



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Obtención químico-enzimática de fragancias y aromas
quirales**

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

I Bt Adán Montalvo Mata

Asesores:

Dra. Rosa María Oliart Ros

Dra. Carolina Peña Montes

Dr. Gerardo Valerio Alfaro

H. VERACRUZ, VER.

Diciembre 2019



"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

H. Veracruz, Veracruz, 05/diciembre/2019
Div. Estudios de Posgrado e Investigación
OFICIO: ITV/DEPI/No.525/2019

Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

**C ADÁN MONTALVO MATA
PRESENTE**

Por este conducto se le comunica que su tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulada:

"Obtención químico-enzimática de fragancias y aromas quirales"

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
Antorcha y Luz de Fuego Permanente®

EL. H. JURADO

BENIGNO ORTIZ MUÑIZ
JEFE DE LA DIV. EST. POSG. E INVEST

DRA. ROSA MARÍA OLIART ROS
PRESIDENTE

DR. OSCAR GONZÁLEZ RÍOS
SECRETARIO

DRA. SANDRA TRINIDAD DEL MORAL VENTURA
VOCAL

DRA. CAROLINA PEÑA MONTES
SUPLENTE 1

DR. GERARDO VALERIO ALFARO
SUPLENTE 2

c. p. Expediente del Estudiante
Archivo

BOM*





EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

El presente trabajo de tesis titulado **"Obtención químico-enzimática de fragancias y aromas quirales"** presentado por el (la) C. **Adán Montalvo Mata** ha sido aprobado por su comité tutorial como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

DIRECTOR


DR. GERARDO VALERIO ALFARO

CO-DIRECTORA


DRA. ROSA MARÍA OLIART ROS

CO-DIRECTORA


DRA. CAROLINA PEÑA MONTES

REVISOR


DR. OSCAR GONZÁLEZ RÍOS

REVISORA


DRA. SANDRA TRINIDAD DEL MORAL VENTURA



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar
C.P. 91897, Veracruz, Ver. Tel. (229) 934 1500
www.veracruz.tecnm.mx



RECONOCIMIENTO

A Dios le dedico este gran logro por la gran fuerza de voluntad y esperanza que me otorgo. Así mismo gracias por la vida que me concedió día a día por su gran misericordia.

A mi Familia le agradezco los valores y principios que me inculcaron, así mismo el gran amor incondicional.

A mis amigos les agradezco el gran afecto y confianza puesta en mí. Muchos los llevaré en el alma.

A mis asesores les agradezco toda la sabiduría que recibí en la mejor disposición para el mejoramiento personal y profesional

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Por el apoyo financiero a estudiantes que trabajan día a día por la ciencia.

RESUMEN

Montalvo Mata, Adán. Maestría en Ciencias de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Junio 2019. “Obtención químico-enzimática de fragancias y aromas quirales”. Asesores: Dra. Oliart Ros, Rosa María; Dra. Peña Montes, Carolina y Dr. Valerio Alfaro, Gerardo.

En la industria de las fragancias, el desarrollo y síntesis de moléculas quirales, tales como: el aldehído 3-metil-5-fenil-pentalanal (Citrális® o Mefranal®), su alcohol derivado, 3-metil-5-fenil-pentanol (Fenoxanol®) y su nitrilo, 3-metil-5-fenil-pentanonitrilo (Citrális nitrilo®), tradicionalmente requieren del uso de químicos complejos en cada etapa de reacción, así mismo de condiciones de reacción que resultan ser de difícil manejo. La obtención de un solo enantiómero de los compuestos mencionados, difiere en el perfil aromático a la de su enantiómero especular no superponible e incluso de la mezcla racémica, convirtiéndolos en productos de un alto valor agregado. Por lo tanto, para la investigación, como la industria; Un reto es el desarrollo de metodologías de síntesis, menos abrasivas como las de biocatálisis y biotransformación, que usan (bio)catalizadores o parte de ellos en condiciones de reacción de bajo costo energético, exhibiendo -quimio - regio y -estereoselectividad en un solo paso de reacción. Por este motivo; el proyecto evaluó las reacciones y caracterizó estructuralmente los productos de biotransformación y biocatálisis de Mefranal® y sus derivados, determinando la configuración estequiométrica mediante polarimetría e interpretando las señales de interés en espectroscopias de CG-EM, IR-FT y RMN. Obteniendo que, en reacciones de biorreducción, *Sacharomisa cerevisiae* (bio)redujo a Mefranal®. La rotación óptica en $+15.0^\circ \pm 0.2$ hizo referencia a la obtención del enantiómero (R)-Fenoxanol® con rendimientos que oscilaron los 32% a 35%, independientemente de los 3 medios empleados, en tiempos de 72 horas a 37°C. En la etapa de biocatálisis para la (bio)acetilación de Fenoxanol® racémico, usando acetato de

vinilo como agente acetilante y *Cal-B*. La rotación óptica de $-7.0^{\circ} \pm 0.1$, indicó la obtención del enantiómero de configuración (S)-éster de Fenoxanol[®] con rendimientos del 45% en tiempos de 12 horas a 40° C. La oxima de Mefranal[®] racémica se obtuvo con rendimientos del 95% en un solo paso de síntesis, usando un sistema de reflujo con $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ a 65°C durante 3 horas. La obtención y la caracterización estructural de la oxima de Mefranal[®] y el éster de Fenoxanol[®], son aportes de nuevas moléculas con perfiles aromáticos, posibles candidatas a fragancias. Finalmente, el enantiómero de configuración (S)-Citralis Nitrilo[®] (Nitrilo de Mefranal) se obtuvo con rotación óptica de -2.0° empleando a *Cal-B*, con rendimientos del 45% y tiempos de 24 horas a 80° C.

ABSTRACT

Montalvo Mata, Adán. Master of Science in Biochemical Engineering. Technological Institute of Veracruz. Food Research and Development Unit. June 2019. "Chemical-enzymatic production of fragrances and chiral aromas". Advisors: Dra. Oliart Ros, Rosa María; Dra. Peña Montes, Carolina and Dr. Valerio Alfaro, Gerardo.

In the fragrance industry, the development and synthesis of chiral molecules, such as: 3-methyl-5-phenyl-pentanal aldehyde (Citralis® or Mefranal®), its derived alcohol, 3-methyl-5-phenyl-pentanol (Phenoxanol®) and its nitrile, 3-methyl-5-phenyl-pentanonitrile (Citralis nitrilo®), traditionally require the use of complex chemicals at each reaction stage, as well as reaction conditions that are difficult to handle. The obtaining of a single enantiomer of the aforementioned compounds differs in the aromatic profile from that of its non-superimposable specular enantiomer and even of the racemic mixture, turning them into products of high added value. Therefore, for research, such as industry; A challenge is the development of synthesis methodologies, less abrasive such as biocatalysis and biotransformation, which use (bio) catalysts or part of them in low energy cost reaction conditions, exhibiting -quimio -regio and -selectoselectivity in a single step of reaction. For this reason; The project evaluated the reactions and structurally characterized the biotransformation and biocatalysis products of Mefranal® and its derivatives, determining the stoichiometric configuration by polarimetry and interpreting the signals of interest in GC-MS, IR-FT and NMN spectroscopy. Obtaining that, in bioreduction reactions, *Sacharomisiae cerevisiae* (bio) reduced to Mefranal®. The optical rotation at $+ 15.0^\circ \pm 0.2$ referred to obtaining the enantiomer (R)-Phenoxanol® with yields that ranged from 32% to 35%, regardless of the 3 media used, in times of 72 hours at 37°C. In the biocatalysis stage for (bio) acetylation of racemic Phenoxanol®, using vinyl acetate as an acetylating agent and *Cal-B*. The optical rotation of $-7.0^\circ \pm 0.1$, indicated the obtaining of the configuration enantiomer (S)-ester of Phenoxanol® with yields of 45% in times of

12 hours at 40°C. The racemic Mefranal[®] oxime was obtained with yields 95% in a single synthesis step, using a reflux system with NH₂OH.HCl at 65°C for 3 hours. The obtaining and structural characterization of the Mefranal[®] oxime and the Phenoxanol[®] ester are contributions of new molecules with aromatic profiles, possible fragrance candidates. Finally, the configuration enantiomer (S)-Citrals Nitrilo[®] (Mefranal Nitrile) was obtained with the optical rotation of -2.0° using *Cal-B*, with yields of 45% and times of 24 hours at 80°C.

CONTENIDO

RECONOCIMIENTO	4
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
CONTENIDO	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	12
I. ANTECEDENTES	1
1.1 Obtención de Mefranal [®] y derivados.....	3
1.2 Procesos de la química verde.....	13
1.2.1 Obtención de compuestos nitrogenados con HN ₂ OH.HCl	14
1.3 Biocatálisis y biotransformaciones	18
1.3.1 Levadura de panificación en la biorreducción asimétrica	19
1.3.2 Lipasa de <i>Cal-B</i> en la acilación/eliminación y oximólisis asimétrica	22
II. OBJETIVOS	25
2.3 Objetivo general.....	25
2.4 Objetivos específicos	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Biorreducción asimétrica selectiva con <i>S. cerevisiae</i>	27
3.1.1 Biorreducción en medio acuoso	27
3.1.2 Biorreducción en solvente orgánico	28
3.1.3 Biorreducción en medio sólido	28
3.2 Reducción química con borohidruro de sodio (NaBH ₄).....	28
3.3 Bioacetilación asimétrica enantioselectiva mediante acilación con <i>Cal-B</i>	29
3.4 Síntesis química de la oxima de Mefranal [®] racémica con clorhidrato de hidroxilamina (NH ₂ OH.HCl)	30
3.5 Acetilación asimétrica de la oxima de Mefranal [®] catalizada por la lipasa <i>Cal-B</i>	30

3.6 Acetilación/eliminación asimétrica promovida por la lipasa <i>Cal-B</i> para la obtención de Citralis Nitrilo [®] a partir de Mefranal [®]	31
3.7 Técnicas instrumentales de análisis espectroscópicas	31
3.7.1 Infrarrojo (FT-IR)	31
3.7.2 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)	31
3.7.3 Polarimetría	32
3.7.4 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹ H y ¹³ C	32
3.7.5 Cromatografía en columna y capa fina (TLC)	33
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1 Análisis estructural de Mefranal [®] y derivados	34
4.1.1 Análisis espectroscópicos de Mefranal [®]	34
4.2 Obtención del alcohol Fenoxanol [®] usando <i>S. cerevisiae</i>	36
4.2.1 Análisis estructural del Alcohol de Fenoxanol [®]	36
4.3 Obtención del éster de Fenoxanol usando <i>Cal-B</i>	40
4.3.1 Análisis estructural del éster de Fenoxanol	41
4.4 Obtención de la oxima de Mefranal con NH ₂ OH.HCl	43
4.4.1 Análisis estructural de la oxima de Mefranal	43
4.5 Obtención del éster de oxima de Mefranal usando <i>Cal-B</i>	45
4.6 Obtención del Citralis Nitrilo [®] usando <i>Cal-B</i>	45
4.6.1 Análisis estructural del Nitrilo de Mefranal [®]	46
CONCLUSIONES	49
V. BIBLIOGRAFÍA	50
VI. APENDICES	59
APENDICE (A) ESPECTROS DE MASAS	60
APENDICE (B) ESPECTROS DE INFRARROJO	63
APENDICE (C) ESPECTROS DE DESPLAZAMIENTO QUÍMICO	66

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 Resultados de CG-EM, RMN ^1H y ^{13}C de Mefranal obtenidos en el presente trabajo y su comparación con resultados en literatura	35
TABLA 2 Resultados de CG-EM, RMN ^1H y ^{13}C de Fenoxanol [®] obtenidos en el presente trabajo y su comparación con resultados en literatura	37
TABLA 3 Resultados de Rendimientos y configuración absoluta Final de Fenoxanol [®] obtenidos en el presente trabajo y su comparación con resultados en literatura	39
TABLA 4 Resultados de CG-EM, RMN ^1H y ^{13}C de Citralis Nitrilo [®] obtenidos en el presente trabajo y su comparación con resultados en literatura	47

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Estructura química de Mefranal [®] 1 , Fenoxanol [®] 2 y Nitrilo de Mefranal [®] 6 (Matteoli <i>et al.</i> , 2007)	4
FIGURA 1.2 Estructura química de la Oxima de Mefranal 4 , Éster de Fenoxanol 3 y el Éster de la oxima de Mefranal 5 no reportadas	5
FIGURA 1.3 Síntesis química asimétrica de (R) y (S)-Fenoxanol [®] 2 con altos excesos enantioméricos, usando Cob(I)alamina como catalizador homogéneo nucleofílico (Fischli y Müller 1980)	6
FIGURA 1.4 Síntesis química asimétrica de los intermediarios (E) y (Z)-Fenoxanol [®] 7 con altos excesos enantioméricos (Ciappa <i>et al.</i> , 2008)	7
FIGURA 1.5 Síntesis química asimétrica de (R) y (S)-Fenoxanol [®] 2 con altos excesos enantioméricos, usando catalizadores complejos quirales metálicos de [Ir-(S)-PHOX] o [Ru-(R)-BINAP] (Ciappa <i>et al.</i> , 2008)	8
FIGURA 1.6 Síntesis química asimétrica de (R) y (S)-Mefranal [®] 1 con altos excesos enantioméricos, mediante oxidación química (Matteoli <i>et al.</i> , 2007)	9
FIGURA 1.7 Síntesis química asimétrica de (R) y (S)-Nitrilo de Mefranal [®] 6 con altos excesos enantioméricos, usando NH ₂ OH.HCl y NaI (Ciappa <i>et al.</i> , 2008)	9
FIGURA 1.8 Hidrogenación asimétrica de fragancias comerciales Fixolide [®] 12 , Florhydral [®] 14 y Rosaphen [®] 16 (Matteoli <i>et al.</i> , 2007)	10
FIGURA 1.9 Hidrogenación asimétrica de los intermediarios de Ciclamen [®] 18 , asistido con [Ru(C ₆ H ₆)Cl ₂] ₂ y presiones de 40 bar (H ₂) (Beghetto <i>et al.</i> , 2012).....	11
FIGURA 1.10 La síntesis asimétrica de la fragancia quiral de Florhydral 14 [®] asistida con catalizadores metálicos de rodio (Paganelli <i>et al.</i> , 2006).....	11

FIGURA 1.11 Inducción y obtención asimétrica de (R/S)-Citrinello 21 [®] mediante la interconversión de ligandos y la estructura química de la fragancia	12
FIGURA 1.12 Obtención de oximas usando aldehídos con clorhidrato de hidroxilamina (Arthur-Santiago et al., 2018)	15
FIGURA 1.13 Obtención de compuestos nitrogenados como nitrilos 27 , amidas 28 , aminas 29 , y ésteres de oxima 26 , a partir de aldehídos 22 y oximas 24 mediante diferentes rutas (bio)químicas (Santiago-Aquino et al., 2019).....	17
FIGURA 1.14 Reducción y transferencia de hidrógeno solo por una cara de cetonas proquirales	20
FIGURA 1.15 Biorreducción del aldehído saturado Florhydral [®] 14 ejercida por <i>S. cerevisiae</i> para la obtención del alcohol (R)-Florhydral [®] 30	21
FIGURA 1.16 Regio- y quimioselectividad ejercida por <i>S. cerevisiae</i> en la obtención del intermediario 32 de la fragancia de vertacetal [®] 33	22
FIGURA 1.17 Rutas bioquímicas usadas por lipasas en presencia de una amplia gama de sustratos nucleofílicos para la obtención de una gran variedad de compuestos (Arthur-Santiago et al., 2018).....	24
FIGURA 1.18 Resolución cinética asimétrica química-enzimática de Doremox [®] 34 , mediante el uso de lipasas hidrolíticas (Brenna, et al. 2002)	25
FIGURA 1.19 Resolución cinética asimétrica química-enzimática para la obtención de enantiómeros individuales de fragancias comerciales de (R)-Florhydral 15 [®] y (R)-Timberol [®] 37 (Brenna et al., 1990).....	26
FIGURA 1. 20 Mecanismo de la reacción de oxima de vainillina como sustrato nucleofílico y acetato de vinilo como agente acetilante catalizada por <i>Cal-B</i> (Arthur-Santiago et al., 2018)	28

FIGURA 1.21 Obtención de ésteres de oxima aromáticos 24 ejercida por <i>Cal-B</i> con rendimientos del 99% a partir de la oxima 26 (Santiago-Aquino <i>et al.</i> , 2019)	29
FIGURA 1.22 Obtención de nitrilos aromáticos a partir de oximas, promovida por la acetilación-eliminación promovida por <i>Cal-B</i> (Arthur-Santiago <i>et al.</i> , 2018)	29
FIGURA 1.23 Cromatograma-espectro de masas de la reacción de acetilación-eliminación promovida por <i>Cal-B</i> , que muestra la mínima (30°C) y máxima conversión a 80°C en 72 h (Santiago-Aquino <i>et al.</i> , 2019)	30
FIGURA 3.1 Diagrama general de la metodología seguida en el presente trabajo para la obtención de las fragancias quirales: Fenoxanol [®] 2 , el éster de Fenoxanol [®] 3 , la oxima de mefranal [®] 4 , el éster de la oxima de mefranal [®] 5 , y Citralis nitrilo [®] 6 , a partir de Mefranal [®] 1	26
FIGURA 4.1 Análisis en TLC donde (1) es Mefranal [®] , (2) Fenoxanol [®] reducido con NaBH ₄ y (3, 4 y 5) son las biorreducciones con <i>S. cerevisiae</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS

e. e	Exceso enantiomérico
BINAP	(2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo)
R/S	Configuración R (del latín <i>rectus</i> , derecho), movimiento hacia la derecha, en el sentido de las agujas del reloj. Configuración S (del latín <i>sinister</i> , izquierdo) sentido contrario a las agujas del reloj
<i>Sin/Anti</i>	Forma estructural dependiendo del eje de un doble enlace (en el mismo lado o en contra)
THF	Tetrahidrofurano
Z/E	<i>Zusammen</i> (juntos)/ <i>Entgegen</i> (opuesto) similar
eV	Electronvoltio
kDa	kilo Dalton
RMN ¹³ C, ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogeno
Red-Al [®]	Hidruro de sodio y bis-(2-metoxietoxi)-aluminio
<i>Cal-B</i>	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> fracción B
CCF	Cromatografía de Capa Fina
CG-EM	Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas
DIBAL [®]	Hidruro de diisobutilaluminio
LiAlH ₄	Hidruro de litio y aluminio
DMAP	4-(dimetilamino)-piridina
PPY	4-pirrolidino-piridina
PCC	clorocromato de piridinio (por sus siglas en inglés)
NaH	hidruro de sodio
Cob(I)alamin	catalizador homogéneo nucleofílico

INTRODUCCIÓN

La industria química y relacionadas manufacturan una gran variedad de productos esenciales para el crecimiento y sustentabilidad de sociedades modernas que demuestran cierta tendencia a preferir y consumir productos “más naturales” (Lukin *et al.*, 2018). Las crecientes dificultades para obtener cantidades suficientes de ingredientes y la aparición continua de nuevas tendencias en el mercado, han encabezado nuevas estrategias en la obtención de productos con alto valor agregado.

El interés por nuestro sentido del olfato y la interacción con más de 10 mil compuestos como alcoholes, aldehídos, ésteres y cetonas que hoy en día son denominadas fragancias quirales (volátiles a temperatura ambiente y peso molecular menores a 300 g/mol) (Rossiter J., 1996 y Takeda K., 1964) (Brenna *et al.*, 2002), comenzó a finales del siglo XIX, con la investigación de los diferentes comportamientos y estímulos que exhiben los receptores proteicos enzimáticos (Sundaresan *et al.*, 2005). El crecimiento de la síntesis química asimétrica dio lugar a la creación, obtención y uso de nuevas fragancias quirales con un enorme potencial económico a nivel industrial. La incorporación de la hidrogenación catalítica homogénea (descrita hace casi más de 60 años), por lo general, muchas veces es asistida con metales de transición como catalizadores altamente quimio-, regio- y estereoselectivos en la formación de enlaces C-C y C=X (Lionel 2007) (Knowles 2007) para la obtención de fragancias quirales.

Los innumerables procesos para cubrir la demanda (transformación de enlaces y grupos funcionales) (Noyori y Takaya *et al.*, 1969) (Ciappa 2004) (Lionel 2007) (Yabushita *et al.* 2019) requieren condiciones específicas y grandes cantidades de reactivos (Joshi 2016), que por lo general justifican al final, en calidades como intensidades, el alto costo final de la fragancia quiral única de consumo actual para cada sexo (Kafka, *et al.* 1973) (Shirokova 2008) (Ciappa 2008). Una tarea muy desafiante es la producción de fragancias ópticamente activas (quirales) en formas individuales, evitando el uso indiscriminado de mezclas racémicas que se biodegradan lentamente y tienden a bioacumularse en tejidos adiposos de

especies acuáticas, permitiendo así, evitar el efecto de dilución de isómeros menos activos y de esta manera usar cantidades más pequeñas de fragancias quirales. Por todo esto, es importante la búsqueda de procesos que involucren la (bio)catálisis para acelerar las reacciones químicas, de forma segura, disminuyendo la cantidad de energía (Sunil y Vivek, 2016) y ocupando solo los enantiómeros sensorialmente activos (Vecchiato 2016).

I. ANTECEDENTES

Una gran gama de moléculas aromáticas ocupadas como fragancias ópticamente activas (quirales), fueron obtenidas a partir de aceites esenciales derivados de animales y plantas mediante la purificación por extracción y destilación. Originalmente, la preparación de muchos aceites esenciales que poseen propiedades organolépticas agradables, inicio en el área de la medicina con destilaciones en los años 70. Particularmente es llamada “fragancia” a moléculas orgánicas con señales químicas agradables hacia la nariz cuyas funciones se determinan mediante la importancia sensorial, la naturaleza y procedencia (natural o sintética), las propiedades sensoriales y estructuras químicas, así mismo la volatilidad y la concentración de los ingredientes activos (la intensidad está determinada principalmente por la presión de vapor, que a su vez depende del peso molecular) (Horst y Johannes, 2016). Una fragancia quiral es aquella molécula aromática que puede existir en más de dos formas físicas, siendo imágenes especulares no superponibles y exhibiendo perfiles sensoriales diferentes ante entidades quirales, cuando están en una forma individual o racémica.

La primera nota de perfumería sintética usada fue el jazmín, de la cual se conocía el aceite esencial. Para ajustarse a la alta demanda de fragancias nuevas y las originales, la industria se esfuerza en desarrollar nuevas moléculas y o formulaciones periódicamente. En aras de ser más competitivo, el 16 y 18% de ventas se está invirtiendo en la investigación, el desarrollo de nuevas y frescas notas, con el surgimiento de la aplicación de la catálisis y materiales catalíticos para la síntesis de químicos de especialidades. Aunque la catálisis homogénea y heterogénea se han desarrollado desde la segunda mitad del siglo pasado para la producción de moléculas fragantes la primera se ha desarrollado más en la industria de los perfumes, así como en otros sectores de la industria química fina. No obstante, que la industria de las fragancias sea muy reservada, un estudio del 2013, reportado en *Perfumer and Flavorist* por analistas de Global Industry,

señalaba que la industria esperaba alcanzar alrededor de 45.6 billones de dólares en ventas en 2018. Givaudan, una compañía suiza, es la más grande en el mundo en la producción de ingredientes de fragancias y saborizantes, con un mercado del 25% del total en el mundo aproximadamente. Respecto de este mercado, el sector de los saborizantes y fragancias comparten un 50% aproximadamente; mientras que el resto son aromas químicos y aceites esenciales. Los aceites esenciales contribuyen alrededor del 7% a la industria de fragancias de los cuales aproximadamente un 20% va a la industria de la perfumería (Joshi y Ranade 2016).

El volumen anual de estas moléculas fragantes, es de más de 6 billones de dólares; que viene en aumento desde la segunda mitad del siglo XX, ya que actualmente el uso de productos de la industria química de la perfumería y de los cosméticos ha llegado a ser común en el consumo de los humanos. De esta manera la demanda de las fragancias, ha venido creciendo con el advenimiento de la urbanización, en las décadas recientes. Debido a lo anterior, significa que los extractos naturales por sí solos son insuficientes para satisfacer la demanda diaria. Por lo que es necesario la producción de las cada vez más diversas moléculas fragantes mediante síntesis química, que se asemejen a las producidas por las fuentes naturales o bien permitan modificar e innovar la producción de las nuevas fragancias. Paralelo al crecimiento de este sector se tiene el desarrollo de la química orgánica sintética, mediante la investigación y el desarrollo de reacciones de dos tipos: las que se requieren para la obtención del esqueleto carbonato (Reacciones con formación de enlaces C-C); como aquellas reacciones que permitirán la interconversión de grupos funcionales en etapas alternativas de la síntesis (Starkey 2012). La demanda y producción de nuevos compuestos químicos en la industria de las fragancias sintéticas es desarrollada por Givaudan obteniendo una fragancia quiral acuñándole el nombre de Mefranal® (Bauer *et al.*, 2002) (Fortineau *et al.*, 2012).

1.1 Obtención de Mefranal® y derivados

El Mefranal® (3-metil-5-fenil-pentanal, **1**, FIGURA 1.1) es considerado como una fragancia sintética única, ocupada como mezcla racémica en: champús, jabones, cosméticos y aromas ambientales (Yamamoto *et al.*, 2004) (Rossiter *et al.*, 1996). Su estructura química está compuesta por un anillo bencílico monosustituido unido a 6 carbonos derivados del isopreno; un centro quiral situado en el 3° carbono de la cadena alifática, le otorga la existencia de dos formas enantioméricas: R o S (Cahn *et al.*, 1956). Contenido en él, la presencia de un grupo funcional carbonilo (C=O) de aldehído situado en el extremo opuesto con respecto al anillo aromático. Los dos enantiómeros de configuración o estereoisómeros (isómeros) tienen propiedades físicas y químicas idénticas, a excepción en entidades quirales, donde interaccionan de manera diferente con los receptores sensoriales del olfato para dar una nota aromática diferente, e incluso diferente a una mezcla equimolecular de los 2 enantiómeros (denominada mezcla racémica).

El enantiómero más activo de la mezcla racémica de Mefranal es (R)-**1** con notas aromáticas frescas como: rosas, cítricos, ozono y lirio del valle, un carácter a citronela fuerte, pronunciación floral-aldehídica fresca con facetas afrutadas a la verbena y el limoncillo de connotación a látex y plástica (umbral de olor: 2.5 ng/l de aire), mientras que la comparación con su enantiómero opuesto (S)-**1** el cual tiene carácter a citronela añeja (menos fresca), pronunciación floral-aldehídica, faceta afrutada en la dirección de las frutas rojas y una tonalidad graso-rosado (umbral del olor: 7.9 ng/l de aire) (Matteoli *et al.*, 2007).

Debido a que la estructura química y física de Mefranal, permite la existencia de dos isómeros y contiene un grupo carbonilo C=O de aldehído, se han llevado a cabo diversas reacciones de interconversión de grupos funcionales y resoluciones racémicas para la obtención de diversos derivados aromáticos, como posibles candidatos a nuevas fragancias. Es así que la obtención de Fenoxanol® (3-metil-5-fenil-pentan-1-ol, **2**, FIGURA 1.1) mediante reacciones de reducción es exitosa, encontrando que las propiedades organolépticas más activas están denotadas en el enantiómero R+**2** al presentar un perfil aromático típico de Fenoxanol, pero más fuerte; más suave en una nota de facetas frutales en dirección de frutos rojos y

una tonalidad fresca incluso ligeramente acuática (umbral del olor: 12.5 ng/l de aire), diferente a su enantiómero opuesto S-2 que es una reminiscencia del Fenoxanol racémico con una tonalidad rosa más duro, más cutre y más metálico (umbral del olor: 5.0 ng/l de aire). Por otro lado, el Nitrilo de Mefranal[®] (Citrals Nitrilo[®], 3-metil-5-fenil-pentano nitrilo, 6, FIGURA 1.1) también forma parte de las 3 principales fragancias derivadas de Mefranal, que es nitrogenada. El perfil aromático de la mezcla racémica y cada enantiómero individual no tiene gran diferencia y se describió como una nota a cítrico típico en la dirección a limón y geranil nitrilo. La obtención de estos compuestos (2 y 6) son importantes para la elaboración de compuestos aromáticos quirales de alto valor agregado (Matteoli *et al.*, 2007).

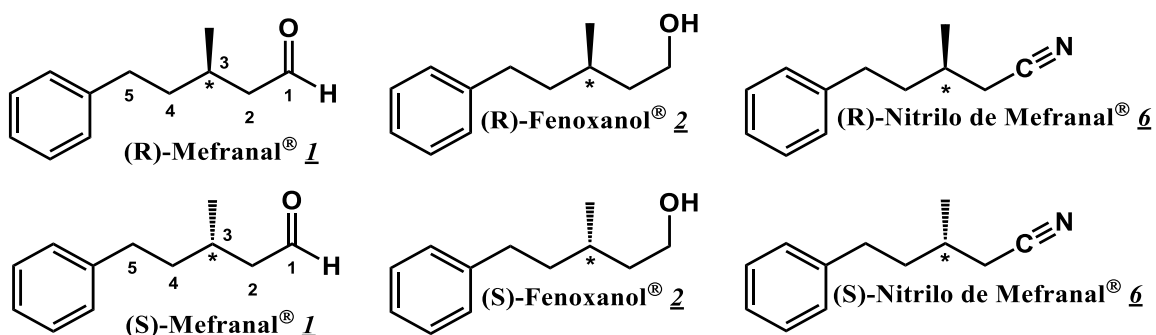


FIGURA 1.1 Estructura química de Mefranal[®] 1, Fenoxanol[®] 2 y Nitrilo de Mefranal[®] 6 (Matteoli *et al.*, 2007)

La obtención separada de los 2 enantiómeros de 1, 2 y 6 fue bien reportada principalmente por Matteoli *et al.*, 2007, Gautschi, *et al.* 2007, Ciappa *et al.*, 2008, Superchi *et al.*, 2011 y Gao *et al.*, 2017 utilizando síntesis asimétrica estereoselectiva. Una ardua investigación de igual forma para el diseño de compuestos interconvertibles a partir de la funcionalidad aldehído de mefranal[®] 1, en formas racémicas y/o individuales son la (R/S)-oxima de Mefranal 4 y los dos (R/S)-ésteres de acetato 3 y 5 derivado de 2 y 4 respectivamente (FIGURA 1.2). La obtención de estos compuestos no está reportada, lo que puede conducir a la caracterización de nuevas posibles moléculas aromáticas, candidatos a fragancias o aromas únicas quirales

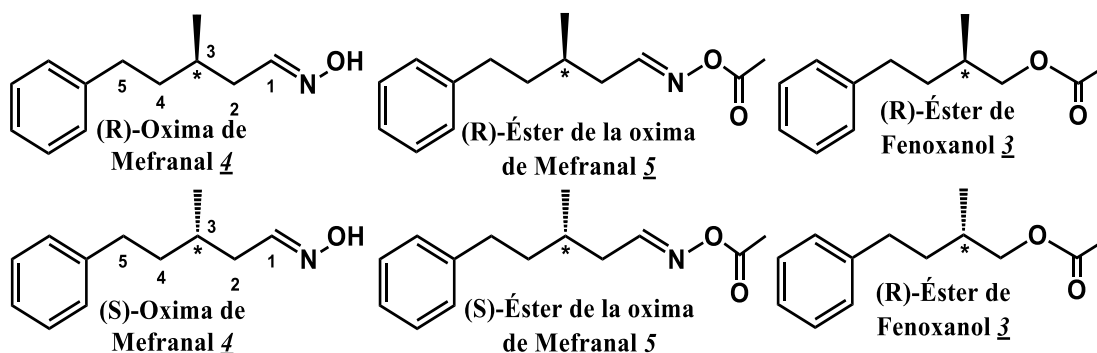


FIGURA 1.2 Estructura química de la Oxima de Mefranal **4**, Éster de Fenoxanol **3** y el Éster de la oxima de Mefranal **5** no reportadas

Fischli y Müller (1980) reportaron una primera preparación química para la obtención de los dos enantiómeros de (R) y (S)-Fenoxanol[®] **2**, a partir de la mezcla de los isómeros geométricos (Z) y (E)-**7**, mediante el uso de Cob(I)alamina como catalizador homogéneo nucleofílico (siguiendo la regla de Markownikov), para obtener rendimientos del 94 y 82% respectivamente (FIGURA 1.3). En este proceso, los alquenos mencionados, por separado, se redujeron usando cantidades catalíticas de cob(I)alamina en una solución acuosa de ácido acético y como fuente de electrones se utilizó zinc en polvo, el cual se adicionó a la solución que contenía al catalizador homogéneo.

En esta hidrogenación del doble enlace, se forma un intermediario alquilcobalamina en cada caso, ocurriendo un ataque nucleofílico al doble enlace coordinado con el catalizador (intermediario), lo cual conduce a la estereoselectividad en la formación de 82% de (R)-Fenoxanol y de 94% de (S)-Fenoxanol, a partir de los alquenos precursores (E) y (Z)-**7**, respectivamente.

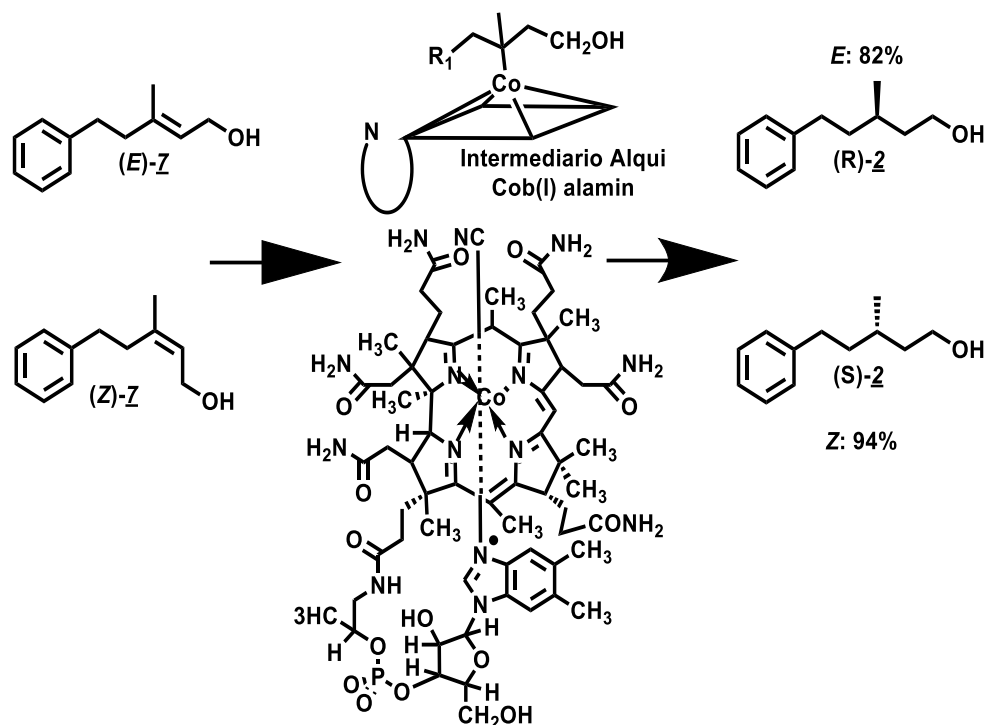


FIGURA 1.3 Síntesis química asimétrica de (R) y (S)-Fenoxanol[®] **2** con altos excesos enantioméricos, usando Cob(I)alamina como catalizador homogéneo nucleofílico (Fischli y Müller 1980)

Como se mencionó antes, Matteoli *et al.*, (2007), en la búsqueda de nuevos perfiles aromáticos para la industria de las fragancias, reportaron la formación de enlaces C-C, con estereoselectividad para producir eficientemente uno u otro de los isómeros geométricos de (E) y (Z)-**7**. La obtención de estereoisómeros individuales de las fragancias (R) y (S)-Fenoxanol[®] **2**, Citralis[®] **1** y Citralis Nitrilo[®] **6** con la utilización de (A): 2-butin-1-ol **8** y (2-fenil-etil) litio **9**, tratado con hidruro de sodio y bis-(2-metoxietoxi)-aluminio (Red-Al[®]) seguido de yodo, condujo al intermediario diastereomérico (Z)-3-metil-5-fenil-pent-2-en-1-ol **7** con alta pureza (rendimiento del 55%). Mientras que, por otro lado, el uso (B): de bencilcetona **10** y fosfonoacetato de etilo **11** en presencia de NaH dio el intermediario éster α,β -insaturado (rendimiento de 50%), mediante una reacción de tipo “Wittig”, el cual fue reducido con DIBAL[®] (hidruro de diisobutil aluminio) (45% de rendimiento total), el cual condujo al intermediario diastereomérico (E)-3-metil-5-fenil-pent-2-en-1-ol **7** (FIGURA 1.4).

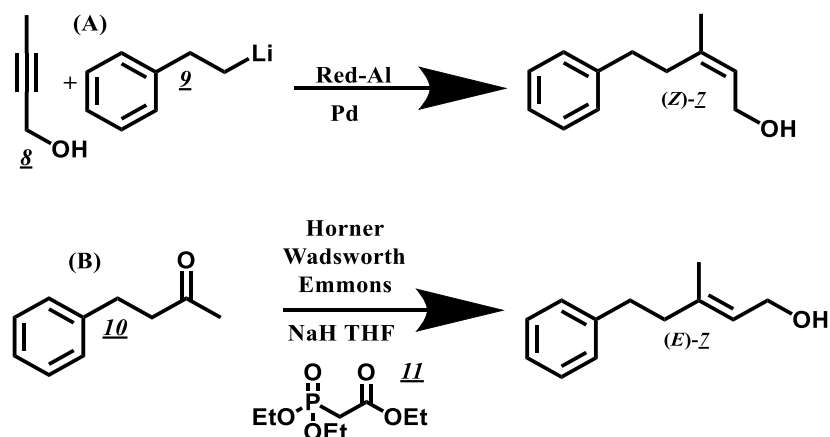


FIGURA 1.4 Síntesis química asimétrica de los intermediarios (*E*) y (*Z*)-Fenoxanol® **Z** con altos excesos enantioméricos (Ciappa *et al.*, 2008)

Nuevamente, los intermediarios clave fueron los diastéromeros (*Z*) y (*E*)-3-metil-5-fenil-pent-2-en-1-ol **Z** ya mencionados. A diferencia del trabajo de Fischi y Muller, el paso clave es la hidrogenación catalítica (mediante metales de transición) asimétrica de los isómeros geométricos **Z**, que condujo a los enantiómeros individuales de Fenoxanol® **Z**. La catálisis asimétrica mediante metales de transición, se encuentra entre los métodos más importantes para la síntesis de sustancias enantioméricamente enriquecidas a escala industrial (Johnson, *et al.*, 2007) (Saudan 2007).

Los complejos metálicos se fabrican a escala industrial y a nivel de laboratorio para el uso de la investigación, mediante una tecnología ya madura, que se consolidó con la concesión del Premio Nobel en Química en 2001, otorgado a William S. Knowles por su descubrimiento y uso de metales de transición como catalizadores quirales en una reacción de hidrogenación para la obtención del importante aminoácido L-dopa, que se emplea para tratar la enfermedad de Parkinson a nivel industrial. Esta tecnología ha sido adoptada para la industria de las fragancias (Nicholas *et al.*, 2007 y Yang *et al.*, 2014). La obtención de fragancias enantioméricamente puras mediante métodos de la síntesis química se llevan a cabo en procesos de planta piloto llegando a escalar perfectamente a nivel de complejos equipos industriales tan sofisticados (Roberts y Whittall, 2007).

La inducción de quiralidad en sustratos planares y la síntesis de complejos catiónicos con diferentes ligandos catalizadores, tiene metodologías que conllevan el uso de reactivos y procesos complejos en condiciones de difícil manejo (Li 2003). Con el advenimiento de los sistemas de ligandos quirales complejos y caros, la cuestión de la fabricación y el uso de catalizadores preformados sobre especies generadas *in situ* es común para la hidrogenación asimétrica (Werkmeister *et al.* 2014). Matteoli y colaboradores efectuaron la hidrogenación asimétrica de (E/Z)-**7**, en presencia del catalizador Ir((S)-2-(o-difenilfosfino fenil)-3-ter-butil-oxazolina) ([Ir-(S)-PHOX] o [Ru-(R)-BINAP]), procediendo con completa quimioselectividad; usando 2% de catalizador, se observó la hidrogenación completa de los sustratos después de 21 h (FIGURA 1.5).

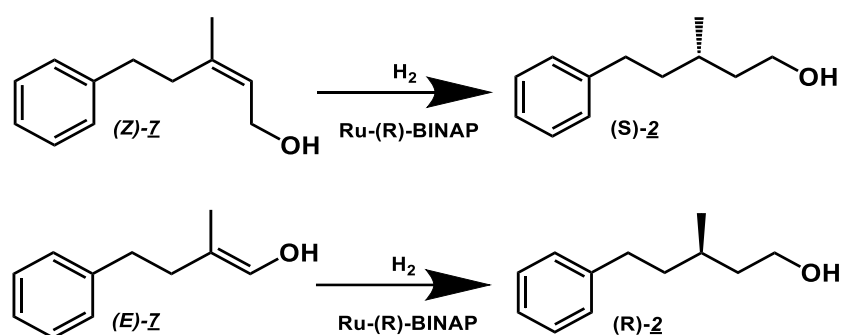


FIGURA 1.5 Síntesis química asimétrica de (R) y (S)-Fenoxanol[®] **2** con altos excesos enantioméricos, usando catalizadores complejos quirales metálicos de [Ir-(S)-PHOX] o [Ru-(R)-BINAP] (Ciappa *et al.*, 2008)

En resumen, el centro quiral de los enantiómeros (R) y (S) de Fenoxanol[®] **2**, se forma con la hidrogenación asimétrica de los isómeros geométricos de los alcoholes insaturados (E) y (Z)-**7** (FIGURA 1.5). A partir de estos compuestos, el paso clave es la oxidación para el tratamiento que conduce finalmente a los enantiómeros (R) y (S) de Mefranal[®] **1** con rendimientos por arriba del 90% sin pérdida de enantiopureza, empleando una columna capilar Chiraldex G-TA (GLC quiral) y clorocromato de piridinio (PCC) (FIGURA 1.6).

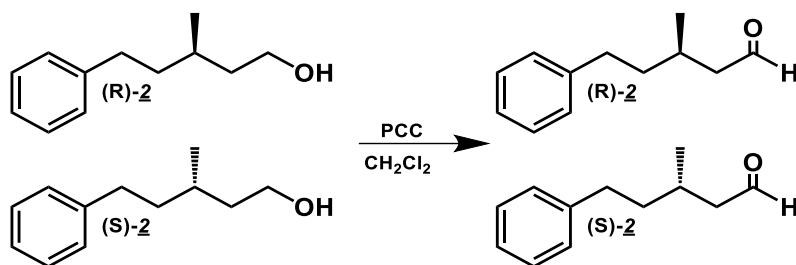


FIGURA 1.6 Síntesis química asimétrica de (R) y (S)-Mefranal[®] **1** con altos excesos enantioméricos, mediante oxidación química (Matteoli *et al.*, 2007)

Existen numerosos reportes de métodos químicos sintéticos asimétricos y una gran gama de reactivos y sustratos (derivados del cianuro) para la obtención de compuestos nitrogenados bajo diferentes condiciones de reacción (Camps y Guerrero (1988) (Ballini *et al.*, 2003) (Yang y Fleming 2017). El paso para la síntesis del Citralis nitrilo[®] (**6**) en sus dos diferentes configuraciones, reportó la utilización de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ y NaI en un medio de acetonitrilo (Ballini (98%) y Mateolli (90%) correspondiente en rendimiento), como transformación final (FIGURA 1.7) (Scrivanti *et al.*, 2006) (Kivrak y Zora 2007) (Gozum y Mebane 2012).

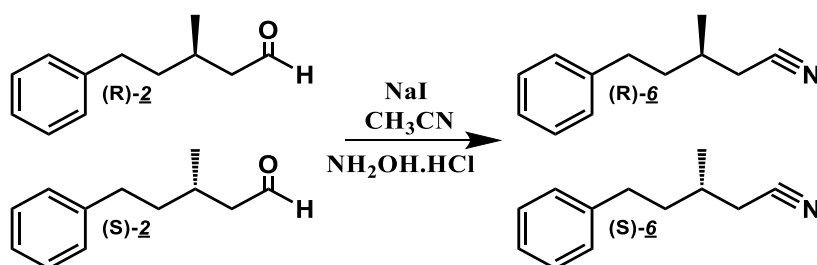


FIGURA 1.7 Síntesis química asimétrica de (R) y (S)-Nitrilo de Mefranal[®] **6** con altos excesos enantioméricos, usando $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ y NaI (Ciappa *et al.*, 2008)

Desde la década de los 80's, se realizaron muchos estudios que condujo a una gama de aplicaciones a gran escala de la hidrogenación catalítica asimétrica y el advenimiento de los catalizadores BINAP (Roberts y Whittall, 2007). Las investigaciones con estos compuestos demostraron que la catálisis con BINAP de rutenio en la industria de las fragancias quirales derivadas de cetonas simples,

hace énfasis en la importancia de los catalizadores que demuestran una más alta efectividad y selectividad (Ryoji 1997). Matteoli en 2011, reportó la obtención de las fragancias quirales (en formas enantioméricamente puras), Fixolide® **12**, Florhydral® **14** y Rosaphen® **16**, los dos primeros comercializados por Givaudan y el tercero por Symrise) con procesos de hidrogenación asimétrica sobre dobles enlaces de sus precursores insaturados, **11** para Fixolide® **12**, **13** para Florhydral® **14** y **15** Rosaphen® **16**, respectivamente, mediante la modificación de presiones empleando catalizadores como $[\text{Ru}(\text{C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$ y (S)-MeO-BIPHEP para dar una ruta sintética efectiva, en cada fragancia (FIGURA 1.8).

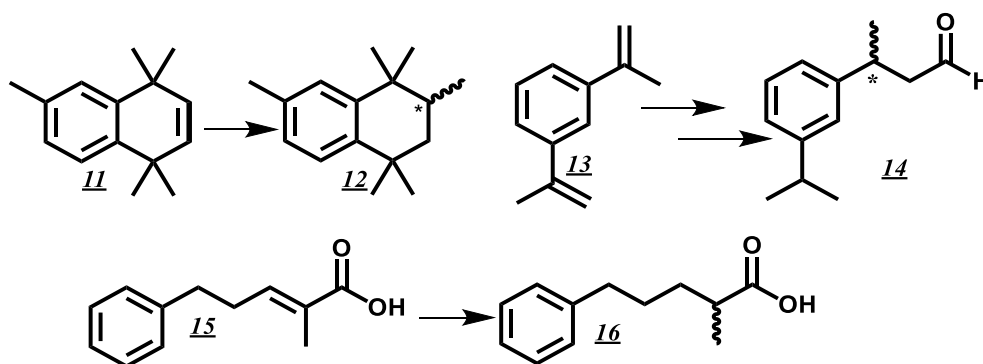


FIGURA 1.8 Hidrogenación asimétrica de fragancias comerciales Fixolide® **12**, Florhydral® **14** y Rosaphen® **16** (Matteoli *et al.*, 2007)

Continuando con la hidrogenación catalítica con metales de transición asimétrica, en la FIGURA 1.9, se muestra la hidrogenación del ácido (*E*)-3-(4-isopropilfenil)-2-metilo acrílico **17** para la obtención de la fragancia quiral Ciclamen® **18** (3-(4-isopropilfenil)-2-metilpropanal). Esta se llevó a cabo con una enantiopureza de aproximadamente 60%. En este caso, la hidrogenación asimétrica efectuada con el sistema catalítico de $[\text{Ru}(\text{C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$ y (S)-MeO-BIPHEP *in situ* del ácido (*E*)-**17** condujo al aldehído Ciclamen® **18**, donde la hidrogenación es selectiva en el doble enlace C=C, sin afectar al doble enlace del grupo carbonilo, en el que la presencia del sistema $[\text{Ru}(\text{C}_6\text{H}_6)\text{Cl}_2]_2$, induce la hidrogenación asimétrica conducente a la formación en mayor proporción de un enantiómero (R/S) en el centro quiral, con

un tiempo de reacción de 24 horas a presiones de 40 bar de H₂ (Beghetto *et al.*, 2012).

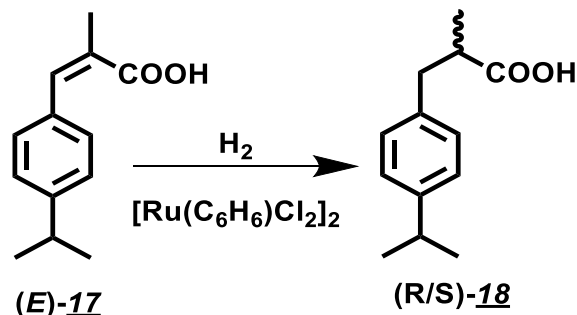


FIGURA 1.9 Hidrogenación asimétrica de los intermediarios de Ciclamen® **18**, asistido con [Ru(C₆H₆)Cl₂]₂ y presiones de 40 bar (H₂) (Beghetto *et al.*, 2012)

Por otro lado, en una reacción diferente, la de hidroformilación, pero utilizando un catalizador de rodio, Paganelli *et al.*, (2006), reportaron la síntesis de la fragancia quiral de Florhydal® **14** con resultados de actividad óptica de 2.0° y 5.0° obteniendo en exceso el isómero de configuración (R), en presencia del complejo de rodio como catalizador, conduciendo al precursor de **14**, cómo se puede ver en la FIGURA 1.10. Usando 6.3 mmol, en temperaturas que llegaban a los 150 °C, en una relación **13**/Rh (molar ratio) igual a 1000/1, 5 mL de tolueno y una presión (H₂ y CO) igual a 35 atm.

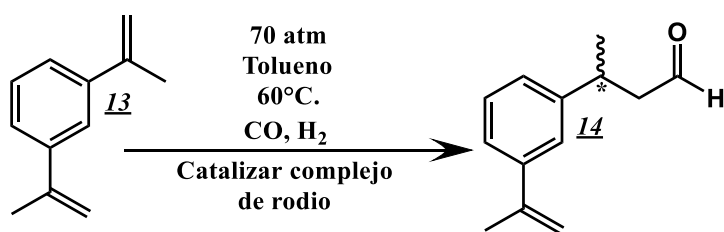


FIGURA 1.10 La síntesis asimétrica de la fragancia quiral de Florhydal® **14** asistida con catalizadores metálicos de rodio (Paganelli *et al.*, 2006)

La aplicación de catalizadores complejos de metales de transición quirales, como los de rutenio, Ru-[(R)-BINAP] y Ru-[(S)-BINAP] en moléculas proquirales

doblemente insaturadas fragantes, como Geraniol® **19** y Nerol® **20**, mostró la importancia de la quiralidad del complejo de rutenio y de los sustituyentes en los más de un doble enlace presentes en el precursor de la molécula de la fragancia, así como su isomería geométrica (E/Z), por cuanto a la selectividad y la inducción de quiralidad del catalizador produciendo los productos de la reducción enantioselectiva y la formación de centros quirales (R) o (S) con excesos enantioméricos de más del 99% según el precursor. De esta forma, el Geraniol® **19** y Nerol® **20** condujeron a la síntesis de los dos enantiómeros de la fragancia quiral (R) y (S)-Citronelol® **21** como producto final, respectivamente con excesos enantioméricos superiores al 99% (FIGURA 1.11).

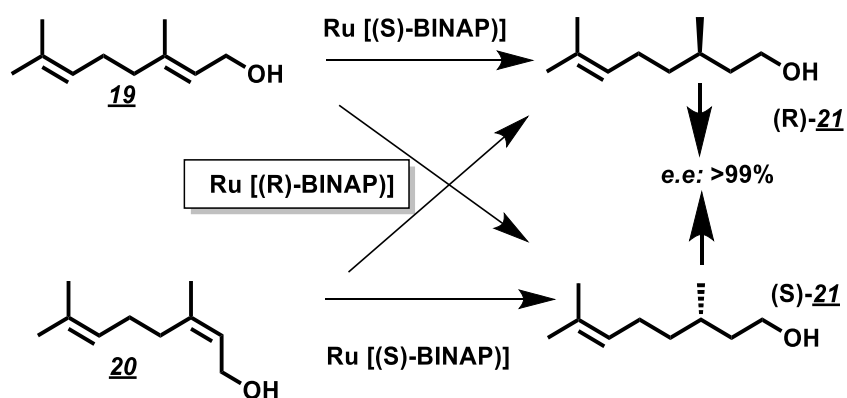


FIGURA 1.11 Inducción y obtención asimétrica de (R/S)-Citronelol **21**® mediante la interconversión de ligandos y la estructura química de la fragancia

Sin embargo, a pesar de los excelentes resultados vistos, las preocupaciones en cuanto al uso de estos reactivos debido a su naturaleza corrosiva y peligrosa, conduce a pensar en la importancia del reemplazo de estos reactivos con alternativas menos dañinas para producir fragancias quirales y que es un objetivo principal para la química verde; la cual utiliza metodologías tales como biocatálisis y biotransformaciones, el uso de microondas y ultrasonido, el uso de solventes no convencionales (fluidos supercríticos, líquidos iónicos y DEEP (Deep eutectic solvents) o reacciones sin solvente/mecanoquímicas como vías alternativas para obtener procesos más amigables con el medio ambiente. De esta manera, el interés en el mejoramiento continuo de procesos “verdes”, hace muy importante

retomar una consciencia en la protección del medio ambiente, siendo un tema especial de la ciencia y la tecnología sustentable (Ryoji 2003). De la misma manera, la "biodiscriminación" por parte de algunos microorganismos y otros organismos animales y vegetales, revela una actividad biológica, por ejemplo, de oxido-reducción muy fuerte que permiten utilizarlos en biotransformaciones para la obtención de productos de valor agregado (Pawłowska 2003).

1.2 Procesos de la química verde

La química verde es un enfoque y una herramienta conceptual para la protección del medio ambiente ante la contaminación originada por la industria química y otras relacionadas con el uso y manufactura de sustancias químicas. La presión constante para reducir la cantidad de energía en procesos con transformaciones químicas menos dañinas en la producción de compuestos con un alto valor agregado fue la respuesta más favorable. Anastas y Warner (1998) describieron y plasmaron los principios en los que se basa el diseño de procesos sustentables para la "Química verde"; propuestas por la EPA (por sus siglas en inglés "Environmental Protection Agency", Agencia de Protección Ambiental de EE.UU.) en coordinación con otras agencias a principios de los años 90's.

Hoy en día el cambio debido a la necesidad apremiante de cuidar la integridad ambiental y adaptar condiciones menos riesgosas para el ser humano; la química ha aportado tantos beneficios a la sociedad, así como su influencia en términos de economía y bienestar. A finales de la década de 1960, comenzó a darse importancia al ambiente, demostrando 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 2007), el mensaje penetró tanto la mente del químico industrial por consideraciones no sólo éticas, sino también económicas. Por tal motivo, es 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) (Easwar, 2006 y Strohmeier *et al.*, 2011).

1.2.1 Obtención de compuestos nitrogenados con $\text{HN}_2\text{OH.HCl}$

La reacción de compuestos carbonílicos como los aldehídos con clorhidrato de hidroxilamina (en forma de clorhidrato, sustituyendo el uso de derivados del cianuro) y la posterior adición de una base, permite la condensación con la formación de un doble enlace C=N de oxima con la pérdida de una molécula de agua, para la obtención del grupo funcional oxima; como se ilustra en la FIGURA 1.12, para vainillina **22** y 2,3,5,5-tetrametilhexanal **23** con la formación de sus oximas **24** y **25**, respectivamente (Arthur-Santiago *et al.*, 2018). Dado que la hidroxilamina es una base que forma sales y es fácil de conservar y manejar, la protonación del oxígeno carbonílico favorece un ataque nucleofílico del grupo amino al carbono carbonílico. Sin embargo, la hidroxilamina puede protonarse en medio ácido y formar el ion $\text{H}_3\text{N}^+\text{OH}$, que carece de electrones no compartidos (Nathan *et al.*, 2006).

Por lo tanto, las mezclas de reacción deben ser lo suficientemente ácidas para que el compuesto carbonílico se protone, pero no tanto como para que la concentración de hidroxilamina libre resulte demasiado baja, que alente la reacción. Las oximas tienen un comportamiento anfótero, ya que, en presencia de ácidos de minerales fuertes, presentan un comportamiento básico formando sales de oxima y actúan como ácidos débiles con hidróxidos alcalinos formando alcóxidos de oxima en medio acuoso (Allinger, 1978). En casos particulares, la conjugación y obtención de compuestos nitrogenados para oximas y sus derivados, las condiciones óptimas dependerá del pH del medio (Celik *et al.*, 2006).

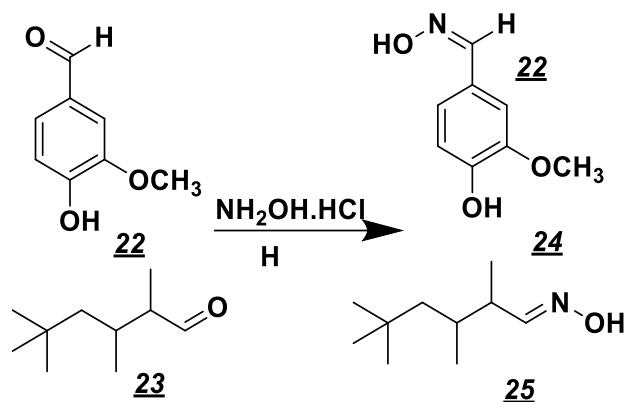


FIGURA 1.12 Obtención de oximas usando aldehídos con clorhidrato de hidroxilamina (Arthur-Santiago et al., 2018)

En comparación con las iminas, el grupo hidroxilo(-OH) de oxima, infiere una mayor estabilidad química a la reacción de hidrólisis, en virtud de que el grupo -OH disminuye la basicidad del nitrógeno, que es esencial para favorecer el ataque del agua, catalizado por la protonación del N al carbono de la oxima, que afecta negativamente al rendimiento de la obtención de la oxima. La síntesis de oximas a partir de aldehídos aromáticos de fuentes naturales como vainillina, citral, anisaldehído, entre otros, para obtener fragancias y aromas de valor agregado, fue reportado por Arthur-Santiago *et al.*, (2018) para la obtención de oximas junto con otros compuestos nitrogenados. En una variante de la química verde, se utilizó un proceso de condensación en fase sólida, en el que la reacción de condensación de los aldehídos aromáticos con el clorhidrato de hidroxilamina, se realizó mediante mecanoquímica en un mortero con pistilo de ágata y usando silicato de magnesio (un material fácilmente asequible y empleado en cromatografía en columna y comercializado como florisil®) como soporte básico.

En este caso, la ausencia de un disolvente, permitió la formación de sitios locales altamente activados, debido a la energía mecánica generada por la fricción, lo cual aceleró la velocidad de la reacción de condensación, con la obtención de buenos rendimientos químicos. En este caso, el florisil®, también favoreció la deshidratación y una fácil extracción del producto. La reacción resultó más “limpia”

que su contraparte tradicional en solvente acuoso-alcohólico y sin tener que emplear una base fuerte para liberar la hidroxilamina de su sal. Hoy en día, los soportes de óxido inorgánico, como sílicagel, silicato de magnesio, las zeolitas, las arcillas y la alúmina básica, son utilizados en mecanoquímica, lo que permite aumentar la reactividad o selectividad y también desempeñar un papel como catalizadores básicos ambientalmente aceptables.

La obtención de oximas mediante el método denominado clásico, utiliza agua o mezclas de agua etanol, metanol, piridina, trietil amina, THF a reflujo; asimismo, se emplea una base para liberar la hidroxilamina de su clorhidrato, que dependiendo de la estructura del sustrato y/o del producto, puede ser débil como NaHCO_3 , Na_2CO_3 , NaOH , KOH , piridina, trietilamina, estos dos últimos también son utilizados como disolventes. Muchas oximas, poseen cualidades organolépticas con un perfil aromático agradable al olfato, por lo que se obtienen y se comercializan son como fragancias bien definidas en la industria. Un sector importante de las empresas como Givaudan 1985, Kao 2006 y UFC 2012 patentaron y registraron una gama de oximas utilizadas como fragancias, asignando perfiles aromáticos específicos para cada una de ellas.

Un ejemplo es el caso de la oxima de 2,3,5,5-tetrametilhexanal **25** (FIGURA 1.12), usada como fragancia en la preparación de cosméticos y perfumes. La utilización de un gran número de oximas como fragancias abre las puertas para la transformación y caracterización como fragancia de la Oxima de Mefranal (**4**) (Figura 1.2) de la cual, aún no se encuentran reportes de su síntesis a partir de **1**, y a partir de ahí considerar la posibilidad de tener un perfil organoléptico agradable y poder ser utilizada como una nueva, y posiblemente dos nuevas fragancias quirales (Zviely *et al.*, 2013).

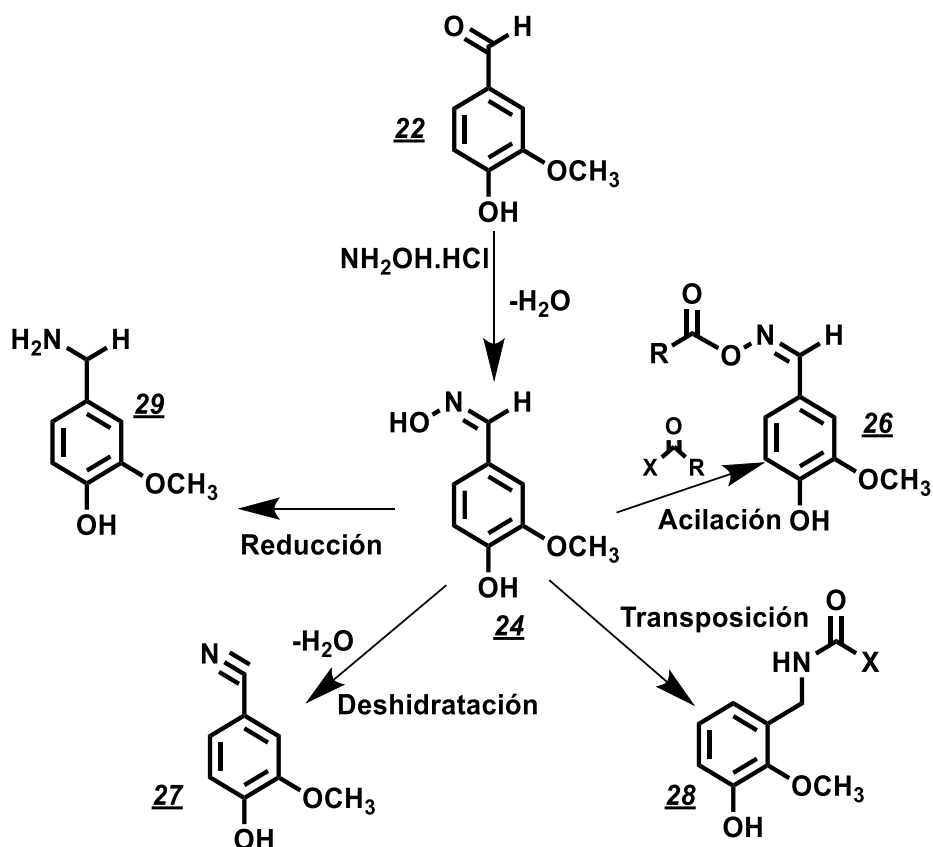


FIGURA 1.13 Obtención de compuestos nitrogenados como nitrilos 27, amidas 28, aminas 29, y ésteres de oxima 26, a partir de aldehídos 22 y oximas 24 mediante diferentes rutas (bio)químicas (Santiago-Aquino *et al.*, 2019)

Como se muestran en la FIGURA 1.13, a partir de un aldehído como vainillina 22 y su oxima 24, se obtienen compuestos nitrogenados, como lo son el nitrilo 27, amida 28, la amina 29, y el éster de oxima 26, que a su vez pueden aplicarse para la síntesis de una gran variedad de productos funcionales (Dikusar *et al.*, 2007) (Andresen *et al.*, 2008) (Karthikeyan *et al.*, 2011) (Diaz-Velandia *et al.*, 2011) (Vilas *et al.*, 2015) (Bolotin *et al.*, 2017) (Hyodo *et al.*, 2018). En la mayoría de todos estos apartados, 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 (Strauss y Faber 2000) (Wohlgemuth 2010) (Coelho y Ribeiro 2015).

En este contexto, es conveniente el empleo de catalizadores (lo más selectivos posible) en vez de reactivos estequiométricos. Para poder reducir lo más posible,

los requerimientos energéticos en la obtención de compuestos nitrogenados derivados de oximas son evaluados por su impacto medioambiental y económico, intenta llevar a cabo los procesos sintéticos a temperatura y presión ambientes. Las enzimas cumplen con los parámetros del dilema, en la coyuntura de diseñar nuevas metodologías menos benignas sin perder la rentabilidad del proceso industrial y científico. Ya que no están restringidas a su función natural, sino que también pueden aceptar una gran variedad de sustratos y ejercer actividad catalítica en medios de reacción orgánicos, además de la disminución de ingeniería genética en la producción de enzimas con propiedades catalíticas deseadas. Hace que la utilización de enzimas como catalizadores de reacciones en la síntesis química asimétrica sea una metodología alternativa confiable (Prasad 2006).

1.3 Biocatálisis y biotransformaciones

Se define como biocatálisis y biotransformaciones a los procesos que utilizan enzimas (biocatalizadores), ya sean nativas o modificadas para la transformación y conversión de compuestos en condiciones de reacción moderadas. En la naturaleza, las enzimas catalizan transformaciones que ocurren dentro y/o fuera de las células vivas y se pueden encontrar en cualquier célula. Con la identificación de la estructura cuaternaria del biocatalizador, se puede determinar no solo la función, sino también la interacción con el medio externo en el que se disuelva o suspenda, con ramificaciones importantes cuando se emplea en condiciones parcialmente o completamente no acuosas (Animesh y Jon *et al*, 2016).

Algunos biocatalizadores aceptan solo una variedad limitada de sustratos, pero una fracción grande es más tolerante y permite conversiones de compuestos de origen no naturales. Es así que la biocatálisis se basa en esta promiscuidad parcial con la identificación de biocatalizadores que sean suficientemente generales para aceptar una gran variedad de sustratos relacionados, pero lo suficientemente selectivas como para producir moléculas únicas o estereoisómericas. Metodologías que involucran condiciones sustentables para la

obtención de moléculas quirales con perfiles aromáticos agradables en una forma enantioméricamente pura; son posibles desde hace casi 50 años con ayuda de microorganismos o parte de ellos usados como catalizadores que ejercen quimio-regio- y estereoselectividad.

1.3.1 Levadura de panificación en la biorreducción asimétrica

Servi (1990) describió a través de los años en la síntesis química orgánica preparativa, las ventajas de usar células microbianas de clasificación hidrolíticas como catalizadores para la biotransformación de una gran variedad de compuestos carbonílicos aromáticos (Kutyna y Borneman *et al.*, 2018) quirales. La levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) (Baker's yeast), es un sistema microbiológico, usualmente comprada en una tienda de abarrotes local. *S. cerevisiae* es una productora prolífica de enzimas, debido a que las células vivas de la levadura regeneran continuamente los cofactores de nicotinamida mediante el metabolismo de azúcares simples como sacarosa o glucosa y puede usarse como agente biocatalítico en el laboratorio.

S. cerevisiae tiene una amplia gama de reacciones enzimáticas (Pratap *et al.*, 2011) (Brenna *et al.*, 2017) (Ji *et al.*, 2019) (Levisson *et al.*, 2019) que puede efectuar (siendo las de oxido-reducción las más importantes) para la transformación de diversos compuestos carbonílicos aromáticos (Häser *et al.*, 2006), mediante biorreducciones estereoselectivas de cetonas, ésteres, lactonas e incluso amidas (Zumbrägel *et al.*, 2018) en el área de síntesis orgánica asimétrica (Csuk y Glänze *et al.*, 1991) (Pilli y Riatto *et al.*, 1998) (Navarro-Ocaña *et al.*, 2001). La razón de esto es la sencillez de su manejo, ya que no requiere condiciones de esterilidad, tiene un fácil uso y bajo costo. La versatilidad al no requerir cofactores, está sujeta a la regulación metabólica por el medio ambiente e inductores. La estabilidad y actividad durante cierto tiempo a la irradiación UV, al ultrasonido y exposición a disolventes orgánicos fue exitosa, extendiendo su vida útil mediante aislamiento e inmovilización (Zhang *et al.* 2018).

Las reacciones biocatalíticas de *S. cerevisiae* exhiben quimio-, regio- y estereoselectividad, cuando algunos grupos funcionales similares están presentes en una

molécula y que a menudo solo reacciona un grupo funcional, mientras que deja intactos los otros, quedando patente así, la capacidad para llevar a cabo la reducción enantioselectiva de sustratos aromáticos in/saturados y heterocíclicos (Brenna *et al.*, 2002).

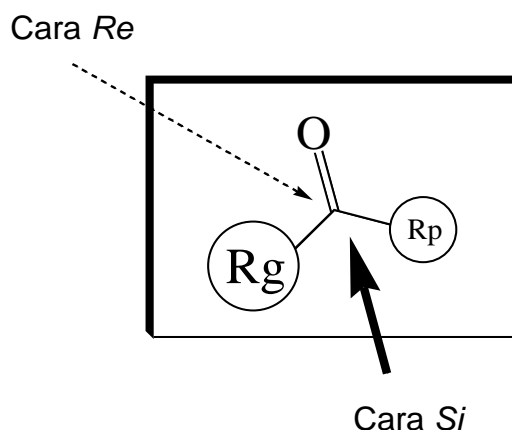


FIGURA 1.14 Reducción y transferencia de hidrógeno solo por una cara de cetonas proquirales

La regla de Prelog postula que la transferencia de hidrógeno se realiza por la cara re de la cetona proquiral (Figura 1.14). La mayoría de las reducciones llevadas a cabo con levaduras, y también con otros microorganismos como las lipasas, obedecen esta regla. La ruta biocatalítica de biorreducción con *S. cerevisiae* conduce a los alcoholes secundarios correspondientes, cuando los materiales de partida son proquirales, dichos procesos son resoluciones cinéticas y, por lo tanto, están sujetos a la limitación del 50% del rendimiento (Cunha *et al.*, 2015).

Por la amplia gama de enzimas de *S. cerevisiae* participes en la biorreducción, las principales enzimas fueron bien caracterizadas y reportadas como oxidorreductasas, deshidrogenasas de alcohol y cetoreductasas, entre otras (Wu *et al.*, 2018). Debido a que las reducciones de carbonilo implican la adición formal de H₂, generalmente en forma de un ion hidruro junto con un protón, se debe incluir un segundo cosustrato que suministre equivalentes reductores junto con el aldehído o la cetona aromática.

En los procesos de biorreducción de compuestos aromáticos proquirales denominadas fragancias mediante las oxidorreductasas presentes en *S. cerevisiae*, la estructura obtenida, depende estrechamente de los tamaños relativos de las cadenas laterales que flanquean la función carbonilo (Abate *et al.*, 2005).

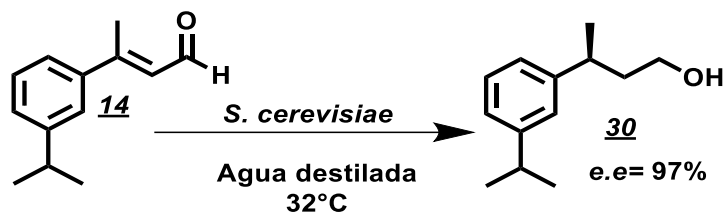


FIGURA 1.15 Biorreducción del aldehído saturado Florhydral® **14** ejercida por *S. cerevisiae* para la obtención del alcohol (R)-Florhydral® **30**

Como se ha visto, las fragancias comerciales en una sola forma enantiomérica (e.e) como por ejemplo el alcohol (R)-Florhydral® **30**, puede obtenerse puro. En este caso, mediante la biorreducción enantioselectiva del aldehído precursor insaturado **14** con *S. cerevisiae*, se favoreció la formación del enantiómero R-(+)-Florhydral® **30** (FIGURA 1.15) con rendimientos de e.e de 97%. En medio acuoso y temperatura de 32°C, la actividad catalítica de las oxido-reductasas presentes redujo con NADH el grupo carbonilo de aldehído al alcohol secundario, y al mismo tiempo redujo el doble enlace adyacente induciendo quiralidad en el centro proquiral mediante la discriminación en el sitio catalítico.

La regio- y quimioselectividad ejercida por las oxidorreductasas de *S. cerevisiae* se observó en el paso para la obtención del precursor **32** de la fragancia de vertacetal® **33**, bajo las mismas condiciones suaves de reacción mencionadas (Abate *et al.*, 2005; Firmenich *et al.*, 1993), reduciendo solamente un grupo carbonilo de los dos presentes en la cadena alifática de benzoil acetona **31** para obtener el intermediario **32** (FIGURA 1.16).

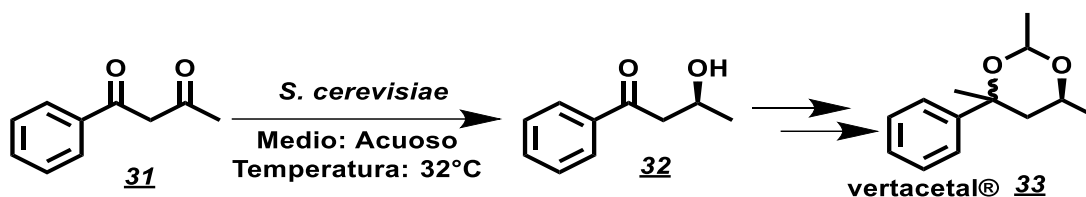


FIGURA 1.16 Regio- y quimioselectividad ejercida por *S. cerevisiae* en la obtención del intermediario **32** de la fragancia de vertacetal® **33**

La publicación de muchos ejemplos de esta estrategia constituyen el conocimiento bien fundamentado para llevar a cabo aplicaciones a escala de producción, aunque si bien, también se identifican desventajas que se están superando (Crocq et al., 1997), se puede señalar metodologías de transformación microbiana en etapas tempranas para la obtención de Fenoxanol (**2**) en una solo isómero de configuración, haciendo que la falta de eficiencia biológica no sea problema en la producción de **2** enantioméricamente puro (Chantasuban et al., 2018). Finalizando en una extracción y purificación apropiada que eventualmente puede conducir a un alto recobro del producto.

1.3.2 Lipasa de *Cal-B* en la acilación/eliminación y oximólisis asimétrica

Algunas lipasas con tamaños de entre 270 y 641 aminoácidos, representa un grupo muy importante de biocatalizadores (Gotor-Fernández 2006), al ser el tercer grupo de enzimas más comercializadas. Un gran número de ellas cuentan con una gran eficiencia como especificidad (Hamaguchi, et al. 1986) para una amplia variedad de aplicaciones industriales. Originaria de la levadura *Candida antarctica*, que produce dos fracciones (A y B), donde la fracción B es la lipasa *Cal-B*, está patentada y caracterizada estructuralmente por Novo Nordisk, para la clonación y sobre expresión en *Aspergillus oryzae*. *Cal-B* tiene un peso molecular de 33 kDa y actividad específica de 435 PLU/mg con una especificidad posicional hacia triacilglicéridos Sn-3 (Palomo-Carmona, 2003).

Desde finales del siglo pasado se han reportado, la obtención de fragancias quirales únicas en pocos pasos de reacción usando biocatalizadores comerciales de bajo costo. Actualmente, se llevan a cabo procesos de acetilación y

transesterificación de alcoholes aromáticos proquirales (utilizado como sustrato nucleofílico), en diferentes agentes acilantes, mediante la acción catalítica, de una de un grupo de lipasas comerciales y no comerciales como *Cal-B* en distintos solventes. Otros procesos relacionados, son usados para la obtención de un amplio grupo de nuevos compuestos orgánicos. En estos tipos de reacciones catalizadas por el grupo de las hidrolasas, se consideran las siguientes enzimas: las proteinasas α -quimiotripsina, tripsina y subtilisina, esterases como la PLE, lipasas como las microbianas PsL, CCL (CRL), PFL, GCL, de *Aspergillus sp*, ANL, RML y CAL, la cual cataliza todas las reacciones anteriores, y como las acilasas, por ejemplo, la de hígado de cerdo (Wong C.H. y Whitesides G.M. 1994).

Generalizando, tenemos el nuevo campo de la enzimología no acuosa, en el que lipasas y otras hidrolasas, actúan como catalizadores y, bajo estas condiciones catalizan procesos no factibles en agua. En la FIGURA 1.17 se indican algunas reacciones donde la lipasa de *Cal-B* es un biocatalizador “robusto” hacia una amplia gama de sustratos nucleofílicos (entre carbohidratos, aminoácidos, lípidos y productos no naturales), ejerciendo quimio- regio- y estereoselectividad tanto en medios acuosos y no acuosos (Mangas-Sánchez et al., 2009) (Dhake et al., 2013) (Carboni-Oerlemans et al., 2006) para la producción de una diversidad de productos quirales únicos de alto valor agregado (Bakke et al., 1998), los cuales resultan difíciles y costosos de obtener por medios tradicionales de síntesis (Montero y Gago, 2007) (da Silva y da Graça Nascimento, 2012) (Kapoor et al., 2012).

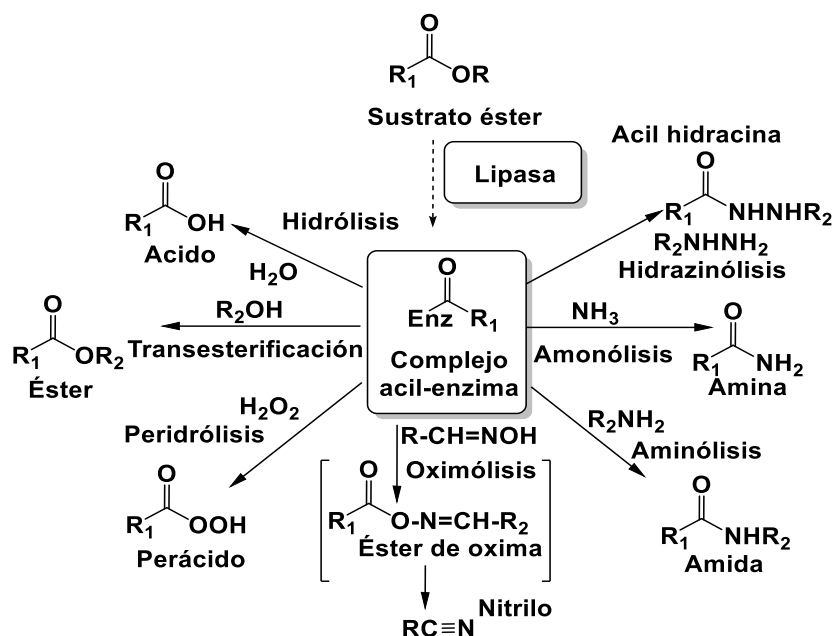


FIGURA 1.17 Rutas bioquímica usadas por lipasas en presencia de una amplia gama de sustratos nucleofílicos para la obtención de una gran variedad de compuestos (Arthur-Santiago *et al.*, 2018)

Una estrategia para la obtención de moléculas fragantes del tipo alcohol y éster, utiliza a las lipasas por su capacidad de resolución cinética asimétrica de alcoholes considerados como aromas, para la producción de alcoholes y sus ésteres correspondientes en forma enantioméricamente pura con valores de conversión favorables desde el 37% hasta cerca del máximo para una resolución que es del 50% teórico y altos rendimientos de enantio pureza (Hamaguchi *et al.*, 1986; Bakke, *et al.*, 1998; Sakaki, *et al.* 2002; Scheck y Waldmann, 2002; Brenna *et al.*, 2017). En la FIGURA 1.18, se muestra la resolución cinética enzimática asimétrica de Doremox® **34**, considerada como una fragancia con un alto potencial comercial.

La obtención de las formas diastereoisoméricas aromáticas derivadas del alcohol intermediario con la inducción de quiralidad debido al centro quiral remoto y que a través de la estereoselectividad de la lipasa, evita el uso de pasos adicionales, incluso de tener que usar transformaciones estereoselectivas más complejas y que permite resolver las mezclas en cada uno de los 4 diastereoisómeros aromáticos del alcohol Doremox (Brenna, *et al.* 2002).

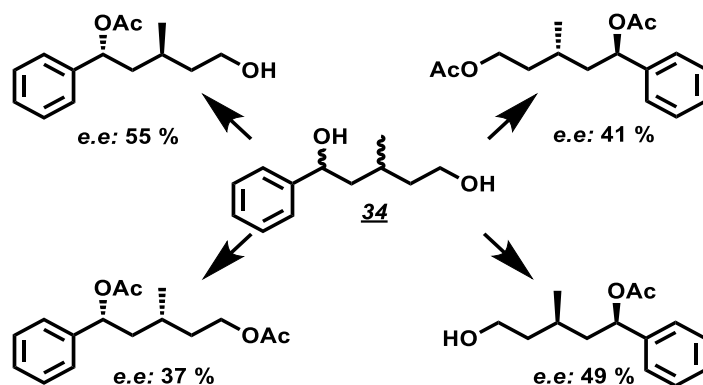


FIGURA 1.18 Resolución cinética asimétrica química-enzimática de Doremox® **34**, mediante el uso de lipasas hidrolíticas (Brenna, *et al.* 2002)

La resolución catalizada por lipasas, mediante reacciones de transesterificación (e hidrólisis), permite la obtención de ésteres y alcoholes en formas enantiopuras para usarlas como fragancias quirales individuales. De esta manera, Irenna *et al.*, 1999 y Abate *et al.*, 2002, obtuvieron los ésteres y alcoholes de las fragancias de Florhydral **15**® y Timberol® **35** (FIGURA 1.19). En el primer caso, de la mezcla racémica de (R,S)-Florhydral **15**®, se obtuvieron el alcohol (R)-Florhydral **15**®, y el éster acetato (S)-**35**, con altos excesos enantioméricos.

En el segundo caso, el (+/-)-Timberol® **36**, sometido a la misma resolución mediante transesterificación enzimática produjo los enantiómeros individuales separados: el estereoisómero de Timberol® ópticamente activo (+)-**36**, y el éster acetato **37**, igualmente con altos excesos enantioméricos. Entre las enzimas probadas las más activas fueron las lipasas de *C. rugosa*, de páncreas porcino, y de *Pseudomonas cepacia*, siendo esta última la que produjo los resultados indicados en la FIGURA 1.19.

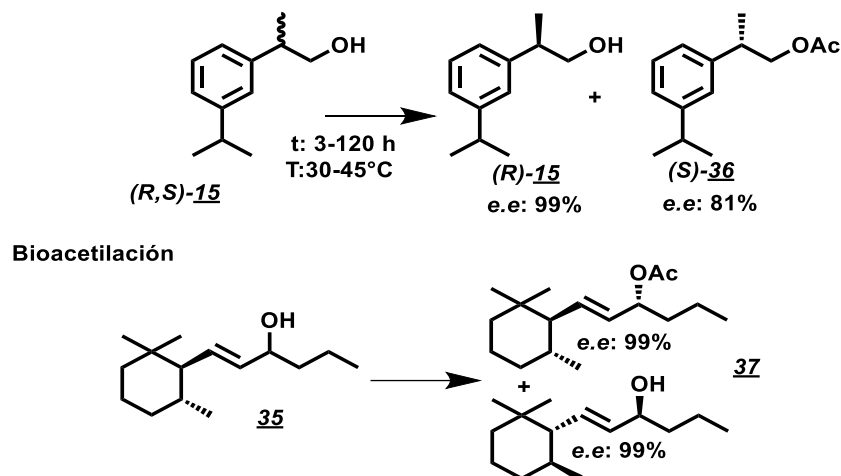


FIGURA 1.19 Resolución cinética asimétrica química-enzimática para la obtención de enantiómeros individuales de fragancias comerciales de (R)-Florhydral **15**[®] y (R)-Timberol[®] **37** (Brenna *et al.*, 1990)

Una característica de las lipasas, como las mencionadas es la activación interfacial. El sitio activo de la mayoría de las lipasas está cubierto por una cadena polipeptídica hidrofóbica similar a una “tapa” que deja el sitio activo inaccesible a las moléculas del sustrato, dando lugar a una forma inactiva. Cuando la lipasa se encuentra cerca de una interfase lipídica sufre un cambio conformacional que provoca que la “tapa” se mueva o se abra” dejando el sitio activo de la enzima disponible, de tal forma que la parte hidrofóbica de la tapa queda expuesta favoreciendo las interacciones hidrofóbicas entre la enzima y el lípido (Jaeger *et al.*, 1994).

Existen algunas excepciones, como las lipasas de *P. aeruginosa*, *P. glumae*, y *Cal-B* que no presentan activación interfacial, aunque poseen “tapa” (Bornscheuer *et al.*, 2002). Se ha reportado también que la lipasa de *Bacillus subtilis* y la de *P. aeruginosa* no muestran activación en presencia de sustratos emulsionados, y han probado ser funcionales tanto con emulsiones como con sustratos monoméricos (Jaeger *et al.*, 1994). La mayoría de las lipasas son proteínas altamente solubles y son mayormente hidrofílicas con un área hidrofóbica rodeando el sitio activo, que le permite la interacción preferencial con superficies altamente hidrofóbicas (Fernández-Lafuente *et al.*, 1998)

1.3.2.1 Mecanismo catalítico de las lipasas

El mecanismo catalítico que se ha aceptado para las lipasas es el siguiente: el primer paso es el ataque del átomo de oxígeno de grupo hidroxilo del residuo de serina (activado por la histidina) al carbono carbonílico del sustrato éster, que considerando la reacción de transesterificación catalizada por lipasa para la síntesis de un éster de oxima de un aldehído aromático, conduciría a un complejo de Michaelis enzima-oxima (sustrato).

En el segundo paso se da la formación de un intermediario tetraédrico, en el que el grupo -OH de la serina (activado por los otros dos aminoácidos de la tríada catalítica: histidina y aspartato), realiza un ataque nucleofílico sobre el doble enlace del C=O del éster acetilante, acetato de vinilo, lo que crea una carga negativa en el oxígeno del carbonilo del éster mencionado FIGURA 1.20.

Este intermediario tetraédrico, se encuentra estabilizado (su carga negativa) por las interacciones con los grupos amido vecinos. Este intermediario, conduce a la regeneración del doble enlace C=O, con desplazamiento de la porción del alcohol del agente acilante, asistido por la histidina protonada que dona un protón al grupo saliente, lo cual es facilitado por el residuo ácido del sitio activo que orienta el anillo imidazol de la histidina y neutraliza parcialmente la carga de éste.

En este tercer paso se obtiene el complejo acil-enzima. Este complejo es atacado en un cuarto paso, por el grupo -OH nucleofílico de la oxima formando un segundo intermediario tetraédrico que desprende ahora un protón a la serina de la tríada catalítica con la liberación del producto, el éster acetato de oxima y la amina libre.

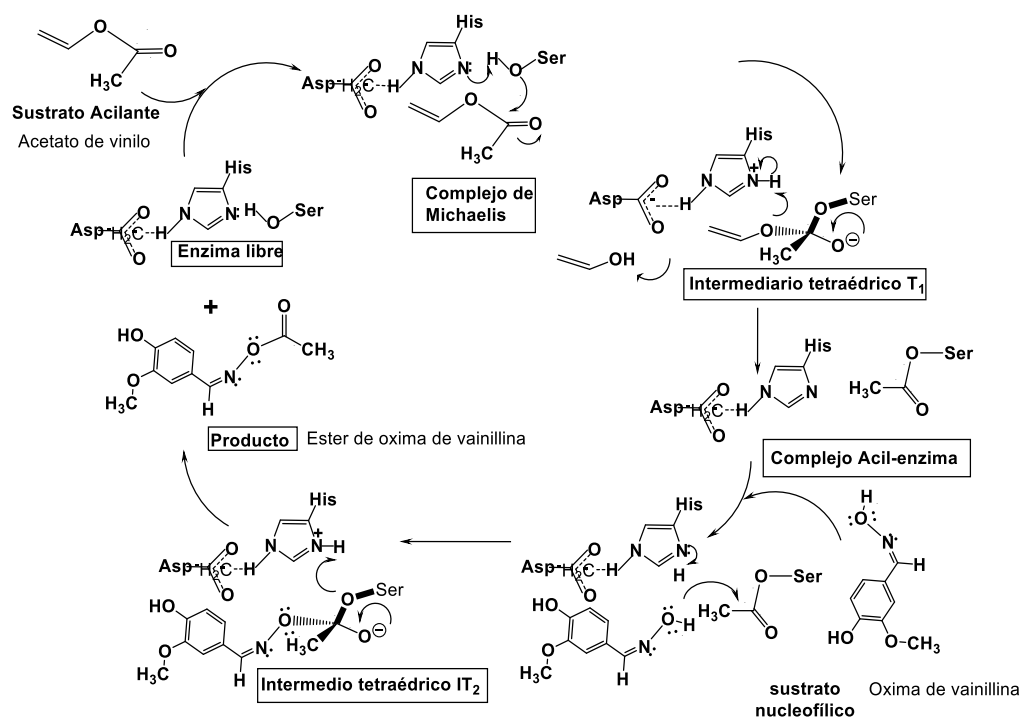


FIGURA 1. 20 Mecanismo de la reacción de oxima de vainillina como sustrato nucleofílico y acetato de vinilo como agente acetilante catalizada por *Cal-B* (Arthur-Santiago *et al.*, 2018)

Este mecanismo de reacción, corresponden a la ruta biocatalítica de oximólisis (FIGURA 1.17), realizada por Arthur-Santiago (2018) y Santiago-Aquino (2019), en trabajos previos mostrando la capacidad biocatalítica de la lipasa *Cal-B* para la oximólisis y obtención de ésteres de oximas (consideradas fragancias, compuestos antimicóticos y antimicrobianos) a partir de sus oximas, mediante la bioacetilación con acetatos de vinilo e isopropenilo en un rango de 40 a 60°C (Arthur-Santiago, 2018; FIGURAS 1.21 y 1.22) y a 80°C (FIGURA 1.23; Aquino-Santiago) (FIGURA 3.2).

Los resultados mejoraron cuando la reacción uso mallas moleculares que remueven el agua formada. La obtención reportó una conversión entre 97-99%, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante la integración y cuantificación de señales apropiadas con la técnica espectrometría de RMN de ^1H , mostrando que *Cal-B* fue mejor biocatalizador en comparación con otras lipasas como *C. rugosa* y *C. antarctica* fracción A.

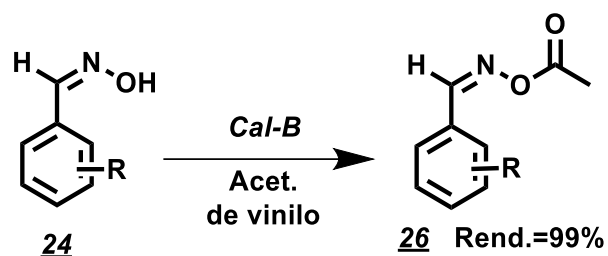


FIGURA 1.21 Obtención de ésteres de oxima aromáticos **24** ejercida por *Cal-B* con rendimientos del 99% a partir de la oxima **26** (Santiago-Aquino *et al.*, 2019)

La clave para la obtención de ésteres de oxima de acuerdo a los resultados obtenidos por Arthur-Santiago (2018) para llevar a cabo la reacción de acilación. Las condiciones clave fueron para la mayor producción del éster de oxima **24** a partir de la oxima **26**, fueron 72 horas a una temperatura de 40°C (FIGURAS 1.21 y 1.22). Cuando la misma reacción, manteniendo las mismas condiciones, excepto la temperatura, la cual se aumentó de 40 a 80°C, se produjo la reacción de eliminación, es decir la deshidratación, para producir nitrilos a partir de sus oximas precursoras, pasando a través del éster de oxima formado mediante la acetilación promovida por la lipasa de *Cal-B*, teniendo como intermediario al éster de la misma. Las reacciones de acilación/eliminación de las oximas fueron probadas con acetato de vinilo como sustrato acetilante y acetato de etilo como disolvente, con una alta conversión, de acuerdo a análisis mediante CCF y CG-EM.

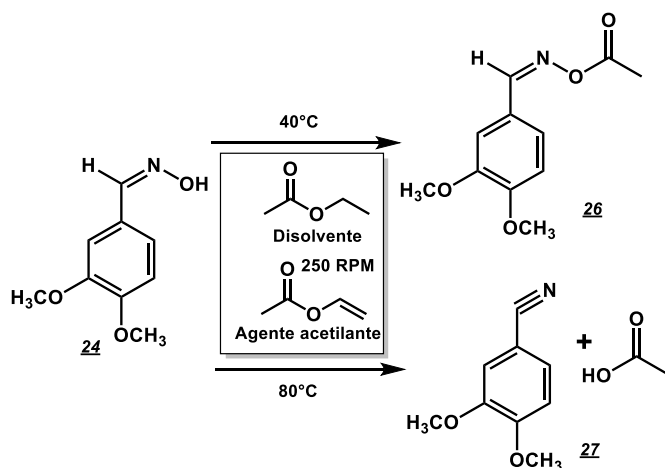


FIGURA 1.22 Obtención de nitrilos aromáticos a partir de oximas, promovida por la acetilación-eliminación promovida por *Cal-B* (Arthur-Santiago *et al.*, 2018)

En la FIGURA 1.22 se muestra la biotransformación de la oxima de vainillina **24** catalizada por *Cal-B* en la obtención del nitrilo de vainillina **27** teniendo como intermediario al éster de la oxima de vainillina **26**. De los resultados anteriores, se concluyó que la lipasa de *Cal-B* catalizó la acilación/eliminación de las oximas de los aldehídos aromáticos a 80°C, promoviendo la obtención de los nitrilos en altos rendimientos. En la FIGURA 1.23 se muestra el cromatograma-espectro de masas de la reacción de acetilación-eliminación promovida por *Cal-B*, que muestra la mínima (30°C) y máxima conversión a 80°C en 72 h. El cromatograma muestra al pico 3, el de la oxima a 72 h. a cada temperatura: disminuyendo de 30 a 80°C. A esta temperatura desaparece completamente. Por otro lado, el pico 2 corresponde al del nitrilo, que contrariamente al de la oxima va en aumento (conforme disminuye la concentración de esta) y es máxima a 80°C. Los espectros de masas de la parte derecha para cada temperatura son los obtenidos de la base de datos, la biblioteca NIST, por comparación con el espectro de masas durante el análisis, lo cual corrobora la identidad del sustrato y del producto final.

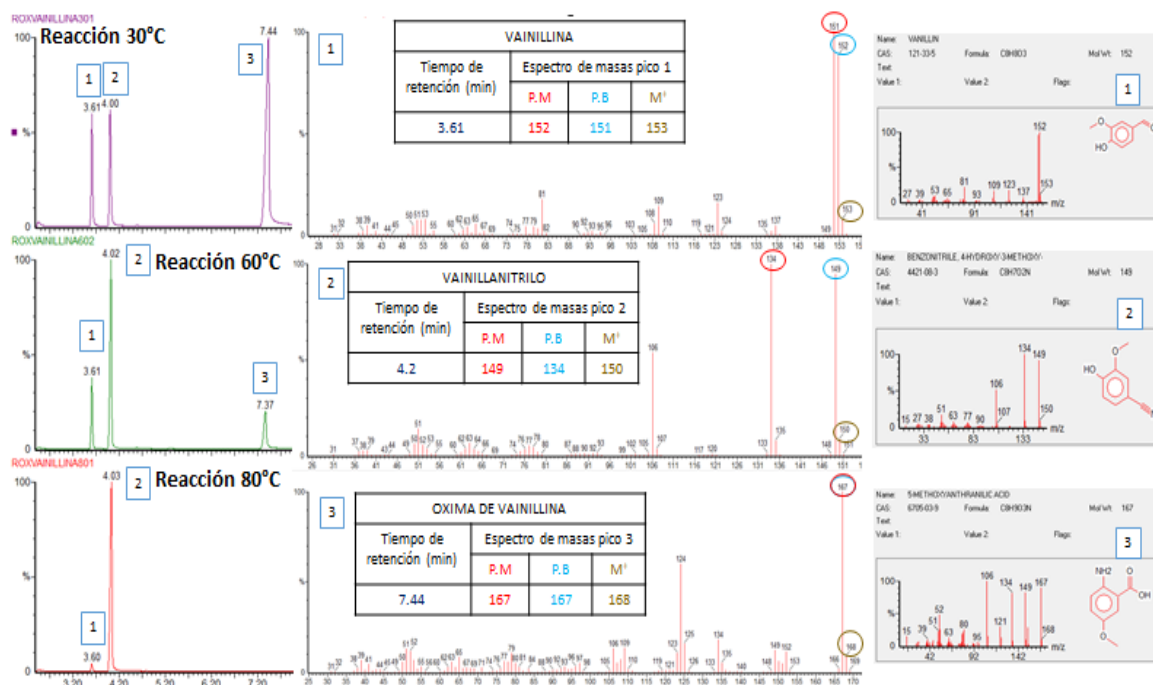


FIGURA 1.23 Cromatograma-espectro de masas de la reacción de acetilación-eliminación promovida por *Cal-B*, que muestra la mínima (30°C) y máxima conversión a 80°C en 72 h (Santiago-Aquino *et al.*, 2019)

De esta manera, la utilización de ésteres de oxima aromáticos como nuevas fragancias quirales abre nuevas posibles moléculas como el éster de la oxima de Mefranal[®] (**4**) (Figura 1.2) del cual, aún no se encuentran reportes de síntesis a partir de **2**, con posibilidades de tener un perfil organoléptico. Así mismo se puede describir pasos en la obtención de Citralis Nitrilo[®] (**6**) a partir de la oxima precursora. Por lo anterior, el presente proyecto, tuvo como objetivo la utilización de metodologías de la química verde para la obtención de derivados de Mefranal[®], **1**: Fenoxanol[®]**2**, el éster de Fenoxanol[®]**3**, la oxima de mefranal[®]**4**, el éster de la oxima de mefranal[®]**5**, y Citralis nitrilo[®]**6**.

II. OBJETIVOS

2.3 Objetivo general

Evaluar la biotransformación mediante la utilización de *S. cerevisiae* y la resolución biocatalítica con la lipasa de *Candida antarctica* para Citralis® (Mefranal) y sus derivados.

2.4 Objetivos específicos

1. Evaluación de la biorreducción del aldehído de Mefranal con *S. cerevisiae* para la obtención enantiomérica de (R) o (S)-Fenoxanol.
2. Obtención del éster de oxima de Mefranal y Nitrilo de Mefranal, enantioméricamente puros por la acetilación/eliminación de la oxima de Mefranal catalizada por lipasa *Cal-B*.
3. Obtención del éster de (R/S)-Fenoxanol mediante la resolución catalizada por la lipasa de *Cal-B* para (R/S)-Fenoxanol y evaluar el exceso enantiomérico.
4. Elucidar la estructura pura de los productos obtenidos en cada etapa del proceso mediante: FT-IR, RMN DE ^1H y ^{13}C , GC-MS y Polarimetría.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo para la obtención de fragancias enantioméricamente individuales no antes descritos derivados de Mefranal, empleando *S. cerevisiae* y *Cal-B*, sigue rutas biocatalíticas para alcanzar los objetivos específicos. Como se puede observar en la metodología seguida en los próximos apartados (3.1-3.6) de la FIGURA 3.1. Los catalizadores biológicos usados fueron: la levadura de *S. cerevisiae* levadura panificadora “*Tradi-Pan*” (Baker yeast) y la lipasa de *Candida antarctica* fracción B (EC 3.1.1.3) de Novozyme 435, inmovilizada en resina macroporosa, diámetro 0.3-0.9 mm, 7000 PIU/g.

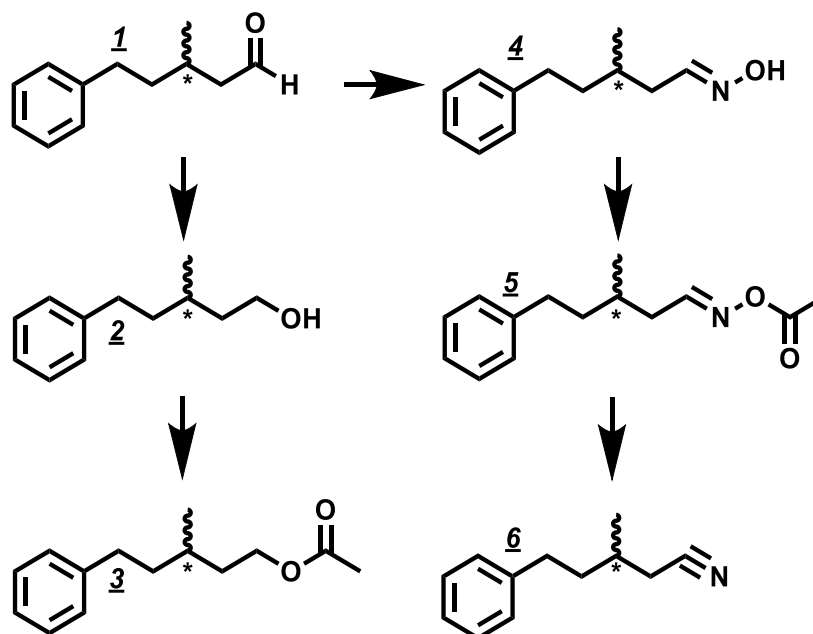


FIGURA 3.1 Diagrama general de la metodología seguida en el presente trabajo para la obtención de las fragancias quirales: Fenoxanol[®] 2, el éster de Fenoxanol[®] 3, la oxima de mefranal[®] 4, el éster de la oxima de mefranal[®] 5, y Citralis nitrilo[®] 6, a partir de Mefranal[®] 1

Los reactivos y disolventes de uso común fueron de grado analítico (99% de pureza) de las compañías Sigma-Aldrich, Baker, Merck y Givaudan purificados

mediante doble destilación y/o cromatografía en columna para mantenerlos anhidros, utilizando mallas moleculares y sulfatos (magnesio o sodio) previamente tratados a 100 °C y almacenados en desecadores para su posterior uso. El material de laboratorio que se ocupó en el presente trabajo se describe con características específicas como: -Incubadoras: Estufa de cultivo E-51 con calentamiento convección. Incubadora: Thermoscientific MaxQ 4450. -Rota evaporador: BUCHI Waterbath B-480 con bomba de alto vacío: Rotavapor Labconco. -Revelador de lampara UV: Cámara de rayos UV Cole-Parmer 9818 series Darkrooms 254 nm y 365 nm.

3.1 Biorreducción asimétrica selectiva con *S. cerevisiae*

Los experimentos de las biorreducciones de Mefranal racémico para la obtención de Fenoxanol se llevaron a cabo en tres diferentes medios de reacción. Los cuales consistieron en medio: acuoso, con solvente y en estado sólido.

3.1.1 Biorreducción en medio acuoso

La activación inicial de la levadura de panificación (33 g) con glucosa (26 g) en agua destilada (150 mL) como medio de reacción, se llevó a incubación durante 30 minutos, 35°C y 200 rpm, en un matraz de 500 mL con tapón de algodón. Posteriormente, se realizó la adición a la mezcla anterior, de 0.182 mL (1 mMol) de Mefranal® diluido en 2 mL de etanol, después se agitó durante 48 horas a 250 rpm y 35°C. Posteriormente, la mezcla de la biotransformación se filtró con vacío, se lavó y extrajo con un disolvente orgánico (100 mL de hexano, acetato de etilo, cloroformo y diclorometano, mediante extracción líquida-líquida de 3x100 mL). Las fases orgánicas separadas y reunidas en un matraz erlen meyer de 500 mL de la etapa anterior, se secó con sulfato de magnesio o de sodio (5 g) durante 5 minutos. Después de la etapa de secado, se filtró para separar la sal secante y el disolvente se removió en un evaporador rotatorio, hasta un peso constante del producto sólido final.

3.1.2 Biorreducción en solvente orgánico

En un matraz de 500 mL se colocó la levadura de panificación (33 g) y una solución de Mefranal[®] (0.182 mL) en etanol (2 mL). Posteriormente se adicionó 300 mL de solvente orgánico (hexano, tolueno o acetato de etilo) como medio de reacción y se incubó durante 48 horas a 200 rpm y 35°C. Al cabo de ese tiempo, la mezcla se filtró por gravedad y se lavó con 100 mL del mismo solvente que se ocupó como medio de reacción. Posteriormente, la solución resultante se secó con 5 g de sulfato de magnesio o de sodio durante 5 minutos, para posteriormente, después de realizar la filtración de la sal sólida secante, concentrar el filtrado en un evaporador rotatorio hasta un peso constante del producto final.

3.1.3 Biorreducción en medio sólido

En un matraz de 500 mL con tapón de algodón se colocó la levadura de panificación (33 g) y se roció con una solución de Mefranal (1 mMol) en etanol (2 mL), posteriormente se incubó a 37°C durante 72 horas y 200 rpm. Transcurrido ese tiempo, se adicionaron 300 mL de disolvente (hexano, acetato de etilo o cloroformo) y se agitó a 200 rpm durante 40 minutos a temperatura ambiente.

La mezcla final se filtró a gravedad y se lavó con 100 mL del disolvente utilizado para la extracción (hexano, acetato de etilo, cloroformo), posteriormente el filtrado se secó con 5 g de sulfato de sodio o magnesio durante 5 minutos y finalmente se removió el disolvente en un evaporador rotatorio hasta un peso constante del producto final.

3.2 Reducción química con borohidruro de sodio (NaBH₄)

La reducción química de Mefranal[®] para la obtención de Fenoxanol[®] racémico, se llevó a cabo para la obtención y comparación con las biorreducciones usando *S. Cerevisiae* y *Cal-B*.

En un matraz bola de 250 mL, se colocó cloruro de metileno (67 mL) y metanol (33 mL) a temperatura ambiente con agitación magnética. Posteriormente, se añadió

gradualmente borhidruro de sodio sólido (1.14 g) (30 mMol) y seguidamente se adicionó gota a gota 5.2 mL (30 mMol) de Mefranal[®]. Al término de la adición, se adaptó al matraz de reacción un refrigerante-condensador y se dejó agitando durante 2 horas. Al término de este tiempo, se adicionó HCl (37% pureza) hasta pH 7 y después agua saturada con sal (100 mL). La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (2x100 mL). Las fases orgánicas se reunieron en un matraz erlen meyer de 500 mL y se secó con 5 g de sulfato de magnesio y se dejó en reposo durante 5 minutos. La solución orgánica se separó de la sal sólida mediante filtración por gravedad y finalmente se removió el disolvente en un evaporador rotatorio hasta un peso constante del producto final.

3.3 Bioacetilación asimétrica enantioselectiva mediante acilación con *Cal-B*

La síntesis enzimática asimétrica enantioselectiva para la obtención del éster de Fenoxanol, se realizó en viales de 5 mL, donde se colocó mallas moleculares (300 mg) y la lipasa de *Cal-B* (50 mg) y se cerró herméticamente con una tapa roscada, y con septa de PTFE/silico y un sello con Parafilm[®]. Utilizando una punta de jeringa hipodérmica de acero conectada a través de un émbolo cortado por la mitad a su vez conectado a un tubo de latex de aproximadamente 10 cm, se sometió a vacío durante 5 minutos para retirar la posible humedad y el aire presente en el sistema. Posteriormente, se adaptó un globo con gas Nitrógeno de alta pureza, seguidamente se adicionó acetato de etilo (2mL como medio de reacción) y acetato de vinilo (184 μ L) como agente acilante, utilizando una microjeringa de μ L 500 y 100 μ L, finalizando con la adición 1 mMol del alcohol Fenoxanol[®] racémico. Similarmente a la biosíntesis anterior, se realizó una réplica enzimática (duplicado) y así mismo una reacción testigo (bajo las mismas condiciones a la biosíntesis y su réplica, excepto sin la enzima) con las mismas concentraciones de los reactivos, para comparar la conversión de la reacción con el biocatalizador. La mezcla anterior se calentó en una incubadora a 40°C y 170 rpm durante 12 horas. Al cabo de ese tiempo, se procedió a la filtración de la mezcla de reacción por gravedad. El sólido resultante se lavó con 50 mL de

disolvente (acetato de etilo o cloroformo); este filtrado, se reunió con el primer filtrado y se concentró en un evaporador rotatorio hasta un peso constante.

3.4 Síntesis química de la oxima de Mefranal[®] racémica con clorhidrato de hidroxilamina (NH₂OH.HCl)

La obtención de la oxima de Mefranal racémica se llevó a cabo en un matraz bola de 250 mL, donde se colocó metanol (100 mL) y agua destilada (10 mL) y con agitación magnética. Posteriormente se adicionó clorhidrato de hidroxilamina (0.04 Mol) y carbonato de potasio anhidro (0.058 Mol). A la mezcla anterior se adicionó gota a gota, 0.04 Mol Mefranal[®], seguidamente se colocó un refrigerante-condensador a la boca del matraz bola y finalmente se calentó a reflujo (a 65°C) durante 3 horas. La mezcla de reacción se dejó enfriar y posteriormente se neutralizó a pH 7 con HCl concentrado (37% pureza). Al término de la neutralización, se adicionó agua saturada con sal (100 mL). Se separó la fase orgánica de la acuosa y ésta se sometió a una extracción líquida-líquida con cloruro de metileno (2x100 mL). Se colectaron las fases orgánicas y se secaron con sulfato de magnesio (5 g); se dejó en reposo durante 5 minutos y posteriormente se removió el disolvente en un evaporador rotatorio hasta un peso constante del producto final.

3.5 Acetilación asimétrica de la oxima de Mefranal[®] catalizada por la lipasa *Cal-B*

La obtención enzimática del éster de oxima de Mefranal, se realizó de manera similar a la del éster de Fenoxanol, sección 3.3. en viales de 5 mL, se colocó 300 mg de mallas moleculares y 100 mg de la lipasa de *Cal-B*. La mezcla se sometió a vacío, se colocó un globo con nitrógeno, se adicionó acetato de etilo (2 mL) y acetato de vinilo (184 µL) y finalmente la oxima de Mefranal racémico (1 mMol). Se realizó una réplica enzimática y una reacción testigo. La incubación se realizó a 40°C y 170 rpm durante 72 horas. Al término de la reacción se procedió a la

filtración de la mezcla de reacción por gravedad, se lavó con 50 mL de disolvente (acetato de etilo o cloroformo), y se concentró en un evaporador rotatorio hasta un peso constante.

3.6 Acetilación/eliminación asimétrica promovida por la lipasa *Cal-B* para la obtención de Citralis Nitrilo® a partir de Mefranal®

La obtención enzimática del Citralis nitrilo, se realizó de manera similar a la del éster de oxima de Mefranal, sección 3.5. en viales de 5 mL, se colocó 300 mg de mallas moleculares y 100 mg de la lipasa de *Cal-B*. La mezcla se sometió a vacío, se colocó un globo con nitrógeno, se adicionó acetato de etilo (2 mL) y acetato de vinilo (184 µL) y finalmente la oxima de Mefranal racémico (1 mMol). Se realizó una réplica enzimática y una reacción testigo. La incubación se realizó a 80°C y 170 rpm durante 24 horas. Al término de la reacción se procedió a la filtración de la mezcla de reacción por gravedad, se lavó con 50 mL de disolvente (acetato de etilo o cloroformo), y se concentró en un evaporador rotatorio hasta un peso constante.

3.7 Técnicas instrumentales de análisis espectroscópicas

La determinación y elucidación estructural de los productos de interés, se llevó a cabo en equipos espectrométricos y espectrofotométricos. Los instrumentos utilizados fueron.

3.7.1 Infrarrojo (FT-IR)

Los espectros de Infrarrojo se obtuvieron e identificaron en el equipo de Infrarrojo de la marca Thermo Scientific Nicolet iS50 FT-IR, con transformada de Fourier. Usando adaptadores de 10 µL para muestras líquidas.

3.7.2 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)

Los cromatogramas y espectros de masas de los intermediarios y productos finales se obtuvieron en el 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, utilizando Helio de ultra alta como gas acarreador, mediante la técnica de impacto electrónico (70 eV) con un analizador de tipo cuadrupolar e inyecciones de 1 μ L, a partir de viales a una concentración de 20 a 50 mg (μ L) por 2 mL de disolvente (acetona, cloroformo o diclorometano de triple destilación).

La columna de cromatografía de gases fue una capilar no polar, a base de polietilenglicol de peso molecular 20, 000, HP-INNOWAX, de 30 metros de largo y 250 μ m de diámetro interno. Las condiciones para las inyecciones fueron: Temperatura del detector e inyector: 220°C. Temperatura de columna: 180°C (20 min). Se utilizó la biblioteca NIST contenida en la computadora del sistema de CG-EM, para confirmar la estructura de los productos y su patrón de fragmentación, así como para la confirmación de su peso molecular.

3.7.3 Polarimetría

La actividad óptica de los productos finales fue medida y observada mediante el polarímetro de la compañía Perkin Elmer Instruments, modelo 343 que usa una lámpara de sodio-halógeno, a una longitud de onda de 546 nm, usando una celda y microcelda de 1 dm de largo a 25°C, a concentraciones 1:2 (g. de producto/ mL de diclorometano).

3.7.4 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C

Los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C se efectuaron en un equipo Varian Mercury de 300 MHz, utilizando soluciones en una concentración de aproximadamente 20 mg en 1 mL de CDCl_3 , usado como referencia interna tetra-metil-silano (TMS). Los valores de desplazamiento químico se leyeron en ppm y las abreviaturas para la

descripción de los espectros son las siguientes: s= singulete, d= doblete, t= triplete y m= multiplete.

3.7.5 Cromatografía en columna y capa fina (TLC)

El seguimiento de las reacciones química-enzimáticas para intermediarios y productos, se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (TLC), colocando cantidades de aproximadamente 0.5 μ L de muestra a una placa de silica gel 60 soportada en aluminio (Merck, 25 mm x 65 mm) con dimensiones de 6.5x2.5 cm, eluyendo en una fase móvil de hexano-acetato de etilo (80/20), revelado en luz U.V a 254 nm. Mientras que para la purificación de los productos finales por cromatografía en columna se utilizó silica gel en proporciones 5:1; donde por cada 5 gramos de silica gel se utiliza 1 gramo del producto a purificar.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis estructural de Mefranal® y derivados

Inicialmente, se caracterizó el Mefranal® para su correcta identificación, análisis de pureza óptica, mediante los espectros de infrarrojo, espectrometría de masas y de resonancia magnética nuclear de ^1H y de ^{13}C , para su comparación y la correcta caracterización estructural de los productos obtenidos.

Los espectros obtenidos se encuentran en la sección VI. APENDICES, para cada técnica y producto final.

4.1.1 Análisis espectroscópicos de Mefranal®

CG-EM: El apartado VI. APENDICES (A) se observa el espectro de masas (I) (Mefranal®) con las señales de fragmentación en $[\text{M}]^{+1}$ 176 (18), señal de ión molecular correspondiente al peso molecular de Mefranal, 158 (11), 143 (29), 131 (22), 117 (41), 105 (21), 92 (32) señal de fragmentación correspondiente a la transposición de McLafferty en alquilbencenos, 91 (100) señal de pico base correspondiente a la fragmentación de alquilbencenos favoreciendo el ión tropilio y 71 (32). Así mismo se obtuvo en CG, el tiempo de retención a 3.3 minutos. Como resultado de la fragmentación del Mefranal, comparado con los resultados reportados por Superchi *et al.*, (2011) y Matteoli *et al.*, (2007) se corrobora la estructura del compuesto.

FT-IR: El apartado VI. APENDICES (B) se observa el Espectro de Infrarrojo (I) (Mefranal®) con las bandas características de absorción que se obtuvieron en el análisis (cm^{-1} v) Estiramientos: 1720 (**C=O** enlace carbonilo de aldehído), 3085, 3061, 3026 (**C-H** enlace del anillo aromático monosustituido con 3 vibraciones consecutivas en creciente), 1603 (**C-C** estiramiento del anillo aromático simétrico), 1496 (**C-C** estiramiento del anillo aromático asimétrico horizontal) , 1454 (**C-C** estiramiento del anillo aromático asimétrico vertical). Flexiones: 1717 (**C-H** flexión y estiramiento del H unidos al grupo funcional aldehído), 1407 (**C-H** flexión del CH_2

unidos al grupo funcional aldehído), 746 (**C-H** flexión de sombrilla del anillo aromático simétrico), 697 (**C-H** flexión de sombrilla del anillo aromático asimétrico) 1800-2500 (huellas dactilares pertenecientes a los anillos aromáticos).

TABLA 1 Resultados de CG-EM, RMN ^1H y ^{13}C de Mefranal obtenidos en el presente trabajo y su comparación con resultados en literatura

CG-EM	m/z
Mateolli <i>et al.</i> 2007	$[\text{M}]^{+1}$ 176 158, 143, 131, 117, 105, 91
Superchi <i>et al.</i> 2011	$[\text{M}]^{+1}$ 176 (31), 158 (13), 143 (31), 131 (22), 117 (42), 105 (20), 92 (36), 91 (100), 71 (24)
Presente trabajo	$[\text{M}]^{+1}$ 176 (18), 158 (11), 143 (29), 131 (22), 117 (41), 105 (21), 92 (32), 91 (100), 71 (32)
RMN DE ^1H	δ ppm
Mateolli <i>et al.</i> 2007	1.04 (d, 3H, CH ₃); 1.63 (m, 2H, CH ₂); 2.06–2.17 (m, 1H, CH), 2.24–2.33 (m, 1H, CH ₂); 2.41–2.49 (m, 1H, CH ₂); 2.55–2.73 (m, 2H, CH ₂); 7.16–7.31 (m, 5H, arom.); 9.75 (t, 1H, CHO)
Superchi <i>et al.</i> 2011	1.03 (3H, CH ₃); 1.64–1.70 (m, 2H, CH ₂); 2.09–2.13 (m, 1H, CH); 2.28 (m, 1H); 2.44 (dd, 1H); 2.57–2.71 (m, 2H); 7.17–7.20 (m, 2H); 7.26–7.29 (m, 3H); 9.75 (s, 1H)
Presente trabajo	1.01 (d, 3H, CH ₃); 1.44-1.59 (m, 2H, CH ₂); 1.61-1.74 (m, 2H, CH ₂); 1.93-2.29 (mm, 1H, CH); 2.2-2.72 (mm 2H, CH ₂); 7.11–7.9 (m, 5H, arom); 9.7 (s, 1H, CHO)
RMN DE ^{13}C	δ ppm
Mateolli <i>et al.</i> 2007	19.8, 27.8, 33.2, 38.6, 50.9, 125.8, 128.3, 128.4, 142.0, 202.7
Superchi <i>et al.</i> 2011	19.7, 27.8, 33.1, 38.5, 50.9, 125.8, 128.2, 128.4, 142.0, 202.6
Presente trabajo	19.6, 27.5, 33.0, 38.4, 50.6, 125.5, 128.0, 128.1, 142.0, 202.6

RMN DE ^1H : El análisis del protón en RMN (CDCl_3) del apartado VI. APENDICES (C), los valores de desplazamiento químico se observan en el Espectro de Resonancia (^1H) (Mefranal[®]) con (δ ppm): 1.01 (d, 3H, CH₃) correspondiente al metil unido al carbono quiral; 1.44-1.59 (m, 2H, CH₂); 1.61-1.74 (m, 2H, CH₂); 1.93-2.29 (mm, 1H, CH) correspondiente al H unido al carbono quiral; 2.2-2.72 (mm 2H, CH₂); 7.11–7.9 (m, 5H, arom) y 9.7 (s, 1H, CHO) de aldehído.

RMN DE ^{13}C : El análisis del ^{13}C en RMN (CDCl_3) del apartado VI. APENDICES (C), los valores de desplazamiento químico se observan en el Espectro de Resonancia (I ^{13}C) (Mefranal[®]) con (δ ppm): 19.6, 27.5, 33.0, 38.4, 50.6, 125.5, 128.0, 128.1, 142.0 y 202.6 correspondiente al carbono de grupo funcional carbonilo de aldehído.

Polarimetría: La presencia de una mezcla de enantiómeros de Mefranal[®] fue resultado de la lectura de rotación óptica en $0.00^\circ \pm 0.02^\circ$ a las condiciones mencionadas el apartado III. Materiales y Métodos, en la sección 3.7.3.

4.2 Obtención del alcohol Fenoxanol[®] usando *S. cerevisiae*

Las biorreducciones asimétricas enantioselectivas con *S. cerevisiae* descritas en el apartado 3.1 de la sección III. Materiales y métodos, aplicadas a este trabajo con Mefranal[®] racémico en diferentes medios de reacción y la comparación con la reducción química simétrica con NaBH_4 para la obtención del alcohol Fenoxanol[®] quiral; se encontró que la levadura *S. cerevisiae* mostró la formación de Fenoxanol[®].

4.2.1 Análisis estructural del Alcohol de Fenoxanol[®]

CG-EM: Como resultado de la elucidación estructural de Fenoxanol[®], se comparó con la elucidación de Superchi *et al.* (2011) y Matteoli *et al.* (2007). Corroborando con los autores mencionados; se obtuvo similar fragmentación. Se observa el Espectro de Masas (II) (Fenoxanol[®]) con las señales de fragmentación en $[\text{M}]^{+1}$ 178 (4) señal de ión molecular correspondiente al peso molecular, 160 (48), 145 (7), 131 (29), 117 (29), 104 (92), 92 (67), señal de fragmentación correspondiente a la transposición de McLafferty en alquilbencenos y 91 (100) señal de pico base correspondiente a la fragmentación de alquilbencenos favoreciendo el ión tropilio.

Los principales cambios de fragmentaciones se observaron con la comparación con Mefranal[®] a $[\text{M}]^{+1}$ 176 (18) correspondiente a la señal de ión molecular del peso molecular de Mefranal, mientras que se conservan las señales de

fragmentación en $[M]^{+1}$ 92 (32) correspondiente a la transposición de McLafferty en alquilbencenos, 91 (100) señal de pico base correspondiente a la fragmentación de alquilbencenos favoreciendo el ión tropilio y 71 (32). Así mismo se obtuvo en CG, el tiempo de retención a 12.5 minutos.

FT-IR: El apartado VI. APENDICES (B) se observa el Espectro de Infrarrojo (II) (Fenoxanol[®]) con las bandas características de absorción que se obtuvieron en: (cm^{-1} ν) Estiramientos: 3341 (**O-H** enlace hidroxilo del alcohol), 3026 (**C-H** enlace del anillo aromático monosustituido con 3 vibraciones consecutivas en decreciente hacia la izquierda), 1602 (**C-C** estiramiento del anillo aromático simétrico), 1495 (**C-C** estiramiento del anillo aromático asimétrico horizontal), 1453 (**C-C** estiramiento del anillo aromático asimétrico vertical). Flexiones: 1409 (**C-H** flexión del CH_2 unidos al grupo funcional alcohol), 743 (**C-H** flexión de sombrilla del anillo aromático simétrico), 696 (**C-H** flexión de sombrilla del anillo aromático asimétrico) 1800-2500 (huellas dactilares pertenecientes a los anillos aromáticos).

La comparación con Mefranal[®] para observar las principales pérdidas de absorción a 1720 (**C=O** enlace carbonilo de aldehído) y 1717 (**C-H** flexión y estiramiento del H unidos al grupo funcional aldehído), corroborando la reducción del principal grupo funcional aldehído.

TABLA 2 Resultados de CG-EM, RMN ^1H y ^{13}C de Fenoxanol[®] obtenidos en el presente trabajo y su comparación con resultados en literatura

CG-EM	m/z
Mateolli <i>et al.</i> 2007	$[M]^{+1}$ 178, 160, 145, 131, 117, 104, 92, 91
Superchi <i>et al.</i> 2011	$[M]^{+1}$ 178 (3), 160 (49), 145 (8), 131 (33), 117 (30), 104 (85), 92 (53), 91 (100)
Presente trabajo	$[M]^{+1}$ 178 (4), 160 (48), 145 (7), 131 (29), 117 (29), 104 (92), 92 (67), 91 (100)
RMN DE ^1H	δ ppm
Mateolli <i>et al.</i> 2007	0.99 (s, 3H, CH_3), 1.45–1.52 (m, 2H), 1.64–1.71 (m, 3H), 2.60–2.76 (m, 2H), 3.43 (m, H OH), 3.68–3.76 (m, 2H), 7.18–

	7.21 (m, 3H), 7.28–7.31 (m, 2H)
Superchi <i>et al.</i> 2011	0.99 (s, 3H, CH ₃), 1.45–1.52 (m, 2H), 1.64–1.71 (m, 3H), 2.60–2.76 (m, 2H), 3.43 (m, H OH), 3.68–3.76 (m, 2H), 7.18–7.21 (m, 3H), 7.28–7.31 (m, 2H)
Presente trabajo	0.94 (s, 3H, CH ₃); 1.3-1.5 (m, 2H CH ₂ , H CH); 1.53-1.7 (m, 2H CH ₂); 2.3 (s, 2H CH ₂); 2.5-2.7 (m, 2H CH ₂); 3.5-3.7 (m, H OH); 7.1-7.2 (d, arom)
RMN DE ¹³ C	δ ppm
Mateolli <i>et al.</i> 2007	19.5, 29.2, 33.3, 39.0, 39.7, 61.0, 125.6, 128.2, 128.2, 142.8
Superchi <i>et al.</i> 2011	19.7, 29.5, 33.6, 39.2, 40.0, 61.3, 125.8, 128.5, 129.2, 143.0
Presente trabajo	19.2, 28.9, 33.0, 38.7, 29.3, 60.4, 125.3 127.9, 128.0, 142.5

RMN DE ¹H: El análisis del protón en RMN (CDCl₃), del apartado VI. APENDICES (C) los valores de desplazamiento químico se observan en el Espectro de Resonancia (II ¹H) (Fenoxanol[®]) con (δ ppm): 0.94 (s, 3H, CH₃) correspondiente al metil unido al carbono quiral; 1.3-1.5 (m, 2H CH₂, H CH); 1.53-1.7 (m, 2H CH₂); 2.3 (s, 2H CH₂); 2.5-2.7 (m, 2H CH₂); 3.5-3.7 (m, H OH) protón hidroxilo; 7.1-7.2 (d, aromático). La principal pérdida de señal de los valores de desplazamiento químico se observó en la comparación con Mefranal[®] a 9.7 (s, 1H, CHO) del aldehído.

RMN DE ¹³C: El análisis del ¹³C en RMN (CDCl₃), del apartado VI. APENDICES (C) los valores de desplazamiento químico se observan en el Espectro de Resonancia (II ¹³C) (Fenoxanol[®]) con (δ ppm): 19.2, 28.9, 33.0, 38.7, 29.3, 60.4 carbono unido al grupo funcional hidroxilo, 125.3 127.9, 128.0, 142.5. La comparación con los autores: Superchi *et al.* (2011) y Matteoli *et al.* (2007) Corroboran la obtención similar de datos de resonancia de ¹³C. La principal pérdida de señal de los valores de desplazamiento químico se observó en la comparación con Mefranal[®] a 202.6 correspondiente al carbono de grupo funcional carbonilo de aldehído.

Polarimetría: A las condiciones mencionadas en el apartado III. Materiales y Métodos, en la sección 3.7.3. La lectura de rotación óptica en +15.00 ±0.01 mostró

la formación de R-Fenoxanol de acuerdo a la comparación con métodos de la síntesis química asimétrica empleada Mateolli *et al.* 2007 y Superchi *et al.* 2011. Mientras que de acuerdo a las comparaciones y métodos empleados por Brenna *et al.* (2002), se encontraron que los rendimientos de 32-35% obtenidos en el presente trabajo; son válidos para la biorreducción y resolución máxima encontrada (50%) en una mezcla de enantiómeros, permitiendo observar una enantioselectividad parcial en los 3 procedimientos.

TABLA 3 Resultados de Rendimientos y configuración absoluta Final de Fenoxanol[®] obtenidos en el presente trabajo y su comparación con resultados en literatura

BIOTRANSFORMACIÓN CON <i>S. cerevisiae</i>	MEDIO DE REACCIÓN		
	ACUOSO	SOLVENTE	SOLIDO
RENDIMIENTO %	35 ±1	33 ±1	32 ±1
CONFIGURACIÓN	R+	R+	R+
ACTIVIDAD ÓPTICA	+14.9 ±2	+15.0 ±2	+15.0 ±1

No obstante, aunque *S. cerevisiae* acepto a Mefranal[®] como sustrato en los tres diferentes medios; se encontró en TLC una gran transferencia de material biológico, lo que dificultando el proceso de purificación en etapas de filtración y purificación. La FIGURA 4.1 corresponde a el análisis del seguimiento de las reacciones de biorreducción del aldehído de Mefranal en un medio acuoso. Donde fueron colocados muestras correspondientes a (1): aldehído de Mefranal, (2) alcohol de Fenoxanol y (3, 4 y 5) biorreducciones con *S. cerevisiae* un medio tradicional de agua, mencionadas en el apartado III. Materiales y Métodos, en la sección 3.7.5.

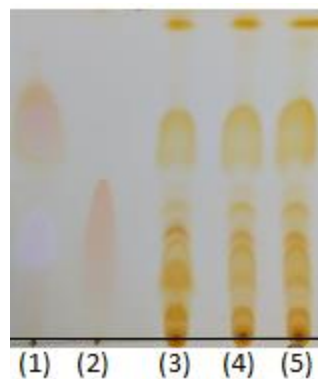


FIGURA 4.1 Análisis en TLC donde (1) es Mefranal[®], (2) Fenoxanol[®] reducido con NaBH₄ y (3, 4 y 5) son las biorreducciones con *S. cerevisiae*

Mientras que para el caso de las biorreducciones en medio de solvente y sólido, trabajando en la tecnología de solventes para extraer la menor cantidad posible de material biológico, no hubo problemas en la separación de Fenoxanol[®] y la levadura, como los observados en medios tradicionales acuosos, obteniendo una pasta por la poca separación de la levadura y el medio. El uso de medios de solvente y sólido para las biorreducciones, descartando la activación inicial de la levadura durante 30 minutos con una fuente de carbono y agua, demostró que la levadura pudo ejercer actividad enzimática y que el uso específico de heptano para las biorreducciones en medios de solvente, mostraron resultados similares de rendimiento obtenidos con las biorreducciones en medios acuosos. No obstante, el uso de este solvente demostró un menor arrastre de material biológico hacia Fenoxanol[®].

Pese a que todas las biorreducciones en los 3 diferentes demostraron que la levadura *S. cerevisiae* ejerció la misma actividad enantioselectiva; La biorreducción en un medio sólido, resultó ser la más viable, al no requerir la adición de un medio de movilidad y energía de activación.

4.3 Obtención del éster de Fenoxanol usando *Cal-B*

La resolución mediante la acetilación enzimática del alcohol de Fenoxanol[®] racémico (obtenido mediante reducción química con NaBH₄), los resultados

demonstraron que la lipasa de *Cal-B* procedió con la formación del enantiómero de configuración (S)-Éster de Fenoxanol mediante el uso de técnicas empleadas por Santiago-Aquino (2019). Proporcionando nueva información acerca de las propiedades físicas y químicas para esta nueva molécula no documentada en una sola forma enantiomérica. Además de proporcionar la elucidación estructural espectroscópica la cual tampoco se tienen datos. Fue así que, los espectros obtenidos del éster del alcohol de Fenoxanol puro, proporcionan los únicos datos comparados con los espectros obtenidos de la elucidación y caracterización del alcohol de Fenoxanol de la TABLA 2.

4.3.1 Análisis estructural del éster de Fenoxanol

CG-EM: La elucidación estructural del éster de Fenoxanol, se comparó con la elucidación estructural del alcohol de Fenoxanol y se corroboró los cambios de las principales señales, en los espectros del apartado VI. APENDICES (A). En CG se mostró un cambio de polaridad al obtener el tiempo de retención en 4.0 minutos. El Espectro de Masas (III) (Éster de Fenoxanol[®]) mostró fragmentaciones en $[M]^{+1}$ 220 (2), 174 (23), 156, 131 (26), 104 (30), 91 (100) y 92 (22), donde la señal de ión molecular 220 con intensidad 2, correspondiente al peso molecular del éster predicho, conservando la fragmentación en 91 (100). Señal presente en los espectros de Mefranal y Fenoxanol como pico base correspondiente a la fragmentación de alquilbencenos favoreciendo el ión tropilio.

FT-IR: El apartado VI. APENDICES (B) se observa el Espectro de Infrarrojo (III) (Éster de Fenoxanol[®]). Los principales señales están en las bandas de absorción que se obtuvieron en el análisis IR con (cm^{-1} ν) Estiramientos: 1735 (**C=O** enlace carbonilo de grupo funcional éster), ~1230 (**O-CO-C** estiramiento central sin contemplar doble enlace hacia el O asimétrico del grupo funcional éster), 1051 (**O-CO-C** estiramiento sin contemplar doble enlace hacia el O simétrico del grupo funcional éster), mientras que se conservan las señales: 3091, 3065, 3026 (**C-H** enlace del anillo aromático monosustituido con 3 vibraciones consecutivas en

creciente), 1603 (**C-C** estiramiento del anillo aromático simétrico), 1495 (**C-C** estiramiento del anillo aromático asimétrico horizontal), 1454 (**C-C** estiramiento del anillo aromático asimétrico vertical). Flexiones: 744 (**C-H** flexión de sombrilla del anillo aromático simétrico), 697 (**C-H** flexión de sombrilla del anillo aromático asimétrico) 1800-2500 (huellas dactilares pertenecientes a los anillos aromáticos). Los principales cambios de la absorción son la pérdida del grupo funcional en 3341 (**O-H** enlace hidroxilo del alcohol).

RMN DE ¹H: El Espectro de Resonancia (III ¹H) (Éster de Fenoxanol[®]) en el apartado VI. APENDICES (C) corroboró los principales cambios de desplazamiento químico. Mostrando las señales en (δ ppm): 1.0 (m, 3H CH₃); 1.48-1.8 (m, H CH); 2.0-2.02 (s, 3H CH₃); 2.5-2.8 (m, 2H CH₂); 4.0-4.2 (m, 2H CH₂); 7.2-7.4 (m, aromático). Donde la señal en 2.0-2.02 (s, 3H CH₃); corresponde a los protones de un metil de éster a campos protegidos, que no presentaba el espectro de Fenoxanol, conservando las señales en alrededor de 1.0 (m, 3H CH₃) correspondiente al metil unido al carbono quiral y en 7.2-7.4 (m, aromático). La principal pérdida de interés en las señales del éster de Fenoxanol es a 3.5-3.7 (m, H OH) correspondiente al protón hidroxilo del alcohol Fenoxanol.

RMN DE ¹³C: El análisis del ¹³C del Espectro de Resonancia (III ¹³C) (Éster de Fenoxanol[®]) del apartado VI. APENDICES (C). Los valores de desplazamiento químico se observaron en: (δ ppm): 19,4 20.8, 29.3, 31.8, 34.5, 58.9, 121.9, 124.5, 124.5, 138.2, 165.9. Donde se conserva la señal del desplazamiento químico a 60.4 corresponde al carbono unido al grupo funcional hidroxilo que, ahora unió al grupo funcional éster. La señal a 165.9 corresponde a una nueva señal de carbonilo del grupo funcional éster. Así mismo la señal a 19,4 correspondiente al metil del grupo.

El seguimiento de las reacciones de biocatálisis mediante TLC, mostró una conversión completa, favoreciendo la obtención del éster de Fenoxanol[®] en tiempos de 12 horas a 40° C y rendimientos del 45%, similares a los obtenidos por Abate *et al.* 2002 usando lipasas hidrolíticas. La lectura de rotación en -7.0° \pm 0.9 dio referencia a la configuración absoluta de (S-). El uso de *Cal-B* inmovilizada fue

comparada con metodologías reportadas por Santiago-Aquino *et al.* (2019) encontrando una baja y casi nula cantidad de subproductos formados.

4.4 Obtención de la oxima de Mefranal con $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$

La obtención de la oxima de Mefranal[®] proporciono nueva información acerca de las propiedades físicas y químicas para esta nueva molécula quiral no documentada. Además de proporcionar la elucidación estructural espectroscópica la cual tampoco se tienen datos. La lectura de la rotación observada de $0.00^\circ \pm 0.09$ confirmo la obtención de la mezcla racémica en concentraciones 50-50%, así mismo paso de una densidad de 0.960- 0.06 a 1.002 g/mL. Los espectros obtenidos de la oxima de Mefranal, se compararon con los espectros obtenidos a partir de la elucidación y caracterización inicial de Mefranal[®] (TABLA 1).

4.4.1 Análisis estructural de la oxima de Mefranal

CG-EM: El apartado VI. APENDICES (A) se observa el Espectro de Masas (IV) (Oxima de Mefranal[®]) con las señales de fragmentación en $[\text{M}]^{+1}$ 191 (2) señal impar de ión molecular correspondiente al peso molecular por regla del Nitrógeno, 174 (30), 158 (12), 131 (29), 104 (11), 91 (100). Las señales en 92 (21) señal de fragmentación correspondiente a la transposición de McLafferty en alquilbencenos y 91 (100) señal de pico base correspondiente a la fragmentación de alquilbencenos favoreciendo el ión tropilio, siguen siendo las fragmentaciones principales que se conservaron. Así mismo se obtuvo el tiempo de retención a 16.4 minutos.

FT-IR: El apartado VI. APENDICES (B) se observó el Espectro de Infrarrojo (IV) (Oxima de Mefranal[®]) con las bandas de absorción que se obtuvieron en (cm^{-1} v) Estiramientos: 3243 (**O-H** enlace hidroxilo del alcohol del grupo funcional oxima), 1030 (**=N-O** estiramiento asimétrico del grupo funcional oxima), 925 (**=N-O** estiramiento simétrico del grupo funcional oxima), 1654 (**C=N** estiramiento del

grupo funcional oxima), conservando las señales en 3085, ~, 3025 (**C-H** enlace del anillo aromático monosustituido con 3 vibraciones consecutivas), 1602 (**C-C** estiramiento del anillo aromático simétrico), 1495 (**C-C** estiramiento del anillo aromático asimétrico horizontal), 1453 (**C-C** estiramiento del anillo aromático asimétrico vertical). Flexiones: 744 (**C-H** flexión de sombrilla del anillo aromático simétrico), 696 (**C-H** flexión de sombrilla del anillo aromático asimétrico), 1800-2500 (huellas dactilares pertenecientes a los anillos aromáticos). Las pérdidas de la absorción se observaron a 1720 (**C=O** enlace carbonilo de aldehído) y 1717 (**C-H** flexión y estiramiento del H unidos al grupo funcional aldehído).

RMN DE ¹H: El análisis del protón en RMN (CDCl₃) del apartado VI. APENDICES (C), los valores de desplazamiento químico se observan en el Espectro de Resonancia (IV ¹H) (Oxima de Mefranal®) con (δ ppm): 1.0-1.2 (s, 3H CH₃) correspondiente al metil unido al carbono quiral; 1.5- 1.7 (m, 2H CH₂); 1.75-1.9 (m, 2H CH₂); 2.2-2.6 (m, H CH) correspondiente al H unido al carbono quiral; 2.7-2.8 (m, 2H CH₂); 6.8 (m, H, HCN) correspondiente a H de la aldoxima (Santiago-Aquino *et. al.* 2019); 7.2-7.6 (m, arom). La pérdida principal de la señal a 9.7 (s, 1H, CHO) de aldehído.

RMN DE ¹³C: El análisis del ¹³C en RMN (CDCl₃), del apartado VI. APENDICES (C) los valores de desplazamiento químico se observan en el Espectro de Resonancia (IV ¹³C) (Oxima de Mefranal®) con (δ ppm): 20.0, 31.5, 32.9, 33.9, 38.2, 142.1, 129.1, 128.9, 126.9, 152.2 correspondiente al carbono de grupo funcional (C=N) aldoxima.

La síntesis química simétrica a partir del aldehído de Mefranal® racémico con NH₂OH.HCl, demostró la obtención de la oxima de Mefranal en una mezcla racémica con rendimientos del 95% usando carbonato de sodio (agente neutralizante del clorhidrato) que libera la hidroxilamina nucleofílica, para favorecer la reacción de síntesis de la oxima (Santiago-Aquino *et. al.* 2019 y Kim *et al.* 2013), permitiendo que las reacciones fueran casi completas. La obtención de los dos enantiómeros de la oxima de Mefranal en una mezcla racémica a partir del

aldehído de Mefranal, es rentable ya que no discrimina una de sus dos formas enantioméricas con una casi nula cantidad de subproductos formados.

4.5 Obtención del éster de oxima de Mefranal usando *Cal-B*

La resolución de la oximólisis enzimática propuesta para la oxima de Mefranal en la obtención del acetato (éster de oxima de Mefranal), mediante la utilización de *Cal-B*, se efectuó con el seguimiento de las reacciones mediante el análisis en TLC, acuerdo a los métodos estudiados y citados por Santiago-Aquino *et al.* (2019), Arthur-Santiago *et al.* (2018) y Gotor *et al.* (1990).

Los resultados finales demostraron que *Cal-B* no fue capaz de realizar la resolución de oximólisis con la oxima de Mefranal. Donde se obtuvo una lenta conversión, lo que permitió suponer una reacción de eliminación incompleta y la formación del subproducto de Citralis Nitrilo en tiempos que oscilaron las 72 horas de reacción a 40° C. Los espectros obtenidos para la identificación y determinación final a partir de la purificación y separación de la mezcla; Corroboró la ausencia de la formación del éster de la oxima de Mefranal

4.6 Obtención del Citralis Nitrilo® usando *Cal-B*

La obtención y purificación del nitrilo como producto final mediante el uso de *Cal-B* inmovilizada fue comparada con metodologías purificación reportadas por Santiago-Aquino *et al.* (2019) encontrando una baja y casi nula cantidad de subproductos formados, que a su vez da lugar a una metodología viable para la obtención de Citralis Nitrilo® de Mefranal mediante acetilación enzimática. Los espectros obtenidos se compararon con los espectros obtenidos de la elucidación y caracterización de la oxima de Mefranal, y así misma, mediante la obtención química reportada por Mateolli (2007) y Superchi (2011). Como resultado, se comparó la elucidación estructural en la obtención vía química y/o enzimática de Citralis Nitrilo® (TABLA 4).

4.6.1 Análisis estructural del Nitrilo de Mefranal®

CG-EM: El apartado VI. APENDICES (A) se observa el Espectro de Masas (V) (Citrális Nitrilo®) con las señales de fragmentación en $[M]^{+2}$ 173 (35) señal impar de ión molecular correspondiente al peso molecular por regla del Nitrógeno, 158 (60); 105 (31); 92 (54); 91 (100). Las señales en 92 (21) señal de fragmentación correspondiente a la transposición de McLafferty en alquilbencenos y 91 (100) señal de pico base correspondiente a la fragmentación de alquilbencenos favoreciendo el ión tropilio, siguen siendo las fragmentaciones principales que se conservaron. Así mismo se obtuvo en CG, el tiempo de retención a 3.3 minutos.

FT-IR: Los principales cambios de señales de IR, se obtuvieron en el análisis de bandas de absorción del apartado VI. APENDICES (B) y el Espectro de Infrarrojo (V) (Citrális Nitrilo®) con bandas en (cm^{-1} v): Estiramientos: 2246 (**C≡N** estiramiento del triple enlace de nitrilos). Las señales en IR en regiones específicas para anillos monosustituídos garantizó la obtención exacta del nitrilo al conservar las señales de 3085, 3061, 3026 (C-H enlace del anillo aromático monosustituído con 3 vibraciones consecutivas), 1602 (C-C estiramiento del anillo aromático simétrico), 1496 (C-C estiramiento del anillo aromático asimétrico horizontal), 1454 (C-C estiramiento del anillo aromático asimétrico vertical). Flexiones: 745 (C-H flexión de sombrilla del anillo aromático simétrico), 696 (C-H flexión de sombrilla del anillo aromático asimétrico), 1800-2500 (huellas dactilares pertenecientes a los anillos aromáticos).

La comparación de espectros con la oxima de Mefranal® y Citralis Nitrilo®, obtenido mediante la síntesis química asimétrica (TABLA 4). Corroboraron las pérdidas de absorción en: 3243 (**O-H** enlace hidroxilo del alcohol del grupo funcional oxima), 1030 (**=N-O** estiramiento asimétrico del grupo funcional oxima), 925 (**=N-O** estiramiento simétrico del grupo funcional oxima), 1654 (**C=N** estiramiento del grupo funcional oxima).

TABLA 4 Resultados de CG-EM, RMN ^1H y ^{13}C de Citralis Nitrilo[®] obtenidos en el presente trabajo y su comparación con resultados en literatura

CG-EM	m/z
Mateolli <i>et al.</i> 2007	$[\text{M}]^{+1}$ 173, 158, 92, 91
Superchi <i>et al.</i> 2011	$[\text{M}]^{+1}$ 173 (20), 158 (43), 92 (29), 91 (100)
Presente trabajo	$[\text{M}]^{+1}$ 173 (35), 158 (60), 105 (31), 92 (54), 91 (100)
RMN DE ^1H	δ ppm
Mateolli <i>et al.</i> 2007	1.06 (m; 3H CH ₃), 1.59–1.69 (m, 2H), 1.80–1.90 (m, 1H), 2.51–2.64 (m, 4H), 7.06–7.25 (m, 5H)
Superchi <i>et al.</i> 2011	1.06 (m; 3H CH ₃), 1.59–1.69 (m, 2H), 1.80–1.90 (m, 1H), 2.51–2.64 (m, 4H), 7.06–7.25 (m, 5H)
Presente trabajo	1.1 (m, 3H CH ₃), 1.5-1.8 (m, H CH), 2.2-2.4 (m ₂ H CH ₂), 2.5-2.7 (m, 2H CH ₂), 7.1-7.4 (m, arom)
RMN DE ^{13}C	δ ppm
Mateolli <i>et al.</i> 2007	19.3, 24.5, 29.9, 33.0, 37.5, 118.7, 126.0, 128.2, 128.5, 141.3.
Superchi <i>et al.</i> 2011	19.2, 24.5, 29.8, 33.0, 37.4, 118.6, 126.0, 128.1, 128.5, 141.2.
Presente trabajo	19.9, 24.9, 29.9, 33.9, 37.8, 117.2, 126.8, 128.9, 128.9, 142.8

RMN DE ^1H : El análisis del protón en RMN (CDCl_3) del apartado VI. APENDICES (C), los valores de desplazamiento químico se observan en el Espectro de Resonancia (^1H) (Citralis Nitrilo[®]) con (δ ppm): 1.1 (m, 3H CH₃); 1.5-1.8 (m, H CH); 2.2-2.4 (m₂H CH₂); 2.5-2.7 (m, 2H CH₂); 7.1-7.4 (m, arom). El espectro mostró el acoplamiento del anillo aromático monosustituido y el centro quiral la cadena alifática, a excepción del C de grupo funcional nitrilo ya que el fuerte enlace $\text{C}-\text{C}\equiv\text{N}$ impide enlaces a hidrógenos que se puedan resonar.

El espectro del nitrilo fue comparado con su precursor, la oxima de Mefranal y se observó la ausencia de las señales del proton en desplazamientos a: 6.8 (m, H, HCN) correspondiente a H de la aldoxima (Santiago-Aquino *et al.* 2019); La comparación con el espectro del aldehído de Mefranal del protón a 9.7 (s, 1H, CHO) de aldehído, también permite obtener la elucidación exacta de la estructura del nitrilo de Mefranal.

RMN DE ^{13}C : El análisis del ^{13}C en RMN (CDCl_3), del apartado VI. APENDICES (C) los valores de desplazamiento químico se observan en el Espectro de Resonancia ($V \ ^{13}\text{C}$) (Citralis Nitrilo[®]) con (δ ppm): 19.9, 24.9, 29.9, 33.9, 37.8, 117.2 correspondiente al carbono de grupo funcional nitrilo ($\text{C}\equiv\text{N}$), 126.8, 128.9, 142.8. La pérdida de la señal a 152.2. correspondiente al $\text{C}=\text{N}$ de la oxima.

Las acilaciones/eliminaciones enzimáticas de la oxima de Mefranal racémica (usando $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) para la obtención del Citralis Nitrilo[®] mediante la utilización de los métodos estudiados y citados por Santiago-Aquino *et al.* (2019), demostraron que *Cal-B* acepto y mostró enantioselectividad para la resolución. El seguimiento de las reacciones con TLC, mostró una conversión completa, en tiempos de 24 horas a 80°C . y rendimientos del 45%, similares a los resultados obtenidos con las acilaciones, eliminaciones y oxidaciones de compuestos nitrogenados vía química y/o enzimática descritos por Santiago-Aquino *et al.* (2019), Arthur-Santiago *et al.* (2018), Superchi *et al.* (2011), Matteoli *et al.* (2007) y Gotor *et al.* (1990), usando lipasas hidrolíticas y/o catalizadores químicos quirales. La discriminación por parte de *Cal-B* para sustratos quirales en el presente proyecto encontró favorecida la formación y enantioselectividad, favoreciendo la formación del enantiómero de configuración (S)-Citralis Nitrilo[®] observado por polarimetría. Teniendo como lectura final la actividad óptica en una rotación de $-2.0^\circ \pm 0.1$.

,

CONCLUSIONES

La Biorreducción de Mefranal[®] racémico con *S. Cerevisiae* ocurrió con la resolución del par enantiomérico para producir el alcohol de configuración (R) con rendimientos entre el 33 al 35% independientemente de la metodología utilizada en el proceso. Es decir, en medio acuoso tradicional, utilizando un disolvente orgánico como medio de la reacción o incluso en estado sólido, en el cual se usó la levadura comercial.

La resolución del alcohol Fenoxanol[®] racémico, mediante la acetilación (con acetato de vinilo) catalizada por *Cal-B* en disolvente orgánico, ocurrió con conversiones del 45% y un alto exceso enantiomérico en favor del alcohol isomérico (S).

La oximación de Mefranal[®] con clorhidrato de hidroxilamina ocurrió con un alto rendimiento para producir una nueva molécula, como posible fragancia.

Se desarrolló una metodología basada en la acetilación (con acetato de vinilo) de oxima de Mefranal catalizada por *Cal-B* en disolvente orgánico a 80°C para producir Citralis nitrilo[®] en un alto rendimiento.

Se obtuvieron 4 productos de valor agregado consideradas fragancias finas, mediante metodologías de la química verde no reportadas previamente, a partir de Mefranal[®] racémico.

V. BIBLIOGRAFÍA

Abate, A., Brenna, E., Dei Negri, C., Fuganti, C. y Serra, S. 2002. Biocatalysed synthesis of the enantiomers of the floral odorant Florhydral[®]. *Tetrahedron: Asymmetry*. 13(8). 899–904.

Abate, A., Brenna, E., Fronza, G., Fuganti, C., Gatti, F. G., Serra, S. y Zardoni, E. 2004. Preparation of the Enantiomerically Enriched Isomers of the Odorous Cyclic Ethers Clarycet[®], Florol[®] and Rhubafuran[®] by Enzymatic Catalysis. *Helvetica Chimica Acta*. 87(4). 765–780.

Abate, A., Brenna, E., Fuganti, C., Gatti, F. G. y Serra, S. 2004. Lipase-catalysed preparation of enantiomerically enriched odorants. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 32(1-2). 33–51.

Abate, A., Brenna, E., Fuganti, C., Gatti, F. G., Giovenzana, T., Malpezzi, L. y Serra, S. 2005. Chirality and Fragrance Chemistry: Stereoisomers of the Commercial Chiral Odorants Muguesia and Pamplefleur. *The Journal of Organic Chemistry*. 70(4). 1281–1290.

Abate, A., Brenna, E., Fuganti, C., Gatti, F. y Serra, S. 2004. Odor and (Bio)diversity: Single Enantiomers of Chiral Fragrant Substances. *Chemistry & Biodiversity*, 1(12), 1888–1898.

Afach, G., Kawanami, Y., Cheetangdee, N., Fukada, K. y Izumori, K. 2008. Lipase-Catalyzed Synthesis of d-Psicose Fatty Acid Diesters and their Emulsification Activities. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 85(8). 755–760.

Appella, D. H., Moritani, Y., Shintani, R., Ferreira, E. M. y Buchwald, S. L. 1999. Asymmetric Conjugate Reduction of α,β -Unsaturated Esters Using a Chiral Phosphine–Copper Catalyst. *Journal of the American Chemical Society*. 121(40). 9473–9474.

- Arthur-Santiago, M. A., Oliart-Ros, R. M., Sánchez-Otero, M. G., & Valerio-Alfaro, G. (2018). *Mechanochemo-enzymatic Synthesis of Aromatic Aldehyde Oxime Esters. Natural Product Communications*, 13(7).
- Bakke, M., Takizawa, M., Sugai, T. y Ohta, H. 1998. Lipase-Catalyzed Enantiomeric Resolution of Ceramides. *The Journal of Organic Chemistry*. 63(20). 6929–6938.
- Ballini, R., Fiorini, D. y Palmieri, A. 2004. Highly Convenient, One-Pot Synthesis of Nitriles from Aldehydes Using the NH₂OH.HCl/NaI/MeCN System. *ChemInform*, 35(6).
- Bauer, K., Garbe, D. y Surberg, H. 2002. Flavors and Fragrances, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, International Flavors & Fragrances Inc. New York.
- Bickers, D. R., Calow, P., Greim, H. A., Hanifin, J. M., Rogers, A. E., Saurat, J.-H. y Tagami, H. 2003. The safety assessment of fragrance materials. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 37(2). 218–273
- Bonikowski, R., Świtakowska, P., Jabłońska, A., Kula, J., Sienkiewicz, M., Gabrysiak, J. y Kajrukszo, K. 2014. Characteristics of some synthetic terpenoids with a grapefruit odour discovered by serendipity. *Flavour and Fragrance Journal*. 29(6). 380–387.
- Borowiecki, P., Fabisiak, M. y Ochal, Z. 2013. Lipase-catalyzed kinetic resolution of 1-(1,3-benzothiazol-2-ylsulfanyl)-propan-2-ol with antifungal activity: a comparative study of transesterification versus hydrolysis. *Tetrahedron*. 69(23). 4597–4602.
- Brenna, E., Fronza, G., Fuganti, C., Righetti, A. y Serra, S. 1999. Enzyme-Mediated Preparation of the Single Enantiomers of the Olfactory Active Components of the Woody Odorant Timberol®. *Helvetica Chimica Acta*. 82. 1762-1773.

Brenna, E., Fuganti, C. y Serra, S. 2003. Enantioselective perception of chiral odorants. *Tetrahedron: Asymmetry*. 14(1). 1–42.

Brenna, E., Fuganti, C., Gatti, F. G. y Serra, S. 2011. Biocatalytic Methods for the Synthesis of Enantioenriched Odor Active Compounds. *Chemical Reviews*. 111(7). 4036–4072.

Brenna, E., Fuganti, C., Grasselli, P. y Serra, S. 2001. Enzyme-Mediated Synthesis of (S)- and (R)-Verapamil. *European Journal of Organic Chemistry*. (7). 1349–1357.

Brenna, E., Fuganti, C., Ronzani, S. y Serra, S. 2002. Biocatalyzed preparation of the optically enriched stereoisomers of 4-methyl-2-phenyl-tetrahydro-2H-pyran (Doremox®). *Canadian Journal of Chemistry*. 80(6). 714–723.

Brookes, J. C., Horsfield, A. y Stoneham, A. 2009. Odour character differences for enantiomers correlate with molecular flexibility. *Journal of The Royal Society Interface*. 6(30) 75–86.

Camps, F., Gasol, V. y Guerrero, A. 1988. A Simple One-Pot Synthesis of Nitriles from Alcohols. *Synthetic Communications*. 18(4). 445–452.

Chastrette, M., Rognon, C., Sauvegrain, P. y Amouroux, R. 1992. On the role of chirality in structure-odor relationships. *Chemical Senses*. 17(5). 555–572.

Ciappa, A., Bovo, S., Bertoldini, M., Scrivanti, A. y Matteoli, U. 2008. Homogeneous Asymmetric Catalysis in Fragrance Chemistry. *Chemistry & Biodiversity*. 5(6) 1058–1069.

Ciappa, A., Scrivanti, A. y Matteoli, U. 2004. The asymmetric hydrogenation of 1,1,4,4,7-pentamethyl-2-methylen-1,2,3,4-tetrahydro-naphthalene, a viable catalytic approach to the synthesis of non-racemic Fixolide®. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 219(2). 217–220.

Cometto-Muñiz, J. 1998. Trigeminal and Olfactory Chemosensory Impact of Selected Terpenes. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 60(3). 765–770.

Fischli, A. y Müller, P. M. 1980. Cob(I)alamin als Katalysator. Retention der Konfiguration bei der reaktiv-protonenübertragenden Spaltung der Co, C-Bindung eines Alkylcobalamins. *Helvetica Chimica Acta*, 63(6), 1619–1627

Fortineau, A. D. 2012. Valuable yet vulnerable: trade secrets in the fragrance industry, in: International Fragrance Association: Position Paper, Switzerland. *J. Chem. Educ.* 81 (2004) 45–50.

Gao, Z. y Fletcher, S. P. 2017. Asymmetric conjugate addition of alkylzirconium reagents to α,β -unsaturated thioesters: access to fragrances and acyclic stereochemical arrays. *Chemical Communications*. 53(73). 10216–10219.

Gautschi, M., Natsch, A. y Schröder, F. 2007 Biochemistry of Human Axilla Malodor and Chemistry of Deodorant Ingredients. *CHIMIA*. 61(1/2). 27-32.

Ghanem, A. y Schurig, V. 2003. Lipase-catalyzed access to enantiomerically pure (R)- and (S)-trans-4-phenyl-3-butene-2-ol. *Tetrahedron: Asymmetry*. 14(1). 57–62.

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.

Gozum, V. P. y Mebane, R. C. 2012. Solvent-free and atom efficient conversion of aldehydes into nitriles. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 6(2). 149–150.

Horst Surburg, H, y Panten, J. 2016. Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses. *Wiley-VCH*. 6 completely revised and updated Edition. Germany.

Jacobsen, E. E. y Anthonsen, T. 2002. Water content influences the selectivity of *CAL-B*-catalyzed kinetic resolution of phenoxyethyl-substituted secondary alcohols. *Canadian Journal of Chemistry*. 80(6). 577–581.

Johnson, N. B., Lennon, I. C., Moran, P. H. y Ramsden, J. A. 2007. Industrial-Scale Synthesis and Applications of Asymmetric Hydrogenation Catalysts. *Accounts of Chemical Research*. 40(12). 1291–1299.

Joshi, S. S. y Ranade, V. V. 2016. Industrial Catalytic Processes for Fine and Specialty Chemicals. Elsevier Inc. Amsterdam, Netherlands. Chap. 8 *Catalysis for Fine and Specialty Chemicals*.

Kafka, W. A., Ohloff, G., Schneider, D. y Vareschi, E. 1973. Olfactory discrimination of two enantiomers of 4-methyl-hexanoic acid by the migratory locust and the honeybee. *Journal of Comparative Physiology*. 87(3). 277–284.

Kapoor, M. y Gupta, M. N. 2012. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*. 47(4). 555–569.

Kawasaki, M., Goto, M., Hu, D., Toyooka, N. y Kometani, T. 2013. Lipase-catalyzed preparation of optically active isomers of cyclamen aldehyde. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 96. 27–33.

Kawasaki, M., Kuroyanagi, S., Ito, T., Morita, H., Tanaka, Y., & Toyooka, N. (2017). Synthesis and odor properties of *Phantolide* analogues. *Tetrahedron*. 73(15). 2089–2099.

Kawasaki, M., Shimizu, M., Kuroyanagi, S., Shishido, Y., Komiyama, T. y Toyooka, N. 2016. Syntheses and odor properties of optically active dimethyl octenone and its analogs. *Tetrahedron: Asymmetry*. 27(6). 285–293.

Kawasaki, M., Toyooka, N., Saka, T., Goto, M., Matsuya, Y. y Kometani, T. 2010. Lipase-mediated preparation of optically active isomers of Rosaphen[®]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 67(1-2). 135–142.

Kivrak, A. y Zora, M. 2007. Efficient one-pot synthesis of cyanoferrocene from ferrocenecarboxaldehyde using NH₂OH·HCl/KI/ZnO/CH₃CN system. *Journal of Organometallic Chemistry*. 692(11). 2346–2349.

- Knowles, W. S. y Noyori, R. 2007. Pioneering Perspectives on Asymmetric Hydrogenation†. *Accounts of Chemical Research*. 40(12). 1238–1239.
- Korsching, S. 2002. Olfactory maps and odor images. *Current Opinion in Neurobiology*. 12(4). 387–392.
- Kraft, P. y Fráter, G. 2001. Enantioselectivity of the musk odor sensation. *Chirality* 13(8). 388–394.
- Lee, H., Kimura, S. y Iwata, T. 2018. Lipase-Catalyzed Regioselective Synthesis of Dextrin Esters. *Biomacromolecules*.
- Li, X., Wu, X., Chen, W., Hancock, F. E., King, F. y Xiao, J. 2005. Asymmetric Transfer Hydrogenation in Water with a Supported Noyori-Ikariya Catalyst. *ChemInform*, 36(2).
- Matteoli, U., Beghetto, V., Scrivanti, A., Aversa, M., Bertoldini, M. y Bovo, S. 2011. An alternative stereoselective synthesis of (R)- and (S)-Rosaphen® via asymmetric catalytic hydrogenation. *Chirality*. 23(9). 779–783.
- Matteoli, U., Ciappa, A., Bovo, S., Bertoldini, M. y Scrivanti, A. 2007. Asymmetric catalysis in fragrance chemistry: a new synthetic approach to enantiopure Phenoxanol®, Citralis® and Citralis Nitrile®. *Tetrahedron: Asymmetry*. 18(6) 797–802.
- Moss, M., Cook, J., Wenes, K. y Duckett, P. 2003. Aromas of rosemary and lavender essential oils differentially affect cognition and mood in healthy adults. *International Journal of Neuroscience*. 113(1). 15–38.
- Nordblad, M., Gomes, M. D., Meissner, M. P., Ramesh, H. y Woodley, J. M. 2018. Scoping Biocatalyst Performance Using Reaction Trajectory Analysis. *Organic Process Research & Development*.
- Noyori, R. 2003. Asymmetric Catalysis: Science and Opportunities (Nobel Lecture 2001). *Advanced Synthesis & Catalysis*, 345(12), 15–32.

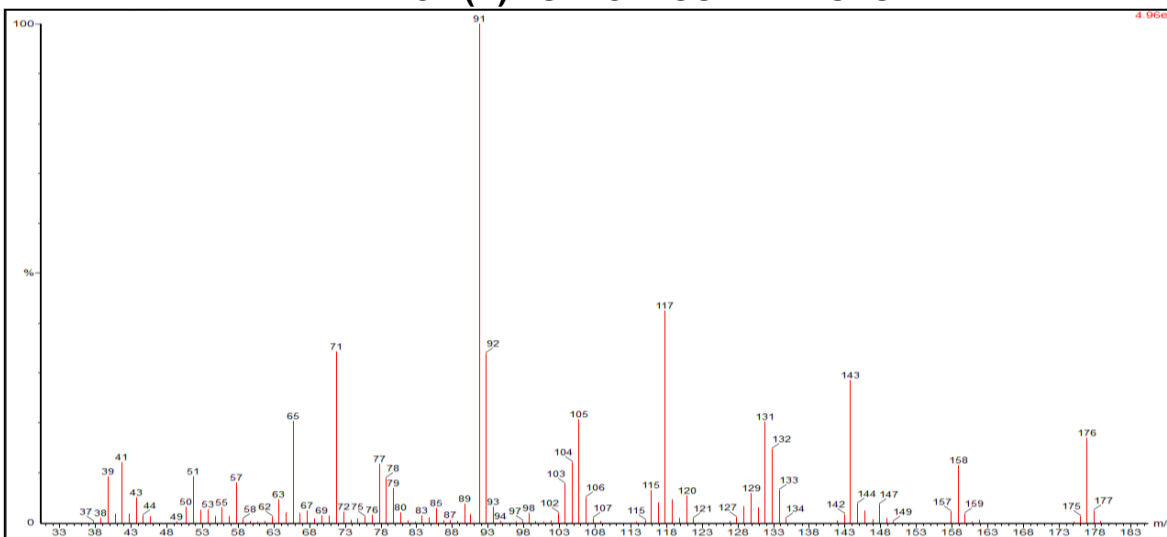
- Noyori, R. y Hashiguchi, S. 1997. Asymmetric Transfer Hydrogenation Catalyzed by Chiral Ruthenium Complexes. *Accounts of Chemical Research*. 30(2). 97–102.
- Noyori, R., Takaya, H., Nakanisi, Y. y Nozaki, H. 1969. Partial asymmetric synthesis of methylenecyclopropanes and spiropentanes. *Canadian Journal of Chemistry*. 47(7). 1242–1245.
- Paganelli, S., Ciappa, A., Marchetti, M., Scrivanti, A. y Matteoli, U. 2006. Hydroformylation of m-diisopropenylbenzene and 1-isopropyl-3-isopropenylbenzene for the preparation of the fragrance Florhydral®. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 247(1-2). 138–144.
- Pawłowska, J., Czarnocki, Z., Wojtasiewicz, K. y Maurin, J. K. 2003. Stereoselective synthesis of (R)-(-)-mianserin. *Tetrahedron: Asymmetry*. 14(21). 3335–3342.
- Prasad, A. K., Mukherjee, C., Sharma, D., Rastogi, S., Mangalam, A., Jha, A. y Parmar, V. S. 2006. Synthesis and lipase-catalyzed resolution studies on novel (±)-2-(2-acetoxyethyl)-4-arylmethyl-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazine-6-carboxylates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 40(3-4). 101–110.
- Sakaki, K., Hara, S. y Itoh, N. 2002. Optical resolution of racemic 2-hydroxy octanoic acid using biphasic enzyme membrane reactor. *Desalination*. 149(1-3). 247–252.
- Saudan, L. A. 2007. Hydrogenation Processes in the Synthesis of Perfumery Ingredients. *Accounts of Chemical Research*. 40(12). 1309–1319.
- Scrivanti, A., Bovo, S., Ciappa, A. y Matteoli, U. 2006. The asymmetric hydrogenation of 2-phenethylacrylic acid as the key step for the enantioselective synthesis of Citralis Nitrile®. *Tetrahedron Letters*. 47(52). 9261–9265.
- Serra, S. 2015. Recent Advances in the Synthesis of Carotenoid-Derived Flavours and Fragrances. *Molecules*. 20(7). 12817–12840.

- Serra, S., Fuganti, C. y Brenna, E. 2006. Synthesis, Olfactory Evaluation, and Determination of the Absolute Configuration of the 3,4-Didehydroionone Stereoisomers. *Helvetica Chimica Acta*. 89(6). 1110–1122.
- Skrobo, B., Rolfes, J. D. y Deska, J. 2016. Enzymatic approaches for the preparation of optically active non-centrochiral compounds. *Tetrahedron*. 72(10). 1257–1275.
- Sontakke, J. B. y Yadav, G. D. 2011. Kinetic Modeling and Statistical Optimization of Lipase Catalyzed Enantioselective Resolution of (R,S)-2-pentanol. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 50(23). 12975–12983.
- Superchi, S., Marchitello, V., Pisani, L. y Scafato, P. 2011. Asymmetric addition of dimethylzinc to alkylidenmalonates mediated by phosphorous ligands: A new synthetic route to floral fragrances. *Chirality*. 23(9). 761–767.
- Takaya, H., Ohta, T., Sayo, N., Kumobayashi, H., Akutagawa, S., Inoue, S. y Noyori, R. 1987. Enantioselective hydrogenation of allylic and homoallylic alcohols. *Journal of the American Chemical Society*. 109(5).
- Truppo, M. D. y Hughes, G. 2011. Development of an Improved Immobilized CAL-B for the Enzymatic Resolution of a Key Intermediate to Odanacatib. *Organic Process Research & Development*. 15(5). 1033–1035.
- Ulland, S., Ian, E., Borg-Karlson, A.-K. y Mustaparta, H. 2006. Discrimination between Enantiomers of Linalool by Olfactory Receptor Neurons in the Cabbage Moth *Mamestra brassicae* (L.). *Chemical Senses*. 31(4). 325–334.
- Wang, S.-Z., Wu, J.-P., Xu, G. y Yang, L.-R. 2009. Kinetic modelling of lipase-catalyzed remote resolution of citalopram intermediate in solvent-free system. *Biochemical Engineering Journal*. 45(2). 113–119.
- Werkmeister, S., Junge, K. y Beller, M. 2014. Catalytic Hydrogenation of Carboxylic Acid Esters, Amides, and Nitriles with Homogeneous Catalysts. *Organic Process Research & Development*. 18(2). 289–302.

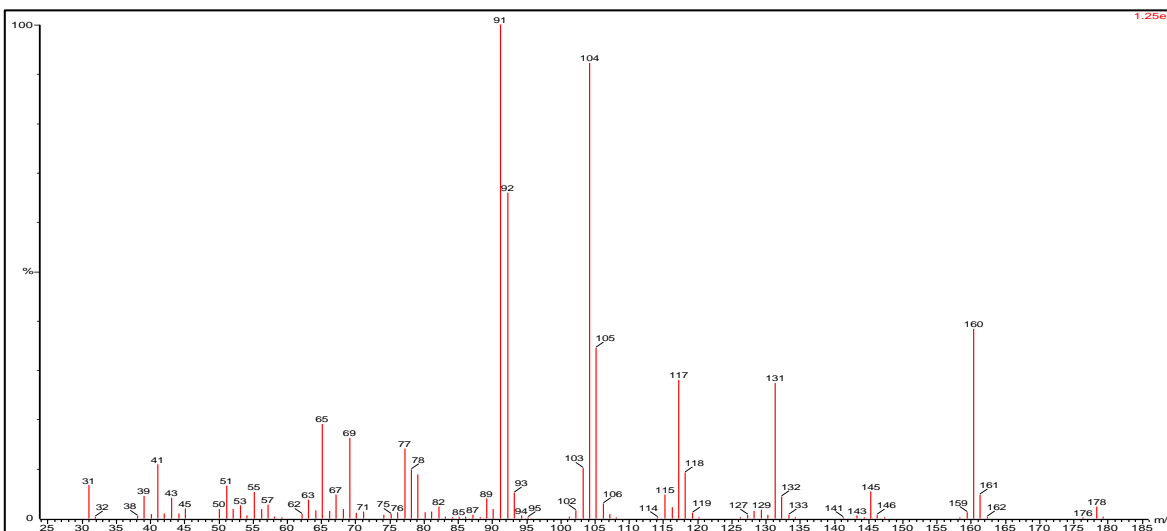
- Wibe, A., Borg-Karlson, A.-K., Persson, M., Norin, T. y Mustaparta, H. 1998. Enantiomeric Composition of Monoterpene Hydrocarbons in Some Conifers and Receptor Neuron Discrimination of α -Pinene and Limonene Enantiomers in the Pine Weevil, *Hylobius abietis*. *Journal of Chemical Ecology*. 24(2). 273–287.
- Xue, Y., Li, L.-P., He, Y.-H. y Guan, Z. 2012. Protease-catalysed Direct Asymmetric Mannich Reaction in Organic Solvent. *Scientific Reports*, 2(1).
- Yabushita, K., Yuasa, A., Nagao, K. y Ohmiya, H. 2018. Asymmetric Catalysis Using Aromatic Aldehydes as Chiral α -Alkoxyalkyl Anions. *Journal of the American Chemical Society*. 141. 113–117.
- Yamamoto, T., Shimada, A., Ohmoto, T., Matsuda, H., Ogura, M. y Kanisawa, T. 2004. Olfactory study on optically active citronellyl derivatives. *Flavour and Fragrance Journal*. 19(2). 121–133.
- Yang, X. y Fleming, F. F. 2017. C- and N-Metalated Nitriles: The Relationship between Structure and Selectivity. *Accounts of Chemical Research*. 50(10). 2556–2568.
- Yang, X.-H., Wang, K., Zhu, S.-F., Xie, J.-H. y Zhou, Q.-L. 2014. Remote Ester Group Leads to Efficient Kinetic Resolution of Racemic Aliphatic Alcohols via Asymmetric Hydrogenation. *Journal of the American Chemical Society*. 136(50). 17426–17429.
- Zhang, Y., Vongvilai, P., Sakulsombat, M., Fischer, A. y Ramström, O. 2014. Asymmetric Synthesis of Substituted Thiolanes through Domino Thia-Michael-Henry Dynamic Covalent Systemic Resolution using Lipase Catalysis. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 356(5). 987–992.

VI. APENDICES

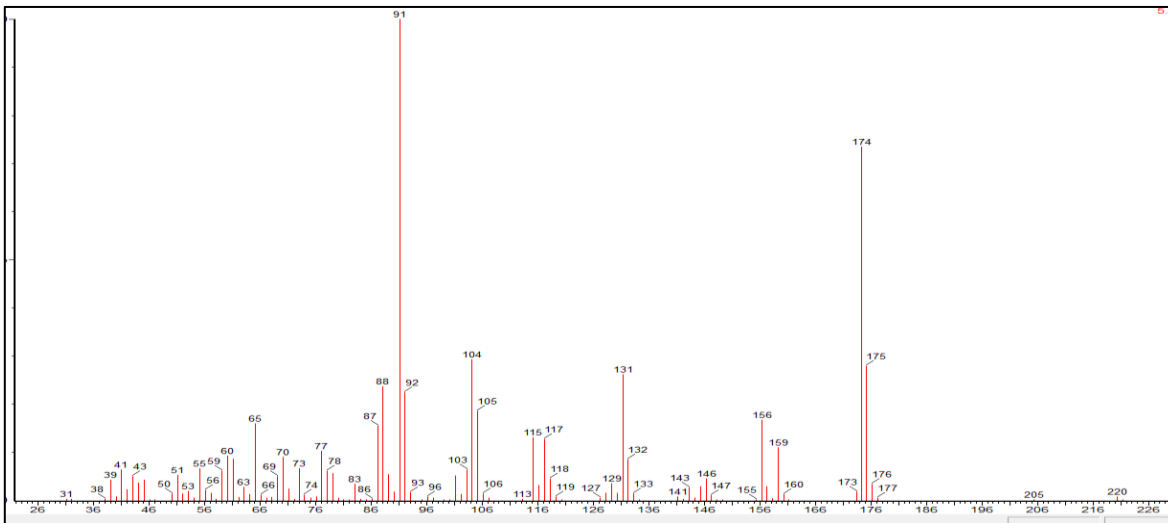
APENDICE (A) ESPECTROS DE MASAS



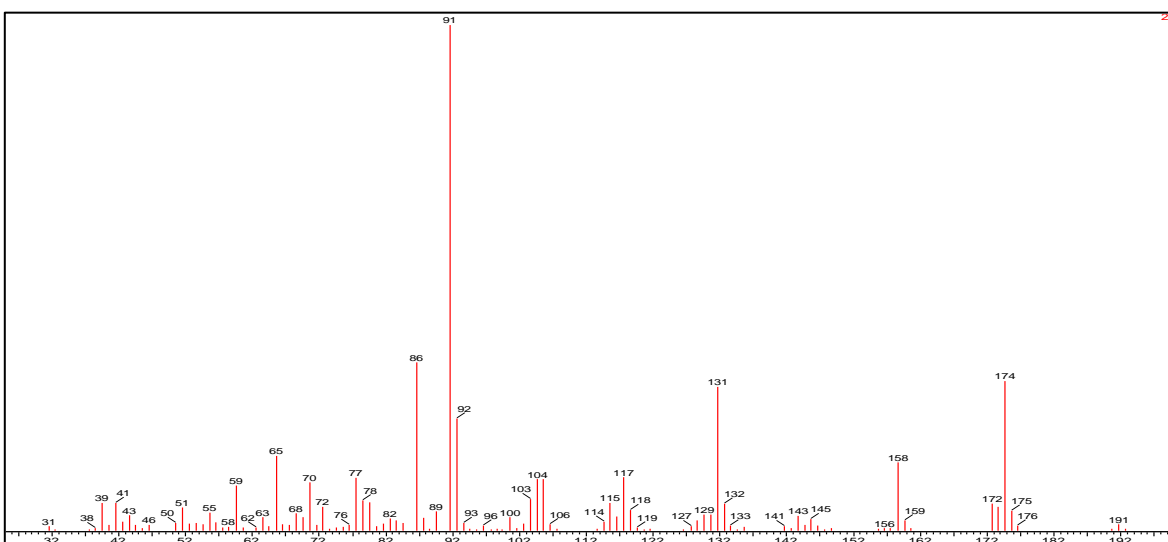
Espectro de Masas (I): Mefranal® 1



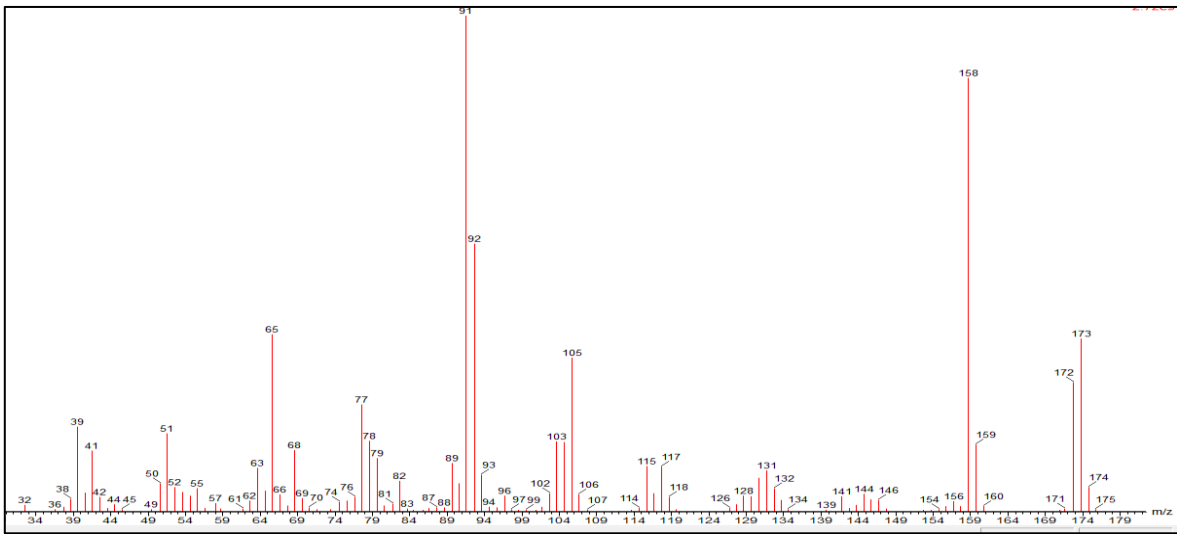
Espectro de Masas (II): Fenoxanol® 2



Espectro de Masas (III): Éster de Fenoxanol **3**

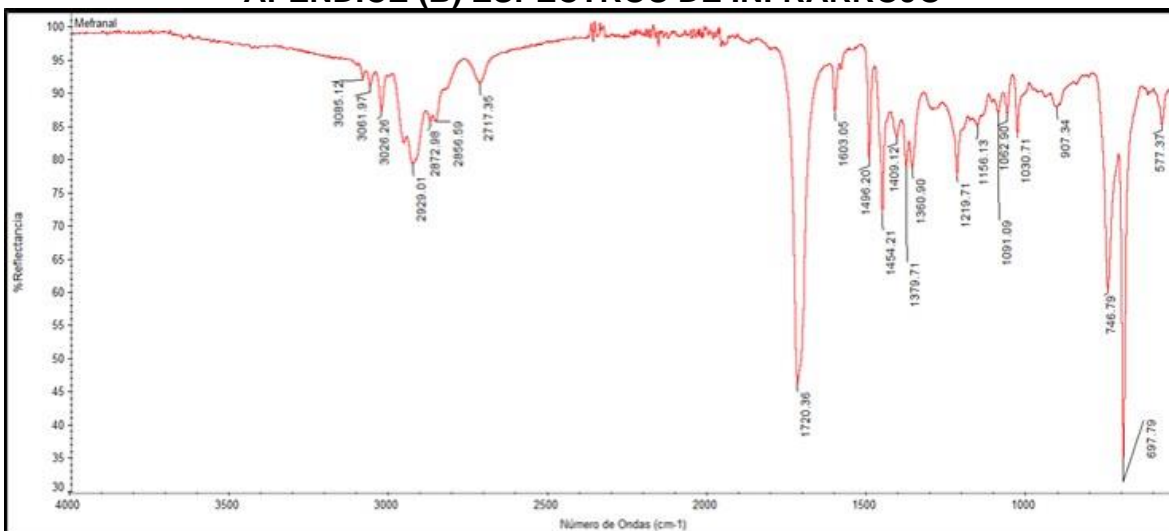


Espectro de Masas (IV): Oxima de Mefranal® **4**

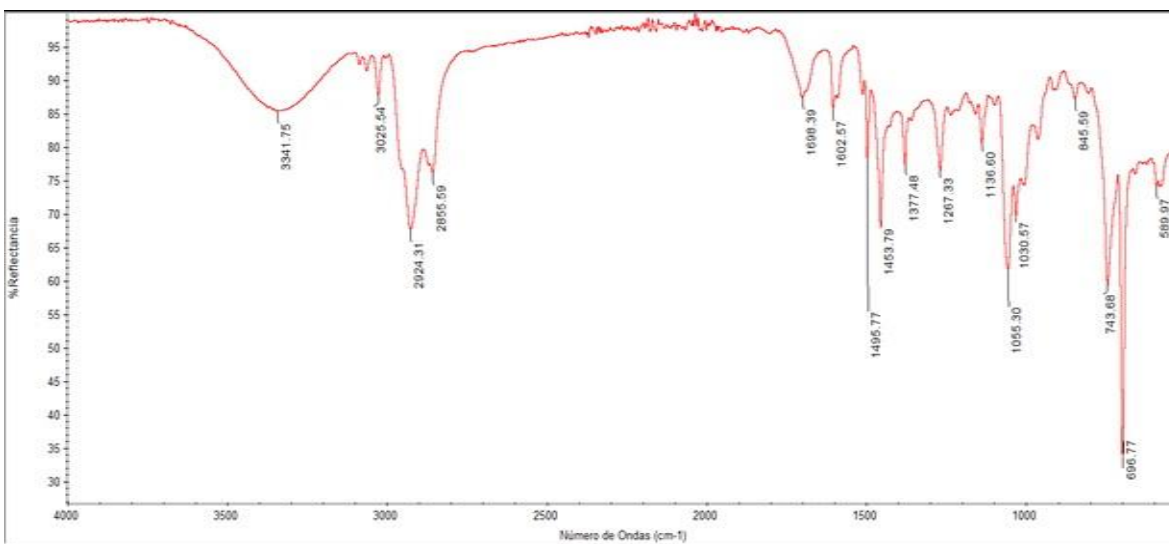


Espectro de Masas (V): Nitrilo de Meformal® 5

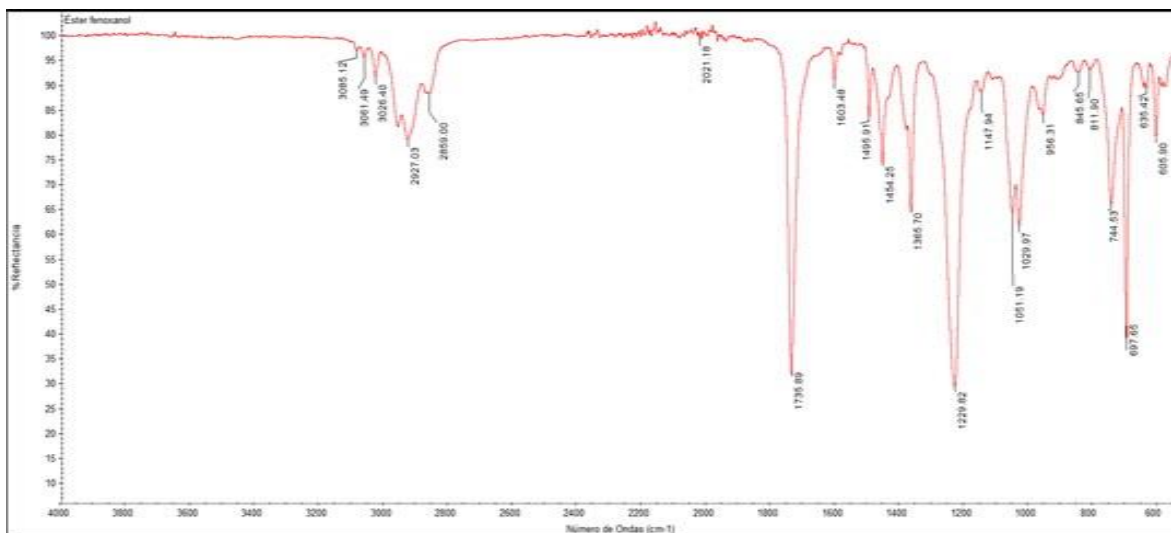
APENDICE (B) ESPECTROS DE INFRARROJO



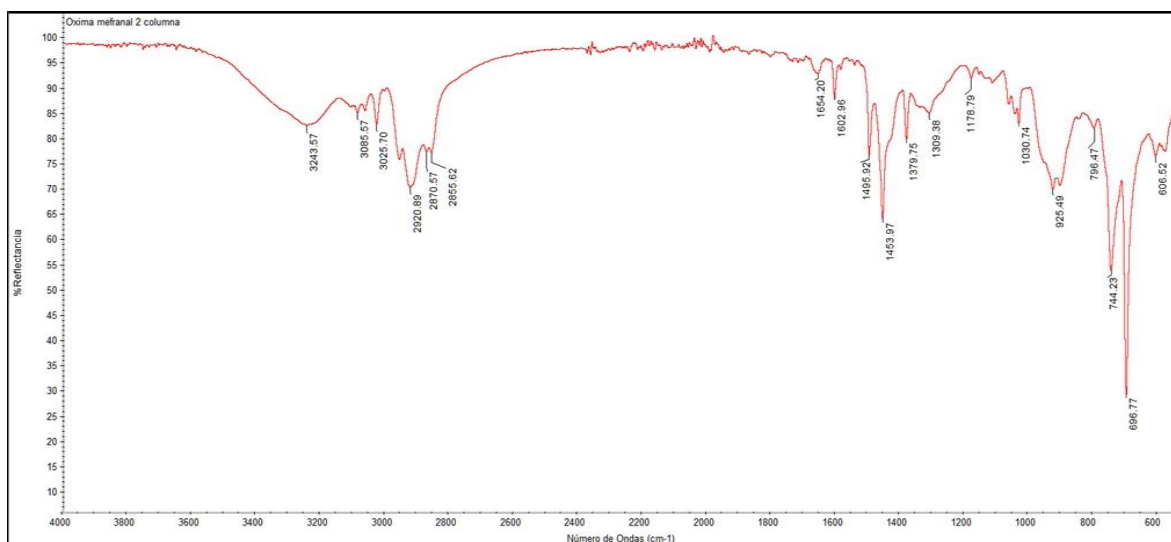
Espectro de Infrarrojo (I): Mefranal® 1



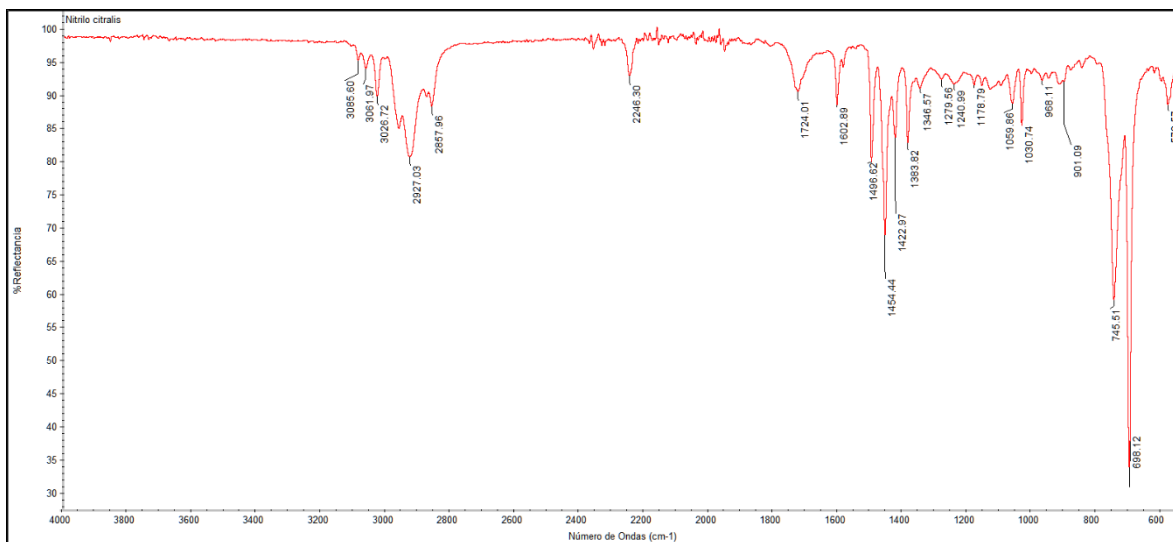
Espectro de Infrarrojo (II): Fenoxanol® 2



Espectro de Infrarrojo (III): Éster de Fenoxanol **3**

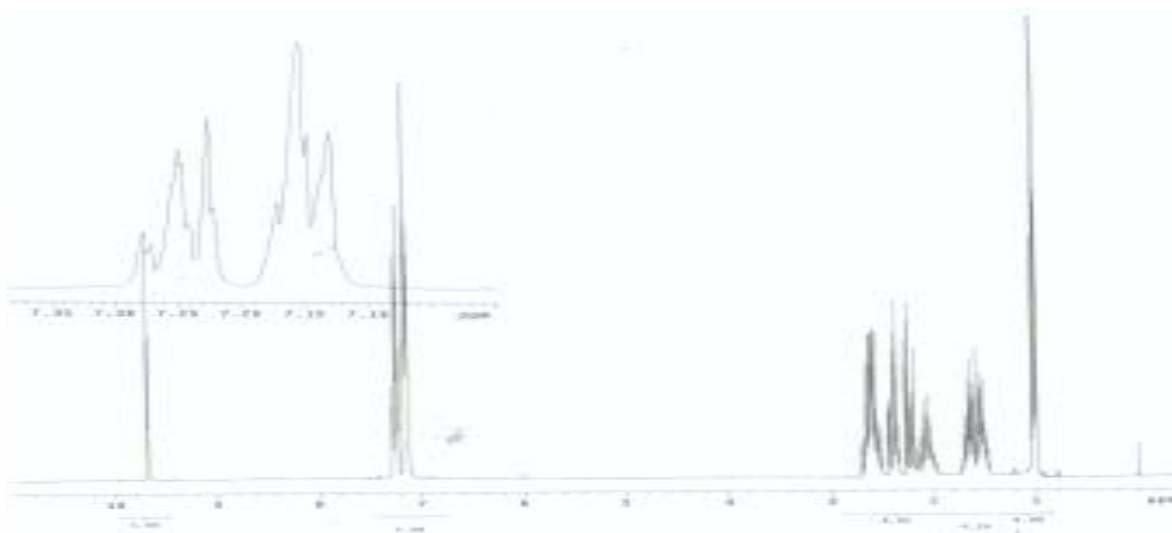


Espectro de Infrarrojo (IV): Oxima de Mefranal **4**

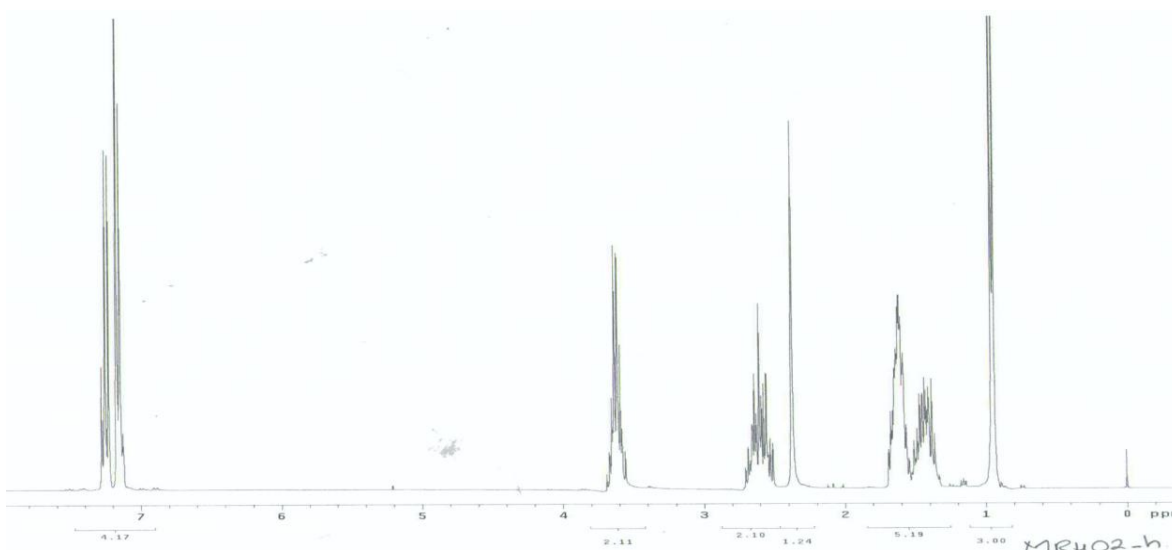


Espectro de Infrarrojo (IV): Nitrilo de Mefranal® 5

APENDICE (C) ESPECTROS DE DESPLAZAMIENTO QUÍMICO
(I-V) ^1H

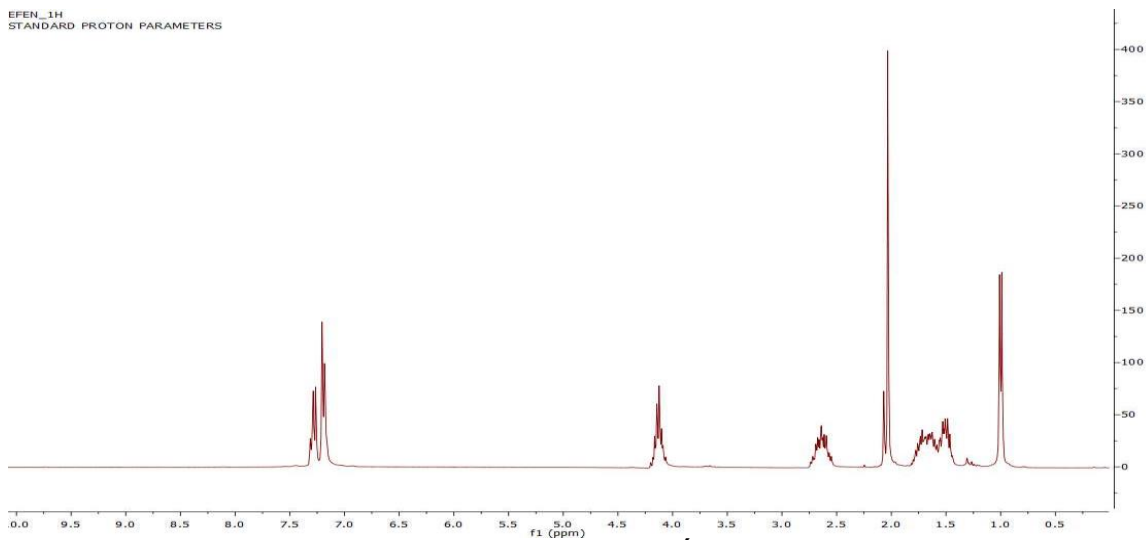


Espectro de Resonancia (I ^1H) Mefranal[®] 1



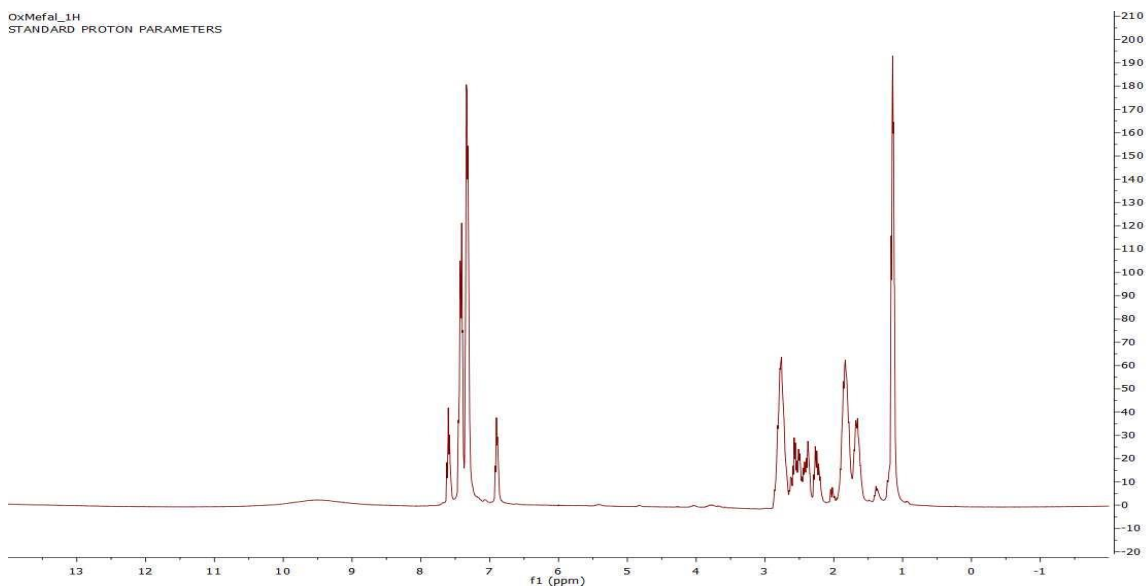
Espectro de Resonancia (II ^1H) Fenoxanol[®] 2

EFEN_1H
STANDARD PROTON PARAMETERS

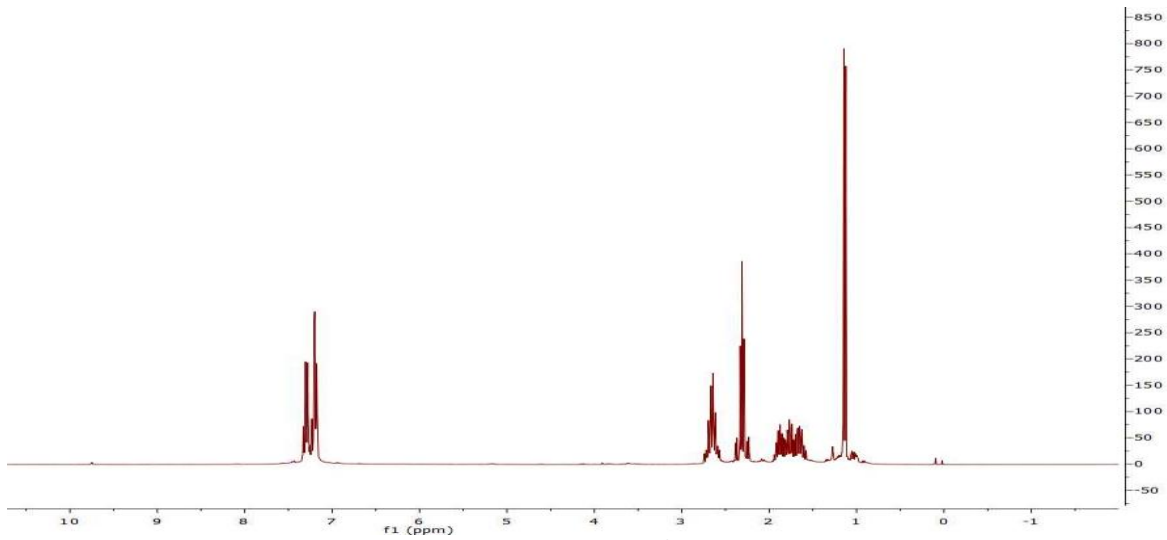


Espectro de Resonancia (III ^1H) Éster de Fenoxanol 3

OxMefal_1H
STANDARD PROTON PARAMETERS

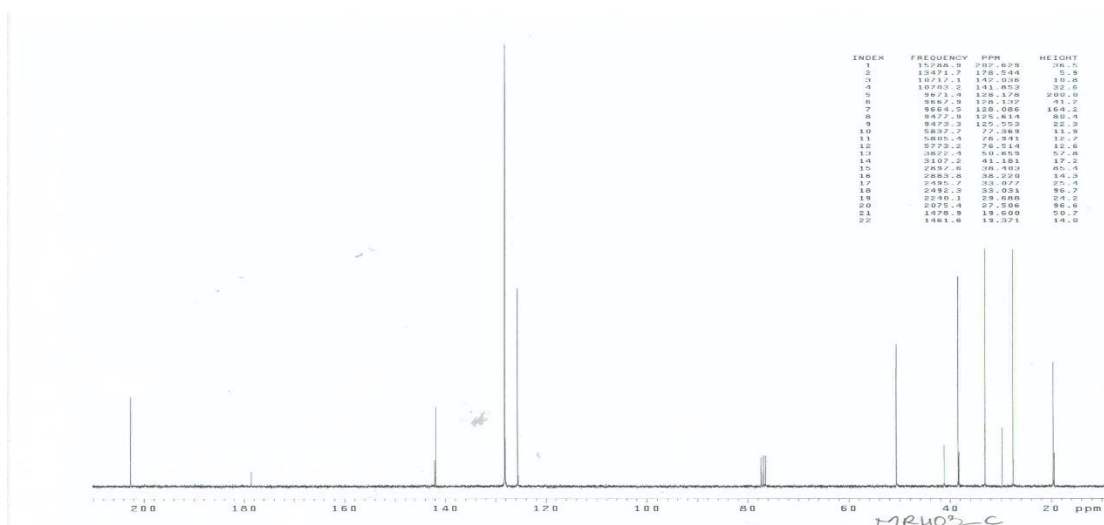


Espectro de Resonancia (IV ^1H) Oxima de Mefranal® 4

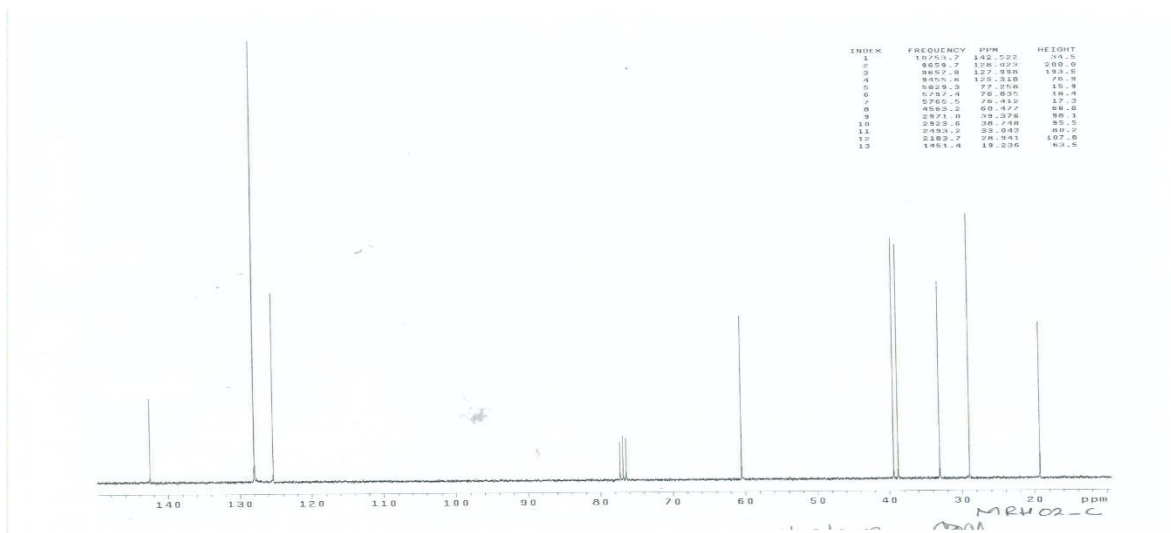


Espectro de Resonancia (V ^1H) Citralis Nitrilo 5

(I-V) ^{13}C

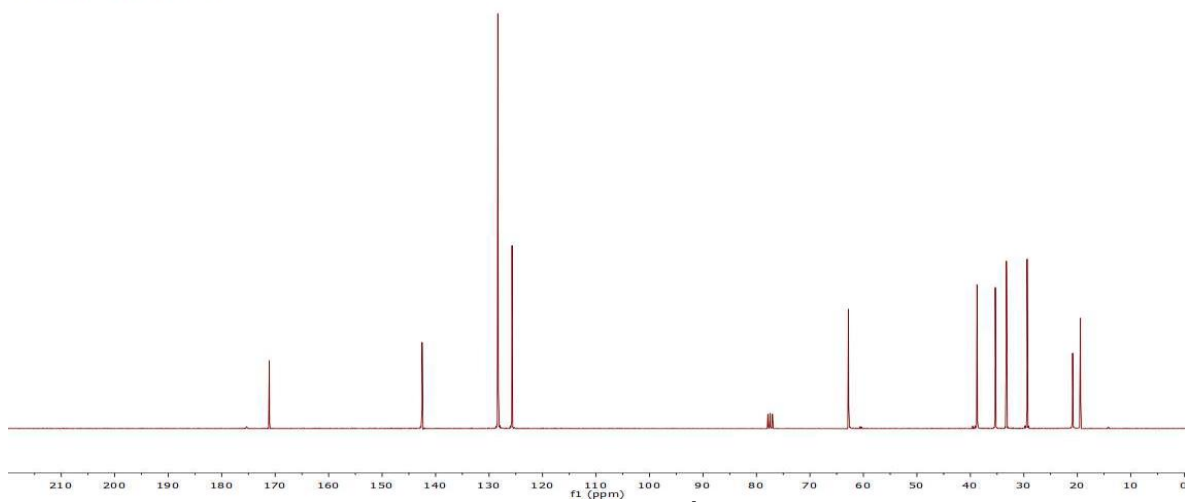


Espectro de Resonancia (I ^{13}C) Mefranal® 1



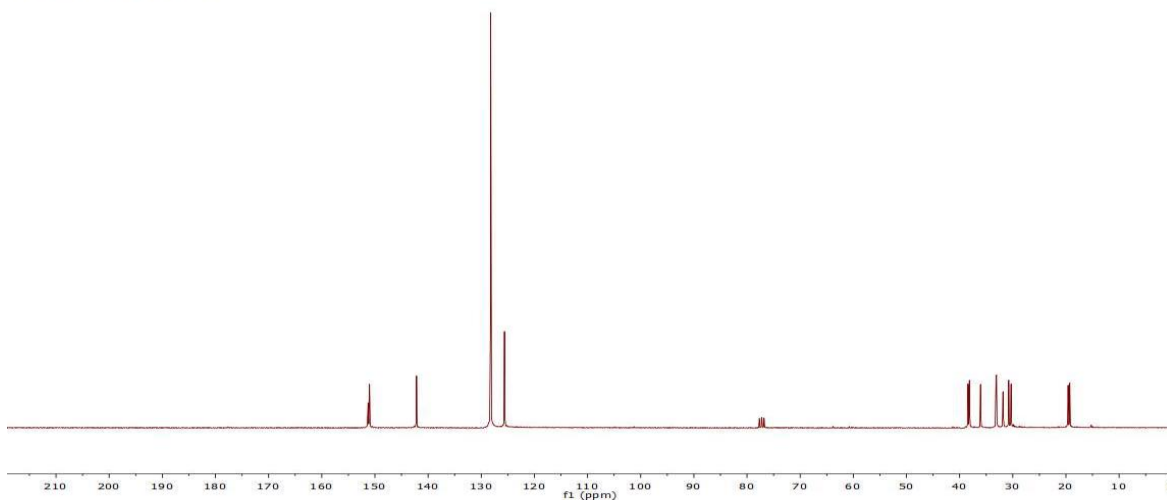
Espectro de Resonancia (II ^{13}C) Fenoxanol® 2

EFEN_13C
STANDARD CARBON PARAMETERS



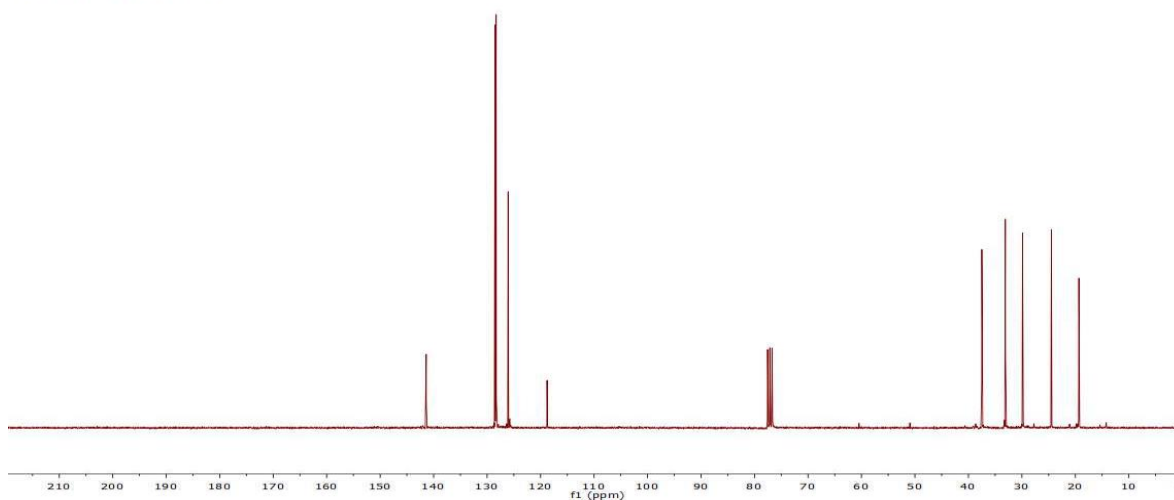
Espectro de Resonancia (III ^{13}C) Éster de Fenoxanol 3

OxMefal_13C
STANDARD CARBON PARAMETERS



Espectro de Resonancia (IV ¹³C) Oxima de Mefranal® 4

NICIL_13C
STANDARD CARBON PARAMETERS



Espectro de Resonancia (V ¹³C) Citralis Nitrilo® 5