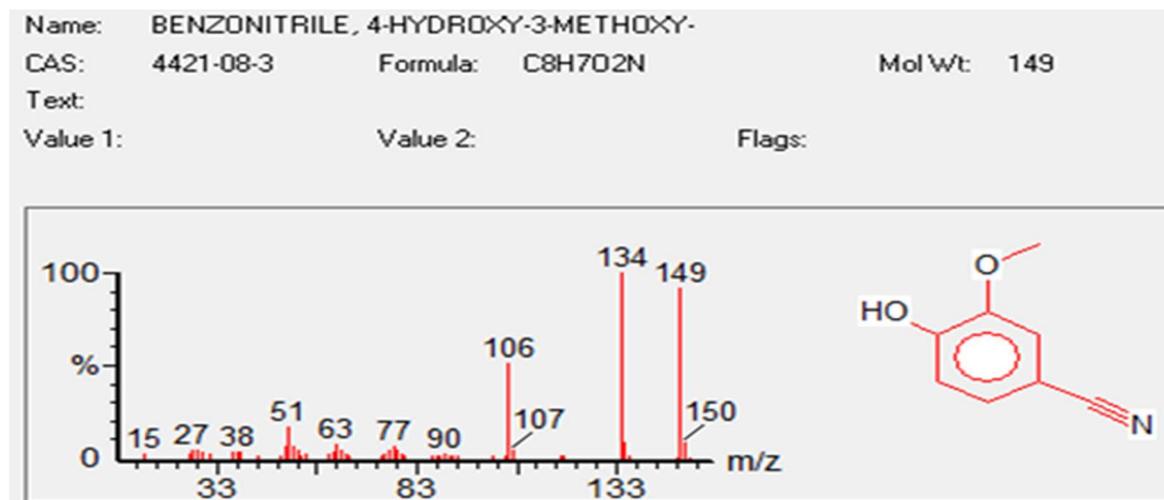


FIGURA 4.13 Espectro de masas y estructura obtenidos en la biblioteca NIST por comparación con el Espectro de Masas del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de vainillina catalizada por CAL-B a 80°C. El producto es 3-hidroxi-4-metoxi benzonitrilo.

4.5.2. Cromatograma y espectro de masas del producto de la mezcla de reacción de acilación/eliminación de la oxima de veratraldehído catalizada por CAL-B a 80°C.

En la FIGURA 4.14, se observa el pico cromatográfico (tiempo de retención 4.82 min), del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de veratraldehído catalizada por CAL-B a 80°C. El producto es 3,4-dimetoxi benzonitrilo como se puede apreciar del espectro de masas del producto (FIGURA 4.15). Los datos espectrométricos de masas (ión molecular, pico base y correlación con la base de datos de espectros de masas de la biblioteca NIST) de la FIGURA 4.16, confirman la estructura esperada.

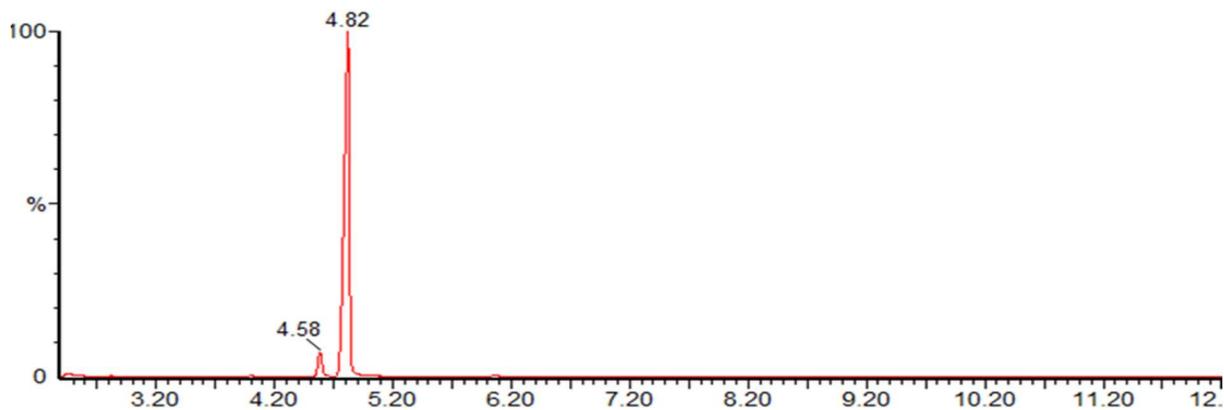


FIGURA 4.14 Cromatograma del pico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de veratraldehído catalizada por CAL-B a 80°C.

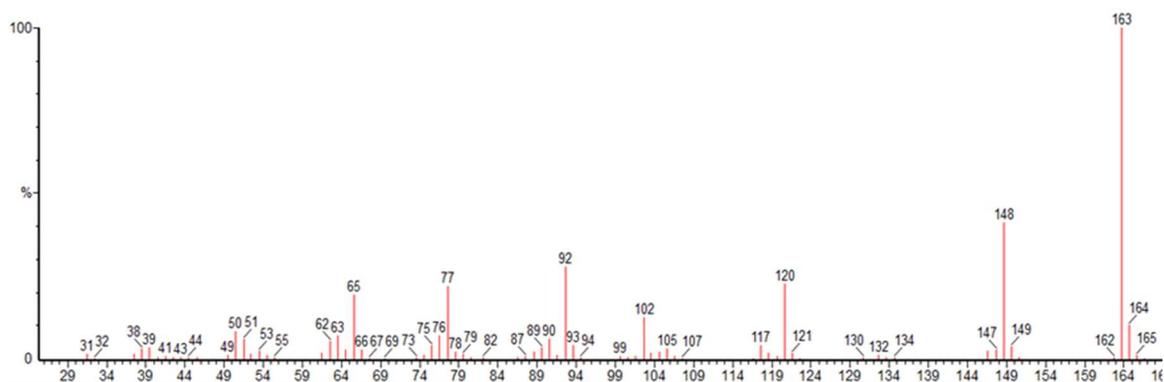


FIGURA 4.15 Espectro de masas del pico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de veratraldehído catalizada por CAL-B a 80°C.

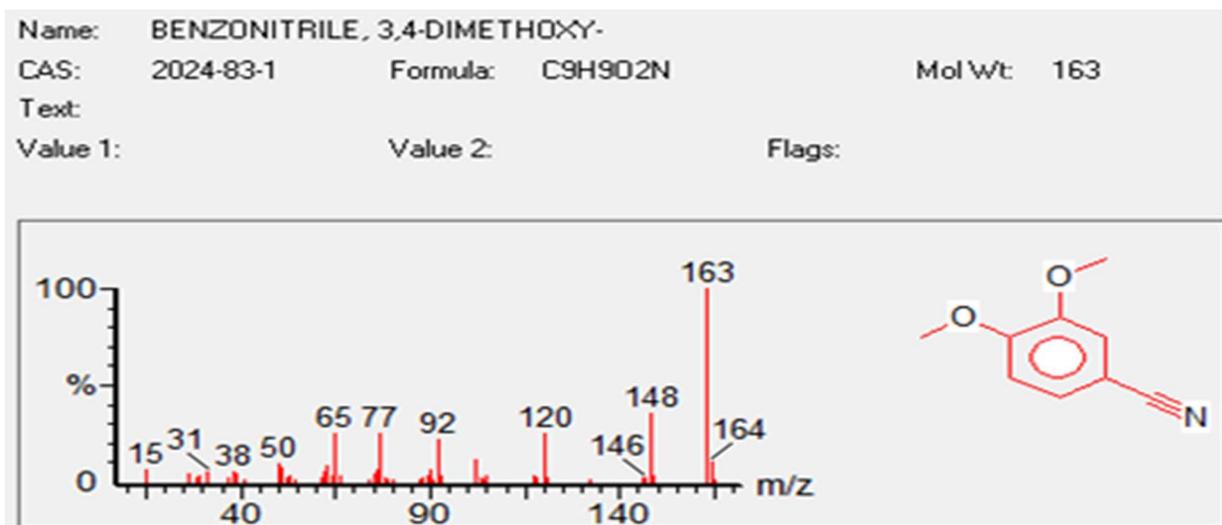


FIGURA 4.16 Espectro de masas y estructura obtenidos en la biblioteca NIST por comparación con el Espectro de Masas del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de veratraldehído catalizada por CAL-B a 80°C. El producto es 3,4-dimetoxi benzonitrilo.

4.5.3 Cromatograma y espectro de masas del producto de la mezcla de reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.

En la FIGURA 4.17, se observa el pico cromatográfico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C. El tiempo de retención del producto es 3.62 min. El producto es 4-hidroxi benzonitrilo como se puede apreciar del patrón de fragmentación del espectro de masas del producto (FIGURA 4.18). Los datos espectrométricos de masas en cada caso (Ión molecular, pico base y correlación con la base de datos de espectros de masas de la biblioteca NIST) de la FIGURA 4.19, confirman la estructura esperada.

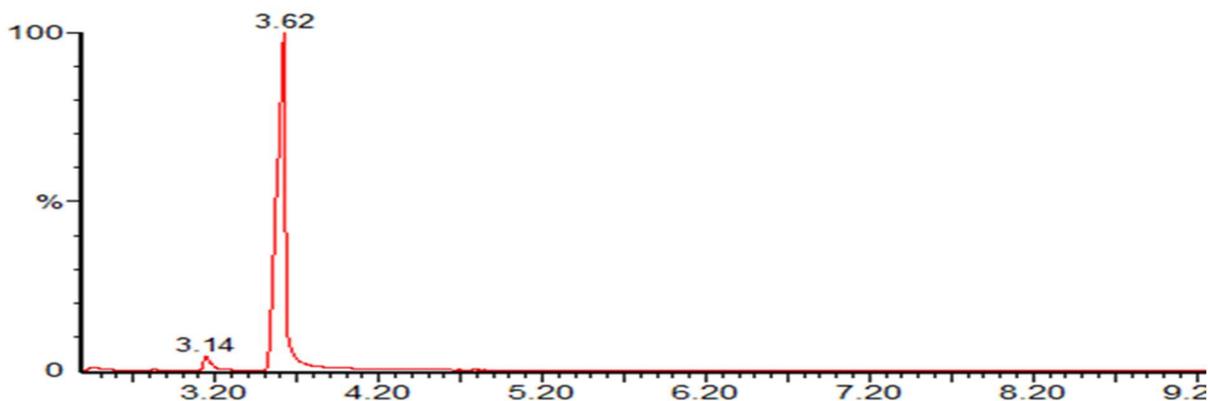


FIGURA 4.17 Cromatograma de la mezcla de reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.

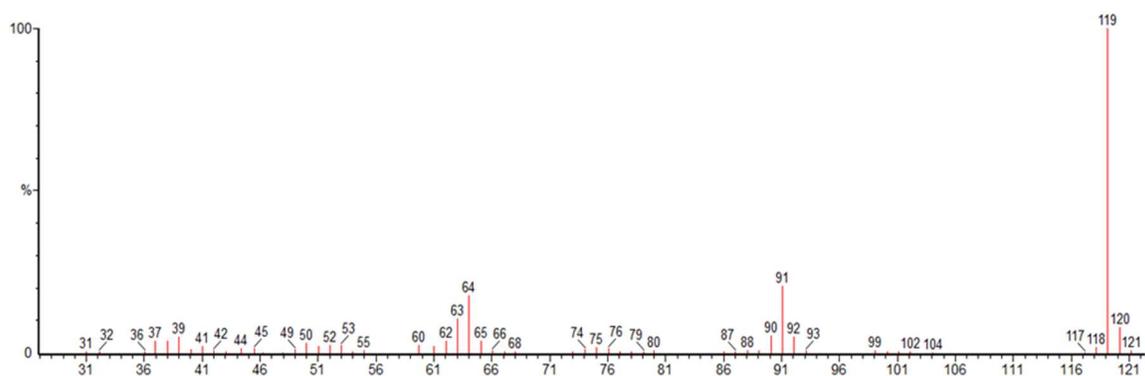


FIGURA 4.18 Espectro de masas del pico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.

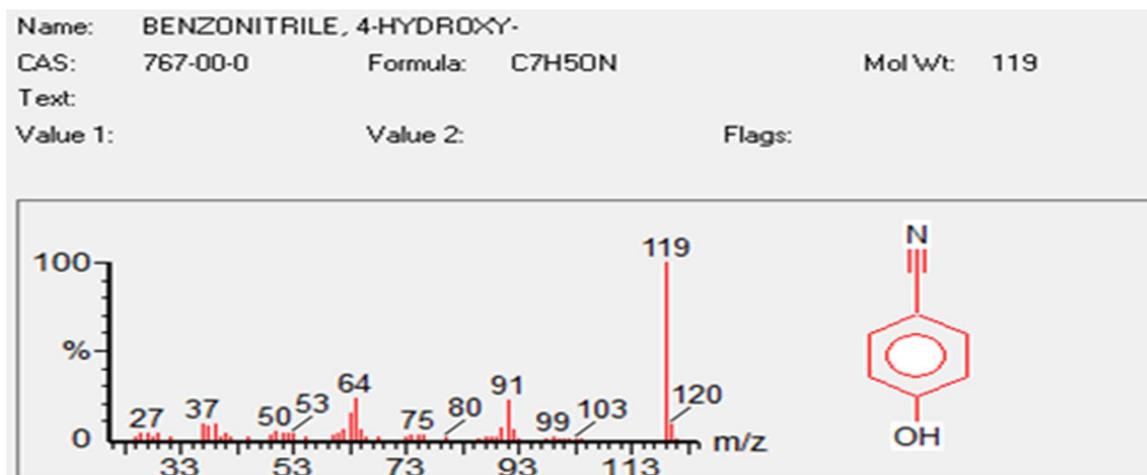


FIGURA 4.19 Espectro de masas y estructura obtenidos en la biblioteca NIST por comparación con el Espectro de Masas del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C. El producto es 4-hidroxi benzonitrilo.

4.5.4 Cromatograma y espectro de masas del producto de la mezcla de reacción de acilación/eliminación de la oxima de 3-nitro benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.

En la FIGURA 4.20, el pico cromatográfico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de 3-nitro benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C, aparece con un tiempo de retención de 3.18 min. De acuerdo con el patrón de fragmentación del espectro de masas del producto, de la FIGURA 4.21, el producto es 3-nitro benzonitrilo como se puede apreciar, por comparación con los datos espectrométricos de masas (ión molecular, pico base y correlación con la base de datos de espectros de masas de la biblioteca NIST, que en la FIGURA 4.22, confirman la estructura esperada.

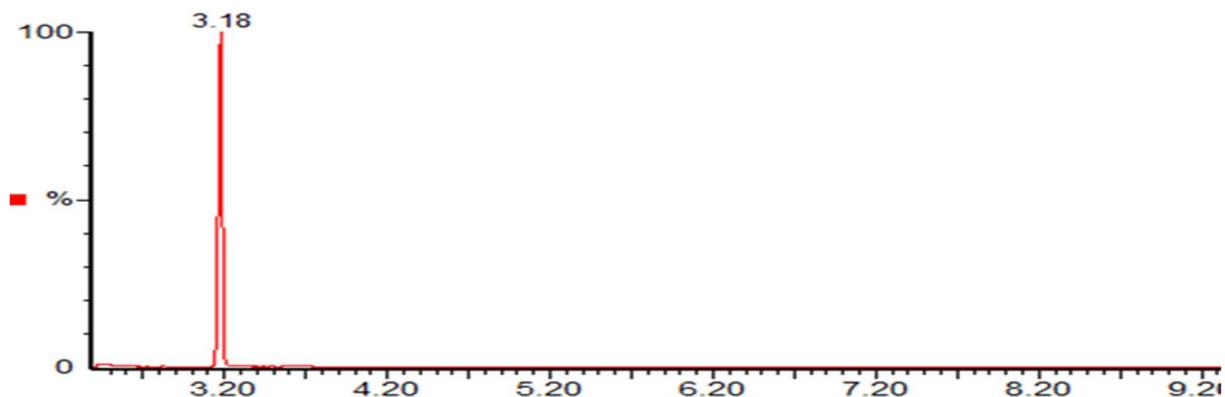


FIGURA 4.20. Cromatograma de la mezcla de reacción de acilación/eliminación de la oxima de 3-nitrobenzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C

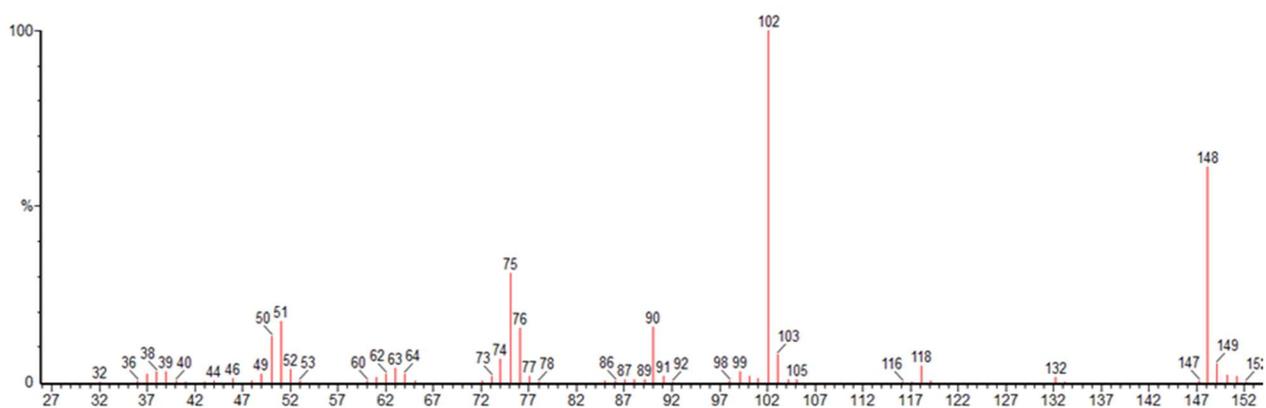


FIGURA 4.21 Espectro de masas del pico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de 3-Nitrobenzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.

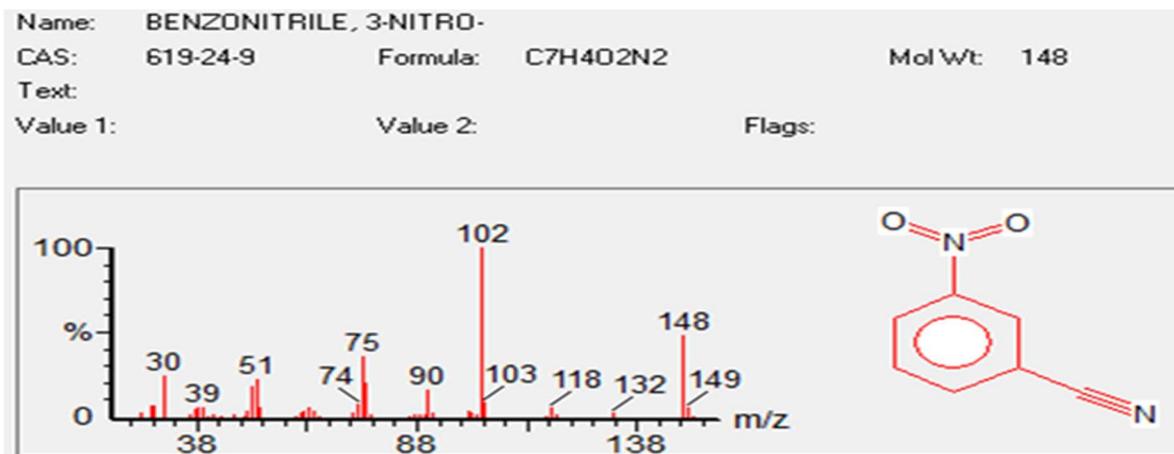


FIGURA 4.22 Espectro de masas y estructura obtenidos en la biblioteca NIST por comparación con el Espectro de Masas del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de 3-nitro benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C. El producto es 3-nitro benzonitrilo.

4.5.5 Cromatogramas y espectros de masas de los productos de las mezclas de reacción de acilación/ eliminación de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.

Por último, en la FIGURA 4.23, el pico cromatográfico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C, aparece con un tiempo de retención de 6.12 min. De acuerdo con el patrón de fragmentación del espectro de masas del producto, mostrado en la FIGURA 4.24, el producto es 4-dimetilamino benzonitrilo, como se puede apreciar por comparación con los datos espectrométricos de masas (Ión molecular, pico base y correlación con la base de datos de espectros de masas de la biblioteca NIST, que en la FIGURA 4.25, confirman la estructura esperada.

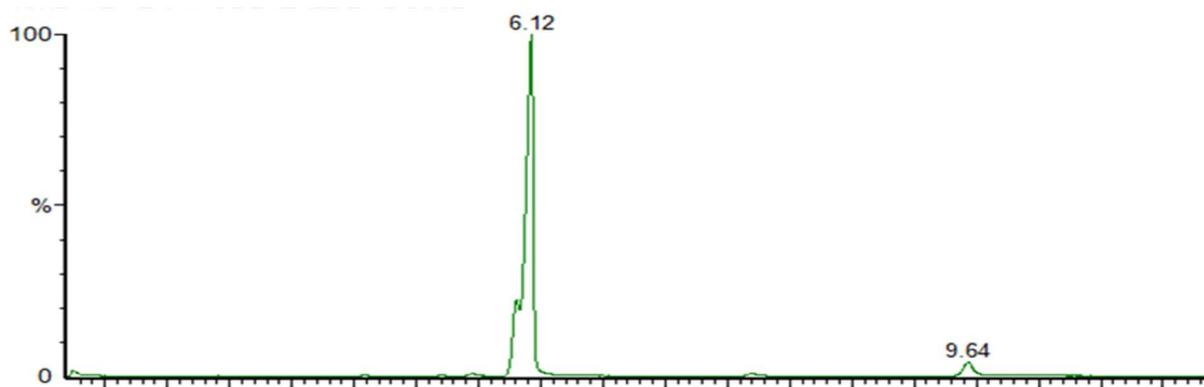


FIGURA 4.23. Cromatograma de la mezcla de reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.

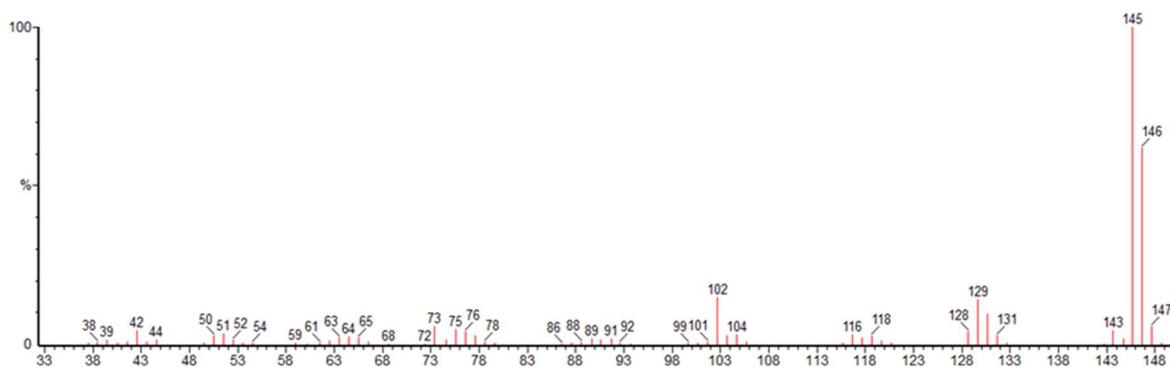


FIGURA 4.24. Espectro de masas del pico del producto de la reacción de acilación/eliminación de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C.

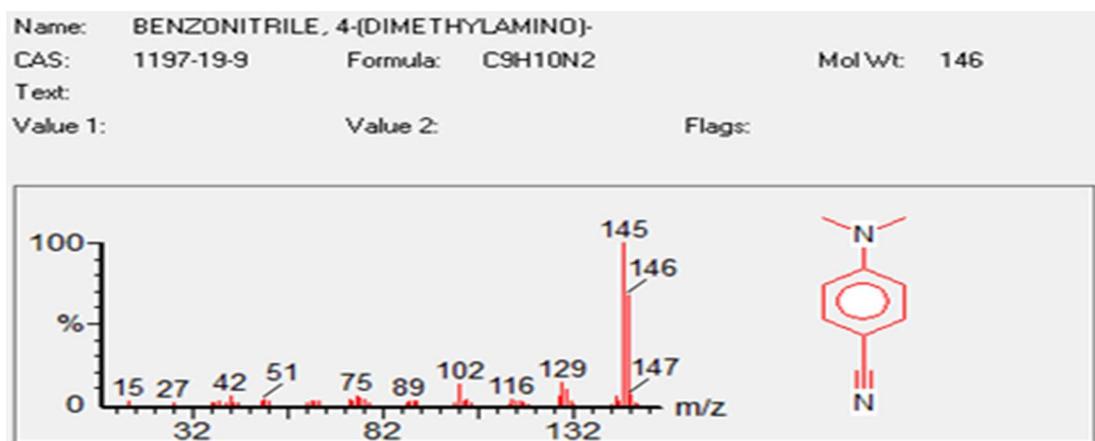


FIGURA 4.25. Espectro de masas y estructuras obtenidas en la biblioteca NIST por comparación con el Espectro de Masas del producto de la reacción de

acilación/eliminación de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído catalizada por CAL-B a 80°C. El producto es 4-dimetilamino benzonitrilo.

De los resultados anteriores, puede concluirse que la lipasa de *Candida antarctica* fracción B, catalizó la acilación/eliminación de las oximas de los aldehídos aromáticos a 80°C, con acetato de vinilo como sustrato acilante y acetato de etilo como disolvente, promoviendo la obtención de los nitrilos correspondientes a esa temperatura, lo cual no ocurrió en ausencia de la misma. La reacción de eliminación del éster acetato de la oxima, probablemente fue de naturaleza química y no enzimática, en virtud de que la enzima catalizó la acetilación y formación del éster de oxima. En ausencia de dicha enzima no procedió la acetilación ni la reacción de eliminación, a partir de lo cual se puede concluir que la enzima fue importante para la conversión global de la oxima en el nitrilo, el producto de la eliminación.

4.6. Interpretación de los resultados de los espectros de RMN de ¹H

Para confirmar la estructura de los productos obtenidos en la reacción de acilación/eliminación de cada una de las oximas de partida (vainillina, veratraldehído, 4-hidroxi benzaldehído, 3-nitro benzaldehído y 4-dimetilamino benzaldehído) con acetato de vinilo como agente acilante y acetato de etilo como disolvente de la reacción a 80°C, empleando la lipasa de *Candida antarctica* (Novozyme 435). Se realizaron los análisis de las mezclas de reacción, mediante RMN de ¹H. Los espectros obtenidos indican una pureza de 99% ó más de los productos de la reacción. En la FIGURA 4.26 se muestran las estructuras propuestas esperadas que corresponden en su totalidad con las propuestas a partir de la información generada del análisis de RMN de ¹H.

Como puede observarse, los espectros de manera general, presentan señales comunes debidas a los hidrógenos del anillo bencénico en la región desde 6.5 ppm para el protón más protegido del 4-dimetilamino benzonitrilo, hasta el protón más

desplazado a campo bajo en 8.55, que corresponde al H-6 del 3-nitro benzonitrilo, *orto* o vecino a los dos grupos electroatrayentes ($C\equiv N$) y (NO_2) y por lo tanto el más desprotegido y situado a campo bajo.

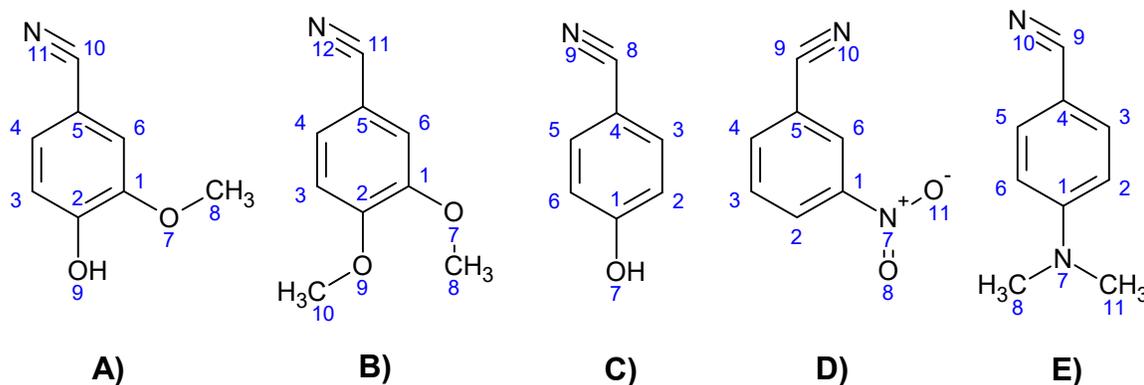


FIGURA 4.26 Estructuras químicas de los nitrilos obtenidos a partir de las diferentes oximas empleadas con CAL-B, Novozyme 435 a 80°C. A) 4-hidroxi-3-metoxi benzonitrilo, B), 3,4-dimetoxi benzonitrilo C) 4-hidroxi benzonitrilo, D) 3-nitro benzonitrilo, E) 4-dimetilamino benzonitrilo.

Al comparar los espectros de RMN de 1H de los nitrilos obtenidos, se observó que el número de señales, la multiplicidad en de las mismas y sus valores de desplazamiento químico (δ), concuerdan con lo esperado en base al desplazamiento químico de las señales para el anillo aromático y su multiplicidad, así como el número y tipo de sustituyentes en cada uno de los productos y que fueron similares a los reportados en la literatura por distintos autores, los cuales se muestran a continuación.

4.6.1 Interpretación de los espectros de RMN de 1H de 4-hidroxi-3-metoxi benzonitrilo.

1H RMN (CD_2Cl_2), los valores de desplazamiento químico obtenidos son los siguientes: $\delta=3.93$ (s, 8), $\delta=6.97$ (d, 6), $\delta=7.09$ (s, 9), $\delta=7.24$ (d, 3-4), FIGURA 4.27. Estos valores de desplazamiento químico, se corresponden muy bien con los obtenidos por Dewan

y Singh (2003), y quienes realizaron las siguientes asignaciones: δ 3.93 (s, 3H, -CH₃), 6.98 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.09 (s, 1H, ArH), 7.23 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), En cuanto a lo reportado por Yadav *et al.* (2014) los valores de desplazamiento son los siguientes: δ 3.91 (s, 3H), 6.44 (brs, 1H), 6.92 (d, 1H, $J=8.0$ Hz), 7.20 (d, 1H, $J=8.0$ Hz). Por lo anterior, se puede concluir que se trata de la estructura propuesta del nitrilo esperado experimentalmente.

Autor	Metodología	Resultados
Dewan y Sing 2003	1 mmol de oxima mezclada con silica gel, irradiada a 560W por 1-3 minutos	1 min, 95% de rendimiento
Yadav 2014	1 mmol de oxima, 2 mol% eosin Y, 20 mmol% DFM, 2 equiv Tetrabromometano (CBr ₄), 3mL acetonitrilo, LED's verdes ($\lambda_{max}=535$ nm, 2.6 W, 161, lm), 14- 18hr.	14 hrs, 92% de rendimiento

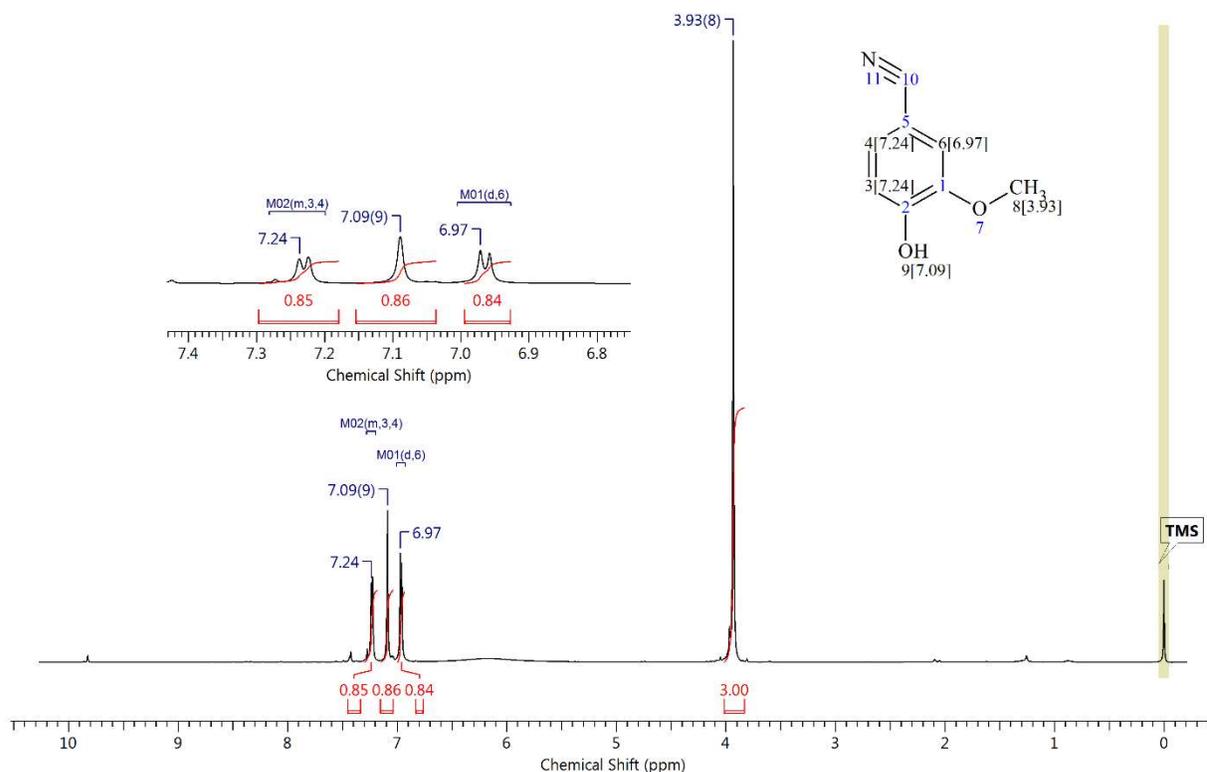


FIGURA 4.27 Espectro de RMN- ^1H de 4-hidroxi-3-metoxi benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de vainillina promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.

4.6.2 Interpretación de los espectros de RMN de ^1H de 3,4-dimetoxi benzonitrilo

^1H RMN (CD_2Cl_2), los valores de desplazamiento obtenidos son los siguientes: $\delta=3.90$ (s, 10), $\delta=3.93$ (s, 8), $\delta=6.91$ (d, 6), $\delta=7.08$ (d, 4), $\delta=7.29$ (dd, 3). Los valores de desplazamiento químico obtenidos por Rokade y Prabhu (2012) fueron muy similares: δ 3.91 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 6.91(d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.29 (d, $J=8.4$ Hz, 1H). En cuanto a lo reportado por Jasem *et al.* (2014) los valores de desplazamiento resultantes son también bastante similares: δ 3.89 (s, 3H, OCH_3), 3.92 (s, 3H, OCH_3) 6.90 (1H,d, $^3J=8.4$ Hz), 7.11 (s, 1H), 7.29 (d, 1H, $^3J=8.4$ Hz). En ambos casos la señal $\delta = 7.29$, los autores no señalan la presencia de un doblete, que en este trabajo corresponde a un acoplamiento doble de cada uno de los tres tipos de H aromático. El doblete más pequeño corresponde a los protones acoplados en *para* con

desplazamientos de 6.91 y 7.08 ppm, observables en nuestros resultados (FIGURA 4.28).

Autor	Metodología	Resultados
Rokade Y Prabhadou 2012	1 mmol aldehído, 1.5 mmol Azida de sodio (NaN ₃), 3 mmol ácido trifluorometansulfónico (TfOH), 2 mL acetonitrilo (CH ₃ CN), a temperatura ambiente en agitación, 2min	2 min, 97% Rendimiento
Jasem 2014	4.8 mmol bromotriclorometano (BrCCl ₃) añadida a 4.8 mmol trifenilfosfina (PPh ₃) en 14 mL de cloruro de metileno (CH ₂ Cl ₂) agitado a temperatura ambiente por 20 min, después se agregaron 4.4 mmol oxima y se refluxo por 25 min, entonces 4.8 mmol de trietilamina (Et ₃ N) seca se añadió gota a gota durante 1 minuto, finalmente la mezcla se calentó a refluxo por 8 horas.	92% rendimiento

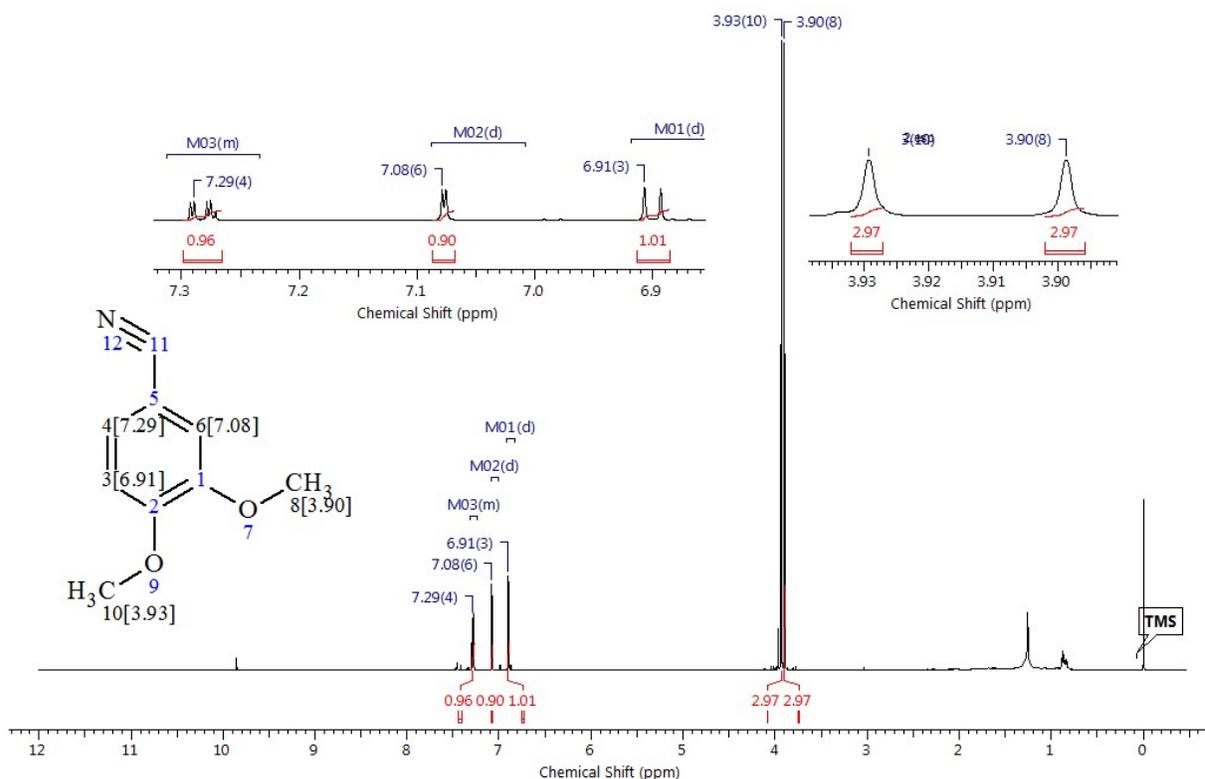


FIGURA 4.28. Espectro de RMN-¹H de 3,4-dimetoxi benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de veratraldehído promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.

4.6.3 Interpretación de los espectros de RMN de ^1H de 4-hidroxi benzonitrilo

^1H RMN (CD_2Cl_2), los valores de desplazamiento obtenidos son los siguientes: $\delta=6.93$ (d, 3-5), $\delta=7.54$ (d, 2-6), sin embargo no se aprecia la señal que representa al (C-OH) dentro del espectro, FIGURA 4.29. Schou (2009) reporta los resultados siguientes $\delta=6.89$ (d, $J=8.7$ Hz, 2H) y 7.62 (d, $J=8.7$, 2H), omitiendo la presencia del (-OH), sin embargo autores como Marshall *et al.* (2009) reportan estos resultados $\delta=6.90$ (d, $J=8.72$ Hz, 2H=3-5) y 7.64 (d, $J=8.7$, 2H=2-6) incluyendo la señal 10.62 (s, 1H, -OH), en nuestro análisis pudiera existir esta señal, pero se encontraría en un desplazamiento menor al reportado, lo cual es normal, considerando que la posición de desplazamiento químico del H-O, es variable dependiente del disolvente, de la concentración de la muestra y de la temperatura del experimento de RMN.

Autor	Metodología	Resultados
Schou 2009		
Marshall 2009		

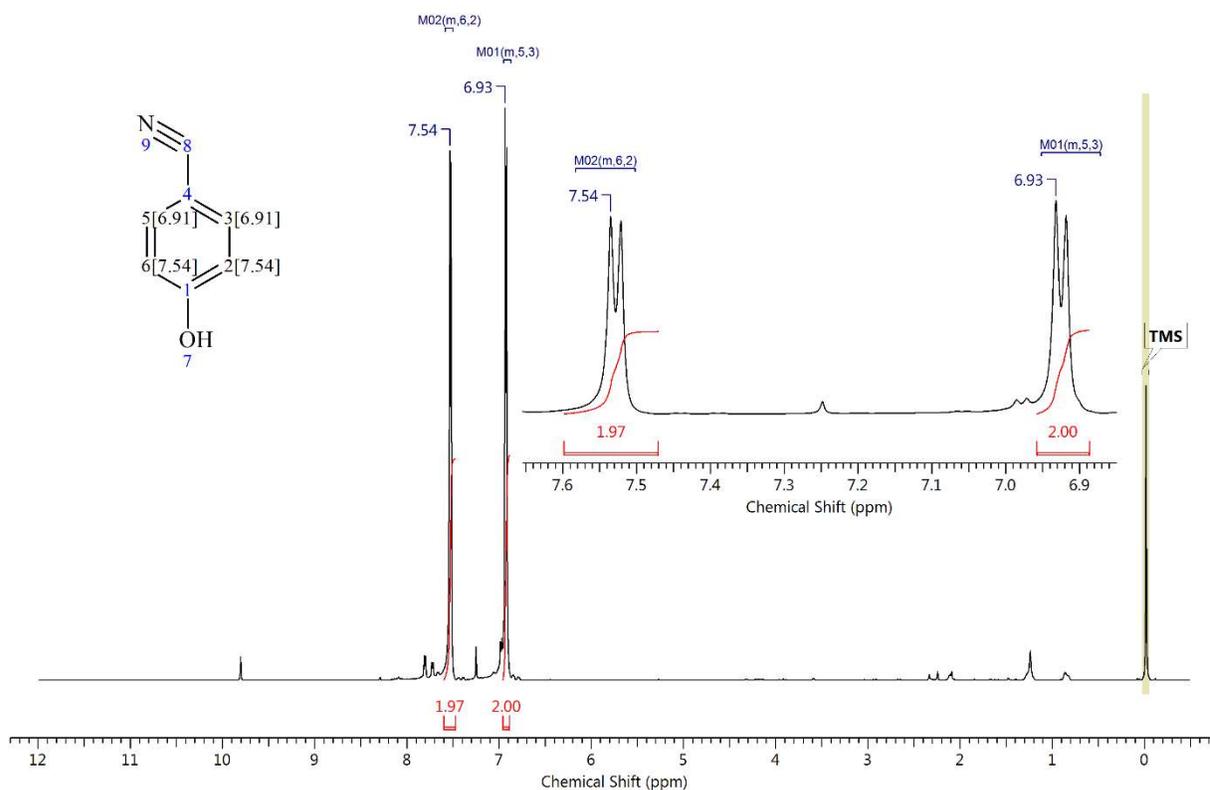


FIGURA 4.29 Espectro de RMN- ^1H de 4-hidroxi benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.

4.6.4 Interpretación de los espectros de RMN de ^1H de 3-nitro benzonitrilo

^1H RMN (CD_2Cl_2), los valores de desplazamiento obtenidos son los siguientes: $\delta=7.79$ (dt), $\delta=8.04$ (t), $\delta=8.26$ (d), $\delta=8.44$ (d), $\delta=8.53$ (d), $\delta=8.71$ (d) FIGURA 4.30. Rezaei *et al.* (2010) Reportaron valores similares a los nuestros: 7.70 (dd, $J=8.35$, 7.12 Hz, 1H, H-Ar), 7.90 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, H-Ar), $\delta=8.46$ (s, 1H, H-Ar). Por otra parte Coşkun (2004), para el mismo compuesto, solo reporta la presencia de señales los protones aromáticos, que van 7.05-8.30 (m, 4H) pero sin asignar las señales.

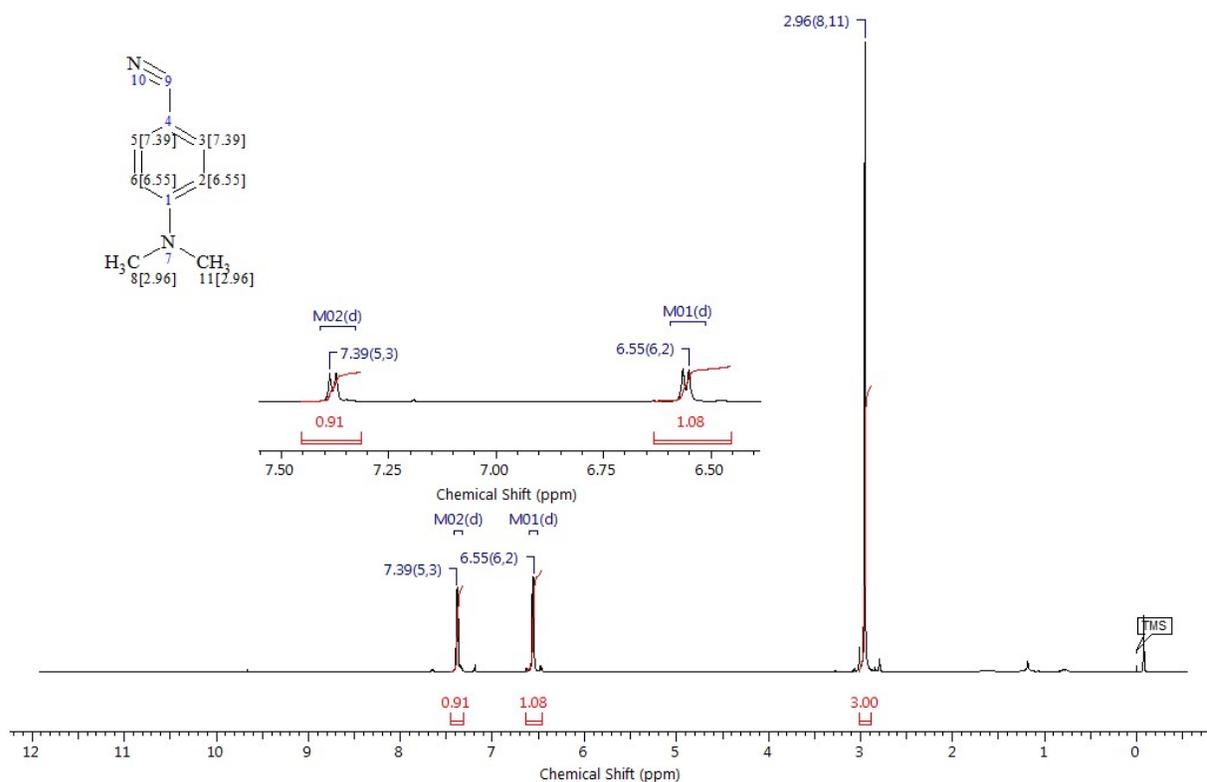


FIGURA 4.31. Espectro de RMN- ^1H de 4-dimetilamino benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acilación-eliminación de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.

De los resultados del análisis estructural realizado mediante RMN ^1H de cada uno de los productos de las reacciones de acilación-eliminación de las oximas de los aldehídos aromáticos, promovida por la lipasa de *Candida antarctica*, fracción B a 80°C , se puede concluir que por los resultados de este trabajo, se obtuvieron los productos esperados con una conversión y rendimientos del 99% ó más. Se observa que las señales de desplazamiento químico de los espectros son similares a los reportados por distintos autores, lo cual confirma que se obtuvieron los nitrilos al término de las reacciones enzimáticas.

4.7.- Interpretación de los resultados de los espectros de Espectros de RMN de ^{13}C

Similarmente a la interpretación de la información generada por los espectros de RMN de ^1H de los benzonitrilos producidos mediante la metodología de la reacción de acetilación-eliminación promovida por CAL-B, se tiene la interpretación de la espectroscopía de RMN de ^{13}C , mediante la cual se puede establecer en las moléculas de estos compuestos, el número y el tipo de Carbonos, es decir si son Sp^3 , Sp^2 ó sp , y si son $-\text{CH}-$, $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_3$, si de acuerdo con su desplazamiento químico forman parte de un grupo funcional determinado, ó si se encuentran enlazados a un elemento electronegativo como O ó N.

La simetría del anillo bencénico de los benzonitrilos sustituidos en *para*, (en los casos de (4-hidroxi benzonitrilo y 4-dimetil amino benzonitrilo) el número de señales de los carbonos del anillo bencénico se reduce a 4 y en los demás casos no simétricos (4-hidroxi-3-metoxi benzonitrilo, 3,4-dimetoxi- benzonitrilo y 3-nitro benzonitrilo), el anillo bencénico muestra los 6 carbonos.

De manera general, el grupo funcional nitrilo se aprecia con un desplazamiento químico de 116.5-120 ppm en los benzonitrilos obtenidos. Este aparece como una señal más “pequeña” por ser un Carbono no protonado ó “*ipso*” ($-\underline{\text{C}}\equiv\text{N}$), generalmente “vecino” a campo bajo respecto de otro Carbono no protonado, “*ipso*” aromático ($=\underline{\text{C}}-\text{C}\equiv\text{N}$), al que se encuentra unido el grupo nitrilo.

Los otros C “*ipso*” se encuentran a campo bajo cercanos a 150 ppm y en número son: uno (en los casos de 4-hidroxi benzonitrilo, 4-dimetil amino benzonitrilo y 3-nitro benzonitrilo) ó dos (en los casos 4-hidroxi-3-metoxi benzonitrilo, 3,4-dimetoxi-benzonitrilo).

El desplazamiento químico de los grupos metilo, a campo alto, se observa sólo en 4-dimetil amino benzonitrilo, y 4-hidroxi-3-metoxi benzonitrilo y 3,4-dimetoxi-benzonitrilo, se observan en 40, 50.1 y 50.2 ppm respectivamente. A continuación se presentan los espectros de ^{13}C de los 5 benzonitrilos y la elucidación estructural conclusiva de la estructura de cada uno de ellos.

TABLA 4.7 Señales de ^{13}C de los nitrilos sintetizados en la literatura (δ =ppm).

4-hidroxi-3-metoxi benzonitrilo		
Desplazamiento obtenido (δ)	Desplazamiento reportado (δ)	Autor
56.25, 103.26, 113.80, 115.26, 119.20, 127.01, 146.68, 149.96	56.18, 103.19, 113.73, 115.19, 119.20, 126.94, 146.61, 149.88	Wang <i>et al.</i> (2004)
3,4-dimetoxi benzonitrilo		
Desplazamiento obtenido	Desplazamiento reportado	Rokade y Prabhu (2012)
56.04, 56.08, 103.86, 111.20, 113.90, 119.16, 126.41, 149.15, 152.83	56, 56.1, 103.8, 111.1, 113.8, 119.2, 126.4, 149.1, 152.8	
4-hidroxi benzonitrilo		
Desplazamiento obtenido	Desplazamiento reportado	Marshall <i>et al.</i> (2009)
102.87, 116.50, 119.32, 134.33, 160.40	101(C1), 116.4(CH-3,5), 119(CN), 134.2(CH-2,6), 161.6 (C4)	
3-nitro benzonitrilo		
Desplazamiento obtenido	Desplazamiento reportado	Wang <i>et al.</i> (2004)
114.10, 116.51, 127.20, 127.51, 130.64, 137.58, 148.21	114.10, 116.48, 127.18, 127.48, 130.64, 137.57, 148.20	
4-dimetilamino benzonitrilo		
Desplazamiento obtenido	Desplazamiento reportado	Jasem <i>et al.</i> (2014)
39.92, 97.3, 111.40, 120.73, 133.37, 152.47	39.9 (2C, 2CH ₃), 97.3 (C _{quat}), 133.4 (2C, CH), 152.4(C _{quat})	

4.7.1 Interpretación de los resultados de los espectros de Espectros de RMN de ^{13}C de 4-hidroxi-3-metoxi benzonitrilo

El espectro muestra las 6 señales en la región de Cs aromáticos, como ya se discutió previamente, entre los que una séptima señal a 119.27, pertenece al carbono del grupo funcional nitrilo (FIGURA 4.32).

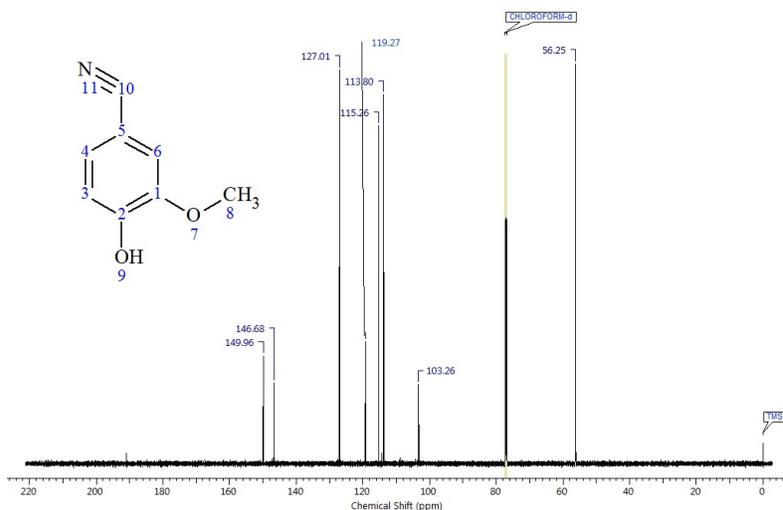


FIGURA 4.32 Espectro de RMN-¹³C de 4-hidroxi-3-metoxi benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de vainillina promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.

4.7.2 Interpretación de los resultados de los espectros de Espectros de RMN de ¹³C de 3,4-dimetoxi benzonitrilo

En este compuesto: la señal a 119.16, pertenece al carbono del grupo funcional nitrilo. Los dos grupos metilo, casi idénticos se desdoblán en una doble señal a 56.04 y 56.08, en la ampliación en la FIGURA 4.33.

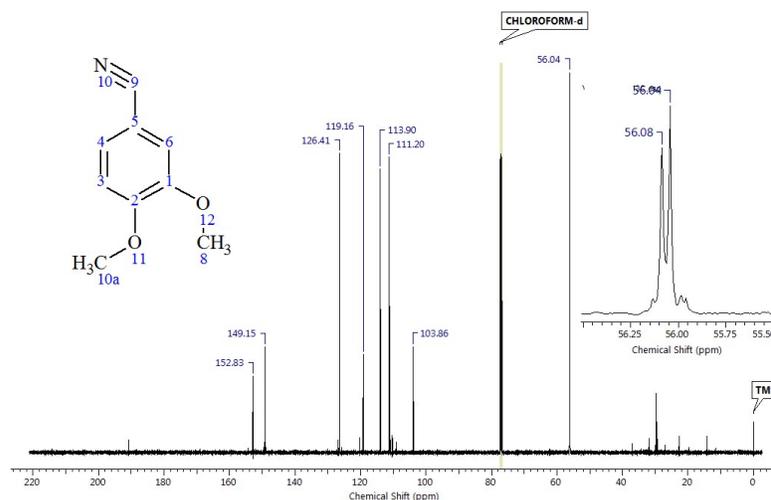


FIGURA 4.33 Espectro de RMN- ^{13}C de 3,4-dimetoxi benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de veratraldehído promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.

4.7.3 Interpretación de los resultados de los espectros de Espectros de RMN de ^{13}C de 4-hidroxi benzonitrilo

La señal a 119.32, corresponde al carbono del grupo funcional nitrilo. Igualmente que en el caso anterior, la simetría de la molécula reduce el número de señales en la región de Cs aromáticos a 4 (FIGURA 4.34).

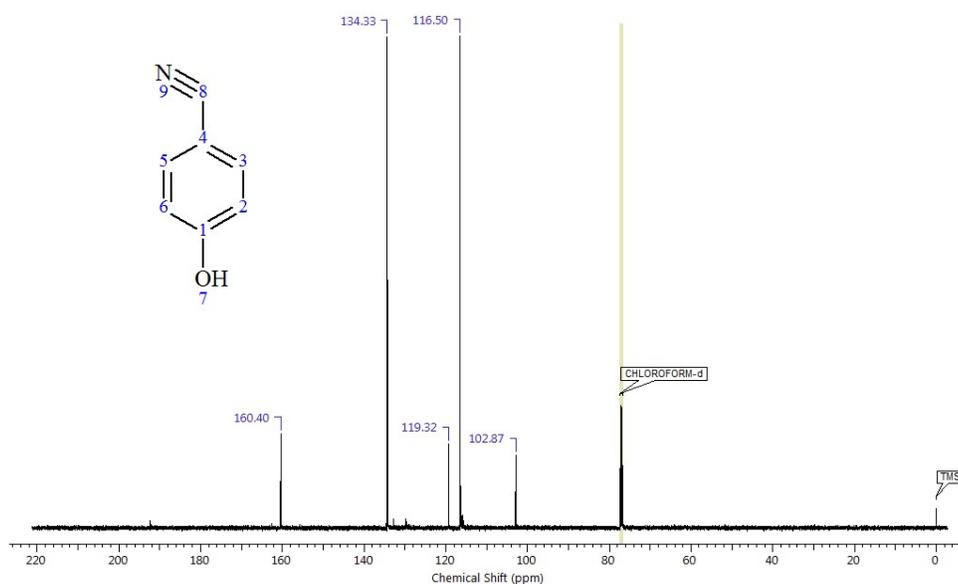


FIGURA 4.34 Espectro de RMN- ^{13}C de 4-hidroxi benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.

4.7.4 Interpretación de los resultados de los espectros de Espectros de RMN de ^{13}C de 3-nitro benzonitrilo

En este caso la señal del carbono del grupo funcional nitrilo se encuentra a 116.51 ppm. Se observan 6 señales diferentes correspondientes a 6 Cs aromáticos distintos. La señal a campo más bajo, corresponde al C *ipso* enlazado al grupo Nitro fuertemente electroatrayente que lo desprotege y por lo cual su señal se presenta a campo bajo. Se observan señales de impurezas, correspondientes a la oxima precursora del grupo nitrilo (FIGURA 4.35).

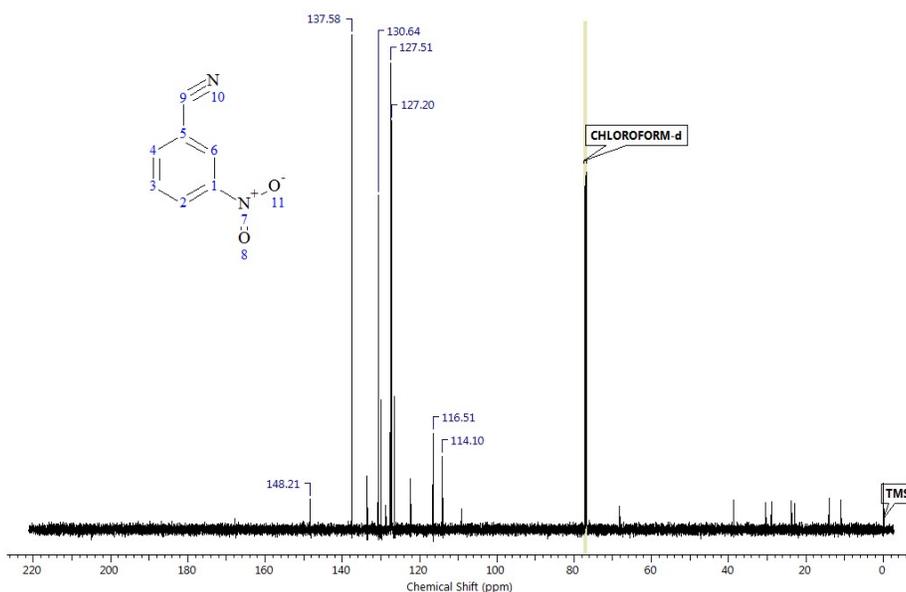


FIGURA 4.35 Espectro de RMN- ^{13}C de 3-nitro benzotrile obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.

4.7.5 Interpretación de los resultados de los espectros de Espectros de RMN de ^{13}C de 4-dimetilamino benzotrile

Aquí se observa la señal del grupo Dimetil(amino) a 39.92 y la señal a 120.73, corresponde al carbono del grupo funcional nitrilo. La simetría de la molécula reduce el número de señales en la región de Cs aromáticos. (FIGURA 4.36)

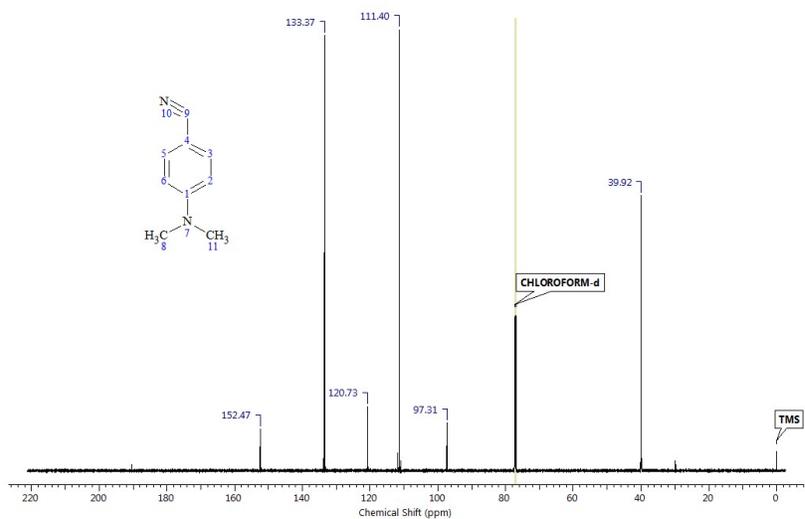


FIGURA 4.36 Espectro de RMN- ^{13}C de 4-dimetilamino benzonitrilo obtenido a partir de la reacción de acetilación-eliminación de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído promovida por Novozyme 435 a 80°C y 168 h.

CONCLUSIONES

Se demostró que es posible sintetizar oximas de aldehídos aromáticos y clorhidrato de hidroxilamina en estado sólido, mediante molienda mecánica de los sustratos y con el uso de materiales de soporte inorgánicos de naturaleza básica, con altos rendimientos y conversiones completas.

La proporción de la mezcla de isómeros Sin/Anti de las oximas de veratraldehído y vainillina en solución en MTBE y acetato de etilo fue cualitativamente la misma (mayor proporción del isómero Sin) a 40, 50 y 60°C, en presencia de la lipasa de *Candida antarctica* (Novozyme 435) durante el tiempo de muestreo. En acetato de etilo, ocurrió la acetilación enzimática no completa, aumentando la proporción de éster en la mezcla, conforme la temperatura aumenta de 40 a 50 a 60°C, pero la proporción de la mezcla Sin/Anti no se modificó.

La lipasa de *Candida antarctica* (Novozyme 435) catalizó la eliminación de las oximas de los aldehídos aromáticos, a 80°C, con acetato de vinilo como sustrato acilante y acetato de etilo como disolvente, promoviendo la obtención de los nitrilos correspondientes a esa temperatura, lo cual no ocurrió en ausencia de la misma.

De los resultados del análisis estructural realizado mediante RMN ¹H y CG-EM de cada uno de los productos de las reacciones de acilación-eliminación de las oximas de los aldehídos aromáticos, promovida por la lipasa de *Candida antarctica*, fracción B a 80°C, se puede concluir que por los resultados de este trabajo, se obtuvieron los productos esperados con una conversión y rendimientos del 99% ó más.

RECOMENDACIONES

Realizar las reacciones mecanoquímicas con un equipo apropiado como lo es el molino de bolas o planetario en donde las variables de fuerza, temperatura, frecuencias de operación y tiempo sean controladas. Además de ampliar la cantidad de sustratos aldehídicos para la obtención de las oximas bajo el método de mecanoquímica.

Aislar los correspondientes isómeros **Anti** y **Sin** de las oximas para realizar el estudio de las reacciones de isomerización y determinar si la lipasa es capaz de realizar este proceso o si es afectado por otras variables como la temperatura en el análisis o la silica de las CCF durante el monitoreo.

Aplicar la metodología de síntesis mecanoquímica de obtención de oximas y su posterior reacción de acetilación-eliminación promovida por CAL-B para la obtención de aromas con notas florales (jazmín, rosa, etc.) importantes para la industria de las fragancias y perfumes tales como: 3-metil-5-fenil-pentanal oxima (Citralis oxima) y 3-metil-5-fenil-pentanonitrilo (Citralis Nitrilo).

BIBLIOGRAFÍA

- Aakeröy, C. B., Sinha, A. S., Epa, K. N., Spartz, C. L., y Desper, J. (2012). A versatile and green mechanochemical route for aldehyde–oxime conversions. *Chemical Communications*, **48**(92), 11289-11291.
- Allinger, N. L. (1978). *Química orgánica* (2 ed.). Barcelona, España: Rajender, SV.
- Anastas, P. T., y Warner, J. C. (1998). Principles of green chemistry. *Green chemistry: Theory and practice*, 29-56.
- Bezborodov, V., Kovganko, N., y Lapanik, V. (2003). Synthesis and mesomorphic properties of new 3-aryl-5-cyano-4, 5-dihydroisoxazoles. *Russian Journal of Organic Chemistry*, **39**(12), 1777-1780.
- Bica, K., y Gaertner, P. (2006). An iron-containing ionic liquid as recyclable catalyst for aryl Grignard cross-coupling of alkyl halides. *Organic Letters*, **8**(4), 733-735.
- Catalán, J., García, M., y Claramunt, R. M. (2017). Influence of solvent basicity on DMABN photophysics. *Journal of Physical Organic Chemistry*, **30**(3).
- Coşkun, N. (2004). Mild and efficient method for the synthesis of nitriles. *Synthetic Communications*, **34**(9), 1625-1630.
- Cygler, M., Grochulski, P., Kazlauskas, R. J., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Rubin, B., . . . Gupta, A. K. (1994). A structural basis for the chiral preferences of lipases. *Journal of the American Chemical Society*, **116**(8), 3180-3186.
- Chandrasekhar, S., y Gopalaiah, K. (2002). Effective 'non-aqueous hydrolysis' of oximes with iodic acid in dichloromethane under mild, heterogeneous conditions. *Tetrahedron Letters*, **43**(22), 4023-4024.
- Chauhan, N. P. S. (2014). Preparation and characterization of bio-based terpolymer derived from vanillin oxime, formaldehyde, and p-hydroxyacetophenone. *Designed Monomers and Polymers*, **17**(2), 176-185.
- Das, B., Ramesh, C., y Madhusudhan, P. (2000). An Improved One-Pot Conversion of Aldehydes into Nitriles under Microwave Irradiation Using Ammonium Acetate. *Synlett*, **2000**(11), 1599-1600.

- Dewan, S. K., y Singh, R. (2003). Synthesis of nitriles from aldoximes using silica gel as catalyst under microwave irradiation. *Synthetic Communications*, **33**(17), 3085-3088.
- Dugave, C., y Demange, L. (2003). Cis-trans isomerization of organic molecules and biomolecules: implications and applications. *Chemical Reviews*, **103**(7), 2475-2532. doi: 10.1021/cr0104375
- Fernández-Bertran, J. F. (1999). Mechanochemistry: an overview. *Pure and Applied Chemistry*, **71**(4), 581-586.
- Ferrero, M., y Gotor, V. (2000). Enzymatic regioselective transformations in natural products. *NATO SCIENCE SERIES 1 DISARMAMENT TECHNOLOGIES*, **33**, 347-364.
- Fersht, A. (1985). Enzyme structure and mechanism. *Freeman Publications*, **2nd Ed.**
- Gawley, R. E., y Garcia-Pons, T. (1986). Kinetics of uncatalyzed isomerization of aliphatic ketoximes. *Tetrahedron Letters*, **27**(43), 5185-5188. doi: 10.1016/S0040-4039(00)85164-3
- Gokce, H., y Bahceli, S. (2011). A study on quantum chemical calculations of 3-, 4-nitrobenzaldehyde oximes. *Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **79**(5), 1783-1793. doi: 10.1016/j.saa.2011.05.057
- Gotor-Fernández, V., Brieva, R., y Gotor, V. (2006). Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **40**(3), 111-120.
- Gotor-Fernández, V., Busto, E., y Gotor, V. (2006). Candida antarctica lipase B: an ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **348**(7-8), 797-812.
- Gotor, V. (1992). Enzymatic aminolysis, hydrazinolysis and oximolysis reactions *Microbial Reagents in Organic Synthesis* (pp. 199-208): Springer.
- Gotor, V., Alfonso, I., y García-Urdiales, E. (2008). *Asymmetric organic synthesis with enzymes*: John Wiley & Sons.
- Gotor, V., y Menéndez, E. (1990). Synthesis of oxime esters through an enzymatic oximolysis reaction. *Synlett*, **1990**(11), 699-700.

- Greene, T. W., y Wuts, P. G. (2002). *Protective Groups in Organic Synthesis* (3 ed.): Wiley Online Library.
- Hajipour, A., Rafiee, F., y Ruoho, A. (2010). A rapid and convenient method for the synthesis of aldoximes under microwave irradiation using in situ generated ionic liquids. *Journal of the Iranian Chemical Society*, **7**(1), 114-118.
- Hania, M. M. (2009). Synthesis and antibacterial activity of some transition metal complexes of oxime, semicarbazone and phenylhydrazone. *Journal of Chemistry*, **6**(S1), S508-S514.
- Hassan, F., Shah, A. A., y Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 235-251.
- Hyodo, K., Kitagawa, S., Yamazaki, M., y Uchida, K. (2016). Iron Catalyzed Dehydration of Aldoximes to Nitriles Requiring Neither Other Reagents nor Nitrile Media. *Chemistry—An Asian Journal*, **11**(9), 1348-1352.
- Jaeger, K. E., y Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 390-397.
- Jasem, Y. A., Barkhad, M., Khazali, M. A., Butt, H. P., El-Khwass, N. A., Alazani, M., . . . Thiemann, T. (2014). Two ways of preparing benzonitriles using BrCCl₃-PPh₃ as the reagent. *Journal of Chemical Research*, **38**(2), 80-84.
- Kamakshi, R., y Reddy, B. S. R. (2005). Solventless Rapid Synthesis of Oxime, Semicarbazone, and Phenylhydrazone Derivatives from Carbonyl Compounds under Microwave Conditions. *Australian Journal of Chemistry*, **58**(8), 603. doi: 10.1071/ch05107
- Kanerva, L. T., y Klibanov, A. M. (1998). Hammet analysis of enzyme action in organic solvents. *Journal of the American Chemical Society*, **111**, 6864-6865.
- Karthikeyan, P., Aswar, S. A., Muskawar, P. N., Sythana, S. K., Bhagat, P. R., Kumar, S. S., y Satvat, P. S. (2011). A novel L-amino acid ionic liquid for quick and highly efficient synthesis of oxime derivatives—An environmental benign approach. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Laita, A. D., Xarau, S. N., y Roa, F. P. (2001). Accidentes o atentados con armas químicas: bases para la atención sanitaria. *Medicina Clínica*, **117**(14), 541-554.

- Le Févre, R., y Northcott, J. (1949). Effects of solvents on the thermal interconversion of the piperonaldoximes. *Journal of the Chemical Society*(SEP), 2235-&.
- Li, J. T., Li, X. L., y Li, T. S. (2006). Synthesis of oximes under ultrasound irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, **13**(3), 200-202. doi: 10.1016/j.ultsonch.2005.11.011
- Marshall, L. J., Cable, K. M., y Botting, N. P. (2009). The synthesis of substituted phenols from pyranone precursors. *Tetrahedron*, **65**(39), 8165-8170.
- Melgar, Á., Enríquez, C., Mendoza, G., Fernández, L., y Elorza, M. E. (2010). Un clásico de Química Orgánica en microescala y con fricción: la ración de Cannizzaro. *Educación química*, **21**(2), 178-182.
- Mirón, C. E., García, P. C., y Cruz, S. V. (2009). Química farmacéutica I. Tomo 2. Preparación de los grupos funcionales más usuales en fármacos. Problemas resueltos de Síntesis de Fármacos (Vol. 2). España: Edicions Universitat Barcelona.
- Morrison, R. T., y Boyd, R. N. (1998). Química orgánica (5 ed.). New York, Estados Unidos Pearson Educación.
- Movassagh, B., y Shokri, S. (2005). An efficient and convenient KF/Al₂O₃ mediated synthesis of nitriles from aldehydes. *Tetrahedron Letters*, **46**(40), 6923-6925.
- Nabors, L., y Gelardi, R. (2001). Alternative sweeteners: an overview (L. O. B. Nabors Ed. 3 ed.). New York Marcel Dekker, Inc.
- O'Ferrall, R. A. M., y O'Brien, D. (2004). Rate and equilibrium constants for hydrolysis and isomerization of (E)- and (Z)-p-methoxybenzaldehyde oximes. *Journal of Physical Organic Chemistry*, **17**(6-7), 631-640. doi: 10.1002/poc.780
- Olah, G. A., y Keumi, T. (1979). Synthetic methods and reactions; 601. Improved one-step conversion of aldehydes into nitriles with hydroxylamine in formic acid solution. *Synthesis*, **1979**(02), 112-113.
- Pérez Castro, I. (2008). Nuevos carbanucleósidos condensados a heterociclos o con bases no naturales: exploración de rutas sintéticas y evaluación biológica: Universidad de Santiago de Compostela.
- Poliakoff, M., y Licence, P. (2007). Sustainable technology: green chemistry. *Nature*, **450**(7171), 810-812.

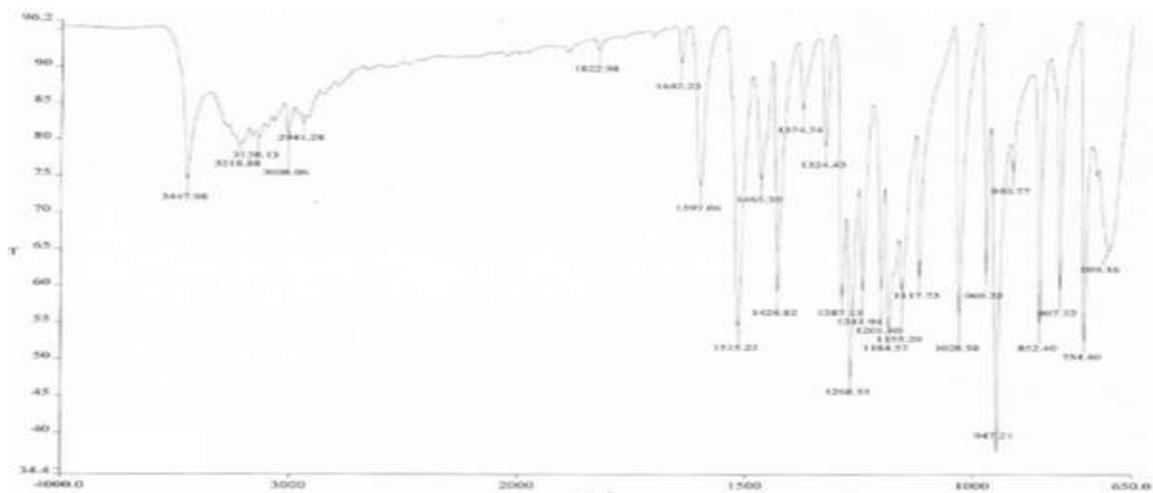
- Rezaei, R., Mohammadi, M. K., y Rastin, N. (2010). Microwave Assisted, Solvent Free One Pot Synthesis of Nitriles from Aryl Aldehydes on Melamin Formaldehyde as Solid Support. *Chinese Journal of Chemistry*, **28**(6), 993-996.
- Ribeiro, T. S., Prates, A., Alves, S. R., Oliveira-Silva, J. J., Riehl, C. A., y Figueroa-Villar, J. D. (2012). The effect of neutral oximes on the reactivation of human acetylcholinesterase inhibited with paraoxon. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **23**(7), 1216-1225. doi: 10.1590/S0103-50532012000700004
- Rokade, B. V., y Prabhu, K. R. (2012). Chemoselective Schmidt reaction mediated by triflic acid: selective synthesis of nitriles from aldehydes. *The Journal of organic chemistry*, **77**(12), 5364-5370.
- Ronchin, L., y Vavasori, A. (2009). On the mechanism of the organocatalyzed Beckmann rearrangement of cyclohexanone oxime by trifluoroacetic acid in aprotic solvent. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **313**(1-2), 22-30. doi: 10.1016/j.molcata.2009.07.016
- Rosa, E. M. S. P. (2006). *Estudios conformacionales y estereoeléctricos en iminas derivadas de 2-amino-2-desoialdosas*. (Doctorado Tesis Doctoral), Universidad de Extremadura, Badajoz, España.
- Rotticci, D. (2000). Understanding and engineering the enantioselectivity of Candida antarctica lipase B towards sec-Alcohols. *Royal Institute of Technology Department of Chemistry Organic Chemistry*, 1-45.
- Safaei-Ghomi, J., y Masoomi, R. (2014). Microwave-assisted synthesis of fulleropyrazolines/fulleroisoxazolines mediated by (diacetoxyiodo) benzene: a rapid and green procedure. *RSC Advances*, **4**(6), 2954-2960.
- Sandler, S. R., y Karo, W. (2013). *Organic functional group preparations* (Vol. 2): Elsevier.
- Schou, S. C. (2009). Fast and efficient synthesis of ¹⁴C labelled benzonitriles and their corresponding acids. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, **52**(5), 173-176.
- Sherin, D. R., y Rajasekharan, K. N. (2016). Curcuminoid-derived 3, 5-bis (styryl) isoxazoles-Mechanochemical synthesis and antioxidant activity. *Journal of Chemical Sciences*, **128**(8), 1315-1319.
- Smith, M. B., y March, J. (2007). *March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure*: John Wiley & Sons.

- Srinivas, K., Reddy, E. B., y Das, B. (2002). Highly convenient and efficient one-pot conversions of aldehydes into nitriles and ketones into amides using HY-zeolite. *Synlett*, **2002**(04), 0625-0627.
- Tamami, B., y Kiasat, A. (1999). Dehydration of aldoximes to nitriles using a polymeric reagent. *Journal of Chemical Research, Synopses*(7), 444-445. doi: 10.1039/A902299F
- Trodler, P., y Pleiss, J. (2008). Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Structural Biology*, **8**(9), 1-10.
- Vijayendar, V., Kaki, S. S., Jala, R. C. R., Poornachandra, Y., Kumar, C. G., y Prasad, R. (2015). Synthesis, characterization and biological evaluation of undecenoic acid based oxime esters. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, **5**(11), 3541-3551.
- Walsh, C. (1979). Enzyme reaction mechanisms. *Freeman, San Francisco*, 585-590.
- Wang, E. C., Huang, K. S., Chen, H. M., Wu, C. C., y Lin, G. J. (2004). An efficient method for the preparation of nitriles via the dehydration of aldoximes with phthalic anhydride. *Journal of the Chinese Chemical Society*, **51**(3), 619-627.
- Yadav, A. K., Srivastava, V. P., y Yadav, L. D. S. (2014). Visible-light-mediated efficient conversion of aldoximes and primary amides into nitriles. *RSC Advances*, **4**(8), 4181-4186.
- Yúfera, E. P. (1995). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria* (Vol. 2). Valencia, España: Reverté.
- Zachariasse, K. A., Grobys, M., y Tauer, E. (1997). Absence of dual fluorescence with 4-(dimethylamino) phenylacetylene. A comparison between experimental results and theoretical predictions. *Chemical Physics Letters*, **274**(4), 372-382.
- Zaks, A., y Klibanov, A. M. (1988). Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *Journal of Biological Chemistry*, **263**(7), 3194-3201.
- Zeynizadeh, B., y Karimkoshteh, M. (2013). Magnetic Fe₃O₄ nanoparticles as recovery catalyst for preparation of oximes under solvent-free condition. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, **3**(1), 57.

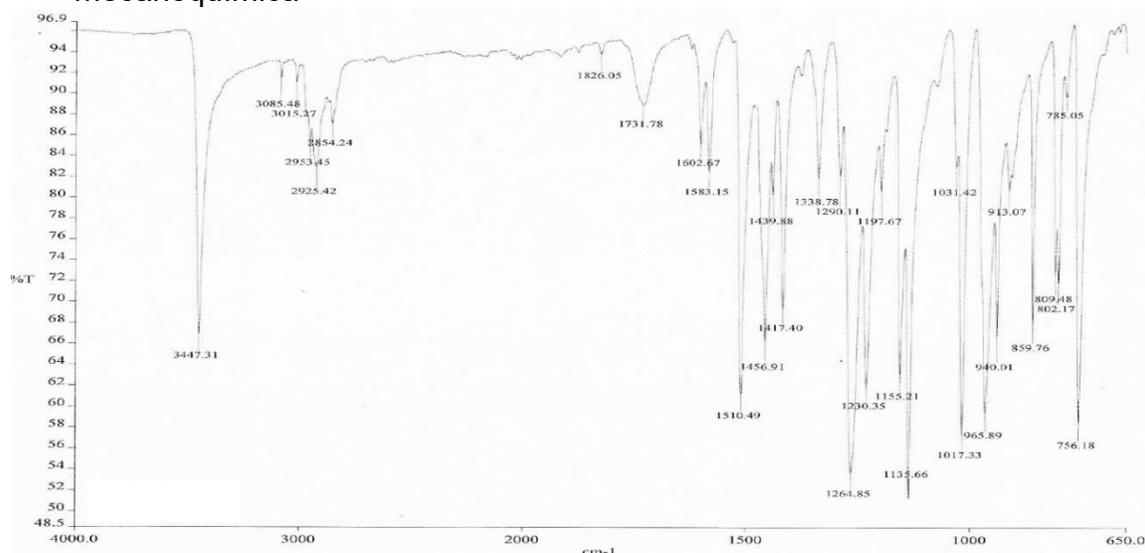
APÉNDICES

APÉNDICE A

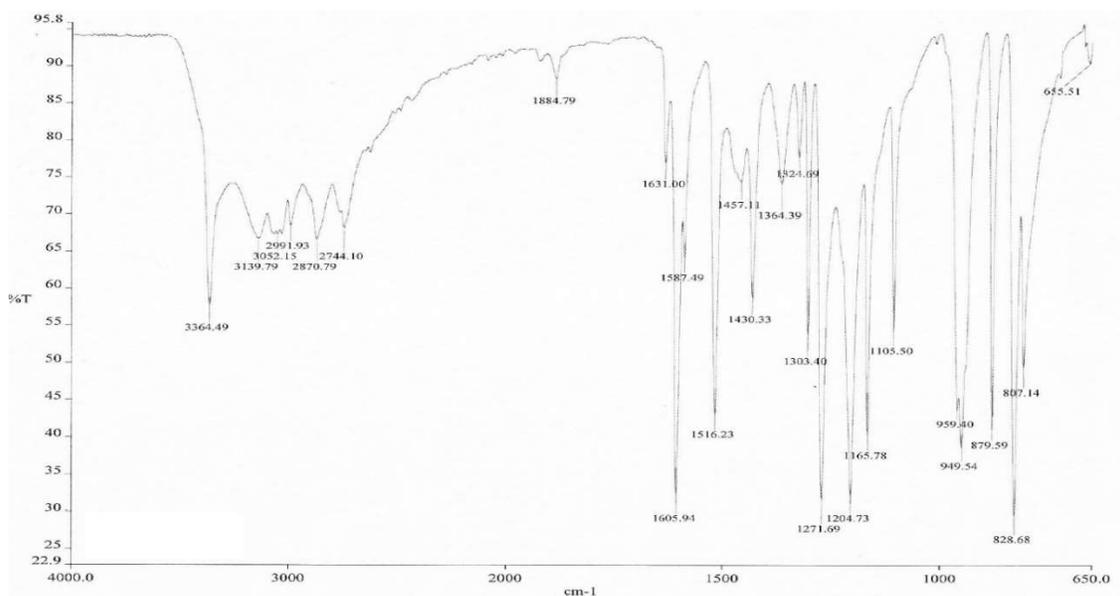
Espectros de infrarrojo de oximas productos de las moliendas de aldehídos aromáticos



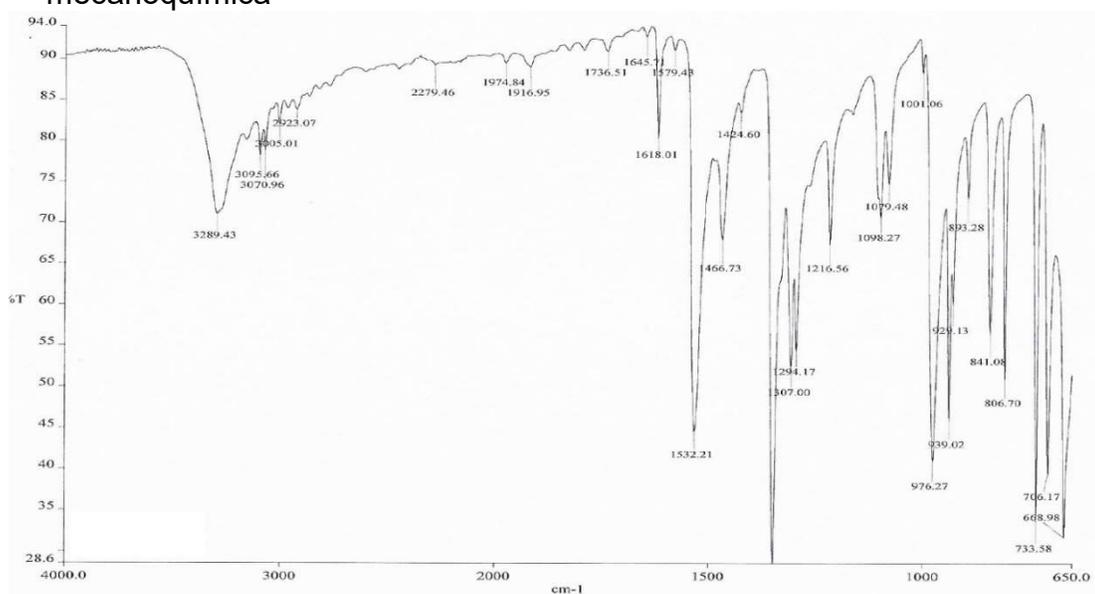
A) Espectro infrarrojo de la oxima de vainillina obtenida por síntesis mecanoquímica



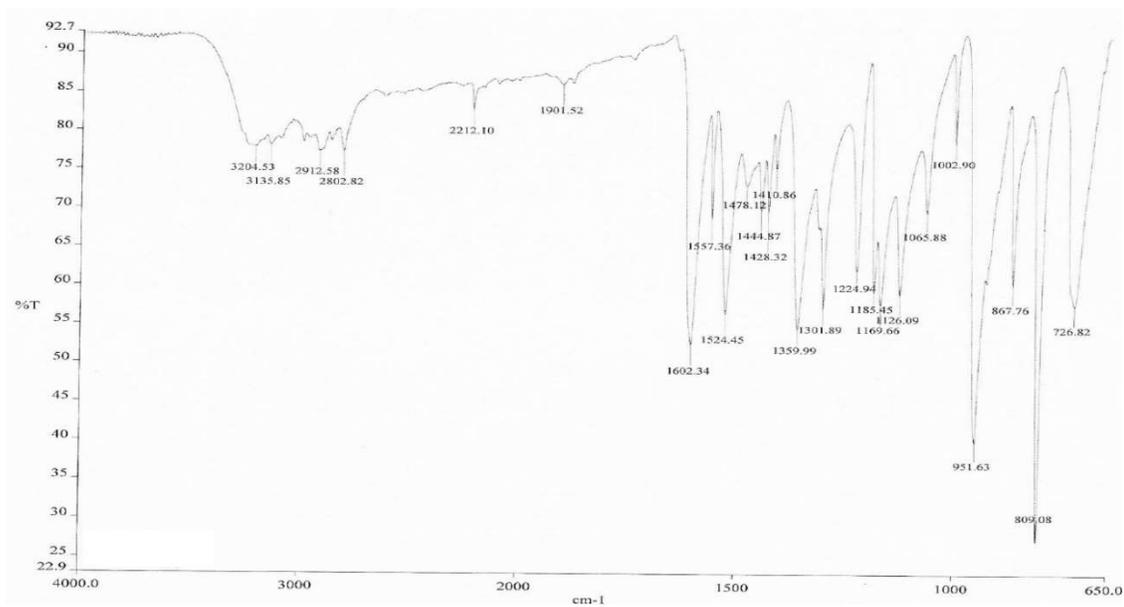
B) Espectro infrarrojo de la oxima de veratraldehído obtenida por síntesis mecanoquímica



C) Espectro infrarrojo de la oxima de 4-hidroxi benzaldehído obtenida por síntesis mecanoquímica



D) Espectro infrarrojo de la oxima de 3-nitro benzaldehído obtenida por síntesis mecanoquímica



E) Espectro infrarrojo de la oxima de 4-dimetilamino benzaldehído oxima obtenida por síntesis mecanoquímica