



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

Programa de doctorado: Síntesis y Reactividad Química

Síntesis y reactividad de compuestos fluorados empleando biocatalizadores

Tesis Doctoral

Marina García Ramos

2021



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

Programa de doctorado: Síntesis y Reactividad Química

Síntesis y reactividad de compuestos fluorados empleando biocatalizadores

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Química
por Marina García Ramos**



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma Síntesis y reactividad de compuestos fluorados empleando biocatalizadores	Inglés: Synthesis and reactivity of fluorinated compounds using biocatalysts
2.- Autor	
Nombre: Marina García Ramos	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Síntesis y Reactividad Química	
Órgano responsable: Departamento de Química Orgánica e Inorgánica	

RESUMEN (en español)

Esta Tesis Doctoral se incluye dentro del campo de la Biocatálisis, una disciplina que apuesta por el uso de biocatalizadores en transformaciones de síntesis orgánica. En los últimos años, el uso de enzimas como catalizadores ha sido reconocido como una solución real a muchos de los retos que afronta la síntesis química, permitiendo el diseño y desarrollo de transformaciones químicas análogas a las reacciones orgánicas convencionales de un modo altamente eficiente, selectivo y sostenible.

El contenido de esta Tesis Doctoral se ha estructurado en una introducción general, seguida de cuatro capítulos en los cuales se muestra el potencial de distintos biocatalizadores aplicados a la síntesis de compuestos orgánicos fluorados de interés, especialmente cuando es necesaria la obtención de dichos compuestos en forma ópticamente activa.

En la Introducción se presentan de manera resumida los principios de la Química Verde y los conceptos generales de la Biocatálisis, mostrando los diferentes tipos de enzimas existentes y haciendo especial hincapié en los biocatalizadores empleados en este trabajo, las alcohol deshidrogenasas (ADHs) y las transaminasas (TAs). Asimismo, se describen los principales procesos asimétricos catalizados por los enzimas y que serán utilizados a lo largo de esta Tesis Doctoral. Por último, debido a la especial reactividad que presentan los compuestos fluorados con enzimas dependientes de piridoxal 5'-fosfato (PLP) y de dinucleótido de nicotinamina adenina (fosfato) [NAD(P)], se destaca la importancia del flúor en química médica, así como el concepto de promiscuidad catalítica, detallándose diversos ejemplos de interés.

En el Capítulo 1 se ha descrito la promiscuidad catalítica que muestran diferentes TAs en presencia de compuestos fluorados, en particular de β -fluoroaminas. De este modo, empleando las transaminasas de *Chromobacterium violaceum* y *Arthrobacter* sp., de estereopreferencia contraria, se ha llevado a cabo la resolución cinética de una serie de β -fluoroaminas racémicas a través de un proceso simultáneo de hidroxidesfluoración y desaminación. De este modo, se han obtenido los correspondientes derivados carbonílicos junto con las β -fluoroaminas remanentes enantiopuras. Esta transformación conlleva un proceso de inhibición enzimática, y se ha propuesto un mecanismo que diera cuenta tanto de la deshalogenación como de dicha acción inhibitoria.

En el Capítulo 2 se ha aprovechado la promiscuidad catalítica manifestada por las transaminasas en el capítulo anterior para desarrollar una metodología de hidroxidesfluoración de α -fluorocetonas en medio acuoso y en condiciones suaves de reacción. Para tal fin, se ha empleado la TA de *Chromobacterium violaceum*, en presencia de una cantidad estequiométrica de 2-propilamina o de alanina, obteniendo únicamente acetona o ácido pirúvico, amoniaco y fluoruro de hidrógeno como subproductos. De nuevo se ha propuesto un mecanismo que explicara la formación de los productos obtenidos.

En el Capítulo 3 se han sintetizado una serie de 2,2-difluoro-1-(hetero)ariletan-1-aminas primarias y secundarias en forma ópticamente activa, mediante el empleo de transaminasas o



aminasas reductivas (RedAms). Por un lado, se ha descrito la reactividad de las TAs en presencia de α,α -difluorocetonas, puesto que en este caso se observa la formación de las correspondientes aminas enantioenriquecidas en lugar de los correspondientes compuestos carbonílicos deshalogenados. Además, puesto que esta metodología se encuentra favorecida termodinámicamente, se han llevado a cabo dichas biotransformaciones empleando un pequeño exceso del donador de amina. Por otro lado, cuando se emplean RedAms en presencia de la 2,2-difluoroacetofenona y distintos donadores de amina, se ha observado una nueva actividad inesperada al obtenerse mezclas de la correspondiente β,β -difluoroamina y del β,β -difluoroalcohol, ambos en forma enantiopura.

Finalmente, en el Capítulo 4 se ha empleado una ADH proveniente de la levadura *Pichia glucozyma* (KRED1-Pglu) para la biorreducción de cetonas fluoradas en posición α , obteniendo una serie de fluorohidrinas, mono-, di-, o trihalogenadas en la posición β de manera estereoselectiva. Asimismo, ha sido posible la utilización de la ADH tanto en forma de preparación de células enteras liofilizadas sobreexpresando este enzima de manera heteróloga como en su forma purificada, mostrando este biocatalizador una gran versatilidad a la hora de llevar a cabo reducciones selectivas de este tipo de compuestos carbonílicos proquirales.

Algunos de estos resultados han sido publicados o enviados para su publicación en los siguientes artículos de investigación:

- "Catalytic promiscuity of transaminases: Preparation of enantioenriched β -fluoroamines by formal tandem hydrodefluorination/deamination". A. Cuetos, M. García-Ramos, E.-M. Fischereder, A. Díaz-Rodríguez, G. Grogan, V. Gotor, W. Kroutil, I. Lavandera, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 3144-3147.
- "Asymmetric synthesis of primary and secondary β -fluoro-arylamines using reductive aminases from fungi". D. González-Martínez, A. Cuetos, M. Sharma, M. García-Ramos, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, G. Grogan, *ChemCatChem* **2020**, 12, 2421-2425.
- "The reactivity of α -fluoroketones with PLP dependent enzymes: Transaminases as Hydrodefluorinases". M. García-Ramos, A. Cuetos, W. Kroutil, G. Grogan, I. Lavandera, *ChemCatChem* **2021**, doi: 10.1002/cctc.202100901.
- "Transaminases as suitable catalysts for the synthesis of enantiopure β,β -difluoroamines". M. García-Ramos, I. Lavandera, enviado para su publicación.

RESUMEN (en Inglés)

This Doctoral Thesis is included in the field of Biocatalysis, a discipline that establishes the use of biocatalysts applied to organic synthetic transformations. In the last years, the use of enzymes as catalysts has been recognized as a real solution to many of the challenges that chemical synthesis faces, allowing the design and development of analogous transformations to the conventional organic reactions in a highly efficient, selective and sustainable way.

This Doctoral Thesis has been divided in a general introduction, followed by four chapters in which the potential of different biocatalysts applied to the synthesis of fluorinated molecules is displayed, more specifically when these compounds are obtained in optically active form.

In the Preface, the main principles of Green Chemistry and general concepts of Biocatalysis concepts are introduced to the reader, defining the different classes of existing enzymes and with special interest in the biocatalysts used in this work, alcohol dehydrogenases (ADHs) and transaminases (TAs). In addition, the most important asymmetric processes catalyzed by enzymes, which will be developed in this Doctoral Thesis, are described. Finally, the importance of fluorine in medicinal chemistry and the concept of catalytic promiscuity are explained, due to the special reactivity that fluorinated compounds will show with pyridoxal 5'-phosphate (PLP) and nicotinic adenine dinucleotide (phosphate) [NAD(P)]-dependent enzymes, detailing some examples of interest.

In Chapter 1, the catalytic promiscuity displayed by different TAs in the presence of fluorinated



compounds, more precisely β -fluoroamines, is described. Thus, employing transaminases from *Chromobacterium violaceum* and *Arthrobacter* sp., with opposite stereopreference, it has been possible to perform the kinetic resolution of racemic β -fluoroamines through a tandem hydrodefluorination-deamination process. Thus, the corresponding carbonyl compounds have been obtained along with the remaining enantiopure β -fluoroamines. This transformation involves an inhibition process and it has been proposed a mechanism which explains both dehalogenation and this inhibitory effect.

In Chapter 2, taking advantage from the catalytic promiscuity exhibited by transaminases in Chapter 1, a hydrodefluorination methodology has been developed by employing α -fluoroketones in aqueous medium and mild reaction conditions in the presence of transaminase from *Chromobacterium violaceum*. With that purpose, a stoichiometric amount of 2-propylamine or alanine were employed since either acetone or pyruvic acid, ammonia and hydrogen fluoride are obtained as by-products. Once again, it has been proposed a mechanism to rationalize the obtained results and the formation of the resulting products.

In Chapter 3, a series of primary and secondary 1-(het)aryl-2,2-difluoroethan-1-amines has been synthesized in optically active form by employing transaminases or reductive aminases (RedAms). On one hand, the reactivity of TAs in the presence of α,α -difluoroketones has been described, since it is observed the formation of the corresponding enantioenriched amines instead of the corresponding dehalogenated carbonyl compounds. Moreover, since this methodology is thermodynamically favored, biotransformations are performed adding a slight excess of the amine donor into the reaction media. On the other hand, when RedAms are incubated in the presence of 2,2-difluoroacetophenone and different amine donors, a new unexpected reactivity has been observed due to the formation of β,β -difluoroamine and β,β -difluoroalcohol mixtures, both in enantiopure form.

Finally, in Chapter 4, an ADH from the yeast *Pichia glucozyma* (KRED1-Pglu) has been employed in the bioreduction of fluorinated ketones at α -position, obtaining a series of fluorohydrins, mono-, di- or trihalogenated at β position in a stereoselective way. The ADH has been used in both, a lyophilized whole cell preparation heterologously overexpressing the enzyme, but also in its purified form, demonstrating the versatility of this biocatalyst to perform selective reductions with this kind of prochiral carbonyl compounds.

Part of the results obtained along this PhD Thesis have been published or submitted for publication in the following scientific contributions:

- "Catalytic promiscuity of transaminases: Preparation of enantioenriched β -fluoroamines by formal tandem hydrodefluorination/deamination". A. Cuetos, M. García-Ramos, E.-M. Fischereder, A. Díaz-Rodríguez, G. Grogan, V. Gotor, W. Kroutil, I. Lavandera, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 3144-3147
- "Asymmetric synthesis of primary and secondary β -fluoro-arylamines using reductive aminases from fungi". D. González-Martínez, A. Cuetos, M. Sharma, M. García-Ramos, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, G. Grogan, *ChemCatChem* **2020**, 12, 2421-2425.
- "The reactivity of α -fluoroketones with PLP dependent enzymes: Transaminases as Hydrodefluorinases". M. García-Ramos, A. Cuetos, W. Kroutil, G. Grogan, I. Lavandera, *ChemCatChem* **2021**, doi: 10.1002/cctc.202100901.
- "Transaminases as suitable catalysts for the synthesis of enantiopure β,β -difluoroamines". M. García-Ramos, I. Lavandera, submitted for publication.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

2-PrOH	2-Propanol
2-PrNH₂	2-Propilamina
α	Rotación óptica específica
α-DFMO	α -Difluorometilornitina
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda
μL	Microlitro
ν	Frecuencia
Å	Ángstrom
AcOEt	Acetato de etilo
Ac₂O	Anhídrido acético
ADH	Alcohol deshidrogenasa
AdRedAm	Aminasa reductiva de <i>Ajellomyces dermatitidis</i>
ADH-A	Alcohol deshidrogenasa de <i>Rhodococcus ruber</i>
ADH-T	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermoanaerobacter</i> sp.
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
AlaDH	Alanina deshidrogenasa
API	Principio activo farmacéutico (<i>Active pharmaceutical ingredient</i>)
Ar	Aromático
Arg	Arginina
ArR-TA	Transaminasa de <i>Arthrobacter</i> sp. (<i>R</i>)-selectiva

ArRmut11-TA	Variante de la transaminasa de <i>Arthrobacter</i> sp. (obtenida tras 11 ciclos evolutivos)
ArS-TA	Transaminasa de <i>Arthrobacter citreus</i> (S)-selectiva
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
AspRedAm	Aminasa reductiva de <i>Aspergillus oryzae</i>
ATA	Amino transaminasa
AtRedAm	Aminasa reductiva de <i>Aspergillus terreus</i>
BmGDH	Glucosa deshidrogenasa de <i>Bacillus megaterium</i>
Bn	Bencilo
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
°C	Grado Celsius
c	Cuatriplete
c	Concentración
CAL-B	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo B
CG	Cromatografía de gases
CIP	Reglas de Cahn-Ingold-Prelog
cm	Centrímetro
CR	Carbonil reductasa
conv.	Conversión
CV-TA	Transaminasa de <i>Chromobacterium violaceum</i>
Cys	Cisteína (<i>Cysteine</i>)
d	Doblete

dc	Doble cuatriplete
dd	Doble doblete
ddd	Doble doblete de dobletes
ddt	Doble doblete de tripletes
DKR	Resolución cinética dinámica (<i>Dynamic kinetic resolution</i>)
dm	Decímetro
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimetilamino)piridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
e⁻	Electrón
EC	Comisión enzimática (<i>Enzyme Comission</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ed</i>	Exceso diastereómerico
<i>ee</i>	Exceso enantiomérico
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
equiv.	Equivalente
ESI	Ionización por electrospray (<i>Electrospay ionization mode</i>)
Et	Etilo
EtOH	Etanol
FDH	Formiato deshidrogenasa
FID	Detector de ionización de llama (<i>Flame ionization detector</i>)
g	Gramo
<i>g</i>	Fuerza g (gravedad)

G6P	Glucosa-6-fosfato (<i>Glucose-6-phosphate</i>)
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GABA-AT	Ácido γ -aminobutírico aminotransferasa (<i>γ-Aminobutyric acid amino transferase</i>)
GDH	Glucosa deshidrogenasa
Glu	Glutamato
GP	Grupo protector
h	Hora
HDF	Hidrodesfluoración
HHDH	Halohidrina deshalogenasa
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High performance liquid chromatography</i>)
Hz	Hertzio
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
IR	Espectrometría infrarroja
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kDa	Kilodalton
KR	Resolución cinética (<i>Kinetic resolution</i>)
KRED	Cetorreductasa (<i>Ketoreductase</i>)
KRED1-Pglu	Alcohol deshidrogenasa de <i>Pichia glucozyma</i>
L	Litro
LB	Medio Luria Broth
LB-ADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus brevis</i>

LDH	Lactato deshidrogenasa
Leu	Leucina
Lys	Lisina (<i>Lysine</i>)
M	Molar
m	Multiplete
<i>m</i>	<i>meta</i>
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertzio
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MS	Tamiz molecular (<i>Molecular sieves</i>)
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamina adenina en su forma oxidada
NADH	Dinucleótido de nicotinamina adenina en su forma reducida
NADP⁺	Dinucleótido de nicotinamina adenina fosfato en su forma oxidada

Abreviaturas y Acrónimos

NADPH	Dinucleótido de nicotinamina adenina fosfato en su forma reducida
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimida
n.d.	No determinado
NfisRedAm	Aminasa reductiva de <i>Neosartorya fischeri</i>
NfRedAm	Aminasa reductiva de <i>Neosartorya fumigatus</i>
nm	Nanómetro
<i>o</i>	<i>orto</i>
ODC	Ornitina descarboxilasa
<i>p</i>	<i>para</i>
PDC	Piruvato descarboxilasa
Ph	Fenilo (<i>Phenyl</i>)
Phe	Fenilalanina (<i>Phenylalanine</i>)
PLP	Piridoxal-5'-fosfato (<i>Pyridoxal-5'-phosphate</i>)
PMP	Piridoxamina-5'-fosfato (<i>Pyridoxamine-5'-phosphate</i>)
ppm	Partes por millón
p/v	Relación peso/volumen
<i>rac</i>	<i>Racémico</i>
RasADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Ralstonia</i> sp
RedAm	Aminasa reductiva (<i>Reductive aminase</i>)
<i>R_f</i>	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto

rto.	Rendimiento
s	Singulete
SAM	S-Adenosil-L-metionina
Ser	Serina
S_N1	Sustitución nucleófila unimolecular
S_N2	Sustitución nucleófila bimolecular
sp.	Species
SyADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Sphingobium yanoikuyae</i>
t	Triplete
T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente
TA	Transaminasa
TB	<i>Terrific broth</i>
TBME	<i>tert</i> -Butil metil éter
td	Triple doblete
tdd	Triple doblete de dobletes
TeSADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía de capa fina (<i>Thin layer chromatography</i>)
Tris-HCl	Disolución reguladora de tris(hidroximetil)aminometano
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina (<i>Tyrosine</i>)

Abreviaturas y Acrónimos

uma	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta
v/v	Relación de volúmenes

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
0.1. QUÍMICA VERDE Y BIOCATÁLISIS	3
0.2. LOS BIOCATALIZADORES EN SÍNTESIS ORGÁNICA	5
0.2.1. Los enzimas como catalizadores	5
0.2.2. Clasificación enzimática	7
0.2.2.1. Alcohol deshidrogenasas.....	8
0.2.2.2. Transaminasas.....	12
0.2.3. Procesos asimétricos catalizados por enzimas	18
0.2.3.1. Asimetrización: Compuestos proquirales.....	18
0.2.3.2. Resolución cinética (KR, 'Kinetic Resolution').....	19
0.3. PROMISCUIDAD CATALÍTICA.....	21
0.4. IMPORTANCIA DEL FLÚOR	26
 OBJETIVOS GENERALES	 31
 CAPÍTULO 1. Síntesis biocatalítica de β-fluoroaminas ópticamente activas mediante resoluciones cinéticas por hidrodesfluoración y desaminación	 35
1.1. ANTECEDENTES	37
1.1.1. IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS FLUORADOS	40
1.1.1.1. β -Fluoroaminas biológicamente activas.....	42
1.1.2. AMINAS FLUORADAS COMO INHIBIDORES DE TRANSAMINASAS.....	43
1.1.3. EMPLEO DE TRANSAMINASAS CON COMPUESTOS FLUORADOS	47
1.1.4. METODOLOGÍAS QUÍMICAS PARA OBTENER β -FLUOROAMINAS ÓPTICAMENTE ACTIVAS.....	50
1.1.4.1. Monofluoraciones químicas	50
1.1.4.2. Reacciones catalíticas.....	52
1.1.4.3. Biotransformaciones.....	54
1.2. OBJETIVOS	57

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
1.3.1. PRUEBAS ENZIMÁTICAS DE ASIMETRIZACIÓN.....	63
1.3.1.1. Reacción de la 2-fluoroacetofenona (2a) en presencia de TAs comerciales empleando 2-propilamina como donador de amina	63
1.3.1.2. Influencia del donador de amina en la transaminación de 2a	64
1.3.1.3. Estudio del efecto inhibitorio de 2a sobre la transaminación enzimática del acetoacetato de etilo (5).....	65
1.3.1.3.1. Reacción de transaminación del acetoacetato de etilo	66
1.3.1.3.2. Reacción de transaminación de 5 en presencia de 2a	67
1.3.1.4. Mecanismo propuesto	69
1.3.2. PRUEBAS ENZIMÁTICAS DE RESOLUCIÓN CINÉTICA.....	70
1.3.2.1. Reacción de 1a con TAs. Comparación con otros biocatalizadores	71
1.3.2.2. Resolución cinética de 1a con transaminasas sobreexpresadas en <i>E. coli</i> ...	72
1.3.2.3. Mecanismo propuesto	73
1.3.2.4. Síntesis de las 1-aril-2-fluoroetan-1-aminas racémicas de partida.....	74
1.3.2.5. Resoluciones cinéticas de las 1-aril-2-fluoroetan-1-aminas utilizando TAs sobreexpresadas en <i>E. coli</i>	75
1.3.2.6. Estudios estructurales. Prueba del mecanismo propuesto	76
1.4. CONCLUSIONES	79
1.5. PARTE EXPERIMENTAL.....	83
1.5.1. GENERAL	85
1.5.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS	86
1.5.2.1. Cromatografía en gel de sílice.....	86
1.5.2.2. Resonancia magnética nuclear (RMN).....	86
1.5.2.3. Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR).....	86
1.5.2.4. Espectrometría infrarroja (IR)	86
1.5.2.5. Puntos de fusión	87
1.5.2.6. Rotación óptica específica.....	87
1.5.2.7. Cromatografía de gases (CG).....	87

1.5.2.8. Difracción de Rayos X	88
1.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS NO ENZIMÁTICOS	88
1.5.3.1. Síntesis química de las 1-aril-2-fluoroetan-1-onas 2a-f	88
1.5.3.2. Síntesis química de las 1-aril-2-fluoroetan-1-aminas racémicas 1b, 1c, 1e y 1f	89
1.5.4. PROCEDIMIENTOS ENZIMÁTICOS	89
1.5.4.1. Reacción de la 1-fenil-2-fluoroetan-1-ona (2a) con transaminasas	89
1.5.4.2. Transformación enantioselectiva de las 1-aril-2-fluoroetan-1-aminas 1a-f usando transaminasas	90
1.5.4.3. Transformación enantioselectiva de las aminas 1a y 1d en escala semipreparativa	90
1.5.4.4. Asignación de la configuración absoluta de las aminas enantioenriquecidas	91
1.5.4.5. Cristalización de la ArRmut11-TA con la amina 1d	91
1.5.4.5.1. Purificación de la ArRmut11-TA	91
1.5.4.5.2. Síntesis de la ArRmut11-TA inhibida	92
1.5.4.5.3. Cristalización de la proteína	92
1.5.4.5.4. Recogida de datos, resolución de la estructura, construcción del modelo y refinamiento de la ArRmut11-TA	93
1.5.5. DATOS EXPERIMENTALES	95

CAPÍTULO 2. Reactividad de α -fluorocetonas con enzimas dependientes de PLP:

Transaminasas como hidrolesfluorosas

2.1. ANTECEDENTES	105
2.1.1. COMPUESTOS HALOGENADOS EN EL MEDIO NATURAL	107
2.1.2. PROCESOS DE DESHALOGENACIÓN ENZIMÁTICA	108
2.1.3. REACCIÓN DE HIDRODESFLUORACIÓN	112
2.1.3.1. Reacción de HDF catalizada por metales de transición en fluoroarenos ...	113
2.1.3.2. Otras reacciones de HDF en fluoroarenos	117

2.1.3.3. Metodologías de HDF sobre enlaces C–F no aromáticos	118
2.2. OBJETIVOS	121
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	125
2.3.1. SÍNTESIS QUÍMICA DE SUSTRATOS DE PARTIDA Y POSIBLES PRODUCTOS DE REACCIÓN.....	127
2.3.1.1. Síntesis de las α -fluoroacetofenonas 2g-i	127
2.3.1.2. Síntesis de la α -fluoropropiofenona (2j)	128
2.3.1.3. Síntesis química de las 1-ariletan-1-aminas 4e-g,i	128
2.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE HIDRODESFLUORACIÓN	129
2.3.2.1. Reacción de la 2-fluoroacetofenona (2a) en presencia de las TAs sobreexpresadas en <i>E. coli</i>	129
2.3.2.2. Efecto del cofactor en la reacción de hidrolesfluoración sobre 2a y 2d	130
2.3.2.3. Influencia de la concentración de la amina en la reacción de hidrolesfluoración.....	131
2.3.3. MECANISMO DE HIDRODESFLUORACIÓN E INHIBICIÓN CON LAS α -FLUOROCETONAS	132
2.3.4. REACCIÓN DE HIDRODESFLUORACIÓN SOBRE LAS α -FLUOROCETONAS 2a-i	134
2.3.5. HIDRODESCLORACIÓN ENZIMÁTICA DE LA α -CLOROACETOFENONA (8).....	136
2.3.6. HIDRODESFLUORACIÓN REGIOSELECTIVA DE LA 2-FLUORO-1-(4- FLUOROFENIL)ETAN-1-ONA (2b) CATALIZADA POR Pt/C	138
2.3.7. HIDRODESFLUORACIÓN ENZIMÁTICA ENANTIOSELECTIVA DE LA α -FLUOROPROPIOFENONA (2j)	139
2.4. CONCLUSIONES	145
2.5. PARTE EXPERIMENTAL	149
2.5.1. GENERAL	151
2.5.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS	151
2.5.2.1. Cromatografía de gases (CG).....	151
2.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS NO ENZIMÁTICOS.....	153

2.5.3.1. Síntesis química de las 1-aril-2-bromoetan-1-onas 7g-i	153
2.5.3.2. Síntesis química de las 1-aril-2-fluoroetan-1-onas 2g-i	153
2.5.3.3. Procedimiento experimental para la síntesis de la 2-fluoropropiofenona (2j)	154
2.5.3.3.1. Síntesis química del intermedio vinilazida 11j	154
2.5.3.3.2. Síntesis química de la 2-fluoropropiofenona.....	154
2.5.3.4. Síntesis química de las 1-ariletan-1-aminas 4e-g,i	155
2.5.3.5. Procedimiento para la hidrogenofluoración de la 2-fluoro-1-(4- fluorofenil)etan-1-ona (2b) catalizada por Pt/C	155
2.5.4. PROCEDIMIENTOS ENZIMÁTICOS	156
2.5.4.1. Reacción de la 2-fluoroacetofenona (2a) en presencia de las transaminasas sobreexpresadas en <i>E. coli</i>	156
2.5.4.2. Reacción de hidrogenofluoración de las α -fluorocetonas 2a y 2d en ausencia de amina	156
2.5.4.3. Reacción de hidrogenofluoración de las α -fluorocetonas 2a y 2d empleando distintas concentraciones de amina.....	156
2.5.4.4. Reacción de hidrogenofluoración de las α -fluorocetonas 2a-i empleando una concentración equimolar de una amina	157
2.5.4.5. Reacción de hidrogenofluoración de las α -fluorocetonas 2a-i empleando una amina con una concentración de 100 mM	157
2.5.4.6. Reacción de hidrogenodescloración de la α -cloroacetofenona (8)	158
2.5.4.7. Reacción de hidrogenofluoración enantioselectiva de la 1-fenil-2- fluoropropan-1-ona (2j).....	158
2.5.4.8. Reacción de hidrogenofluoración de las cetonas 2b y 2h a escala semipreparativa	158
2.5.5. DATOS EXPERIMENTALES.....	160

CAPÍTULO 3. Síntesis de β,β -difluoroaminas ópticamente activas mediante el empleo de transaminasas y aminosas reductivas

3.1. ANTECEDENTES	167
-------------------------	-----

3.1.1. COMPUESTOS DE INTERÉS CONTENIENDO LA UNIDAD CF ₂	169
3.1.2. COMPUESTOS NITROGENADOS β,β-DIFLUORADOS COMO INHIBIDORES DE ENZIMAS DEPENDIENTES DE PLP	170
3.1.3. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE β,β-DIFLUOROAMINAS ÓPTICAMENTE ACTIVAS.....	172
3.1.4. PROCESOS DE BIORREDUCCIÓN CON SUSTRATOS HALOGENADOS FAVORECIDOS TERMODINÁMICAMENTE	175
3.1.5. PROCESOS DE TRANSAMINACIÓN FAVORECIDOS TERMODINÁMICAMENTE	177
3.1.6. IMINO REDUCTASAS (IREDs) Y AMINASAS REDUCTIVAS (RedAms).....	178
3.2. OBJETIVOS.....	183
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	187
3.3.1. OBTENCIÓN DE AMINAS DIFLUORADAS ÓPTICAMENTE ACTIVAS EMPLEANDO TRANSAMINASAS	189
3.3.1.1. Optimización de la reacción con la 2,2-difluoroacetofenona (12a)	189
3.3.1.2. Síntesis de las 2,2-difluoro-1-(hetero)ariletan-1-onas de partida	192
3.3.1.3. Síntesis de las 2,2-difluoro-1-(hetero)ariletan-1-aminas racémicas	193
3.3.1.4. Aminaciones de las 2,2-difluoro-1-(hetero)ariletan-1-onas utilizando TAs sobreexpresadas en <i>E. coli</i>	194
3.3.1.5. Aminaciones de las 2,2-difluoro-1-(hetero)ariletan-1-onas utilizando TAs comerciales (S)-selectivas	196
3.3.2. OBTENCIÓN DE AMINAS DIFLUORADAS ÓPTICAMENTE ACTIVAS EMPLEANDO RedAms PROVENIENTES DE HONGOS.....	198
3.3.2.1. Síntesis de los productos	198
3.3.2.1.1. Síntesis del derivado racémico <i>N</i> -metilado 15	198
3.3.2.1.2. Síntesis de la amina racémica <i>N</i> -alilada 16	199
3.3.2.2. Aminación reductiva de la α,α-difluorocetona 12a catalizada por RedAms.....	199
3.3.2.3. Influencia del número de átomos de flúor en la posición α de la cetona en el proceso biocatalítico de aminación reductiva.....	201

3.4. CONCLUSIONES	205
3.5. PARTE EXPERIMENTAL	209
3.5.1. GENERAL	211
3.5.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS	212
3.5.2.1. Cromatografía de gases (CG)	212
3.5.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	214
3.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS NO ENZIMÁTICOS	214
3.5.3.1. Síntesis química de las 2,2-difluoro-1-(hetero)ariletan-1-onas 12b-d,f,h,k-m	214
3.5.3.1.1. Preparación de las 1-trifluorometil-1,3-dicetonas intermedias	214
3.5.3.1.2. Proceso concurrente de fluoración/fragmentación	214
3.5.3.2. Síntesis química de las 2,2-difluoro-1-(hetero)ariletan-1-aminas racémicas 13a-d,f,h,k-m	215
3.5.3.3. Síntesis química de la amina racémica N-metilada 15	215
3.5.3.4. Síntesis química de la amina racémica N-alilada 16	216
3.5.3.5. Síntesis química del alcohol racémico 14a	217
3.5.4. PROCEDIMIENTOS ENZIMÁTICOS	217
3.5.4.1. Procedimiento general para la biotransaminación de la cetona 12a empleando transaminasas sobreexpresadas en <i>E. coli</i> y 2-propilamina a diferentes concentraciones	217
3.5.4.2. Procedimiento general para la transaminación de las cetonas 12b-d,f,h,k-m	218
3.5.4.3. Biotransaminación de las 2,2-difluoroetan-1-onas 12b-d,f,h,k-m a escala semipreparativa	218
3.5.4.4. Biotransaminación de las cetonas 12a y 12f a escala semipreparativa	219
3.5.4.5. Asignación de la configuración absoluta de las aminas enantioenriquecidas	220

3.5.4.6. Procedimiento general para la aminación reductiva de cetonas empleando RedAms.....	220
3.5.5. DATOS EXPERIMENTALES.....	221
CAPÍTULO 4. Obtención estereoselectiva de fluorohidrinas con una ADH proveniente de <i>Pichia glucozyma</i>	237
4.1. ANTECEDENTES	239
4.1.1. RELEVANCIA DE LAS FLUOROHIDRINAS.....	241
4.1.2. SÍNTESIS DE FLUOROHIDRINAS ÓPTICAMENTE ACTIVAS	242
4.1.2.1. Metodologías químicas no enzimáticas.....	242
4.1.2.2. Biotransformaciones.....	243
4.1.3. ALCOHOL DESHIDROGENASA DE <i>PICHIA GLUCOZYMA</i>	247
4.1.3.1. Células enteras.....	247
4.1.3.2. KRED1-Pglu recombinante.....	250
4.2. OBJETIVOS.....	255
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	259
4.3.1. SÍNTESIS QUÍMICA DE LAS FLUOROCETONAS	261
4.3.1.1. Síntesis de la 1-(2-clorofenil)-2-fluoroetan-1-ona (2n).....	261
4.3.1.2. Síntesis de la 1-fluorododecan-2-ona (2o)	262
4.3.2. SÍNTESIS DE LAS HALOHIDRINAS RACÉMICAS.....	263
4.3.3. ESTUDIOS INICIALES DE LA BIORREDUCCIÓN DE α -HALOCETONAS CON <i>E. COLI</i> /KRED1-Pglu	264
4.3.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO.....	266
4.3.5. EXTENSIÓN DE LA BIORREDUCCIÓN DE α -HALOCETONAS EMPLEANDO <i>E. COLI</i> /KRED1-Pglu	268
4.3.6. BIORREDUCCIÓN DE LAS CETONAS HALOGENADAS CON LAS CÉLULAS LIOFILIZADAS DE <i>E. COLI</i>	270
4.3.7. BIORREDUCCIÓN DE CETONAS HALOGENADAS EMPLEANDO LA KRED1-Pglu PURIFICADA.....	271

4.3.8. CRIBADO DE ADHS CON LA 1-FLUORODODECAN-2-ONA (2o).....	273
4.4. CONCLUSIONES	275
4.5. PARTE EXPERIMENTAL	279
4.5.1. GENERAL	281
4.5.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS	282
4.5.2.1. Cromatografía de gases (CG).....	282
4.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS NO ENZIMÁTICOS.....	283
4.5.3.1. Procedimiento para la síntesis de la 1-(2-clorofenil)-2-fluoroetan-1-ona (2n).....	283
4.5.3.1.1. Síntesis química de la 2-bromo-1-(2-clorofenil)etan-1-ona (7n).....	283
4.5.3.1.2. Síntesis química de 2n	284
4.5.3.2. Procedimiento para la síntesis de la 1-fluorododecan-2-ona (2o)	284
4.5.3.2.1. Síntesis química del intermedio 2-azidododec-1-eno (11o)	284
4.5.3.2.2. Síntesis química de 2o	285
4.5.3.3. Síntesis química de los alcoholes halogenados 14m , 18a-i , 18n , 18o , 19 y 21	285
4.5.4. PROCEDIMIENTOS ENZIMÁTICOS	286
4.5.4.1. Procedimiento general para la biorreducción de las cetonas halogenadas empleando células liofilizadas de <i>E. coli</i> /KRED1-Pglu.....	286
4.5.4.1.1. Procedimiento general para la biorreducción de 2a-i , 2n , 2o , 8 y 20	286
4.5.4.1.2. Procedimiento para la biorreducción de la cetona 12a	286
4.5.4.2. Procedimiento general para la biorreducción de las cetonas halogenadas empleando las células liofilizadas de <i>E. coli</i> BL21 DE3 Star	287
4.5.4.2.1. Procedimiento general para la biorreducción de 2a-i , 2n , 2o , 8 y 20	287
4.5.4.2.2. Procedimiento general para la biorreducción de 12a y 12m	287
4.5.4.3. Procedimiento general para la biorreducción de las cetonas halogenadas empleando la KRED1-Pglu purificada.....	288

4.5.4.3.1. Procedimiento general para la biorreducción de 2a-i , 2n , 2o , 8 y 20	288
4.5.4.3.2. Procedimiento general para la biorreducción de 12a y 12m	288
4.5.4.4. Biorreducción de la cetona 2e a escala semipreparativa empleando la <i>E. coli</i> /KRED1-Pglu.....	289
4.5.4.5. Procedimientos para el cribado de ADHs con la 1-fluorododecan-2-ona (2o)	289
4.5.4.5.1. Biorreducción con la <i>E. coli</i> /RasADH	289
4.5.4.5.2. Biorreducción con la <i>evo</i> -1.1.200	290
4.5.4.5.3. Biorreducción con la <i>E. coli</i> /SyADH, <i>E. coli</i> /TeSADH y <i>E. coli</i> /ADH-T.....	290
4.5.4.5.4. Biorreducción con la <i>E. coli</i> /LB-ADH	290
4.5.4.5.5. Biorreducción con la <i>E. coli</i> /ADH-A.....	291
4.5.5. DATOS EXPERIMENTALES.....	292
CONCLUSIONES GENERALES	301
REFERENCIAS CRUZADAS	305

INTRODUCCIÓN

0.1. QUÍMICA VERDE Y BIOCATÁLISIS

La dependencia de la humanidad de fuentes de energía no renovables como el petróleo, así como los posibles efectos nocivos sobre la salud y el medioambiente derivados del cambio climático han provocado una inquietud en aumento desde mediados de los años 80. La gran cantidad de residuos generados por la industria alertó a la comunidad científica, que decidió, en la medida de lo posible, comenzar a utilizar fuentes renovables, disminuir las cantidades de residuos generadas y evitar el uso de reactivos y disolventes nocivos. En el campo de la química, este conjunto de medidas dio lugar al concepto de *Química Verde* a principios de los años 90, y tiene como principal objetivo evitar el uso de agentes contaminantes en lugar de emplear estrategias de remediación de residuos.¹ Este término adquirió especial relevancia con la publicación en 1998 por Anastas y Warner de los 12 principios de la Química Verde (Tabla 0.1)² que todo proceso químico sostenible debe cumplir de la manera más aproximada posible.

Tabla 0.1. Principios de la Química Verde o Química Sostenible.

<u>Principios de la Química Verde</u>	
1.	<i>Prevención de residuos</i>
2.	<i>Utilización de materias primas renovables</i>
3.	<i>Omisión de etapas de derivatización</i>
4.	<i>Productos biodegradables</i>
5.	<i>Uso de métodos sintéticos seguros</i>
6.	<i>Uso de catalizadores</i>
7.	<i>Uso de condiciones suaves de reacción</i>
8.	<i>Monitorización de los procesos en tiempo real</i>
9.	<i>Uso de pocas sustancias auxiliares</i>
10.	<i>Economía atómica</i>
11.	<i>Diseño de productos con baja toxicidad</i>
12.	<i>Procesos seguros</i>

En relación con los puntos anteriores, la catálisis ofrece toda una serie de ventajas entre las que se encuentran, entre otras, el hecho de evitar el uso de reactivos en

¹ R. A. Sheldon, J. M. Woodley, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801-838.

² (a) H. C. Erythropel, J. B. Zimmerman, T. M. de Winter, L. Petitjean, F. Melnikov, C. H. Lam, A. W. Lounsbury, K. E. Mellor, N. Z. Janković, Q. Tu, L. N. Pincus, M. M. Falinski, W. Shi, P. Coish, D. L. Plata, P. T. Anastas, *Green Chem.* **2018**, *20*, 1929-1961; (b) P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, Nueva York (EE. UU.), **1998**, p. 30.

cantidades estequiométricas, así como aumentar la selectividad de las reacciones y su eficiencia energética. En este sentido, la mayoría de los procesos químicos actuales (85-90%) utilizan al menos un paso catalítico.³ Dentro del amplio campo de investigación de la catálisis, cabe remarcar el reciente auge y consolidación de la Biocatálisis como herramienta sintética,⁴ una disciplina que hace referencia al uso de enzimas o microorganismos como catalizadores en transformaciones químicas. Esta rama de la química adquiere gran madurez a partir de finales del siglo XX, aunque hay que resaltar que la humanidad lleva aprovechando diferentes biotransformaciones desde la antigüedad, ya que nuestros antepasados utilizaban microorganismos en la fabricación de, por ejemplo, queso y cerveza.

Así, no es hasta 1984 con el descubrimiento de Zaks y Klivanov, demostrando que los enzimas eran capaces de funcionar en medios orgánicos,⁵ cuando se produjo un primer punto de inflexión. En los últimos años, el uso de enzimas como catalizadores ha sido reconocido como una solución real a muchos de los retos que afronta la síntesis química, planteando el diseño y desarrollo de transformaciones análogas a las reacciones orgánicas convencionales pero de una manera más eficiente y sostenible.^{4,6} De este modo, cabe destacar la concesión del premio Nobel de Química a la profesora Frances H. Arnold en 2018, por el trabajo dirigido hacia la modificación de biocatalizadores con el fin de encontrar mejores valores de actividad o nuevas reactividades.⁷ En este sentido, el gran avance en las biotransformaciones no hubiese sido posible sin la colaboración entre las ciencias químicas y biológicas, como un buen ejemplo de relación sinérgica entre disciplinas, debido al descubrimiento y caracterización de biocatalizadores con sus secuencias de aminoácidos modificadas, lo

³ (a) T. Schaub, *Chem. Eur. J.* **2021**, 27, 1865-1869; (b) D. Rodríguez-Padrón, A. R. Puente-Santiago, A. M. Balu, M. J. Muñoz-Batista, R. Luque, *ChemCatChem* **2019**, 11, 18-38.

⁴ (a) *Biocatalysis for Practitioners: Techniques, Reactions and Applications*, Eds. G. De Gonzalo, I. Lavandera, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2021**; (b) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*, 7ª Ed., Springer Nature, Berlín (Alemania), **2018**; (c) *Science of Synthesis. Biocatalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Faber, W.-D. Fessner, N. J. Turner, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (Alemania), **2015**; (d) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2012**; (e) *Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*, Eds. W.-D. Fessner, T. Anthonsen, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**; (f) *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Eds. V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2008**.

⁵ (a) G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7072-7076; (b) A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 3192-3196.

⁶ (a) C. K. Winkler, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *ACS Cent. Sci.* **2021**, 7, 55-71; (b) M. M. C. H. van Schie, J.-D. Spörling, M. Bocola, P. Domínguez de María, D. Rother, *Green Chem.* **2021**, 23, 3191-3206; (c) B. Hauer, *ACS Catal.* **2020**, 10, 8418-8427; (d) D. L. Hughes, *Org. Process Res. Dev.* **2018**, 22, 1063-1080.

⁷ F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 14420-14426.

que ha resultado en una mejora exponencial de los resultados alcanzados para muy diversos procesos químicos.⁸

0.2. LOS BIOCATALIZADORES EN SÍNTESIS ORGÁNICA

0.2.1. Los enzimas como catalizadores

Los enzimas son los catalizadores encargados de la mayoría de las reacciones químicas en las células. Puesto que son naturales, y por ende biodegradables, llevan a cabo transformaciones orgánicas en condiciones suaves de reacción (pH, presión o temperatura) y en medio acuoso. Más concretamente son proteínas, y como tal, son polímeros naturales formados por combinaciones de 22 aminoácidos proteinogénicos. Sin embargo, sólo una ínfima parte de los mismos lleva a cabo funciones catalíticas, mientras los restantes poseen funciones estructurales o regulatorias.⁹ Estos se enlazan creando una disposición tridimensional en el interior de la proteína denominada centro activo, confiriendo así una de las características más importantes que definen a los biocatalizadores, su selectividad.^{4,10} Los enzimas son capaces de diferenciar entre dos grupos funcionales con similar reactividad, lo que se denomina *quimioselectividad*. También poseen la capacidad de distinguir entre varios grupos funcionales idénticos que se encuentren en distintas posiciones de una misma molécula, por lo que pueden actuar de forma *regioselectiva*. Por último, pueden actuar de un modo *estereoselectivo*, es decir, reconociendo y transformando preferentemente un estereoisómero frente a otro(s) de la misma molécula.

La importancia de la quiralidad en la química y la industria farmacéutica no debe ignorarse, puesto que los enantiómeros de un compuesto bioactivo provocan distintos efectos biológicos.¹¹ En este mismo contexto, el enantiómero con mejor actividad es denominado *eutómero*, mientras que su imagen especular, con actividad más baja, nula

⁸ (a) J. R. Marshall, J. Mangas-Sanchez, N. J. Turner, *Tetrahedron* **2021**, 82, 131926; (b) B. Wiltschi, T. Cernava, A. Dennig, M. Galindo Casas, M. Geier, S. Gruber, M. Haberbauer, P. Heidinger, E. Herrero Acero, R. Kratzer, C. Luley-Goedl, C. A. Muller, J. Pitzer, D. Ribitsch, M. Sauer, K. Schmolzer, W. Schnitzhofer, C. W. Sensen, J. Soh, K. Steiner, C. K. Winkler, M. Winkler, T. Wriessnegger, *Biotechnol. Adv.* **2020**, 40, 107520; (c) R. A. Sheldon, D. Brady, *ChemSusChem* **2019**, 12, 2859-2881; (d) R. A. Sheldon, D. Brady, *Chem. Commun.* **2018**, 54, 6088-6104.

⁹ R. A. Sheldon, D. Brady, M. L. Bode, *Chem. Sci.* **2020**, 11, 2587-2605.

¹⁰ R. Mu, Z. Wang, M. C. Wamsley, C. N. Duke, P. H. Lii, S. E. Epley, L. C. Todd, P. J. Roberts, *Catalysts* **2020**, 10, 832.

¹¹ (a) A. Ballard, S. Narduolo, H. O. Ahmed, N. I. Keimer, N. Asaad, D. A. Crosgrave, N. J. Buurma, A. G. Leach, *Chem. Eur. J.* **2020**, 26, 3661-3687; (b) E. Thall, *J. Chem. Educ.* **1996**, 73, 481-484.

o indeseada recibe el nombre de *distómero*. Uno de los ejemplos más conocidos por los efectos trágicos del distómero fue el caso de la *Talidomida*. Comercializada como racemato en 1960, por aquel entonces no se conocían los efectos teratogénicos de su enantiómero *S*, mientras que el efecto sedante se atribuía principalmente al enantiómero *R*.^{4b,12}

A pesar de las ventajas mencionadas, aún existen algunas dificultades asociadas al empleo de enzimas debido a su baja estabilidad a pHs y temperaturas extremas (a excepción de algunos microorganismos extremófilos), o a su baja tolerancia en disolventes orgánicos. Son también susceptibles a sufrir cierta inhibición debido a altas concentraciones tanto de producto como de sustrato, así como a la presencia de otros reactivos presentes en el medio de reacción. Asimismo, la mayoría de los enzimas requieren cofactores para actuar correctamente, lo que encarece su uso. Sin embargo, se ha logrado minimizar la mayoría de estas limitaciones gracias a técnicas como la inmovilización enzimática, el desarrollo de sistemas eficientes de regeneración del cofactor, y nuevas herramientas de biología molecular como la evolución dirigida, el diseño racional, y estudios de metagenómica o ADN recombinante, entre otras.^{8,13}

Tradicionalmente, los biocatalizadores pueden utilizarse bien como células enteras o como enzimas aislados,^{4b} la elección depende de factores como el tipo de reacción a llevar a cabo y su escala, así como la necesidad de emplear uno o varios cofactores. El uso de células enteras tanto *en reposo* (una vez terminada la fase de crecimiento), como *en crecimiento* (fermentaciones) tiene la ventaja de no necesitar la adición externa de cofactores, puesto que la propia célula posee mecanismos de (re)generación de los mismos. Por contra, es más difícil controlar la formación de subproductos debido a la interferencia de otros enzimas con el sustrato/producto a estudiar. En el caso de los enzimas purificados, la proteína es aislada y purificada tras ruptura de las paredes celulares, siendo sus reacciones mucho más limpias y selectivas, aunque suelen requerir el suministro del cofactor, así como el acoplamiento de un sistema de regeneración del mismo.

¹² J. E. Ridings, *Methods Mol. Biol.* **2013**, 947, 575-586.

¹³ (a) E. L. Bell, W. Finnigan, S. P. France, A. P. Green, M. A. Hayes, L. J. Hepworth, S. L. Lovelock, H. Niikura, S. Osuna, E. Romero, K. S. Ryan, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *Nat. Rev. Methods Primers*, **2021**, 1, 46; (b) C. M. Heckmann, F. Paradisi, *ChemCatChem* **2020**, 12, 6082-6102; (c) G. Qu, A. Li, C. G. Acevedo-Rocha, Z. Sun, M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 13204-13231; (d) J. I. Ramsden, S. C. Cosgrove, N. J. Turner, *Chem. Sci.* **2020**, 11, 11104-11112; (e) B. A. Sandoval, T. K. Hyster, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2020**, 55, 45-51; (f) A. M. Foley, A. R. Maguire, *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, 3713-3734; (g) M. T. Reetz, *Chem. Rec.* **2016**, 16, 2449-2459.

Más recientemente ha aparecido una tercera opción que consiste en utilizar microorganismos recombinantes. En este caso se inserta un plásmido con la información genética del enzima de interés en un organismo huésped (normalmente *E. coli*), de manera que esta nueva cepa recombinante producirá el enzima deseado en gran cantidad (sobreexpresión). Todo ello da lugar a un nuevo biocatalizador donde predomina la actividad deseada del enzima nativo, pero que puede dar lugar a otras reacciones indeseadas debido a que este ya no se encuentra en su hábitat natural. Al utilizarse organismos huésped muy conocidos y de fácil accesibilidad, esta técnica es una metodología frecuente en ámbitos académicos e industriales.¹⁴ Para este tipo de preparaciones, además de las posibilidades mencionadas anteriormente, se puede utilizar el sobrenadante tras ruptura de las paredes celulares, es decir, el extracto de la célula.⁴

0.2.2. Clasificación enzimática

El descubrimiento e identificación de nuevos biocatalizadores durante los años 50 respaldó la necesidad de realizar una clasificación sistemática de los mismos. Con el propósito de una mejor descripción, la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) ha dividido a los enzimas en 7 grandes grupos, los 6 primeros divididos según la reacción que catalizan, y el último asociado a su responsabilidad en el desplazamiento de determinados iones o moléculas (Tabla 0.2).¹⁵ Cada enzima está descrito por un número de 4 dígitos precedido por las siglas EC del inglés *Enzyme Commission* (EC a.b.c.d), donde se indica: (a) el tipo de reacción, (b) el tipo de sustrato o molécula transferida, (c) la naturaleza del cosustrato, y (d) el número individual del enzima.^{4b}

¹⁴ G. Grogan, *Practical Biotransformations: A Beginner's Guide*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), 2009.

¹⁵ <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/>.

Tabla 0.2. Clasificación enzimática en función del tipo de (re)acción que promueven.

Clase de enzima	EC	Función
Oxidorreductasas	EC.1	Procesos de oxidación, reducción y oxigenación
Transferasas	EC.2	Transferencia de grupos acilo, amino, glucosilo, metilo y fosforilo
Hidrolasas	EC.3	Hidrólisis de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilos, anhídridos, glicósidos o haluros
Liasas	EC.4	Adición y eliminación de pequeñas moléculas en enlaces C=C, C=N o C=O
Isomerasas	EC.5	Isomerizaciones: reagrupamientos, epimerizaciones, racemizaciones o ciclaciones
Ligasas	EC.6	Formación y ruptura de enlaces C–O, C–S, C–N y C–C
Translocasas	EC.7	Promueven el movimiento de iones o moléculas a través de membranas

En esta Tesis Doctoral, se emplearán enzimas de los grupos EC.1 y EC.2. Más concretamente, alcohol deshidrogenasas y transaminasas pertenecientes, respectivamente, a las clases de las oxidorreductasas y transferasas. Por tanto, a continuación, se hará una descripción más detallada de las mismas.

0.2.2.1. Alcohol deshidrogenasas

Las alcohol deshidrogenasas (ADHs), también conocidas como carbonil reductasas (CRs) o cetorreductasas (KREDs, *ketoreductases*), son un tipo de oxidorreductasas que catalizan reversiblemente la reducción de cetonas o aldehídos a los correspondientes alcoholes. Para llevar a cabo este proceso necesitan de un cofactor derivado de nicotinamida (Figura 0.1) como fuente o aceptor de hidruro, bien como nicotinamida-adenina dinucleótido (NADH vs NAD⁺) o su análogo fosforilado (NADPH vs NADP⁺).

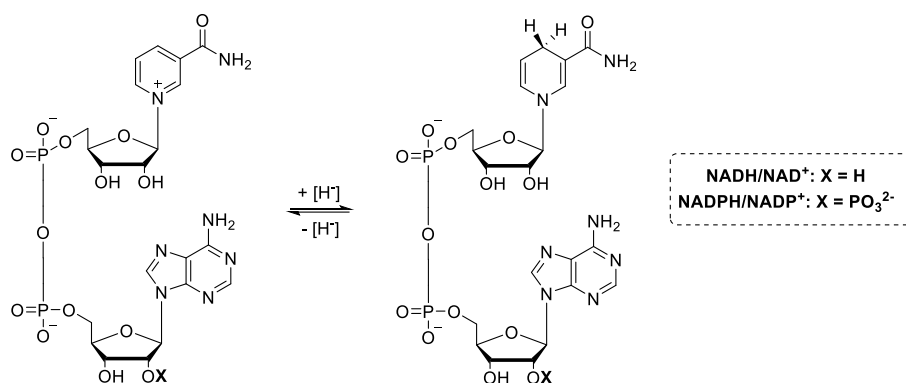
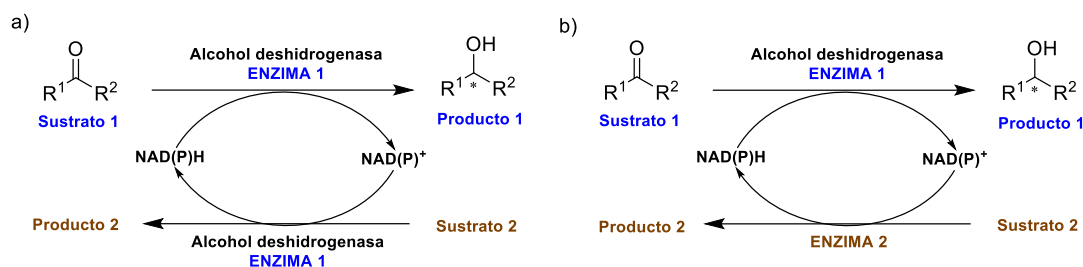


Figura 0.1. Estructura de los cofactores NADP⁺ (fosforilado) y NAD⁺ (sin fosforilar) y sus análogos reducidos (NADPH y NADH) empleados por las cetorreductasas.

Estos cofactores (también llamados coenzimas) son relativamente inestables, y debido a su elevado coste, el uso estequiométrico de los mismos no es viable económicamente. Sin embargo, este contratiempo puede solventarse empleando sistemas eficientes de regeneración del cofactor.¹⁶ Los más comunes son el método del sustrato acoplado (Esquema 0.1a) y el método del enzima acoplado (Esquema 0.1b). El primero es el más sencillo, ya que el mismo enzima (ADH) que cataliza la transformación del sustrato lleva a cabo el reciclaje del cofactor, empleando un segundo cosustrato. En el caso de una reducción, suele ser 2-propanol debido a su bajo coste y su transformación en acetona, compuesto fácilmente eliminable debido a su bajo punto de ebullición. Para el caso del sistema del enzima acoplado, se emplea un segundo enzima en combinación con un cosustrato, normalmente de bajo coste y que desplace el equilibrio hacia la formación del producto deseado. De nuevo para el caso de reducciones de grupos carbonilo, los sistemas glucosa (6-fosfato)/glucosa (6-fosfato) deshidrogenasa (GDH o G6PDH) o formiato/formiato deshidrogenasa (FDH) son los más empleados.

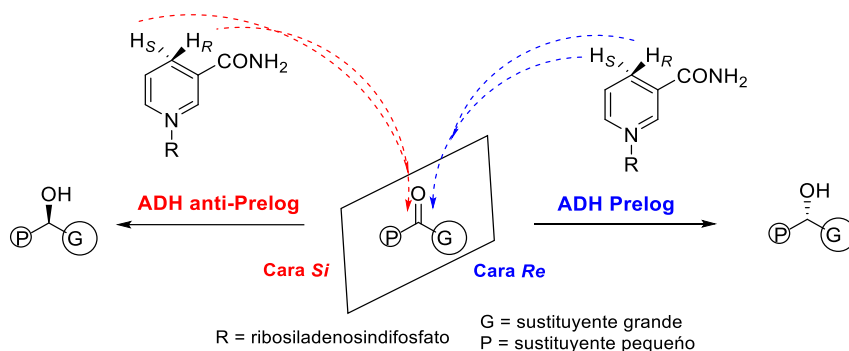
¹⁶ (a) F. Hollmann, D. J. Opperman, C. E. Paul, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 5644-5665; (b) A. A. Koesoema, D. M. Standley, T. Senda, T. Matsuda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, 104, 2897-2909; (c) S. Mordhorst, J. N. Andexer, *Nat. Prod. Rep.* **2020**, 37, 1316-1333.



Esquema 0.1. Sistemas de regeneración del cofactor en reacciones con alcohol deshidrogenasas: a) Método del sustrato acoplado; b) Método del enzima acoplado.

Con el objetivo de minimizar la cantidad utilizada de los cofactores de nicotinamida, han sido recientemente descritas otras estrategias alternativas,^{4,17} como el empleo de técnicas electroquímicas, el uso de cofactores artificiales (miméticos) más baratos que el NAD(P)H, o incluso su regeneración mediada por procesos fotoquímicos.

Cuando se llevan a cabo biorreducciones de cetonas proquirales con estos enzimas, suelen catalizar la transferencia del hidruro (proporcionado por el cofactor) preferentemente a través de una de las dos caras proquirales de la cetona sustrato. En este sentido se ha establecido la llamada *regla de Prelog* (Esquema 0.2), descrita por Vladimir Prelog en 1964.¹⁸ De este modo, si la ADH transfiere el hidruro por la cara *Re*, dando lugar al alcohol de configuración (*S*),¹⁹ el enzima se considera de tipo ‘Prelog’ (la gran mayoría), mientras que serán ‘anti-Prelog’ cuando suceda el ataque por la cara *Si*, obteniéndose el alcohol enantiocomplementario.



Esquema 0.2. Regla de Prelog para la reducción asimétrica de grupos carbonilo.

¹⁷ (a) A. Guarneri, W. J. H. van Berkel, C. E. Paul, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, 60, 63-71; (b) I. Zachos, C. Nowak, V. Sieber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, 49, 59-66; (c) L. Josa-Culleré, A. S. K. Lahdenperä, A. Ribaucourt, G. T. Höfler, S. Gargiulo, Y.-Y. Liu, J.-H. Xu, J. Cassidy, F. Paradisi, D. J. Opperman, F. Hollmann, C. E. Paul, *Catalysts* **2019**, 9, 207; (d) E. Tassano, M. Hall, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, 48, 5596-5615; (e) H. Wu, C. Tian, X. Song, C. Liu, D. Yang, Z. Jiang, *Green Chem.* **2013**, 15, 1773-1789.

¹⁸ V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, 9, 119-130.

¹⁹ Siempre que el sustituyente grande tenga también la prioridad según las reglas de nomenclatura de Cahn-Ingold-Prelog (CIP).

Las ADHs se encuentran clasificadas en 4 grandes grupos que se describen a continuación de manera breve.²⁰ Las ADHs de cadena corta (250 aminoácidos aproximadamente) aceptan una gran variedad de sustratos, y por lo general son enzimas que no dependen de metales para catalizar los procesos de reducción, si bien pueden necesitar cationes Mg^{2+} para estabilizar la estructura cuaternaria de la proteína, como el caso de las ADHs de *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus kefir*. El segundo gran grupo abarca las ADHs de cadena media (en torno a 350 aminoácidos), que son dependientes de Zn^{2+} , el cual posee una doble función estructural y catalítica, perteneciendo por ejemplo a este grupo las ADHs de *Rhodococcus ruber* o de *Thermoanaerobacter* sp. Las ADHs de cadena larga (600-750 aminoácidos) aceptan sustratos de tipo polialcohol, incluyendo derivados de azúcar. Por último, las aldo-ceto reductasas normalmente están involucradas en procesos metabólicos de compuestos endógenos y xenobióticos, tolerando un amplio rango de compuestos.⁴ Principalmente en esta Tesis Doctoral se emplearán diversas ADHs de las dos primeras clases.

La alta disponibilidad comercial de este tipo de enzimas, así como su excelente estereoselectividad ha llamado la atención de algunas empresas farmacéuticas, que consideran la biorreducción un proceso clave a la hora de sintetizar alcoholes quirales.^{6d,9,21} Muchos de estos procesos se encuentran recogidos en patentes,²² como es el caso del fármaco Ezetimiba, más conocido por sus nombres comerciales Zetia® o Ezetrol®, empleado para regular los niveles del colesterol. En esta patente, aceptada en 2011 y desarrollada por la empresa biotecnológica estadounidense Codexis, se emplea una mutante de la ADH de *Lactobacillus kefir*, obteniéndose el fármaco con excelente exceso diastereomérico y elevada conversión tras 24 h, empleándose una concentración de 50 g/L de sustrato (Esquema 0.3a).²³ Posteriormente, en el 2014, también se aprobó una patente en la cual se sintetiza la (S)-Eslicarbazepina, fármaco empleado en el tratamiento de la epilepsia, empleando ADHs evolucionadas de la especie

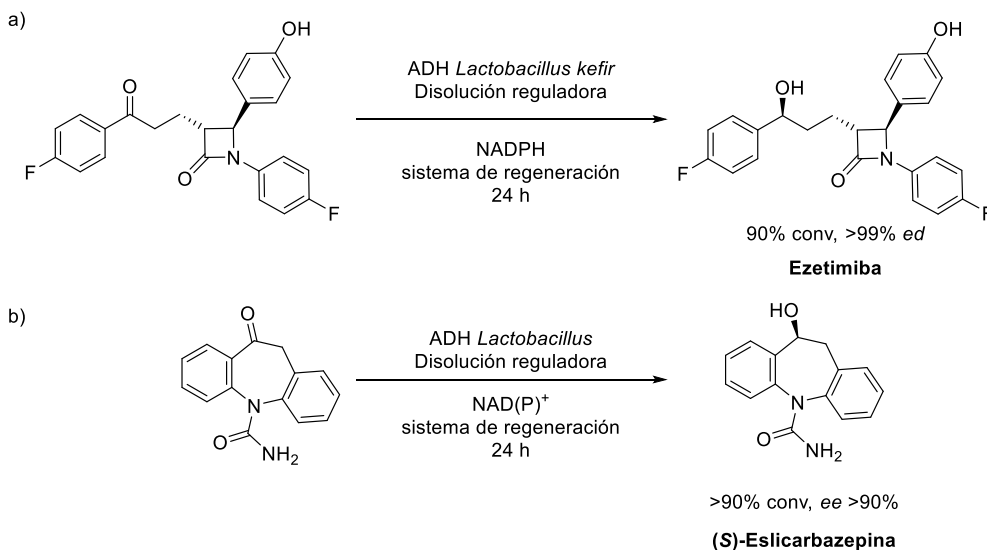
²⁰ J. An, Y. Nie, Y. Xu, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2019**, 39, 366-379.

²¹ (a) Z. Li, H. Yang, J. Liu, Z. Huang, F. Chen, *Chem. Rec.* **2021**, 21, 1611-1630; (b) S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore, K. Baldenius, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 88-119; (c) J. P. Adams, M. J. B. Brown, A. Díaz-Rodríguez, R. C. Lloyd, G.-D. Roiban, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, 361, 2421-2432; (d) Y.-G. Zheng, H.-H. Yin, D.-F. Yu, X. Chen, X.-L. Tang, X.-J. Zhang, Y.-P. Xue, Y.-J. Wang, Z.-Q. Liu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, 101, 987-1001.

²² P. Domínguez de María, G. de Gonzalo, A. R. Alcántara, *Catalysts* **2019**, 9, 802.

²³ M. A. Crowe, O. Alvizo, B. Behrouzian, Y. K. Bong, S. J. Collier, A. Gohel, J. Mavinahalli, N. Modukuru, E. Mundorff, D. Smith, S. Song, W. L. Yeo, WO2011140219A1, **2011**.

Lactobacillus, siendo capaces de producir la hidroxiamida deseada con altos excesos enantioméricos y conversiones superiores al 90% tras 24 h (Esquema 0.3b).²⁴



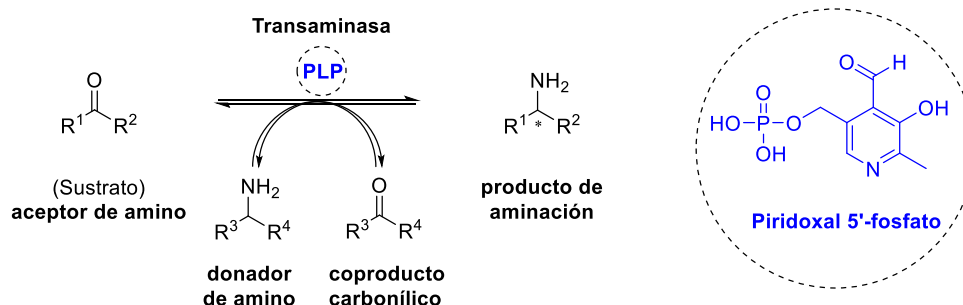
Esquema 0.3. Ejemplos que han sido patentados de biorreducciones estereoselectivas catalizadas por ADHs, aplicadas a la síntesis de fármacos: a) Ezetimiba; b) Eslicarbazepina.

0.2.2.2. Transaminasas

Las transaminasas (TAs) o aminotransferasas pertenecen al grupo de las transferasas, y catalizan la transferencia reversible de un grupo amino entre un donador de amino (normalmente un α -aminoácido) y un aceptor de amino (cetoácidos, cetonas o aldehídos), todo ello mediado por el cofactor piridoxal 5'-fosfato (PLP, *pyridoxal 5'-phosphate*, Esquema 0.4).²⁵

²⁴ A. Gohel, D. Smith, B. Wong, J. Sukumaran, W. L. Yeo, S. J. Collier, S. Novick, US20140199735A1, **2014**.

²⁵ (a) J. F. Rocha, A. F. Pina, S. F. Sousa, N. M. F. S. A. Cerqueira, *Catal. Sci. Technol.* **2019**, 9, 4864-4876; (b) S. A. Kelly, S. Pohle, S. Wharry, S. Mix, C. C. R. Allen, T. S. Moody, B. G. Gilmore, *Chem. Rev.* **2018**, 118, 349-367; (c) M. D. Patil, G. Grogan, A. Bommarius, H. Yun, *Catalysts* **2018**, 8, 254; (d) A. Gomm, E. O'Reilly, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, 43, 106-112; (e) E. E. Ferrandi, D. Monti, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, 34, 13-22; (f) F. Guo, P. Berglund, *Green Chem.* **2017**, 19, 333-360; (g) I. Slabu, J. L. Galman, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2017**, 7, 8263-8284.



Esquema 0.4. Reacción de transaminación de compuestos carbonílicos catalizada por transaminasas. A la derecha aparece la estructura química del cofactor PLP.

La primera evidencia de la existencia de un enzima capaz de llevar a cabo reacciones de transaminación fue publicada por Needham en 1930.²⁶ Desde entonces, se han descubierto y caracterizado un gran número de transaminasas. Su clasificación puede dividirse en tres grandes grupos en función del tipo de grupo amino transferido (Figura 0.2):²⁷ α -transaminasas (α -TAs), ω -transaminasas (ω -TAs) y amino transaminasas (ATAs).

	α -Transaminasas	ω -Transaminasas	Amino Transaminasas
Dador de amino	$R^1-CH(NH_2)-COOH$ R^1: cadena lateral de aminoácido	$HOOC-CH(R^2)-(CH_2)_n-NH_2$ R^2: NHR o H	$R^3-CH(NH_2)-R^4$ R^3: COOH, alquilo, arilo R^4: H, CH₃, C₂H₅, CH₂OH
Aceptor de amino	α -cetoglutarato	α -cetoglutarato	piruvato

Figura 0.2. Clasificación de las transaminasas en función del tipo de grupo amino transferido.

Las α -TAs son muy específicas y solo aceptan sustratos que contienen un ácido carboxílico en posición α al grupo amino. En cambio, las ω -TAs transfieren grupos amino terminales situados en posiciones lejanas al ácido carboxílico. Por último, las ATAs no precisan de sustratos que presenten grupos carboxílicos, es decir, son capaces de aceptar cetonas o aldehídos, de ahí que este tipo de transaminasas sean muy útiles en síntesis orgánica, ya que ofrecen la posibilidad de producir aminas quirales.

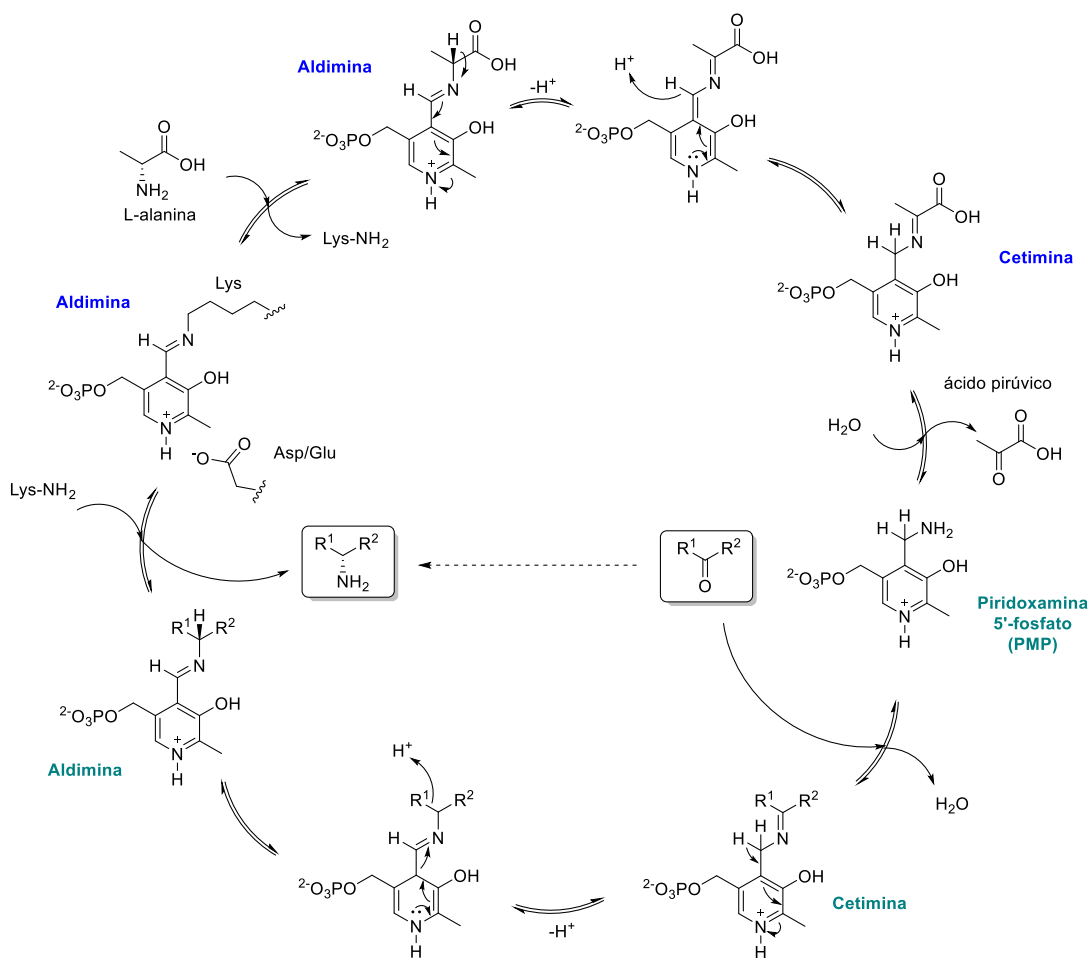
El mecanismo de la reacción de transaminación (Esquema 0.5)²⁸ ha sido estudiado con detalle para el caso de la aspartato aminotransferasa, y se cree análogo para el resto

²⁶ D. M. Needham, *Biochem. J.* **1930**, 24, 208-227.

²⁷ M. Höhne, U. T. Bornscheuer, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2012**, p. 779.

²⁸ (a) H. Mizuguchi, H. Hayashi, K. Okada, I. Miyahara, K. Hirotsu, H. Kagamiyama, *Biochemistry* **2001**, 40, 353-360; (b) J. M. Goldberg, J. F. Kirsh, *Biochemistry* **1996**, 35, 5280-5291.

de transaminasas. Es totalmente reversible y puede dividirse en dos partes. En la primera, el PLP se encuentra enlazado a la lisina (Lys) catalítica perteneciente al centro activo del enzima mediante un enlace imínico reversible, y está activado por un grupo aspartato (Asp) o glutamato (Glu), siendo capaz de reaccionar con el dador del grupo amino (L-alanina en la parte superior derecha del Esquema 0.5) formando una nueva aldimina.



Esquema 0.5. Mecanismo catalítico de transaminación en el centro activo del enzima.

Este doble enlace isomeriza generando un intermedio cetimina, que se hidroliza dando lugar a la especie piridoxamina 5'-fosfato (PMP, *pyridoxamine 5'-phosphate*) y al ácido pirúvico como co-producto. En la segunda parte del proceso, de nuevo formándose enlaces imínicos, el PMP reacciona con el aceptor de amino que contiene un grupo carbonilo (por ejemplo, una cetona), para volver a generar una cetimina (parte inferior del Esquema 0.5). Una vez más se produce la isomerización a la aldimina, que al interaccionar con la lisina catalítica permite obtener el producto de transaminación

con un centro quiral creado y se regenera el PLP, incorporándose a un nuevo ciclo catalítico.

Sin embargo, el uso de las ATAs presenta una dificultad añadida, y es que el equilibrio termodinámico se encuentra fuertemente favorecido hacia el compuesto carbonílico y la amina que actúa como donador de amino, por lo que si se desea sintetizar una amina (quiral) a partir de dicho compuesto carbonílico, se requiere proporcionar condiciones adecuadas para desplazar el equilibrio en el sentido deseado.²⁹

El donador de amino natural de este tipo de enzimas es la alanina (Ala), la cual se transforma en ácido pirúvico, que resulta ser un inhibidor de la transaminasa.³⁰ Para evitar este inconveniente, las metodologías más comunes para desplazar el equilibrio son la eliminación del co-producto o la regeneración de la alanina (Esquema 0.6). Uno de los métodos más empleados es el uso de la lactato deshidrogenasa (LDH), mediante la cual el ácido pirúvico es transformado en lactato (Esquema 0.6a), siendo para ello necesaria la adición de NAD(P)H con su correspondiente sistema de regeneración (normalmente glucosa/GDH o formiato/FDH).³¹

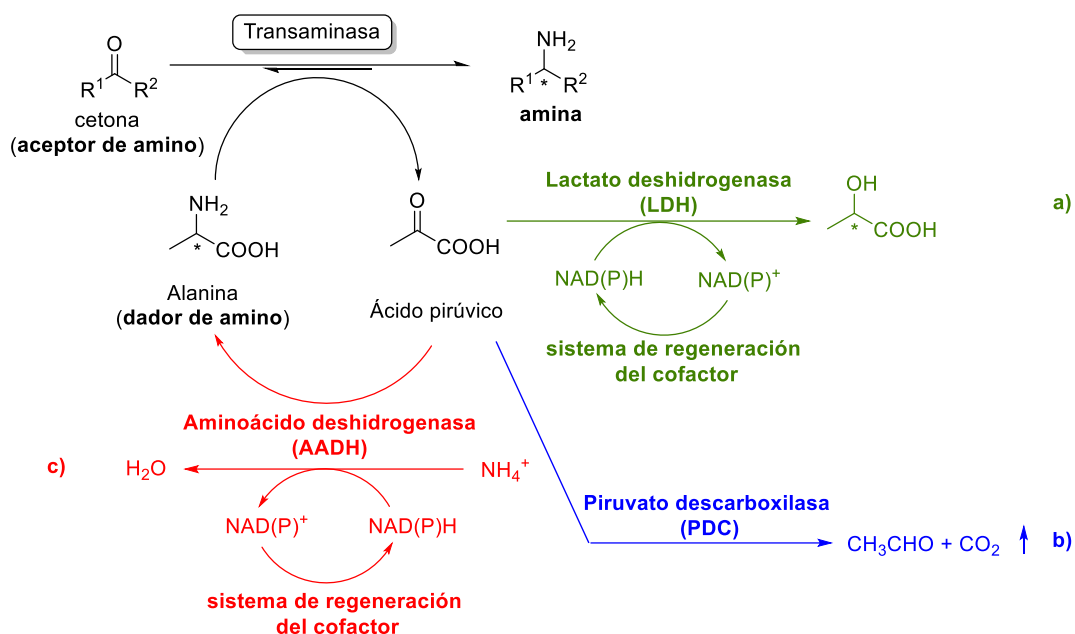
Otra técnica de eliminación del piruvato del medio de reacción se basa en el empleo de una piruvato descarboxilasa (PDC),^{31g,32} la cual genera como subproductos acetaldehído y dióxido de carbono (CO₂) como se describe en el Esquema 0.6b. Se trata en principio de una reacción mucho más simple, puesto que no es necesaria la presencia de NAD(P)H, y la formación de CO₂ desplaza la reacción hacia la formación de los productos de un modo cuasi-irreversible. Sin embargo, algunas transaminasas pueden reaccionar con el acetaldehído formado, generando etilamina como subproducto, y por ello se requiere de un mayor exceso del donador de amino.

²⁹ (a) M. Voges, R. Abu, M. T. Gundersen, C. Held, J. M. Woodley, G. Sadowski, *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21*, 976-986; (b) P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, J. S. Jensen, N. Al-Haque, W. Neto, J. M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 1479-1493.

³⁰ J. S. Shin, B. G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 206-211.

³¹ (a) N. Richter, J. E. Farnberger, D. Pressnitz, H. Lechner, F. Zepeck, W. Kroutil, *Green Chem.* **2015**, *17*, 2952-2958; (b) S. Mathew, G. Shin, M. Shon, H. Yun, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2013**, *18*, 1-7; (c) D. Pressnitz, C. S. Fuchs, J. H. Sattler, T. Knaus, P. Macheroux, F. G. Mutti, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 555-559; (d) S. Schätzle, F. Steffen-Munsberg, A. Thontowi, M. Höhne, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2439-2445; (e) D. Koszelewski, M. Göritzer, D. Clay, B. Seisser, W. Kroutil, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 73-77; (f) D. Koszelewski, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2289-2292; (g) M. D. Truppo, J. D. Rozzell, J. C. Moore, N. J. Turner, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 395-398; (h) D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2761-2766.

³² (a) M. D. Truppo, N. J. Turner, J. D. Rozzell, *Chem. Commun.* **2009**, 2127-2129; (b) M. Höhne, S. Köhl, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 363-365.



Esquema 0.6. Estrategias enzimáticas para el desplazamiento del equilibrio mediante la eliminación del ácido pirúvico o la regeneración de la alanina.

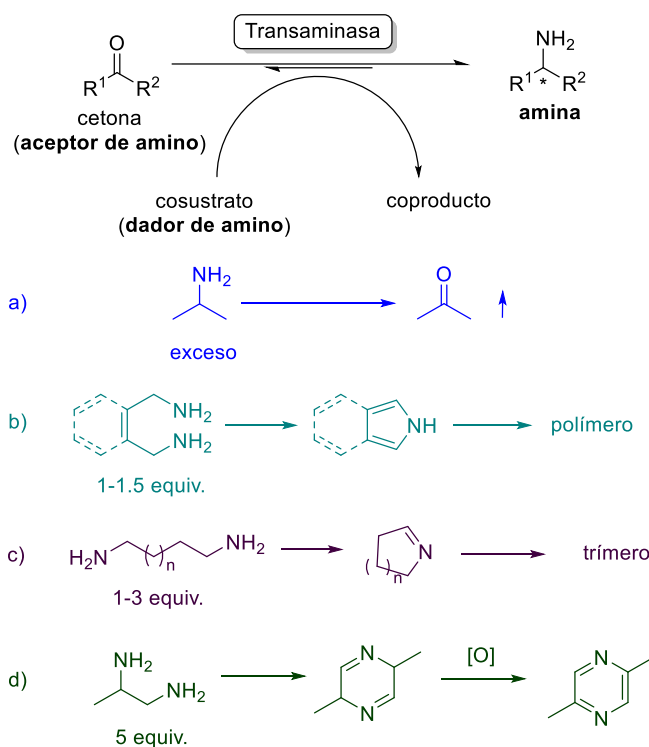
Por último, en lo que se refiere a la regeneración del donador de amino (alanina), es posible emplear una aminoácido deshidrogenasa (AADH) como la alanina deshidrogenasa empleada en el Esquema 0.6c. Añadiendo una sal inorgánica de amonio, así como $NAD(P)H$ junto con su sistema de regeneración, es posible regenerar la alanina. Por tanto se puede añadir el aminoácido en cantidades catalíticas, minimizando posibles problemas de inhibición debido a altas concentraciones del donador de amino.^{31e,31g,33}

En la última década se ha estudiado la aplicación de nuevas aminas como posibles donadores de amino, lo que ha venido unido a la modificación de la secuencia de aminoácidos de algunas TAs para poder aceptar a estos sustratos. Una de las más utilizadas debido a su fácil accesibilidad y bajo coste es la 2-propilamina (2-PrNH₂, Esquema 0.7a).³⁴ Así, además de ser reconocida por varias transaminasas naturales, el subproducto formado es acetona, compuesto fácilmente eliminable, lo que representa una gran ventaja operacional, especialmente si los sustratos y productos involucrados no

³³ (a) S. Klatte, V. F. Wendisch, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 5578-5585; (b) M. Fuchs, K. Tauber, J. Sattler, H. Lecher, J. Pfeffer, W. Kroutil, K. Faber, *RSC Adv.* **2012**, 2, 6262-6265; (c) D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, G. M. Guebitz, D. Rozzell, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 9337-9340.

³⁴ (a) A. W. H. Dawood, M. S. Weiß, C. Schulz, I. V. Pavlidis, H. Iding, R. O. M. A. de Souza, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2018**, 10, 3943-3949; (b) C. Iglesias, P. Panizza, S. R. Giordano, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, 101, 5677-5687; (c) P. Tufvesson, C. Bach, J. M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, 111, 309-319; (d) K. E. Cassimjee, C. Branneby, V. Abedi, A. Wells, P. Berglund, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5569-5571.

son volátiles. Otra opción sería emplear un gran exceso del donador de amino (≥ 50 equivalentes) con la finalidad de desplazar el equilibrio hacia el producto de interés. Este gran exceso, significa en algunos casos un inconveniente puesto que la transaminasa puede inhibirse debido a la alta concentración de 2-propilamina presente en el medio de reacción.



Esquema 0.7. Métodos de desplazamiento del equilibrio en reacciones de transaminación empleando donadores de amino diferentes de la alanina.

Otra de las metodologías más recientes, es el uso de los llamados cosustratos inteligentes (*smart cosubstrates*), que utilizados en cantidades cuasi-estequiométricas son capaces de desplazar el equilibrio en el sentido de la aminación, tras sufrir reacciones espontáneas de ciclación y/o polimerización (Esquemas 0.7b-d).³⁵

³⁵ (a) S. Grigoriu, P. Kugler, E. Kulcinskaja, F. Walker, J. King, P. Hill, V. F. Wendisch, E. O'Reilly, *Green Chem.* **2020**, 22, 4128-4132; (b) A. Gomm, S. Grigoriu, C. Peel, J. Ryan, N. Mujtaba, T. Clarke, E. Kulcinskaja, E. O'Reilly, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 5282-5284; (c) S. E. Payer, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 2553-2559; (d) L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, 358, 1618-1624; (e) I. Slabu, J. L. Galman, N. J. Weise, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2016**, 8, 1038-1042; (f) A. P. Green, N. J. Turner, E. O'Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 10714-10717.

Con el propósito de su posterior aplicación a escala industrial,^{6d,21b,36} los procesos de síntesis de aminas se encuentran en continuo desarrollo y mejora. Uno de los ejemplos más conocidos es la síntesis biocatalítica del antidiabético Sitagliptina, el cual será descrito con más detalle en los antecedentes del Capítulo 1. Asimismo, existen numerosos estudios recientes que implican entre otros el desarrollo de transaminasas más robustas a través de técnicas de biología molecular, su empleo en medios de reacción no convencionales, su inmovilización sobre diferentes tipos de soportes o su aplicación en procesos de flujo en continuo.³⁷

0.2.3. Procesos asimétricos catalizados por enzimas

Como ya se ha comentado a lo largo de esta introducción, la síntesis de compuestos enantiopuros ha ido adquiriendo vital importancia en la industria farmacéutica y agroquímica a lo largo de las últimas décadas. Las estrictas políticas de regulación surgidas a raíz de los más que conocidos posibles efectos secundarios del distómero de una mezcla racémica han obligado al desarrollo de metodologías enfocadas a la síntesis de compuestos enantioenriquecidos. De entre los distintos procesos existentes,^{4,38} se centrará a continuación la discusión exclusivamente en la asimetrización de compuestos proquirales y en la resolución cinética de racematos empleando biocatalizadores, puesto que serán los procesos que se estudiarán en esta Tesis Doctoral.

0.2.3.1. Asimetrización: Compuestos proquirales

La asimetrización de compuestos proquirales o en forma *meso* se basa en la eliminación de uno o varios de sus elementos de simetría (Esquema 0.8a),³⁹

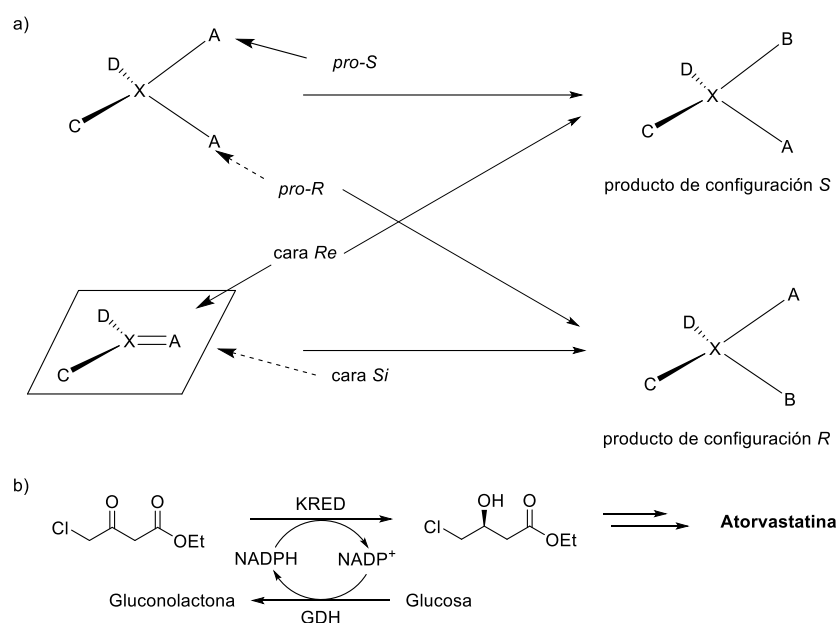
³⁶ (a) S. A. Kelly, S. Mix, T. S. Moody, B. F. Gilmore, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 4781-4794; (b) H. Sun, H. Zhang, E. L. Ang, H. Zhao, *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 1275-1284; (c) J. Chapman, A. E. Ismail, C. Z. Dinu, *Catalysts* **2018**, *8*, 238.

³⁷ Ejemplos recientes: (a) Á. Lakó, Z. Molnár, R. Mendonça, L. Poppe, *RSC Adv.* **2020**, *10*, 40894-40903; (b) W. Böhmer, A. Volkov, K. E. Cassimjee, F. G. Mutti, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 1858-1867; (c) A. Fiorati, P. Berglund, M. S. Humble, D. Tessaro, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 1156-1166; (d) H. Land, F. Ruggieri, A. Szekrenyi, W.-D. Fessner, P. Berglund, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 812-821; (e) R. Semproli, G. Vaccaro, E. E. Ferrandi, M. Vanoni, T. Bavaro, G. Marrubini, F. Annunziata, P. Conti, G. Speranza, D. Monti, L. Tamborini, D. Ubiali, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 1359-1367; (f) L. Leipold, D. Dobrijevic, J. W. E. Jeffries, M. Bawn, T. S. Moody, J. M. Ward, H. C. Hailes, *Green Chem.* **2019**, *21*, 75-86; (g) Z. Molnár, E. Farkas, Á. Lakó, B. Erdélyi, W. Kroutil, B. G. Vértessy, C. Paizs, L. Poppe, *Catalysts* **2019**, *9*, 438.

³⁸ M. Hall, *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2*, 958-989.

³⁹ (a) E. García-Urdiales, I. Lavandera, V. Gotor, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2012**, p. 43; (b) E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, PR110-PR180.

conduciendo a un producto quiral con un rendimiento máximo teórico del 100%. Así, se puede llevar a cabo la modificación selectiva de un grupo enantiotópico (en un compuesto *meso*, por ejemplo), o de una cara enantiotópica (en una cetona, por ejemplo). Además de los mostrados anteriormente en el Esquema 0.3, en el Esquema 0.8b se muestra otro ejemplo de asimetrización de una cetona proquiral empleando una alcohol deshidrogenasa, desarrollado por la empresa Codexis para la síntesis de un intermedio de la Atorvastatina, el principio activo del fármaco más vendido del mundo para evitar la acumulación de colesterol en el cuerpo humano.⁴⁰



Esquema 0.8. a) Representación general de una asimetrización de un compuesto *meso* o un derivado con dos caras proquirales; b) Ejemplo de asimetrización enzimática de una cetona proquiral precursora de la Atorvastatina.

0.2.3.2. Resolución cinética (KR, 'Kinetic Resolution')

Históricamente, los primeros procesos biocatalíticos desarrollados se basaron en la resolución de mezclas racémicas.⁴¹ Esta metodología se basa en la diferente velocidad de reacción de los dos enantiómeros de un racemato cuando son expuestos en un entorno quiral (en nuestro caso, el centro activo de un enzima).⁴² Para conseguir una buena resolución cinética, la velocidad de reacción de un enantiómero debe ser mucho mayor que la del otro ($k_R > k_S$), y la reacción debe ser cuasi-irreversible (Esquema 0.9a).

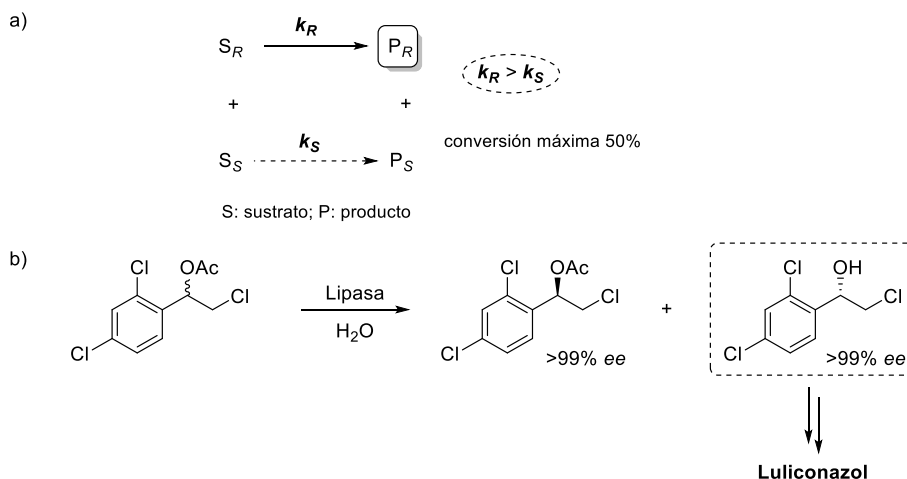
⁴⁰ S. K. Ma, J. Gruber, C. Davis, L. Newman, D. Gray, A. Wang, J. Grate, G. W. Huisman, R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2010**, *12*, 81-86.

⁴¹ A. Kamal, M. A. Azhar, T. Krishnaji, M. S. Malik, S. Azeeza, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 569-592.

⁴² H. B. Kagan, J. C. Fiaud, *Top. Stereochem.* **1988**, *18*, 249-330.

La única limitación intrínseca a la propia técnica para obtener compuestos enantiopuros, es una conversión máxima teórica del 50% ya que en el mejor de los casos solo reaccionará uno de los dos enantiómeros, lo que implica una disminución del rendimiento aislado del producto de interés, así como una mayor dificultad para su aislamiento puesto que hay que separarlo del sustrato de partida remanente.

Aunque muy diversos tipos de enzimas pueden catalizar procesos de KR, en Biocatálisis son mayormente conocidas aquellas llevadas a cabo por lipasas,⁴³ enzimas pertenecientes al grupo de las hidrolasas, como el ejemplo mostrado en el Esquema 0.9b, donde una lipasa es capaz de resolver una mezcla racémica dando lugar al enantiómero de interés, paso clave en la síntesis del antifúngico Luliconazol.⁴⁴



Esquema 0.9. a) Representación general de una resolución cinética de una mezcla racémica; b) Ejemplo de resolución cinética enzimática.

Aunque en esta Tesis Doctoral no se utilizará esta técnica de resolución, cabe destacar que una manera de superar la limitación del 50% de rendimiento máximo de las KRs es la integración de un proceso de racemización del sustrato remanente, a la vez que ocurre la resolución enzimática, dando lugar a lo que se conoce como resoluciones cinéticas dinámicas (DKRs, *Dynamic Kinetic Resolutions*), y que han sido muy utilizadas a lo largo de estas últimas décadas.⁴⁵

⁴³ (a) *Pharmaceutical Biocatalysis, Chemoenzymatic Synthesis of APIs*, Ed. P. Grunwald, Jenny Stanford Publishing Pte. Ltd., Boca Raton (EE. UU.), **2020**; (b) J. Albarrán-Velo, D. González-Martínez, V. Gotor-Fernández, *Biocatal. Biotransform.* **2018**, *36*, 102-130.

⁴⁴ T. S. Fonseca, L. D. Lima, M. C. F. de Oliveira, T. L. G. de Lemos, D. Zampieri, F. Molinari, M. C. de Mattos, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 2110-2116.

⁴⁵ Revisiones recientes: (a) M. M. Musa, F. Hollmann, F. G. Mutti, *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9*, 5487-5503; (b) D. Méndez-Sánchez, M. López-Iglesias, V. Gotor-Fernández, *Curr. Org. Chem.* **2016**, *20*,

0.3. PROMISCUIDAD CATALÍTICA

A pesar de la presumible selectividad atribuida a los enzimas, el término promiscuidad catalítica, definida como la capacidad de un biocatalizador para llevar a cabo procesos distintos a su función natural, no es ni mucho menos inédito, ya que existen ejemplos bien documentados desde mediados del siglo XX.⁴⁶ Aunque inicialmente parezca contradictorio, este concepto ha sido un factor importante en el origen de enzimas con funciones catalíticas específicas. En 1976 Jensen ya propone la capacidad de aceptación de un amplio número de sustratos de los llamados enzimas ancestrales para, posteriormente, evolucionar hacia los enzimas más específicos conocidos actualmente.⁴⁷ Por tanto, la promiscuidad catalítica es clave para los microorganismos con respecto a la adaptación a cambios de ambiente, al permitir el desarrollo de nuevas funciones enzimáticas a partir de las ya existentes. Uno de los ejemplos es la aparición de organismos capaces de degradar pesticidas como la Atrazina o los organofosfatos, décadas después de su uso inicial.⁴⁸

Se ha descubierto que la actividad principal del enzima es más ‘rígida’ frente al cambio, mientras que las actividades secundarias son más ‘plásticas’. Este comportamiento puede explicarse en parte, debido a que aunque el centro activo del enzima está diseñado para reconocer al sustrato nativo, la diversidad conformacional del mismo y los diferentes modos de interacción contribuyen a la aceptación de sustratos alternativos. Otros factores responsables del comportamiento promiscuo de un enzima pueden ser modificaciones postraduccionales,⁴⁹ la disposición de las subunidades y la presencia de múltiples dominios en la proteína. De este modo se ha observado que los enzimas pueden mostrar distintos tipos de promiscuidad: (i) actividad del enzima en condiciones de reacción no naturales (promiscuidad de condición), (ii) aceptación de sustratos inusuales (promiscuidad de sustrato), (iii) realización de reacciones

1186-1203; (c) O. Långvik, T. Saloranta, D. Y. Murzin, R. Leino, *ChemCatChem* **2015**, 7, 4004-4015; (d) O. Verho, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 3996-4009.

⁴⁶ (a) R. C. Jackson, R. E. Handschumacher, *Biochemistry* **1970**, 9, 3585-3590; (b) Y. Nakagawa, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 1566-1567; (c) T. W. Reid, D. Fahrney, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 3941-3943; (d) Y. Pocker, J. T. Stone, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 5497-5498.

⁴⁷ R. A. Jensen, *Annu. Rev. Microbiol.* **1976**, 30, 409-425.

⁴⁸ (a) H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 3351-3367; (b) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6032-6040.

⁴⁹ Cambio químico ocurrido en una proteína después de su síntesis en los ribosomas.

inesperadas (promiscuidad catalítica), o (iv) la catálisis se produce en un centro activo alternativo (promiscuidad de centro activo alterno).⁵⁰

Con respecto a la promiscuidad catalítica, e inspirados en los mecanismos de evolución natural, las actividades promiscuas se pueden emplear para el desarrollo de nuevas funciones catalíticas y su posterior aplicación en síntesis orgánica. De este modo pueden encontrarse en un enzima natural (promiscuidad accidental) o en un enzima mutado, empleando tanto técnicas en el laboratorio de evolución dirigida como ingeniería racional de proteínas (promiscuidad inducida).^{7,48,50d} Alternativamente, existe la posibilidad de la ‘resurrección’ de proteínas ancestrales que sirvan como puntos de inicio en la ingeniería de proteínas con diversas actividades catalíticas.⁵¹

Dentro de todos los biocatalizadores descritos hasta la fecha, los pertenecientes al grupo de las hidrolasas han sido los más estudiados respecto a sus actividades ‘no naturales’.⁵² Así, desde que en el año 2003 Berglund y colaboradores descubrieran la capacidad de la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B) para catalizar reacciones aldólicas entre aldehídos alifáticos (Esquema 0.10),⁵³ se ha observado que pueden llevar a cabo otros procesos de formación de enlaces C–C como reacciones de Mannich o Baylis-Hillman, así como reacciones de formación de enlaces C–N como adiciones de tipo aza-Michael.



Esquema 0.10. Reacción aldólica catalizada por la CAL-B.

Los enzimas, como ya se ha visto en el caso de las ADHs o las TAs, también precisan de iones metálicos o cofactores por razones estructurales o catalíticas. Curiosamente, en algunos casos, la unión de distintos metales en el centro activo puede

⁵⁰ (a) P. Singla, R. D. Bhardwaj, *Biocatal. Biotransform.* **2020**, 38, 81-92; (b) S. D. Copley, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2017**, 47, 167-175; (c) R. D. Gupta, *Sustain. Chem. Process* **2016**, 4, 2; (d) M. S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401; (e) A. Babbie, N. Tokuriki, F. Hollfelder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 200-207; (f) K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, 25, 231-238.

⁵¹ J. M. Gardner, M. Biler, V. A. Risso, J. M. Sanchez-Ruiz, S. C. L. Kamerlin, *ACS Catal.* **2020**, 10, 4863-4870.

⁵² (a) E. V. M. Orozco, A. L. M. Porto, en *Biocatalysis for Practitioners: Techniques, Reactions and Applications*, Eds. G. de Gonzalo, I. Lavandera, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2021**, p. 115; (b) B. P. Dwivedee, S. Soni, M. Sharma, J. Bhaumik, J. K. Laha, U. C. Banerjee, *ChemistrySelect* **2018**, 3, 2441-2466; (c) M. López-Iglesias, V. Gotor-Fernández, *Chem. Rec.* **2015**, 15, 743-759; (d) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4504-4523.

⁵³ C. Branneby, P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 874-875.

dar lugar a reacciones que no son su función natural.⁵⁴ Por ejemplo, la sustitución del zinc(II) por manganeso(II) en la anhidrasa carbónica convierte a esta última en un enzima capaz de catalizar la epoxidación de olefinas,⁵⁵ sin embargo, si se sustituye por rodio(I) o rodio(II), es capaz de catalizar reacciones de hidrogenación e hidroformilación.⁵⁶

Esta promiscuidad también se extiende a los (metalo)cofactores, como el caso de las proteínas unidas a grupos hemo. La mayoría de las metaloporfirinas sintéticas se desarrollaron con el fin de mimetizar las funciones oxidativas de las citocromo P450. Así, cambiando los sustratos de dichas enzimas, se pueden obtener reactividades inesperadas. De este modo, un diazocompuesto puede reaccionar con el metal de transición del complejo metaloporfirínico para generar un intermedio metal-carbenoide que se puede transferir a diferentes moléculas orgánicas. En el año 2013, Arnold y colaboradores llevaron a cabo la ciclopropanación de alquenos empleando una citocromo P450 de *Bacillus megaterium* (P450_{BM3}, Esquema 0.11a),⁵⁷ y desde entonces distintas proteínas tanto naturales como mutadas conteniendo el grupo hemo, han sido empleadas para llevar a cabo la inserción de carbenos en enlaces C–H (Esquema 0.11b),⁵⁸ triples enlaces (Esquema 0.11c),⁵⁹ enlaces Si–H (Esquema 0.11d)⁶⁰ o B–H (Esquema 0.11e),⁶¹ entre otras transformaciones.⁶²

⁵⁴ (a) K. Chen, F. H. Arnold, *Nat. Catal.* **2020**, 3, 203-213; (b) R. B. Leveson-Gower, C. Mayer, G. Roelfes, *Nat. Rev. Chem.* **2019**, 3, 687-705.

⁵⁵ A. Fernández-Gacio, A. Codina, J. Fastrez, O. Riant, P. Soumillion, *ChemBioChem* **2006**, 7, 1013-1016.

⁵⁶ (a) Q. Jing, R. J. Kazlauskas, *ChemCatChem* **2010**, 2, 953-957; (b) Q. Jing, K. Okrasa, R. J. Kazlauskas, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 1370-1376.

⁵⁷ P. S. Coelho, E. M. Brustad, A. Kannan, F. H. Arnold, *Science* **2013**, 339, 307-310.

⁵⁸ R. K. Zhang, K. Chen, X. Huang, L. Wohlschlager, H. Renata, F. H. Arnold, *Nature* **2019**, 565, 67-72.

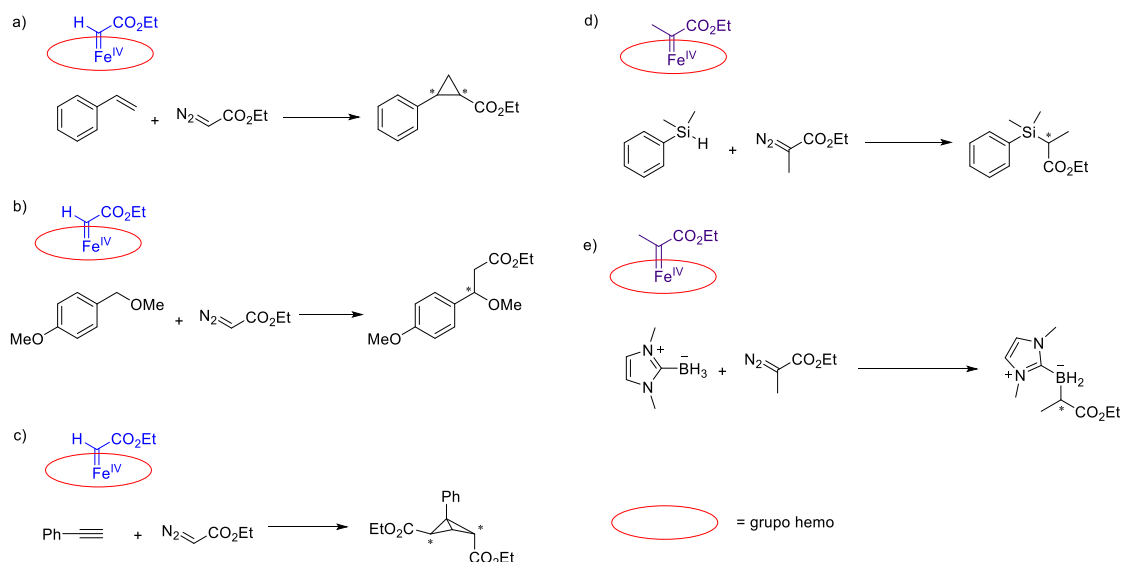
⁵⁹ K. Chen, X. Huang, S. B. J. Kan, R. J. Zhang, F. H. Arnold, *Science* **2018**, 360, 71-75.

⁶⁰ S. B. J. Kan, R. D. Lewis, K. Chen, F. H. Arnold, *Science* **2016**, 354, 1048-1051.

⁶¹ S. B. J. Kan, X. Huang, Y. Gumulya, K. Chen, F. H. Arnold, *Nature* **2017**, 552, 132-136.

⁶² (a) I. Cho, C. K. Prier, Z.-J. Jia, R. K. Zhang, T. Görbe, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 3138-3142; (b) K. Chen, S.-Q. Zhang, O. F. Brandenburg, X. Hong, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 16402-16407; (c) C. K. Prier, R. Z. Zhang, A. R. Buller, S. Brinkmann-Chen, F. H. Arnold, *Nat. Chem.* **2017**, 9, 629-634; (d) Z. J. Wang, N. E. Peck, H. Renata, F. H. Arnold, *Chem. Sci.* **2014**, 5, 598-601.

Introducción

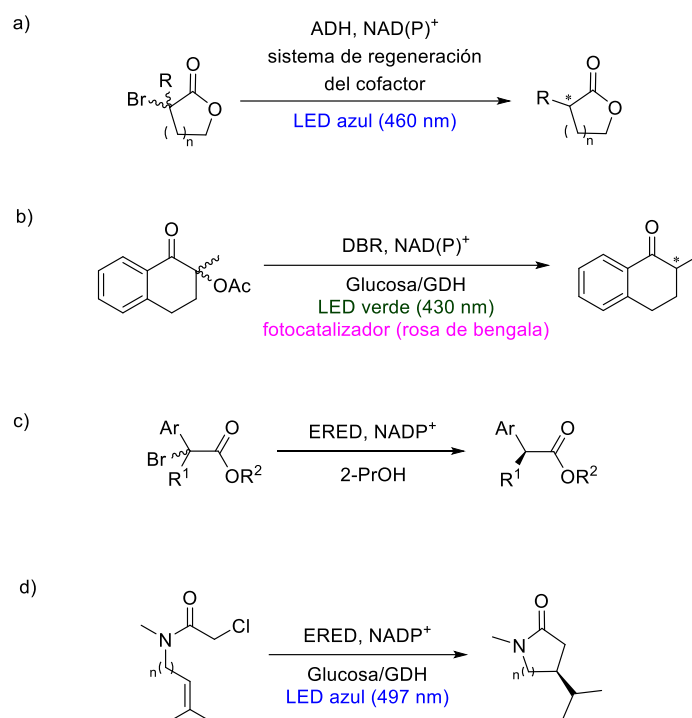


Esquema 0.11. Reacciones de transferencia de carbenos catalizadas por citocromos P450.

Los enzimas dependientes de un cofactor son interesantes puesto que tienen un gran potencial catalítico sobre el que se puede investigar. En este sentido, el NAD(P)H es conocido por su capacidad redox, sin embargo, recientemente se ha descrito su capacidad para llevar a cabo reacciones de transferencia de un electrón en condiciones fotocatalíticas (SET, del inglés *single electron transfer*). Así, el grupo de Hyster ha documentado la deshalogenación radicalaria enantioselectiva de α -bromolactonas mediante la irradiación con luz de ADHs dependientes de NAD(P)H. El proceso de fotoexcitación conduce a la eliminación homolítica del átomo de halógeno formando un radical proquiral que, posteriormente, es reducido por el cofactor con control estereoquímico del proceso en función de la selectividad del enzima (Esquema 0.12a).⁶³ El mismo grupo de investigación ha desarrollado más recientemente otra metodología similar, combinando en este caso reductasas de dobles enlaces (DBR, del inglés, *double bond reductases*), luz, y un derivado de xanteno (rosa de bengala) como fotocatalizador, permitiendo la desacetoxilación radicalaria enantioselectiva de α -acetoxicetonas (Esquema 0.12b).⁶⁴

⁶³ M. A. Emmanuel, N. R. Greenberg, D. G. Oblinsky, T. K. Hyster, *Nature* **2016**, 540, 414-417.

⁶⁴ K. F. Biegasiewicz, S. J. Cooper, M. A. Emmanuel, D. C. Miller, T. K. Hyster, *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 770-775.



Esquema 0.12. Promiscuidad catalítica de oxidorreductasas mediante irradiación con luz visible (excepto en el ejemplo c, donde no es necesaria).

Las alqueno reductasas (EREDs, *ene-reductases*) dependientes de flavina han mostrado una reactividad similar a las ADHs con respecto a la deshalogenación radicalaria, sin embargo, en este caso no se requiere del empleo de luz o fotocatalizador para su activación. Así, han mostrado ser capaces de catalizar la desbromación radicalaria enantioselectiva de α -bromoésteres por acción de la propia flavina (Esquema 0.12c).⁶⁵ Por otro lado, estudios recientes han demostrado que las EREDs también pueden funcionar como fotoenzimas (Esquema 0.12d).⁶⁶ Al irradiar estos enzimas en presencia de sustratos conteniendo fragmentos de tipo α -cloroamida y un alqueno, se produce la ciclación radicalaria intramolecular fotoinducida, obteniendo lactamas de entre 5 a 8 miembros mediante un mecanismo similar al descrito para la deshalogenación radicalaria enantioselectiva de las α -bromolactonas.

⁶⁵ B. A. Sandoval, A. J. Meichan, T. K. Hyster, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11313-11316.

⁶⁶ K. A. Biegasiewicz, S. J. Cooper, X. Gao, D. G. Oblinsky, J. H. Kim, S. E. Garfinkle, L. A. Joyce, B. A. Sandoval, G. D. Scholes, T. K. Hyster, *Science* **2019**, *364*, 1166-1169.

0.4. IMPORTANCIA DEL FLÚOR

Aislado por Henri Moisson en 1886, el flúor es el halógeno más abundante en la corteza terrestre. Se encuentra mayoritariamente como fluorita y fluoroapatita y, a pesar de que el flúor inorgánico puede encontrarse en concentraciones importantes en organismos terrestres y marinos, apenas se han aislado compuestos organofluorados a partir del reino animal.⁶⁷ La razón principal se atribuye a las características únicas del flúor, muy distintas en comparación al resto de los halógenos, como su tamaño, electronegatividad o nucleofilia. De entre los pocos productos naturales de los que se tiene constancia que contienen flúor, se pueden destacar los 5 compuestos mostrados en la Figura 0.3.

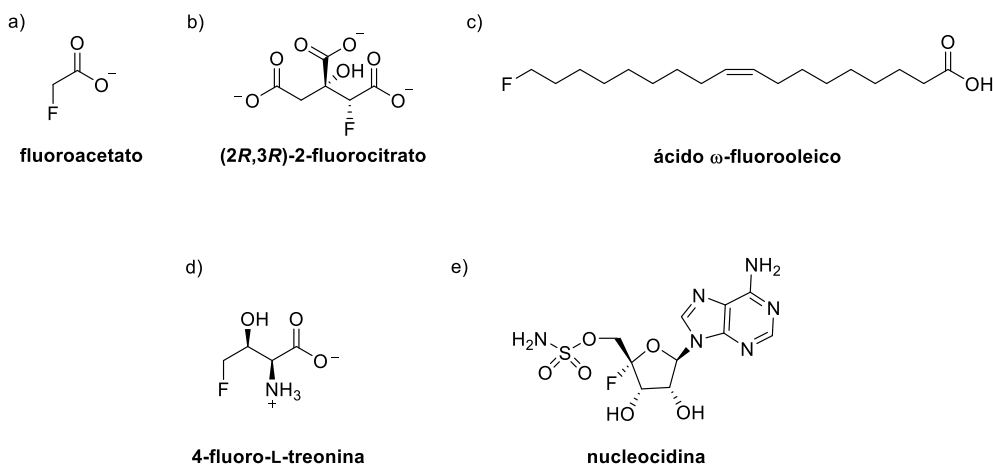


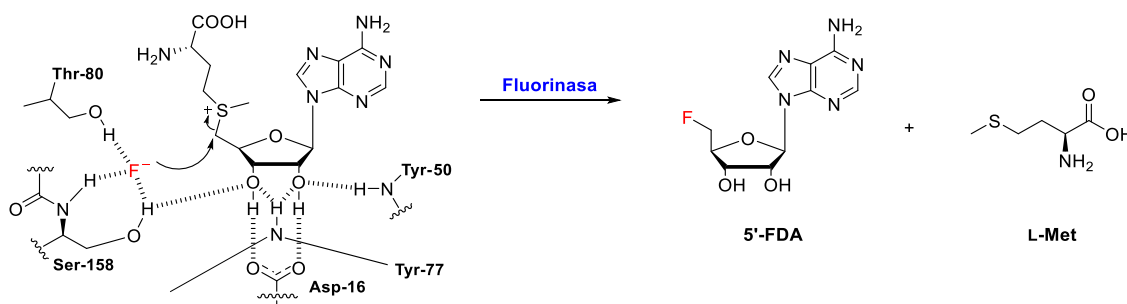
Figura 0.3. Compuestos organofluorados de origen natural.

El fluoroacetato (Figura 0.3a) es el más común, identificado en la especie *Dichapetalum cymosum*, que se encuentra en una variedad de plantas presente en diferentes zonas del mundo, especialmente en las áreas tropicales de Sudáfrica, Australia y Brasil. Este compuesto se metaboliza para dar lugar a la potente toxina (2R,3R)-2-fluorocitrato (Figura 0.3b), inhibidor de un enzima clave en el ciclo de Krebs. Sin embargo, a día de hoy, se desconoce la base bioquímica de la biosíntesis del fluoroacetato. El ácido ω-fluorooleico (Figura 0.3c) es el principal ácido graso presente en la planta *Dichapetalum toxicarium*, mientras que los antibióticos 4-fluoro-L-treonina

⁶⁷ (a) J. Han, L. Kiss, H. Mei, A. M. Remete, M. Ponikvar-Svet, D. M. Sedgwick, R. Roman, S. Fustero, H. Moriwaki, V. A. Soloshonok, *Chem. Rev.* **2021**, 121, 4678-4742; (b) R. Fuge, *Appl. Geochem.* **2019**, 100, 393-406.

(Figura 0.3d) y nucleocidina (Figura 0.3e) son compuestos producidos respectivamente por las bacterias *Streptomyces cattleya* y *Streptomyces calvus*.⁶⁸

Esta última ha servido como guía para estudiar la enzimología de la fluoración, con el descubrimiento en 2002 del primer enzima capaz de catalizar la formación de enlaces C–F, denominado fluorinasa.⁶⁹ Este enzima es capaz de promover una reacción S_N2 , donde el ion fluoruro ataca a la posición C-5' de la ribosa perteneciente a la S-adenosil-L-metionina (SAM), dando lugar a la 5'-fluoro-5'-desoxiadenosina (5'-FDA) y L-metionina (L-Met), tal como se describe en el Esquema 0.13.



Esquema 0.13. Mecanismo de la reacción mediada por una fluorinasa.

Para la naturaleza, metabolizar el flúor es una ardua tarea, principalmente debido a su elevado calor de hidratación en agua, lo que lo convierte en un mal nucleófilo. A pesar de ello, la fluorinasa ha desarrollado una estrategia característica de desolvatación para la reacción S_N2 . En el centro activo del enzima se forma un complejo entre el anión fluoruro y la SAM mediante enlaces de hidrógeno. Así, el anión se une al centro activo a través de las mencionadas interacciones para ser desolvatado. La SAM, que tiene una afinidad mucho más elevada por el centro activo, también se une al mismo y durante ese proceso se consigue la desolvatación total del centro activo. Las interacciones electrostáticas entre el flúor desolvatado y el C-5' electropositivo de la especie sulfonio formada en este complejo hacen que sea posible la formación del enlace C–F de la 5'-FDA.^{68a,70} A raíz de este trabajo, se han identificado y caracterizado algunos homólogos de este enzima a partir de organismos actinomicetos.⁷¹ La fluorinasa además ha mostrado ser un catalizador excelente para la síntesis de compuestos marcados con ^{18}F ,

⁶⁸ (a) D. O'Hagan, H. Deng, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 634-649; (b) D. B. Harper, D. O'Hagan, *Nat. Prod. Rep.* **1994**, *11*, 123-133.

⁶⁹ D. O'Hagan, C. Schaffrath, S. L. Cobb, J. T. G. Hamilton, C. D. Murphy, *Nature* **2002**, *416*, 279.

⁷⁰ L. Wu, F. Maglangit, H. Deng, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *55*, 119-126.

⁷¹ (a) L. Ma, Y. Li, L. Meng, H. Deng, Y. Li, Q. Zhang, A. Diao, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 27047-27051; (b) H. Deng, L. Ma, N. Bandaranayaka, Z. Qin, G. Mann, K. Kyeremeh, Y. Yu, T. Shepherd, J. H. Naismith, D. O'Hagan, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 364-368.

empleados en tomografía de emisión de positrones (PET, *Positron Emission Tomography*), donde los principales métodos de síntesis requieren múltiples etapas de reacción o condiciones drásticas debido a la limitada reactividad del ion fluoruro.^{68a}

No puede pasarse por alto la importancia que tiene en química sintética los métodos de fluoración,⁷² puesto que los productos obtenidos poseen un alto valor añadido,⁷³ en especial para el desarrollo de nuevos fármacos.⁷⁴ El hecho de que la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, *Food and Drug Administration*) apruebe cada vez más medicamentos conteniendo flúor, pone de manifiesto su importancia. En la actualidad ya es reconocido como el segundo heteroátomo con más presencia después del nitrógeno, ya que en química médica es bien conocida su capacidad para modificar las propiedades biofísicas y bioactivas de las moléculas en las que está presente, con el propósito de mejorar la eficacia de los principios activos.⁷⁵ En la Figura 0.4 se muestran algunos ejemplos de los más representativos.

Para el caso del taxoide mostrado en la Figura 0.4a, similar al Paclitaxel, la inserción de átomos de flúor ofrece una citotoxicidad mucho más potente que el propio Paclitaxel en una serie de células tumorales humanas. A su vez, muestra resistencia a la modificación metabólica en presencia de los citocromos P450 en los carbonos C-3' y C-6, conocidos como principales lugares de labilidad metabólica.⁷⁶

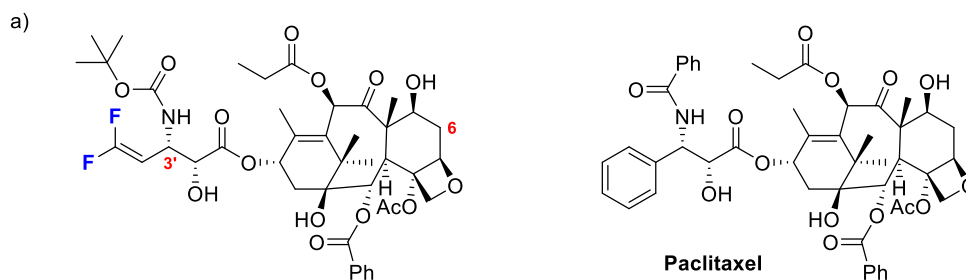
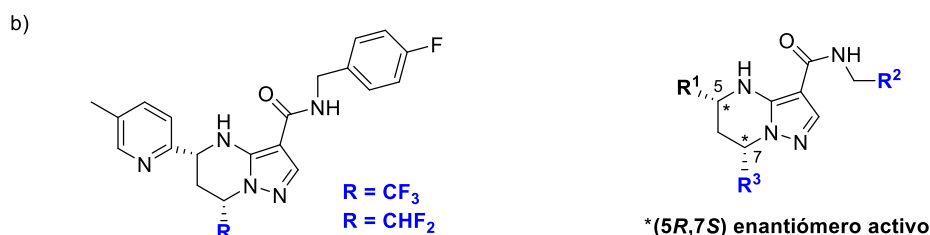
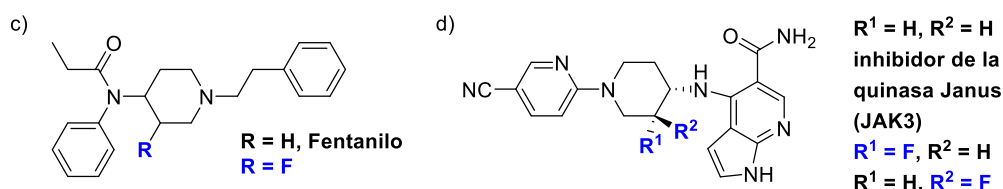
⁷² (a) S. Caron, *Org. Process Res. Dev.* **2020**, 24, 470-480; (b) R. Szpera, D. F. J. Moseley, L. B. Smith, A. J. Sterling, V. Gouverneur, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 14824-14848; (c) S. Fustero, D. M. Sedgwick, R. Román, P. Barrio, *Chem. Commun.* **2018**, 54, 9706-9725.

⁷³ P. T. Lowe, D. O'Hagan, *J. Fluor. Chem.* **2020**, 230, 109420.

⁷⁴ (a) J. Han, A. M. Remete, L. S. Dobson, L. Kiss, K. Izawa, H. Moriwaki, V. A. Soloshonok, D. O'Hagan, *J. Fluor. Chem.* **2020**, 239, 109639; (b) M. Reichel, K. Karaghiosoff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 12268-12281; (c) *Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnosis, and Agrochemicals*, Eds. G. Haufe, F. R. Leroux, Elsevier, Ámsterdam (Países Bajos), **2019**; (d) A. Harsanyi, G. Sandford, *Green Chem.* **2015**, 17, 2081-2086; (e) D. Barnes-Seeman, J. Beck, C. Springer, *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, 14, 855-864; (f) J. Wang, M. Sánchez-Roselló, J. L. Aceña, C. del Pozo, A. E. Sorochinsky, S. Fustero, V. A. Soloshonok, H. Liu, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 2432-2506; (g) S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 320-330; (h) H.-J. Böhm, D. Banner, S. Bendels, M. Kansy, B. Kuhn, K. Müller, U. Obst-Sander, M. Stahl, *ChemBioChem* **2004**, 5, 637-643.

⁷⁵ (a) B. M. Johnson, Y.-Z. Shu, X. Zhuo, N. A. Meanwell, *J. Med. Chem.* **2020**, 63, 6315-6386; (b) N. A. Meanwell, *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 5822-5880; (c) E. P. Gillis, K. J. Eastman, M. D. Hill, D. J. Donnelly, N. A. Meanwell, *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 8315-8359.

⁷⁶ (a) I. Ojima, *J. Fluor. Chem.* **2017**, 198, 10-23; (b) L. Kuznetsova, L. Sun, J. Chen, X. Zhao, J. Seitz, M. Das, Y. Li, J. M. Veith, P. Pera, R. J. Bernacki, S. Xia, S. B. Horwitz, I. Ojima, *J. Fluor. Chem.* **2012**, 143, 177-188; (c) M. Ehrlichová, I. Ojima, J. Chen, R. Václavíková, V. Němcová-Fürstová, J. Vobořilová, P. Šimek, S. Horský, P. Souček, J. Kovář, M. Brabec, I. Gut, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2012**, 385, 1035-1048.

Fluoración como estrategia para impedir el metabolismo de la molécula**Efecto de los átomos de flúor sobre la solubilidad de la molécula****Flúor como modulador de la basicidad sobre aminas próximas****Figura 0.4.** Modificación de las propiedades de algunos fármacos por la presencia de flúor.

Otra consecuencia derivada del grado de fluoración en una molécula es la solubilidad del compuesto en agua, como se observa en los inhibidores de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* mostrados en la Figura 0.4b. Mientras que ambos son inhibidores efectivos, la solubilidad acuosa del derivado difluorado es mucho más elevada que la de su análogo trifluorado.⁷⁷

Por otro lado, la elevada electronegatividad asociada al enlace C–F hace que la introducción de átomos de flúor sea útil para modular la basicidad de aminas próximas a dicho(s) átomo(s). Un ejemplo interesante es el derivado fluorado del Fentanilo, un potente agonista de los receptores opioides μ (Figura 0.4c). El diseño del análogo fluorado explora la hipótesis de la sobreregulación de los receptores opioides μ periféricos en el síndrome del dolor regional complejo y su contribución a la sensación del dolor. Además, los tejidos de la zona dañada que producen dolor se asocian con

⁷⁷ F. Yokokawa, G. Wang, W. L. Chan, S. H. Ang, J. Wong, I. Ma, S. P. S. Rao, U. Manjunatha, S. B. Lakshminarayana, M. Herve, C. Kounde, B. H. Tan, P. Thayalan, S. H. Ng, M. Nanjundappa, S. Ravindran, P. Gee, M. Tan, L. Wei, A. Goh, P.-Y. Chen, K. S. Lee, C. Zhong, T. Wagner, I. Dix, A. K. Chatterjee, K. Pethe, K. Kuhen, R. Glynn, P. Smith, P. Bifani, J. Jiricek, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 4, 451-455.

procesos de inflamación y un entorno de pH más bajo, lo que se podría aprovechar para regular la selectividad de este compuesto, evitando la activación de los receptores en tejidos sanos. La hipótesis se basa en que la forma protonada del Fentanilo, altamente básico ($pK_a > 8$) predomina a pH fisiológico y es reconocido por el receptor. La introducción de un átomo de flúor, evaluado como mezcla de diastereoisómeros, reduce el pK_a a 6.8, por lo que este compuesto solo se protonaría sustancialmente a valores de pH que estén por debajo de la media habitual, fuera de las condiciones fisiológicas normales. Los ensayos de unión estudiados en células con el receptor opioide μ han indicado que la afinidad del Fentanilo es independiente del pH, mientras que su análogo fluorado se une débilmente a pH fisiológico. De este modo se podría favorecer la unión del análogo fluorado al receptor opioide μ sólo a pHs bajos, activándolo únicamente en la fuente de generación del dolor, donde se cree que el pH está por debajo de 7.4. Además, evita efectos secundarios asociados al Fentanilo, como síndrome de dificultad respiratoria, sedación y estreñimiento, incluso reduciendo su adicción.⁷⁸

El control de la basicidad también es muy común para modular la unión de inhibidores del canal de potasio cardíaco hERG, (*human ether-a-go-go related gene*), un fenómeno que se asocia a arritmias, y fosfolipidosis inducida, efectos que pueden ser provocados por ciertos farmacóforos. La sustitución de un átomo de hidrógeno por uno de flúor en el anillo de piperidina de un inhibidor de la quinasa Janus (JAK3, *Janus kinase 3*) reduce la capacidad de unión al canal hERG (Figura 0.4d), controlando así su inhibición.⁷⁹

⁷⁸ V. Spahn, G. Del Vecchio, D. Labuz, A. Rodriguez-Gaztelumendi, N. Massaly, J. Temp, V. Durmaz, P. Sabri, M. Reidelbach, H. Machelska, M. Weber, C. Stein, *Science* **2017**, 355, 966-969.

⁷⁹ Y. Nakajima, T. Inoue, K. Nakai, K. Mukoyoshi, H. Hamaguchi, K. Hatanaka, H. Sasaki, A. Tanaka, F. Takahashi, S. Kunikawa, H. Usuda, A. Moritomo, Y. Higashi, M. Inami, S. Shirakami, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 4871-4883.

OBJETIVOS GENERALES

En la Introducción de esta Tesis Doctoral se ha destacado la importancia de los métodos biocatalíticos en síntesis orgánica, gracias a la excelente selectividad desempeñada por los enzimas y a su capacidad de actuación en condiciones de reacción suaves y benignas con el medio ambiente. Dentro de los distintos tipos de biocatalizadores que se han desarrollado a lo largo de la última década, se pueden destacar aquellos que dan lugar a aminas quirales a partir de compuestos carbonílicos, tales como las transaminasas o las aminasas reductivas (RedAms). Asimismo, se ha destacado el creciente interés por los compuestos organofluorados debido a su importancia a la hora de diseñar nuevas moléculas, más concretamente en lo referente al desarrollo de nuevos fármacos. Con este propósito, esta Tesis Doctoral se ha orientado principalmente hacia la síntesis de derivados fluorados enantioenriquecidos, tales como las β -fluoroaminas, las β,β -difluoroaminas y los β -fluoroalcoholes, así como a estudiar la reactividad de compuestos α -halogenados con diversos tipos de biocatalizadores.

Así, en los Capítulos 1 y 2 nos centraremos en el estudio de la actividad catalítica promiscua de hidrodesfluoración mostrada por las transaminasas frente a aminas y a cetonas fluoradas. Más concretamente, en el Capítulo 1 se estudiará el desarrollo un método de obtención de β -fluoroaminas quirales mediado por transaminasas a través de un proceso tándem de hidrodesfluoración y desaminación mediante resolución cinética de los sustratos racémicos de partida. Posteriormente, en el Capítulo 2 nos centraremos en el estudio de la actividad promiscua de estos biocatalizadores para poner a punto una metodología biocatalítica con el fin de llevar a cabo la reducción de enlaces C–F mediante una reacción de hidrodesfluoración, e intentar obtener las correspondientes cetonas deshalogenadas en condiciones suaves de reacción y en medio acuoso. Asimismo, en los procesos de optimización se estudiará en detalle el papel del aceptor o donador del grupo amino, resultados con los que se podrían proponer los correspondientes mecanismos de reacción.

En el Capítulo 3 se desarrollará la síntesis asimétrica de 2,2-difluoroaminas partiendo de las correspondientes cetonas involucrando, bien transaminasas o bien RedAms, para tratar de acceder a aminas primarias y secundarias de manera enantiopura. En el caso de las reacciones catalizadas por TAs, de nuevo se estudiará la cantidad requerida del donador de amina, tratando de encontrar biocatalizadores estereocomplementarios. Para el caso de las RedAms, aunque el estudio se focalizará en

su reactividad con α,α -difluorocetonas, se emplearán otras cetonas fluoradas para dar cuenta de la actividad de estas oxidorreductasas con este tipo de sustratos, apenas estudiados hasta el momento, examinando en detalle además, el uso de diferentes aminas para observar si también influyen en la selectividad de los procesos.

Finalmente, en el Capítulo 4 se empleará una alcohol deshidrogenasa de *Pichia glucozyma* (KRED1-Pglu) para estudiar su reactividad en la biorreducción de una serie de α -fluorocetonas, lo que permitiría acceder a las correspondientes fluorohidrinas ópticamente activas. En este caso, además de optimizar diferentes parámetros en las biorreducciones, se prestará especial atención al tipo de preparación enzimática usada, realizando los procesos con células liofilizadas enteras de *E. coli* sobreexpresando de manera heteróloga dicha ADH, o bien utilizando el propio enzima una vez purificado.

Como objetivos globales se pretende demostrar la versatilidad que puede ofrecer la Biocatálisis, y más específicamente enzimas pertenecientes a las familias de las oxidorreductasas y transferasas, aplicadas a la síntesis de compuestos de gran interés como son los derivados organofluorados en condiciones suaves de reacción compatibles con la llamada Química Verde. Esto resulta especialmente de interés cuando se pretende introducir quiralidad en las moléculas, donde los enzimas a priori se presentan como catalizadores adecuados. Además, se pretende estudiar en detalle la reactividad especial que confieren los átomos de flúor en posición α a un grupo carbonilo frente a diversas clases de enzimas así como profundizar en las propiedades catalíticas inusuales de diversos enzimas (promiscuidad catalítica).

CAPÍTULO 1

Síntesis biocatalítica de β -fluoroaminas ópticamente activas mediante resoluciones cinéticas por hidrolesfluoración y desaminación

ANTECEDENTES

En la introducción de esta Tesis Doctoral se ha destacado la importancia de incorporar átomos de flúor en moléculas orgánicas debido a sus diversos beneficios,^{74,75} especialmente desde un punto de vista farmacológico. Adicionalmente, aquellos compuestos que presentan grupos nitrogenados en su estructura, como es el caso de las aminas, son muy importantes desde un punto de vista biológico ya que realizan múltiples funciones, bien de tipo regulador (neurotransmisores como la serotonina) o desempeñando un papel crucial en mecanismos de defensa como es el caso de la adrenalina. Existe otro grupo importante de aminas como son los alcaloides, compuestos que son sintetizados por algunos organismos vivos y utilizados en medicina mayoritariamente como analgésicos en pequeñas dosis, puesto que en mayor cantidad son tóxicos y pueden provocar incluso la muerte.

Por otro lado, el piridoxal 5'-fosfato (Esquema 0.4), una de las formas activas de la vitamina B₆, se ha identificado como cofactor necesario para la acción de muchos enzimas. Estas proteínas han sido objeto de varios estudios debido a su alta versatilidad catalítica, así como a su intervención en numerosos procesos celulares claves.⁸⁰ Entre otros, catalizan la síntesis, interconversión y degradación de aminoácidos, y reacciones de descarboxilación, además de estar involucradas en el metabolismo de aminoazúcares. De este modo, se las ha identificado como dianas terapéuticas para enfermedades tales como el Alzheimer, la epilepsia o el Parkinson.

⁸⁰ A. Amadasi, M. Bertoldi, R. Contestabile, S. Bettati, B. Cellini, M. L. di Salvo, C. Borri-Voltattorni, F. Bossa, A. Mozzarelli, *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1291-1324.

1.1.1. IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS FLUORADOS

Desde un punto de vista médico, la elevada presencia de átomos de flúor en estructuras de compuestos biológicamente activos pone de manifiesto su gran importancia a la hora de desarrollar nuevos fármacos. Desde la década de los 1950s se conocen los dos primeros fármacos sintéticos fluorados, la fludrocortisona y el 5-fluorouracilo (Figura 1.1).^{74f} El primero de ellos es un corticosteroide relacionado con la retención del sodio, y por tanto empleado en el tratamiento de trastornos renales, mientras que el segundo es un derivado de la base pirimidínica natural uracilo, que actúa como antimetabolito natural de este último, mostrando una potente actividad anticancerígena.⁸¹ Por ello, la búsqueda de análogos selectivos más efectivos es un área de investigación de interés, puesto que el 5-fluorouracilo presenta una elevada toxicidad.⁸²

En la Figura 1.1 también se muestran una serie de compuestos nitrogenados fluorados empleados como fármacos en el mercado, los cuales han mostrado numerosas actividades biológicas ventajosas, como la Sitagliptina (Januvia[®], Janumet[®]), el Escitalopram (Lexapro[®]), el Maraviroc (Selzentry[®]) y el Cinacalcet (Sensipar[®], Minpara[®]).^{74f,83} Merecen especial mención el Baloxavir marboxil (Xofluza[®]) y el Akynceo[®].⁸⁴ El primero fue desarrollado por el laboratorio farmacéutico japonés Shionogi para el tratamiento de la gripe de tipo A y B, siendo aprobado en octubre del 2018 para el tratamiento de la gripe severa por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, *Food and Drug Administration*). Por otro lado, Akynceo[®], desarrollado por la compañía farmacéutica suiza Helsinn, fue aprobado por la FDA también en 2018, y consiste en una combinación de Fosnetupitant y Palonosetrón, que se aplica como antiemético a pacientes que sufren vómitos y náuseas derivados de tratamientos quimioterapéuticos.

⁸¹ C. Heidelberger, N. K. Chaudhuri, P. Danneberg, D. Mooren, L. Griesbach, R. Duschinsky, R. J. Schnitzer, E. Plevin, J. Scheiner, *Nature* **1957**, 179, 663-666.

⁸² I. Ojima, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 6358-6383.

⁸³ O. I. Afanasyeb, E. Kuchuk, D. L. Usanov, D. Chusov, *Chem Rev.* **2019**, 119, 11857-11911.

⁸⁴ H. Mei, J. Han, S. Fustero, M. Medio-Simon, D. M. Sedgwick, C. Santi, R. Ruzziconi, V. A. Soloshonok, *Chem. Eur. J.* **2019**, 25, 11797-11819.

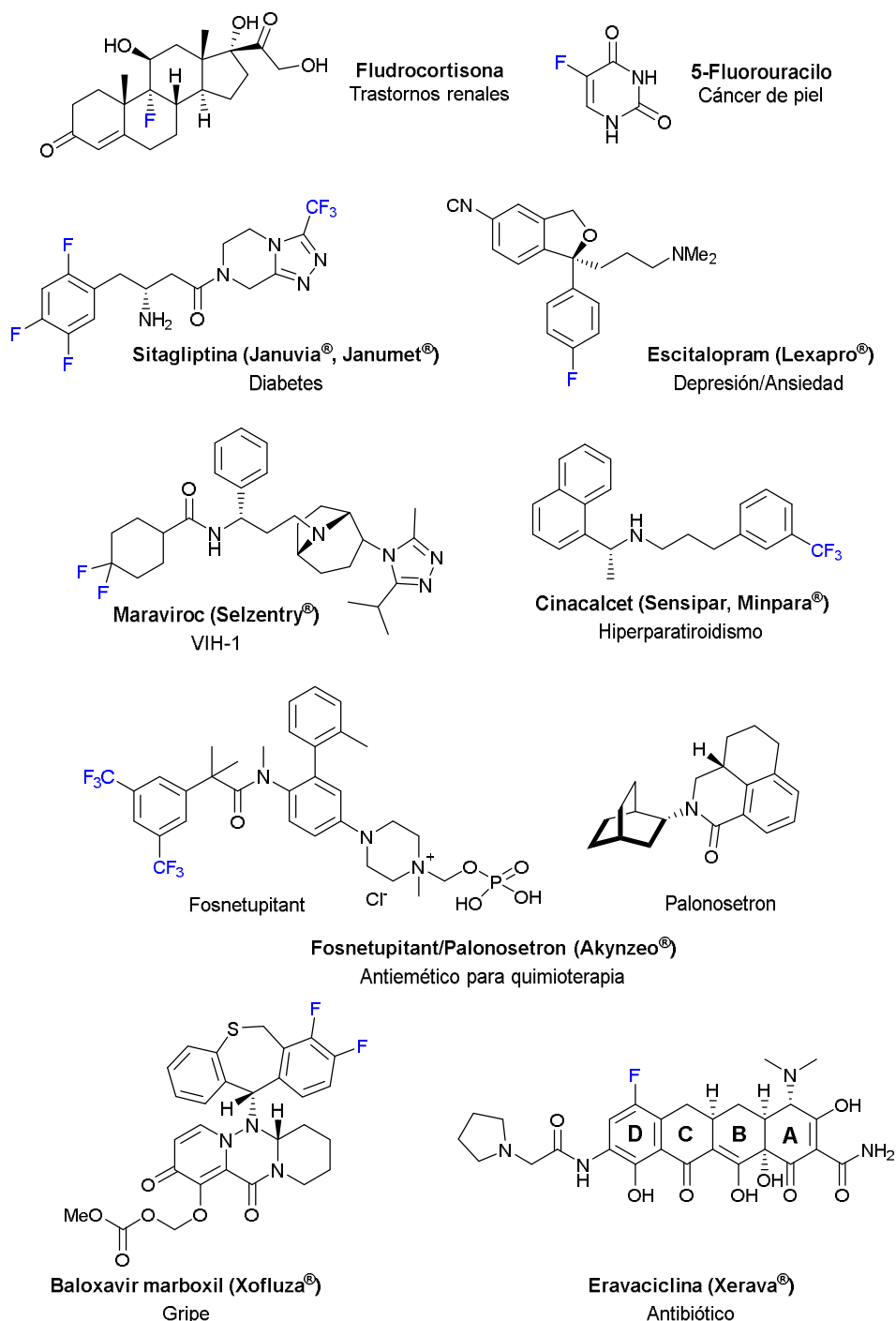


Figura 1.1. Estructuras químicas de fármacos nitrogenados y fluorados destacados.

En último lugar, cabe destacar también las tetraciclinas, agentes bacterianos de amplio espectro, útiles para el tratamiento de diversas infecciones. En particular, la Eravaciclina (Xerava®) es la primera fluorociclina completamente sintética, que ha mostrado ser particularmente eficaz para tratar tanto infecciones intraabdominales provocadas por bacterias Gram negativas multirresistentes como infecciones urinarias.⁸⁴

1.1.1.1. β -Fluoroaminas biológicamente activas

Este tipo de moléculas han mostrado propiedades farmacológicas destacadas, especialmente si las comparamos con sus análogos no fluorados. Así, el fragmento β -fluoroamina está presente en un amplio número de moléculas con un vasto potencial biológico, siendo capaz de reducir la toxicidad renal,⁸⁵ el eflujo de glicoproteínas P⁸⁶ y las inhibiciones no deseadas en los canales iónicos.⁸⁷ Un ejemplo de la eficiencia de este tipo de fármacos es el Sofosbuvir (Sovaldi[®], Virunon[®]), empleado actualmente en el tratamiento de la hepatitis C.⁸⁸ En la Figura 1.2 se ilustran algunas β -fluoroaminas representativas que presentan perfiles biológicos relevantes, como por ejemplo, el anteriormente mencionado Sofosbuvir, el denominado MK-0731 empleado para impedir la proliferación de células tumorales, el famoso inhibidor de la ácido γ -aminobutírico aminotransferasa (GABA-AT) y el llamado LY503430 empleado para tratar el Parkinson.⁸⁹

⁸⁵ J. P. Maianti, H. Kanazawa, P. Dozzo, R. D. Matias, L. A. Feeney, E. S. Armstrong, D. J. Hildebrandt, T. R. Kane, M. J. Gliedt, A. A. Goldblum, M. S. Linsell, J. B. Aggen, J. Kondo, S. Hanessian, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2067-2073.

⁸⁶ (a) K. Fjelbye, M. Marigo, R. P. Clausen, E. B. Jørgensen, C. T. Christoffersen, K. Juhl, *Med. Chem. Commun.* **2018**, *9*, 893-896; (b) E. J. Hicken, F. P. Marmsater, M. C. Munson, S. T. Schlachter, J. E. Robinson, S. Allen, L. E. Burgess, R. K. DeLisle, J. P. Rizzi, G. T. Topalov, Q. Zhao, J. M. Hicks, N. C. Kallan, E. Tarlton, A. Allen, M. Callejo, A. Cox, S. Rana, N. Klopfenstein, R. Woessner, J. P. Lyssikatos, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 78-83; (c) C. D. Cox, P. J. Coleman, M. J. Breslin, D. B. Whitman, R. M. Garbaccio, M. E. Fraley, C. A. Buser, E. S. Walsh, K. Hamilton, M. D. Schaber, R. B. Lobell, W. Tao, J. P. Davide, R. E. Diehl, M. T. Abrams, V. J. South, H. E. Huber, M. Torrent, T. Prueksaritanont, C. Li, D. E. Slaughter, E. Mahan, C. Fernández-Metzler, Y. Yan, L. C. Kuo, N. E. Kohl, G. D. Hartman, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4239-4252.

⁸⁷ S. P. Hameed, V. Patil, S. Solapure, U. Sharma, P. Madhavapeddi, A. Raichurkar, M. Chinnapattu, P. Manjrekar, G. Shanbhag, J. Puttur, V. Shinde, S. Menasinakai, S. Rudrapatana, V. Achar, D. Awasthy, R. Nandishaiah, V. Humnabadkar, A. Ghosh, C. Narayan, V. K. Ramya, P. Kaur, S. Sharma, J. Werngren, S. Hoffner, V. Panduga, C. N. N. Kumar, J. Reddy, M. Kumar KN, S. Ganguly, S. Bharath, U. Bheemaroo, K. Mukherjee, U. Arora, S. Gaonkar, M. Coulson, D. Waterson, V. K. Sambandamurthy, S. M. de Sousa, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4889-4905.

⁸⁸ B. M. Trost, J. S. Tracy, T. Yusoontorn, C.-I. J. Hung, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 2370-2374.

⁸⁹ D. E. Yerien, S. Bonesi, A. Postigo, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 8398-8427.

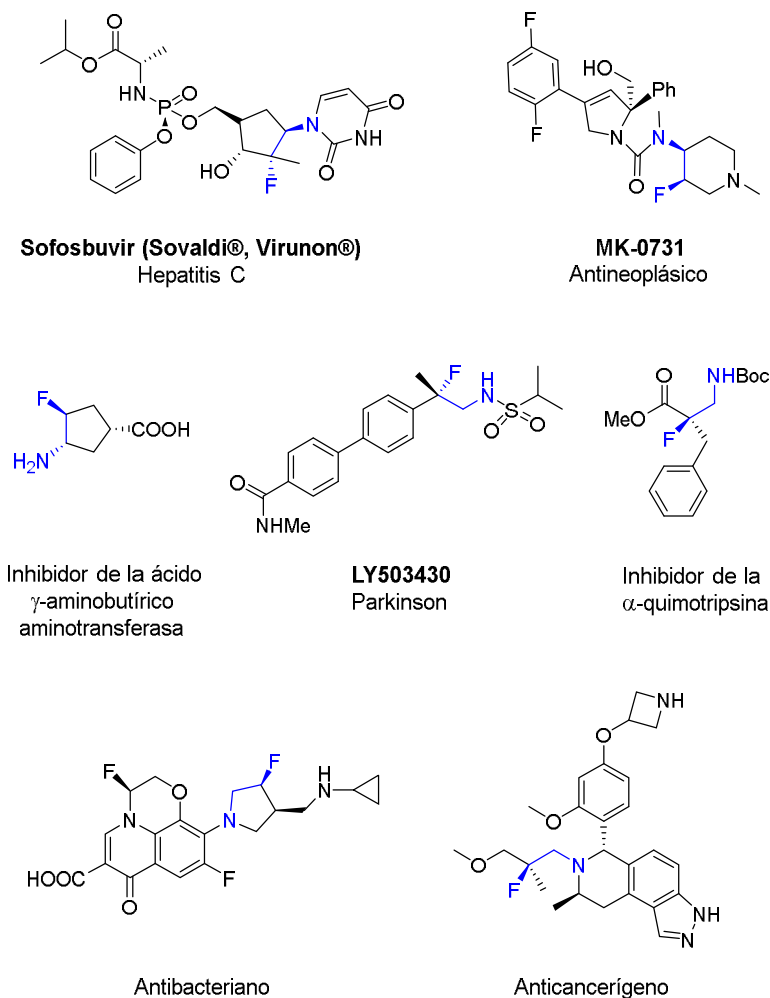


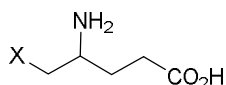
Figura 1.2. β -Fluoroaminas biológicamente activas.

1.1.2. AMINAS FLUORADAS COMO INHIBIDORES DE TRANSAMINASAS

Los enzimas dependientes de piridoxal 5'-fosfato se encuentran ampliamente distribuidas en procesos celulares e íntimamente asociadas con rutas biosintéticas donde están implicados compuestos que contienen grupos amino. Un factor importante es que se caracterizan por la cantidad de reacciones químicas que catalizan, de hecho, actualmente se les atribuye más de 230 funciones catalíticas distintas.^{25g} Uno de estos enzimas es la GABA-AT. El GABA es el neurotransmisor principal en el sistema nervioso central de los mamíferos, y su baja concentración parece estar relacionada con la aparición de enfermedades neurológicas como el Alzheimer o el Parkinson. Dicha concentración depende básicamente de dos enzimas, la GABA-AT, encargada de metabolizarlo, y la L-glutamato descarboxilasa, encargada de sintetizarlo. La solución

más eficaz a este problema sería la administración directa de GABA, sin embargo, este compuesto no es capaz de atravesar la membrana que rodea los capilares del sistema circulatorio en el cerebro.

Un enfoque alternativo para abordar este problema es el diseño de moléculas inhibitoras de la GABA-AT, de ahí que este enzima haya sido estudiado como diana terapéutica para tratar enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, Silverman y colaboradores han descrito ampliamente el papel de los ácidos 4-aminopentanoicos halogenados en posición 5 (Figura 1.3) como inhibidores de dicho enzima,⁹⁰ observando que cuando se incubaba la GABA-AT junto con los sustratos halogenados, reaccionaba aproximadamente un equivalente de dicho compuesto con la proteína, detectándose un cambio en el espectro visible-UV del enzima. Además, ha sido posible observar la aparición en disolución del correspondiente anión halogenuro que pudo ser cuantificado mediante estudios potenciométricos.⁹¹



X = F, Cl, Br

Figura 1.3. Ejemplos de ácidos 4-aminopentanoicos halogenados en la posición 5 utilizados como inhibidores de la GABA-AT.

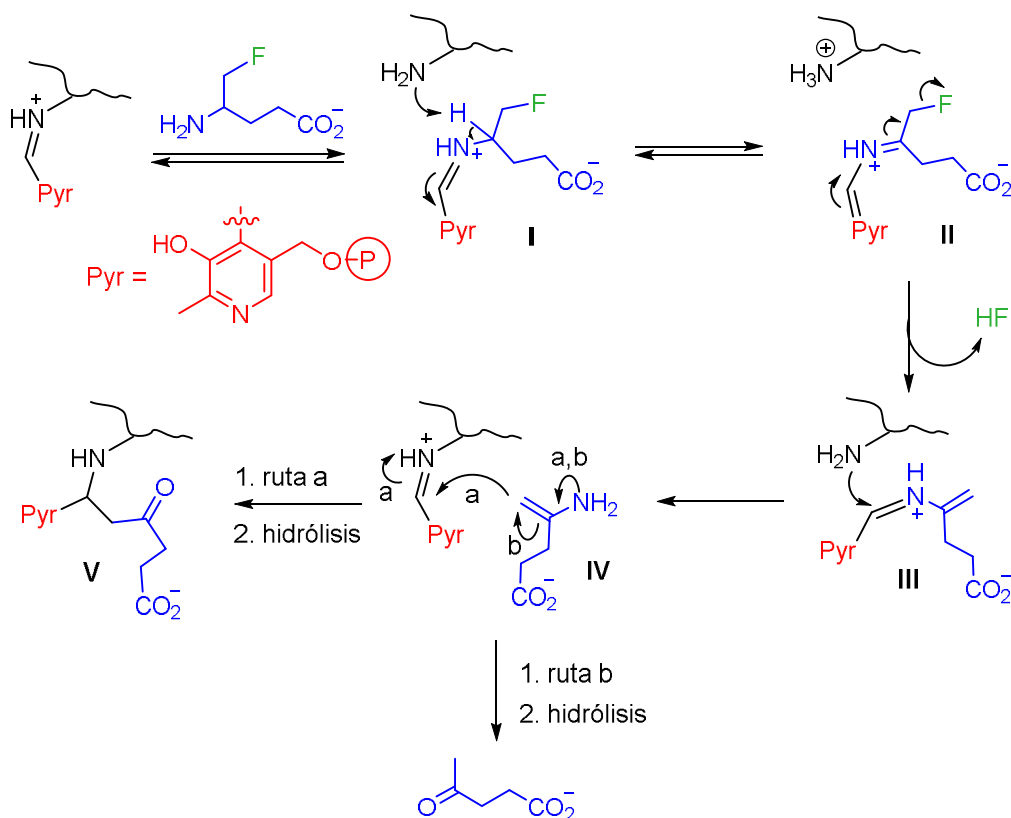
A su vez se observó que el derivado β,β -dihalogenado era un excelente inhibidor mientras que el β,β,β -trihalogenado no.⁹² Tras realizar diferentes estudios cinéticos con sustratos marcados isotópicamente se llegó a la conclusión de que el mecanismo por el cual estos compuestos podrían actuar sería el que se observa en el Esquema 1.1.⁹³

⁹⁰ R. B. Silverman, M. A. Levy, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 815-818.

⁹¹ R. B. Silverman, M. A. Levy, *Biochemistry* **1981**, *20*, 1197-1203.

⁹² P. Bey, M. J. Jung, F. Gerhart, D. Schirlin, V. Van Dorsselaer, P. Casara, *J. Neurochem.* **1981**, *37*, 1341-1344.

⁹³ R. B. Silverman, B. J. Invergo, *Biochemistry* **1986**, *25*, 6817-6820.

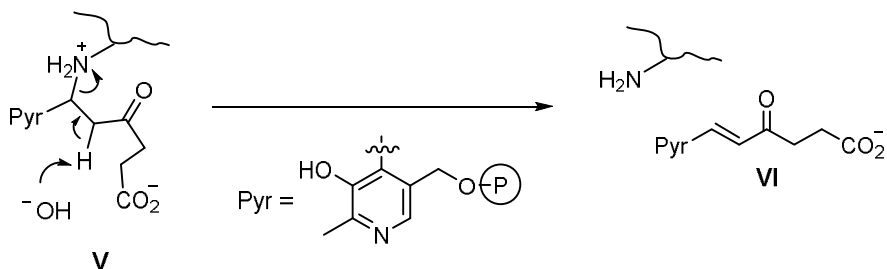


Esquema 1.1. Mecanismo de inhibición de la GABA-AT con el ácido 4-amino-5-fluoropentanoico.⁹³

Dicho mecanismo comenzaría con la interacción del sustrato halogenado con el PLP formando el típico aducto de tipo aldimina **I**. En el siguiente paso se produciría la isomerización de la aldimina a la cetimina **II**. Debido a la presencia del halógeno en posición α (flúor en este caso), en lugar de liberarse la cetona halogenada a través de un proceso de hidrólisis, se desprende el correspondiente halogenuro de hidrógeno mediante un proceso de eliminación, proceso posiblemente catalizado por el grupo amino perteneciente a un residuo de lisina que se encuentra en el centro activo, generándose el intermediario enámico **III**. Posteriormente, la lisina atacaría a la aldimina liberando la enamina deshalogenada **IV** que podría evolucionar a través de dos caminos diferentes. Si se sigue la *ruta a*, la enamina podría atacar a la aldimina formada entre la lisina catalítica y el PLP, dando lugar al aducto covalente **V** tras un proceso de hidrólisis de la imina intermedia. Esto provocaría la inactivación irreversible de la transaminasa.

Alternativamente siguiendo la *ruta b*, la enamina **IV** podría tautomerizar, y después de sufrir un proceso de hidrólisis, liberar el compuesto carbonílico deshalogenado. En este caso la transaminasa podría entrar en un nuevo ciclo catalítico,

puesto que seguiría siendo activa. Dicho mecanismo pudo ser demostrado mediante el tratamiento del aducto **V** en condiciones básicas, el cual generó como producto la especie **VI**, que pudo ser aislada y caracterizada (Esquema 1.2).⁹³



Esquema 1.2. Formación del compuesto **VI** por tratamiento de **V** en condiciones básicas.

Además de los derivados halogenados del GABA, se han estudiado también como inhibidores de la GABA-AT a los análogos fluorados de la β -alanina,⁹⁴ los ácidos 5-aminohexanoicos halogenados en posición 6,⁹² y los ácidos 4-amino-5-fluoropent-2-enoicos.⁹⁵ Todos ellos siguen el mecanismo de inhibición a través de la forma “enamina”, tal y como se describe en el Esquema 1.1. Mención especial requiere el compuesto **VII** (Figura 1.4), cuyo aducto de tipo **V** con la GABA-AT fue cristalizado y su estructura elucidada a través de un estudio de difracción de rayos X, siendo una prueba fehaciente de dicho mecanismo de inhibición.⁹⁶

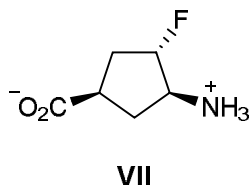


Figura 1.4. Inhibidor cíclico de la GABA-AT.

Otro ejemplo de TA desactivada por aminas β -halogenadas es la ornitina aminotransferasa, la cual en presencia de la 5-fluorometilornitina se inhibe,⁹⁷ aparentemente también mediante el mecanismo de inhibición a través de la “enamina”.

Hay que señalar que Silverman clasificó los inhibidores del GABA en 4 tipos diferentes.⁹⁸ Así, las aminas β -halogenadas las englobó dentro de la clase 2 mientras que

⁹⁴ D. Schirlin, S. Baltzer, J.-G. Heydt, M. J. Jung, *J. Enzyme Inhib.* **1987**, *1*, 243-258.

⁹⁵ R. B. Silverman, B. J. Invergo, J. Mathew, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1840-1846.

⁹⁶ P. Storici, J. Qiu, T. Schirmer, R. B. Silverman, *Biochemistry* **2004**, *43*, 14057-14063.

⁹⁷ F. N. Bolkenius, B. Knödgen, N. Seiler, *Biochem. J.* **1990**, *268*, 409-414.

a las cetonas α -halogenadas las incluyó dentro de las de tipo 4. Hasta ahora, existe un único ejemplo descrito en la literatura donde una α -fluorocetona ha demostrado ser inhibidor de la GABA-AT, empleando en este caso el ácido 5-fluoro-4-oxopentanoico.⁹⁹ Lógicamente en este caso el sustrato interacciona con la forma aminada del PLP, el PMP, para formar el intermedio **I**, el cual ya evoluciona del mismo modo siguiendo el mecanismo descrito en el Esquema 1.1.

1.1.3. EMPLEO DE TRANSAMINASAS CON COMPUESTOS FLUORADOS

Gracias a la amplia disponibilidad de transaminasas y su gran potencial sintético, trabajando en condiciones suaves de reacción y con alta (estereo)selectividad, este tipo de biocatalizadores se pueden considerar como una alternativa sostenible a las aproximaciones químicas clásicas para la síntesis de aminas. Su inclusión en rutas quimioenzimáticas, ha permitido la preparación de intermedios quirales y APIs, favoreciendo el desarrollo de procesos sintéticos más cortos y reduciendo la generación de residuos.^{64,25} Sin embargo, aún existen algunas limitaciones y retos a la hora de utilizar transaminasas en síntesis orgánica, especialmente a la hora de realizar estos procesos a escala industrial, como por ejemplo su alta especificidad de sustrato, equilibrios de reacción desfavorables o inhibición debido al sustrato o al producto. A continuación, se destacan algunos de los ejemplos más exitosos del uso de transaminasas en la preparación de compuestos fluorados con actividad biológica.

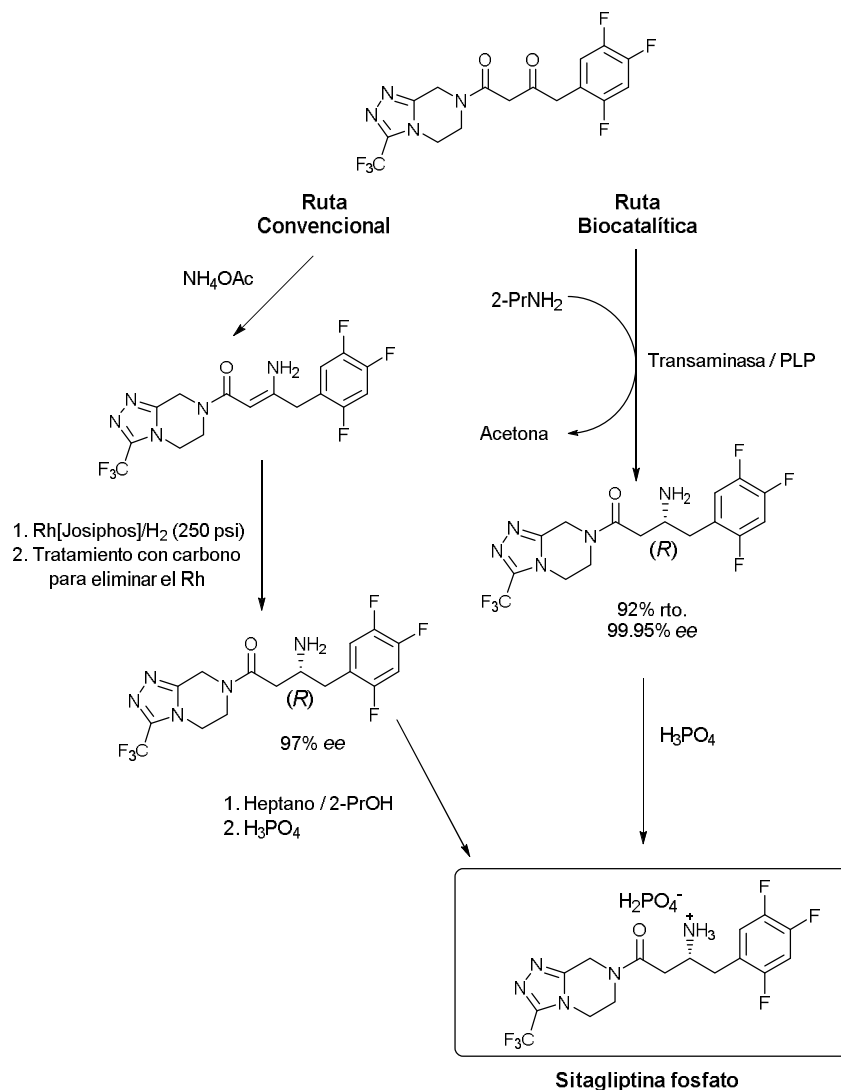
Sin lugar a duda, el ejemplo más exitoso y elegante del uso de transaminasas en síntesis farmacéutica, es el caso del antidiabético Sitagliptina.¹⁰⁰ Saville y colaboradores realizaron un cribado de transaminasas comerciales sobre una cetona precursora muy voluminosa, observándose una actividad enzimática nula, como cabría esperar debido a su gran tamaño. Sin embargo, mediante estudios de modelización molecular y tras varias rondas de mutaciones sobre una transaminasa de *Arthrobacter* sp., desarrollaron una variante enzimática con 27 mutaciones (ArRmut11-TA), que permitió la biotransaminación eficiente y estereoselectiva incluso a escala industrial (Esquema 1.3).

⁹⁸ (a) R. B. Silverman, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 4037-4070; (b) S. M. Nanavati, R. B. Silverman, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2413-2421.

⁹⁹ B. Lippert, B. W. Metcalf, R. J. Resvick, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *108*, 146-152.

¹⁰⁰ C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Branz, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305-309.

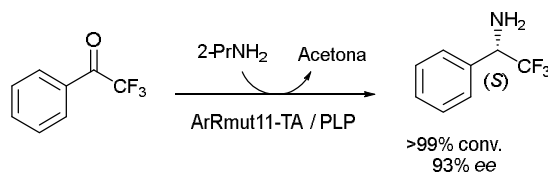
Cabe destacar que el proceso enzimático fue capaz de reemplazar a la ruta convencional que implicaba la reducción asimétrica de una enamina precursora de la Sitagliptina catalizada por un compuesto de rodio, mejorando el rendimiento y disminuyendo la generación de residuos y los costes.



Esquema 1.3. Síntesis catalítica convencional y biocatalítica de la Sitagliptina.

El enzima desarrollado para la síntesis de la Sitagliptina admite un mayor número de sustratos y aumenta la tolerancia a altas concentraciones del donador de amina, así como de elevadas proporciones de disolventes orgánicos, lo cual aumenta su utilidad práctica. De este modo, se ha descrito la preparación estereoselectiva de distintas 1-ariletan-1-aminas con sustituyentes electroattractores, encontrando entre ellas la (S) -1-fenil-2,2,2-trifluoroetan-1-amina (Esquema 1.4).¹⁰⁰ Asimismo, en un trabajo posterior,

Truppo y colaboradores inmovilizaron este biocatalizador en una resina de polimetacrilato (SEPABEADS EXE120) con el fin de sintetizar los derivados anteriores, presentando la ventaja del posible reciclaje del enzima durante varios ciclos de reacción.¹⁰¹



Esquema 1.4. Síntesis de la (S)-1-fenil-2,2,2-trifluoroetan-1-amina con una transaminasa diseñada mediante estudios de modelización molecular.

Investigadores de Pfizer han descrito una ruta quimioenzimática, empleando una transaminasa, para la síntesis de intermedios quirales claves de un inhibidor de γ -secretasa con potencial actividad antitumoral (Figura 1.5a). La ATA-47 comercial del kit de la casa comercial CLecta, resultó ser el enzima más eficiente en la biotransaminación de una tetralona difluorada, proporcionando la correspondiente amina de configuración *S*.¹⁰² Posteriores transformaciones químicas, incluyendo un proceso de biorreducción asimétrico del 2-oxopentanoato de *tert*-butilo catalizado por una ADH comercial, condujo a la preparación del inhibidor deseado que contiene dos centros quirales.

Por último, otro ejemplo destacable es el uso de la transaminasa de *Vibrio fluvialis* (Vf-TA) para la producción de la (S)-1-(5-fluoropirimidin-2-il)etan-1-amina, precursora clave en la síntesis del inhibidor de la quinasa JAK2, AZD1480, desarrollado por la empresa farmacéutica AstraZeneca para el tratamiento de la mielofibrosis idiopática y la policitemia vera (Figura 1.5b).¹⁰³ Tras la optimización del proceso, que incluyó la utilización de (S)- α -metilbencilamina como donador de amina y tolueno como cosolvente, se empleó una preparación comercial del enzima, obteniéndose el precursor enantiopuro con un rendimiento del 77%. Asimismo, mediante el uso de células enteras

¹⁰¹ M. D. Truppo, H. Strotmann, G. Hughes, *ChemCatChem* **2012**, 4, 1071-1074.

¹⁰² M. Burns, C. A. Martinez, B. Vanderplas, R. Wisdom, S. Yu, R. A. Singer, *Org. Process Res. Dev.* **2017**, 21, 871-877.

¹⁰³ (a) R. E. Meadows, K. R. Mulholland, M. Schürmann, M. Golden, H. Kierkels, E. Meulenbroeks, D. Mink, O. May, C. Squire, H. Straatman, A. S. Wells, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, 17, 1117-1122; (b) L. Frodsham, M. Golden, S. Hard, M. N. Kenworthy, D. J. Klauber, K. Leslie, C. Macleod, R. E. Meadows, K. R. Mulholland, J. Reilly, C. Squire, S. Tomasi, D. Watt, A. S. Wells, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, 17, 1123-1130.

recombinantes de *E. coli* fue posible obtener la (*S*)-1-(5-fluoropirimidin-2-il)-etanamina con un 66% de rendimiento y una pureza óptica del 97.3%. Esta biotransaminación fue integrada en una ruta quimioenzimática propuesta como una alternativa prometedora a la ruta clásica, mostrando el gran potencial de la combinación de la biocatálisis con otros procesos químicos.

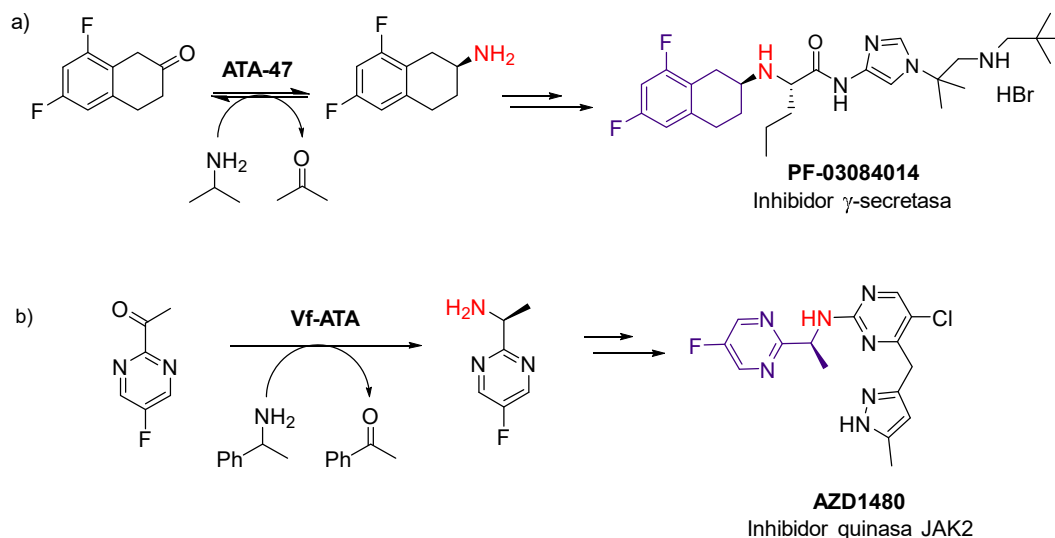


Figura 1.5. Ejemplos seleccionados de aplicación de transaminasas en la síntesis de aminas quirales fluoradas.

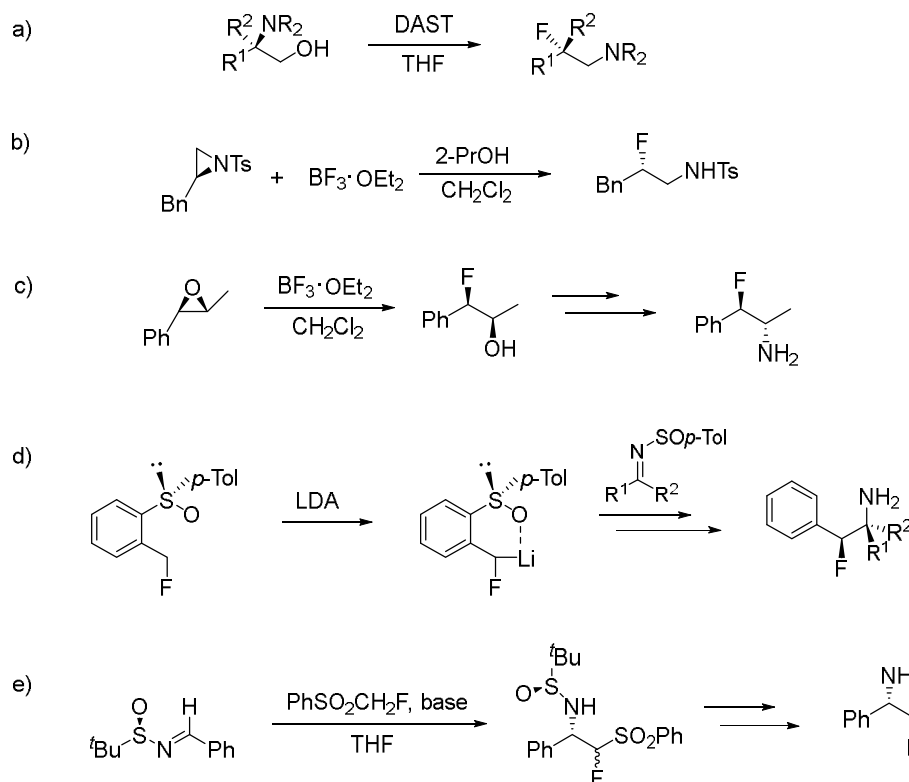
1.1.4. METODOLOGÍAS QUÍMICAS PARA OBTENER β -FLUOROAMINAS ÓPTICAMENTE ACTIVAS

Las rutas sintéticas para obtener este tipo de moléculas han ido evolucionando con el tiempo, descubriéndose nuevas metodologías recientemente. Por ello, se puede decir que la síntesis de β -fluoroaminas ópticamente activas es un campo de investigación que se encuentra en continuo desarrollo. Podemos distinguir una serie de metodologías eficientes como monofluoraciones químicas o procesos asimétricos catalizados por compuestos químicos o enzimas, los cuales se discuten a continuación.

1.1.4.1. Monofluoraciones químicas

La monofluoración de compuestos orgánicos para obtener β -fluoroaminas ha sido desarrollada con éxito empleando el trifluoruro de dietilaminoazufre (DAST), el difluorotrimetilsilicato de tris(dimetilamino)sulfonio (TASF), o sales conteniendo

fluoruro de hidrógeno (HF) con reactivos orgánicos que actúan como bases. Así, Cossy y colaboradores han descrito el uso del DAST para transformar β -aminoalcoholes en β -fluoroaminas a través de un proceso de inversión de configuración,¹⁰⁴ induciendo además un reagrupamiento por asistencia anquimérica de la amina vecinal al grupo hidroxilo formando un catión aziridinio intermedio (Esquema 1.5a). La desventaja de esta metodología radica en la necesidad de utilizar sustratos enantiopuros, sin embargo, ha permitido la síntesis éxito del fármaco LY503430 empleado en el tratamiento del Parkinson como se ha comentado anteriormente.



Esquema 1.5. Algunas metodologías para obtener β -fluoroaminas enantioenriquecidas.

El grupo de Hou ha desarrollado una reacción de apertura de aziridinas para formar β -fluoroaminas usando el eterato de trifluoruro de boro ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) en presencia de 2-propanol,¹⁰⁵ obteniendo las correspondientes fluorhidrinas con alta regioselectividad y rendimiento. Se observó que los tres átomos de flúor del complejo reaccionaban incorporándose al átomo de carbono más impedido. Al utilizar un sustrato

¹⁰⁴ B. Duthion, D. Gomez-Pardo, J. Cossy, *Org. Lett.* **2010**, 12, 4620-4623.

¹⁰⁵ C.-H. Ding, L.-X. Dai, X.-L. Hou, *Synlett* **2004**, 12, 2218-2220.

enantioenriquecido se obtuvo el producto final sin pérdida de exceso enantiomérico (Esquema 1.5b).

Por otro lado, Davies y colaboradores¹⁰⁶ también han utilizado el complejo $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ para llevar a cabo la apertura de aril epóxidos y demostrar que en la estrategia de fluoración nucleofílica el mecanismo es de tipo $\text{S}_{\text{N}}1$, existiendo una racemización/epimerización debido a la aparición de carbocationes bencílicos. Partiendo de un derivado enantioenriquecido, se obtuvo el correspondiente β -fluoroalcohol quiral, que por posterior reacción de mesilación, sustitución con azida de sodio y reducción en condiciones de Staudinger dio lugar a la β -fluoroamina ópticamente activa (Esquema 1.5c).

Otras metodologías que se han descrito para la síntesis de β -fluoroaminas, son la adición de un carbanión fluorado estabilizado sobre *N-p*-tolilsulfiniliminas, generando así las 2-fenil-2-fluoroetan-1-aminas diastereoenriquecidas (Esquema 1.5d),¹⁰⁷ o una reacción de adición nucleófila de la fluorometil fenil sulfona en presencia de una base sobre (*R*)-*N*-(*tert*-butilsulfinil)iminas a bajas temperaturas (Esquema 1.5e).¹⁰⁸

1.1.4.2. Reacciones catalíticas

La síntesis de aminas fluoradas empleando métodos organocatalíticos ha sido especialmente descrita por el grupo de Lindsley, mediante el desarrollo de α -fluoraciones de aldehídos empleando diversos organocatalizadores y un agente de fluoración como la *N*-fluorobencenosulfonimida (NFSI) para la síntesis de β -fluoroaminas sobre carbonos primarios (Esquema 1.6a).¹⁰⁹ Con estos precedentes, Pyne y colaboradores han sintetizado α -alil- β -fluoroaminas a partir de α -fluoroaldehídos quirales, alcanzado diastereoselectividades *anti* y excesos enantioméricos excelentes (Esquema 1.6b).¹¹⁰ Para ello emplearon la NFSI y un organocatalizador quiral, obteniendo los correspondientes aldehídos α -fluorados, que luego se hicieron reaccionar

¹⁰⁶ A. J. Creswell, S. G. Davies, J. A. Lee, P. M. Roberts, A. J. Russell, J. E. Thomson, M. J. Tyte, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2936-2939.

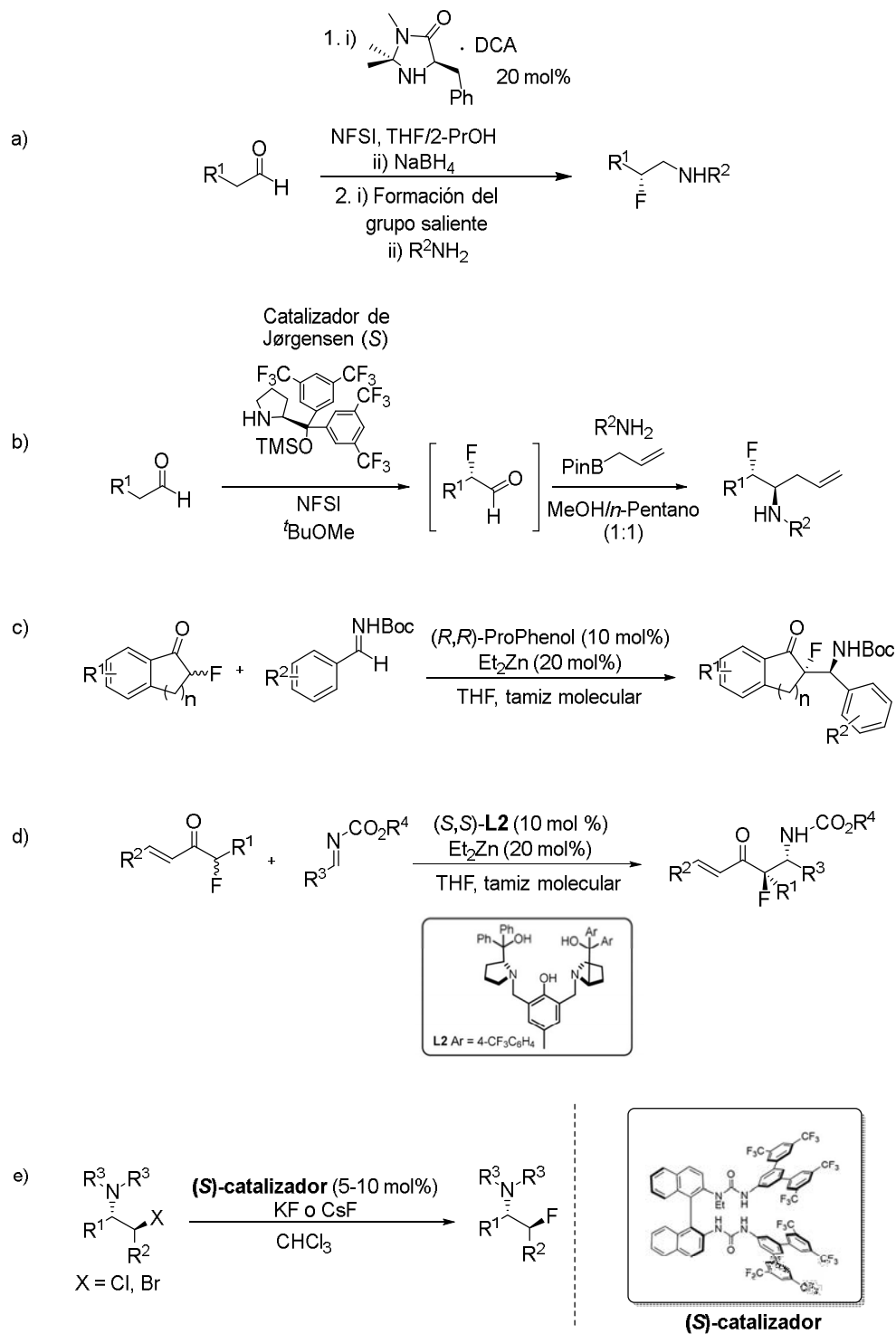
¹⁰⁷ J. L. García Ruano, A. Parra, I. Alonso, S. Fustero, C. del Pozo, Y. Arroyo, A. Sanz-Tejedor, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6142-6147.

¹⁰⁸ Y. Li, C. Ni, J. Liu, L. Zhang, J. Zheng, L. Zhu, J. Hu, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1693-1696.

¹⁰⁹ (a) M. C. O'Reilly, C. W. Lindsley, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 3627-3629; (b) M. L. Schulte, C. W. Lindsley, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5684-5687; (c) O. O. Fadeyi, C. W. Lindsley, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 943-946.

¹¹⁰ P. J. Chevis, S. Wangngae, T. Thaima, A. W. Carroll, A. C. Willis, M. Pattarawarapan, S. G. Pyne, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 6050-6053.

con aminas primarias y alilboronato de pinacol, con el fin de obtener las β -fluoroaminas aliladas deseadas.



Esquema 1.6. Metodologías catalíticas para obtener β -fluoroaminas enantioenriquecidas.

Otro tipo de catalizadores son los desarrollados por Trost y colaboradores para llevar a cabo reacciones de Mannich.^{88,111} Este sistema catalítico empleó un ligando quirál derivado de prolinol (ProPhenol) en combinación con Et₂Zn para generar una especie dinuclear de zinc *in situ*. De esta manera fueron capaces de hacer reaccionar distintas α -fluorocetonas con un amplio número de iminas en presencia del mencionado sistema catalítico (Esquemas 1.6c y d), dando lugar a los productos deseados con estereocentros tetrasustituídos y excelentes enantio- y diastereoselectividades.

En último lugar, cabe destacar la metodología desarrollada recientemente por Gouverneur y colaboradores,¹¹² basada en el empleo de un catalizador de transferencia de fase con enlace de hidrógeno, del inglés, HB-PTC, formado por un catalizador de urea. Al añadir un agente fluorante sólido (KF o CsF), este catalizador actuó como agente de transporte del agente fluorante hacia la disolución mediante la formación de un complejo de flúor *in situ* a través de enlaces de hidrógeno, que reaccionó como nucleófilo. De este modo, tiene lugar la fluoración enantioselectiva de β -haloaminas racémicas permitiendo el acceso a β -fluoroaminas de alto valor (Esquema 1.6e). Además, este catalizador poseía la ventaja de poder reutilizarse.¹¹³ Esta metodología sintética estaba inspirada en el mecanismo catalítico de la fluorinasa,^{68,69,70} un enzima capaz de formar enlaces C–F, cuyo mecanismo se describió más detalladamente en la Introducción de esta Tesis Doctoral (Sección 0.4).

1.1.4.3. Biotransformaciones

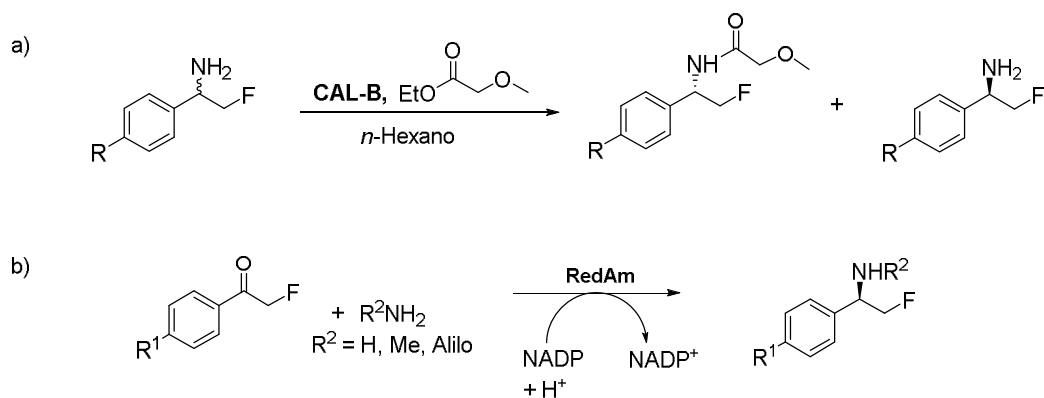
En lo que se refiere a la Biocatálisis, también se han empleado procesos estereoselectivos para obtener aminas fluoradas. Así, está descrita la resolución cinética de β -fluoroaminas aromáticas a través de un proceso de acilación enantioselectiva utilizando la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B),¹¹⁴ obteniendo una serie de 1-aril-2-fluoroetan-1-aminas y sus correspondientes metoxiacetamidas con altos excesos enantioméricos (Esquema 1.7a).

¹¹¹ B. M. Trost, T. Saget, A. Lerchen, C.-I (J.) Hung, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 781-784.

¹¹² G. Pupo, F. Ibba, D. M. H. Ascough, A. C. Vicini, P. Ricci, K. E. Christensen, L. Pfeifer, J. R. Morphy, J. M. Brown, R. S. Paton, V. Gouverneur, *Science* **2018**, *360*, 638-642.

¹¹³ G. Pupo, A. C. Vicini, D. M. H. Ascough, F. Ibba, K. E. Christensen, A. L. Thompson, J. M. Brown, R. S. Paton, V. Gouverneur, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 2878-2883.

¹¹⁴ T. H. K. Thvedt, E. Fuglseth, E. Sundby, B. H. Hoff, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6733-6743.



Esquema 1.7. Metodologías biocatalíticas para obtener β-fluoroaminas enantioenriquecidas.

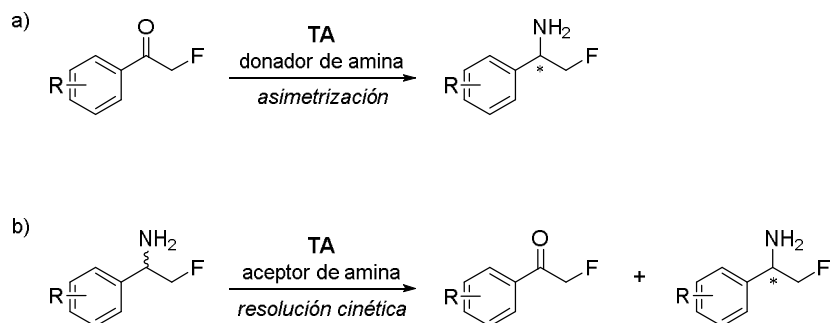
Más recientemente, nuestro grupo de investigación, en colaboración con el grupo del Prof. Grogan, de la Universidad de York, ha puesto a punto la aminación reductiva de α-fluoroacetofenonas (Esquema 1.7b), empleando una clase de imino reductasas, llamadas RedAms (del inglés, “*reductive aminases*”) provenientes de hongos para obtener las β-fluoroaminas primarias o secundarias enantiopuras en la gran mayoría de los casos.¹¹⁵ Esta transformación se discutirá en más detalle en el Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral.

¹¹⁵ D. González-Martínez, A. Cuetos, M. Sharma, M. García-Ramos, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, G. Grogan, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 2421-2425.

OBJETIVOS

En base a las posibilidades sintéticas de las transaminasas, la importancia biológica de las aminos fluoradas, y la necesidad de desarrollar métodos generales de obtención de β -fluoroaminas ópticamente activas, en este capítulo nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

- Diseñar una metodología enzimática sencilla para la síntesis de β -fluoroaminas enantioenriquecidas empleando, bien α -fluoroacetofenonas proquirales (a través de procesos de asimetrización, Esquema 1.8a) o bien β -fluoroaminas (a través de procesos de resolución cinética, Esquema 1.8b), como productos de partida y transaminasas como biocatalizadores.
- Sintetizar químicamente y caracterizar una serie de α -fluoroacetofenonas proquirales con buenos rendimientos y alta pureza.
- De la misma manera, sintetizar las correspondientes 1-aril-2-fluoroetan-1-aminas racémicas, lo que permitiría desarrollar métodos analíticos adecuados para la monitorización de las reacciones catalizadas por los enzimas, empleando por ejemplo, la técnica de cromatografía de gases para poder medir las conversiones y selectividades de los procesos biocatalizados.
- Demostrar la versatilidad de este tipo de transformaciones mediante el desarrollo de biotransformaciones a escala multimiligramo.



Esquema 1.8. Empleo de transaminasas para la síntesis estereoselectiva de 1-aril-2-fluoroetan-1-aminas.

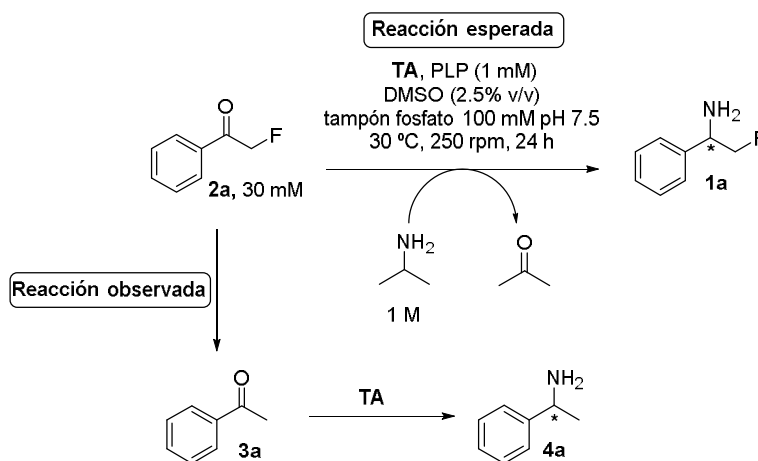
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido al creciente interés de la aplicabilidad sintética de las transaminasas para la obtención de aminas enantiopuras, y el efecto inhibitor de las aminas β -halogenadas con los enzimas dependientes de PLP, nos planteamos la obtención de una serie de β -fluoroaminas quirales por aminación de las correspondientes cetonas α -fluoradas.

1.3.1. PRUEBAS ENZIMÁTICAS DE ASIMETRIZACIÓN

1.3.1.1. Reacción de la 2-fluoroacetofenona (**2a**) en presencia de TAs comerciales empleando 2-propilamina como donador de amina

En primer lugar, decidimos utilizar un kit comercial de 23 transaminasas de la empresa Codexis, 11 *S*-selectivas y 12 *R*-selectivas, con el fin de sintetizar la 1-fenil-2-fluoroetan-1-amina (**1a**) enantiopura. En este punto, se pensó que la metodología más eficiente sería la aminación de la cetona fluorada en posición α (**2a**), puesto que así teóricamente podríamos obtener los productos deseados con un 100% de rendimiento (Esquema 1.9). Las primeras pruebas¹¹⁶ se llevaron a cabo en las condiciones típicas con estos enzimas utilizando el sustrato **2a** (30 mM) en presencia de un tampón fosfato (100 mM, pH 7.5), con 2-propilamina como donador de amina (1 M) y un pequeño porcentaje de DMSO (2.5% v/v) como cosolvente para solubilizar a **2a** en el medio acuoso. Las biotransformaciones se llevaron a cabo a 30 °C durante 24 h utilizando agitación orbital (250 rpm). Los resultados se muestran en la Figura 1.6.



Esquema 1.9. Transaminación de la α -fluoroacetofenona **2a** usando 2-propilamina como donador de amina.

¹¹⁶ Estas primeras pruebas fueron realizadas por el Dr. Aníbal Cueto en nuestro grupo de investigación.

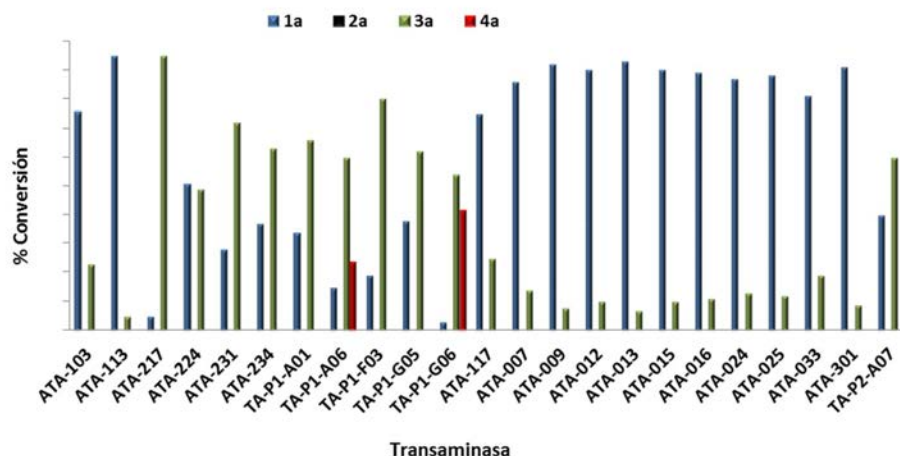


Figura 1.6. Conversiones obtenidas en la reacción de la cetona fluorada **2a** con distintas transaminasas comerciales en presencia de 2-propilamina.

De los resultados obtenidos se pueden sacar dos conclusiones fundamentales:

- 1) En ningún caso se observó conversión alguna hacia la amina fluorada **1a** esperada, obteniéndose en cambio en muchos de los casos la acetofenona **3a** (barras verdes).
- 2) Salvo para la TA-P1-A06 y la TA-P1-G06, dicha cetona no se transformó en la 1-feniletan-1-amina (**4a**, barras rojas). Este hecho llama la atención puesto que sabíamos por resultados previos que prácticamente todas estas transaminasas aceptaban la acetofenona dando lugar a **4a**.¹¹⁷

1.3.1.2. Influencia del donador de amina en la transaminación de **2a**

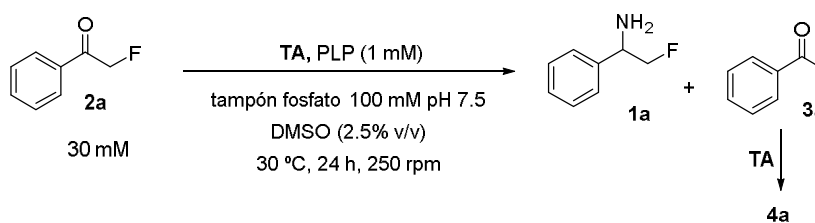
Para estudiar la posible influencia del donador de amina sobre este sustrato se realizó la misma reacción enzimática, pero utilizándose alanina en lugar de 2-propilamina, y por tanto lactato deshidrogenasa y glucosa deshidrogenasa como sistema de eliminación del piruvato formado (Esquema 0.6). Inicialmente, se escogieron un grupo reducido de transaminasas comerciales (ATA-103, ATA-113, ATA-234 y ATA-117) para este estudio. Los resultados obtenidos fueron similares, por lo que junto con el hecho de que este sustrato era estable en presencia de todos los reactivos en ausencia del enzima (lo que comúnmente se conoce como prueba en blanco), corroboró que el

¹¹⁷ C. E. Paul, M. Rodríguez-Mata, E. Busto, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, S. García-Cerrada, J. Mendiola, Ó. de Frutos, I. Collado, *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 788-792.

sistema de regeneración del cofactor PLP no jugaba un papel importante en la reactividad observada.

Posteriormente, se optó por investigar la reacción de transaminación de la cetona **2a** en ausencia de la 2-propilamina empleada como donador del grupo amino (Tabla 1.1). Así, como biocatalizadores se eligieron 3 que daban lugar a cantidades apreciables de la cetona **3a** (ATA-231 y TA-P1-F03, Figura 1.6), o incluso de la amina **4a** (TA-P1-G06, Figura 1.6). En estas condiciones, se detectaron solamente trazas de la acetofenona, recuperándose casi completamente el sustrato de partida.

Tabla 1.1. Conversiones obtenidas para el proceso de aminación en ausencia de 2-propilamina.



Entrada	TA	1a (%) ^a	2a (%) ^a	3a (%) ^a	4a (%) ^a
1	ATA-231	<1	95	5	<1
2	TA-P1-F03	<1	98	2	<1
3	TA-P1-G06	<1	97	3	<1

^a Conversiones medidas por cromatografía de gases con fase estacionaria quiral.

1.3.1.3. Estudio del efecto inhibitorio de **2a** sobre la transaminación enzimática del acetoacetato de etilo (**5**)

El hecho de que la α -fluorocetona **2a** resultara ser estable en el medio de reacción, y de que solo se modificara en presencia del enzima parecía indicar que esta cetona sí que podía actuar como sustrato del mismo. Sin embargo, que diera lugar a la cetona deshalogenada **3a** y que esta no se pudiera transformar en la correspondiente amina **4a**, parecía señalar que la transaminasa se estuviera inactivando. Para demostrar este hecho, se decidieron realizar una serie de experimentos en los que se empleó un sustrato estructuralmente diferente a la cetona fluorada para que, una vez comprobada su reactividad con una serie de TAs, repetir los experimentos en presencia de **2a** para ver si efectivamente las transaminasas se inactivaban. El sustrato modelo escogido fue el acetoacetato de etilo (**5**).

1.3.1.3.1. Reacción de transaminación del acetoacetato de etilo

Llegados a este punto, además de utilizar algunas de las transaminasas comerciales mostradas anteriormente, decidimos emplear una serie de enzimas sobreexpresadas en *E. coli* donadas por el Prof. Wolfgang Kroutil de la Universidad de Graz (Austria): las TAs *S*-selectivas de *Chromobacterium violaceum* (CV-TA),¹¹⁸ y *Arthrobacter citreus* (ArS-TA),¹¹⁹ y la TA *R*-selectiva de *Arthrobacter* sp. natural, (ArR-TA),¹²⁰ así como otra proveniente de la ArR-TA con una serie de mutaciones en su estructura (ArRmut11-TA) pero que actúa con la misma selectividad.¹⁰⁰ Estas preparaciones enzimáticas se usaron como células enteras liofilizadas, lo que facilita su manejo y almacenamiento en largos periodos de tiempo conservando su actividad.

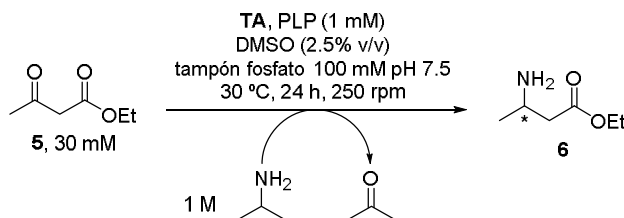
Todas ellas han demostrado que pueden actuar sobre cetonas tanto alifáticas como aromáticas mostrando buenos niveles de actividad y selectividades excelentes.^{31c,31e,120a,121} Así, en primer lugar se estudió la transaminación del cetoéster **5** para obtener el aminoéster **6**, empleando las condiciones de reacción anteriores, es decir, con 2-propilamina como donador de amina (Tabla 1.2).

¹¹⁸ U. Kaulmann, K. Smithies, M. E. B. Smith, H. C. Hailes, J. M. Ward, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 628-637.

¹¹⁹ S. Pannuri, S. V. Kamat, A. R. M. Garcia, Cambrex North Brunswick Inc., PCT Int. Appl. WO 063336A2 20060615, **2006**.

¹²⁰ (a) F. G. Mutti, C. S. Fuchs, D. Pressnitz, J. H. Sattler, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 3227-3233; (b) A. Iwasaki, Y. Yamada, N. Kizaki, Y. Ikenaka, J. Hasegawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *69*, 499-505; (c) Y. Yamada, A. Iwasaki, N. Kizaki, K. Matsumoto, Y. Ikenaka, M. Ogura, J. Hasegawa, Kaneka Corporation, PCT Int. Appl. WO 9848030A1 19981029, **1998**.

¹²¹ F. G. Mutti, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 3409-3413.

Tabla 1.2. Biotransaminación del sustrato modelo **5** empleando transaminasas comerciales y sobreexpresadas en *E. coli*.

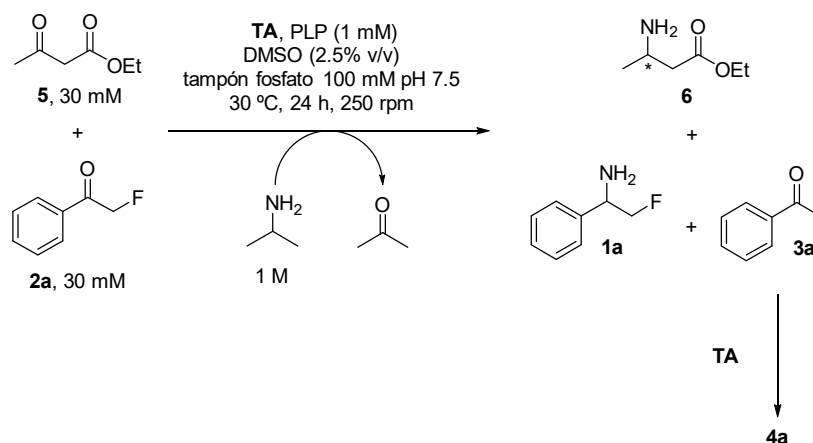
Entrada	TA	6 (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b
1	TA-P1-A01	>99	90 (<i>S</i>)
2	TA-P1-F03	>99	98 (<i>S</i>)
3	ATA-113	>99	94 (<i>S</i>)
4	ATA-015	>99	n.d.
5	CV-TA	97	86 (<i>S</i>)
6	ArS-TA	97	n.d.
7	ArR-TA	27	82 (<i>R</i>)
8	ArRmut11-TA	96	70 (<i>R</i>)

^a Conversiones calculadas por cromatografía de gases con fase estacionaria aquiral. ^b Excesos enantioméricos medidos mediante cromatografía de gases con fase estacionaria quiral. n.d. No determinado.

Como puede observarse, para el caso de las transaminasas comerciales (entradas 1 a 4), las conversiones fueron cuantitativas. Asimismo, con los enzimas sobreexpresados (entradas 5 a 8) se obtuvieron resultados similares, exceptuando en la entrada 7 donde se apreció una conversión más baja para la ArR-TA. También se observó una buena estereoselectividad en estos procesos, con altos valores de los excesos enantioméricos en general (70-98% *ee*).

1.3.1.3.2. Reacción de transaminación de **5** en presencia de **2a**

Tras analizar los resultados anteriores se propuso demostrar el posible efecto inhibitorio de la cetona **2a** sobre las transaminasas a la hora de obtener el aminoéster **6** (Esquema 1.10). Por ello, las reacciones del apartado anterior se repitieron añadiendo 1 equivalente de la amina **2a** al medio de reacción, recogiendo los resultados en la Tabla 1.3.



Esquema 1.10. Test de inhibición de la cetona **2a** en la reacción de transaminación del cetoéster **5** con varias transaminasas.

Al añadir 1 equivalente de la cetona **2a**, para tres de los enzimas comerciales (entradas 2 a 4) y para tres de los enzimas sobreexpresados (entradas 6 a 8), se observó una elevada inactivación enzimática puesto que las conversiones hacia **6** disminuyeron enormemente, llegándose a inactivar completamente la ATA-113 o la ATA-015. Además, dicha inhibición parecía no tener una correlación clara con la cantidad de cetona deshalogenada **3a** puesto que en algunos de los casos se detectó una cantidad mínima de la misma (entradas 3, 4, 6 y 8), mientras que en otros casos se formó una cantidad apreciable (entradas 2 y 7).

Por otro lado, destaca que para los casos de la TA-P1-A01 (entrada 1) y la CV-TA (entrada 5), se obtuvo una conversión excelente respecto a la transaminación del cetoéster **5**, generándose tanto **6** como la acetofenona **3a**. Además, para el caso del enzima sobreexpresado se detectó la formación de la amina **4a**, lo que parece indicar que esta transaminasa no se inhibía rápidamente. Como era de esperar, la prueba en blanco (entrada 9), no dio lugar a la formación de ninguno de los productos finales.

Tabla 1.3. Conversiones obtenidas en los test de inhibición mezclando las cetonas **2a** y **5**.

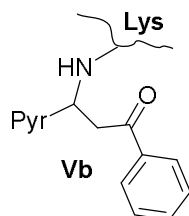
Entrada	TA	5 (%) ^a	6 (%) ^a	1a (%) ^a	2a (%) ^a	3a (%) ^a	4a (%) ^a
1	TA-P1-A01	10	90	<1	64	36	<1
2	TA-P1-F03	88	12	<1	76	24	<1
3	ATA-113	>99	<1	<1	97	3	<1
4	ATA-015	>99	<1	<1	98	2	<1
5	CV-TA	2	98	<1	<1	69	31
6	ArS-TA	88	12	<1	97	3	<1
7	ArR-TA	98	2	<1	79	21	<1
8	ArRmut11-TA	93	7	<1	95	5	<1
9	-	>99	<1	<1	>99	<1	<1

^a Conversiones medidas por cromatografía de gases con fase estacionaria aquiral.

Estos resultados parecen sugerir que, por un lado, existe inhibición enzimática de las TAs cuando se emplean cetonas α -fluoradas, y en los casos en que es muy acusada no parece tener una correlación clara con la cantidad de producto deshalogenado obtenido, aunque sugiere que cuanto más lenta es dicha inhibición, mayor es la cantidad de cetona desfluorada **3a** obtenida. En uno de los casos incluso se pudo llegar a obtener la amina proveniente de dicha cetona, aunque en el resto de los casos no fue así.

1.3.1.4. Mecanismo propuesto

Con los precedentes descritos en la bibliografía y los resultados obtenidos hasta aquí podemos proponer un mecanismo dual como el descrito en el Esquema 1.1. Así, la 2-fluoroacetofenona reaccionará en el centro activo de la TA dando lugar, bien al aducto covalente **Vb** (Figura 1.7) que inhibirá la transaminasa (equivalente al aducto **V** en el Esquema 1.1, *ruta a*), o bien acetofenona **3a** (Esquema 1.1, *ruta b*).

**Figura 1.7.** Aducto covalente formado con la TA empleando la cetona fluorada **2a**.

Este mecanismo dual explicaría los diferentes resultados obtenidos con las transaminasas empleadas. De este modo, dependiendo de la estructura del centro activo del enzima se favorecerá una posibilidad u otra. Analizando dichos resultados se puede concluir que una buena parte de los biocatalizadores reaccionan con **2a** preferentemente a través de la *ruta a*, ya que la gran mayoría de las transaminasas *R*-selectivas

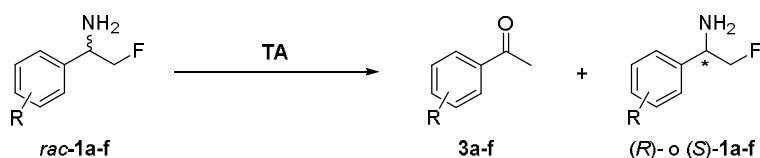
comerciales, así como las transaminasas ArS-TA y ArRmut11-TA sobreexpresadas en *E. coli*, dan lugar a bajas concentraciones de acetofenona al final de la reacción, con lo que se podría esperar un elevado grado de inhibición enzimática.

En el caso opuesto están aquellos enzimas como la TA-P1-A06, la TA-P1-G06 y la CV-TA, en los que además de obtenerse una elevada concentración de acetofenona (**3a**), se observa incluso la formación de la 1-feniletan-1-amina (**4a**), lo que nos indicaría que estas transaminasas reaccionan preferentemente a través de la *ruta b*, con lo que se inhibirían más lentamente.

Finalmente, en un caso intermedio, estaría otro grupo de biocatalizadores (como la gran mayoría de las transaminasas *S*-selectivas comercializadas por Codexis y la ArR-TA), en las que se forma una cantidad apreciable de acetofenona, pero los enzimas se inhiben con la suficiente rapidez como para que no se perciba una conversión apreciable hacia la amina **4a**.

1.3.2. PRUEBAS ENZIMÁTICAS DE RESOLUCIÓN CINÉTICA

Puesto que nuestro principal interés era encontrar una metodología enzimática que nos permitiera sintetizar β -fluoroaminas enantioenriquecidas, y ya que el método más favorable, sintéticamente hablando, de la aminación directa partiendo de las α -fluorocetonas no daba lugar a los derivados deseados, se optó por cambiar de estrategia sintética. Así, ya que habíamos encontrado transaminasas sobreexpresadas en *E. coli* relativamente estables frente a **2a**, tales como la CV-TA o la ArR-TA, nos propusimos partir de las β -fluoroaminas racémicas y realizar su resolución cinética a través de un proceso combinado de desaminación y deshalogenación como se muestra en el Esquema 1.11.

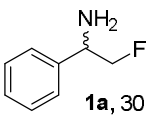
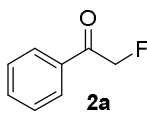
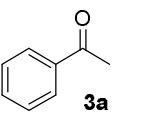
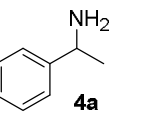


Esquema 1.11. Resolución cinética de las β -fluoroaminas **1a-f** catalizada por transaminasas a través de un proceso concurrente de desaminación y deshalogenación.

1.3.2.1. Reacción de 1a con TAs. Comparación con otros biocatalizadores

Una vez planteada esta hipótesis de trabajo, decidimos llevar a cabo la reacción enzimática con algunas transaminasas de Codexis sobre la amina fluorada racémica comercial **1a** en las condiciones de trabajo más sencillas posibles, esto es, sin adicionar ningún aceptor del grupo amino como podría ser la acetona, ni tampoco el cofactor, puesto que dichas preparaciones contienen PLP (Tabla 1.4). Además, se incluyó en el estudio otro tipo de proteínas/microorganismos para comparar los resultados obtenidos con las TAs y descartar una posible catálisis inespecífica.¹²²

Tabla 1.4. Reacción de **1a** empleando diversas transaminasas, proteínas o microorganismos.

 1a, 30 mM Proteína/Microorganismo DMSO (2.5% v/v) tampón fosfato 100 mM pH 7.5 30 °C, 24 h, 250 rpm  2a +  3a +  4a					
Entrada	TA	1a (%) ^a	2a (%) ^a	3a (%) ^a	4a (%) ^a
1	ATA-231	88	<1	12	<1
2	TA-P1-F03	66	<1	34	<1
3	TA-P1-G06	41	<1	59	<1
4	BSA ^b	>99	<1	<1	<1
5	CAL-B ^c	>99	<1	<1	<1
6	<i>E. coli</i> ^d	>99	<1	<1	<1

^a Conversiones medidas por cromatografía de gases con fase estacionaria aquiral. ^b Albúmina de suero bovino. ^c Lipasa de tipo B de *Candida antarctica* (Novozyme 435). ^d Células liofilizadas de *E. coli* Top10.

Por tanto, se eligieron 3 transaminasas comerciales (ATA-231, TA-P1-F03 y TA-P1-G06, entradas 1 a 3), así como una serie de proteínas pertenecientes a otros grupos diferentes a las transferasas como la proteína de transporte albúmina de suero bovino (BSA, *bovine serum albumin*, entrada 4) y la CAL-B (entrada 5). Además, se realizó una prueba con células liofilizadas de *E. coli* (entrada 6), que son el soporte biológico de las transaminasas no comerciales estudiadas en este trabajo, lo que nos mostraría si algunos de los enzimas endógenos podrían transformar **1a**. Satisfactoriamente, se observó que las TAs reaccionaban con la amina fluorada dando lugar, en mayor o menor medida, a la cetona deshalogenada **3a** incluso en ausencia de un aceptor del grupo amino, mientras que las demás preparaciones enzimáticas no afectaron a la estabilidad del compuesto de partida, por lo que los resultados obtenidos se pueden

¹²² Dícese de la catálisis debida a aminoácidos que no forman parte del centro activo del enzima y que por lo tanto no intervienen en la reacción natural para la cual han sido diseñados.

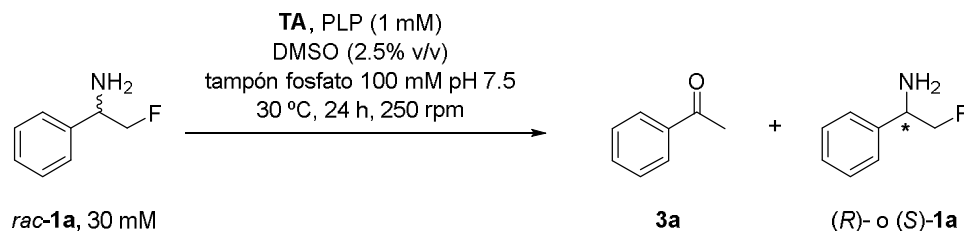
interpretar como una interacción real de este sustrato con la transaminasa y no debido a reacciones inespecíficas. Además, hay que destacar que en ningún caso se observó la presencia de la cetona fluorada **2a** ni de la amina **4a**.

1.3.2.2. Resolución cinética de 1a con transaminasas sobreexpresadas en *E. coli*

Una vez corroborada la actividad específica de este sustrato con las transaminasas, nos propusimos estudiar su posible resolución cinética empleando tanto algunos enzimas comerciales como sobreexpresados en *E. coli* (Tabla 1.5). En este caso decidimos además añadir al medio de reacción el cofactor PLP (1 mM), para asegurarnos tener una cantidad suficiente del mismo. Asimismo, vistos los resultados anteriores se optó por no añadir ningún compuesto aceptor de amina (por ejemplo, acetona). De entre las TAs sobreexpresadas, se eligieron la CV-TA y la ArR-TA ya que mostraron una mayor estabilidad frente a los sustratos fluorados.

Así, partiendo de la mezcla racémica de la amina **1a**, en el mejor de los casos, se podría llegar a obtener el sustrato remanente enantiopuro con un rendimiento máximo teórico del 50%, además de otro 50% de la cetona deshalogenada **3a**. Hay que tener en cuenta además que aquellas transaminasas *S*-selectivas reaccionarán con el enantiómero *R* de la amina debido al cambio de preferencia en la nomenclatura Cahn-Ingold-Prelog (CIP), dejando intacto el enantiómero *S*, y viceversa.

Tabla 1.5. Conversiones y *ee* obtenidos en las resoluciones cinéticas sobre **1a** catalizadas por transaminasas.



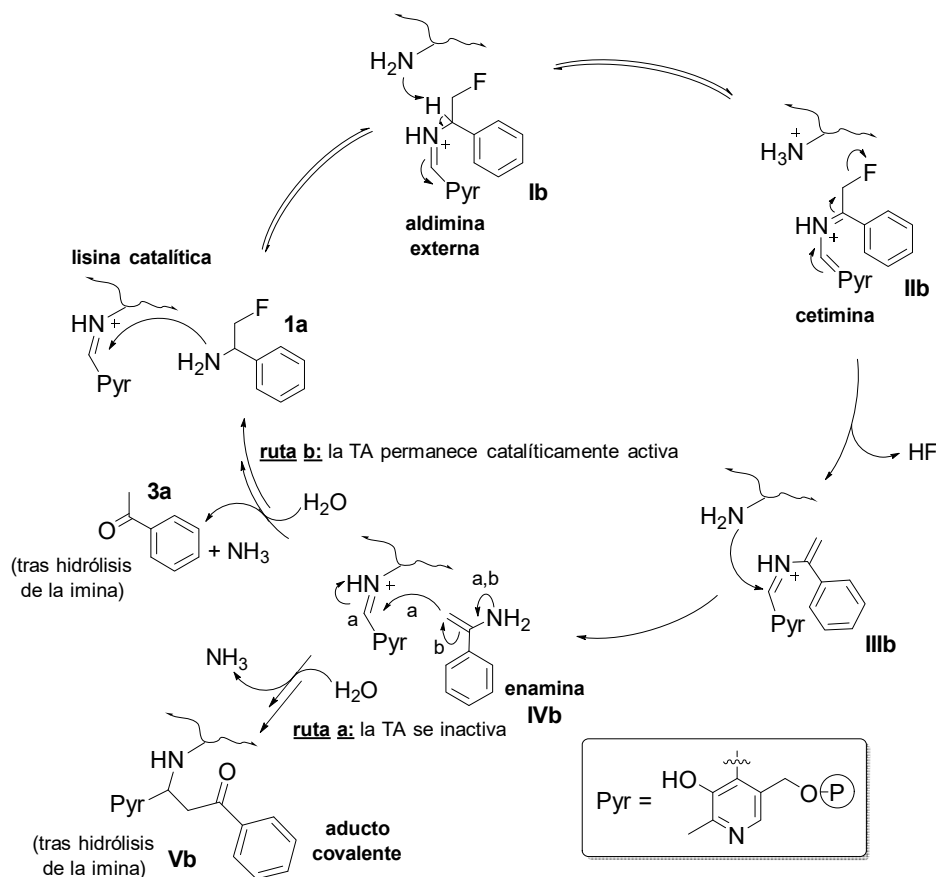
Entrada	TA	1a (%) ^a	ee 1a (%) ^b	2a (%) ^a	3a (%) ^a	4a (%) ^a
1	ATA-231	41	n.d.	<1	59	<1
2	TA-P1-F03	53	n.d.	<1	46	<1
3	TA-P1-G06	28	n.d.	<1	71	<1
4	CV-TA	47	>99 (<i>S</i>) ^c	<1	53	<1
5	ArR-TA	78	23 (<i>R</i>) ^c	<1	22	<1

^a Conversiones medidas por cromatografía de gases con fase estacionaria aquiral. ^b Excesos enantioméricos medidos por cromatografía de gases con fase estacionaria quiral de los derivados N-acetilados. ^c Cambio de la preferencia en la nomenclatura CIP. n.d. No determinado.

En estas transformaciones se apreció únicamente la desfluoración y desaminación del sustrato dando lugar a la cetona **3a**, no observándose en ningún caso ni la cetona **2a** ni la amina **4a**. Resultados especialmente destacables fueron los alcanzados con la CV-TA (entrada 4), ya que permitió acceder a la amina enantiopura con una conversión próxima al 50%. Para el caso de las demás transaminasas, o las conversiones eran menores al 50% (entradas 2 y 5), o demasiado altas (entradas 1 y 3).

1.3.2.3. Mecanismo propuesto

De nuevo en base a los precedentes descritos en la bibliografía y a los resultados experimentales obtenidos con la amina fluorada **1a**, se propone el mecanismo dual mostrado en el Esquema 1.12.



Esquema 1.12. Mecanismo dual de inhibición de la TA (*ruta a*) y de formación de la acetofenona **3a** (*ruta b*) empleando la β-fluoroamina **1a**.

En un primer paso, la amina **1a** interactuará con la aldimina formada entre el PLP y la lisina catalítica formando el intermediario aldímínico típico **Ib** (equivalente al intermediario **I** del Esquema 1.1), que tras varios pasos tal como se describe en dicho

esquema, evolucionará hacia la enamina deshalogenada **IVb**. Llegados a este punto, el sistema puede seguir a través de dos caminos de reacción distintos. Si la enamina queda “retenida” el suficiente tiempo en el centro activo de la transaminasa, atacará a la imina formada entre el PLP y la lisina catalítica generando un aducto imínico, que tras ser hidrolizado generará el producto **Vb** (*ruta a*). Si por el contrario esta enamina difunde rápidamente hacia la disolución generará, tras un paso de hidrólisis, la acetofenona **3a** (*ruta b*).

Como se puede observar también, esta reacción conlleva además la ventaja de no tener que utilizar un agente aceptor de amina, ya que el grupo amino del sustrato **1a** no se transfiere a otro compuesto, sino que simplemente difunde al medio de reacción dando lugar a la formación de una molécula de amoníaco. Formalmente, este proceso de hidrodesfluoración solamente requiere una molécula de agua para formar otra molécula de fluoruro de amonio.

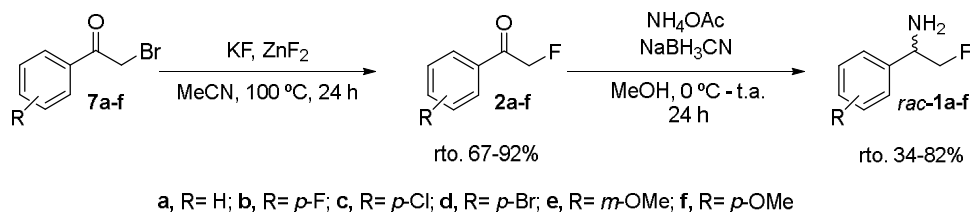
1.3.2.4. Síntesis de las 1-aril-2-fluoroetan-1-aminas racémicas de partida

Una vez demostrada la posibilidad de obtener β -fluoroaminas enantioenriquecidas, decidimos preparar una familia de aminas fluoradas aromáticas. Para ello se siguió una ruta sintética de dos pasos que se muestra en el Esquema 1.13. Partiendo de las cetonas bromadas **7a-f**, disponibles comercialmente, se sustituyó el átomo de bromo por el flúor a través de un proceso de sustitución nucleófila bimolecular mediante la adición en el medio de dos sales de flúor como son el fluoruro de zinc (ZnF_2) y el fluoruro de potasio (KF). Dichas transformaciones se realizaron en tubo sellado con acetonitrilo como disolvente y durante 24 horas a 100 °C, sintetizando los derivados **2a-f** con unos rendimientos de entre el 67 y el 92%.¹²³ Hay que reseñar que estas cetonas fluoradas son extremadamente volátiles, por lo que cualquier proceso realizado a presión reducida requirió hacerse con extrema precaución.

En el segundo y último paso de la secuencia sintética se llevó a cabo la aminación reductiva de las cetonas fluoradas en presencia de acetato amónico y cianoborohidruro de sodio en metanol seco como disolvente a temperatura ambiente durante 24 h,¹¹⁷ obteniendo las aminas racémicas deseadas con unos rendimientos de entre el 34 y el

¹²³ (a) C. Zizhan, W. Zhu, Z. Zheng, X. Zou, *J. Fluor. Chem.* **2010**, 131, 340-344; (b) W. Borzęcka, I. Lavandera, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 7312-7317.

82%. De nuevo estos compuestos finales son muy volátiles, por lo que hay que trabajar con ellos con mucho cuidado.



Esquema 1.13. Síntesis de las aminas racémicas de partida **1a-f**.¹²⁴

1.3.2.5. Resoluciones cinéticas de las 1-aril-2-fluoroetan-1-aminas utilizando TAs sobreexpresadas en *E. coli*

Una vez sintetizados los sustratos de partida, se llevaron a cabo las resoluciones cinéticas de las aminas **1a-f** con la CV-TA y la ArR-TA, tal como se hizo para el sustrato modelo **1a** (Tabla 1.6). Asimismo, se realizaron un par de pruebas en blanco en ausencia del enzima, con o sin PLP, para demostrar si las aminas fluoradas podían reaccionar en el medio de reacción sin mediación del biocatalizador. En la mayoría de los casos se alcanzaron conversiones superiores al 50%, siendo posible la preparación de ambas antípodas con *ee* excelentes. En algún caso se detectó que las aminas se transformaban en la correspondiente cetona deshalogenada en ausencia de la TA, lo que puede contribuir a aumentar ligeramente la conversión final observada, aunque siempre estas conversiones fueron muy bajas (<5%). En general, la CV-TA mostró mejores resultados con la gran mayoría de los sustratos analizados. Asimismo, se demostró la estereopreferencia de estos procesos con ambos enzimas, siendo la CV-TA *R*-selectiva, y la ArR-TA *S*-selectiva debido al cambio de preferencia en la nomenclatura CIP de los sustituyentes unidos al carbono quiral.

¹²⁴ Las aminas **1a** y **1d** no fueron sintetizadas porque son comercialmente accesibles.

Tabla 1.6. Conversiones y *ee* medidos en las resoluciones cinéticas de **1a-f** con TAs sobreexpresadas en *E. coli*.

$\text{rac-1a-f, 30 mM} \xrightarrow[\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4\text{F}]{\text{TA, PLP (1 mM), DMSO (2.5\% v/v), tampón fosfato 100 mM pH 7.5, 30 °C, 24 h, 250 rpm}} \text{3a-f} + \text{(R)- o (S)-1a-f}$

a, R= H; b, R= *p*-F; c, R= *p*-Cl; d, R= *p*-Br; e, R= *m*-OMe; f, R= *p*-OMe

R	conv. (%) ^a		<i>ee</i> (%) ^{b,c}		Sustrato sin enzima		Sustrato sin enzima ni PLP	
	CV	ArR	CV	ArR	3a-f (%)	1a-f (%)	3a-f (%)	1a-f (%)
H (a)	53	22	99 (<i>S</i>)	23 (<i>R</i>)	1	98	<1	>99
<i>p</i> -F (b)	50	67	99 (<i>S</i>)	>99 (<i>R</i>)	5	95	5	95
<i>p</i> -Cl (c)	52	51	>99 (<i>S</i>)	>99 (<i>R</i>)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -Br (d)	51	28	>99 (<i>S</i>)	55 (<i>R</i>)	<1	>99	<1	>99
<i>m</i> -OMe (e)	60	54	>99 (<i>S</i>)	>99 (<i>R</i>)	<1	>99	<1	>99
<i>p</i> -OMe (f)	55	55	99 (<i>S</i>)	>99 (<i>R</i>)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a Conversiones medidas por cromatografía de gases con fase estacionaria aquiral. ^b Excesos enantioméricos medidos por cromatografía de gases con fase estacionaria quiral de los derivados N-acetilados. ^c Cambio de la preferencia en la nomenclatura CIP. n.d. No determinado.

A continuación, se llevaron a cabo las resoluciones cinéticas en escala semipreparativa empleando las aminas racémicas **1a** y **1d** (100 mg, 30 mM) con la transaminasa CV-TA, obteniendo tras 32 horas de incubación los correspondientes derivados enantiopuros (*S*)-**1a** y (*S*)-**1d**, con rendimientos aislados del 35 y 40% respectivamente, después de un simple proceso de extracción ácido-base (Figura 1.8) para separarlas de las cetonas deshalogenadas.

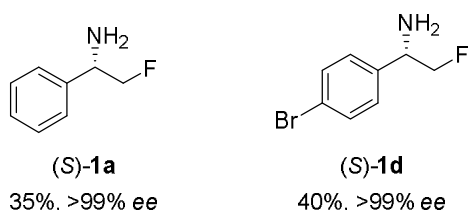


Figura 1.8. Rendimientos obtenidos en los procesos catalizados por la CV-TA con las aminas racémicas **1a** y **1d** a una escala de 100 mg de sustrato.

1.3.2.6. Estudios estructurales. Prueba del mecanismo propuesto

En último lugar, con el fin de evidenciar el mecanismo de inhibición propuesto en el Esquema 1.12, se determinó la estructura de rayos X a partir de la cristalización de la

ArRmut11-TA tras incubación con la amina racémica **1d** en colaboración con el Prof. Gideon Grogan de la Universidad de York (Reino Unido). Además, los cristales del enzima inhibido son isomorfos de la ATA-117 descrita en el Protein Data Bank (3WWJ)^{100,125} y pertenecen al grupo espacial $P2_1$. La estructura de la proteína se muestra en la Figura 1.9.

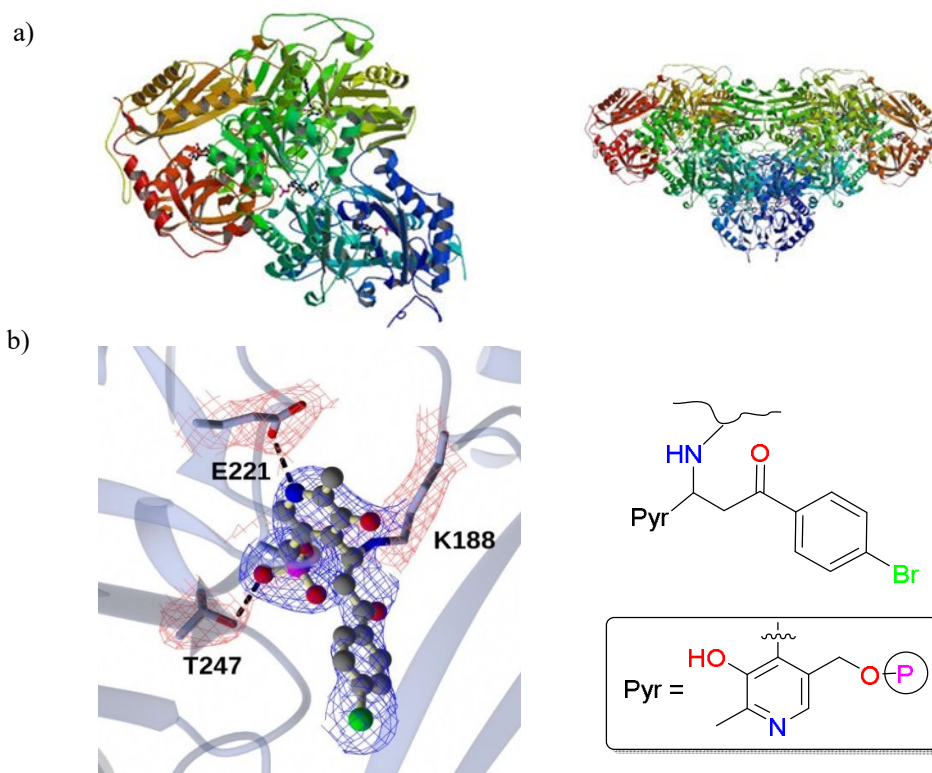


Figura 1.9. a) Izquierda: Estructura de ArRmut11-TA inhibida con la 1-(4-bromofenil)-2-fluoroetan-1-amina, PDB: 5FR9. Derecha: se muestra la unidad asimétrica compuesta por 6 dímeros. b) Izquierda: Centro activo de la ArRmut11-TA después de la reacción con **1d**. Se muestra el PLP unido covalentemente a K188 y al ligando proveniente de **1d**, representado por el complejo **Vb**, como se muestra en el Esquema 1.12. El aducto de PLP se muestra en formato de barras y esferas. Derecha: Representación esquemática del complejo **Vb**.

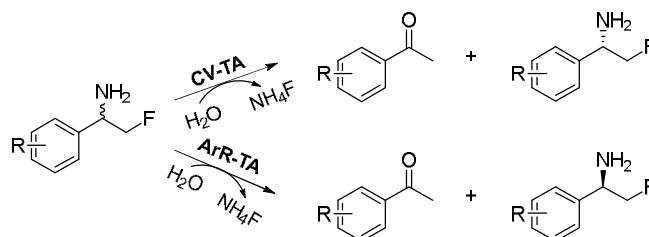
Después de construir y refinar la estructura, se observó densidad electrónica en dos direcciones: la primera conecta el carbono bencílico del PLP a la cadena lateral de la Lys188, mientras que la segunda conecta dicho carbono del PLP con la parte proveniente de **1d**, demostrándose así el aducto covalente resultante de la inhibición

¹²⁵ (a) M. M. Heberling, Genomics-based discovery and engineering of biocatalysts for conversion of amines, *University of Groningen*, **2017**, p. 222; (b) L.-J. Guan, J. Ohtsuka, M. Okai, T. Miyakawa, T. Mase, Y. Zhi, F. Hou, N. Ito, A. Iwasaki, Y. Yasohara, M. Tanokura, *Sci. Rep.* **2015**, 5, 10753-10762.

enzimática causada por **1d** representado en la estructura **Vb** del Esquema 1.12. Los datos cristalográficos se encuentran recogidos en la Tabla 1.9 (ver parte experimental).

CONCLUSIONES

- Puesto que el objetivo en este estudio era la síntesis biocatalítica de β -fluoroaminas, en un principio se ha estudiado la biotransaminación de una α -fluorocetona (**2a**) empleando diversas transaminasas, observándose la hidrodesfluoración del sustrato junto con cierta inhibición enzimática, siendo un ejemplo de promiscuidad catalítica.



Esquema 1.14. Resolución cinética de 1-aryl-2-fluoroetan-1-aminas desarrollada en este capítulo con TAs.

- En base a estos resultados iniciales, y aprovechando la promiscuidad catalítica mostrada por una serie de transaminasas, se desarrolló la preparación de una serie de 1-aryl-2-fluoroetan-1-aminas racémicas con diversas sustituciones en el anillo aromático para llevar a cabo su resolución cinética a través de un proceso simultáneo de hidrodesfluoración y desaminación en ausencia de un aceptor de amina (Esquema 1.14).
- Así, se han empleado transaminasas de enantioselectividad complementaria para la obtención de las aminas de configuración *S* o *R*, encontrando los mejores resultados con la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* que ha conducido a la obtención de las (*S*)- β -fluoroaminas de manera enantiopura. Algunos de estos procesos se escalaron empleando 100 mg de amina racémica de partida.
- Se ha propuesto un mecanismo que diera cuenta tanto del proceso de inhibición enzimático inherente a esta reacción, así como al proceso de hidrodesfluoración. Dicho mecanismo se demostró obteniendo una estructura de rayos X con una molécula de la amina inhibidora unida a la proteína.¹²⁶

¹²⁶ A. Cuetos, M. García-Ramos, E.-M. Fischereder, A. Díaz-Rodríguez, G. Grogan, V. Gotor, W. Kroutil, I. Lavandera, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 3144-3147.

PARTE EXPERIMENTAL

1.5.1. GENERAL

Las cetonas de partida bromadas y demás reactivos químicos se adquirieron de las siguientes casas comerciales: Acros Organics, Sigma Aldrich y Alfa Aesar, utilizándose sin ninguna purificación adicional.

Las transaminasas comerciales fueron adquiridas a la casa comercial Codexis, mientras que las de *Chromobacterium violaceum* (CV-TA), *Arthrobacter* sp. (ArR-TA, y ArRmut11-TA) y *Arthrobacter citreus* (ArS-TA) sobreexpresadas en células de *E. coli*, fueron donadas por el Prof. Wolfgang Kroutil de la Universidad de Graz (Austria).

El crecimiento de las células se realizó en un medio de tipo *luria broth* (LB) con ampicilina como antibiótico: (20 mL, 120 mg/L) para CV-TA y ArS-TA, (20 mL, 100 mg/L) para ArR-TA y ArRmut11-TA y se incubó a 37 °C y 120 rpm durante 12 h. Entonces, 10 mL de ese precultivo se añadieron a un nuevo medio LB con ampicilina (330 mL, 90 mg/L) para CV-TA y ArS-TA, (330 mL, 100 mg/L) para ArR-TA y ArRmut11-TA y se incubó de nuevo a 37 °C y 120 rpm, hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor de 0.7 para CV-TA y ArS-TA y 0.5 para las de *Arthrobacter* sp. A continuación, se añadió una nueva cantidad de ampicilina (30 mg/L) e isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, 120 mg/L), y la mezcla se agitó durante 3 h a 20 °C. Posteriormente, las células se centrifugaron a 4800 rpm durante 20 min a 4 °C y se lavaron con una disolución tampón de fosfato (pH 7.5, 50 mM para CV-TA y ArS-TA, o pH 7.0, 100 mM para ArR-TA y ArRmut11-TA), y se resuspendieron en el mismo tampón, para posteriormente congelar la mezcla con nitrógeno líquido y liofilizarla. Las células obtenidas se almacenaron a 4 °C, manteniéndose estables incluso tras varios meses en la nevera.

Los disolventes empleados, diclorometano (CH_2Cl_2), acetonitrilo (MeCN), dimetilsulfóxido (DMSO) y acetato de etilo (AcOEt) han sido empleados sin ningún secado previo, mientras que el metanol (MeOH) fue destilado previamente bajo nitrógeno y secado sobre hidruro cálcico.

1.5.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS

1.5.2.1. Cromatografía en gel de sílice

Para la cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *thin layer chromatography*) se utilizaron cromatofolios de gel de sílice 60 de 0.25 mm de espesor y con un indicador ultravioleta incorporado, comercializados por Merck.

Como revelador se utilizó una lámpara de ultravioleta ($\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$) y una disolución acuosa al 1% de KMnO_4 (2 g), 5% de NaOH (10 g) en 200 mL de H_2O , siendo todas las proporciones en peso/volumen. En algunos casos y alternativamente se empleó como revelador una disolución de ninhidrina (0.3 g) en EtOH (100 mL). La cromatografía en columna se realizó sobre gel de sílice 60 (230-400 *mesh*) adquirida a Merck.

1.5.2.2. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y ^{19}F -RMN se realizaron en espectrómetros Bruker AV-300 (300.13 MHz para ^1H , 75.5 MHz para ^{13}C y 282 MHz para ^{19}F), Bruker DPX-300 (300.13 MHz para ^1H , 75.5 MHz para ^{13}C y 282 MHz para ^{19}F), empleando en todos los casos CDCl_3 como disolvente. Los valores de desplazamiento químico (δ) están referidos en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se dan en hertzios (Hz).

1.5.2.3. Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR)

Los experimentos de masas exactas de alta resolución se llevaron a cabo con un espectrómetro Bruker MicrOTof-Q empleando la técnica de electrospray (ESI^+). Los valores se refieren a unidades de masa atómica (uma).

1.5.2.4. Espectrometría infrarroja (IR)

Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer FT: ESPECTRUM 100T empleando como soporte dos monocristales de NaCl , utilizando diclorometano para disolver los compuestos sólidos. Las bandas de vibración se indican en valores de ν máxima y se expresan en cm^{-1} .

1.5.2.5. Puntos de fusión

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Gallenkamp usando tubos capilares abiertos y, por tanto, sus valores no están corregidos.

1.5.2.6. Rotación óptica específica

Las medidas de rotación óptica específica están realizadas en un polarímetro Perkin Elmer 241 utilizando la línea D de una lámpara de sodio (589.3 nm) a 20 °C. Las concentraciones (c) están expresadas en g/100 mL y las unidades de los valores de rotación óptica específica son $^{\circ}$ mL g⁻¹ dm⁻¹.

1.5.2.7. Cromatografía de gases (CG)

Los análisis por cromatografía de gases (CG) de los procesos enzimáticos de resolución cinética por deshalogenación se llevaron a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard 7820 con detector de ionización de llama (FID), utilizando para el seguimiento de las conversiones la columna de relleno aquiral HP-5 (30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m, 12.2 psi N₂). Adicionalmente, se empleó la columna de relleno quiral CP-Chirasil-DEX-CB (25 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, 12.2 psi N₂) para la medida de los excesos enantioméricos de las aminas obtenidas tras acetilación. Las condiciones y tiempos de retención se muestran en las Tablas 1.7 y 1.8.

Tabla 1.7. Determinación de las conversiones por CG empleando una fase estacionaria aquiral.

Compuesto	Programa ^a	Tiempo de retención (min)
1a	50/15/40/220/2	13.1
3a	50/15/40/220/2	9.8
1b	50/15/40/220/2	14.5
3b	50/15/40/220/2	9.4
1c	55/15/1/72/0/40/220/2	31.7
3c	55/15/1/72/0/40/220/2	24.4
1d	55/15/1/72/0/40/220/2	33.9
3d	55/15/1/72/0/40/220/2	32.8
1e	55/15/1/72/0/40/220/2	33.4
3e	55/15/1/72/0/40/220/2	32.4
1f	100/0/2/120/0/40/200/2	7.8
3f	100/0/2/120/0/40/200/2	8.3

^a T_{inicial} (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T_{final} (°C)/ tiempo (min).

Tabla 1.8. Determinación de los valores de *ee* por CG empleando una fase estacionaria quiral.

Compuesto ^a	Programa ^a	Tiempo de retención (min)
1a	130/30/40/190/5	13.0 (<i>R</i>), 14.0 (<i>S</i>)
1b	135/25/40/190/5	24.5 (<i>R</i>), 25.7 (<i>S</i>)
1c	150/30/40/180/4	25.8 (<i>R</i>), 27.6 (<i>S</i>)
1d	150/45/40/190/5	19.5 (<i>R</i>), 20.7 (<i>S</i>)
1e	160/25/40/190/5	18.5 (<i>R</i>), 19.1 (<i>S</i>)
1f	160/15/20/180/2	12.5 (<i>R</i>), 13.0 (<i>S</i>)

^a En todos los casos, se midieron los excesos enantioméricos tras acetilación de las aminas **1a-f** *in situ* con anhídrido acético y carbonato de potasio anhidro. ^b T_{inicial} (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T_{final} (°C)/ tiempo (min).

1.5.2.8. Difracción de Rayos X

Las primeras pruebas de determinación estructural por análisis de difracción de Rayos X se han realizado en el Laboratorio de Biología estructural del Prof. Gideon Grogan, en la Universidad de York (Reino Unido), utilizando un difractómetro Rigaku MicroMax-007 HF equipado con óptica Osmic multicapa y detector de placa de imagen MAR Research MAR345. Los cristales que difractaron a más de 3 Å se midieron en el sincrotrón del Diamond light Source (Didcot, Oxfordshire, Reino Unido), en la línea de luz I04-1.

1.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS NO ENZIMÁTICOS

1.5.3.1. Síntesis química de las 1-aril-2-fluoroetan-1-onas **2a-f**

Una mezcla de fluoruro potásico (KF, 6.90 mmol, 1.5 equiv.) y fluoruro de zinc (ZnF₂, 6.90 mmol, 1.5 equiv.) en MeCN (10 mL) depositada en un tubo sellado se agitó durante 1 h calentando a 100 °C. Posteriormente se le añadió una disolución de la correspondiente 1-aril-2-bromoetan-1-ona **7a-f** (4.60 mmol, 1 equiv.) en MeCN (10 mL), y se agitó la mezcla 100 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se evaporó el disolvente bajo presión reducida en el rotavapor y se añadió agua (20 mL). La disolución se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL), se combinaron las fases orgánicas que se lavaron con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 x 20 mL), y la capa orgánica resultante se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó cuidadosamente en el rotavapor, debido a la volatilidad de estas cetonas, obteniéndose las cetonas deseadas **2a-f**, de las cuales se purificaron únicamente las cetonas **2a** y **2c** mediante cromatografía

de columna en gel de sílice, utilizando una mezcla de hexano y AcOEt (9:1) como eluyente (67-92% rendimiento).

1.5.3.2. Síntesis química de las 1-aril-2-fluoroetan-1-aminas racémicas **1b**, **1c**, **1e** y **1f**

A una disolución de la correspondiente cetona **2b,c,e,f** (3.59 mmol, 1 equiv.) en MeOH seco (12 mL), se le añadió a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte acetato amónico (NH₄OAc, 35.9 mmol, 10 equiv.). Posteriormente se enfrió la disolución a 0 °C para añadir cianoborohidruro de sodio (NaBH₃CN, 7.18 mmol, 2 equiv.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Tras ese tiempo, se acidificó hasta pH 5 el medio de reacción empleando una disolución acuosa de HCl 2 N, y se evaporó el MeOH en el rotavapor. Esta disolución se lavó con CH₂Cl₂ (3 x 15 mL) y se recogió la fase acuosa. Posteriormente, la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl 2 N (2 x 15 mL). Se combinaron todas las fases acuosas y se alcalinizaron hasta pH 9 con una disolución acuosa de NaOH 2 N para extraer finalmente la correspondiente amina **1b,c,e,f** con CH₂Cl₂ (4 x 15 mL). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se filtraron, evaporando a continuación el disolvente en el rotavapor. Las aminas deseadas se obtuvieron con suficiente pureza como para poder ser empleadas posteriormente sin necesidad de realizar procesos adicionales de purificación (34-82% rendimiento).

1.5.4. PROCEDIMIENTOS ENZIMÁTICOS

1.5.4.1. Reacción de la 1-fenil-2-fluoroetan-1-ona (**2a**) con transaminasas

En un tubo Eppendorf se añadió la correspondiente transaminasa comercial (2 mg) o sobreexpresada en *E. coli* (10 mg), y posteriormente se adicionó una mezcla de la disolución reguladora de fosfato (100 mM, pH 7.5) que contenía PLP (1 mM), 2-propilamina (1 M) y DMSO como cosolvente (12.5 µL para un volumen total de 0.5 mL). Finalmente se añadió la α-fluorocetona **2a** (1.7 µL, 30 mM) a la mezcla de reacción y se agitó en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. La reacción se detuvo adicionando una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃ (350 µL) y se extrajo con AcOEt (3 x 350 µL). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre Na₂SO₄

anhidro, midiendo las conversiones por cromatografía de gases empleando el método detallado en la Tabla 1.7.

1.5.4.2. Transformación enantioselectiva de las 1-aril-2-fluoroetan-1-aminas **1a-f** usando transaminasas

En un tubo Eppendorf se añadió la correspondiente transaminasa CV-TA o ArR-TA sobreexpresada en *E. coli* (10 mg), y posteriormente se adicionó una mezcla de la disolución reguladora de fosfato (100 mM, pH 7.5) que contenía PLP (1 mM) y DMSO (12.5 μ L para un volumen total de 0.5 mL). Finalmente se añadió la amina racémica correspondiente **1a-f** (30 mM) a la mezcla de reacción que se agitó en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. La reacción se detuvo adicionando una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃ (350 μ L) y se extrajo con AcOEt (3 x 350 μ L). Las fases orgánicas se combinaron y secaron con Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones por cromatografía de gases empleando el método detallado en la Tabla 1.7.

Los excesos enantioméricos de las aminas **1a-f** se midieron tras su transformación en las correspondientes acetamidas mediante el siguiente procedimiento de derivatización. Al sustrato racémico (2 μ L) o una mezcla de la reacción enzimática previamente extraída (200 μ L), se adicionaron AcOEt (500 μ L), unas gotas de anhídrido acético, y una punta de espátula de carbonato potásico (K₂CO₃). Esta mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, y transcurrido este tiempo se detuvo la reacción añadiendo agua (500 μ L). El producto se extrajo con AcOEt (2 x 350 μ L), combinando las fases orgánicas resultantes que se secaron con Na₂SO₄ anhidro. Los excesos enantioméricos se midieron empleando la técnica de cromatografía de gases y el método detallado en la Tabla 1.8.

1.5.4.3. Transformación enantioselectiva de las aminas **1a** y **1d** a escala semipreparativa

En un matraz Erlenmeyer se añadió la CV-TA sobreexpresada en *E. coli* (140 mg para **1a** y 200 mg para **1d**), y posteriormente una mezcla de la disolución reguladora de fosfato (100 mM, pH 7.5, 1 mM PLP) y DMSO (600 μ L para **1a** resultando un volumen total de 24 mL; 380 μ L para **1d** resultando un volumen total de 15.2 mL). Finalmente se añadió el sustrato correspondiente **1a** o **1d** (100 mg, 30 mM) a la mezcla de reacción y

se agitó en un agitador orbital durante 32 h a 30 °C y 250 rpm. Transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota de las reacciones para medir las conversiones por cromatografía de gases (**3a**: 47%, **3d**: 52%) empleando los métodos detallados en la Tabla 1.7, y tras su acetilación se midieron los *ee* ((*S*)-**1a**: >99%, (*S*)-**1d**: >99%) empleando los métodos detallados en la Tabla 1.8. Después, se acidificó el medio de reacción hasta pH 5 empleando una disolución acuosa de HCl 2 N. La reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 15 mL), recogiendo la fase acuosa. Posteriormente, la fase orgánica se lavó con HCl 2 N (2 x 15 mL). Se combinaron todas las fases acuosas y se alcalinizaron hasta pH 9 con una disolución acuosa de NaOH 2 N para extraer finalmente las correspondientes aminas **1a** y **1d** con CH₂Cl₂ (4 x 15 mL). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se filtraron, evaporando a continuación el disolvente en el rotavapor con cuidado obteniéndose las aminas (*S*)-**1a** (43 mg, 35% rto.) y (*S*)-**1d** (46 mg, 40% rto.).

1.5.4.4. Asignación de la configuración absoluta de las aminas enantioenriquecidas

La configuración absoluta de las aminas remanentes **1a-f** obtenidas en las resoluciones cinéticas enzimáticas se ha asignado por comparación de sus tiempos de retención, obtenidos mediante cromatografía de gases en fase quiral, con los descritos en la bibliografía previamente.¹¹⁴ Dicha asignación coincide con la configuración prevista inicialmente, propuesta en base a la selectividad descrita en la bibliografía para ambas preparaciones enzimáticas (CV-TA y ArR-TA) con sustratos estructuralmente similares.^{31c,31e,120a,121}

1.5.4.5. Cristalización de la ArRmut11-TA con la amina **1d**

1.5.4.5.1. Purificación de la ArRmut11-TA

El pellet obtenido mediante el protocolo descrito en la Sección 1.5.1 se resuspendió en una disolución reguladora de Tris-HCl (50 mM y pH 7.5, 5 mL llamada reguladora A) que contenía NaCl (300 mM) y PLP (50 µM). Estas células fueron sometidas a un proceso de ultrasonificación en hielo (5 x 30 s) a 4 °C con intervalos de 35 s, y las fracciones solubles e insolubles fueron separadas por centrifugación durante 40 min a 10.000 rpm en un rotor Sorvall SS34. El líquido sobrenadante se cargó sobre una columna quelante His-Trap con resina de níquel. Después de lavarse con 10 volúmenes de columna con la disolución reguladora A, el enzima se eluyó con un gradiente de

imidazol (0-300 mM) de en torno a 20 volúmenes de columna (disolución reguladora de elución, Tris-HCl 50 mM pH 7.5 conteniendo 300 mM NaCl y 300 mM imidazol, 50 μ M PLP). Las fracciones de la columna que contenían la ArRmut11-TA (determinado por SDS-PAGE), se combinaron y filtraron utilizando filtros de 10 kDa *Centricon filter membrane*. Después, el enzima se purificó por cromatografía de exclusión por tamaños en una columna S75 Superdex 16/600 *gel-filtration* con 120 mL de la disolución reguladora A empleando un flujo de 1 mL min⁻¹. Las fracciones que contenían la ArRmut11-TA, determinadas por SDS-PAGE, se combinaron y almacenaron a 4 °C.

1.5.4.5.2. Síntesis de la ArRmut11-TA inhibida

En un tubo Falcon, se incubó la proteína (3 mg mL⁻¹, 5 mL) en una disolución reguladora Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) que contenía NaCl (300 mM) y PLP (50 μ M), con la 1-(4-bromofenil)-2-fluoroetan-1-amina racémica (**1d**, 2 mg) durante 16 h a 4 °C y 250 rpm para obtener el aducto covalente entre **1d** y la transaminasa. Posteriormente, la disolución amarilla se centrifugó durante 20 min a 4000 rpm y 4 °C para eliminar la fracción insoluble, mientras que el enzima soluble se concentró empleando un filtro 10 kDa *Centricon filter membrane*. Este enzima se purificó por cromatografía de exclusión por tamaños en una columna S75 Superdex 16/60 *gel-filtration* con 120 mL de una disolución reguladora Tris-HCl 50 mM pH 7.5 conteniendo NaCl (300 mM) a un flujo de 1 mL min⁻¹. Las fracciones que contenían el enzima inhibido se determinaron por SDS-PAGE, se combinaron y almacenaron a 4 °C.

1.5.4.5.3. Cristalización de la proteína

Las condiciones de cristalización para la ArRmutR11-TA se determinaron utilizando placas de cristalización de 96 pocillos con gotas de 300 nL. Los mejores cristales se obtuvieron en las siguientes condiciones: 22% (p/v) PEG 3350, 0.2 M MgCl₂ en una disolución reguladora bis-tris propano (0.1 M, pH 6.5) con la proteína en una concentración de 15 mg mL⁻¹ (1:1 proteína:disolución precipitante). Los cristales más grandes para análisis de difracción de rayos X se prepararon mediante el método de la gota colgante por difusión de vapor en placas de 24 pocillos empleando 22% (p/v) PEG 3350, 0.2 M MgCl₂ en una disolución reguladora bis-tris propano (0.1 M, pH 7.0). Se emplearon muestras de 2 mL con una concentración de la proteína de 10 mg mL⁻¹ (1:1 proteína:disolución precipitante), y los cristales se congelaron rápidamente en

nitrógeno líquido en una disolución criogénica conteniendo las aguas madres con un 10% (p/v) de glicerol.

1.5.4.5.4. Recogida de datos, resolución de la estructura, construcción del modelo y refinamiento de la ArRmut11-TA

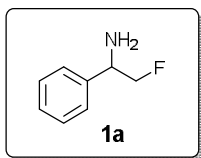
El conjunto de datos completo de la ArRmut11-TA unida al PLP y a la β -fluoroamina **1d** se encuentran recogidos en la línea de luz I04-1 del *Diamond Light Source* (Didcot, Oxfordshire, Inglaterra). Los datos fueron procesados e integrados empleando XDS y escalados usando SCALA, tal y como se usó el sistema de procesamiento xia2. La estructura se resolvió empleando MOLREP, con el monómero de la misma transaminasa 3WWJ como modelo de búsqueda. El disolvente contenido en los cristales fue del 52.5%. La estructura se construyó y refinó empleando ciclos iterativos con Coot y REFMAC, el último utilizando restricciones NCS. El diseño y refinamiento posterior de los átomos proteicos y moléculas de agua facilitó la observación de la densidad electrónica. Esta densidad se modelizó correctamente, empleando un ligando construido con el programa PRODRG. La estructura final mostró valores de R_{crist} y R_{libre} de 21.0 y 23.8%, respectivamente, y fue validada finalmente con PROCHECK. Los datos se muestran en la Tabla 1.9. El gráfico Ramachandran demostró que el 96.3% de los residuos se situaban en las regiones más favorecidas. Todos los datos se encuentran almacenados en el *Protein Data Bank* (PDB) con número de acceso 5FR9.

Tabla 1.9. Datos y estadísticas de refinamiento para la ArRmut11-TA inhibida por unión con **1d**. Los números entre paréntesis se refieren a los datos para sistemas con alta resolución.

Característica	Estructura ArRmut11-TA unida a 1d
Línea de luz	I04-1
Longitud de onda (Å)	0.92820
Resolución (Å)	48.52-2.81 (2.86-2.81)
Grupo espacial	$P2_1$
Celdilla unidad (Å)	$a = 84.15$; $b = 135.51$; $c = 197.32$; $\alpha = \gamma = 90.00^\circ$; $\beta = 100.40$
Nº de moléculas en la unidad asimétrica	12
Reflexiones únicas	105297 (5141)
Exhaustividad (%)	99.4 (99.7)
R_{merge}	0.06 (0.61)
$R_{\text{p.i.m.}}$	0.05 (0.50)
Multiplicidad	4.2 (4.3)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	15.5 (2.1)
$CC_{1/2}$	1.00 (0.84)
Factor B de Wilson (Å ²)	51
$R_{\text{crist}}/R_{\text{libre}}$ (%)	21.0/23.8
r.m.s.d 1-2 enlaces (Å)	0.014
r.m.s.d 1-3 ángulos (°)	1.519
Promedio cadena principal B (Å ²)	68
Promedio cadena lateral B (Å ²)	71
Promedio ligando B (Å ²)	65

1.5.5. DATOS EXPERIMENTALES

1-Fenil-2-fluoroetan-1-amina (**1a**)



Fórmula empírica: C₈H₁₀NF

Peso molecular: 139.17 g/mol

Aspecto: aceite amarillo

Compuesto comercial R_f (10% MeOH/AcOEt): 0.22

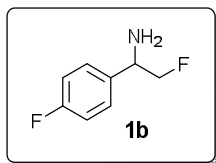
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.87 (s, 2H), 4.28-4.59 (m, 3H), 7.29-7.39 (m, 5H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 55.7 (d, J = 19.4 Hz, CH), 88.2 (d, J = 174.1 Hz, CH₂), 127.0 (2CH), 128.0 (CH), 128.7 (2CH), 140.3 (d, J = 8.1 Hz, C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -219.3

Rotación óptica específica: $[\alpha]_D^{20} = +12.3$ (c 0.2, CHCl₃, >99% *ee* (*S*)-**1a**); bibliografía $[\alpha]_D^{20} = +44.0$ (c 0.6, CHCl₃, 98.5% *ee*)¹¹⁴

2-Fluoro-1-(4-fluorofenil)etan-1-amina (1b)



Fórmula empírica: C₈H₉NF₂

Peso molecular: 157.16 g/mol

Aspecto: aceite amarillo

Rendimiento: 46% **R_f** (10% MeOH/AcOEt): 0.20

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.96 (s, 2H), 4.22-4.53 (m, 3H), 7.00 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.35 (dd, *J* = 8.6, 5.4 Hz, 2H)

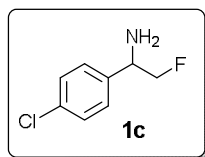
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 55.2 (d, *J* = 19.5 Hz, CH), 88.1 (d, *J* = 174.7 Hz, CH₂), 115.6 (d, *J* = 21.4 Hz, 2CH), 128.7 (d, *J* = 8.0 Hz, 2CH), 136.0 (d, *J* = 9.0 Hz, C), 162.5 (d, *J* = 246.0 Hz, C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -114.6, -219.4

IR (NaCl): ν 3348, 3020, 1606, 1560, 1511, 1500, 840, 780 cm⁻¹

EMAR (ESI⁺, m/z): Calculada para (C₈H₁₀NF₂)⁺ [(M+H)⁺]: 158.0776; encontrada: 158.0779

1-(4-Clorofenil)-2-fluoroetan-1-amina (1c)



Fórmula empírica: C₈H₉ClFN

Peso molecular: 173.62 g/mol

Aspecto: aceite naranja

Rendimiento: 34% **R_f** (10% MeOH/EtOAc): 0.27

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.85 (s, 2H), 4.20-4.54 (m, 3H), 7.33 (s, 4H)

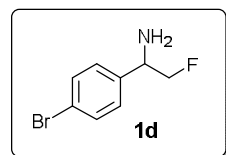
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 55.2 (d, *J* = 19.7 Hz, CH), 87.9 (d, *J* = 174.8 Hz, CH₂), 128.4 (2CH), 128.9 (2CH), 133.8 (C), 138.9 (d, *J* = 7.6 Hz, C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃): δ (ppm) -219.6

IR (NaCl): ν 3391, 2979, 1558, 829, 737 cm⁻¹

EMAR (ESI⁺, *m/z*): calculada (C₈H₁₀ClFN)⁺ [(M+H)⁺]: 174.0480; encontrada: 174.0480

1-(4-Bromofenil)-2-fluoroetan-1-amina (1d)



Fórmula empírica: C₈H₉NFBr

Peso molecular: 218.07 g/mol

Aspecto: aceite amarillo

Compuesto comercial **R_f** (20% MeOH/AcOEt): 0.28

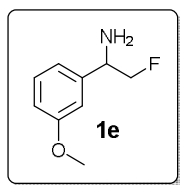
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.04 (s, 2H), 4.27-4.60 (m, 3H), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 55.3 (d, *J* = 19.6 Hz, CH), 87.8 (d, *J* = 175.0 Hz, CH₂), 121.9 (C), 128.8 (2CH), 131.9 (2CH), 139.2 (d, *J* = 7.9 Hz, C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ (ppm) -219.8

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = +6.9 (*c* 0.2, CHCl₃, >99% *ee* (*S*)-**1d**); bibliografía [α]_D²⁰ = +27.4 (*c* 0.66, CHCl₃, 90.5% *ee*)¹¹⁴

2-Fluoro-1-(3-metoxifenil)etan-1-amina (1e)



Fórmula empírica: C₉H₁₂NOF

Peso molecular: 169.20 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 49% **R_f** (10% MeOH/AcOEt): 0.20

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.80 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 4.26-4.60 (m, 3H), 6.85 (m, 1H), 6.97 (dd, *J* = 4.4, 2.5 Hz, 2H), 7.29 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H)

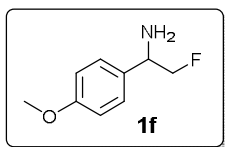
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 55.3 (CH₃), 55.8 (d, *J* = 19.3 Hz, CH), 88.3 (d, *J* = 174.1 Hz, CH₂), 112.6 (CH), 113.4 (CH), 119.3 (CH), 129.8 (CH), 142.0 (d, *J* = 8.0 Hz, C), 160.0 (C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ (ppm) -219.4

IR (NaCl): ν 3380, 3200, 1603, 1490, 750, 700 cm⁻¹

EMAR (ESI⁺, *m/z*): Calculada para (C₉H₁₃NOF)⁺ [(M+H)⁺]: 170.0976; encontrada: 170.0980

2-Fluoro-1-(4-metoxifenil)etan-1-amina (1f)



Fórmula empírica: C₉H₁₂NOF

Peso molecular: 169.20 g/mol

Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 82% **R_f** (10% MeOH/AcOEt): 0.23

Punto de fusión: 77-79 °C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.99 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 4.23-4.57 (m, 3H), 6.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H)

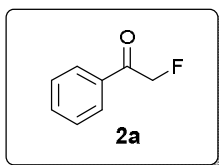
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 55.0 (CH₃), 55.4 (d, *J* = 8.7 Hz, CH), 88.2 (d, *J* = 174.4 Hz, CH₂), 114.2 (2CH), 128.2 (2CH), 132.2 (d, *J* = 8.7 Hz, C), 159.4 (C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ (ppm) -218.7

IR (NaCl): 3400, 2980, 1653, 1606, 1511, 800 cm⁻¹

EMAR (ESI⁺, *m/z*): Calculada para (C₉H₁₃NOF)⁺ [(M+H)⁺]: 170.0976; encontrada: 170.0982

1-Fenil-2-fluoroetan-1-ona (2a)



Fórmula empírica: C₈H₇OF

Peso molecular: 138.14 g/mol

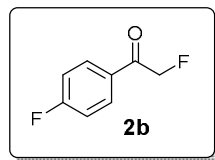
Aspecto: sólido naranja

Rendimiento: 67% *R_f* (20% AcOEt/hexano): 0.53

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.54 (d, *J* = 46.9 Hz, 2H), 7.50 (m, 2H), 7.62 (m, 1H), 7.89 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 83.7 (d, *J* = 182.2 Hz, CH₂), 128.0 (d, *J* = 2.6 Hz, 2CH), 129.1 (2CH), 133.8 (CH), 134.3 (C), 193.6 (d, *J* = 16 Hz, C)

2-Fluoro-1-(4-fluorofenil)etan-1-ona (2b)



Fórmula empírica: C₈H₆OF₂

Peso molecular: 156.13 g/mol

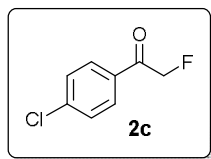
Aspecto: aceite marrón

Rendimiento: 78% *R_f* (15% AcOEt/Hexano): 0.76

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.47 (d, *J* = 46.9 Hz, 2H), 7.14 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.91 (dd, *J* = 8.9, 5.3 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 83.6 (d, *J* = 182.8 Hz, CH₂), 116.2 (d, *J* = 22.1 Hz, 2CH), 130.8 (dd, *J* = 9.5, 2.9 Hz, 2CH), 131.8 (d, *J* = 9.5 Hz, C), 166.3 (d, *J* = 256.4 Hz, C), 192.1 (d, *J* = 15.8 Hz, C)

1-(4-Clorofenil)-2-fluoroetan-1-ona (2c)



Fórmula empírica: C₈H₆ClFO

Peso molecular: 172.58 g/mol

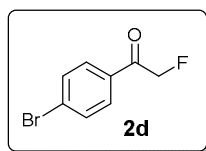
Aspecto: sólido naranja

Rendimiento: 75% **R_f** (20% EtOAc/Hexano): 0.55

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.48 (d, *J* = 46.9 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 83.7 (d, *J* = 183.5 Hz, CH₂), 129.4 (2CH), 132.2 (2CH), 134.7 (C), 140.8 (C), 192.7 (d, *J* = 16 Hz, C)

1-(4-Bromofenil)-2-fluoroetan-1-ona (2d)



Fórmula empírica: C₈H₆OFBr

Peso molecular: 217.04 g/mol

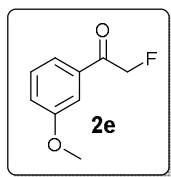
Aspecto: sólido rosa

Rendimiento: 92% **R_f** (10% AcOEt/Hexano): 0.47

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.48 (d, *J* = 46.9 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 83.6 (d, *J* = 183.2 Hz, CH₂), 129.5 (d, *J* = 2.8 Hz, 2CH), 132.3 (C), 132.4 (2CH), 132.6 (C), 192.8 (d, *J* = 16.0 Hz, C)

2-Fluoro-1-(3-metoxifenil)etan-1-ona (2e)



Fórmula empírica: C₉H₉O₂F

Peso molecular: 168.17 g/mol

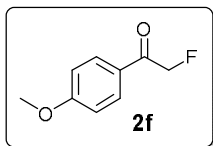
Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 76% *R_f* (20% AcOEt/Hexano): 0.51

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.77 (s, 3H), 5.50 (d, *J* = 46.9 Hz, 2H), 7.22 (m, 1H), 7.35-7.55 (m, 3H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 55.3 (CH₃), 86.3 (d, *J* = 182.2 Hz, CH₂), 112.3 (CH), 120.4 (CH), 121.4 (CH), 130.7 (CH), 135.2 (C), 161.2 (C), 194.9 (d, *J* = 15.8 Hz, C)

2-Fluoro-1-(4-metoxifenil)etan-1-ona (2f)



Fórmula empírica: C₉H₉O₂F

Peso molecular: 168.17 g/mol

Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 73% *R_f* (10% AcOEt/Hexano): 0.37

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.87 (s, 3H), 5.47 (d, *J* = 47.0 Hz, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.88 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 55.7 (CH₃), 83.6 (d, *J* = 181.8 Hz, CH₂), 114.2 (2CH), 126.8 (2CH), 130.3 (d, *J* = 2.9 Hz, C), 164.3 (C), 192.0 (d, *J* = 15.3 Hz, C)

CAPÍTULO 2

Reactividad de α -fluorocetonas con enzimas dependientes de PLP: Transaminasas como hidrolesfluoraras

ANTECEDENTES

2.1.1. COMPUESTOS HALOGENADOS EN EL MEDIO NATURAL

Existe una gran diversidad de productos naturales halogenados que comprenden desde compuestos muy simples, como derivados de metano o fenoles, pasando por moléculas más complejas como terpenoides, policétidos, oligopéptidos y alcaloides, hasta llegar a moléculas que constituyen todo un reto sintético como el caso de la Palau'amina (Figura 2.1a).¹²⁷

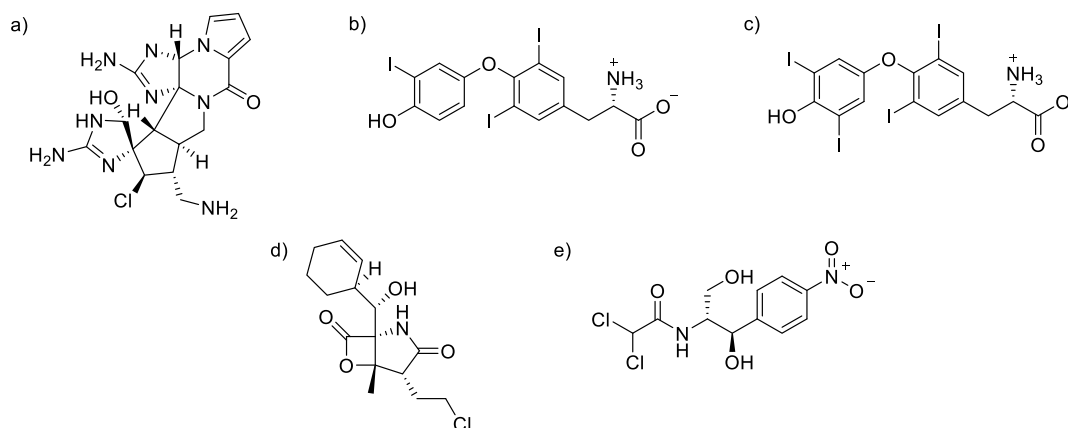


Figura 2.1. Ejemplos de compuestos biológicamente activos organohalogenados.

La inclusión o eliminación de halógenos, en especial en productos naturales, resulta hoy en día de gran interés. Más concretamente, en un contexto fisiológico, las actividades de la hormona tiroidea triyodotironina (Figura 2.1b) y su prohormona tiroxina (Figura 2.1c) dependen del número de átomos de yodo unidos a su estructura.¹²⁸ Además, este tipo de compuestos también tienen aplicabilidad en el campo farmacéutico, donde los procesos de halogenación juegan un papel relevante en el mecanismo de acción del candidato a anticancerígeno clorado Salinosporamida A (Figura 2.1d). De este modo, forma un aducto covalente con el residuo de treonina del centro activo del proteosoma 20S, facilitado por un átomo de cloro, que actúa como grupo saliente.¹²⁹ También cabe mencionar, que la presencia de halógenos puede potenciar la actividad de una determinada molécula, como es el caso del Cloranfenicol,

¹²⁷ (a) C. Wang, H. Lu, J. Lan, K. H. A. Zaman, S. Cao, *Molecules* **2021**, 26, 458; (b) G. W. Gribble, *Naturally Occurring Organohalogen Compounds: A Comprehensive Update*, Springer, Viena (Austria), **2010**; (c) G. W. Gribble, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1996**, 68, 1-423; (d) R. B. Kinnel, H. P. Gehrken, P. J. Scheuer, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3376-3377.

¹²⁸ (a) A. Marsili, A. M. Zavacki, J. W. Harney, P. R. Larsen, *J. Endocrinol. Invest.* **2011**, 34, 395-407; (b) A. C. Bianco, D. Salvatore, B. Gereben, M. J. Berry, P. R. Larsen, *Endocr. Rev.* **2002**, 23, 38-89.

¹²⁹ (a) N. Serrano-Aparicio, V. Moliner, K. Świderek, *ACS Catal.* **2021**, 11, 3575-3589; (b) A. J. Kale, R. P. McGlinchey, A. Lechner, B. S. Moore, *ACS Chem. Biol.* **2011**, 6, 1257-1264; (c) M. Groll, R. Huber, B. C. M. Potts, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5136-5141.

compuesto natural halogenado muy conocido por su utilización como antibiótico (Figura 2.1e).¹³⁰

Además de los compuestos halogenados producidos de manera natural, también existen una gran cantidad de compuestos antropogénicos halogenados que persisten en el medioambiente debido a su lenta degradación, siendo en algunos casos tóxicos para los humanos y el medio natural. De hecho, todas las moléculas que se encuentran dentro de la lista de contaminantes orgánicos recalcitrantes regulados por la Convención de Estocolmo¹³¹ son moléculas polihalogenadas, por ello en las últimas décadas se ha intensificado el interés por el desarrollo de procesos de degradación y biorremediación de esta familia de compuestos. Incluso se ha sugerido un papel relevante de la deshalogenación microbiana como parte del ciclo biogeoquímico en ambientes tanto marinos como terrestres.¹³²

2.1.2. PROCESOS DE DESHALOGENACIÓN ENZIMÁTICA

La investigación en el campo de la deshalogenación enzimática se ha centrado principalmente en la identificación de enzimas en base a su capacidad de actuar sobre compuestos antropogénicos con el fin de biorremediar los compuestos contaminantes.¹³³ Sin embargo, no se conoce con claridad si las deshalogenasas han evolucionado como resultado de la reciente incorporación de moléculas (poli)halogenadas contaminantes en el medioambiente, o si se debe a la similitud con los productos naturales polihalogenados.¹³⁴

Este tipo de enzimas han mostrado ser capaces de catalizar deshalogenaciones hidrolíticas, reductivas, oxígeno-líticas y deshidrohalogenaciones, englobándose en la Clasificación Enzimática dentro de las clases de las oxidorreductasas (EC 1), hidrolasas

¹³⁰ G. P. Dinos, C. M. Athanassopoulos, D. A. Missiri, P. C. Giannopoulou, I. A. Vlachogiannis, G. E. Papadopoulos, D. Papaioannou, D. L. Kalpaxis, *Antibiotics* **2016**, 5, 20.

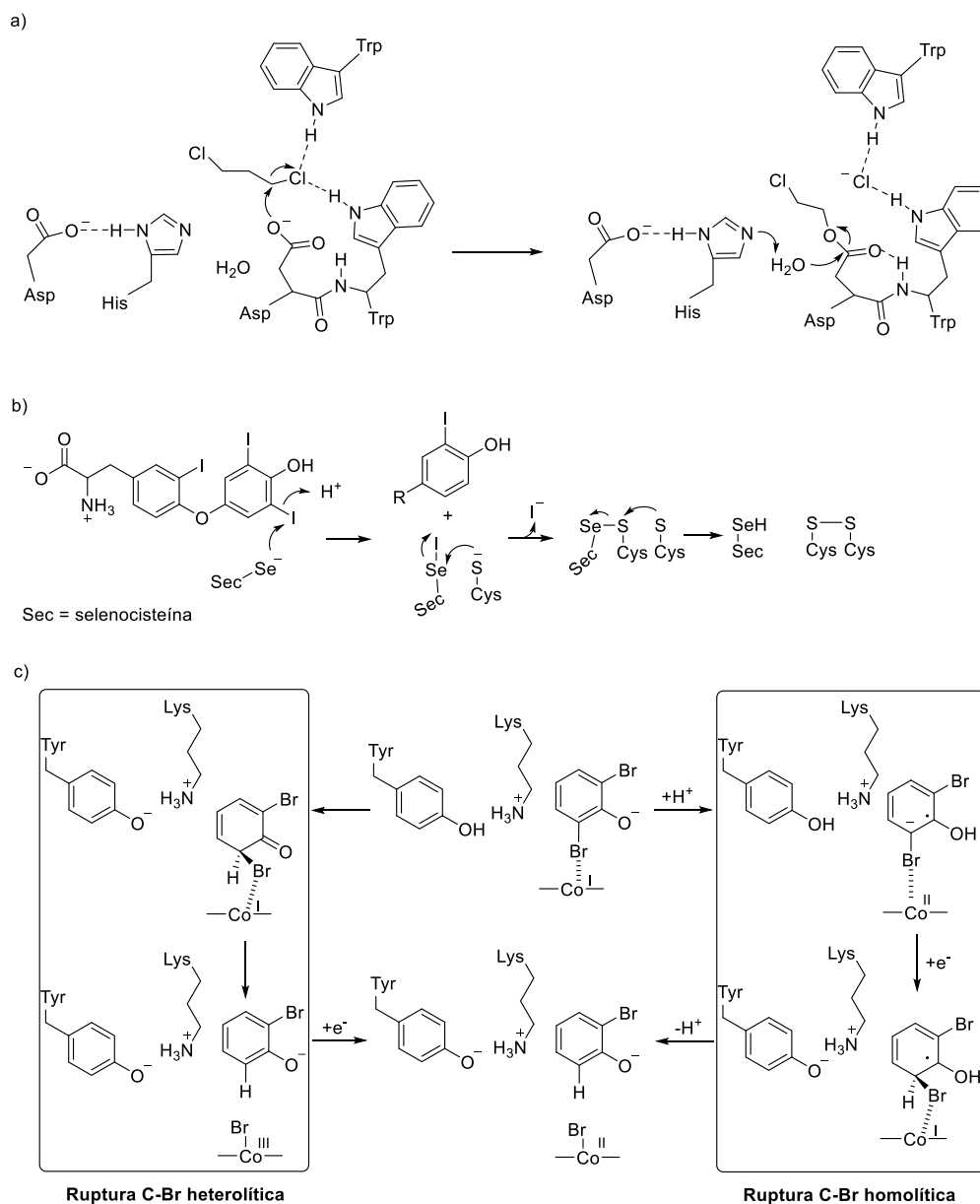
¹³¹ (a) H. Fiedler, R. Kallenborn, J. de Boer, L. K. Sydnes, *Chem. Int.* **2019**, 41, 4-11; (b) *Persistent Organic Pollutants*, Ed. H. Fiedler, Vol. 3, Springer-Verlag, Heidelberg (Alemania), **2003**.

¹³² C. Holliger, I. Nijenhuis, *FEMS Microbiol. Ecol.* **2018**, 94, fty054.

¹³³ (a) H. A. Oyewusi, R. A. Wahab, F. Huyop, *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, 160, 111603; (b) I. Nijenhuis, K. Kuntze, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, 38, 33-38.

¹³⁴ (a) D. B. Janssen, I. J. T. Dinkla, G. J. Poelarends, P. Terpstra, *Environ. Technol.* **2005**, 7, 1868-1882; (b) L. P. Wackett, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 41259-41262.

(EC 3) o liasas (EC 4) según la reacción que catalizan.¹³⁵ Todas ellas comparten mecanismos catalíticos que implican el reemplazo de un átomo de halógeno mediante sustitución nucleófila,¹³⁶ mostrándose en el Esquema 2.1 algunos ejemplos.



Esquema 2.1. Mecanismos simplificados de algunas deshalogenasas.

La deshalogenación hidrolítica está catalizada por las haloalcano deshalogenasas (HLD, EC 3.8.1.5), la familia de las deshalogenasas más estudiada en la actualidad.¹³⁷

¹³⁵ (a) P. Sobrado, *Arch. Biochem. Biophys.* **2021**, 691, 108696; (b) T.-F. Ang, J. Maiangwa, A. B. Salleh, Y. M. Normi, T. C. Leow, *Molecules* **2018**, 23, 1100; (c) V. Agarwal, Z. D. Miles, J. M. Winter, A. S. Eustáquio, A. A. El Gamal, B. S. Moore, *Chem. Rev.* **2017**, 117, 5619-5674.

¹³⁶ S. Fetzner, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, 50, 633-657.

Actúan convirtiendo haloalcanos en los correspondientes alcoholes liberando el haluro durante la transformación. Estas enzimas poseen la ventaja de que el proceso puede llevarse a cabo sin necesidad de cofactor, y únicamente en presencia de agua, convirtiendo a estos biocatalizadores en un instrumento muy atractivo con fines prácticos.

La catálisis de las haloalcano deshalogenasas sigue un mecanismo S_N2 que implica una triada catalítica Asp-His-Asp/Glu y dos residuos estabilizantes del ion haluro (Trp-Trp o Trp-Asn). Inicialmente el átomo de oxígeno del carboxilato perteneciente al residuo del aspartato inicia un ataque nucleófilo al carbono unido directamente al halógeno, formándose de esta manera un intermedio tipo éster, que a continuación es hidrolizado conduciendo al alcohol deseado y liberándose finalmente el correspondiente ion haluro (Esquema 2.1a).^{135b}

Las deshalogenasas reductoras (RDHs, EC 1.97.1.8) catalizan la ruptura de:

- un enlace carbono-halógeno, que conlleva la posterior formación de un enlace carbono-hidrógeno, generando un ion haluro (α -eliminación) como co-producto; o
- dos sustituyentes de tipo halógeno adyacentes, resultando en la liberación de ambos haluros y la formación de un producto insaturado (β -eliminación).¹³⁸

Posiblemente las RDHs más estudiadas son la yodotironina desyodasas y aquellas que son dependientes de cobalamina (vitamina B_{12}). Las yodotironina desyodasas están relacionadas con la regulación de las hormonas tiroideas, y son los únicos ejemplos conocidos de deshalogenasas existentes en mamíferos.¹³⁹ Debido a la importancia del tiroides como principal regulador del metabolismo, estas enzimas tienen un papel fundamental en la salud, por lo que su mal funcionamiento desemboca en disfunciones como hipo- e hipertiroidismo y ciertos tipos de cáncer.¹⁴⁰

La catálisis de la desyodación es dependiente de selenocisteína y se cree que su mecanismo implica un ataque directo del selenio sobre el yodo, dando lugar a un

¹³⁷ (a) Y. Nagata, Y. Ohtsubo, M. Tsuda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, 99, 9865-9881; (b) T. Koudelakova, S. Bidmanova, P. Dvorak, A. Pavelka, R. Chaloupkova, Z. Prokop, J. Damborsky, *Biotechnol. J.* **2013**, 8, 32-45.

¹³⁸ B.-E. Judger, H. Ertan, M. Lee, M. Manfield, C. P. Marquis, *Trends Biotechnol.* **2015**, 33, 595-610.

¹³⁹ (a) U. Schweizer, C. Steegborn, *J. Mol. Endocrinol.* **2015**, 55, 37-52; (b) J. Köhrle, *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, 57, 1853-1863.

¹⁴⁰ (a) C. Luongo, M. Dentice, D. Salvatore, *Nat. Rev. Endocrinol.* **2019**, 15, 479-488; (b) A. G. Cicatiello, D. Di Girolamo, M. Dentice, *Front. Endocrinol.* **2018**, 9, 474.

intermedio covalente entre el haluro y el selenio. Este enlace se rompe al adicionarse una cisteína para formar un enlace Se–S, que posteriormente es atacado por un segundo residuo de cisteína, rompiendo el enlace selenio–azufre y dando lugar a un puente disulfuro, regenerando el residuo selenocisteína del centro activo del enzima (Esquema 2.1b).^{135c,139b}

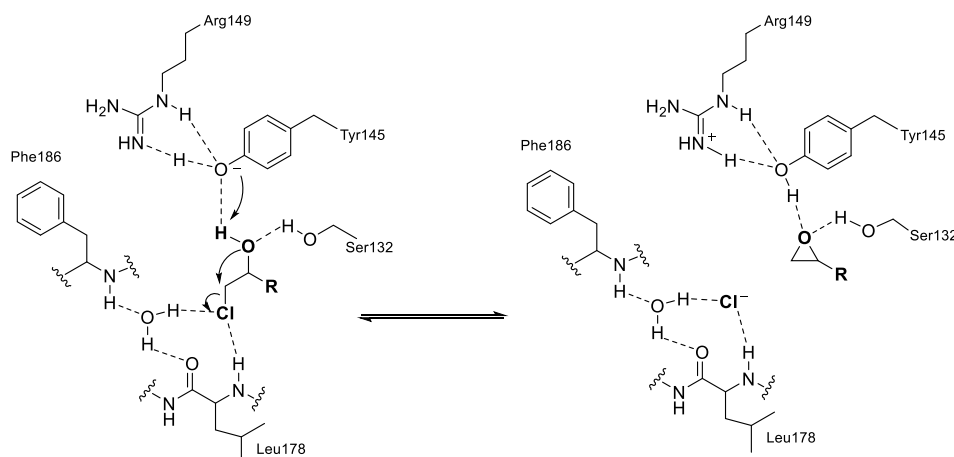
Por otro lado, los enzimas dependientes de cobalamina están formados además por clústeres de Fe–S y, aunque su mecanismo de acción aún no está completamente dilucidado, la eliminación del halógeno a través de la formación de un enlace Co–haluro parece que es la posibilidad más factible.¹⁴¹ La deshalogenasa utiliza el cofactor cobalamina para activar al sustrato halogenado, dando lugar a la ruptura del enlace carbono–halógeno y la formación del enlace C–H (Esquema 2.1c).

Finalmente, las halohidrina deshalogenasas (HHDHs, EC 4.5.1) catalizan la deshalogenación reversible de halohidrinas mediante la formación de un epóxido a través de un desplazamiento nucleófilo intramolecular del halógeno por el grupo hidroxilo contiguo.¹⁴² Estos enzimas presentan gran interés ya que también pueden catalizar la reacción contraria en presencia de nucleófilos cargados negativamente, tales como grupos cianuro, azida o nitrito, proporcionándoles una gran aplicabilidad sintética. Las HHDHs poseen la característica de contener una triada catalítica constituida por Ser-Tyr-Arg similar a la que poseen las reductasas de cadena corta (Ser-Tyr-Lys). Sin embargo, en lugar de disponer de un lugar de unión para el cofactor de nicotinamida, las HHDHs contienen un amplio centro de unión para el nucleófilo. El análisis del mecanismo catalítico de la halohidrina deshalogenasa de *Agrobacterium radiobacter* (HheC) ha demostrado que la triada catalítica es la encargada de llevar a cabo tanto la formación del epóxido (Esquema 2.2), como su apertura. En primer lugar, el residuo de tirosina actúa como base catalítica, abstrayendo un protón del grupo hidroxilo adyacente al átomo de halógeno y de manera concurrente el átomo de oxígeno lleva a cabo el ataque nucleófilo en el átomo de carbono contiguo unido al halógeno, resultando en la formación del epóxido y la liberación del ion haluro. Por otro lado, en presencia de un nucleófilo (por ej. CN[−]), el residuo de tirosina cede un protón al átomo de oxígeno del

¹⁴¹ (a) K. A. Payne, C. P. Quezada, K. Fisher, M. S. Dunstan, F. A. Collins, H. Sjuts, C. Levy, S. Hay, S. E. Rigby, D. Leys, *Nature* **2015**, 517, 513-516; (b) M. Bommer, C. Kunze, J. Fessler, T. Schubert, G. Diekert, H. Dobbek, *Science* **2014**, 346, 455-458.

¹⁴² (a) A. Schallmey, M. Schallmey, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, 100, 7827-7839; (b) Z.-Y. You, Z.-Q. Liu, Y.-G. Zheng, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 9-21.

epóxido, activándolo y favoreciendo su apertura. Durante todo el proceso, el residuo de arginina interacciona con el de tirosina, polarizando el grupo hidroxilo de su cadena lateral y disminuyendo su pK_a , mientras que la correspondiente serina posiciona el sustrato con el fin de que el grupo hidroxilo de la halohidrina o el átomo de oxígeno del epóxido interaccione con la tirosina de la triada catalítica.



Esquema 2.2. Mecanismo catalítico de la HHDH de *Agrobacterium radiobacter* en la deshalogenación de halohidrinas.

Aunque su aplicación principal hasta ahora se ha enfocado en procesos de biorremediación, las deshalogenasas pueden aplicarse en diferentes áreas de investigación, siendo ya empleadas como biosensores,¹⁴³ diseño de antidotos para armas químicas,¹⁴⁴ procesos biocatalíticos,^{137,142,145} y en el desarrollo de imágenes celulares y análisis de proteínas.¹⁴⁶

2.1.3. REACCIÓN DE HIDRODESFLUORACIÓN

Debido a la importancia de los compuestos organofluorados en diversas industrias químicas, como pueden ser la preparación de agroquímicos, fármacos y refrigerantes entre otros, pero conociendo sus efectos adversos hacia la salud humana y en ciertos

¹⁴³ (a) S. Bidmanova, R. Chaloupkova, J. Damborsky, Z. Prokop, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 398, 1891-1898; (b) D. W. Campbell, C. Müller, K. F. Reardon, *Biotechnol. Lett.* **2006**, 28, 883-887.

¹⁴⁴ Z. Prokop, F. Opluštil, J. DeFrank, J. Damborský, *Biotechnol. J.* **2006**, 1, 1370-1380.

¹⁴⁵ P. E. Swanson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, 10, 365-369.

¹⁴⁶ (a) R. F. Ohana, L. P. Encell, K. Zhao, D. Simpson, M. R. Slater, M. Uhr, K. V. Wood, *Protein Exp. Purif.* **2009**, 68, 110-120; (b) G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohana, M. Uhr, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 373-382.

ecosistemas, tanto la formación como ruptura de enlaces C–F resultan de gran interés. Puesto que el flúor posee una elevada electronegatividad (4.0) frente al carbono (2.5), los enlaces C–F poseen diversas peculiaridades, entre las que destaca su alto carácter iónico. Esto resulta en una gran estabilidad termodinámica e inactividad cinética.¹⁴⁷ Hoy en día, la modificación de enlaces C–F se realiza principalmente mediante el empleo de catalizadores metálicos,¹⁴⁸ apareciendo el empleo de enzimas como una estrategia menos desarrollada, aunque en continuo auge.¹⁴⁹

La modificación más simple del enlace C–F es su transformación en uno de tipo C–H, reacción conocida con el nombre de hidrogenofluoración (HDF). Se trata, por tanto, de un proceso muy simple, pero con una gran diversidad mecanística¹⁵⁰ que formalmente involucra la activación del enlace C–F seguida de la introducción de un átomo de hidrógeno para formar la molécula final. Este proceso es interesante no solo por la importancia de la química de activación de enlaces C–F,^{148,151} sino también por la necesidad de convertir los compuestos clorofluorocarbonados (CFCs, *chlorofluorocarbons*) en derivados hidrogenados menos contaminantes.¹⁵² Otra aplicación desarrollada más recientemente es el empleo de este tipo de reacciones en química medicinal. De hecho, a la hora de estudiar los efectos que proporcionan los átomos de flúor en las propiedades fisicoquímicas y metabólicas de un compuesto de potencial interés, se suelen comparar con sus análogos desfluorados, por lo que el desarrollo de metodologías generales y directas de HDF resulta de gran importancia para tener los análogos hidrocarbonados y fluorados de manera conjunta y sencilla.¹⁵³

2.1.3.1. Reacción de HDF catalizada por metales de transición en fluoroarenos

El primer ejemplo de una reacción de HDF de fluoroarenos desarrollada en condiciones catalíticas fue descrito en 1994 por Milstein y Aizenberg,¹⁵⁴ mostrando que el complejo de rodio $[\text{Rh}(\text{SiMe}_2\text{Ph})(\text{PMe}_3)_3]$ era capaz de catalizar la ruptura de un

¹⁴⁷ D. O'Hagan, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 308-319.

¹⁴⁸ (a) T. Fujita, K. Fuchibe, J. Ichikawa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 390-402; (b) W. Chen, C. Bakewell, M. R. Crimmin, *Synthesis* **2017**, 49, 810-821; (c) T. Ahrens, J. Kohlmann, M. Ahrens, T. Braun, *Chem. Rev.* **2015**, 115, 931-972.

¹⁴⁹ (a) Y. Wang, A. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, 49, 4906-4925; (b) H. J. Seong, S. W. Kwon, D.-C. Seo, J.-H. Kim, Y.-S. Jang, *Appl. Biol. Chem.* **2019**, 62, 62; (c) C. D. Murphy, *Biotechnol. Lett.* **2010**, 32, 351-359; (d) R. Natarajan, R. Azerad, B. Badet, E. Copin, *J. Fluor. Chem.* **2005**, 126, 424-435.

¹⁵⁰ M. F. Kuchnel, D. Lentz, T. Braun, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 3328-3348.

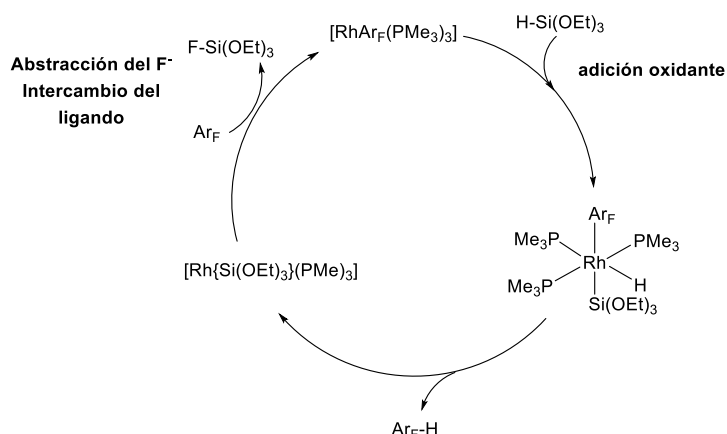
¹⁵¹ J.-D. Hamel, J.-F. Paquin, *Chem. Commun.* **2018**, 54, 10224-10239.

¹⁵² A. J. Sicard, R. T. Baker, *Chem. Rev.* **2020**, 120, 9164-9303.

¹⁵³ J. J. Gair, R. L. Grey, S. Giroux, M. A. Brodney, *Org. Lett.* **2019**, 21, 2482-2487.

¹⁵⁴ M. Aizenberg, D. Milstein, *Science* **1994**, 265, 359-361.

enlace C–F del C_6F_6 (Ar_F) formándose la especie $[Rh(C_6F_5)(PMe_3)_3]$, la cual reaccionó posteriormente con $(EtO)_3Si-H$ para dar lugar al C_6F_5H (Ar_H , Esquema 2.3). El segundo paso de la reacción se cree que procede como consecuencia de la adición oxidante del silano al metal, seguido de una eliminación reductora del producto de hidrodesfluoración. La elevada afinidad del fluoruro para formar enlaces con el Si fue empleada para eliminar y reemplazar el arilo fluorado (Ar_F) por el ligando sililo en el complejo de Rh(I), cerrando el ciclo catalítico.



Esquema 2.3. Primera reacción descrita de HDF catalizada por un metal de transición.

Desde entonces se han descrito multitud de procesos con una gran variedad de catalizadores que emplean metales de transición.¹⁵⁵ En este grupo de catalizadores metálicos se pueden destacar diversos complejos de Co, Rh, Ir, Ni, Pd, Pt, Fe o Ru, entre otros. En este sentido, se han desarrollado metodologías selectivas para la ruptura de enlaces C–F en fluoroarenos o fluoroalquenos principalmente, puesto que en derivados alifáticos la ruptura del enlace C–F no resulta trivial.

Una de las principales dificultades asociadas a esta reacción es la selectividad, pues si se emplean arenos polifluorados o que contengan distintos halógenos, es complicado controlar la regio- y quimioselectividad del proceso.^{150,155b} Una de las estrategias más recurrentes consiste en el empleo de un grupo director para la HDF de un enlace C–F en *orto* (*orto*-HDF). Sin embargo, la necesidad del uso de un reductor externo puede dar lugar a procesos de sobredesfluoración con la consiguiente pérdida de selectividad. Así, Huang y colaboradores han solucionado este problema empleando un sistema en el que integran conjuntamente el areno polifluorado y un hidrosilano que

¹⁵⁵ (a) D. Ventura-Espinosa, J. A. Mata, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, 2667-2675; (b) M. K. Wittlesey, E. Peris, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 3152-3159.

actúa simultáneamente como grupo director y agente reductor para llevar a cabo la HDF intramolecular.¹⁵⁶ De este modo, el hidrosilano dirige la reacción vía adición de un enlace Si–H al centro metálico (Ru), controlando la selectividad hacia la posición *orto*, y a su vez actúa como dador de “H” y aceptor de “F”, eliminando la posibilidad de la sobredesfluoración. Como ventaja adicional, el enlace con el flúor activa el fragmento sililo, haciendo que los productos de HDF, todavía sililados, sean reactivos adecuados para el acoplamiento con otros arenos (Esquema 2.4a).

Una gran parte de los sistemas que utilizan complejos con metales de transición emplean agentes reductores fluorofilicos fuertes para facilitar la reacción del hidruro. Este es el caso de los hidrosilanos, aunque poseen la desventaja de que normalmente van acompañados de la formación de productos secundarios. Para evitar este inconveniente, se han desarrollado metodologías alternativas como la transferencia de hidrógeno empleando 2-propanol o formiato de potasio (HCOOK). En este sentido, Kuwata y colaboradores¹⁵⁷ han descrito que a través de la cooperación metal/N–H en ciertos complejos semi-sandwich de iridio derivados de aminas bencílicas, el enlace C–N quelante es capaz de transferir el hidruro al sustrato fluoroareno. De este modo han sido capaces de llevar a cabo la HDF de una serie de polifluoroarenos, obteniéndose por lo general el producto desfluorado en posición 4 (Esquema 2.4b). La adición de una base como el formiato de potasio para neutralizar el HF generado mostró ser efectiva para acelerar el proceso. Además, esta metodología posee la ventaja de que la sal de flúor obtenida se puede reutilizar para posteriores reacciones de fluoración.

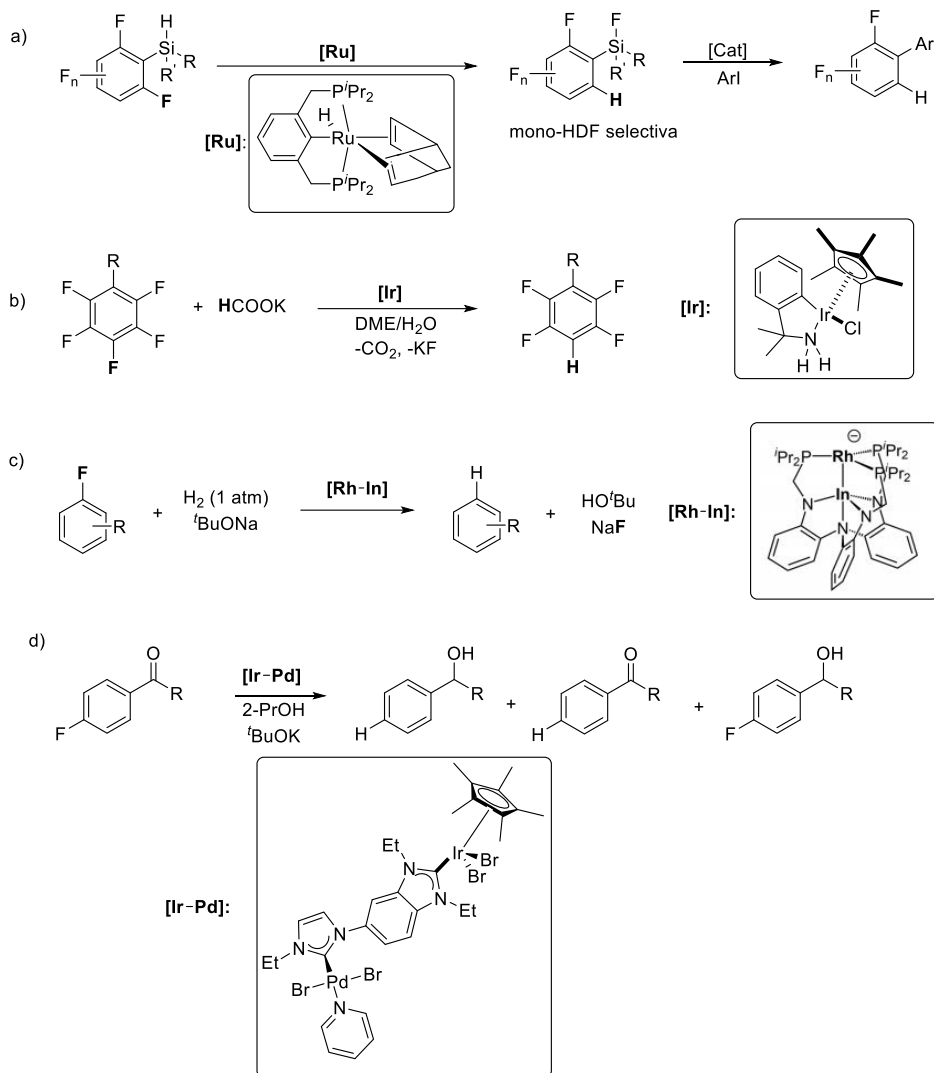
En la mayoría de los casos se utiliza un único catalizador metálico, pero existen ejemplos recientes donde se ha explorado la acción sinérgica al combinar al menos dos metales. Por ejemplo, Moore y Lu emplearon un catalizador bimetálico de Rh–In capaz de hidrodeshuoración enlaces C–F de tipo arilo empleando *t*BuONa como base (Esquema 2.4c).¹⁵⁸ Más recientemente, el grupo de Rit también ha empleado un complejo heterobimetálico, en este caso formado por Ir y Pd para llevar a cabo un proceso que combina la hidrodeshuoración y la reducción de una serie de *p*-fluoroacetofenonas

¹⁵⁶ H. Fang, Q. He, G. Liu, Z. Huang, *Org. Lett.* **2020**, 22, 9298-9302.

¹⁵⁷ A. Matsunami, S. Kuwata, Y. Kayaki, *ACS Catal.* **2016**, 6, 5181-5185.

¹⁵⁸ J. T. Moore, C. C. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 11641-11646.

utilizando 2-propanol y *tert*-butóxido potásico ($t\text{BuOK}$) como base, hacia los correspondientes alcoholes deshalogenados (Esquema 2.4d).¹⁵⁹



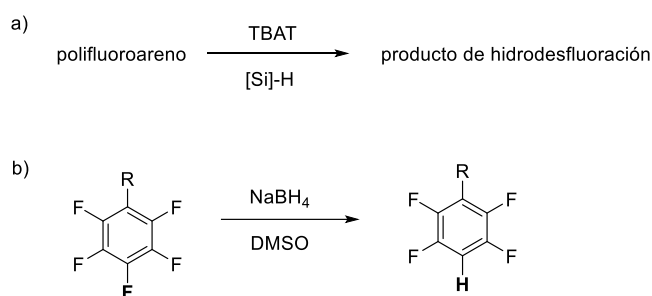
Esquema 2.4. Ejemplos recientes de reacciones de hidrodeshalogenación catalizadas por complejos organometálicos.

¹⁵⁹ R. C. Nishad, S. Kumar, A. Rit, *Organometallics* **2021**, 40, 915-926.

2.1.3.2. Otras reacciones de HDF en fluoroarenos

El desarrollo de métodos de HDF de polifluoroarenos en ausencia de catalizadores derivados de metales de transición representa una alternativa interesante desde un punto de vista económico y medioambiental. Además, puesto que los átomos de flúor poseen una elevada afinidad por los catalizadores metálicos, pueden dar lugar en muchos casos a su inactivación.

Ogoshi y colaboradores han utilizado hidrosilicatos pentacoordinados para la hidrogenofluoración de arenos polifluorados como catalizadores alternativos. Así, empleando difluorotrifenisilicato de tetrabutylamonio (TBAT) y distintos hidrosilanos, han llevado a cabo esta reacción sobre una gran variedad de polifluoroarenos (Esquema 2.5a).¹⁶⁰ El mecanismo propuesto sugiere una transferencia directa del hidrógeno a partir del hidrosilicato, formado a partir del hidrosilano y la sal de flúor, de manera que posteriormente el flúor eliminado regenera dicho hidrosilicato y continúa el ciclo catalítico.



Esquema 2.5. Ejemplos de reacciones de hidrogenofluoración de arenos polifluorados en ausencia de metales de transición como catalizadores.

Recientemente Weaver y colaboradores han descrito una metodología en la cual han sido capaces de eliminar los átomos de flúor de compuestos aromáticos polifluorados, utilizando únicamente borohidruro de sodio (NaBH_4) y sin necesidad de emplear catalizadores, obteniéndose en la mayoría de los casos el producto de hidrogenofluoración en posición 4 (Esquema 2.5b).¹⁶¹ Los autores sugieren un mecanismo de desplazamiento nucleófilo, destacando de esta aproximación que el empleo de NaBH_4 permite la presencia de grupos de tipo éster o amida en los sustratos

¹⁶⁰ K. Kikushima, M. Grellier, M. Ohashi, S. Ogoshi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 16191-16196.

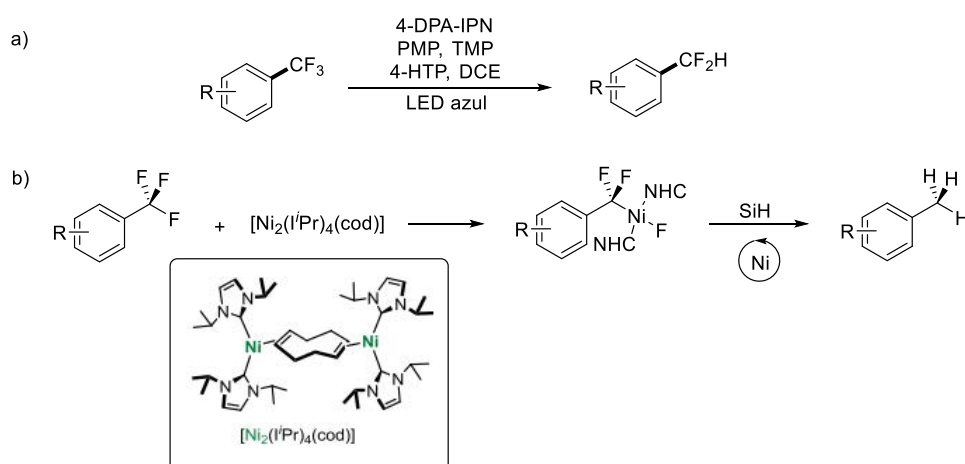
¹⁶¹ T. D. Schoch, M. Mondal, J. D. Weaver, *Org. Lett.* **2021**, 23, 1588-1593.

de partida, ventaja frente a otros reductores más fuertes como el hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4).

2.1.3.3. Metodologías de HDF sobre enlaces C–F no aromáticos

Aunque la reacción de hidrodesfluoración se ha enfocado principalmente sobre arenos polifluorados, no se debe restar importancia tampoco a la activación de enlaces C–F sobre compuestos alifáticos, donde se emplean diversas metodologías como ácidos de Lewis formados por silicio, fósforo, boro o aluminio, entre otros.¹⁶² En este contexto, cabe destacar dos ejemplos recientes de ruptura de enlaces C–F de tipo sp^3 en trifluorometilarenos.

Por un lado, Gouverneur y colaboradores han descrito un proceso fotocatalítico donde se produce la desfluoración de trifluorometilarenos en condiciones básicas empleando el 2,4,5,6-tetraquis(difenilamino)isofalonnitrilo (4-DPA-IPN) como organofotocatalizador, 4-hidroxitiofenol (4-HTP) como donador de hidrógeno y una combinación de 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TMP) y 1,2,2,6,6-pentametilpiperidina (PMP) como base en 1,2-dicloroetano (DCE) con irradiación de luz azul (Esquema 2.6a).¹⁶³ Los estudios mecanísticos sugieren un ciclo catalítico donde el fotocatalizador es reducido por el donador de hidrógeno y devuelto a su estado de oxidación inicial reaccionando con el trifluorometilareno, que actúa como oxidante.



Esquema 2.6. Reacciones de HDF sobre enlaces C–F de tipo sp^3 en trifluorometilarenos.

¹⁶² (a) S. S. Chitnis, F. Krischer, D. W. Stephan, *Chem. Eur. J.* **2018**, 24, 6543-6546; (b) J. Zhu, M. Pérez, C. B. Caputo, D. W. Stephan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 1417-1421; (c) Q. Shen, Y.-G. Huang, C. Liu, J.-C. Xiao, Q.-Y. Chen, Y. Guo, *J. Fluor. Chem.* **2015**, 179, 14-22; (d) T. Stahl, H. F. T. Klare, M. Oestreich, *ACS Catal.* **2013**, 3, 1578-1587.

¹⁶³ J. B. I. Sap, N. J. W. Straathof, T. Knauber, C. F. Meyer, M. Médebielle, L. Buglioni, C. Genicot, A. A. Trabanco, T. Noël, C. W. am Ende, V. Gouverneur, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 9181-9187.

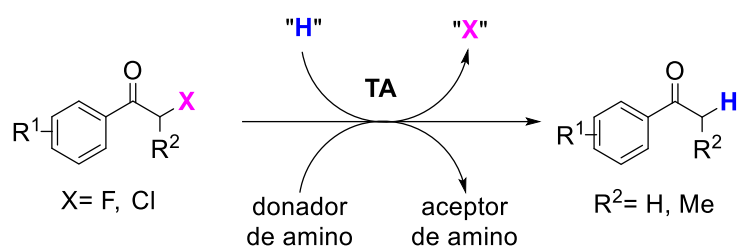
Por otro lado, Ogoshi y colaboradores han descrito una metodología alternativa para romper enlaces C–F en trifluorometilarenos (Esquema 2.6b), pero en este caso empleando un complejo de níquel(0) que contiene dos ligandos carbeno N-heterocíclicos (NHC) para formar complejos de fluoruro de *trans*-difluorobencilníquel(II).¹⁶⁴ Además, aprovechando la reactividad de estos complejos, los mismos autores desarrollaron la hidrodesh fluoración catalítica de estos trifluorometilarenos hacia los metilarenos empleando hidrosilanos.

¹⁶⁴ H. Iwamoto, H. Imiya, M. Ohashi, S. Ogoshi, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 19360-19367.

OBJETIVOS

En los antecedentes se ha mostrado la escasez de métodos para llevar a cabo la hidrodesfluoración de enlaces C–F de tipo sp^3 , en especial en condiciones suaves de reacción. Aprovechando la promiscuidad catalítica mostrada por las transaminasas en el Capítulo 1 en procesos de HDF sobre β -fluoroaminas, en este capítulo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- Establecer una metodología enzimática sencilla aplicable a la síntesis de acetofenona a partir de la 2-fluoroacetofenona.
- Optimizar las condiciones de reacción, estudiando en particular la necesidad del uso de un donador de amino en este proceso (Esquema 2.7).
- Estudiar a continuación la hidrodesfluoración de una serie de 1-aryl-2-fluoroetan-1-onas sustituidas en distintas posiciones del anillo aromático, prestando atención al carácter electrónico de los mismos, así como el efecto del halógeno en posición α .
- Examinar la posibilidad de realizar procesos enantioselectivos de hidrodesfluoración empleando una cetona racémica como sustrato de partida.
- Demostrar la aplicabilidad de esta reacción mediante el desarrollo de biotransformaciones a escala semipreparativa.



Esquema 2.7. Proceso de hidrodeshalogenación de cetonas halogenadas en posición α catalizado por transaminasas.

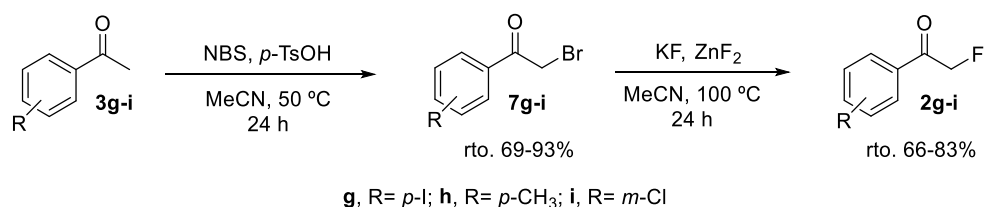
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los antecedentes de este capítulo se ha expuesto la limitada disponibilidad de métodos para eliminar átomos de flúor en compuestos organofluorados, en especial en enlaces $C(sp^3)-F$, así como la necesidad de presentar alternativas sostenibles a los métodos que emplean metales como catalizadores para este tipo de transformaciones. Aprovechando la promiscuidad catalítica mostrada por las transaminasas en el Capítulo 1,¹²⁶ donde se ha puesto a punto una metodología consistente en la resolución cinética de β -fluoroaminas racémicas por desaminación junto con un proceso de hidrodeshalogenación de manera simultánea, a continuación, en este Capítulo 2, nos planteamos el estudio de un proceso de hidrodeshalogenación sobre una serie de cetonas halogenadas en posición α empleando estos mismos enzimas (Esquema 2.7). Así, en un primer lugar se estudiará y optimizará el proceso considerando una serie de cetonas fluoradas en posición α , para posteriormente intentar extender esta aproximación a sustratos que contengan otro tipo de halógenos como por ejemplo el cloro en lugar del flúor. Finalmente, se explorará si este tipo de procesos se pueden realizar de forma enantioselectiva, con el fin de obtener cetonas ópticamente activas.

2.3.1. SÍNTESIS QUÍMICA DE SUSTRATOS DE PARTIDA Y POSIBLES PRODUCTOS DE REACCIÓN

2.3.1.1. Síntesis de las α -fluoroacetofenonas **2g-i**

Además de emplear las α -fluorocetonas **2a-f** ($R = H, 4-F, 4-Cl, 4-Br, 3-OMe$ y $4-OMe$, Esquema 1.13) descritas en el Capítulo 1, decidimos incorporar las α -fluoroacetofenonas **2g-i** ($4-I, 4-Me$ y $3-Cl$, Esquema 2.8) al panel de sustratos de este Capítulo 2, haciendo uso de la metodología descrita anteriormente.



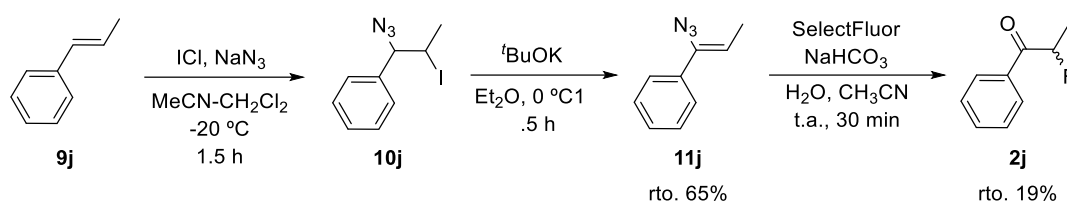
Esquema 2.8. Síntesis de las α -fluorocetonas de partida **2g-i**.

Debido a que las cetonas bromadas de partida no se encontraban disponibles comercialmente, estas fueron sintetizadas mediante un proceso de bromación a partir de las correspondientes acetofenonas **3g-i** con *N*-bromosuccinimida (NBS) y ácido *p*-toluensulfónico (*p*-TsOH) en acetonitrilo (MeCN) a 50 °C, obteniendo las mencionadas

α -bromoacetofenonas **7g-i** con rendimientos entre buenos y altos (69-93%).^{123b} Posteriormente se llevó a cabo la sustitución nucleófila ya mencionada en el Capítulo 1, obteniéndose las cetonas **2g-i** con buenos rendimientos (66-83%).¹²³

2.3.1.2. Síntesis de la α -fluoropropiofenona (**2j**)

Para poder examinar si este tipo de procesos podían ocurrir con cierta enantioselectividad, se seleccionó la α -fluoropropiofenona (**2j**) como posible sustrato racémico a estudiar en este capítulo. Su síntesis consistió en una ruta sintética de tres etapas mostrada en el Esquema 2.9.



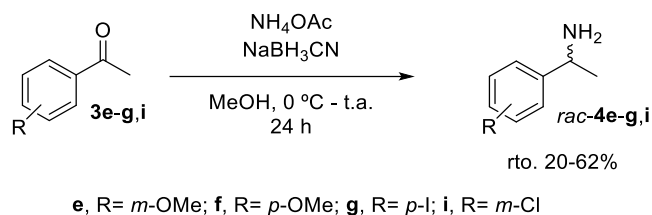
Esquema 2.9. Síntesis de la α -fluoropropiofenona (**2j**).

La reacción del *trans*- β -estireno (**9j**) con azida de sodio y cloruro de yodo condujo al (1-azido-2-yodopropil)benceno (**10j**), el cual una vez aislado fue tratado con *tert*-butóxido de potasio en dietiléter a 0 °C para obtener la vinilazida deseada **11j** con un rendimiento del 65%. En un último paso, se llevó a cabo la reacción de fluoración propiamente dicha, en la cual se hizo reaccionar la mencionada vinilazida con una suspensión de Selectfluor, bicarbonato de sodio y agua en acetonitrilo, dando lugar a la α -fluoropropiofenona (**2j**) con un rendimiento únicamente del 19%.¹⁶⁵

2.3.1.3. Síntesis química de las 1-ariletan-1-aminas **4e-g,i**

Finalmente, se sintetizaron las correspondientes aminas **4e-g,i** que podrían obtenerse como subproducto en las reacciones de deshalogenación. De este modo, partiendo de las acetofenonas **3e-g,i** disponibles comercialmente, se llevó a cabo su aminación reductiva en presencia de acetato de amonio (NH_4OAc) y cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN) en metanol seco como disolvente a temperatura ambiente durante 24 h (Esquema 2.10),¹¹⁷ obteniéndose las correspondientes aminas con unos rendimientos entre bajos y moderados (20-62%).

¹⁶⁵ S.-W. Wu, F. Liu, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 3642-3645.



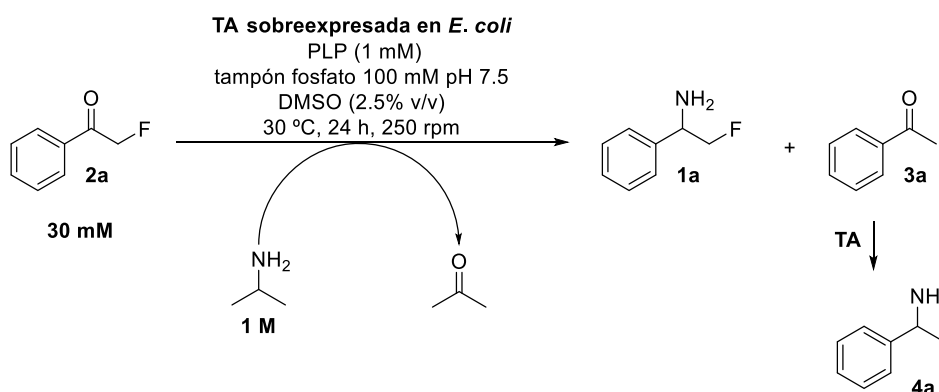
Esquema 2.10. Síntesis de las 1-ariletan-1-aminas racémicas **4e-g,i**.¹⁶⁶

2.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE HIDRODESFLUORACIÓN

2.3.2.1. Reacción de la 2-fluoroacetofenona (**2a**) en presencia de las TAs sobreexpresadas en *E. coli*

Tras haber observado en el Capítulo 1 la reacción de deshalogenación que tiene lugar con la α -fluorocetona **2a** en presencia de una serie de transaminasas comerciales (Figura 1.6), se seleccionaron una serie de ellas sobreexpresadas en *E. coli* y disponibles en el laboratorio (CV-TA, ArS-TA, ArR-TA, así como una variante de esta última con diversas mutaciones, la ArRmut11-TA) para llevar a cabo un estudio inicial de la HDF de la dicha cetona modelo **2a** (Tabla 2.1). Para ello se empleó el medio descrito ya en el Capítulo 1, usando una pequeña cantidad de DMSO para solubilizar mejor el sustrato de partida.

Tabla 2.1. Reactividad de **2a** empleando transaminasas sobreexpresadas en *E. coli* y 2-propilamina como donador de amino.



Entrada	TA	1a (%) ^a	2a (%) ^a	3a (%) ^a	4a (%) ^a
1	CV-TA	<1	5	46	49
2	ArR-TA	<1	88	12	<1
3	ArRmut11-TA	<1	96	4	<1
4	ArS-TA	<1	98	2	<1

^a Conversiones medidas por cromatografía de gases con fase estacionaria aquiral.

¹⁶⁶ Las aminas **4a-d,h,j** no fueron sintetizadas porque eran comercialmente accesibles.

Como se puede apreciar, la transaminasa CV-TA fue capaz de llevar a cabo la hidrolesfluoración, siendo lo suficientemente activa para conducir a la formación de α -metilbencilamina (**4a**) por posterior biotransaminación de la acetofenona (**3a**) generada. Sin embargo, las otras 3 enzimas probadas (entradas 2-4), condujeron únicamente a la acetofenona con conversiones inferiores al 13%. Además, en ningún caso se observó la formación de la amina fluorada **1a**. Por último, cabe destacar que puesto que con estas enzimas y con las comerciales (Figura 1.6) no se obtuvieron en muchos de los casos las cantidades esperadas de la amina **4a**,¹¹⁷ esto parecía indicar, como ocurrió con las β -fluoroaminas **1a-f**, que este proceso de HDF llevaba asociada cierta inactivación de las transaminasas empleadas como catalizadores del proceso.

2.3.2.2. Efecto del cofactor en la reacción de hidrolesfluoración sobre **2a** y **2d**

Como ya se ha comentado anteriormente, el PLP es el cofactor necesario para la reacción de transaminación, y es una de las formas de la vitamina B₆, que tiene tres derivados, piridoxal, piridoxina y piridoxamina. Este cofactor actúa como mediador en las reacciones que involucran a los compuestos aminados como transferidor del grupo amino. Así, el PLP reacciona con el grupo donador de amino, para formar la piridoxamina 5'-fosfato (PMP), la cual a su vez transferirá el grupo amino al compuesto carbonílico aceptor del mismo, regenerándose de nuevo el PLP.

Puesto que en las reacciones con las β -fluoroaminas llevadas a cabo en el Capítulo 1 no fue necesaria la adición de ningún aceptor de amino,¹²⁶ decidimos en este caso estudiar si para las reacciones con las cetonas halogenadas sería necesario añadir un donador de amino. Así, en un primer lugar se realizaron una serie de pruebas en las cuales se añadió al medio PLP o la forma aminada PMP en ausencia de amina (Figura 2.2). Para realizar dicho estudio se emplearon las transaminasas CV-TA y ArR-TA, ya que mostraron los mejores resultados en el estudio inicial (entradas 1 y 2, Tabla 2.1).

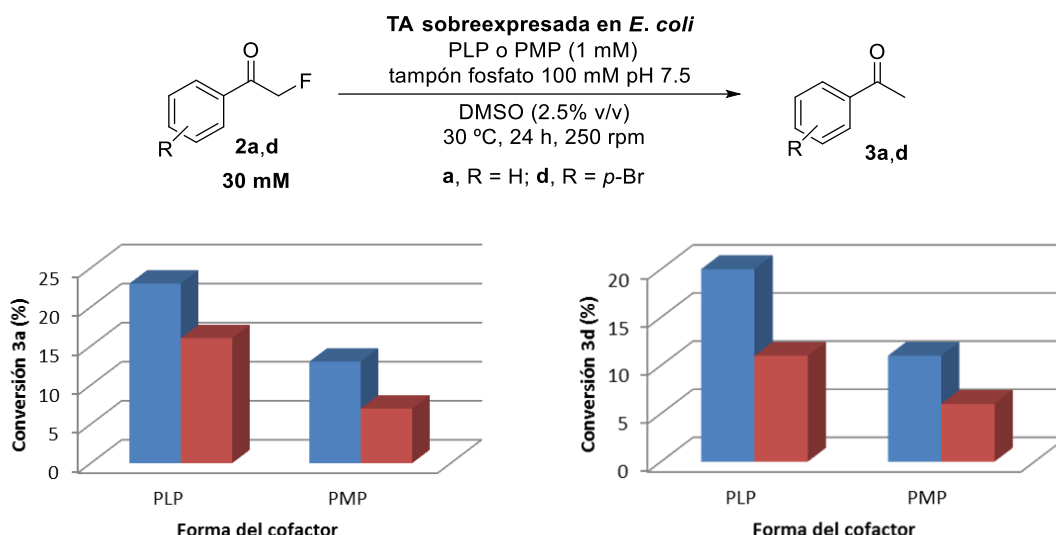


Figura 2.2. Hidrodesfluoración de las cetonas **2a** (izquierda) y **2d** (derecha) añadiendo diferentes formas del cofactor (PLP o PMP) en ausencia del donador de amino. Las barras azules corresponden a los resultados obtenidos con la CV-TA, mientras que las barras rojas corresponden a los resultados obtenidos con la ArR-TA.

Por lo general se obtuvieron conversiones muy bajas de la cetona deshalogenada tanto empleando PLP o PMP como cofactor. Por lo observado, y puesto que la concentración del cofactor (1 mM) es mucho más baja que la del sustrato (30 mM), parece ser necesario su reciclaje para que la reacción de hidrodeshalogenación pueda transcurrir.

2.3.2.3. Influencia de la concentración de la amina en la reacción de hidrodesfluoración

Llegados a este punto, decidimos investigar cual era la concentración más baja necesaria para llevar a cabo con éxito la reacción estudiada. Para ello, se llevaron a cabo las reacciones de hidrodesfluoración sobre las cetonas fluoradas **2a** y **2d** empleando distintas concentraciones de dos aminas comúnmente aceptadas por las transaminasas, la 2-propilamina y la L-alanina, en este caso empleando únicamente la CV-TA (Figura 2.3). Se utilizó la alanina de configuración natural, ya que se sabe por estudios previos¹¹⁸ que este enzima acepta como donador de amino este isómero y no el de configuración D.

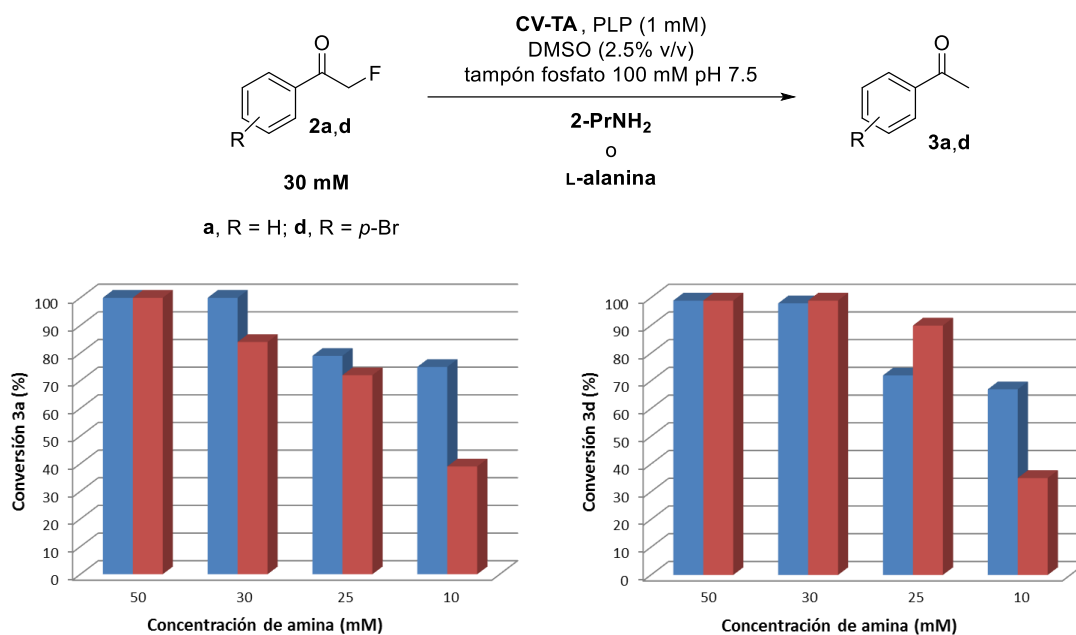
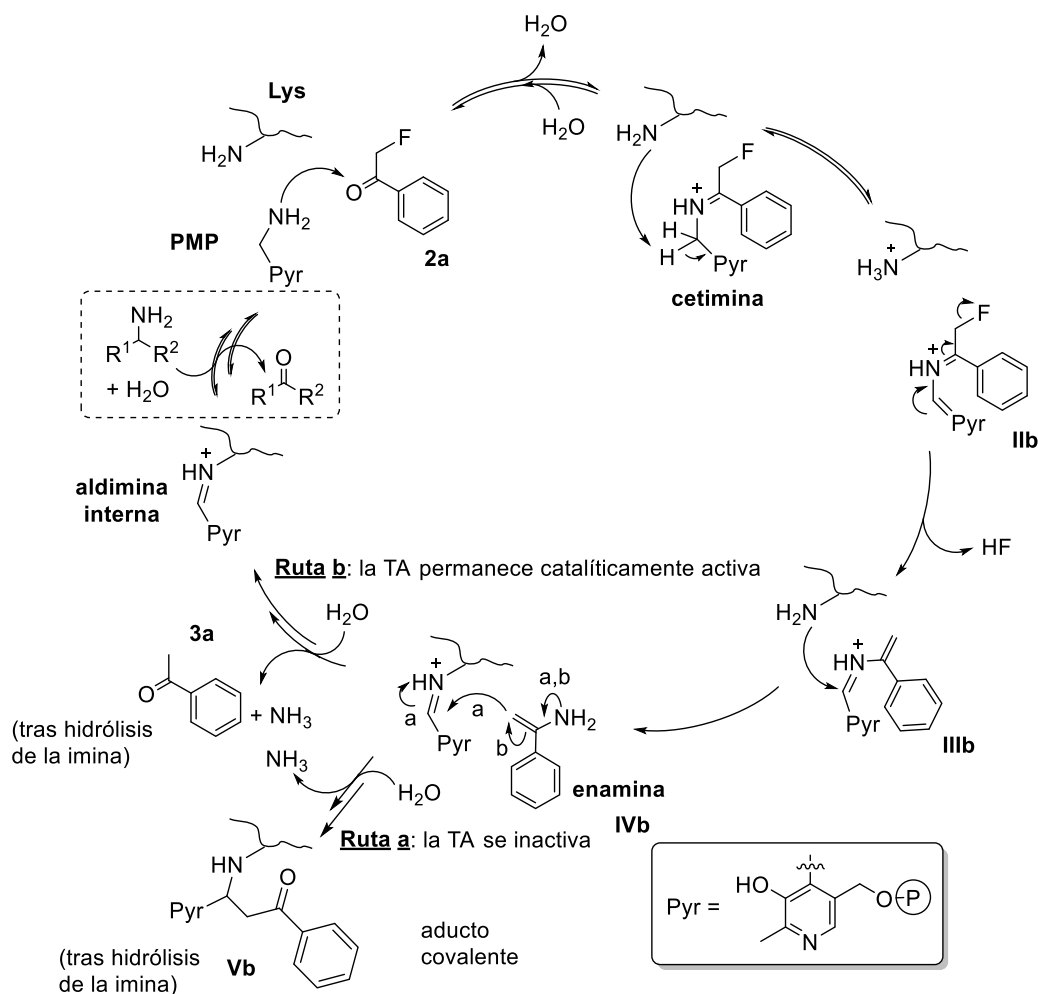


Figura 2.3. Hidrodesfluoración de las cetonas **2a** y **2d** empleando diferentes aminas a distintas concentraciones y en presencia de la CV-TA. Las barras azules corresponden a los resultados obtenidos con la 2-propilamina, mientras que las barras rojas se corresponden con los resultados obtenidos con la L-alanina.

Como se aprecia con ambas cetonas, tanto con la 2-propilamina como con la L-alanina, la conversión hacia la formación de la cetona deshalogenada disminuyó a medida que se redujo la concentración de la amina, observando que resulta necesaria al menos una concentración de 30 mM de dicho compuesto para alcanzar conversiones cuantitativas de la cetona deshalogenada. Esto parece indicar que por cada molécula de cetona halogenada se necesita una molécula de amina. Cabe destacarse que en ningún caso se observó la aparición de las aminas desfluoradas **4a** y **4d**.

2.3.3. MECANISMO DE HIDRODESFLUORACIÓN E INHIBICIÓN CON LAS α -FLUOROCETONAS

En base a los resultados experimentales obtenidos hasta ahora y a lo ya discutido en la Sección 1.3.1.4 del Capítulo 1, además de los precedentes descritos en la bibliografía,^{98,99} se ha propuesto el siguiente mecanismo para explicar tanto la HDF como la inhibición enzimática observada empleando α -fluorocetonas (Esquema 2.11).



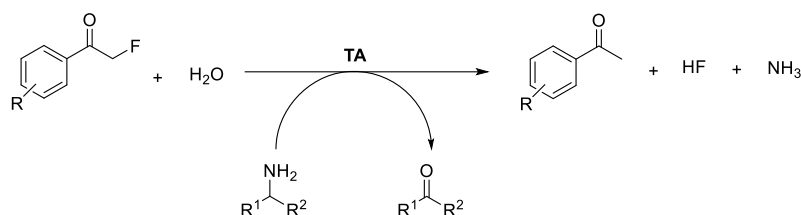
Esquema 2.11. Mecanismo de hidrogenofluoración e inhibición empleando cetona fluorada en posición α con TAs.

En un primer paso la α -fluorocetona interacciona con el PMP formando el intermedio cetimínico típico, que por desprotonación catalizada por la lisina del centro activo del enzima da lugar a la cetimina **IIb**. Debido a la presencia del átomo de flúor en posición α se produce la pérdida de dicho átomo, dando lugar a la especie enamínica **IIIb**, la cual, por ataque de la lisina catalítica, conduce a la formación de la aldimina interna desprendiéndose la enamina deshalogenada **IVb**.

Llegados a este punto, el sistema puede seguir dos caminos de reacción diferentes. Así, si la enamina queda retenida el suficiente tiempo en el centro activo de la transaminasa, ataca a la imina formada entre el PLP y la lisina catalítica generando un aducto imínico, que tras ser hidrolizado generará el producto **Vb** (*ruta a*) inactivando irreversiblemente a la transaminasa. Este tipo de aductos, como se ha visto en el primer capítulo, pueden ser caracterizados.^{96,126} Por el contrario, si esta enamina difunde

rápidamente hacia la disolución, se propone la formación de la cetona deshalogenada **3a** tras un paso de hidrólisis (*ruta a*), pudiendo entrar el enzima en un nuevo ciclo catalítico. Por último, para regenerar el PMP, es necesaria la participación de una amina (por ejemplo, 2-PrNH₂).

Por lo tanto, la reacción global de hidrodesfluoración quedaría tal y como se muestra en el Esquema 2.12. Formalmente, la cetona fluorada en presencia de agua y una amina, da lugar a la cetona desfluorada, obteniéndose como co-productos una molécula de amoníaco, una de fluoruro de hidrógeno y la amina oxidada.



Esquema 2.12. Reacción de HDF de cetonas fluoradas en posición α mediada por TAs.

2.3.4. REACCIÓN DE HIDRODESFLUORACIÓN SOBRE LAS α -FLUOROCETONAS **2a-i**

Una vez estudiada la cantidad de amina requerida en nuestra reacción de interés, y habiendo establecido su concentración mínima necesaria (30 mM), se decidió extender la metodología a distintas α -fluorocetonas **2a-i** sustituidas en las posiciones *meta* y *para* del anillo aromático, empleando la CV-TA, ya que fue el biocatalizador que mejores resultados ofreció (Figura 2.4). Para este estudio se seleccionaron la 2-propilamina y a la L-alanina como posibles aminas. Salvo para la 1-(3-clorofenil)-2-fluoroetan-1-ona (**2i**), donde la conversión no superó el 70% con ninguna de las dos aminas empleadas, la mayoría de las reacciones transcurrieron con valores de conversión cercanos o por encima del 90%, dando lugar a las correspondientes acetofenonas **3a-i**. Cabe remarcar que se obtuvieron valores de conversión ligeramente superiores cuando se empleó 2-propilamina como amina, no observándose en ninguno de los casos la biotransaminación de las cetonas desfluoradas hacia las correspondientes 1-ariletan-1-aminas.

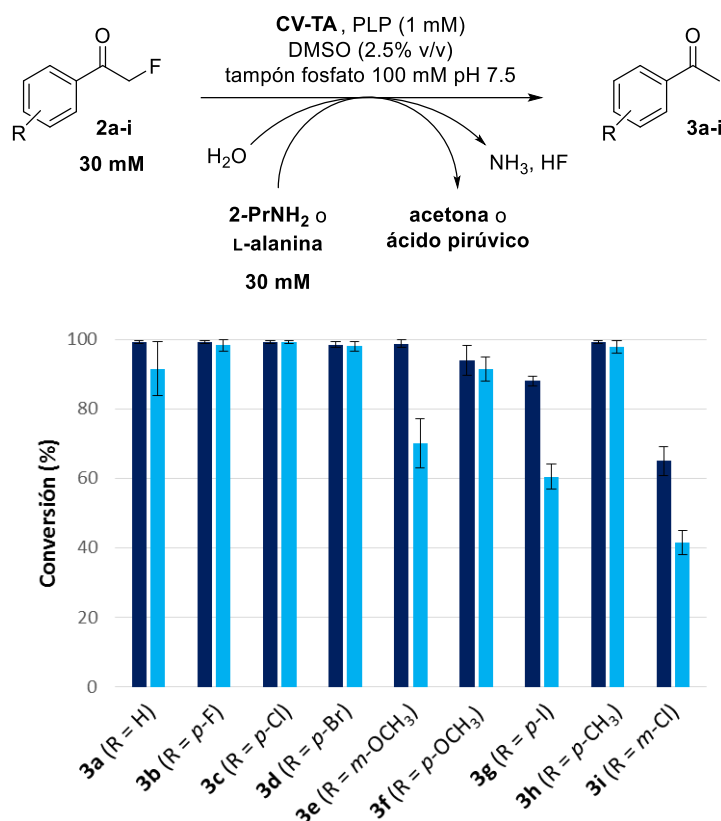


Figura 2.4. Reacción de HDF de las α -fluorocetonas **2a-i** catalizada por la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* sobreexpresada en *E. coli* empleando 2-propilamina (azul oscuro) o L-alanina (azul claro) como aminas (30 mM).

Para demostrar una mayor aplicabilidad de esta metodología, se llevaron a cabo los procesos de hidrodesfluoración de las α -fluorocetonas **2b** (R= 4-F) y **2h** (R= 4-OCH₃) a una mayor escala (30 mg, 30 mM) con la transaminasa CV-TA, obteniéndose tras 45 h de incubación las correspondientes acetofenonas **3b** y **3h** que fueron aisladas tras un simple proceso de extracción con rendimientos aislados del 90 y 40% respectivamente.

Se ha comprobado que para obtener las cetonas deshalogenadas con conversiones cuantitativas, se necesitaba al menos una concentración equimolar de la amina con respecto al sustrato. Sin embargo, es cierto que en algunos casos las conversiones no fueron totales, y puesto que como ya se ha mencionado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, debido a que la formación de las aminas en los procesos catalizados por las TAs se encuentra termodinámicamente desfavorecida, requiriéndose un exceso grande del donador de amino, nos planteamos aumentar ligeramente la concentración de la amina sin que ello provocara la formación de las 1-ariletan-1-aminas en gran cantidad.

Por ello, se realizó una prueba rebajando el exceso de la amina de 1 a 0.1 M con el fin de favorecer las conversiones hacia las cetonas desfluoradas **3a-i**. Para llevar a cabo este estudio se empleó de nuevo únicamente la CV-TA, utilizando una concentración de amina de 100 mM, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 2.5. En estas condiciones también se obtuvieron las cetonas desfluoradas con conversiones excelentes, no detectando además la presencia de las correspondientes aminas desfluoradas independientemente de la naturaleza de la amina empleada.

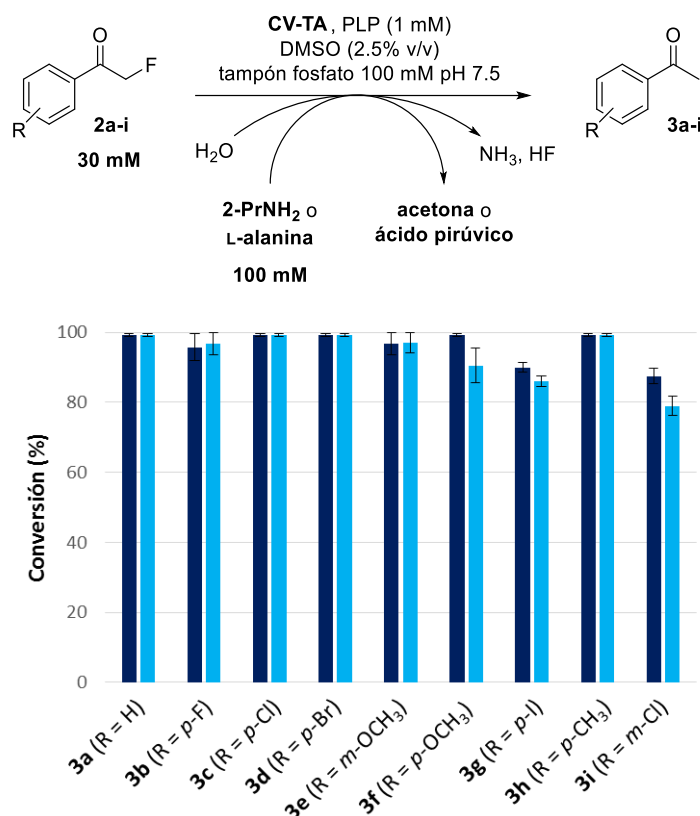


Figura 2.5. Conversiones obtenidas en la reacción de hidrodesfluoración de las α -fluorocetonas **2a-i** catalizada por la CV-TA empleando 2-propilamina (azul oscuro) o L-alanina (azul claro) con una concentración de 100 mM.

2.3.5. HIDRODESCLORACIÓN ENZIMÁTICA DE LA α -CLOROACETOFENONA (8)

El hecho de que estos enzimas actuaran sobre sustratos aromáticos fluorados en posición α nos llevó a plantearnos la posibilidad de ampliar esta metodología a otros sustratos aromáticos, en este caso considerando otro halógeno en dicha posición como el cloro. De este modo se realizaron las pruebas de hidrodeshalogenación en las mismas

condiciones empleadas para las hidrodesfluoraciones pero utilizando en este caso la α -cloroacetofenona (**8**). Puesto que no se habían realizado estudios previos con este sustrato, se llevaron a cabo los experimentos empleando las 4 transaminasas sobreexpresadas en *E. coli* disponibles en el laboratorio ya mostradas en la Tabla 2.1.

En cuanto a la elección de las aminas, puesto que este tipo de cetonas pueden ser inestables frente a la presencia de ciertas aminas nucleófilas como el caso de la 2-propilamina, se decidió estudiar también el comportamiento de una amina menos nucleófila como es la alanina, ya utilizada a lo largo de este capítulo en las reacciones de HDF. Hay que mencionar que la CV-TA y la ArS-TA, ambas S-selectivas, se sabe que aceptan la L-alanina, al contrario que la ArR-TA y la ArRmut11-TA, que aceptan D-alanina. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2.6.

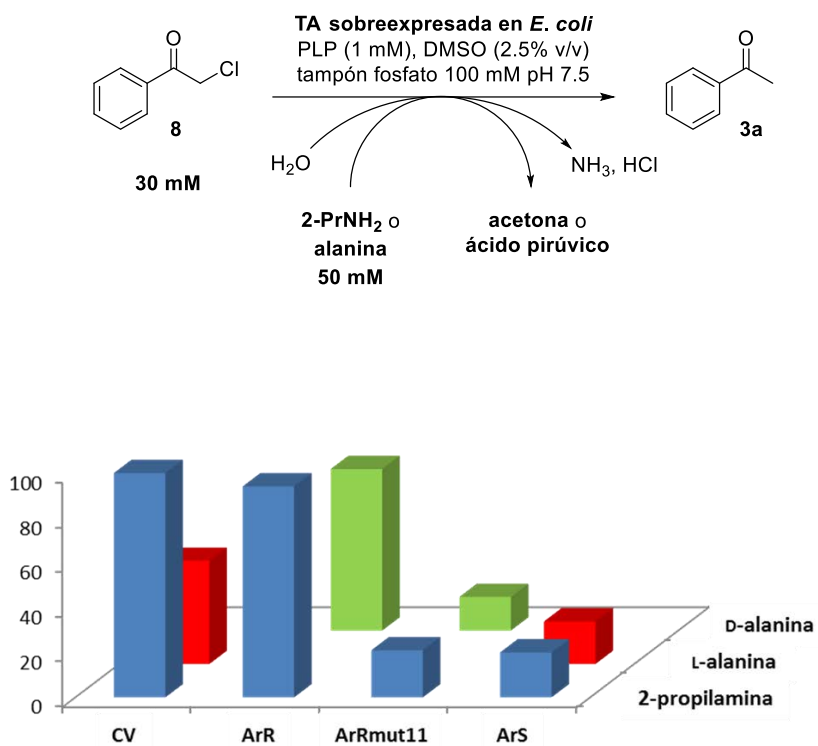


Figura 2.6. Hidrodescloración de la α -cloroacetofenona **8** empleando transaminasas sobreexpresadas en *E. coli* y alanina o 2-propilamina como amina (50 mM).

Como se puede apreciar, también se observa el proceso de deshalogenación de la α -cloroacetofenona (**8**), obteniéndose los mejores valores de conversión cuando se emplearon las transaminasas CV-TA y ArR-TA. En cuanto a la amina empleada, los mejores resultados se obtuvieron con la 2-propilamina (50 mM), no apreciándose problemas de estabilidad del sustrato de partida. Por último, al igual que en los análogos

fluorados, en estas condiciones no se observó la transaminación de la cetona deshalogenada hacia la correspondiente amina **4a**.

2.3.6. HIDRODESFLUORACIÓN REGIOSELECTIVA DE LA 2-FLUORO-1-(4-FLUOROFENIL)ETAN-1-ONA (**2b**) CATALIZADA POR Pt/C

Desde un punto de vista químico, resultó interesante observar como la cetona difluorada **2b** (R= 4-F) pudo ser deshalogenada selectivamente en la posición α al carbonilo, mientras que el átomo de flúor en el anillo aromático permaneció inalterado. Aunque evidentemente ambos enlaces C–F son de naturalezas muy diferente, como ya se ha comentado en los antecedentes de este capítulo, muchas de las metodologías descritas hasta el momento empleando principalmente metales de transición activan enlaces C–F en arenos.

Es por ello, que en este punto se decidió estudiar como una posible metodología complementaria la descrita por Sajiki y colaboradores,¹⁶⁷ en la que se describe la HDF de fluoroarenos empleando platino sobre carbono en combinación con una mezcla de 2-propanol, agua y carbonato de sodio. Así, seleccionando la cetona **2b** como sustrato y empleando una TA fuimos capaces de catalizar la eliminación del átomo de flúor en la posición α al carbonilo, mientras que con este sistema catalítico metálico se podría actuar selectivamente sobre el átomo de flúor aromático. Los resultados se muestran en la Figura 2.7.

¹⁶⁷ Y. Sawama, Y. Yabe, M. Shigetsura, T. Yamada, S. Nagata, Y. Fujiwara, T. Maegawa, Y. Monguchi, H. Sajiki, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 777-782.

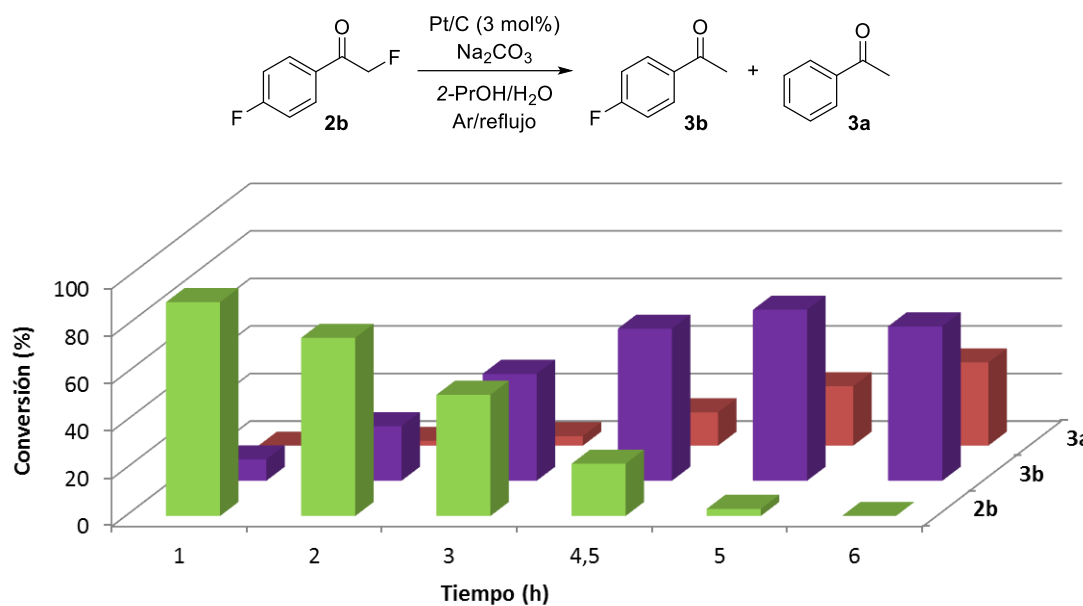


Figura 2.7. Conversiones obtenidas empleando Pt/C en la reacción de HDF de la cetona **2b**.

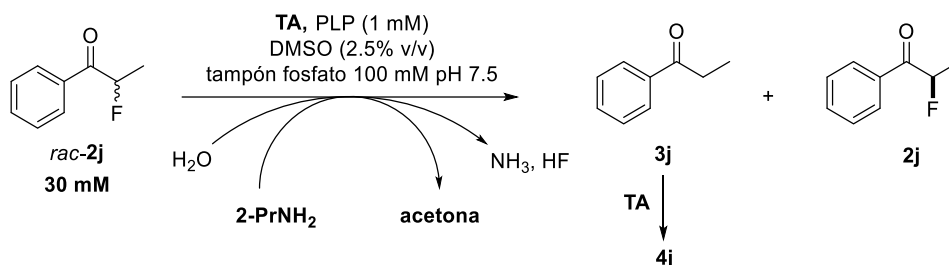
Desafortunadamente, los resultados obtenidos no fueron los esperados, ya que no se consiguió eliminar selectivamente el átomo de flúor en la posición aromática. A las 2 h de reacción ya se apreció la formación de una cantidad apreciable de la acetofenona **3b**, que posteriormente evolucionó tras pérdida del flúor aromático para dar lugar a la acetofenona (**3a**). Esto, de todas maneras, pone de manifiesto que la metodología biocatalítica aquí descrita es superior en cuanto a la selectividad proporcionada para este proceso.

2.3.7. HIDRODESFLUORACIÓN ENZIMÁTICA ENANTIOSELECTIVA DE LA α -FLUOROPROPIOFENONA (**2j**)

Tras los buenos resultados obtenidos con las desfluoraciones en posición α empleando transaminasas, decidimos profundizar en este proceso e investigar en este momento su posible versión estereoselectiva, dado que se emplea un catalizador biológico. Por ello, seleccionamos una cetona α -fluorada con un centro quiral como es el caso de la α -fluoropropiofenona (**2j**), para intentar llevar a cabo su resolución cinética, en un proceso similar al ya descrito en el Capítulo 1. De este modo, se obtendría por un lado la cetona fluorada remanente (enantiopura en la situación ideal), y por otro lado el producto de desfluoración como es la propiofenona (**3j**) en nuestro caso, aunque este último podría evolucionar hacia la formación de la 1-fenilpropan-1-amina (**4j**) si ocurriera el consiguiente proceso de biotransaminación. Así, se probaron las 23

transaminasas del kit comercial de Codexis, junto con las transaminasas sobreexpresadas en *E. coli* ya mencionadas. Los mejores resultados obtenidos se recogen en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Hidrodesfluoración enzimática enantioselectiva de la α -fluoropropiofenona.



Entrada	Enzima	[2-PrNH ₂] (mM)	t (h)	2j (%) ^a	3j (%) ^a	4j (%) ^a	Subproducto (%) ^a	ee 2j (%) ^{b,c}
1	ATA-113	50	24	23	74	3	<1	70 (2)
2	ATA-113	30	24	46	53	<1	<1	47 (2)
3	ATA-237	50	24	22	75	3	<1	28 (1)
4	ATA-237	30	24	11	89	<1	<1	37 (1)
5	ATA-251	50	24	55	36	5	4	48 (2)
6	ATA-251	30	24	57	41	1	1	55 (2)
7	TA-P1-B04	50	24	69	31	<1	<1	n.d.
8	TA-P1-B04	30	24	13	87	<1	<1	32 (2)
9	TA-P1-B04	30	6	62	38	<1	<1	12 (2)
10	ATA-033	50	24	8	68	7	17	n.d.
11	ATA-033	30	24	16	79	<1	5	78 (2)
12	ATA-033	30	12	17	81	<1	2	82 (2)
13 ^d	ATA-033	30	12	29	62	<1	9	74 (2)
14	TA-P2-A07	50	24	30	28	<1	42	n.d.
15	TA-P2-A07	30	24	33	31	1	35	42 (2)
16	TA-P2-A07	30	12	41	36	<1	23	36 (2)
17	ATA-013	30	24	38	36	<1	26	60 (2)
18	ATA-013	30	12	48	38	<1	13	46 (2)
19	ATA-024	30	24	9	72	10	9	n.d.
20	ATA-024	30	2.5	46	33	<1	21	58 (2)
21 ^d	ATA-024	30	8	46	46	<1	8	60 (2)
22	ATA-025	30	24	17	47	6	30	n.d.
23	ATA-025	30	3	62	11	<1	27	42 (2)
24	ArRmut11-TA	30	24	31	56	<1	13	80 (2)
25	ArRmut11-TA	30	8	42	35	<1	23	74 (2)
26	<i>E. coli</i> top 10	30	24	>99	<1	<1	<1	n.d.
27	BSA	30	24	>99	<1	<1	<1	n.d.

^a Conversiones medidas por CG. ^b Excesos enantioméricos medidos por CG quiral. ^c Orden de elución del enantiómero mayoritario (entre paréntesis). ^d Reacción a pH 6.5. n.d. no determinado.

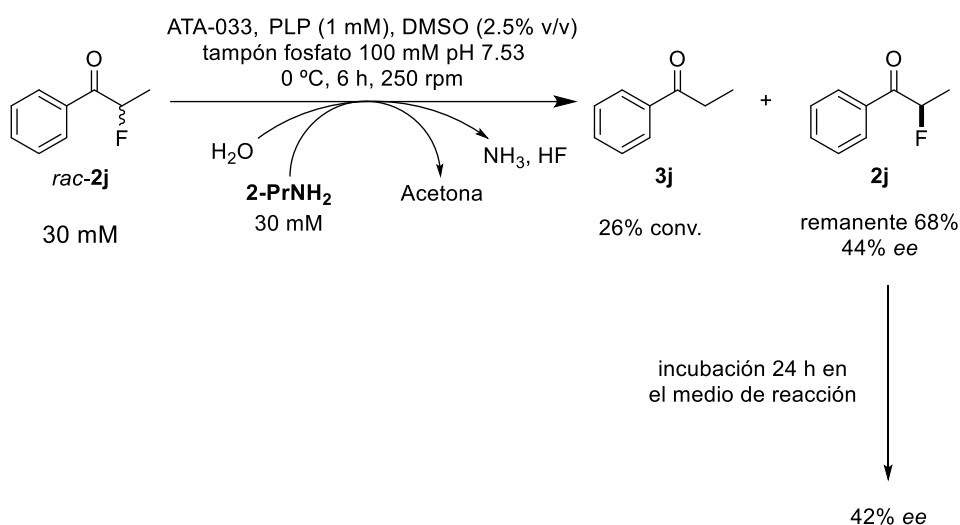
Un inconveniente que se encontró en esta reacción fue la formación de un subproducto no identificado, lo que disminuyó en muchos casos la cantidad de la cetona

remanente enantioenriquecida. De todas maneras, en la mayoría de los casos no se formó en cantidades altas (<20%). Para asegurarnos que dicho subproducto no tuviera su origen en una reacción catalizada por otros enzimas provenientes de las células de *E. coli*, o que bien se formara a través de una catálisis inespecífica,¹²² se incubó el sustrato tanto con las células liofilizadas de *E. coli* (soporte biológico de las transaminasas sobreexpresadas, entrada 26) como con la albúmina de suero bovino, una proteína de transporte muy comúnmente empleada en este tipo de estudios debido a que carece de centro activo en su estructura (entrada 27). En ninguno de los dos casos se llegó a observar reacción alguna, por lo que asumimos que la formación del subproducto está catalizada por las TAs. Desgraciadamente, no ha sido posible aislar este compuesto debido a la rápida variación de su conversión con el tiempo.

Por otro lado, tras 24 h de reacción la cantidad de cetona remanente fue mucho menor del 50% con algunas de las transaminasas examinadas, por lo que se rebajaron los tiempos de reacción y también se varió la concentración de la 2-propilamina en función de los resultados obtenidos. Así, transaminasas como la TA-P2-A07 o la ATA-013 precisaron de 12 h de reacción (entradas 16 y 18), la TA-P1-B04 de 6 h (entrada 9) y otros enzimas como la ATA-024 y la ATA-025 necesitaron de tiempos aún más cortos, entre 2.5 y 3 h de reacción (entradas 20 y 23), para alcanzar conversiones de en torno al 50%. Al igual que en las reacciones anteriores de deshalogenación, la amina desfluorada **4j**, producto de la transaminación de la propiofenona, se observó únicamente en muy pequeño porcentaje en la mayoría de los casos (<5%).

En lo que respecta a los excesos enantioméricos, aunque los resultados no fueron excelentes, puesto que no se obtuvo la cetona remanente enantiopura con ninguna de las transaminasas estudiadas, son destacables los resultados obtenidos con algunas de ellas, como el caso de la ArRmut11-TA (entrada 24), con un *ee* del 80% y un 31% de cetona remanente, o de la ATA-033 (entrada 12), con un *ee* del 82% y un 17% de la cetona **2j**. Otra dificultad adicional fue la de la asignación de la configuración absoluta, ya que este compuesto no ha sido previamente descrito en la bibliografía y es líquido a temperatura ambiente, lo que impide realizar una determinación por difracción de rayos X. Aun así, hay que destacar que salvo para el caso de la ATA-237 (entradas 3 y 4), donde se obtuvo el primer pico de elución por cromatografía de gases de manera mayoritaria, para el resto de enzimas siempre se obtuvo mayoritariamente el enantiómero contrario, correspondiente al segundo pico de elución en CG.

Tras estos resultados se nos planteó la duda de si nuestro sustrato de interés, puesto que es un centro en posición α a un grupo carbonilo, podría sufrir racemización en el medio de reacción, por lo que se realizó la prueba que se muestra en el Esquema 2.13. Una vez realizada una biotransformación dando lugar a la cetona **2j** con un exceso enantiomérico remanente aceptable, se aisló tras extracción y se incubó en el medio de reacción (en ausencia de enzima, obviamente) otras 24 h adicionales, volviendo a medir su exceso enantiomérico tras ese tiempo, observando que el exceso enantiomérico decayó ligeramente. Esto indicó que los *ee* de la cetona **2j** provenientes del proceso enzimático podrían ser incluso algo mejores que los mostrados en la Tabla 2.2.



Esquema 2.13. Prueba de racemización de la cetona **2j**.

Tras observar que la α -fluoropropiofenona (**2j**) podía racemizar en el medio de reacción, decidimos estudiar la posible influencia del pH en este tipo de isomerización, así como en la propia reacción enzimática. Para ello, se escogieron 3 valores de pH distintos (7.5, 6.5 y 6.0), y se llevaron a cabo las reacciones enzimáticas. Para este estudio, se seleccionaron las transaminasas ATA-024, ATA-033 y ArRmut11-TA ya que mostraron buenas conversiones y selectividades en tiempos de reacción cortos (ver resultados previos en la Tabla 2.2). Los resultados se recogen en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Efecto del pH en la HDF de la α -fluoropropiofenona (**2j**) catalizada por TAs.

TA	Tiempo de incubación (h)	2j (%) ^a	3j (%) ^a	Subproducto (%) ^a	ee 2j (%) ^{b,c}	pH
ATA-024	2.5	46	33	21	58 (2)	7.5
	8	46	46	8	60 (2)	6.5
	8	65	25	10	47 (2)	6.0
ATA-033	12	17	81	2	82 (2)	7.5
	8	51	30	19	66 (2)	6.5
	8	65	17	18	55 (2)	6.0
ArRmut11-TA	8	42	35	23	74 (2)	7.5
	8	52	26	22	60 (2)	6.5
	8	57	22	21	64 (2)	6.0

^a Conversiones medidas por CG. ^b Excesos enantioméricos medidos por CG quiral. ^c Orden de elución del enantiómero mayoritario (entre paréntesis).

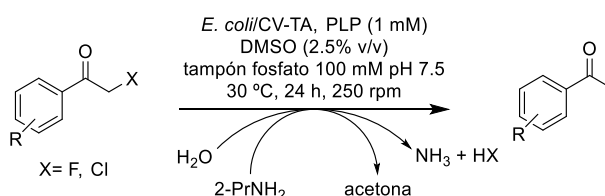
Como se puede apreciar, el pH no afectó en gran medida al exceso enantiomérico de la cetona remanente. De hecho, de manera general se observaron conversiones más altas a pH 7.5 que a pHs ácidos, obteniendo además la cetona **2j** con selectividades similares o incluso mejores a pH 7.5, por lo que la disminución del pH no ayudó a mejorar la enantioselectividad del proceso enzimático.

A pesar de que los resultados en cuanto a estereoselectividad no son excelentes, hay que destacar que este es uno de los primeros ejemplos en los que se ha realizado una reacción de hidrogenodesfluoración de manera enantioselectiva.¹⁶⁸ Además, hay que recalcar que la TA en este caso tiene que discernir entre dos sustituyentes que se encuentran en posición α al centro reactivo y que además no difieren demasiado en cuanto a tamaño, lo que vuelve a poner de manifiesto las posibilidades sintéticas que ofrecen los biocatalizadores como catalizadores estereoselectivos.

¹⁶⁸ M. F. Kuehnel, T. Schlöder, S. Riedel, B. Nieto-Ortega, F. J. Ramírez, J. T. López Navarrete, J. Casado, D. Lentz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2218-2220.

CONCLUSIONES

- Se ha aprovechado la promiscuidad catalítica mostrada por las transaminasas para obtener una serie de acetofenonas a partir de las correspondientes α -fluorocetonas aplicando una metodología novedosa de HDF en medio acuoso. Asimismo, se ha observado que este proceso también ocurre con una α -clorocetona, dando lugar a la correspondiente cetona deshalogenada con resultados satisfactorios (Esquema 2.14).¹⁶⁹



Esquema 2.14. Reacción de hidrodeshalogenación desarrollada en este capítulo.

- Se han optimizado las condiciones de reacción de hidrodeshalogenación, siendo necesaria una concentración mínima estequiométrica de una amina para que la reacción pueda tener lugar de manera cuantitativa. La transaminasa de *Chromobacterium violaceum* junto con la 2-propilamina han mostrado los mejores resultados. Empleando una cantidad baja de la amina, se ha conseguido además minimizar la formación de las aminas deshalogenadas.
- Se ha descrito el mecanismo de dicha reacción, el cual sugiere la necesidad de emplear una amina para poder realizar este proceso con éxito. Asimismo, se ha dado cuenta del proceso de inactivación enzimática que ocurre de manera simultánea con la reacción de HDF.
- Se ha escalado el proceso de hidrodeshalogenación empleando 30 mg de las cetonas **2b** y **2h**, obteniendo buenos resultados en términos de conversión y rendimiento.
- Se ha demostrado que este proceso puede transcurrir de manera enantioselectiva, aunque no ha sido posible obtener la cetona fluorada enantiopura ya que, por un lado, las transaminasas estudiadas no demostraron ser lo suficientemente selectivas sobre este sustrato y además ocurría un proceso de racemización indeseado de manera simultánea. La ingeniería de TAs puede dar lugar a catalizadores más estereoselectivos en un futuro cercano.

¹⁶⁹ M. García-Ramos, A. Cuetos, W. Kroutil, G. Grogan, I. Lavandera, *ChemCatChem*, DOI: 10.1002/cctc.202100901.

PARTE EXPERIMENTAL

2.5.1. GENERAL

La procedencia de los compuestos químicos, transaminasas y disolventes es común a lo establecido en el Capítulo 1. El 2-propanol (2-PrOH) fue destilado bajo nitrógeno y secado sobre hidruro de calcio.

2.5.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS

Las técnicas de cromatografía en gel de sílice y resonancia magnética nuclear se emplearon según se han descrito en el Capítulo 1.

2.5.2.1. Cromatografía de gases (CG)

Los análisis mediante cromatografía de gases se realizaron en cromatógrafos Hewlett-Packard 6890 Plus y 7820A con detector de ionización de llama (FID) utilizando para el seguimiento de las conversiones las columnas de relleno aquiral HP-1 (30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m, 12.2 psi N₂) y HP-5 (30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m, 12.2 psi N₂), adicionalmente se empleó la columna de relleno quiral CP-Chirasil-DEX-CB (25 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, 12.2 psi N₂) para el seguimiento de las mismas. Para la medida de los excesos enantioméricos se empleó la columna de relleno quiral Rt- β -Dex (25 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, 12.2 psi N₂). Las condiciones y los tiempos de retención se muestran en las Tablas 2.4, 2.5 y 2.6.

Tabla 2.4. Determinación de las conversiones por CG.

Compuesto	Columna	Programa ^a	Tiempo de retención (min)
2a	HP-5	50/15/6/60/0/40/220/2	14.3
3a	HP-5	50/15/6/60/0/40/220/2	10.2
4a	HP-5	50/15/6/60/0/40/220/2	9.1
2b	Chirasil-Dex-CB	90/0/2.5/120/0/40/200/3	9.8
3b	Chirasil-Dex-CB	90/0/2.5/120/0/40/200/3	7.2
4b	Chirasil-Dex-CB	90/0/2.5/120/0/40/200/3	9.0; 9.2
2c	HP-1	70/9/5/75/0/40/180/0	9.5
3c	HP-1	70/9/5/75/0/40/180/0	8.3
4c	HP-1	70/9/5/75/0/40/180/0	8.9
2d	HP-1	75/18/30/220/2	20.0
3d	HP-1	75/18/30/220/2	19.5
4d	HP-1	75/18/30/220/2	19.8
2e	Chirasil-Dex-CB	130/12/35/200/1	10.0
3e	Chirasil-Dex-CB	130/12/35/200/1	6.5
4e	Chirasil-Dex-CB	130/12/35/200/1	7.3; 7.4
2f	HP-1	100/0/2/120/0/40/200/2	9.8
3f	HP-1	100/0/2/120/0/40/200/2	9.0
4f	HP-1	100/0/2/120/0/40/200/2	7.5
2g	Chirasil-Dex-CB	120/0/30/180/0/5/190/1/10/200/4	4.9
3g	Chirasil-Dex-CB	120/0/30/180/0/5/190/1/10/200/4	4.4
4g	Chirasil-Dex-CB	120/0/30/180/0/5/190/1/10/200/4	4.6
2h	HP-5	110/3/3/125/0/40/200/2	6.1
3h	HP-5	110/3/3/125/0/40/200/2	5.3
4h	HP-5	110/3/3/125/0/40/200/2	4.7
2i	HP-5	80/10/30/200/2	8.9
3i	HP-5	80/10/30/200/2	7.1
4i	HP-5	80/10/30/200/2	7.7
8	HP-1	60/0/10/100/1/20/200/2	7.5
3a	HP-1	60/0/10/100/1/20/200/2	5.1
4a	HP-1	60/0/10/100/1/20/200/2	4.9
2j	Chirasil-Dex-CB	100/0/2.5/120/0/10/200/0	7.1
3j	Chirasil-Dex-CB	100/0/2.5/120/0/10/200/0	7.6
4j	Chirasil-Dex-CB	100/0/2.5/120/0/10/200/0	8.0; 8.2

^a T_{inicial} (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T_{final} (°C)/ tiempo (min).

Tabla 2.5. Determinación de las conversiones por CG para la hidroduesfluoración regioselectiva de 2b.

Compuesto	Columna	Programa ^a	Tiempo de retención (min)
2a	HP-5	90/0/4/115/0/40/200/2	5.2
2b	HP-5	90/0/4/115/0/40/200/2	4.8
3a	HP-5	90/0/4/115/0/40/200/2	4.6
3b	HP-5	90/0/4/115/0/40/200/2	4.4

^a T_{inicial} (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T_{final} (°C)/ tiempo (min).

Tabla 2.6. Determinación del *ee* de **2j** por CG empleando una fase estacionaria quiral.

Compuesto	Columna	Programa ^a	Tiempo de retención (min)
2j	Rt-β-Dex	100/0/2.5/130/0/20/200/0.5	7.8 (1); 8.0 (2)

^a T_{inicial} (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T_{final} (°C)/ tiempo (min).

2.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS NO ENZIMÁTICOS

Las 1-aril-2-fluoroetan-1-onas **2a-f** se sintetizaron tal como se ha descrito en el Capítulo 1, el resto de los procedimientos desarrollados en este capítulo se describen a continuación.

2.5.3.1. Síntesis química de las 1-aril-2-bromoetan-1-onas **7g-i**

A una disolución de la correspondiente acetofenona **3g-i** (7.45 mmol, 1 equiv.) en MeCN (4 mL) se añadió *N*-bromosuccinimida (NBS, 7.6 mmol, 1.02 equiv.) y ácido *p*-toluensulfónico (*p*-TsOH, 7.45 mmol, 1 equiv.). La reacción se agitó durante 24 h a 50 °C. Transcurrido este tiempo, se destiló el disolvente bajo presión reducida en el rotavapor y se añadió una disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO₃, 10 mL). La disolución resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (5 x 10 mL), se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó en el rotavapor obteniéndose las cetonas deseadas **7g-i** sin necesidad de purificación adicional (69-93% rendimiento) y que fueron empleadas a continuación para obtener las cetonas fluoradas **2g-i**.

2.5.3.2. Síntesis química de las 1-aril-2-fluoroetan-1-onas **2g-i**

Una mezcla de fluoruro de potasio (KF, 6.45 mmol, 1.5 equiv.) y fluoruro de zinc (ZnF₂, 6.45 mmol, 1.5 equiv.) en MeCN (10 mL) depositada en un tubo sellado se agitó durante 1 h calentando a 100 °C. Posteriormente se le añadió una disolución de la correspondiente 1-aril-2-bromoetan-1-ona **7g-i** (4.3 mmol, 1 equiv.) en MeCN (10 mL), y se agitó la mezcla a 100 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se destiló el disolvente bajo presión reducida en el rotavapor y se añadió agua (20 mL). La disolución resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (4 x 20 mL), se combinaron las fases orgánicas que se lavaron con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 x 20 mL), y la capa orgánica resultante se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó cuidadosamente en el rotavapor, debido a la volatilidad de estas cetonas **2g-i**, que fueron

purificadas mediante cromatografía de columna en gel de sílice utilizando una mezcla de hexano y Et₂O (9:1) como eluyente (66-83% rendimiento).

2.5.3.3. Procedimiento experimental para la síntesis de la 2-fluoropropiofenona (2j)

2.5.3.3.1. Síntesis química del intermedio vinilazida 11j

Sobre una suspensión de azida de sodio (NaN₃, 42.5 mmol, 2.5 equiv.) en MeCN (13 mL) se añadió mediante un embudo de adición una disolución de cloruro de yodo (25.5 mmol, 1.5 equiv.) en CH₂Cl₂ (21 mL) a -20 °C, y se agitó la mezcla a la misma temperatura durante 30 min. Después de este tiempo, se adicionó por goteo una disolución de *trans*-β-estireno (**9j**, 17 mmol, 1 equiv.) en CH₂Cl₂ (21 mL) y se dejó agitar la mezcla durante 1 h a esa misma temperatura. Transcurrido este tiempo, la reacción se detuvo adicionando una disolución acuosa saturada de Na₂S₂O₃ (20 mL) y se extrajo con Et₂O (2 x 50 mL). Posteriormente se combinaron las fases orgánicas, que se lavaron con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 x 50 mL), y la capa orgánica resultante se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Tras la evaporación de los disolventes en el rotavapor, el crudo resultante conteniendo al compuesto **10j** se usó inmediatamente para el siguiente paso sin purificación adicional.

El crudo obtenido anteriormente se disolvió en Et₂O (43 mL) y se añadió ^tBuOK (20.4 mmol, 1.2 equiv.) a 0 °C, agitándose la mezcla durante 1.5 h a esa misma temperatura. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se filtró sobre celita y se eliminó el disolvente en el rotavapor. El crudo resultante se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice utilizando hexano puro como eluyente dando lugar al producto deseado **11j** (65% rendimiento).

2.5.3.3.2. Síntesis química de la 2-fluoropropiofenona

Sobre una suspensión de Selectfluor (6.1 mmol, 1.5 equiv.), NaHCO₃ (8.2 mmol, 2 equiv.) y H₂O (8.2 mmol, 2 equiv.) en MeCN (41 mL) se añadió la vinilazida **11j** (4.11 mmol, 1 equiv.) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 30 minutos y transcurrido este tiempo se destiló el disolvente en el rotavapor. La reacción se extrajo con Et₂O (2 x 40 mL), y se combinaron las fases orgánicas para posteriormente lavarlas con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 x 40 mL). La capa orgánica resultante se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó en el

rotavapor obteniéndose la cetona deseada **2j** sin necesidad de purificación adicional (19% rendimiento).

2.5.3.4. Síntesis química de las 1-ariletan-1-aminas **4e-g,i**

A una disolución de la acetofenona correspondiente **3e-g,i** (0.72 mmol, 1 equiv.) en MeOH seco (2.4 mL), se le añadió a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte NH₄OAc (7.2 mmol, 10 equiv.). Posteriormente se enfrió la disolución a 0 °C para añadir NaBH₃CN (1.44 mmol, 2 equiv.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción acidificando hasta pH 5 empleando una disolución acuosa de HCl 2 N. En este punto, se evaporó el MeOH en el rotavapor y la disolución resultante se lavó con CH₂Cl₂ (3 x 15 mL) y se recogió la fase acuosa. Posteriormente, la fase orgánica se lavó con HCl 2 N (2 x 15 mL), combinando a continuación todas las fases acuosas que se alcalinizaron hasta pH 9-10 con una disolución acuosa de NaOH 2 N para extraer finalmente las correspondientes aminas **4e-g,i** con CH₂Cl₂ (4 x 15 mL). Se juntaron las fases orgánicas, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se filtraron, evaporando a continuación el disolvente en el rotavapor. Las aminas deseadas **4e-g,i** se obtuvieron con suficiente pureza como para poder ser empleadas posteriormente sin necesidad de realizar procesos adicionales de purificación (20-62% rendimiento).¹¹⁷

2.5.3.5. Procedimiento para la hidrodesfluoración de la 2-fluoro-1-(4-fluorofenil)etan-1-ona (**2b**) catalizada por Pt/C

En un tubo Schlenk, se añadió la 2-fluoro-1-(4-fluorofenil)etan-1-ona (**2b**, 0.25 mmol, 1 equiv.), 10% Pt/C (14.6 mg, 0.03 equiv.), Na₂CO₃ (0.27 mmol, 1.1 equiv.), 2-propanol (2 mL) y H₂O (1 mL) bajo atmósfera de argón y se calentó a 100 °C. La reacción se monitorizó cada hora hasta que la reacción se completó, siguiéndose la conversión por análisis de cromatografía de gases empleando el método detallado en la Tabla 2.5. Las alícuotas se diluyeron con AcOEt (500 µL) mientras que el metal se separó por centrifugación.

2.5.4. PROCEDIMIENTOS ENZIMÁTICOS

2.5.4.1. Reacción de la 2-fluoroacetofenona (**2a**) en presencia de las transaminasas sobreexpresadas en *E. coli*

En un tubo Eppendorf se añadió la correspondiente transaminasa (CV-TA, ArR-TA, ArS-TA o ArRmut11-TA) sobreexpresada en *E. coli* (10 mg) como células liofilizadas, y posteriormente se adicionó una mezcla de la disolución reguladora de fosfato (100 mM, pH 7.5) que contenía PLP (1 mM) y 2-propilamina (1 M) y DMSO como cosolvente (12.5 μ L para un volumen total de 0.5 mL). Finalmente se añadió la α -fluorocetona **2a** (1.7 μ L, 30 mM) a la mezcla de reacción y se agitó en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. La reacción se detuvo adicionando una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃ (350 μ L) y se extrajo con AcOEt (3 x 350 μ L). Se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones por cromatografía de gases empleando el método detallado en la Tabla 2.4.

2.5.4.2. Reacción de hidrogenofluoración de las α -fluorocetonas **2a** y **2d** en ausencia de amina

En un tubo Eppendorf se añadió la correspondiente transaminasa CV-TA o ArR-TA sobreexpresada en *E. coli* (10 mg) y posteriormente se adicionó una mezcla de la disolución reguladora de fosfato (100 mM, pH 7.5) que contenía PLP o PMP (1 mM), y DMSO como cosolvente (12.5 μ L para un volumen total de 0.5 mL). Finalmente se añadió el sustrato correspondiente **2a** o **2d** (30 mM) a la mezcla de reacción y se agitó en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. La reacción se detuvo adicionando una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃ (350 μ L) y se extrajo con AcOEt (3 x 350 μ L). Se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones por cromatografía de gases empleando el método detallado en la Tabla 2.4.

2.5.4.3. Reacción de hidrogenofluoración de las α -fluorocetonas **2a** y **2d** empleando distintas concentraciones de amina

En un tubo Eppendorf se añadió la transaminasa CV-TA sobreexpresada en *E. coli* (10 mg) y posteriormente se adicionó una mezcla de la disolución reguladora de fosfato (100 mM, pH 7.5) que contenía PLP (1 mM) y la correspondiente amina con la

concentración deseada (2-propilamina o L-alanina, desde 10 mM hasta 50 mM), y DMSO como cosolvente (12.5 μ L para un volumen total de 0.5 mL). Finalmente se añadió el sustrato correspondiente **2a** o **2d** (30 mM) a la mezcla de reacción y se agitó en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. La reacción se detuvo adicionando una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃ (350 μ L) y se extrajo con AcOEt (3 x 350 μ L). Se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones por cromatografía de gases empleando el método detallado en la Tabla 2.4.

2.5.4.4. Reacción de hidrogenofluoración de las α -fluorocetonas 2a-i empleando una concentración equimolar de una amina

En un tubo Eppendorf se añadió la transaminasa CV-TA sobreexpresada en *E. coli* (10 mg) y posteriormente se adicionó una mezcla de la disolución reguladora de fosfato (100 mM, pH 7.5) que contenía PLP (1 mM), la amina (2-propilamina o L-alanina, 30 mM) y DMSO como cosolvente (12.5 μ L para un volumen total de 0.5 mL). Finalmente se añadió el sustrato correspondiente **2a-i** (30 mM) a la mezcla de reacción y se agitó en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. La reacción se detuvo adicionando una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃ (350 μ L) y se extrajo con AcOEt (3 x 350 μ L). Se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones por cromatografía de gases empleando el método detallado en la Tabla 2.4.

2.5.4.5. Reacción de hidrogenofluoración de las α -fluorocetonas 2a-i empleando una amina con una concentración de 100 mM

En un tubo Eppendorf se añadió la transaminasa CV-TA sobreexpresada en *E. coli* (10 mg) y posteriormente se adicionó una mezcla de la disolución reguladora de fosfato (100 mM, pH 7.5) que contenía PLP (1 mM), la amina (2-propilamina o L-alanina, 100 mM) y DMSO como cosolvente (12.5 μ L para un volumen total de 0.5 mL). Finalmente se añadió el sustrato correspondiente **2a-i** (30 mM) a la mezcla de reacción y se agitó en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. La reacción se detuvo adicionando una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃ (350 μ L) y se extrajo con AcOEt (3 x 350 μ L). Se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones por cromatografía de gases empleando el método detallado en la Tabla 2.4.

2.5.4.6. Reacción de hidrodescloración de la α -cloroacetofenona (**8**)

En un tubo Eppendorf se añadió la CV-TA sobreexpresada en *E. coli* (10 mg) y posteriormente una mezcla de la disolución reguladora de fosfato (100 mM, pH 7.5) que contenía PLP (1 mM), 2-propilamina (50 mM) y DMSO como cosolvente (12.5 μ L para un volumen total de 0.5 mL). Finalmente se añadió la α -cloroacetofenona (**8**, 2.32 mg, 30 mM) a la mezcla de reacción, agitando la mezcla en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. La reacción se detuvo adicionando una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃ (350 μ L) y se extrajo con AcOEt (3 x 350 μ L). Se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones por cromatografía de gases empleando el método detallado en la Tabla 2.4.

2.5.4.7. Reacción de hidrodesfluoración enantioselectiva de la 1-fenil-2-fluoropropan-1-ona (**2j**)

En un tubo Eppendorf se añadió la correspondiente transaminasa comercial (2 mg) o sobreexpresada en *E. coli* (10 mg) y posteriormente se adicionó una mezcla de la disolución reguladora de fosfato 100 mM con el correspondiente pH (7.5, 6.5 o 6.0) que contenía PLP (1 mM), 2-propilamina (30 o 50 mM) y DMSO como cosolvente (12.5 μ L para un volumen total de 0.5 mL). Finalmente se añadió la 2-fluoropropiofenona (**2j**, 2.15 μ L, 30 mM) a la mezcla de reacción y se agitó en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. La reacción se detuvo adicionando una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃ (350 μ L) y se extrajo con AcOEt (3 x 350 μ L). Se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones y excesos enantioméricos por cromatografía de gases empleando los métodos detallados en las Tablas 2.4 y 2.6, respectivamente.

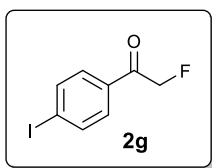
2.5.4.8. Reacción de hidrodesfluoración de las cetonas **2b** y **2h** a escala semipreparativa

En un matraz Erlenmeyer se añadió la CV-TA sobreexpresada en *E. coli* (210 mg para **2b** y 180 mg para **2h**), y posteriormente una mezcla de la disolución reguladora de fosfato (100 mM, pH 7.5, 1 mM PLP) con una concentración de 30 mM de 2-propilamina y MeCN (160 μ L para **2b** resultando un volumen total de 6.4 mL; 165 μ L para **2h** resultando un volumen total de 6.6 mL). Finalmente se añadió la cetona correspondiente **2b** o **2h** (30 mg, 30 mM) a la mezcla de reacción y se agitó en un

agitador orbital a 30 °C a 250 rpm. En ambos casos, tras 45 h de reacción se observó empleando los métodos de CG detallados en la Tabla 2.4 que ya no quedaba sustrato de partida. La reacción se extrajo con AcOEt (6 x 6 mL) y las fases orgánicas se combinaron, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se filtraron, evaporando a continuación el disolvente en el rotavapor para aislar las acetofenonas **3b** (24 mg, 90% rto.) y **3h** (11 mg, 40% rto.).

2.5.5. DATOS EXPERIMENTALES

2-Fluoro-1-(4-yodofenil)etan-1-ona (2g)



Fórmula empírica: C₈H₆FIO

Peso molecular: 264.04 g/mol

Aspecto: sólido beige

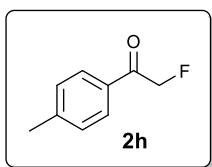
Rendimiento: 75% **R_f** (20% AcOEt/Hexano): 0.54

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.46 (d, *J* = 46.9 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.86 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 83.6 (d, *J* = 183.5 Hz, CH₂), 102.5 (C), 129.3 (d, *J* = 2.9 Hz, 2CH), 133.0 (C), 138.4 (2CH), 193.1 (d, *J* = 16.0 Hz, C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) -229.9

2-Fluoro-1-(4-metilfenil)etan-1-ona (2h)



Fórmula empírica: C₉H₉FO

Peso molecular: 152.17 g/mol

Aspecto: líquido amarillo

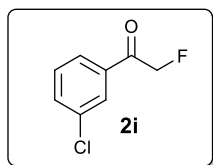
Rendimiento: 83% **R_f** (20% AcOEt/Hexano): 0.57

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.41 (s, 3H), 5.49 (d, *J* = 46.9 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 21.9 (CH₃), 83.6 (d, *J* = 182.0 Hz, CH₂), 128.0 (2CH), 129.7 (2CH), 131.3 (C), 145.3 (C), 193.1 (d, *J* = 15.2 Hz, C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) -231.2

1-(3-Clorofenil)-2-fluoroetan-1-ona (2i)



Fórmula empírica: C₈H₆ClFO

Peso molecular: 172.58 g/mol

Aspecto: aceite amarillo

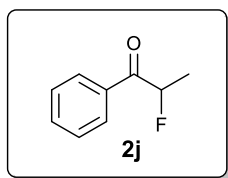
Rendimiento: 66% **R_f** (20% AcOEt/Hexano): 0.58

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.48 (d, *J* = 46.8 Hz, 2H), 7.42 (td aparente, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.57 (ddd, *J* = 8.0, 2.1, 1.2 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 83.6 (d, *J* = 183.5 Hz, CH₂), 126.1 (d, *J* = 2.8 Hz, CH), 128.1 (d, *J* = 3.1 Hz, CH), 130.4 (CH), 134.1 (CH), 135.2 (C), 135.4 (C), 192.5 (d, *J* = 15.8 Hz, C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -230.2

2-Fluoropropiofenona (2j)



Fórmula empírica: C₉H₉FO

Peso molecular: 152.17 g/mol

Aspecto: aceite naranja

Rendimiento: 19% **R_f** (20% AcOEt/Hexano): 0.68

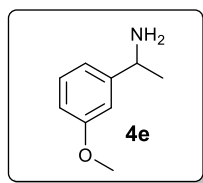
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.60 (dd, *J* = 24.0, 6.8 Hz, 3H), 5.57-5.80 (dc, *J* = 48.5, 6.8 Hz, 1H), 7.43 (m, 2H), 7.56 (m, 1H), 7.92 (dd, *J* = 7.8, 0.6 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 18.2 (d, *J* = 22.7 Hz, CH₃), 89.9 (d, *J* = 179.7 Hz, CH), 128.6 (2CH), 128.7 (d, *J* = 3.4 Hz, 2CH), 133.7 (CH), 133.8 (C), 196.7 (d, *J* = 19.2 Hz, C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -181.8

EMAR (ESI⁺, *m/z*): Calculada para C₉H₁₀FO [(M+H)]⁺: 153.0710; encontrada: 153.0709

1-(3-Metoxifenil)etan-1-amina (4e)



Fórmula empírica: C₉H₁₃NO

Peso molecular: 151.21 g/mol

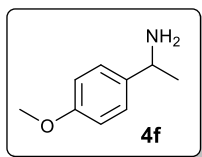
Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 52% *R_f* (5% MeOH/AcOEt): 0.11

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.37 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.74 (s ancho, 2H), 3.79 (s, 3H), 4.07 (c, *J* = 6.7 Hz, 1H), 6.77 (m, 1H), 6.91 (m, 2H), 7.23 (t aparente, *J* = 8.2 Hz, 1H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 25.6 (CH₃), 51.3 (CH), 55.2 (CH₃), 111.4 (CH), 112.1 (CH), 118.1 (CH), 129.5 (CH), 149.5 (C), 159.8 (C)

1-(4-Metoxifenil)etan-1-amina (4f)



Fórmula empírica: C₉H₁₃NO

Peso molecular: 151.21 g/mol

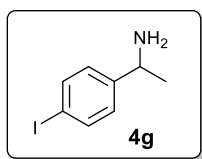
Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 62% *R_f* (5% MeOH/AcOEt): 0.10

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.40 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.78 (s ancho, 2H), 3.83 (s, 3H), 4.11 (c, *J* = 6.6 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 25.7 (CH₃), 50.7 (CH), 55.3 (CH₃), 113.8 (2CH), 126.7 (2CH), 139.9 (C), 158.4 (C)

1-(4-Yodofenil)etan-1-amina (4g)



Fórmula empírica: C₈H₁₀IN

Peso molecular: 247.08 g/mol

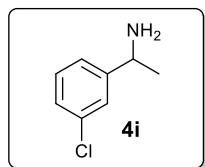
Aspecto: sólido amarillo

Rendimiento: 53% **R_f** (5% MeOH/AcOEt): 0.12

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.31 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.56 (s ancho, 2H), 4.03 (c, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 25.7 (CH₃), 50.8 (CH), 91.9 (C), 127.8 (2CH), 137.4 (2CH), 147.3 (C)

1-(3-Clorofenil)etan-1-amina (4i)



Fórmula empírica: C₈H₁₀ClN

Peso molecular: 155.63 g/mol

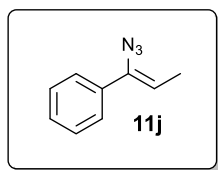
Aspecto: aceite amarillo

Rendimiento: 20% **R_f** (20% MeOH/AcOEt): 0.17

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.30 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.64 (s ancho, 2H), 4.02 (c, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.12-7.22 (m, 3H), 7.30 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 25.5 (CH₃), 50.9 (CH), 123.9 (CH), 125.9 (CH), 126.8 (CH), 129.7 (CH), 134.1 (C), 149.8 (C)

1-(1-Azidoprop-1-en-1-il)benceno (11j)



Fórmula empírica: C₉H₉N₃

Peso molecular: 159.19 g/mol

Aspecto: Líquido amarillo

Rendimiento: 65% **R_f** (100% Hexano): 0.83

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.65 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 5.44 (c, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.23-7.54 (m, 5H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 13.6 (CH₃), 111.9 (CH), 128.3 (2CH), 128.4 (CH), 128.7 (2CH), 133.1 (C), 137.3 (C)

CAPÍTULO 3

Síntesis de β,β -difluoroaminas ópticamente activas mediante el empleo de transaminasas y aminasas reductivas

ANTECEDENTES

3.1.1. COMPUESTOS DE INTERÉS CONTENIENDO LA UNIDAD CF₂

La inserción de fragmentos difluorados geminales para la síntesis de nuevas moléculas¹⁷⁰ es un campo aplicado mayoritariamente a la preparación de fármacos, puesto que se pueden obtener moléculas con perfiles biológicos bien diferenciados con respecto a los análogos no fluorados o que contengan grupos CH₂F y CF₃. En concreto, se ha demostrado que la inserción de unidades CF₂ ofrece propiedades beneficiosas a la hora de diseñar nuevos compuestos biológicamente activos, dado que el fragmento CHF₂ actúa como grupo donador de enlaces de hidrógeno, siendo un grupo bioisótero al resto hidroxilo. En términos de tamaño también presenta bioisosterismo con los grupos metilo,¹⁷¹ confiriendo bioactividad mejorada a numerosas estructuras. Por ejemplo, las estatinas, muy empleadas para rebajar altos niveles de colesterol, han visto acrecentada su actividad biológica gracias a la introducción de átomos de flúor geminales (Figura 3.1a),¹⁷² y los análogos difluorados de la Rodopeptina (Figura 3.1b) retienen la actividad antifúngica característica de estos compuestos mejorando propiedades físicas como la solubilidad o la dosis máxima tolerada.¹⁷³

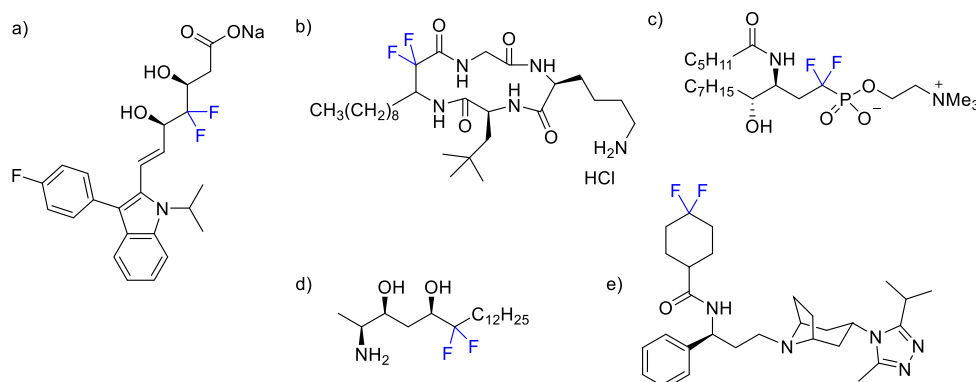


Figura 3.1. Ejemplos de moléculas biológicamente activas conteniendo unidades CF₂.

La ceramida es conocida por inducir la apoptosis celular, pero en cambio, si es degradada se obtiene la esfingosina, que tras sufrir fosforilación produce la esfingosina-

¹⁷⁰ (a) N. Levi, D. Amir, E. Gershonov, Y. Zafrani, *Synthesis* **2019**, 51, 4549-4567; (b) A. Ricucci, J. Rodriguez, A. Quintard, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 3697-3700; (c) J. Rong, C. Ni, J. Hu, *Asian J. Org. Chem.* **2017**, 6, 139-152.

¹⁷¹ (a) Y. Zafrani, S. Saphier, E. Gershonov, *Future Med. Chem.* **2020**, 12, 361-365; (b) Y. Zafrani, G. Sod-Moriah, D. Yeffet, A. Berliner, D. Amir, D. Marciano, S. Elias, S. Katalan, N. Ashkenazi, M. Madmon, E. Gershonov, S. Saphier, *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 5628-5637; (c) C. D. Sessler, M. Rahm, S. Becker, J. M. Goldberg, F. Wang, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 9325-9332.

¹⁷² Z. Wang, L. Cheng, Z. Kai, F. Wu, Z. Liu, M. Cai, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 3869-3876.

¹⁷³ K. Nakayama, H. C. Kawato, H. Inagaki, R. Nakajima, A. Kitamura, K. Someya, T. Ohta, *Org. Lett.* **2000**, 2, 977-980.

1-fosfato, inductora de la mitosis celular.¹⁷⁴ Por lo tanto, el control de los enzimas que producen o degradan ceramida es objeto de investigación, y así se han empleado análogos fluorados de la esfingomielina (Figura 3.1c), para estudiar el efecto inhibitorio sobre el enzima que cataliza la hidrólisis de la esfingomielina a la ceramida.¹⁷⁵ Por otro lado, aunque la inhibición del enzima que cataliza la fosforilación de la esfingosina es una estrategia prometedora contra la proliferación de células tumorales,^{174,176} existe la posibilidad del diseño de compuestos miméticos de la esfingosina. Es el caso del análogo difluorado del Enigmol (Figura 3.1d), que muestra elevada citotoxicidad y propiedades farmacocinéticas mejoradas.¹⁷⁷ Por último, se puede destacar el fármaco Maraviroc (UK-427,857, Figura 3.1e), utilizado como agente anti-VIH, y que posee una unidad CF₂ en una parte de su molécula.¹⁷⁸

3.1.2. COMPUESTOS NITROGENADOS β,β -DIFLUORADOS COMO INHIBIDORES DE ENZIMAS DEPENDIENTES DE PLP

Los enzimas dependientes de PLP son esenciales, y por ello se puede actuar sobre ellos como dianas terapéuticas para investigar diversas enfermedades.^{80,179} En este sentido, en el Capítulo 1 se ha mencionado la posible relación entre dolencias neurológicas y niveles bajos de GABA, de modo que una solución plausible pasa por la inhibición del enzima encargado de metabolizarlo, la GABA-AT.^{90,98} De entre todos los inhibidores estudiados cabe destacar el empleo de análogos nitrogenados β -fluorados de sustratos reconocidos por este enzima. Si bien los compuestos monofluorados tienen un potente efecto inhibitorio como ya se ha discutido anteriormente (Sección 1.1.2), también se ha observado que los derivados β,β -difluorados pueden actuar como excelentes inhibidores (Figuras 3.2a-c).^{92,94} El mecanismo de inhibición es idéntico al mostrado para las β -fluoroaminas en el Capítulo 1 (Esquema 1.1), formando un aducto

¹⁷⁴ X. Zheng, W. Li, L. Ren, J. Liu, X. Pang, X. Chen, D. Kang, J. Wang, G. Du, *Pharmacol. Ther.* **2019**, 195, 85-99.

¹⁷⁵ T. Hakogi, T. Yamamoto, S. Fujii, K. Ikeda, S. Katsumura, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 2627-2630.

¹⁷⁶ P. Sanllehí, J.-L. Abad, J. Casas, A. Delgado, *Chem. Phys. Lipids*, **2016**, 197, 69-81.

¹⁷⁷ E. J. Miller, S. G. Mays, M. T. Baillie, R. B. Howard, D. G. Culver, M. Saindane, S. T. Pruett, J. J. Holt, D. S. Menaldino, T. J. Evers, G. P. Reddy, R. F. Arrendale, M. G. Natchus, J. A. Petros, D. C. Liotta, *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, 7, 537-542.

¹⁷⁸ A. Wood, D. Armour, *Prog. Med. Chem.* **2005**, 43, 239-271.

¹⁷⁹ A. S. El-Sayed, A. A. Shindia, en *Targets in Gene Therapy*, Ed. Y. Yu, InTechOpen (Londres, Reino Unido), **2011**, p. 119.

covalente con el PLP y la lisina catalítica de la transaminasa, dando lugar al desprendimiento de un anión fluoruro.

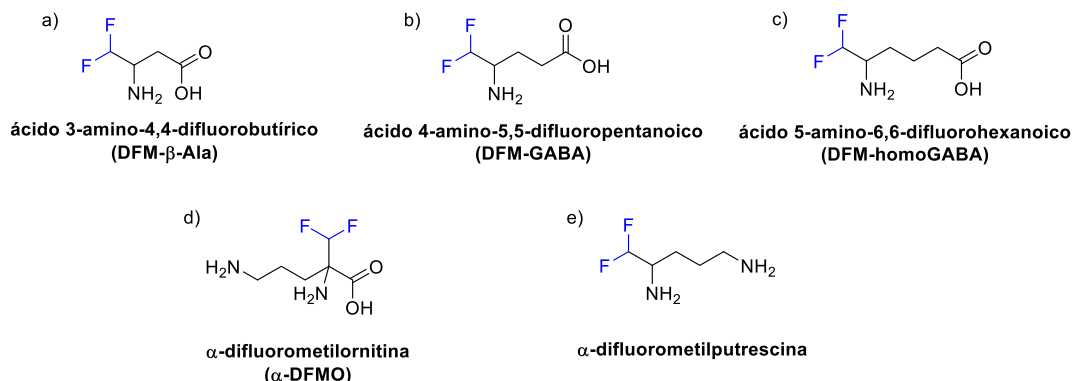


Figura 3.2. Moléculas nitrogenadas que contienen grupos CHF_2 y que son inhibidores de enzimas dependientes de PLP.

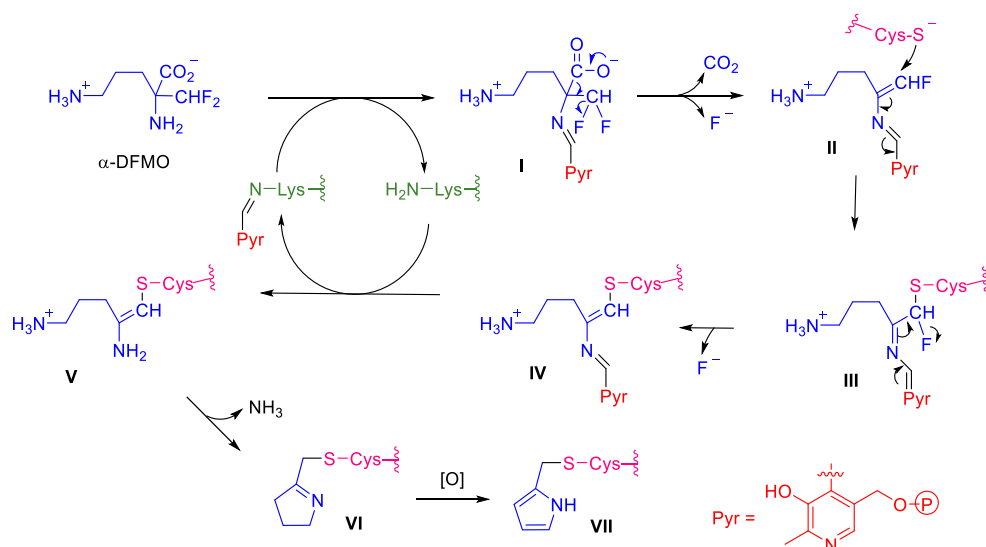
Por otro lado, la α -DFMO (α -difluorometilornitina, Figura 3.2d) es un inhibidor de la ornitina descarboxilasa (ODC). En las células de los mamíferos y de muchas otras células eucariotas este enzima cataliza la producción de putrescina (butano-1,4-diamina), precursor de diversas poliaminas presentes en multitud de procesos celulares, siendo destacable su papel en la proliferación celular.¹⁸⁰ De ahí el potencial que poseen las moléculas inhibitoras de este enzima para estudiar el tratamiento de algunos tipos de cáncer, aunque también se ha aprobado su uso para el tratamiento de otras afecciones, como la denominada ‘enfermedad del sueño’ o tripanosomiasis africana y el hirsutismo facial femenino.¹⁸¹ En el mecanismo de inhibición propuesto (Esquema 3.1),¹⁸² la α -DFMO interacciona con el centro activo de la ODC, cuya lisina catalítica se encuentra unida al PLP, formando un intermedio de tipo aldimina (**I**). En un segundo paso, el sustrato sufre un proceso de descarboxilación seguido de la eliminación de un átomo de flúor para dar lugar a una imina conjugada con un gran carácter electrófilo (**II**), que es atacada por un grupo tiol de un residuo de cisteína presente en el centro activo de la proteína (**III**). A continuación, la eliminación de un segundo átomo de flúor produce

¹⁸⁰ (a) D.-H. Bae, D. J. R. Lane, P. J. Jansson, D. R. Richardson, *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **2018**, 1862, 2053-2068; (b) B. C. Mounce, M. E. Olsen, M. Vignuzzi, J. H. Connor, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2017**, 81, e00029-17.

¹⁸¹ (a) N. LoGiudice, L. Le, I. Abuan, Y. Leizorek, S. C. Roberts, *Med. Sci.* **2018**, 6, 12; (b) G. L. S. Sholler, E. W. Gerner, G. Bergendahl, R. B. MacArthur, A. VanderWerff, T. Ashikaga, J. P. Bond, W. Ferguson, W. Roberts, R. K. Wada, D. Eslin, J. M. Kraveka, J. Kaplan, D. Mitchell, N. S. Parikh, K. Neville, L. Sender, T. Higgins, M. Kawakita, K. Hiramatsu, S.-s. Moriya, A. S. Bachmann, *PLoS One* **2015**, 10, e0127246.

¹⁸² (a) R. Poulin, L. Lu, B. Ackermann, P. Bey, A. E. Pegg, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 150-158; (b) B. W. Metcalf, P. Bey, C. Danzin, M. J. Jung, P. Casara, J. P. Vever, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 2551-2553.

una nueva imina (**IV**), que sufre un proceso de transaldiminación al interactuar con el residuo de la lisina catalítica del centro activo, generando por un lado la aldimina interna y por otro un derivado enamina (**V**), que tras hidrólisis y ataque del grupo amino terminal puede ciclar dando lugar a una imina cíclica unida al aminoácido cisteína (**VI**). En este caso hay una interacción covalente mínima entre las especies formadas a partir de la α -DFMO con el aducto PLP-lisina del centro activo, al contrario de lo que ocurre por ejemplo con la unión covalente en la GABA-AT con sustratos fluorados, y además se observó que este aducto se oxidaba lentamente hacia el pirrol **VII**.⁹³ La presencia de una cisteína capaz de actuar como nucleófilo y la elevada electrofilia de la imina **II** formada a partir de la α -DFMO parecen ser causas suficientes para inactivar a la ODC a través de la formación de la imina cíclica. Por otro lado, también se ha demostrado que la α -difluorometilputrescina (Figura 3.2e), producto de la reacción de descarboxilación, también es capaz de inhibir irreversiblemente a la ODC.¹⁸³



Esquema 3.1. Mecanismo propuesto para la inhibición de la ODC por acción de la α -DFMO.

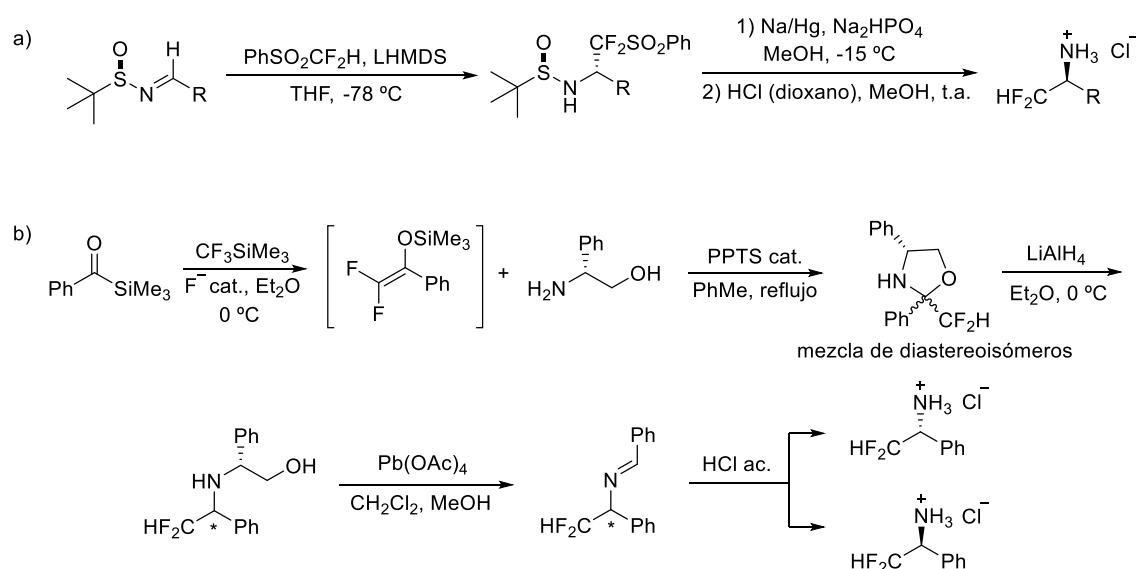
3.1.3. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE β,β -DIFLUOROAMINAS ÓPTICAMENTE ACTIVAS

A pesar de la actividad biológica mostrada por las β,β -difluoroaminas, su síntesis no se ha explorado en profundidad. De manera general, los compuestos difluorometilados se han sintetizado mediante metodologías clásicas que requieren el uso de reactivos y disolventes tóxicos, en condiciones fuertes de reacción, y en las que

¹⁸³ C. Danzin, P. Bey, D. Schirlin, N. Claverie, *Biochem. Pharmacol.* **1982**, 31, 3871-3878.

además muchas veces las fuentes del grupo CF₂ son demasiado volátiles. Sin embargo, cada vez se describen métodos sintéticos más seguros, eficientes y menos contaminantes.¹⁸⁴

En cuanto a la síntesis estereoselectiva de β,β-difluoroaminas,¹⁸⁵ Li y Hu han descrito la preparación de sulfinamidas quirales empleando difluorometil fenil sulfona como agente difluorometilante sobre *N*-(*tert*-butilsulfinil)aldiminas enantiopuras en presencia de una base fuerte.¹⁸⁶ El anión difluorado se generó *in situ* a partir de la sulfona empleando hexametildisilazida de litio (LHMDS), ocurriendo la reacción de adición sobre la imina. La posterior desprotección de los grupos *tert*-butilsulfinilo y fenilsulfonilo utilizando una amalgama de Na/Hg, seguida de una alcoholisis ácida, permitió el acceso a las aminas deseadas en forma de clorhidrato con excelentes excesos enantioméricos (Esquema 3.2a).



Esquema 3.2. Metodologías multietapa para obtener β,β-difluoroaminas ópticamente activas.

Por otro lado, el grupo de Portella ha estudiado la reactividad *umpolung* de difluoroenol silil éteres con aminas y aminoalcoholes, obteniendo β,β-difluoroaminas tras una serie de transformaciones adicionales.¹⁸⁷ Los difluoroenol silil éteres se

¹⁸⁴ (a) D. E. Yerien, S. Barata-Vallejo, A. Postigo, *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 14676-14701; (b) Y.-L. Liu, J.-S. Yu, J. Zhou, *Asian J. Org. Chem.* **2013**, 2, 194-206; (c) J. Hu, W. Zhang, F. Wang, *Chem. Commun.* **2009**, 7465-7478.

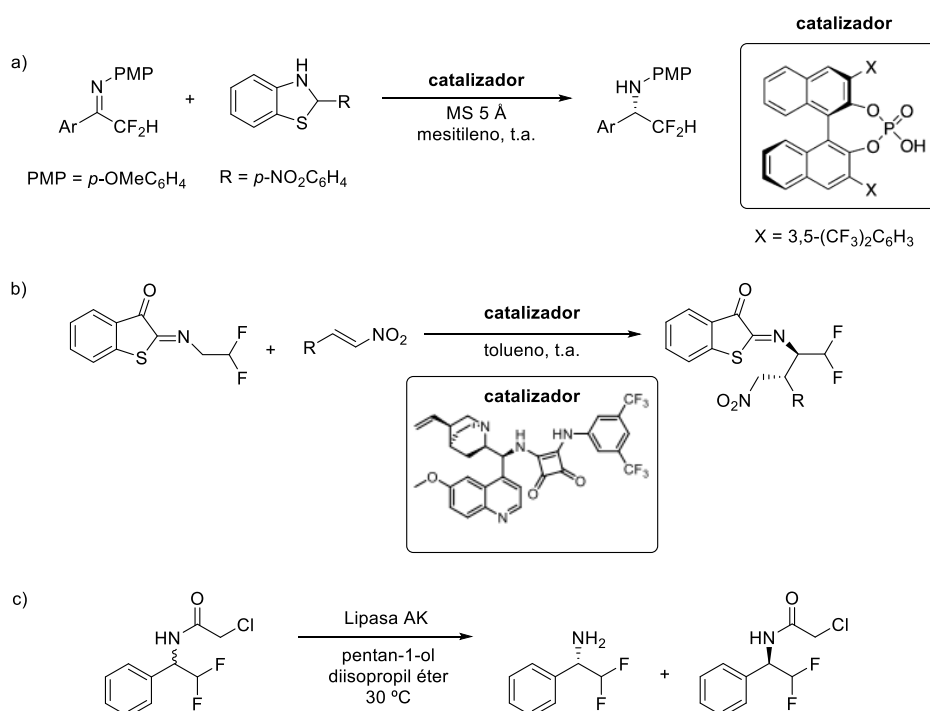
¹⁸⁵ Hay ejemplos recientes muy interesantes en versión no asimétrica: (a) A. F. Garrido-Castro, A. Gini, M. C. Maestro, J. Alemán, *Chem. Commun.* **2020**, 56, 3769-3772; (b) L. Yang, W.-X. Fan, E. Lin, D.-H. Tan, Q. Li, H. Wang, *Chem. Commun.* **2018**, 54, 5907-5910.

¹⁸⁶ Y. Li, J. Hu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5882-5886.

¹⁸⁷ F. Huguenot, A. Billac, T. Brigaud, C. Portella, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 2564-2569.

formaron *in situ* a partir de acilsilanos y trifluorometiltrimetilsilano. Su posterior reacción con (*R*)-fenilglicinol en presencia de *p*-toluensulfonato de piridinio (PPTS) catalítico a reflujo de tolueno permitió preparar una mezcla diastereomérica de 2-difluorometiloxazolidinas que tuvieron que ser separadas. Finalmente, su reducción con LiAlH_4 , oxidación con $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ y posterior hidrólisis ácida generó las β,β -difluoroaminas enantioenriquecidas (Esquema 3.2b).

Por lo que a metodologías catalíticas respecta, el grupo de Akiyama ha desarrollado una reacción de transferencia de hidrógeno a difluorometilcetimas N-protegidas.¹⁸⁸ De este modo, mediante el uso de una benzotiazolina como donador de hidrógeno, en combinación con un derivado de ácido fosfórico quiral y en presencia de tamiz molecular (MS, *molecular sieves*), las difluorometilcetimas se transformaron en las correspondientes aminas difluoradas con enantioselectividades altas (91-93% *ee*, Esquema 3.3a).



Esquema 3.3. Metodologías catalíticas para obtener β,β -difluoroaminas ópticamente activas.

Cabe destacar también el reciente trabajo de Wang, Yan y colaboradores, donde se llevó a cabo la alquilación asimétrica de cetimas derivadas de la *N*-2,2-

¹⁸⁸ T. Sakamoto, K. Horiguchi, K. Saito, K. Mori, T. Akiyama, *Asian J. Org. Chem.* **2013**, 2, 943-946.

difluoroetiltoisatina con derivados de nitroalqueno (Esquema 3.3b).¹⁸⁹ Para ello se empleó un organocatalizador de tipo escuaramida derivado de la quinina que actuó tanto como base como donador de enlaces de hidrógeno a temperatura ambiente. Así, fue posible el acceso de manera estereoselectiva a un compuesto con dos centros quirales que puede ser un precursor interesante de compuestos ópticamente activos conteniendo unidades γ -nitro- β,β -difluoroamina. Otros tipos de metodologías que se han utilizado para obtener este tipo de derivados de manera estereoselectiva han sido la adición organocatalizada de acetona¹⁹⁰ o mediada por una base de un carbanión quiral¹⁹¹ sobre aldiminas difluoradas N-protegidas.

Por último, también se ha descrito la síntesis de estos derivados empleando biocatalizadores, como el ejemplo descrito por Kato y colaboradores, en el cual se describió la resolución cinética de una amida racémica derivada de la 1-fenil-2,2-difluoroetan-1-amina usando la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK, Esquema 3.3c). El proceso consistió en la alcoholisis enantioselectiva de la cloroacetamida con pentan-1-ol como nucleófilo y diisopropil éter como disolvente a 30 °C, dando lugar a la amina con alto exceso enantiomérico (96%), aunque con una baja conversión (38%).¹⁹²

3.1.4. PROCESOS DE BIORREDUCCIÓN CON SUSTRATOS HALOGENADOS FAVORECIDOS TERMODINÁMICAMENTE

La capacidad de desplazar un equilibrio químico es crucial en síntesis orgánica porque permite obtener un máximo rendimiento del producto de interés. Aunque la constante de equilibrio prediga que la reacción no se encuentre desplazada hacia uno de los sentidos, la modificación de las condiciones de reacción como la temperatura, presión o estequiometría de los reactivos, así como el diseño racional del medio, se pueden emplear para desplazar el equilibrio de la reacción hacia el sentido deseado.¹⁹³

¹⁸⁹ F. Gao, Y. Guo, M. Sun, Y. Wang, C. Yang, Y. Wang, K. Wang, W. Yan, *Org. Lett.* **2021**, 23, 2584-2589.

¹⁹⁰ K. Funabiki, M. Nagamori, S. Goushi, M. Matsui, *Chem. Commun.* **2004**, 1928-1929.

¹⁹¹ I. Aparici, M. Guerola, C. Dialer, A. Simón-Fuentes, M. Sánchez-Roselló, C. del Pozo, S. Fustero, *Org. Lett.* **2015**, 17, 5412-5415.

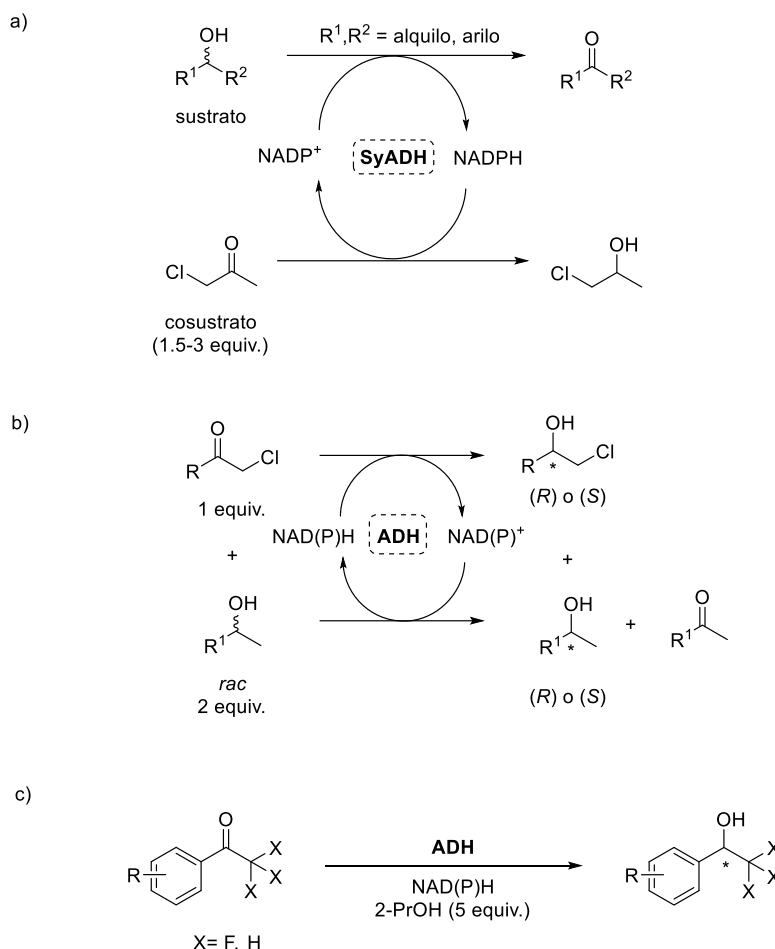
¹⁹² K. Kato, Y. Gong, T. Saito, Y. Yokogawa, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2004**, 30, 61-68.

¹⁹³ F. R. Bisogno, E. García-Urdiales, H. Valdés, I. Lavandera, W. Kroutil, D. Suárez, V. Gotor, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 11012-11019.

Para el caso de las ADHs en un proceso de reducción/oxidación de una cetona/alcohol de interés, el equilibrio se desplaza tradicionalmente utilizando un alcohol o cetona auxiliar que se emplea como cosustrato. Este suele ser 2-propanol o acetona, y se emplea en un gran exceso molar debido a su bajo coste y fácil eliminación (Sección 0.2.2.1). Sin embargo, existen ejemplos donde es posible utilizar un cosustrato en cantidades cuasi-estequiométricas. Kroutil y colaboradores han llevado a cabo la oxidación de alcoholes secundarios de manera cuasi-irreversible utilizando ADHs y cetonas halogenadas en posición α como aceptores de hidrógeno, tal como se muestra en el Esquema 3.4a con la ADH de *Sphingobium yanoikuyae*.¹⁹⁴ Mientras que las α -clorocetonas fueron capaces de reducirse sin problema hacia las correspondientes clorohidrinas, estas últimas no eran capaces de oxidarse hacia las correspondientes cetonas halogenadas. Aprovechando este hecho, sustituyendo a la acetona, típicamente empleada con ADHs, por la cloroacetona, se conseguía oxidar a los alcoholes de partida sin necesidad de añadir un gran exceso del oxidante en el sistema (1.5-3 equiv.). Esto como se comprobó posteriormente,¹⁹³ no era debido a ninguna interacción especial de las clorohidrinas con alguno de los aminoácidos del centro activo del enzima, sino simplemente a que la oxidación de estos compuestos se encontraba muy desfavorecida desde el punto de vista termodinámico, probablemente debido en parte a la posible existencia de un puente de hidrógeno intramolecular entre el grupo alcohol y el átomo de halógeno. Con estos precedentes, en nuestro grupo de investigación se aplicó esta metodología a la obtención de manera concurrente de dos tipos de alcoholes secundarios ópticamente enriquecidos, empleando para ello un único enzima redox, una α -halocetona (1 equiv.) y un alcohol secundario racémico (2 equiv.) a través de una reacción en cascada paralela (Esquema 3.4b).¹⁹⁵

¹⁹⁴ I. Lavandera, A. Kern, V. Resch, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, W. M. F. Fabian, S. de Wildeman, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2155-2158.

¹⁹⁵ F. R. Bisogno, I. Lavandera, W. Kroutil, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1730-1732.



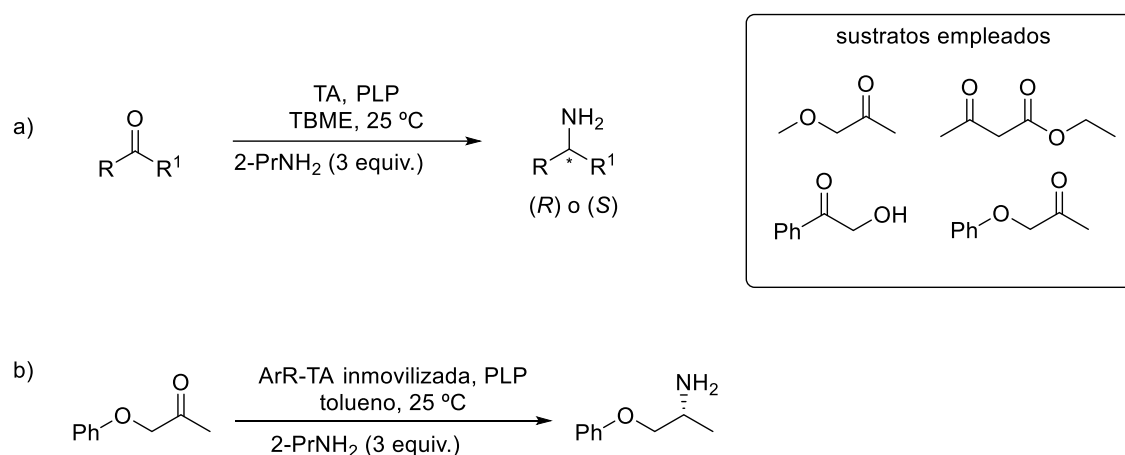
Esquema 3.4. Procesos de transferencia de hidrógeno catalizados por ADHs favorecidos termodinámicamente debido al empleo de cetonas halogenadas.

En otro proceso desarrollado en nuestro grupo de investigación,^{123b} se llevó a cabo la biorreducción de α -fluorocetonas con diversas ADHs sobreexpresadas en *E. coli* empleando 2-propanol como cosustrato con un apreciable exceso molar (5 equiv.), aunque menor de lo habitual, con respecto al sustrato, ya que estas cetonas α -halogenadas eran capaces de reducirse de un modo cuasi-irreversible (Esquema 3.4c).

3.1.5. PROCESOS DE TRANSAMINACIÓN FAVORECIDOS TERMODINÁMICAMENTE

Como ya se comentó en la Sección 0.2.2.2 en la Introducción de esta memoria, los procesos de transaminación catalizados por TAs se encuentran desfavorecidos termodinámicamente, de ahí que se hayan desarrollado sistemas enzimáticos acoplados o donadores de amina especiales (*smart cosubstrates*) para desplazar dicho equilibrio sin necesidad de añadir un gran exceso del donador de amina. Sin embargo, existe algún

ejemplo en la literatura donde es posible utilizar un menor exceso de dicho donador para llevar a cabo este tipo de reacciones con éxito. Kroutil y colaboradores no solo han descrito la biotransaminación de cetonas conteniendo un átomo de oxígeno en posición vecinal al grupo carbonilo empleando 3 equivalentes de 2-propilamina con conversiones excelentes, sino que además han llevado a cabo las reacciones en disolvente orgánico, disminuyéndose incluso el tiempo de reacción con respecto a las reacciones en medios acuosos (Esquema 3.5a).¹²¹ Siguiendo este estudio, Mutti y colaboradores han empleado uno de los sustratos empleados en el ejemplo anterior combinando las ventajas del uso de transaminasas en disolventes orgánicos con su inmovilización, y han utilizado la ArR-TA en un proceso de flujo en continuo con tres equivalentes de 2-propilamina (Esquema 3.5b). Cabe destacar que, si bien el uso de tolueno como disolvente no es el óptimo para transformaciones a mayor escala, se sugirió el empleo de disolventes con propiedades similares, pero más benignos, como el anisol, el 2-metiltetrahydrofurano o el 2,2,5,5-tetrametiltetrahydrofurano.^{37b}

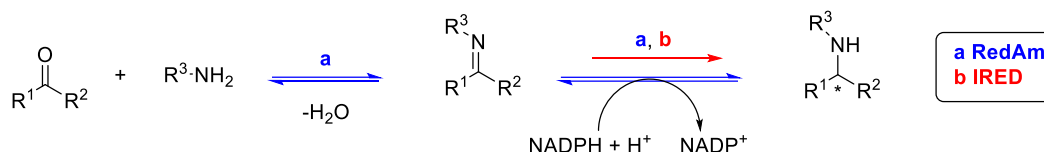


Esquema 3.5. Biotransaminaciones empleando poco exceso molar del donador de amina.

3.1.6. IMINO REDUCTASAS (IREDs) Y AMINASAS REDUCTIVAS (RedAms)

La aminación reductiva, consistente en la transformación de un grupo carbonilo en un grupo amino a través de la formación de una imina intermedia y su posterior reducción, es una de las reacciones químicas más importantes a la hora de sintetizar aminas quirales. Por tanto, el desarrollo de procesos asimétricos para este tipo de transformaciones resulta de gran interés, puesto que el estereocentro que contiene la amina es crucial a la hora de determinar su actividad biológica. De hecho, el proceso enzimático equivalente ha sido definido como uno de los mayores retos para la

Biocatálisis aplicada a la industria farmacéutica, por lo que el descubrimiento de diversos enzimas en los últimos años ha permitido mejorar el acceso a este tipo de reacción. Concretamente, las imino reductasas (*imine reductases*, IREDs o IRs) son un tipo de oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H que catalizan la reducción asimétrica de iminas proquirales.¹⁹⁶ Estos enzimas son un excelente punto de inicio para estudiar esta transformación, puesto que el paso de reducción de la imina constituye el segundo paso de la aminación reductiva (Esquema 3.6).



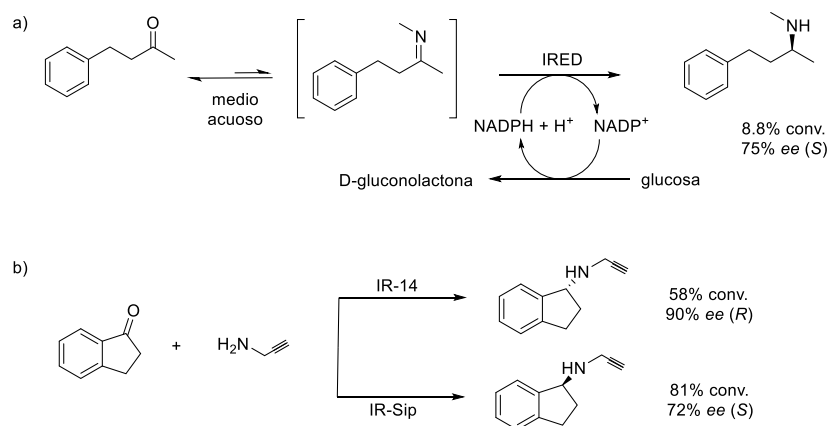
Esquema 3.6. Aminación reductiva catalizada por IREDs y RedAms.

El primer ejemplo fue descrito por Müller y colaboradores (Esquema 3.7a),¹⁹⁷ en el cual la 4-fenilbutan-2-ona fue reducida a la correspondiente amina N-metilada en presencia de altas concentraciones de la (S)-IRED de *Streptomyces* sp. GF3546 y un gran exceso del donador de amina a un pH de 9.5. Si bien la amina fue obtenida con una baja conversión (8.8%) y un *ee* modesto (75%), el exceso del donador de amina y el elevado pH fueron considerados como condiciones óptimas para favorecer la formación de la imina en la disolución, uniéndose posteriormente al centro activo del enzima y finalmente siendo reducida por una de sus caras proquirales. Como se puede ver en este ejemplo, otra ventaja que ofrece este tipo de enzimas con respecto a las TAs es que permiten la síntesis de aminas secundarias, y no solo de aminas primarias. Posteriormente, el descubrimiento de nuevas IREDs y el estudio de los distintos sustratos aceptados por este tipo de enzimas permitió su expansión a la síntesis de diversos derivados de interés. Por ejemplo, Höhne y colaboradores emplearon las IREDs Roche IR14 e IR-Sip para la síntesis de ambos enantiómeros del agente antiparkinsoniano Rasagilina usando 40 equivalentes de la propargilamina a un pH de 9.5, alcanzando unos rendimientos del 58 y 81% con purezas ópticas del 90 y 72% *ee*

¹⁹⁶ (a) L. Ducrot, M. Bennett, G. Grogan, C. Vergne-Vaxelaire, *Adv. Synth. Catal.* **2021**, 363, 328-351; (b) G. Grogan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, 43, 15-22; (c) J. Mangas-Sánchez, S. P. France, S. L. Montgomery, G. A. Aleku, H. Man, M. Sharma, J. I. Ramsden, G. Grogan, N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, 37, 19-25; (d) M. Sharma, J. Mangas-Sánchez, N. J. Turner, G. Grogan, *Adv. Synth. Catal.* **2017**, 359, 2011-2025.

¹⁹⁷ T. Huber, L. Schneider, A. Präg, S. Gerhardt, O. Einsle, M. Müller, *ChemCatChem* **2014**, 6, 2248-2252.

respectivamente (Esquema 3.7b).¹⁹⁸ Sin embargo, en estos primeros ejemplos las reacciones aún presentaban la desventaja de necesitar de un gran exceso molar de la amina, presumiblemente debido a la necesidad de favorecer la formación de la imina en la disolución, sustrato de la reducción catalizada por las IREDs.



Esquema 3.7. Ejemplos de aminaciones reductivas para obtener aminas secundarias enantioenriquecidas catalizadas por IREDs.

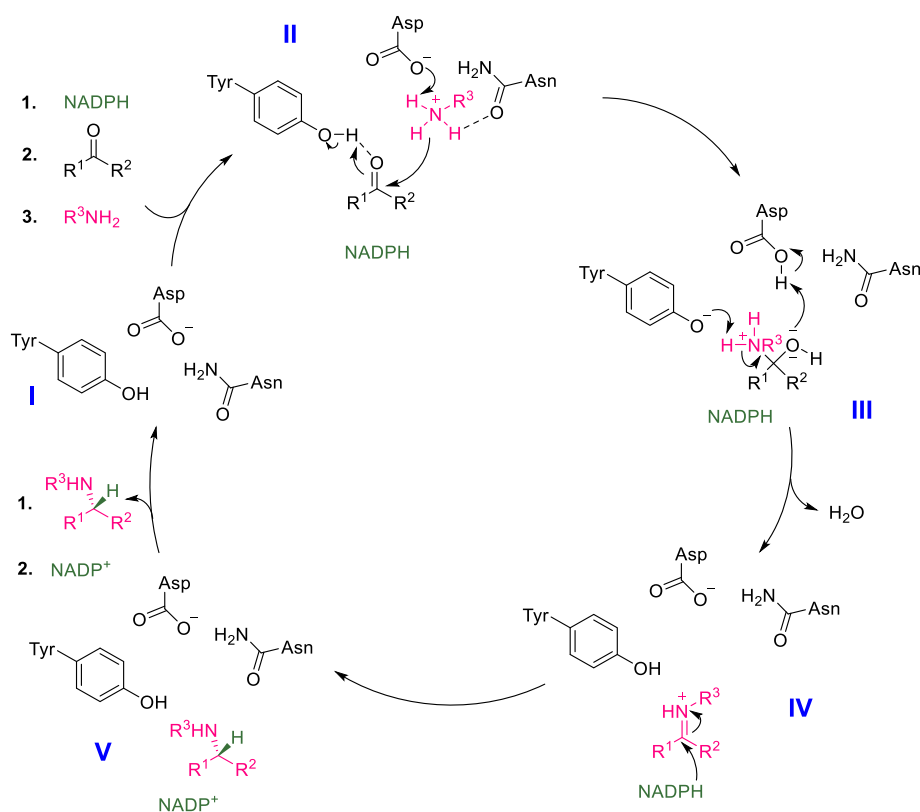
Más recientemente se descubrió una subclase de las IREDs, las aminosas reductivas (RedAms, del inglés *Reductive Aminases*),^{196a,d} las cuales demostraron que también son capaces de catalizar el primer paso de la formación de la imina (Esquema 3.6, a). La primera RedAm detallada se debe al grupo de Turner, y fue obtenida a partir del hongo *Aspergillus oryzae*, AspRedAm, capaz de llevar a cabo la aminación reductiva de cetonas con el correspondiente donador de amina en cantidad equimolar, o con un ligero exceso, además de catalizar las reacciones a un pH neutro.¹⁹⁹ El mecanismo de esta subclase de enzimas ha sido elucidado por Grogan y colaboradores,²⁰⁰ y consta de los siguientes pasos en base a los aminoácidos esenciales que conforman el centro activo del enzima (**I**, Esquema 3.8): Tras la unión del cofactor (suele ser NADPH), la cetona interacciona con el grupo hidroxilo del residuo de tirosina, mientras que la amina lo hace con el de asparagina, siendo activada por un grupo aspartato para llevar a cabo el ataque al carbono electrofílico de la cetona (**II**), resultando un intermedio de tipo hemiaminal (**III**) a partir del cual se elimina una molécula de agua para dar lugar a un intermedio proquiral iminio (**IV**). Finalmente, la

¹⁹⁸ P. Matzel, M. Gand, M. Höhne, *Green Chem.* **2017**, *19*, 385-389.

¹⁹⁹ G. A. Aleku, S. P. France, H. Man, J. Mangas-Sánchez, S. L. Montgomery, M. Sharma, F. Leipold, S. Hussain, G. Grogan, N. J. Turner, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 961-969.

²⁰⁰ M. Sharma, J. Mangas-Sánchez, S. P. France, G. A. Aleku, S. L. Montgomery, J. I. Ramsden, N. J. Turner, G. Grogan, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 11534-11541.

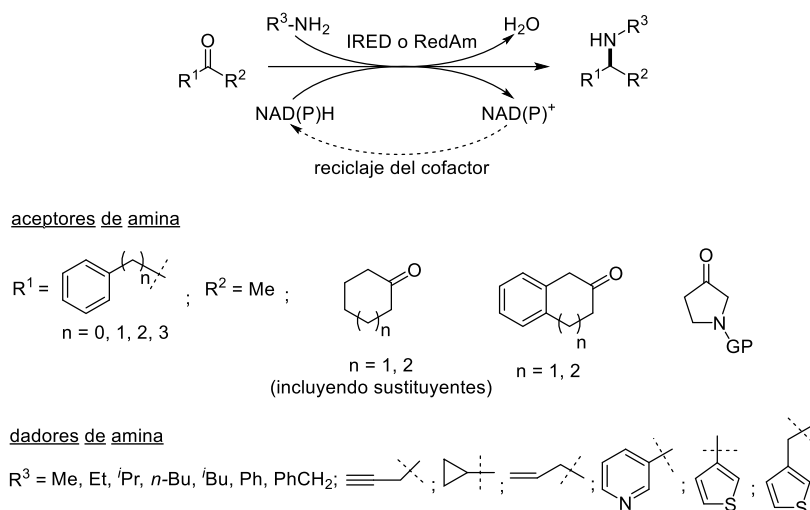
imina se reduce por adición de un hidruro proveniente del cofactor pirimidínico y tanto el producto amina como el cofactor en su forma oxidada (V) son liberados del centro activo. Dicho cofactor se suele regenerar empleando sistemas del enzima acoplado tal como se ha descrito para las ADHs (Sección 0.2.2.1). Adicionalmente, aportaron una evidencia de la formación de la imina resultante de la reacción entre ciclohexanona y alilamina catalizada por la RedAm de *Aspergillus terreus* (AtRedAm), mediante la comparación de la actividad con la (S)-IRED de *Streptomyces* sp. GF3546 y el cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN) como reductor químico para la aminación reductiva. La AtRedAm proporcionó un 73% de conversión tras 3 h, mientras que la (S)-IRED y el NaBH_3CN únicamente un 4%, sugiriendo que la IRED únicamente aceptaba la imina formada en disolución para la reducción enzimática, tal como actuaba el reductor químico, mientras que la AtRedAm aceleraba la reacción a través de la catálisis activa de la formación de la imina intermedia.



Esquema 3.8. Mecanismo propuesto para la aminación reductiva de una cetona catalizada por RedAms.

Finalmente, es importante hacer mención de la diversidad de cetonas alifáticas, aromáticas y cíclicas, así como de los diferentes tipos de aminas, que pueden ser

aceptadas por estos biocatalizadores (Esquema 3.9),^{196a,201} si bien las técnicas de biología molecular en combinación con las potentes herramientas informáticas disponibles actualmente podrán expandir la aplicabilidad de las RedAms en el futuro.



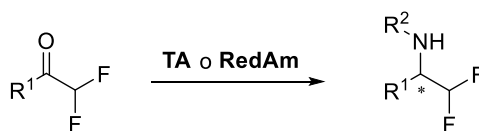
Esquema 3.9. Estructuras generales de compuestos carbonílicos y aminas aceptados por las IREDs y las RedAms.

²⁰¹ (a) F. G. Mutti, T. Knaus, en *Biocatalysis for Practitioners: Techniques, Reactions and Applications*, Eds. G. de Gonzalo, I. Lavandera, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2021**, p. 143; (b) J. Mangas-Sánchez, M. Sharma, S. C. Cosgrove, J. I. Ramsden, J. R. Marshall, T. W. Thorpe, R. B. Palmer, G. Grogan, N. J. Turner, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 5052-5057.

OBJETIVOS

Ante el enorme potencial de los compuestos que contienen grupos CHF_2 , en especial al considerar derivados nitrogenados β,β -difluorados que son inhibidores enzimáticos aplicables sobre dianas terapéuticas, y con el propósito de desarrollar un método quimioenzimático para la obtención de aminas difluoradas enantiopuras en condiciones suaves de reacción, nos hemos propuesto en este capítulo los siguientes objetivos:

- Estudiar distintos métodos biocatalíticos para obtener 2,2-difluoroetan-1-aminas en forma enantiopura, en particular mediante el desarrollo de procesos de asimetrización sobre 2,2-difluorocetonas catalizados bien por RedAms, o bien por transaminasas (Esquema 3.10).
- Identificar selectividades complementarias en ambos tipos de biocatalizadores que permitan acceder a los dos enantiómeros de las 2,2-difluoroetan-1-aminas a partir de las correspondientes α,α -difluorocetonas.
- Estudiar el efecto de la cantidad del donador de amina en los procesos catalizados por transaminasas, así como del tipo de amina en las reacciones mediadas por las RedAms.
- Demostrar la versatilidad de las aminaciones de las 2,2-difluorocetonas catalizadas por transaminasas mediante el desarrollo de procesos a una escala semipreparativa.



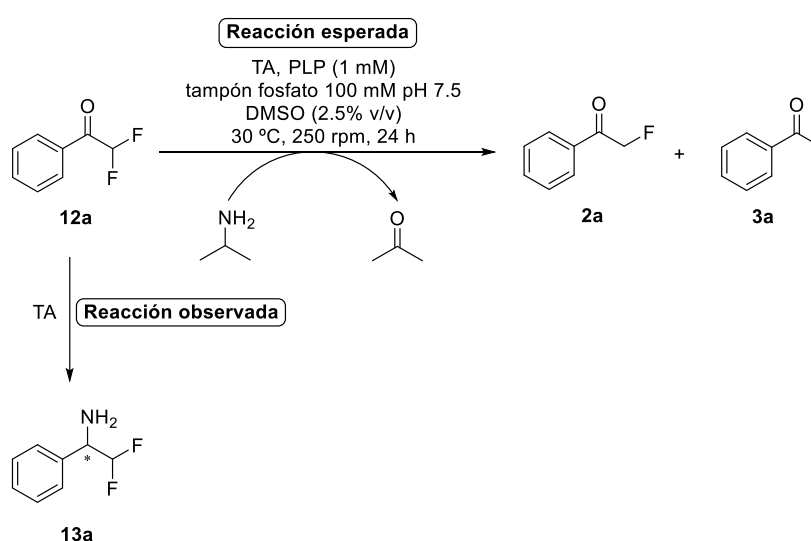
Esquema 3.10. Síntesis estereoselectiva de 2,2-difluoroetan-1-aminas a partir de 2,2-difluorocetonas empleando transaminasas o aminas reductivas como biocatalizadores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. OBTENCIÓN DE AMINAS DIFLUORADAS ÓPTICAMENTE ACTIVAS EMPLEANDO TRANSAMINASAS

3.3.1.1. Optimización de la reacción con la 2,2-difluoroacetofenona (**12a**)

Tras estudiar las reacciones de deshalogenación sobre cetonas α -monofluoradas en el Capítulo 2, y en vista de los antecedentes mostrados en los cuales se observó la inhibición de transaminasas en presencia de cetonas α,α -difluoradas (Sección 3.1.2),⁹² inicialmente se pensó que la 2,2-difluoroacetofenona (**12a**) daría lugar al mismo proceso, tal y como se muestra en el Esquema 3.11.

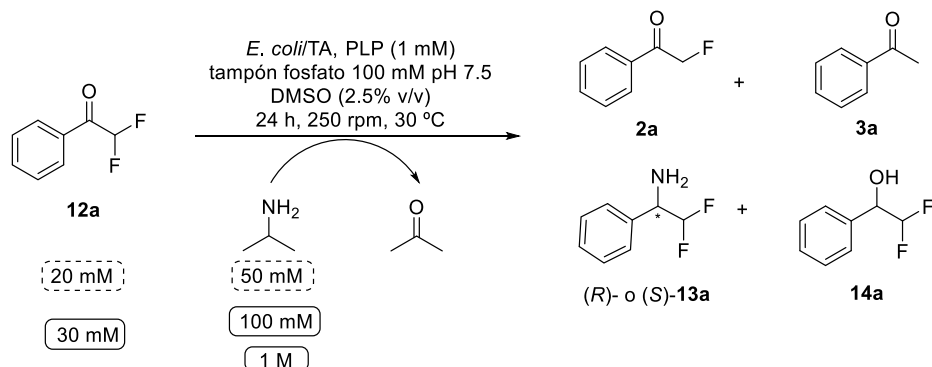


Esquema 3.11. Reacción de la 2,2-difluoroacetofenona (**12a**) con transaminasas empleando 2-propilamina como donador de amina.

Así, se necesitaría un mínimo de dos equivalentes de la amina para hidrodesfluorar sucesivamente los dos átomos de flúor de la molécula, de ahí que inicialmente se utilizara el proceso con una concentración de 50 mM de la 2-propilamina frente a una concentración de 20 mM de la cetona difluorada **12a**. Adicionalmente, se probó a añadir diversos excesos del donador de amina (100 mM o 1 M) a una concentración de 30 mM de la cetona **12a**, ya que en estas condiciones se vería favorecida la transaminación del sustrato. El resto de las condiciones son las típicas usadas en estas transformaciones, empleando una reguladora fosfato 100 mM pH 7.5 y un pequeño porcentaje de DMSO (2.5% v/v) para favorecer la solubilización del sustrato en el medio de reacción, en presencia de PLP (1 mM), a 30 °C y utilizando agitación orbital (250 rpm) durante 24 h. Sin embargo, tras realizar estas pruebas se comprobó que el proceso de transaminación

era el que se encontraba favorecido, contrariamente a lo esperado, tal como se observa en los datos reflejados en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Conversiones obtenidas en la biotransaminación de la cetona **12a** empleando transaminasas sobreexpresadas en *E. coli* y 2-propilamina a distintas concentraciones.



Entrada	ATA	[12a] (mM)	[2-PrNH ₂] (mM)	12a (%) ^a	2a (%) ^a	3a (%) ^a	13a (%) ^a	14a (%) ^a
1	-	20	50	>99	<1	<1	<1	<1
2	CV			8	<1	<1	77	15
3	ArR			<1	<1	2	98	<1
4	ArRmut11			4	<1	3	93	<1
5	ArS			72	<1	<1	28	<1
6	-	30	100	>99	<1	<1	<1	<1
7	CV			30	<1	<1	70	<1
8	ArR			<1	<1	<1	>99	<1
9	ArRmut11			21	1	1	77	<1
10	ArS			73	<1	<1	27	<1
11	-	30	1000	>99	<1	<1	<1	<1
12	CV			46	<1	1	53	<1
13	ArR			63	<1	<1	37	<1
14	ArRmut11			<1	1	<1	99	<1
15	ArS			73	<1	<1	27	<1

^a Conversiones medidas por cromatografía de gases con fase estacionaria quiral.

En todos los casos se observó mayoritariamente la formación de la amina difluorada **13a**, con porcentajes mínimos de conversión (<3%) hacia la 2-fluoroacetofenona (**2a**) o la acetofenona (**3a**). Puesto que en las pruebas en ausencia del enzima (pruebas en blanco, entradas 1, 6 y 11) no se apreció la degradación del sustrato de partida, se pudo concluir que la amina producto se formó exclusivamente debido a la catálisis de las transaminasas. Por otro lado, la formación del alcohol difluorado **14a** en la entrada 2 se debió con seguridad a la actuación de las ADHs presentes en la *E. coli* soporte de las transaminasas, puesto que estamos empleando preparaciones liofilizadas de células enteras, y no el enzima purificado.

Salvo para el caso de la ArS-TA, la cual no aceptó bien este sustrato conduciendo a valores de conversión bajos (entradas 5, 10 y 15), las otras tres transaminasas empleadas mostraron buenos resultados tanto para una concentración de 50 mM como de 100 mM del donador de amina. Cuando se empleó un mayor exceso del donador (1 M), solamente la variante ArRmut11-TA dio lugar a una conversión cuantitativa hacia la amina **13a**, mientras que los enzimas naturales ofrecieron peores resultados. Esto es debido a que estos enzimas no aceptan concentraciones altas de 2-propilamina, prefiriendo alanina como donador de amina, mientras que la variante fue diseñada precisamente para trabajar a altas concentraciones de esta amina.¹⁰⁰

Posteriormente, se midieron los excesos enantioméricos de las aminas obtenidas, como se muestra en la Tabla 3.2. Así, se obtuvieron las aminas enantiopuras en todos los casos, a excepción de la ArS-TA, que mostró unos excesos enantioméricos algo menores del 86 y el 92% (entradas 8 y 12).

Tabla 3.2. Excesos enantioméricos observados en la reacción de transaminación de **12a** con una serie de transaminasas sobreexpresadas en *E. coli*.

Entrada	ATA	[12a] (mM)	[2-PrNH ₂] (mM)	13a (%) ^a	ee ^{b,c}
1	CV	20	50	77	>99 (R)
2	ArR			98	>99 (S)
3	ArRmut11			93	>99 (S)
4	ArS			28	>99 (R)
5	CV	30	100	70	>99 (R)
6	ArR			>99	>99 (S)
7	ArRmut11			77	>99 (S)
8	ArS			27	86 (R)
9	CV	30	1000	53	>99 (R)
10	ArR			37	>99 (S)
11	ArRmut11			99	>99 (S)
12	ArS			27	92 (R)

^a Conversiones medidas por cromatografía de gases con fase estacionaria aquiral. ^b Excesos enantioméricos medidos por cromatografía de gases con fase estacionaria quiral de los derivados N-acetilados. ^c Cambio de la preferencia en la nomenclatura CIP.

Posteriormente, se llevó a cabo la biotransaminación a escala semipreparativa empleando la 2,2-difluoroacetofenona (80 mg, 30 mM) con la transaminasa ArRmut11-TA obteniendo, tras 48 h de incubación, la correspondiente amina enantiopura (S)-**13a** con un rendimiento aislado del 82% después de un simple proceso de extracción ácido-base (Figura 3.3). La estructura de dicha amina fue confirmada por experimento de ¹H-RMN. Además, se pudo asignar la configuración absoluta de la amina comparando el

signo obtenido de la rotación específica con el ya descrito para este isómero en la bibliografía (ver Sección 3.5.4.5).¹⁹² Como se puede observar, este enzima *R*-selectivo dio lugar al enantiómero *S* del producto, lo que es debido a un cambio en la preferencia de los sustituyentes al asignar la configuración absoluta siguiendo las reglas de Cahn-Ingold-Prelog.



(*S*)-**13a**
82%, >99% ee

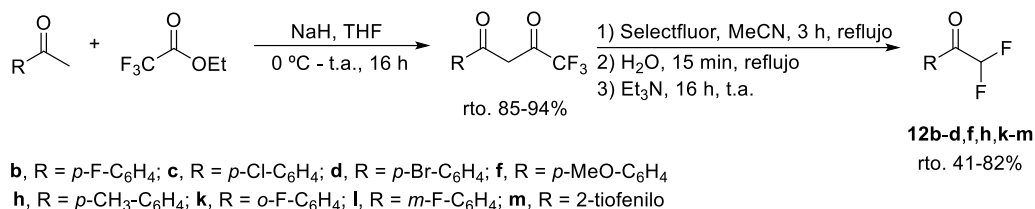
Figura 3.3. Rendimiento y ee obtenido de la amina enantiopura (*S*)-**13a** en la aminación de **12a** a una escala de 80 mg de sustrato con la ArRmut11-TA.

Es muy destacable el hecho de que se obtuvieran conversiones muy buenas de la amina incluso utilizando un exceso molar muy pequeño del donador de amina con respecto al sustrato (entradas 1-10, Tabla 3.1). Esto es debido a que el proceso de formación de la β,β -difluoroamina se encuentra muy favorecido termodinámicamente,¹¹⁵ por lo que no es necesario emplear un gran exceso de la 2-propilamina. Ejemplos similares en procesos biocatalizados por alcohol deshidrogenasas y transaminasas ya han sido discutidos en los antecedentes de este capítulo (Secciones 3.1.4 y 3.1.5). Por lo tanto, tras los resultados obtenidos se decidió escoger como condiciones óptimas una concentración de 30 mM del sustrato y 100 mM de la 2-propilamina.

3.3.1.2. Síntesis de las 2,2-difluoro-1-(hetero)ariletan-1-onas de partida

Una vez corroborada la transaminación de la 2,2-difluoroacetofenona, se procedió a extender esta metodología preparando en un primer lugar una familia de cetonas difluoradas en posición α siguiendo la secuencia sintética que se muestra en el Esquema 3.12. En el primer paso tuvo lugar la condensación de Claisen entre una serie de cetonas (hetero)arómicas y 1,1,1-trifluoroacetato de etilo, dando lugar a las correspondientes 1-trifluorometil-1,3-dicetonas con rendimientos entre el 85 y el 94%. En el segundo paso de la secuencia sintética se llevó a cabo, mediante un proceso en un solo recipiente, tanto la difluoración del grupo metileno de las dicetonas empleando el agente fluorante Selectfluor a reflujo de acetonitrilo (MeCN) como la fragmentación de esta molécula, que se consiguió mediante la adición de agua y, una vez enfriada la reacción a

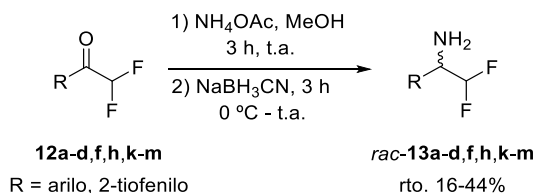
temperatura ambiente, junto con la adición de trietilamina. De este modo, a través de un proceso de tipo retro-Claisen se obtuvo ácido trifluoroacético y las cetonas difluoradas deseadas **12b-d,f,h,k-m** con unos rendimientos entre el 41 y el 82%.²⁰² Es importante destacar la volatilidad de estos productos, por lo que los disolventes se evaporaron con precaución.



Esquema 3.12. Síntesis de las cetonas difluoradas de partida **12b-d,f,h,k-m**.²⁰³

3.3.1.3. Síntesis de las 2,2-difluoro-1-(hetero)ariletan-1-aminas racémicas

Para obtener las aminas β,β-difluoradas racémicas, producto de las biotransaminaciones, se llevó a cabo la aminación reductiva de las cetonas difluoradas **12a-d,f,h,k-m**. En primer lugar, a la mezcla de reacción conteniendo la cetona correspondiente se añadió acetato de amonio (NH₄OAc) empleando metanol seco como disolvente, y se dejó agitando durante 3 h a temperatura ambiente para favorecer la formación de la imina en la disolución. Posteriormente se enfrió la reacción a 0 °C y se añadió NaBH₃CN, analizando la formación de la amina por análisis de TLC (3 h aproximadamente). Es importante el seguimiento y control del proceso ya que la cetona remanente puede reducirse hacia el alcohol con el paso del tiempo, disminuyendo el rendimiento de la reacción, así como dificultando el aislamiento de la amina deseada. Las aminas racémicas **13a-d,f,h,k-m** se obtuvieron con unos rendimientos de entre el 16 y el 44%, tal como se muestra en el Esquema 3.13, siendo compuestos extremadamente volátiles, por lo que se debió tener especial cuidado a la hora de realizar su aislamiento.



Esquema 3.13. Síntesis de las aminas β,β-difluoradas racémicas **13a-d,f,h,k-m**.

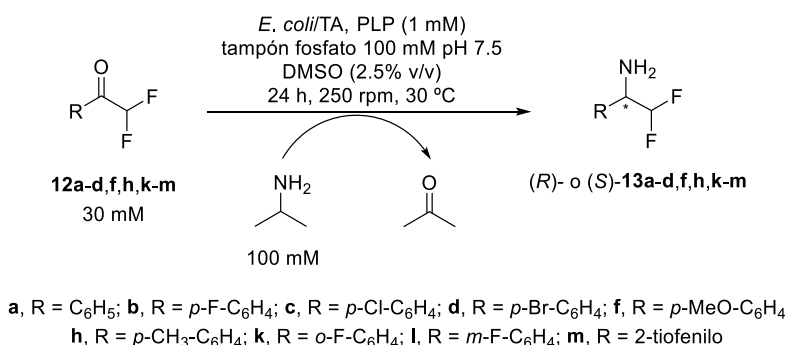
²⁰² D. J. Leng, C. M. Black, G. Pattison, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 1531-1535.

²⁰³ La cetona **12a** no fue sintetizada ya que es comercialmente accesible.

3.3.1.4. Aminaciones de las 2,2-difluoro-1-(hetero)ariletan-1-onas utilizando TAs sobreexpresadas en *E. coli*

Tras sintetizar las cetonas difluoradas **12a-d,f,h,k-m** y habiendo desarrollado métodos analíticos para el estudio de los procesos enzimáticos, se llevaron a cabo las reacciones de transaminación empleando las transaminasas sobreexpresadas en *E. coli* disponibles en el laboratorio utilizadas en los capítulos anteriores en las condiciones optimizadas anteriormente, es decir, una concentración de 100 mM de la 2-propilamina como donador de amina para una concentración de la cetona difluorada de 30 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Conversiones y *ee* medidos en las biotransformaciones de las cetonas **12a-d,f,h,k-m** con TAs sobreexpresadas en *E. coli*.



Cetona	conv. (%) ^a				ee (%) ^b			
	CV	ArR	ArRmut11	ArS	CV	ArR	ArRmut11	ArS
12a	70	>99	77	27	>99 (R) ^c	>99 (S) ^c	>99 (S) ^c	86 (R) ^c
12b	19	>99	65	14	>99 (R) ^c	>99 (S) ^c	>99 (S) ^c	>99 (R) ^c
12c	24	>99	56	12	>99 (R) ^c	>99 (S) ^c	>99 (S) ^c	>99 (R) ^c
12d	21	>99	64	15	>99 (R) ^c	>99 (S) ^c	>99 (S) ^c	>99 (R) ^c
12f	50	98	68	25	>99 (R) ^c	>99 (S) ^c	>99 (S) ^c	>99 (R) ^c
12h	53	>99	65	44	>99 (R) ^c	>99 (S) ^c	>99 (S) ^c	>99 (R) ^c
12k	25	91	>99	8	>99 (R) ^c	>99 (S) ^c	>99 (S) ^c	n.d.
12l	31	>99	96	9	>99 (R) ^c	>99 (S) ^c	>99 (S) ^c	n.d.
12m	4	>99	70	<1	n.d.	>99 (R)	>99 (R)	n.d.

^a Conversiones medidas por cromatografía de gases con fase estacionaria aquiral. ^b Excesos enantioméricos medidos bien por cromatografía de gases o por HPLC con fase estacionaria quiral de los derivados N-acetilados. ^c Cambio de la preferencia en la nomenclatura CIP. n.d. No determinado.

Sin duda el mejor biocatalizador mostró ser la ArR-TA, ya que con todos los sustratos estudiados se obtuvieron conversiones de las β,β-difluoroaminas enantiopuras de configuración *S* (a excepción de la amina derivada del tiofeno (*R*)-**13m**). También su variante ArRmut11-TA dio lugar a las aminas enantiopuras de la misma configuración con conversiones entre buenas y excelentes (56->99%).

Las otras transaminasas sobreexpresadas que se utilizaron (CV-TA y ArS-TA) con estereopreferencia contraria, no aceptaron tan bien las cetonas difluoradas. Así, los mejores sustratos para la CV-TA fueron **12a**, **12f** y **12h** que formaron las (*R*)-aminas enantiopuras con conversiones entre el 50 y el 70%, mientras que la ArS-TA mostró los resultados más pobres en términos de conversión (<44%).

A continuación se llevaron a cabo las transaminaciones a escala semipreparativa empleando las cetonas **12b-d,f,h,k-m** (20 mg, 30 mM) con la transaminasa ArR-TA, obteniendo tras 24 h de incubación los correspondientes derivados enantiopuros (*S*)-**13b-d,f,h,k,l** y (*R*)-**13m**, con rendimientos aislados de entre el 55 y el 80% después de un simple proceso de extracción ácido-base (Figura 3.4).

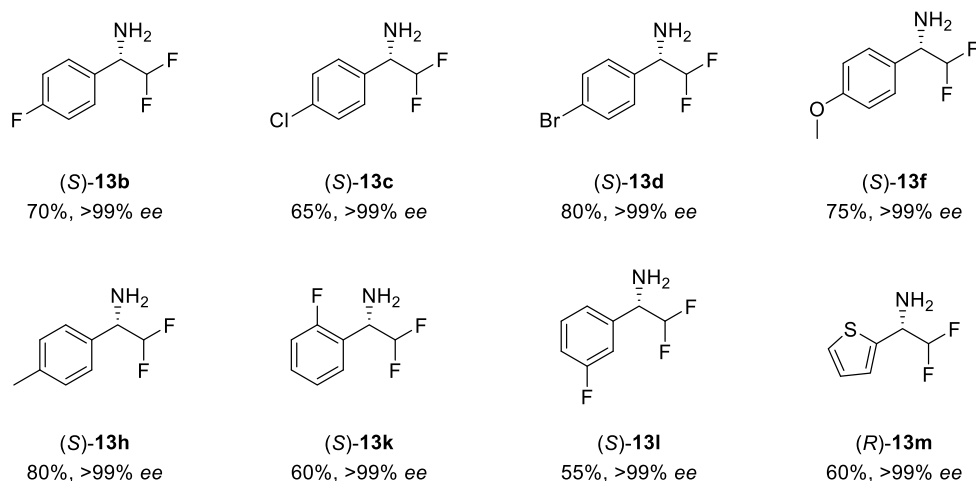


Figura 3.4. Rendimientos y ees obtenidos con la ArR-TA para las aminaciones de **12b-d,f,h,k-m** a una escala de 20 mg de sustrato.

Por otro lado, el sustrato **13f** tiene potencial aplicación como precursor de ciclohexanaminas antagonistas del neuropéptido Y1, encargado de la reducción del bloqueo del canal hERG (*human ether-a-go-go-related gene*) y de las actividades inhibitorias sobre el transportador de serotonina humano (hSERT, *human serotonin transporter*).²⁰⁴ Este tipo de compuestos se han estudiado también para un posible tratamiento de la obesidad. Por ello se llevó a cabo la transaminación a una escala semipreparativa de la cetona **12f** (100 mg, 30 mM) con la transaminasa ArR-TA, obteniendo tras 24 h de incubación el derivado enantiopuro (*S*)-**13f** con un rendimiento aislado del 79% después de un simple proceso de extracción (Figura 3.5).

²⁰⁴ K. Cho, M. Ando, K. Kobayashi, H. Miyazoe, T. Tsujino, S. Ito, T. Suzuki, T. Tanaka, S. Tokita, N. Sato, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 4781-4785.

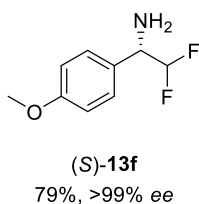


Figura 3.5. Rendimiento y ee obtenido en la aminación de **12f** con la ArR-TA a una escala de 100 mg de sustrato.

3.3.1.5. Aminaciones de las 2,2-difluoro-1-(hetero)ariletan-1-onas utilizando TAs comerciales (S)-selectivas

Puesto que las conversiones obtenidas con las transaminasas sobreexpresadas S-selectivas no fueron buenas en la mayoría de los casos, decidimos examinar si cabría la posibilidad de que alguna de las transaminasas de un kit comercial adquirido a la empresa Codexis fuese capaz de mejorar las conversiones hacia las (R)-aminas enantiopuras. Los mejores datos obtenidos se muestran en la Tabla 3.4, donde las aminas fueron obtenidas con unas conversiones entre un 15 y un 50%. Desgraciadamente, no se encontró ninguna transaminasa que mejorase los resultados obtenidos con la CV-TA y la ArS-TA. Así, la cetona **12m** no fue aceptada por ninguna transaminasa (S)-selectiva comercial. Para el resto de las cetonas estudiadas, la ATA-251 fue la que mostró los mejores resultados, a excepción de la transaminación de la cetona **12h** donde la ATA-254 condujo al valor de conversión más alto (15%).

Tabla 3.4. Conversiones y ee medidos en las biotransformaciones de las cetonas **12b,f,h,k,l** con TAs comerciales (S)-selectivas.

Amina	ATA	conv. (%) ^a	ee (%) ^{b,c}
13b	ATA-251	20	n.d.
13f	ATA-251	40	>99 (R)
13h	ATA-254	15	n.d.
13k	ATA-251	33	n.d.
13l	ATA-251	50	>99 (R)

^a Conversiones medidas por cromatografía de gases con fase estacionaria aquiral. ^b Excesos enantioméricos medidos bien por cromatografía de gases o por HPLC con fase estacionaria quiral de los derivados N-acetilados. ^c Cambio de la preferencia en la nomenclatura CIP. n.d. No determinado.

Es interesante observar como las cetonas α,α -difluoradas no daban lugar a los procesos de hidrodesfluoración, como en el caso de las cetonas monofluoradas (Capítulo 2). Este hecho mostró ser general para varios sustratos, independientemente del tipo de sustituyente en el anillo aromático, y para diversas transaminasas, tanto sobreexpresadas en *E. coli* como comercialmente accesibles. Aunque no hay una explicación obvia a esta diferencia de reactividad debido a un cambio tan sutil en la estructura de la molécula, en referencia a algunos trabajos publicados anteriormente se puede desarrollar alguna hipótesis (Figura 3.6). Así, mientras que la formación del complejo de tipo cetimina entre la piridoxamina 5'-fosfato y cetonas α -fluoradas hace que el enlace C-F aumente ligeramente su distancia de enlace,²⁰⁵ favoreciendo la ruptura de dicho enlace y facilitando la salida del anión fluoruro como grupo saliente, también se ha descrito que, a mayor número de átomos de flúor en un mismo carbono, los enlaces C-F se fortalecen,²⁰⁶ lo que haría más difícil la salida del átomo de flúor en los compuestos di- y trifluorados (como así ocurre).

Por otro lado, aunque no está demasiado claro aún, se supone que la lisina catalítica es la encargada de arrancar el protón en posición α al nitrógeno del intermedio aldimina, lo que favorece la salida del átomo de flúor (Figura 3.6a).^{98a,207} La presencia de un segundo átomo de flúor podría aumentar el impedimento estérico en dicha posición, impidiendo que la lisina pueda actuar como base y así desfavoreciéndose el proceso de hidrodesfluoración frente a la aminación (ataque al carbono de la aldimina, Figura 3.6b). Por supuesto, habría que hacer más estudios al respecto para poder justificar plenamente estas hipótesis.

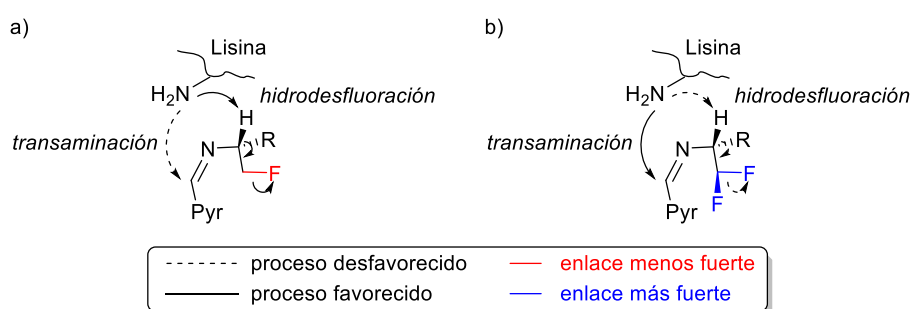


Figura 3.6. Diferencias entre el intermedio aldimina formado por el PLP y: a) una α -fluorocetona, y b) una α,α -difluorocetona.

²⁰⁵ C. Sparr, E. Salamanova, W. B. Schweizer, H. M. Senn, R. Gilmour, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 8850-8857.

²⁰⁶ C. H. DePuy, A. L. Schultz, *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 878-881.

²⁰⁷ H. Gökcan, F. A. S. Konuklar, *J. Mol. Graph.* **2014**, *51*, 173-183.

3.3.2. OBTENCIÓN DE AMINAS DIFLUORADAS ÓPTICAMENTE ACTIVAS EMPLEANDO RedAms PROVENIENTES DE HONGOS²⁰⁸

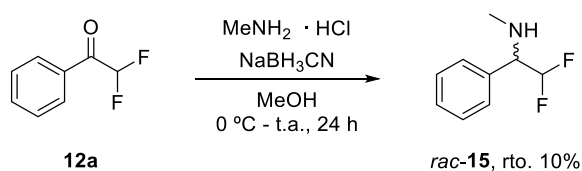
Como ya se ha comentado en los antecedentes de este capítulo (Sección 3.1.6), una alternativa al empleo de transaminasas para obtener aminas quirales es el uso tanto de imino reductasas como de aminosas reductivas, ya que además poseen la ventaja de posibilitar la obtención de aminas secundarias en función del donador de amina empleado a diferencia de las TAs. Además, estos enzimas son dependientes de nicotinamida y por lo tanto se evitarían los problemas de inhibición asociados que estos sustratos fluorados presentan con los enzimas dependientes de PLP.

Por ello en esta segunda parte del Capítulo 3, se ha llevado a cabo la obtención de una serie de aminas difluoradas primarias y secundarias mediante el uso de RedAms provenientes de hongos: RedAm de *Ajellomyces dermatitidis* (AdRedAm),¹⁹⁹ RedAm de *Neosartorya fumigatus* (NfRedAm), RedAm de *Neosartorya fischeri* (NfisRedAm), RedAm de *Aspergillus terreus* (AtRedAm)²⁰⁰ y RedAm de *Aspergillus oryzae* (AspRedAm).¹⁹⁹

3.3.2.1. Síntesis de los productos

3.3.2.1.1. Síntesis del derivado racémico N-metilado 15

La amina N-metilada racémica **15** se sintetizó mediante la aminación reductiva de la correspondiente cetona fluorada **12a** por reacción del clorhidrato de la metilamina con la cetona **12a** empleando metanol seco como disolvente, y posterior reducción con cianoborohidruro de sodio, aislando la amina racémica **15** tras extracción líquido-líquido con un rendimiento muy bajo del 10%, tal como se muestra en el Esquema 3.14.

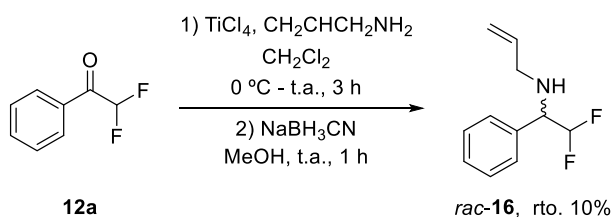


Esquema 3.14. Síntesis de la amina N-metilada racémica difluorada **15**.

²⁰⁸ Este trabajo se desarrolló en colaboración con el Dr. Daniel González Martínez.

3.3.2.1.2. Síntesis de la amina racémica N-alilada 16

La amina N-alilada racémica **16** fue sintetizada mediante la adición de TiCl_4 a una disolución de la cetona **12a** en diclorometano, a la que posteriormente se añadió alilamina para formar la correspondiente imina. Finalmente, dicha imina fue reducida con una disolución de cianoborohidruro de sodio en metanol, aislando la amina alílica **16** con un rendimiento del 10% (Esquema 3.15).²⁰⁹



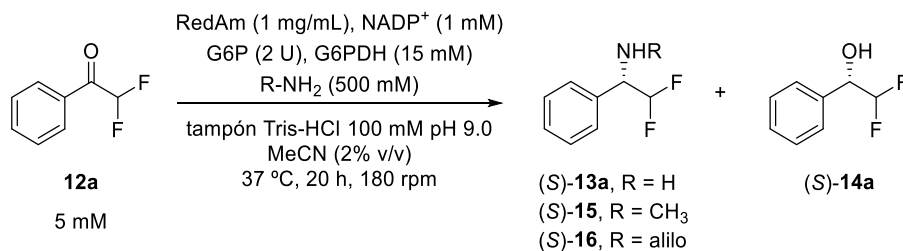
Esquema 3.15. Síntesis de la amina N-alilada racémica difluorada **16**.

3.3.2.2. Aminación reductiva de la α,α -difluorocetona **12a** catalizada por RedAms

Una vez sintetizados los productos de la reacción y desarrollados los métodos analíticos adecuados para el seguimiento de las reacciones enzimáticas, se planteó la obtención de diversas aminas difluoradas mediante la adición de tres donadores de amina diferentes como son amoniaco, metilamina y alilamina. De este modo sería posible obtener las correspondientes aminas primarias y secundarias enantioenriquecidas utilizando los enzimas purificados (Tabla 3.5). En cuanto a las condiciones de reacción, se utilizó una disolución reguladora de Tris-HCl 100 mM pH 9, una pequeña cantidad de acetonitrilo (2% v/v) como cosolvente para disolver el sustrato lipofílico en el medio, el cofactor de nicotinamida NADP^+ (1 mM), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y glucosa-6-fosfato (G6P, 3 equivalentes) para reciclar el cofactor y un exceso molar grande del donador de amina (100 equivalentes). Los procesos se realizaron a 37 °C utilizando agitación orbital (180 rpm) durante 20 h.

²⁰⁹ S. Mukherjee, B. List, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11336-11337.

Tabla 3.5. Obtención de aminas primarias y secundarias β,β -difluoradas enantioenriquecidas catalizada por RedAms.



RedAm	Donador de amina	Amina (%) ^a	Alcohol (%) ^a
Ad	NH ₃	3	97
	CH ₃ NH ₂	47	25
	alilamina	5	2
Nf	NH ₃	19	81
	CH ₃ NH ₂	44	27
	alilamina	65	16
At	NH ₃	2	98
	CH ₃ NH ₂	20	76
	alilamina	4	57
Nfis	NH ₃	10	90
	CH ₃ NH ₂	39	46
	alilamina	18	29
Asp	CH ₃ NH ₂	26	3
	alilamina	11	<1

^a Conversiones medidas por cromatografía de gases empleando una fase estacionaria aquiral.

Curiosamente se obtuvieron mezclas de la amina correspondiente difluorada y el alcohol difluorometilado **14a** en todos los casos, observándose que en muchos casos el producto no esperado (el alcohol) resultó ser el producto mayoritario, siendo esta tendencia más acusada cuando se empleó amoníaco como donador de amina. De entre todas las RedAms estudiadas, si tenemos en cuenta los tres donadores de amina empleados, la *Nf*RedAm y la *Nfis*RedAm mostraron los mejores valores hacia la conversión de las aminas. De manera general, los mayores porcentajes de amina se alcanzaron en presencia de la alilamina, obteniéndose una conversión del 65% de la amina **16** con la *Nf*RedAm, y con la metilamina en el caso de la *Ad*RedAm, alcanzándose un 47% de la amina **15**.

Respecto a los excesos enantioméricos, en la mayoría de los casos fue excelente obteniendo los productos de la serie enantiomérica *S* en su forma enantiopura (99%). También se observó que el alcohol difluorado (S)-**14a** se obtuvo también con *ee* >90%, lo que evidentemente confirmó que su obtención era debida a la acción del biocatalizador a través de una actividad promiscua (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Estereoselectividades obtenidas en las aminaciones reductivas con **12a** catalizadas por las RedAms.

RedAm	15 (%) ^{a,b}	16 (%) ^{a,b}	14a (%) ^{a,b}
<i>Ad</i>	99 (S)	99 (S)	99 (S)
<i>Nf</i>	99 (S)	99 (S)	90 (S)
<i>At</i>	99 (S)	n.d.	99 (S)
<i>Nfis</i>	99 (S)	70 (S)	97 (S)
<i>Asp</i>	99 (S)	99 (S)	n.d.

^a Excesos enantioméricos medidos por cromatografía de gases con fase estacionaria quirál.^b Cambio de la preferencia en la nomenclatura CIP. n.d. No determinado.

3.3.2.3. Influencia del número de átomos de flúor en la posición α de la cetona en el proceso biocatalítico de aminación reductiva

Aunque no es el foco principal de este capítulo, se van a resumir los resultados obtenidos en las biotransformaciones realizadas con otros derivados fluorados utilizando las RedAms. Puesto que se obtenían elevadas cantidades de alcohol al utilizar una α,α -difluorocetona, nos preguntamos si modificando el número de átomos de flúor en la posición α del grupo carbonilo afectaría a las proporciones del alcohol y amina obtenidos. Está descrito que la 2,2,2-trifluoroacetofenona se reduce completamente al alcohol trifluorometilado en una reacción catalizada por la *SrIRED* (imino reductasa de *Streptosporangium roseum*),²¹⁰ pero no se conocían hasta este estudio los efectos de acetofenonas mono- y difluoradas. Por ello, se compararon los resultados de las reacciones de aminación reductiva empleando la cetona **12a** con procesos que utilizan como sustratos la α -fluoroacetofenona (**2a**), la 2,2,2-trifluoroacetofenona (**17**) o incluso la acetofenona (**3a**), mostrándose a modo de ejemplo los resultados con los biocatalizadores *AdRedAm* y *NfRedAm* en la Figura 3.7.

²¹⁰ M. Lenz, J. Meisner, L. Quertinmont, S. Lutz, J. Kästner, B. M. Nestl, *ChemBioChem* **2016**, *18*, 253-256.

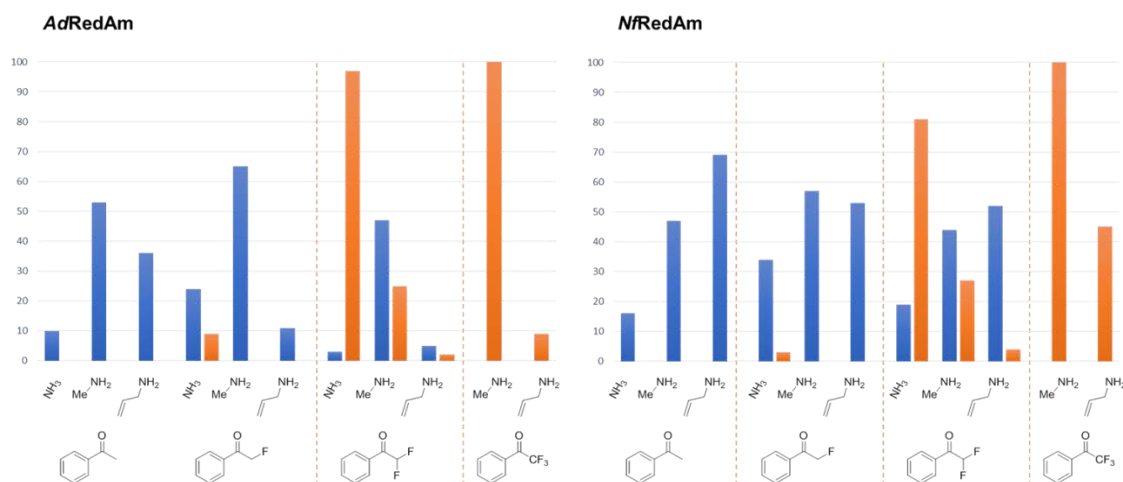


Figura 3.7. Porcentajes de amina (azul) y alcohol (naranja) obtenidos en las biotransformaciones de (fluoro)acetofenonas catalizados por AdRedAm (izda) y NfRedAm (dcha).

Como se puede observar, las proporciones de amina y alcohol obtenidas no solo se encontraron influenciadas por el donador de amina, sino también por el grado de fluoración del sustrato. Así, con respecto a la amina, y como ya se había observado con **12a**, en presencia de amoníaco se favorecía la formación del alcohol, mientras que la alilamina dio lugar a una formación más selectiva de la amina, quedando la metilamina en una situación intermedia. En cuanto a la sustitución de la posición α con átomos de flúor, la acetofenona solo se transformó en las correspondientes aminas, mientras que con la 2-fluoroacetofenona (**2a**) se obtuvieron mezclas de ambos compuestos en presencia del amoníaco. Por lo que respecta a los otros donadores de amina, se formaron exclusivamente las correspondientes aminas. En cualquier caso, siempre se favoreció la proporción de la amina frente al alcohol, a diferencia de la 2,2-difluoroacetofenona, donde se obtuvo predominantemente el alcohol, como ya se explicó antes. Por último, en el caso de la cetona trifluorada **17**, esta se transformó exclusivamente en el alcohol independientemente del donador de amina utilizado.

En cuanto a la estereoselectividad observada en estas reacciones, los enantiómeros obtenidos con todos estos enzimas fueron de configuración *S*, a excepción de las aminas provenientes de la acetofenona, que fueron de configuración *R*. En la mayoría de los casos se obtuvieron los productos (aminas o alcoholes) con altos valores de exceso enantiomérico (>90%).

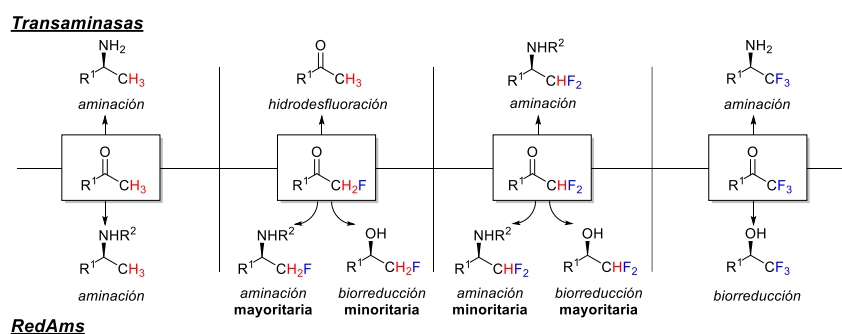
Varios factores pueden contribuir a la promiscuidad catalítica observada. Los resultados sugieren que el proceso de transferencia directa del hidruro es más fácil para las fluoroacetofenonas que para los análogos no fluorados, puesto que la electrofilia del carbono carbonílico se ve incrementada al aumentar la cantidad de átomos de flúor. Sin embargo, las proporciones diferentes de amina y alcohol observadas en función del donador de amina utilizado sobre cada sustrato sugieren que el reconocimiento molecular de ambos sustratos (cetona y amina), parece ser un factor importante en regular la quimioselectividad de la reacción. Para las reacciones estudiadas, en las que se emplea un gran exceso del donador de amina, la preferencia en la formación del alcohol sobre la amina o viceversa refleja la preferencia de unión en el centro activo de la propia cetona como sustrato o bien de la imina formada en la disolución.

En un estudio desarrollado por Grogan, Nestl y colaboradores,²¹¹ se determinó la estructura de la *SrIRED* unida a la trifluoroacetofenona, observando que dos de los tres átomos de flúor interaccionaban directamente con uno de los grupos hidroxilo de la ribosa del NADP^+ , de manera que favorecía una disposición de la cetona en la cual había una distancia óptima para que el carbono electrofílico del sustrato fuera reducido por el cofactor. Se demostró que estas interacciones eran menos pronunciadas en los casos de la 2,2-difluoroacetofenona o de la 2-fluoroacetofenona, y evidentemente no se presentaban en el caso de la acetofenona. Además, la proporción creciente de la amina al emplear amoníaco, metilamina o alilamina, respectivamente, es un reflejo de la competencia entre la imina (N-alquilada) con la cetona por unirse al centro activo. Este fenómeno es otro ejemplo interesante de promiscuidad catalítica dirigida por el sustrato, tal como ya se ha demostrado previamente en este capítulo con las transaminasas.

²¹¹ M. Lenz, S. Fademrecht, M. Sharma, J. Pleiss, G. Grogan, B. M. Nestl, *Protein Eng. Des. Sel.* **2018**, *31*, 109-120.

CONCLUSIONES

- Se ha estudiado la reactividad de la 2,2-difluoroacetofenona (**12a**) empleando transaminasas sobreexpresadas en *E. coli* y comerciales, observando la reacción de transaminación en presencia de un exceso molar pequeño del donador de amina (2-propilamina).²¹²
- Ha sido posible obtener la β,β -difluoroamina **13a** enantiopura de configuración *S* o *R*, empleándose transaminasas de estereopreferencia complementaria, encontrándose los mejores resultados con la transaminasa de *Arthrobacter* sp. y su variante ArRmut11.
- En base a estos resultados iniciales, se sintetizaron una serie de 2,2-difluoro-1-(hetero)ariletan-1-onas que difirieron en el tipo de sustitución y su posición en el anillo aromático. Algunos de estos procesos se pudieron escalar con éxito hasta los 100 mg de sustrato, obteniendo las aminas difluoradas con buenos resultados en términos de rendimiento aislado y exceso enantiomérico.
- Alternativamente se han empleado distintas RedAms para la síntesis selectiva de aminas difluoradas primarias y secundarias a partir de la cetona **12a** empleando diversos donadores de amina como amoníaco, metilamina y alilamina.¹¹⁵ Los mejores resultados se encontraron con las RedAms de *Neosartorya fumigatus* y *Neosartorya fischeri*, aunque se favoreció la formación del alcohol difluorado.
- Asimismo, se ha estudiado la reactividad de distintas cetonas (α -fluoradas) con las RedAms, observándose una influencia muy clara de la sustitución en posición α al grupo carbonilo en la quimioselectividad del proceso, obteniéndose en algunos casos preferentemente los derivados alcohol y en otros las aminas, en la mayoría de los casos de configuración *S* con muy buenos *ee*. Un resumen de todos los resultados obtenidos en este capítulo se muestra en el Esquema 3.16.



Esquema 3.16. Reactividad de transaminasas y RedAms frente a sustratos (fluorados).

²¹² M. García-Ramos, I. Lavandera, artículo enviado para su publicación.

PARTE EXPERIMENTAL

3.5.1. GENERAL

Las cetonas **3a** y **12a**, así como el trifluoroacetato de etilo fueron adquiridos a Sigma-Aldrich mientras que el tetracloruro de titanio (TiCl_4) fue adquirido a Alfa Aesar. El tetrahidrofurano fue destilado previamente bajo argón y secado sobre sodio utilizando benzofenona como indicador, mientras que la trietilamina fue destilada previamente bajo nitrógeno y secada sobre hidróxido de potasio y el acetonitrilo y el diclorometano fueron destilados bajo nitrógeno y secados sobre hidruro de calcio. La procedencia del resto de compuestos químicos y disolventes, así como de las transaminasas es común a lo descrito en capítulos anteriores.

Las aminosas reductivas (RedAms) de *Aspergillus terreus* (AtRedAm), *Ajellomyces dermatitidis* (AdRedAm), *Neosartorya fumigata* (NfRedAm) y *Neosartorya fischeri* (NfisRedAm) fueron donadas por el Prof. Gideon Grogan de la Universidad de York (Reino Unido). El crecimiento de las células se realizó en un medio de tipo *luria broth* (LB) con kanamicina como antibiótico (5 mL, 30 $\mu\text{g/mL}$) y se incubó a 37 °C y 180 rpm durante 18 h. Entonces, 5 mL de ese precultivo se inocularon a un nuevo medio LB (1 L) y se incubó de nuevo a 37 °C y 180 rpm, hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor de entre 0.6-0.8. La expresión del gen se indujo mediante la adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, 1 mM), y la mezcla se agitó durante 12 h a 18 °C y 180 rpm. Alternativamente, el precultivo de la AspRedAm se inoculó a un nuevo medio *terrific broth* (TB, 4 x 1 L) conteniendo 30 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina y se incubó a 37 °C y 250 rpm hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor de entre 1.7-2.0. La expresión del gen se indujo mediante la adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, 1 mM), y la mezcla se agitó durante 20 h a 16 °C y 160 rpm. Posteriormente, las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 min a 4 °C y se resuspendieron en una disolución tampón de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) que contenía NaCl (300 mM). Para llevar a cabo su purificación las paredes celulares se rompieron por ultrasonificación en hielo (5 x 30 s) a 4 °C con intervalos de parada de 30 s. Las fracciones solubles e insolubles fueron separadas por centrifugación a 50.000 g durante 30 min. Las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad (IMAC) empleando una columna quelante His-Trap con resina de níquel, seguido de cromatografía de exclusión por tamaños para el caso de la AdRedAm. Los lisados se cargaron sobre una columna Ni-NTA preequilibrada con la adición de una disolución reguladora de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) que contenía NaCl (300 mM), e imidazol (20

mM) y los enzimas se eluyeron con una disolución reguladora Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) conteniendo NaCl (300 mM) e imidazol (500 mM).

Para el caso de la AdRedAm el enzima se purificó por cromatografía de exclusión por tamaños en una columna S75 Superdex 16/600 con una disolución reguladora de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) que contenía NaCl (300 mM). Las fracciones que contenían la proteína se combinaron y almacenaron a 4 °C. Para el resto de las RedAms se combinaron las fracciones que contenían la proteína y se filtraron utilizando filtros de 30 kDa Amicon Ultra-15 para su posterior almacenamiento a 4 °C.

3.5.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS

Las técnicas de cromatografía en gel de sílice, resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas de alta resolución, espectrometría infrarroja y rotación óptica se emplearon según se ha descrito en capítulos anteriores.

3.5.2.1. Cromatografía de gases (CG)

Para los análisis por cromatografía de gases (CG) se utilizaron las columnas de relleno aquiral HP-1, HP-5 y DB-1701 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) para el seguimiento de las conversiones (Tabla 3.7), y la columna de relleno quiral Chirasil-Dex-CB y CycloSil-B para la medición de los excesos enantioméricos (Tabla 3.8).

Tabla 3.7. Determinación de las conversiones por CG empleando una fase estacionaria aquiral.

Compuesto	Columna	Programa ^a	Tiempo de retención (min)
2a	DB-1701	85/8/10/160/2/20/220/4	13.4
3a	DB-1701	85/8/10/160/2/20/220/4	11.4
12a	DB-1701	85/8/10/160/2/20/220/4	8.2
13a	DB-1701	85/8/10/160/2/20/220/4	11.8
14a	DB-1701	85/8/10/160/2/20/220/4	14.1
12b	HP-1	70/5/5/100/0/30/200/0	5.9
13b	HP-1	70/5/5/100/0/30/200/0	9.7
12c	HP-1	100/0/1.5/120/0/30/200/1	5.0
13c	HP-1	100/0/1.5/120/0/30/200/1	8.5
12d	HP-1	90/0/2.5/120/1/30/220/2	6.4
13d	HP-1	90/0/2.5/120/1/30/220/2	10.5
12f	HP-1	100/0/1.5/120/0/30/200/1	8.2
13f	HP-1	100/0/1.5/120/0/30/200/1	10.7
12h	HP-1	100/0/1.5/120/0/30/200/1	4.6
13h	HP-1	100/0/1.5/120/0/30/200/1	6.2
12k	DB-1701	90/0/5/150/0/20/220/0	7.1
13k	DB-1701	90/0/5/150/0/20/220/0	8.2
12l	DB-1701	85/8/10/160/2/20/200/4	8.3
13l	DB-1701	85/8/10/160/2/20/200/4	13.3
12m	HP-1	70/5/5/100/0/30/200/0	5.2
13m	HP-1	70/5/5/100/0/30/200/0	7.1
2a	HP-5	70/5/3/100/0/40/220/0	13.1
3a	HP-5	70/5/3/100/0/40/220/0	11.5
12a	HP-5	70/5/3/100/0/40/220/0	8.0
13a	HP-5	70/5/3/100/0/40/220/0	12.2
14a	HP-5	70/5/3/100/0/40/220/0	19.0
16	HP-5	70/5/3/100/0/40/220/0	12.7
12a	HP-5	60/10/1/70/5/40/200/0	12.3
15	HP-5	60/10/1/70/5/40/200/0	23.6

^a T_{inicial} (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T_{final} (°C)/ tiempo (min).

Tabla 3.8. Determinación de los valores de ee por CG empleando una fase estacionaria quiral.

Compuesto ^a	Columna	Programa ^b	Tiempo de retención (min)
13a	Chirasil-Dex-CB	90/6/2.5/155/0/20/200/1	30.2 (R), 30.5 (S)
13b	Chirasil-Dex-CB	110/5/3/150/0/30/200/4	19.5 (R), 19.6 (S)
13c	Chirasil-Dex-CB	110/3/3/180/2/30/200/4	25.1 (R), 25.4 (S)
13d	Chirasil-Dex-CB	120/5/30/180/10/10/200/1	16.9 (R), 17.1 (S)
13f	Chirasil-Dex-CB	110/3/3/180/2/30/200/4	26.5 (R), 26.8 (S)
13h	Chirasil-Dex-CB	120/5/5/180/5/30/200/1	41.5 (R), 42.2 (S)
13l	Chirasil-Dex-CB	110/5/3/150/0/30/200/4	19.7 (R), 19.8 (S)
14a	Chirasil-Dex-CB	70/10/5/200/0	26.4 (S), 26.8 (R)
15	Chirasil-Dex-CB	70/10/1/115/0/20/150/0	29.2 (S), 29.8 (R)
16	CycloSil-B	80/10/1/105/10/20/200/0	65.4 (R), 65.9 (S)

^a En todos los casos a excepción de **14a**, **15** y **16**, se midieron los excesos enantioméricos tras acetilación de las aminas con anhídrido acético y carbonato de potasio anhidro. ^b T_{inicial} (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T_{final} (°C)/ tiempo (min).

3.5.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se empleó el análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) quiral para la separación analítica de aquellos compuestos racémicos para los que no se encontró un método adecuado mediante CG. Los análisis se realizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 con un detector visible-ultravioleta a longitudes de onda de 210, 215 y 254 nm, con la columna Chiralpak AD-H (25 cm x 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 μ m). Como fase móvil se empleó una mezcla de *n*-hexano y 2-propanol 95:5 con un flujo de 0.8 mL/min a 30 °C (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Determinación de los valores de *ee* por HPLC.

Compuesto ^a	Tiempo de retención (min)
13k	13.5 (S), 16.5 (R)
13m	18.4 (R), 23.2 (S)

^a En ambos casos, se midieron los excesos enantioméricos como N-acetamidas tras acetilación de las aminas con anhídrido acético y carbonato de potasio anhidro.

3.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS NO ENZIMÁTICOS

3.5.3.1. Síntesis química de las 2,2-difluoro-1-(hetero)ariletan-1-onas **12b-d,f,h,k-m**

3.5.3.1.1. Preparación de las 1-trifluorometil-1,3-dicetonas intermedias

Sobre una dispersión de hidruro de sodio en aceite mineral al 60% p/v, (8 mmol, 1.2 equiv.), se añadió una disolución de la correspondiente 1-(hetero)ariletan-1-ona **12b-d,f,h,k-m** (6.7 mmol, 1 equiv.) en THF seco (13 mL) a 0 °C y bajo atmósfera de argón. Posteriormente, se añadió gota a gota trifluoroacetato de etilo (8 mmol, 1.2 equiv.) y se dejó que la mezcla alcanzara temperatura ambiente agitando durante 16 h. Transcurrido este tiempo se añadió una disolución acuosa de HCl 1 N (10 mL) y la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se filtraron, evaporando a continuación el disolvente en el rotavapor. Finalmente, las dicetonas obtenidas se purificaron por cromatografía de columna en gel de sílice empleando hexano puro como eluyente (85-94% rendimiento).

3.5.3.1.2. Proceso concurrente de fluoración/fragmentación

A una disolución de la correspondiente 1-trifluorometil-1,3-dicetona (6 mmol, 1 equiv.) en MeCN seco (30 mL), se añadió Selectfluor (14 mmol, 2.4 equiv.) bajo

atmósfera inerte y se calentó la mezcla a reflujo durante 3 h. Transcurrido este tiempo se añadió H₂O (6.17 mmol, 1 equiv.) y se calentó a reflujo otros 15 minutos adicionales. Posteriormente la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió lentamente trietilamina (30 mmol, 5 equiv.) para posteriormente agitar la reacción a temperatura ambiente otras 16 h. Después, se eliminó la trietilamina en el rotavapor y se redisolvió el crudo en CH₂Cl₂ (20 mL). Se añadió una disolución acuosa de HCl 2 N (15 mL) y se extrajo la mezcla de reacción con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL), combinando las fases orgánicas, que se secaron con Na₂SO₄ anhidro, filtraron y evaporaron cuidadosamente en el rotavapor debido a la volatilidad de estas cetonas. Finalmente, las cetonas obtenidas **12b-d,f,h,k-m** se purificaron mediante cromatografía de columna en gel de sílice empleando una mezcla de hexano y Et₂O 9:1 como eluyente (41-82% rendimiento).

3.5.3.2. Síntesis química de las 2,2-difluoro-1-(hetero)ariletan-1-aminas racémicas **13a-d,f,h,k-m**

A una disolución de la correspondiente cetona **12a-d,f,h,k-m** (0.54 mmol, 1 equiv.) en MeOH seco (2 mL) se añadió acetato de amonio (NH₄OAc, 5.4 mmol, 10 equiv.) bajo atmósfera inerte, agitando la mezcla durante 3 h a temperatura ambiente. Después se enfrió la reacción a 0 °C y se añadió cianoborohidruro de sodio (NaBH₃CN, 1.1 mmol, 2 equiv.), agitando la disolución a temperatura ambiente durante 3 h. Transcurrido ese tiempo se acidificó el medio de reacción hasta pH 5 empleando una disolución acuosa de HCl 2 N y se evaporó el MeOH en el rotavapor. Esta disolución se lavó con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL) y se recogió la fase acuosa. Posteriormente, la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl 2 N (2 x 20 mL). Se combinaron todas las fases acuosas y se alcalinizaron hasta pH 9 con una disolución acuosa de NaOH 2 N para extraer finalmente las correspondientes aminas con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). Se combinaron las fases orgánicas, secaron con Na₂SO₄ anhidro y filtraron, evaporando el disolvente de manera muy cuidadosa en el rotavapor debido a la elevada volatilidad de estos compuestos. Las aminas deseadas **13a-d,f,h,k-m** se obtuvieron con suficiente pureza como para poder ser empleadas posteriormente sin necesidad de realizar procesos adicionales de purificación (16-44% rendimiento).

3.5.3.3. Síntesis química de la amina racémica N-metilada **15**

A una mezcla de clorhidrato de metilamina (CH₃NH₂·HCl, 19.2 mmol, 30 equiv.) en MeOH seco (15 mL), se añadió la cetona fluorada **12a** (0.64 mmol, 1 equiv.) y

NaBH₃CN (0.77 mmol, 1.2 equiv.) bajo atmósfera inerte. La mezcla se agitó durante 30 minutos a 0 °C y posteriormente durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se acidificó el medio de reacción hasta pH 2 empleando una disolución acuosa de HCl 1 N (10 mL) y se evaporó el MeOH en el rotavapor. Esta disolución se lavó con CH₂Cl₂ (6 x 15 mL) y se recogió la fase acuosa. Posteriormente, la fase orgánica se lavó con HCl 2 N (2 x 20 mL), combinando todas las fases acuosas que a continuación se alcalinizaron hasta pH 10 con una disolución acuosa de NaOH 10 N (4 mL) para extraer finalmente las correspondientes aminas con CH₂Cl₂ (6 x 30 mL). Se combinaron las fases orgánicas, secaron con Na₂SO₄ anhidro y filtraron, evaporando de manera muy cuidadosa el disolvente en el rotavapor debido a la elevada volatilidad de este compuesto. La amina **15** se obtuvo con suficiente pureza como para poder ser empleada posteriormente sin necesidad de realizar ningún proceso adicional de purificación (10% de rendimiento).

3.5.3.4. Síntesis química de la amina racémica N-alilada **16**

A una disolución de la cetona **12a** (1.28 mmol, 1 equiv.) en CH₂Cl₂ (7 mL) se le añadió bajo atmósfera de argón una disolución de TiCl₄ en CH₂Cl₂ (~1.0 M, 1.4 mmol, 1.1 equiv.), y la mezcla de reacción, de color amarillo, se enfrió a 0 °C. Posteriormente se añadió alilamina (25.6 mmol, 20 equiv.) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h aproximadamente, observando la formación de un precipitado amarillento. Transcurrido este tiempo se añadió una disolución de NaBH₃CN (1.54 mmol, 1.2 equiv.) en MeOH (2.3 mL), desapareciendo el color amarillo de la mezcla de reacción. Esta disolución se agitó durante 1 h a temperatura ambiente, y tras este tiempo se alcalinizó el medio de reacción hasta pH 10 con una disolución acuosa de NaOH 5 N, formándose un precipitado de color blanco, que se filtró. El líquido filtrado se transfirió a un embudo de extracción que contenía agua (50 mL) y CH₂Cl₂ (50 mL). Se separó la fase orgánica, que se lavó con agua (2 x 50 mL) y una disolución acuosa saturada de NaCl (2 x 50 mL). Posteriormente esta fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl concentrado y posteriormente con agua (3 x 50 mL). Se combinaron las fases acuosas y alcalinizaron con una disolución de NH₃ concentrado hasta pH 10, extrayendo a continuación la capa acuosa con CH₂Cl₂ (3 x 50 mL). Finalmente se combinaron las fases orgánicas, que se secaron con Na₂SO₄ anhidro y filtraron, evaporando el disolvente de manera muy cuidadosa en el rotavapor debido a la elevada volatilidad de este compuesto. La amina **16** se obtuvo con suficiente pureza como para poder ser

empleada posteriormente sin necesidad de realizar procesos adicionales de purificación (10% rendimiento).

3.5.3.5. Síntesis química del alcohol racémico **14a**

A una disolución de la cetona **12a** (1.28 mmol, 1 equiv.) en MeOH (2 mL) a 0 °C, se añadió borohidruro de sodio (NaBH₄, 1.28 mmol, 4 equiv.) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente hasta observar la desaparición de la cetona de partida por TLC (~3 h). Transcurrido este tiempo se añadieron unas gotas de una disolución acuosa de HCl 1 N y agua (2 mL) a la mezcla de reacción y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 2 mL). Finalmente se combinaron las fases orgánicas, que se secaron con Na₂SO₄ anhidro y filtraron, evaporando el disolvente de manera muy cuidadosa en el rotavapor debido a la volatilidad de este compuesto. El alcohol **14a** se obtuvo con suficiente pureza como para poder ser empleado posteriormente sin necesidad de realizar procesos adicionales de purificación (79% rendimiento).

3.5.4. PROCEDIMIENTOS ENZIMÁTICOS

3.5.4.1. Procedimiento general para la biotransaminación de la cetona **12a** empleando transaminasas sobreexpresadas en *E. coli* y 2-propilamina a diferentes concentraciones

En un tubo Eppendorf, se añadió la correspondiente transaminasa sobreexpresada en *E. coli* (10 mg), y posteriormente se adicionó una mezcla de la disolución reguladora de fosfato (100 mM, pH 7.5) que contenía PLP (1 mM) y la correspondiente concentración de 2-propilamina (0.05, 0.1 o 1 M), y DMSO como cosolvente (12.5 µL, para un volumen total de 0.5 mL). Finalmente se añadió la cetona difluorada **12a** (20 o 30 mM) a la mezcla de reacción y se agitó en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. La reacción se detuvo adicionando una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃ (350 µL) y se extrajo con AcOEt (3 x 350 µL). Se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones por cromatografía de gases empleando el método detallado en la Tabla 3.7. El exceso enantiomérico de la amina **13a** se midió por cromatografía de gases con una fase estacionaria quiral empleando el método detallado en la Tabla 3.8 tras su transformación en la correspondiente acetamida mediante el procedimiento de derivatización descrito en el Capítulo 1 (Sección 1.5.4.2).

3.5.4.2. Procedimiento general para la transaminación de las cetonas **12b-d,f,h,k-m**

En un tubo Eppendorf, se añadió la correspondiente transaminasa comercial (2 mg) o sobreexpresada en *E. coli* (10 mg), y posteriormente se adicionó una mezcla de la disolución reguladora de fosfato (100 mM, pH 7.5) que contenía PLP (1 mM) y 2-propilamina (100 mM), y DMSO (12.5 μ L, para un volumen total de 0.5 mL). Finalmente se añadió el sustrato correspondiente **12b-d,f,h,k-m** (30 mM) a la mezcla de reacción y se agitó dicha mezcla en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. La reacción se detuvo adicionando una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃ (350 μ L) y se extrajo con AcOEt (3 x 350 μ L). Se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones por cromatografía de gases empleando el método detallado en la Tabla 3.7. Los excesos enantioméricos de las aminas **13b-d,f,h,k-m** se midieron por cromatografía de gases o cromatografía líquida de alta resolución empleando una fase estacionaria quiral y los métodos detallados en las Tablas 3.8 y 3.9 tras su transformación en las correspondientes acetamidas mediante el procedimiento de derivatización descrito en el Capítulo 1 (Sección 1.5.4.2).

3.5.4.3. Biotransaminación de las 2,2-difluoroetan-1-onas **12b-d,f,h,k-m** a escala semipreparativa

En un matraz Erlenmeyer se añadió la ArR-TA sobreexpresada en *E. coli* (100 mg) y posteriormente una mezcla de la disolución reguladora de fosfato (100 mM, pH 7.5, 1 mM PLP) conteniendo 2-propilamina (100 mM) como donador de amina y MeCN (95 μ L para **12b,k,l** resultando un volumen total de 3.8 mL; 87.5 μ L para **12c** resultando un volumen total de 3.5 mL; 70 μ L para **12d** resultando un volumen total de 2.8 mL; 90 μ L para **12f** resultando un volumen total de 3.6 mL; 97.5 μ L para **12h** resultando un volumen total de 3.9 mL; 103 μ L para **12m** resultando un volumen total de 4.1 mL). Finalmente se añadió el sustrato correspondiente **12b-d,f,h,k-m** (20 mg, 30 mM) a la mezcla de reacción y se agitó en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. Transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota de las reacciones para medir, por un lado las conversiones por cromatografía de gases (>99% en todos los casos) empleando los métodos detallados en la Tabla 3.7, y por otro lado la pureza óptica de las aminas (S)-**13b-d,f,h,k,l** y (R)-**13m** (>99% ee) tras un proceso de acetilación empleando los métodos detallados en las Tablas 3.8 y 3.9. Después, se acidificó el medio de reacción hasta pH 3 empleando una disolución acuosa de HCl 3 N. La

reacción se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 15 mL), recogiendo la fase acuosa. Posteriormente, la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl 2 N (2 x 15 mL). Se combinaron todas las fases acuosas y se alcalinizaron hasta pH 9 con una disolución acuosa de NaOH 3 N para extraer finalmente las correspondientes aminas difluoradas con CH_2Cl_2 (8 x 15 mL). Se combinaron las fases orgánicas, secaron con Na_2SO_4 anhidro y filtraron, evaporando a continuación el disolvente en el rotavapor, aislando las aminas (S)-**13b** (14 mg, 70% rto.), (S)-**13c** (13 mg, 65% rto.), (S)-**13d** (16 mg, 80% rto.), (S)-**13f** (15 mg, 75% rto.), (S)-**13h** (16 mg, 80% rto.), (S)-**13k** (12 mg, 60% rto.), (S)-**13l** (11 mg, 55% rto.) y (R)-**13m** (12 mg, 60% rto.).

3.5.4.4. Biotransaminación de las cetonas **12a** y **12f** a escala semipreparativa

En un matraz Erlenmeyer se añadió la correspondiente transaminasa sobreexpresada en *E. coli* (ArRmut11-TA, 180 mg para **12a**; ArR-TA, 200 mg para **12f**) y posteriormente una mezcla de la disolución reguladora de fosfato (100 mM, pH 7.5, 1 mM PLP) con una concentración de 2-propilamina (100 mM) como donador de amina y MeCN (427.5 μL para **12a** resultando un volumen total de 17.1 mL; 448 μL para **12f** resultando un volumen total de 17.9 mL). Finalmente se añadió el sustrato correspondiente (**12a**, 80 mg, 30 mM; **12f**, 100 mg, 30 mM) a la mezcla de reacción y se agitó la mezcla en un agitador orbital a 30 °C y 250 rpm (48 h para **12a** y 24 h para **12f**). Transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota de las reacciones para medir las conversiones por cromatografía de gases (>99% en ambos casos) empleando los métodos detallados en la Tabla 3.7, y tras su acetilación se midieron sus *ee* (>99%) empleando el método detallado en la Tabla 3.8. Después, se acidificó el medio de reacción hasta pH 3 empleando una disolución acuosa de HCl 3 N. La reacción se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 15 mL), recogiendo la fase acuosa. Posteriormente, la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl 2 N (2 x 15 mL), y se combinaron todas las fases acuosas que se alcalinizaron hasta pH 10 con una disolución acuosa de NaOH 3 N. Las correspondientes aminas **13a** y **13f** se extrajeron finalmente con CH_2Cl_2 (10 x 15 mL), combinando las fases orgánicas que se secaron con Na_2SO_4 anhidro y filtraron, evaporando a continuación el disolvente en el rotavapor, aislando las aminas (S)-**13a** (67 mg, 82% rto.) y (S)-**13f** (79 mg, 79% rto.).

3.5.4.5. Asignación de la configuración absoluta de las aminas enantioenriquecidas

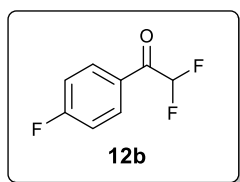
La configuración absoluta de las aminas **13a**, **13c** y **13f** obtenidas en las biotransaminaciones se ha asignado por comparación con las rotaciones ópticas específicas descritas previamente en la bibliografía.^{186,192} Dicha asignación coincide con la configuración absoluta prevista inicialmente, propuesta en base a la selectividad descrita en la bibliografía para ambas preparaciones enzimáticas (ArR-TA y ArRmut11-TA) con sustratos estructuralmente similares.^{31c,31e,120a,121} Para el resto de los derivados se asumió la misma configuración de nuevo en base a la estereoselectividad prevista por los enzimas y por el orden de elución de los enantiómeros en la cromatografía de gases en fase quiral.

3.5.4.6. Procedimiento general para la aminación reductiva de cetonas empleando RedAms

En un tubo Eppendorf se añadió una mezcla de la disolución reguladora Tris-HCl (100 mM, pH 9) con un volumen total de 0.5 mL que contenía el correspondiente donador de amina (500 mM), glucosa-6-fosfato (G6P, 15 mM), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, 2 U), NADP⁺ (1 mM), y la correspondiente cetona (5 mM) solubilizada en MeCN (10 μ L, 2% v/v). Finalmente se añadió la correspondiente RedAm purificada (1 mg/mL) y se agitó la mezcla en un agitador orbital durante 20 h a 37 °C (30 °C para AspRedAm) entre 180-250 rpm. La reacción se detuvo adicionando una disolución acuosa de NaOH 4 N (200 μ L) y se extrajo con AcOEt (3 x 500 μ L). Se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones y los *ee* por cromatografía de gases empleando los métodos detallados en las Tablas 3.7 y 3.8.

3.5.5. DATOS EXPERIMENTALES

2,2-Difluoro-1-(4-fluorofenil)etan-1-ona (12b)



Fórmula empírica: C₈H₅F₃O

Peso molecular: 174.12 g/mol

Aspecto: Sólido amarillo

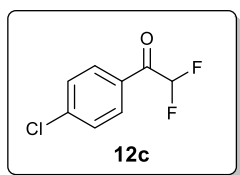
Rendimiento: 43% **R_f** (20% Et₂O/Hexano): 0.77

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6.25 (t, *J* = 54.0 Hz, 1H), 7.21 (t aparente, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.13 (dd, *J* = 9.0, 6.0 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 111.5 (t, *J* = 252.0 Hz, CH), 116.4 (d, *J* = 22.5 Hz, 2CH), 127.9 (C), 132.7 (d, *J* = 9.8 Hz, 2CH), 166.8 (d, *J* = 256.5 Hz, C), 186.2 (t, *J* = 25.5 Hz, C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -101.0, -121.4

1-(4-Clorofenil)-2,2-difluoroetan-1-ona (12c)



Fórmula empírica: C₈H₅ClF₂O

Peso molecular: 190.57 g/mol

Aspecto: Sólido amarillo

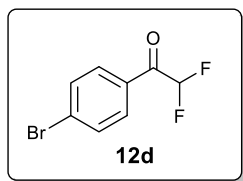
Rendimiento: 64% **R_f** (30% Et₂O/Hexano): 0.45

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6.24 (t, *J* = 54.0 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.02 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 111.4 (t, *J* = 254.0 Hz, CH), 129.5 (2CH), 129.8 (C), 131.1 (2CH), 141.8 (C), 186.7 (t, *J* = 25.9 Hz, C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -121.6

1-(4-Bromofenil)-2,2-difluoroetan-1-ona (12d)



Fórmula empírica: C₈H₅BrF₂O

Peso molecular: 235.03 g/mol

Aspecto: Sólido blanco

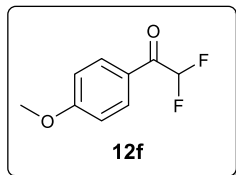
Rendimiento: 80% **R_f** (30% Et₂O/Hexano): 0.77

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6.24 (t, *J* = 53.4 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 111.4 (t, *J* = 254.1 Hz, CH), 130.2 (C), 130.7 (C), 131.2 (2CH), 132.5 (2CH), 187.0 (t, *J* = 25.9 Hz, C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -121.6

2,2-Difluoro-1-(4-metoxifenil)etan-1-ona (12f)



Fórmula empírica: C₉H₈F₂O₂

Peso molecular: 186.16 g/mol

Aspecto: Sólido amarillo

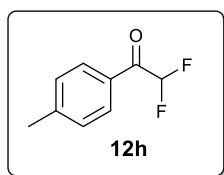
Rendimiento: 80% **R_f** (20% Et₂O/Hexano): 0.56

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.90 (s, 3H), 6.26 (t, *J* = 54.0 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.06 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 55.7 (CH₃), 111.5 (t, *J* = 252.0 Hz, CH), 114.4 (2CH), 124.5 (C), 132.3 (2CH), 165.0 (C), 186.2 (t, *J* = 24.0 Hz, C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -121.4

2,2-Difluoro-1-(4-metilfenil)etan-1-ona (12h)



Fórmula empírica: C₉H₈F₂O

Peso molecular: 170.16 g/mol

Aspecto: Sólido amarillo

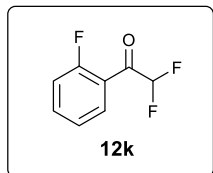
Rendimiento: 41% **R_f** (20% Et₂O/Hexano): 0.80

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.45 (s, 3H), 6.28 (t, *J* = 54.0 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.97 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 21.9 (CH₃), 111.2 (t, *J* = 252.0 Hz, CH), 129.1 (C), 129.8 (4CH, solapados), 146.3 (C), 187.2 (t, *J* = 25.5 Hz, C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -121.9

2,2-Difluoro-1-(2-fluorofenil)etan-1-ona (12k)



Fórmula empírica: C₈H₅F₃O

Peso molecular: 174.12 g/mol

Aspecto: Aceite amarillo

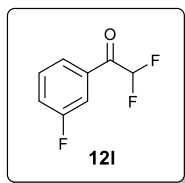
Rendimiento: 82% **R_f** (20% Et₂O/Hexano): 0.35

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6.44 (td, *J* = 53.3, 2.8 Hz, 1H), 7.21 (m, 1H), 7.32 (m, 1H), 7.66 (m, 1H), 7.96 (m, 1H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 109.6 (td, *J* = 249.4, 8.5 Hz, CH), 116.9 (d, *J* = 22.9 Hz, CH), 121.2 (d, *J* = 13.4 Hz, C), 125.2 (d, *J* = 3.3 Hz, CH), 131.4 (CH), 136.9 (d, *J* = 9.3 Hz, CH), 162.2 (d, *J* = 256.7 Hz, C), 186.1 (td, *J* = 25.5, 4.5 Hz, C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -108.8 (t, *J* = 12.4 Hz), -128.2 (d, *J* = 12.4 Hz)

2,2-Difluoro-1-(3-fluorofenil)etan-1-ona (12l)



Fórmula empírica: C₈H₅F₃O

Peso molecular: 174.12 g/mol

Aspecto: Aceite amarillo

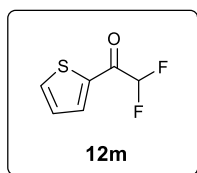
Rendimiento: 56% **R_f** (30% Et₂O/Hexano): 0.75

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6.26 (t, *J* = 53.4 Hz, 1H), 7.38 (m, 1H), 7.52 (m, 1H), 7.75 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 111.3 (t, *J* = 254.0 Hz, CH), 116.5 (d, *J* = 22.9 Hz, CH), 122.2 (d, *J* = 21.5 Hz, CH), 125.6 (d, *J* = 1.5 Hz, CH), 129.9 (d, *J* = 10.9 Hz, C), 130.9 (d, *J* = 7.6 Hz, CH), 133.4 (C), 162.9 (d, *J* = 249.2 Hz, C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -110.6, -121.8

2,2-Difluoro-1-(tiofen-2-il)etan-1-ona (12m)



Fórmula empírica: C₆H₄F₂OS

Peso molecular: 162.15 g/mol

Aspecto: Sólido naranja

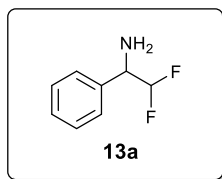
Rendimiento: 61% **R_f** (10% Et₂O/Hexano): 0.56

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6.18 (t, *J* = 54.0 Hz, 1H), 7.23 (dd, *J* = 4.9, 3.9 Hz, 1H), 7.84 (dd, *J* = 4.9, 1.1 Hz, 1H), 8.01 (m, 1H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 110.8 (t, *J* = 253.6 Hz, CH), 129.0 (CH), 135.7 (t, *J* = 4.0 Hz, CH), 136.9 (CH), 137.8 (C), 181.1 (t, *J* = 26.4 Hz, C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -121.7

1-Fenil-2,2-difluoroetan-1-amina (13a)



Fórmula empírica: C₈H₉F₂N

Peso molecular: 157.16 g/mol

Aspecto: Aceite incoloro

Rendimiento: 25% **R_f** (20% AcOEt/Hexano): 0.26

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.66 (s ancho, 2H), 4.19 (ddd, *J* = 13.8, 9.7, 4.6 Hz, 1H), 5.76 (td, *J* = 56.6, 4.6, 1H), 7.38 (m, 5H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 58.1 (dd, *J* = 23.7, 21.5 Hz, CH), 117.3 (t, *J* = 244.5 Hz, CH), 127.6 (2CH), 128.6 (CH), 128.8 (2CH), 137.6 (dd, *J* = 4.0, 3.1 Hz, C)

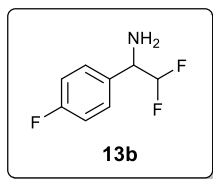
¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -124.1 (ddd, *J* = 278.0, 56.2, 9.8 Hz), -127.4 (ddd, *J* = 278.2, 57.0, 13.4 Hz)

IR (NaCl): ν 3388, 1628, 1619, 1496, 1455, 1055, 701 cm⁻¹

EMAR (ESI⁺, *m/z*): Calculada para [C₈H₁₁F₂N]⁺ [(M+H)]⁺: 158.0776; encontrada: 158.0784

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = +5.1 (*c* 1.0, EtOH, >99% *ee* (S)-**13a**); bibliografía [α]_D²⁰ = +13.0 (*c* 2.5, EtOH, 89% *ee* (S)-**13a**)¹⁹²

2,2-Difluoro-1-(4-fluorofenil)etan-1-amina (13b)



Fórmula empírica: C₈H₈F₃N

Peso molecular: 175.15 g/mol

Aspecto: Aceite incoloro

Rendimiento: 20% **R_f** (100% CH₂Cl₂): 0.20

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.74 (s ancho, 2H), 4.18 (ddd, *J* = 12.8, 10.0, 4.6 Hz, 1H), 5.71 (td, *J* = 57.0, 4.6 Hz, 1H), 7.07 (t aparente, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.38 (dd, *J* = 9.0, 6.0 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 57.5 (t, *J* = 23.3 Hz, CH), 115.8 (d, *J* = 21.8 Hz, 2CH), 117.2 (t, *J* = 243.0 Hz, CH), 129.4 (d, *J* = 8.3 Hz, 2CH), 133.3 (d, *J* = 4.5 Hz, C), 162.9 (d, *J* = 245.3 Hz, C)

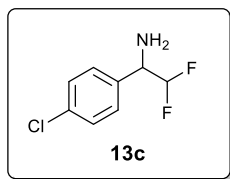
¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -113.6, -124.5 (d, *J* = 278.8 Hz), -127.1 (d, *J* = 278.8 Hz)

IR (NaCl): ν 3394, 2917, 1711, 1666, 1606, 1512, 1227, 837, 735 cm⁻¹

EMAR (ESI⁺, *m/z*): Calculada para [C₈H₉F₃N]⁺ [(M+H)]⁺: 176.0682; encontrada: 176.0683

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = +8.3 (*c* 1.0, CHCl₃, >99% *ee* (S)-**13b**)

1-(4-Clorofenil)-2,2-difluoroetan-1-amina (13c)



Fórmula empírica: C₈H₈ClF₂N

Peso molecular: 191.61 g/mol

Aspecto: Aceite incoloro

Rendimiento: 20% **R_f** (100% CH₂Cl₂): 0.22

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.63 (s, 2H), 4.17 (ddd, *J* = 12.6, 10.1, 4.5 Hz, 1H), 5.71 (td, *J* = 56.5, 4.5 Hz, 1H), 7.35 (s, 4H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 57.6 (t, *J* = 22.5 Hz, CH), 117.1 (t, *J* = 243.8 Hz, CH), 129.0 (2CH), 129.1 (2CH), 134.5 (C), 136.1 (t, *J* = 3.0 Hz, C)

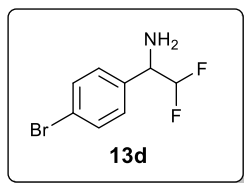
¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -124.6 (d, *J* = 279.0 Hz), -127.0 (d, *J* = 279.3 Hz)

IR (NaCl): ν 3391, 2977, 1597, 1493, 830 cm⁻¹

EMAR (ESI⁺, *m/z*): Calculada para [C₈H₉ClF₂N]⁺ [(M+H)]⁺: 192.0386; encontrada: 192.0390

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = +10.0 (*c* 1.0, CHCl₃, >99% *ee* (S)-**13c**); bibliografía [α]_D²⁰ = +24.9 (*c* 0.5, MeOH, >99% *ee* (S)-**13c**.HCl)¹⁸⁶

1-(4-Bromofenil)-2,2-difluoroetan-1-amina (13d)



Fórmula empírica: C₈H₈BrF₂N

Peso molecular: 236.06 g/mol

Aspecto: Aceite incoloro

Rendimiento: 28% **R_f** (100% CH₂Cl₂): 0.40

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.67 (s ancho, 2H), 4.16 (ddd, *J* = 12.7, 10.1, 4.5 Hz, 1H), 5.71 (td, *J* = 56.5, 4.5 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 57.6 (t, *J* = 22.5 Hz, CH), 117.0 (t, *J* = 244.9 Hz, CH), 122.7 (C), 129.4 (2CH), 132.0 (2CH), 136.5 (C)

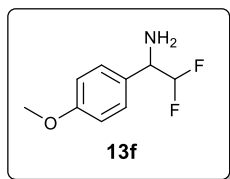
¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -124.6 (d, *J* = 279.2 Hz), -126.9 (d, *J* = 279.3 Hz)

IR (NaCl): ν 3391, 3329, 2970, 1593, 1489, 825, 743 cm⁻¹

EMAR (ESI⁺, *m/z*): Calculada para [C₈H₉BrF₂N]⁺ [(M+H)]⁺: 235.9881; encontrada: 235.9883

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = +8.4 (*c* 1.0, CHCl₃, >99% *ee* (S)-**13d**)

2,2-Difluoro-1-(4-metoxifenil)etan-1-amina (13f)



Fórmula empírica: C₉H₁₁F₂NO

Peso molecular: 187.19 g/mol

Aspecto: Aceite amarillo

Rendimiento: 16% **R_f** (50% Et₂O/Hexano): 0.14

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.67 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 4.14 (ddd, *J* = 12.0, 9.0, 3.0 Hz, 1H), 5.72 (td, *J* = 57.0, 3.0 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 55.4 (CH₃), 57.5 (dd, *J* = 23.2, 21.0 Hz, CH), 114.2 (2CH), 117.5 (t, *J* = 242.3 Hz, CH), 128.8 (2CH), 129.7 (dd, *J* = 4.5, 3.0 Hz, C), 159.8 (C)

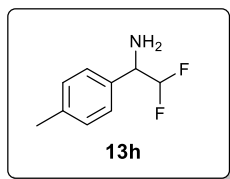
¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -124.2 (d, *J* = 277.4 Hz), -127.2 (d, *J* = 277.4 Hz)

IR (NaCl): ν 3390, 3324, 2961, 1613, 1585, 1515, 1465, 1251, 833, 768 cm⁻¹

EMAR (ESI⁺, *m/z*): Calculada para [C₉H₁₂F₂NO]⁺ [(M+H)]⁺: 188.0881; encontrada: 188.0884

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = +10.7 (*c* 1.0, CHCl₃, >99% *ee* (S)-**13f**); bibliografía [α]_D²⁰ = +26.3 (*c* 0.7, MeOH, >99% *ee* (S)-**13f**.HCl)¹⁸⁶

2,2-Difluoro-1-(4-metilfenil)etan-1-amina (13h)



Fórmula empírica: C₉H₁₁F₂N

Peso molecular: 171.19 g/mol

Aspecto: Aceite incoloro

Rendimiento: 35% **R_f** (5% MeOH/EtOAc): 0.32

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.67 (s, 2H), 2.36 (s, 3H), 4.15 (ddd, *J* = 13.9, 9.8, 4.6 Hz, 1H), 5.74 (td, *J* = 57.1, 4.6 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 21.2 (CH₃), 57.8 (dd, *J* = 23.3, 21.0 Hz, CH), 117.5 (t, *J* = 243.0 Hz, CH), 127.5 (2CH), 129.5 (2CH), 134.6 (dd, *J* = 3.8, 3.0 Hz, C), 138.4 (C)

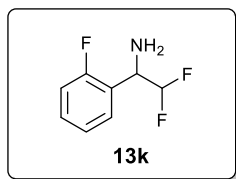
¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -124.0 (d, *J* = 277.6 Hz), -127.3 (d, *J* = 277.7 Hz)

IR (NaCl): ν 3394, 3327, 1733, 1615, 1516, 1374, 1247, 910, 735 cm⁻¹

EMAR (ESI⁺, *m/z*): Calculada para [C₉H₁₂F₂N]⁺ [(M+H)]⁺: 172.0932; encontrada: 172.0933

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = +9.2 (*c* 1.0, CHCl₃, >99% *ee* (S)-**13h**)

2,2-Difluoro-1-(2-fluorofenil)etan-1-amina (13k)



Fórmula empírica: C₈H₈F₃N

Peso molecular: 175.15 g/mol

Aspecto: Aceite incoloro

Rendimiento: 44% **R_f** (100% AcOEt): 0.64

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.72 (s ancho, 2H), 4.49 (ddd, *J* = 15.4, 8.9, 3.9 Hz, 1H), 5.89 (tdd, *J* = 57.0, 6.0, 3.0 Hz, 1H), 7.08 (m, 1H), 7.19 (m, 1H), 7.32 (m, 1H), 7.44 (m, 1H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 52.3 (t, *J* = 23.5 Hz, CH), 115.8 (d, *J* = 21.9 Hz, CH), 116.2 (C), 116.3 (t, *J* = 243.0 Hz, CH), 124.7 (d, *J* = 3.6 Hz, CH), 128.8 (d, *J* = 4.0 Hz, CH), 130.1 (d, *J* = 8.4 Hz, CH), 160.7 (d, *J* = 246.5 Hz, C)

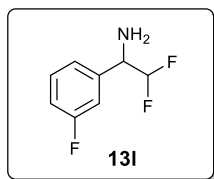
¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -118.1 (t, *J* = 3.9 Hz), -123.7 (dd, *J* = 278.2, 4.2 Hz), -128.9 (dd, *J* = 278.2, 3.7 Hz)

IR (NaCl): ν 3400, 2976, 1616, 1587, 1493, 1456, 759 cm⁻¹

EMAR (ESI⁺, *m/z*): Calculada para [C₈H₉F₃N]⁺ [(M+H)]⁺: 176.0682; encontrada: 176.0684

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = +13.9 (*c* 1.0, CHCl₃, >99% *ee* (S)-**13k**)

2,2-Difluoro-1-(3-fluorofenil)etan-1-amina (13I)



Fórmula empírica: C₈H₈F₃N

Peso molecular: 175.15 g/mol

Aspecto: Aceite incoloro

Rendimiento: 31% **R_f** (100% CH₂Cl₂): 0.15

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.68 (s ancho, 2H), 4.20 (ddd, *J* = 12.8, 9.9, 4.5 Hz, 1H), 5.74 (td, *J* = 56.5, 4.5 Hz, 1H), 7.04 (m, 1H), 7.16 (m, 2H), 7.35 (m, 1H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 57.7 (t, *J* = 22.9 Hz, CH), 114.7 (d, *J* = 22.3 Hz, CH), 115.6 (d, *J* = 21.0 Hz, CH), 117.0 (t, *J* = 243.0 Hz, CH), 123.4 (d, *J* = 3.0 Hz, CH), 130.4 (d, *J* = 8.2 Hz, CH), 140.0 (C), 163.0 (d, *J* = 246.5 Hz, C)

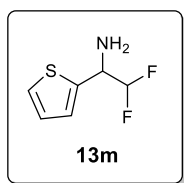
¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -112.4, -124.4 (d, *J* = 279.0 Hz), -127.2 (d, *J* = 279.1 Hz)

IR (NaCl): ν 3397, 3329, 2978, 1616, 1593, 1489, 1451, 1247, 790, 697 cm⁻¹

EMAR (ESI⁺, *m/z*): Calculada para [C₈H₉F₃N]⁺ [(M+H)]⁺: 176.0682; encontrada: 176.0683

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = +6.8 (*c* 1.0, CHCl₃, >99% *ee* (S)-13I)

2,2-Difluoro-1-(tiofen-2-il)etan-1-amina (13m)



Fórmula empírica: C₆H₇F₂NS

Peso molecular: 163.19 g/mol

Aspecto: Aceite incoloro

Rendimiento: 41% **R_f** (100% CH₂Cl₂): 0.23

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.75 (s ancho, 2H), 4.47 (ddd, *J* = 12.2, 9.9, 4.4 Hz, 1H), 5.78 (td, *J* = 56.6, 4.4 Hz, 1H), 7.03 (dd, *J* = 5.0, 3.6 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J* = 5.1, 1.3 Hz, 1H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 54.4 (t, *J* = 24.0 Hz, CH), 116.6 (t, *J* = 245.2 Hz, CH), 125.6 (CH), 125.8 (CH), 127.2 (CH), 140.7 (t, *J* = 3.0 Hz, C)

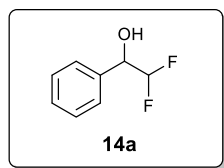
¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -124.3 (d, *J* = 277.7 Hz), -126.8 (d, *J* = 277.8 Hz)

IR (NaCl): ν 3390, 2921, 2849, 1662, 1598, 1061, 705 cm⁻¹

EMAR (ESI⁺, *m/z*): Calculada para [C₆H₈F₂NS]⁺ [(M+H)]⁺: 164.0340; encontrada: 164.0341

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = +0.9 (*c* 1.0, CHCl₃, >99% *ee* (S)-**13m**)

1-Fenil-2,2-difluoroetan-1-ol (14a)



Fórmula empírica: C₈H₈F₂O

Peso molecular: 158.15

Aspecto: Aceite incoloro

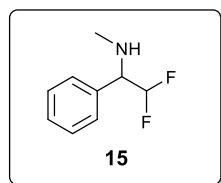
Rendimiento: 79% **R_f** (30% Et₂O/Hexano): 0.41

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 4.80 (td, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H), 5.76 (td, *J* = 57.0, 6.0 Hz, 1H), 7.41 (m, 5H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 73.7 (t, *J* = 24.0 Hz, CH), 115.9 (t, *J* = 244.5 Hz, CH), 127.2 (2CH), 128.8 (2CH), 129.1 (CH), 136.0 (t, *J* = 3.0 Hz, C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -127.5, -127.6

1-Fenil-2,2-difluoro-*N*-metiletan-1-amina (15)



Fórmula empírica: C₉H₁₁F₂N

Peso molecular: 171.19 g/mol

Aspecto: Aceite amarillo

Rendimiento: 10% **R_f** (20% AcOEt/Hexano): 0.45

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.35 (s, 3H), 3.81 (td, *J* = 11.3, 4.7 Hz, 1H), 5.79 (td, *J* = 56.3, 4.8 Hz, 2H), 7.31-7.44 (m, 5H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 34.4 (CH₃), 67.0 (t, *J* = 21.9 Hz, CH), 117.0 (t, *J* = 244.8 Hz, CH), 128.5 (2CH), 128.7 (CH), 128.8 (2CH), 135.7 (t, *J* = 2.3 Hz, C)

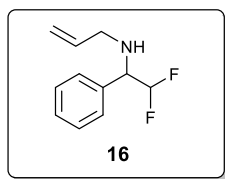
¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -124.5 (dd, *J* = 56.6, 11.4 Hz)

IR (NaCl): ν 3418, 1639, 1455, 1109, 1059, 760, 700 cm⁻¹

EMAR (ESI⁺, *m/z*): Calculada para [C₉H₁₂F₂N]⁺ [(M+H)]⁺: 172.0932; encontrada: 172.0933

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = +48.0 (*c* 0.5, CHCl₃, 99% ee (S)-15)

N-Alil-1-fenil-2,2-difluoroetan-1-amina (16)



Fórmula empírica: C₁₁H₁₃F₂N

Peso molecular: 197.23 g/mol

Aspecto: Aceite amarillo

Rendimiento: 10% **R_f** (20% AcOEt/Hexano): 0.63

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.81 (s, 1H), 3.09 (dd, *J* = 14.2, 6.7 Hz, 1H), 3.22 (dd, *J* = 14.1, 5.4 Hz, 1H), 3.98 (td, *J* = 11.5, 4.7 Hz, 1H), 5.14 (m, 2H), 5.62-6.01 (m, 2H), 7.31-7.44 (m, 5H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 49.6 (CH₂), 64.0 (t, *J* = 22.1 Hz, CH), 116.7 (CH₂), 117.1 (t, *J* = 243.6 Hz, CH), 128.5 (2CH), 128.6 (CH), 128.8 (2CH), 135.9 (t, *J* = 3.1 Hz, C), 136.1 (CH)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -124.4 (sistema AA'MX; A: ddd, *J* = 281.2, 56.8, 11.1 Hz; A': ddd, *J* = 281.3, 56.3, 12.0 Hz)

IR (NaCl): ν 3423, 2962, 2925, 2851, 1644, 1495, 1455, 1420, 1386, 1109, 1052, 922, 913, 737, 702 cm⁻¹

EMAR (ESI⁺, m/z): Calculada para [C₁₁H₁₄F₂N]⁺ [M+H]⁺: 198.1089; encontrada: 198.1084

CAPÍTULO 4

**Obtención estereoselectiva de fluorohidrinas
con una ADH proveniente de *Pichia glucozyma***

ANTECEDENTES

4.1.1. RELEVANCIA DE LAS FLUOROHIDRINAS

Las fluorohidrinas o β -fluoroalcoholes son una clase de compuestos organofluorados de gran importancia, especialmente en sus formas ópticamente activas, pues son intermedios clave en la síntesis de compuestos con variados perfiles biológicos. Entre ellos se encuentran análogos de esteroides como el caso de la Fludrocortisona,²¹³ (Figura 4.1a) o fármacos como el antiinflamatorio ocular Difluprednato (Figura 4.1b).²¹⁴ Otros fármacos conteniendo fragmentos de fluorohidrina son el Sofosbuvir (Figura 4.1c), empleado para el tratamiento de la hepatitis C,²¹⁵ antiepilépticos²¹⁶ como el mostrado en la Figura 4.1d o antidepresivos como la Befloxatona (Figura 4.1e).²¹⁷ Asimismo, también se han descrito ejemplos de algunas fluorohidrinas derivadas de alcaloides²¹⁸ o carbohidratos,²¹⁹ e incluso se han empleado en la síntesis de cristales líquidos,²²⁰ demostrando su versatilidad y aplicabilidad en áreas como la química medicinal o la química de materiales.

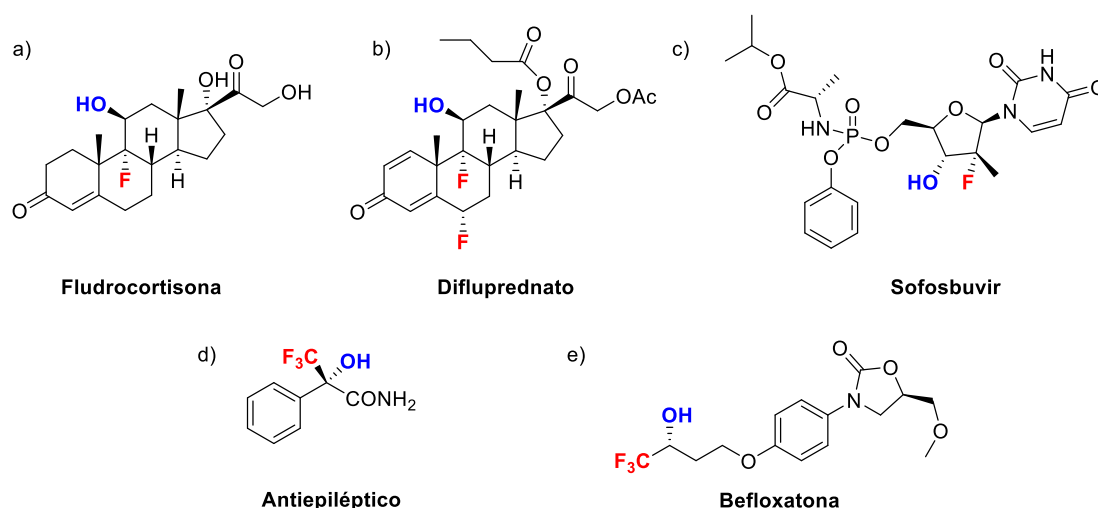


Figura 4.1. Compuestos de interés biológico conteniendo la subunidad fluorohidrina.

²¹³ J. Fried, E. F. Sabo, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 1455-1456.

²¹⁴ (a) L. Mulki, C. S. Foster, *Drugs Today* **2011**, 47, 327-333; (b) K. N. Jamal, D. G. Callanan, *Clin. Ophthalmol.* **2009**, 3, 381-390.

²¹⁵ A. Yancey, A. Armbruster, S. Tackett, *J. Pharm. Technol.* **2015**, 31, 29-37.

²¹⁶ H. A. Schenck, P. W. Lenkowski, I. Choudhuri-Mukherjee, S.-H. Ko, J. P. Stables, M. K. Patel, M. L. Brown, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 979-993.

²¹⁷ J. Wouters, F. Moureau, G. Evrard, J.-J. Koenig, S. Jegham, P. George, F. Durant, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 1683-1693.

²¹⁸ V. Chagnault, M.-P. Jouannetaud, J.-C. Jacquesy, J. Marrot, *Tetrahedron* **2006**, 62, 10248-10254.

²¹⁹ (a) A. J. Cresswell, S. G. Davies, J. A. Lee, M. J. Morris, P. M. Roberts, J. E. Thomson, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 7262-7281; (b) J.-L. Chen, F. Zheng, Y. Huang, F.-L. Qing, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 6525-6533.

²²⁰ (a) N. Al-Maharik, P. Kirsch, A. M. Z. Slawin, D. B. Cordes, D. O'Hagan, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 9974-9980; (b) M. Nicoletti, M. Bremer, P. Kirsch, D. O'Hagan, *Chem. Commun.* **2007**, 5075-5077.

4.1.2. SÍNTESIS DE FLUOROHIDRINAS ÓPTICAMENTE ACTIVAS

La aplicación de métodos químicos no enzimáticos, así como el empleo de biocatalizadores ha permitido acceder a lo largo de las últimas décadas a diversos tipos de fluorohidrinas en forma ópticamente activa.²²¹ De entre las metodologías no enzimáticas destacan diversas estrategias altamente selectivas,^{72c} como la apertura de epóxidos racémicos o de sus formas *meso*²²² y la reducción de α -fluorocetonas.²²³ Más recientemente, las biotransformaciones se han consolidado como una potente herramienta en síntesis asimétrica, debido a sus altos niveles de selectividad trabajando en condiciones de reacción suaves y benignas con el medio ambiente. A continuación se destacarán algunos de los métodos recientes de síntesis química de fluorohidrinas tanto no enzimáticos como biocatalíticos descritos en la bibliografía, haciendo especial hincapié en estas últimos, objetivo de este capítulo de la Tesis Doctoral.

4.1.2.1. Metodologías químicas no enzimáticas

Hanquet y colaboradores han desarrollado una metodología eficiente para la obtención de α,α -difluoro- β -hidroxisulfóxidos a partir del α,α -difluorometil *p*-toluensulfóxido (Esquema 4.1a).²²⁴ Este proceso transcurrió a baja temperatura empleando la denominada superbase de Schwesinger (P_4t -Bu) que condujo a la formación del anión reactivo (*p*-toluenosulfinilo)difluorometilo. Su posterior reacción con diferentes aldehídos y cetonas dio lugar a los α,α -difluoro- β -hidroxisulfóxidos, los cuales fueron precursores adecuados de los β,β -difluoroalcoholes.

Otros métodos de síntesis recientes describen el uso de catalizadores de iridio. Por ejemplo, Wen y colaboradores, han combinado la hidrogenación de α -fluorocetonas catalizada por un complejo de iridio con una estrategia de resolución cinética dinámica en medio básico en presencia de 2-propanol e hidrógeno (Esquema 4.1b).²²⁵ De esta manera, se ha descrito la síntesis de una serie de fluorohidrinas quirales a temperatura ambiente. Por otro lado, Andersson y colaboradores han empleado un complejo de iridio de tipo azabicyclo tiazol-fosfina, para la síntesis de fluorohidrinas mediante procesos de hidrogenación asimétrica a partir de alcoholes fluorados alílicos (Esquema

²²¹ G. Haufe, *J. Fluor. Chem.* **2004**, 125, 875-894.

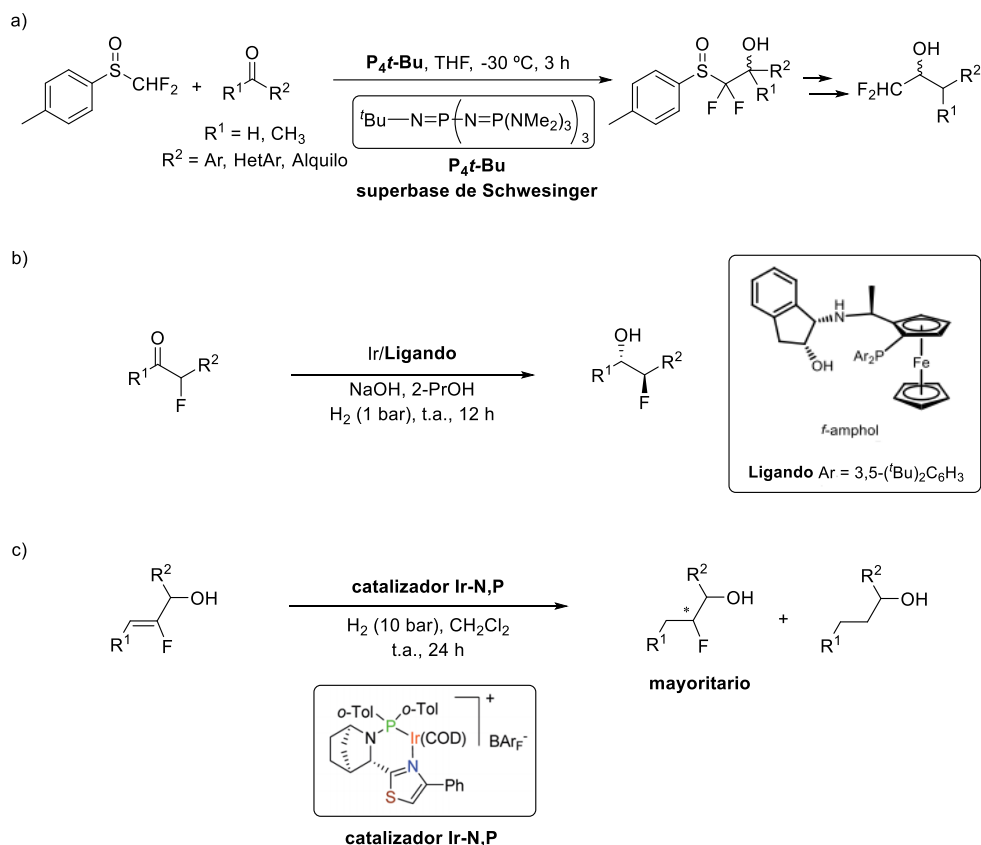
²²² (a) C. Hollingworth, V. Gouverneur, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 2929-2942; (b) J. A. Kalow, A. G. Doyle, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 3268-3269.

²²³ P. K. Mohanta, T. A. Davis, J. R. Gooch, R. A. Flowers, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 11896-11897.

²²⁴ C. Batisse, A. Panossian, G. Hanquet, F. R. Leroux, *Chem. Commun.* **2018**, 54, 10423-10426.

²²⁵ X. Tan, W. Zeng, J. Wen, X. Zhang, *Org. Lett.* **2020**, 22, 7230-7233.

4.1c).²²⁶ Una de las ventajas de esta metodología es que apenas se observó el correspondiente producto de desfluoración como reacción secundaria, lo cual resulta ser uno de los problemas recurrentes en las reacciones de hidrogenación de fluoruros de alqueno.



Esquema 4.1. Metodologías químicas para obtener alcoholes fluorados ópticamente activos.

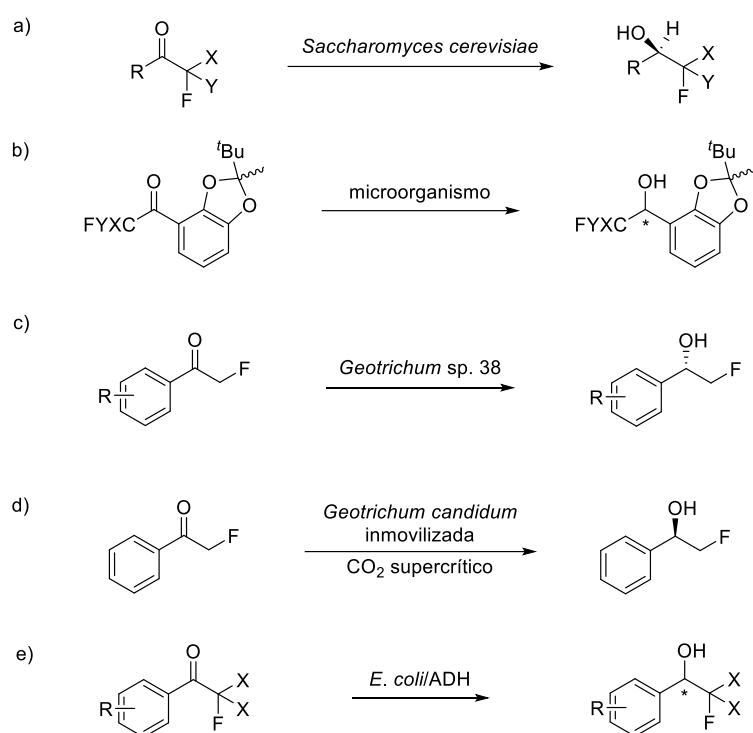
4.1.2.2. Biotransformaciones

Por lo que respecta al empleo de enzimas en la síntesis asimétrica de fluorohidrinas, la reacción más estudiada tradicionalmente ha sido la biorreducción de α -fluorocetonas proquirales. Las primeras reacciones catalizadas por enzimas de la clase de las oxidorreductasas se realizaron empleando biocatalizadores en forma de células enteras. Por ejemplo, la levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) ha sido utilizada en la reducción de diversas α -fluorocetonas (mono-, di- y trihalogenadas) para dar lugar a un conjunto de fluorohidrinas quirales de configuración *R* con diferentes enantioselectividades (50-94% *ee*) en función del número de átomos de halógeno

²²⁶ S. Ponra, J. Yang, H. Wu, W. Rabten, P. G. Andersson, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 11189-11194.

existentes en el carbono en α al grupo carbonilo de la cetona de partida (Esquema 4.2a).²²⁷

Sugai y colaboradores han descrito la biorreducción de α -fluorocetonas proquirales empleando ciertos microorganismos como levaduras y hongos en forma de células enteras para catalizar la reducción de compuestos racémicos como la 1-(2-*tert*-butil-2-metil-1,3-benzodioxol-4-il)-2,2-difluoroetan-1-ona y la 1-(2-*tert*-butil-2-metil-1,3-benzodioxol-4-il)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (Esquema 4.2b).²²⁸ De entre todos los microorganismos estudiados, los mejores resultados fueron obtenidos con *Pichia angusta* y *Geotrichum candidum*, que además mostraron estereopreferencias opuestas.



Esquema 4.2. Biorreducciones de α -fluorocetonas catalizadas por oxidorreductasas.

Dentro del mismo género de hongos, Lin y colaboradores han empleado el hongo *Geotrichum* sp. 38 para reducir α -halocetonas aromáticas obteniendo las halohidrinatas de configuración anti-Prelog (Esquema 4.2c),²²⁹ lo cual es una ventaja ya que la mayoría de estas enzimas dan lugar a los alcoholes de configuración opuesta. Entre las cetonas halogenadas estudiadas se encontraba la α -fluoroacetofenona, la cual se transformó hacia el correspondiente alcohol con buen rendimiento (80%) y exceso enantiomérico

²²⁷ B. Barkakaty, Y. Takaguchi, S. Tsuboi, *Tetrahedron* **2007**, 63, 970-976.

²²⁸ C. Abe, T. Sugawara, T. Machida, T. Higashi, K. Hanaya, M. Shoji, C. Cao, T. Yamamoto, T. Matsuda, T. Sugai, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, 82, 86-91.

²²⁹ Z.-L. Wei, Z.-Y. Li, G.-Q. Lin, *Tetrahedron* **1998**, 54, 13059-13072.

moderado (75%). De manera similar, Nakamura y colaboradores emplearon el microorganismo *Geotrichum candidum* APG4 para la síntesis de alcoholes fluorados ópticamente puros.²³⁰ Así, partiendo de monofluoro, difluoro y trifluorometilcetonas y empleando el enzima tanto en forma de células enteras como parcialmente purificado, se obtuvieron los correspondientes alcoholes quirales en algunos casos con excelentes excesos enantioméricos, ocurriendo una inversión en la configuración de los alcoholes dependiendo del número de átomos de flúor en la posición α a la cetona. Así, en el caso de la α -fluoroacetofenona, se obtuvo la (*R*)-fluorohidrina enantiopura con un rendimiento del 93%. Sin embargo, cuando se purificó uno de los enzimas responsables de este proceso, se observó que dio lugar al alcohol de configuración contraria con alto rendimiento (91%) y también de manera enantiopura. Las células enteras de este mismo microorganismo fueron inmovilizadas resultando activas en condiciones de CO₂ supercrítico (100 MPa) a una temperatura de 35 °C (Esquema 4.2d).²³¹ Entre las cetonas estudiadas se encontraba de nuevo la α -fluoroacetofenona, obteniéndose el alcohol de configuración *R* con un *ee* del 96%.

Por otro lado, tras el descubrimiento y la aplicación de procesos de sobreexpresión de enzimas en organismos huésped como la *E. coli*, cabe mencionarse el trabajo desarrollado en nuestro grupo de investigación^{123b} (Esquema 4.2e) en el cual se desarrolló exitosamente la biorreducción de α -fluorocetonas a altas concentraciones de sustrato (hasta 500 mM), accediendo a ambos enantiómeros de la misma fluorohidrina empleando ADHs de selectividad opuesta (*E. coli*/ADH-A, dando lugar a los alcoholes de configuración *R*, y *E. coli*/LBADH, que produjo las halohidrininas de configuración *S*). Como ya se ha comentado en los antecedentes del Capítulo 3 (Sección 3.1.4), debido a que la biorreducción de α -halocetonas se encuentra favorecida termodinámicamente, no fue necesario añadir un elevado exceso del donador de hidrógeno (2-propanol).

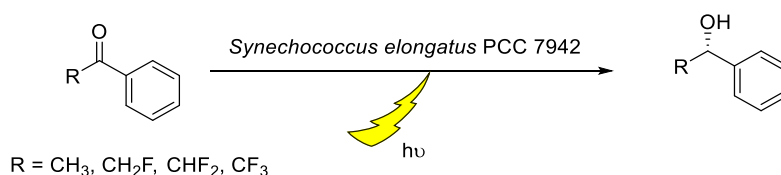
Los ejemplos descritos anteriormente empleaban oxidorreductasas provenientes de levaduras u hongos, pero un caso atípico es el mostrado en el Esquema 4.3, donde Nakamura y Yamanaka redujeron la acetofenona y varios análogos fluorados en posición α empleando la cianobacteria *Synechococcus elongatus* en presencia de luz.²³² De este modo, la energía lumínica pudo regular la selectividad de la reacción

²³⁰ T. Matsuda, T. Harada, N. Nakajima, T. Itoh, K. Nakamura, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 157-163.

²³¹ T. Matsuda, T. Harada, K. Nakamura, *Chem. Commun.* **2000**, 1367-1368.

²³² K. Nakamura, R. Yamanaka, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, 13, 2529-2533.

induciendo un incremento en la actividad del enzima responsable de la biorreducción, dando lugar a las fluorohidrinas de configuración *R*. Para los casos de la α -fluoroacetofenona y la 2,2-difluoroacetofenona, tanto la conversión como los excesos enantioméricos mejoraron de manera notable en presencia de la luz. Para el caso de la reducción de la 2,2,2-trifluoroacetofenona, el uso de la luz mejoró el rendimiento del proceso, aunque no tanto el *ee* obtenido. Esta transformación se puede considerar el primer ejemplo descrito de reducción asimétrica de cetonas en condiciones fotocatalíticas, disciplina de gran aplicación en la actualidad.²³³

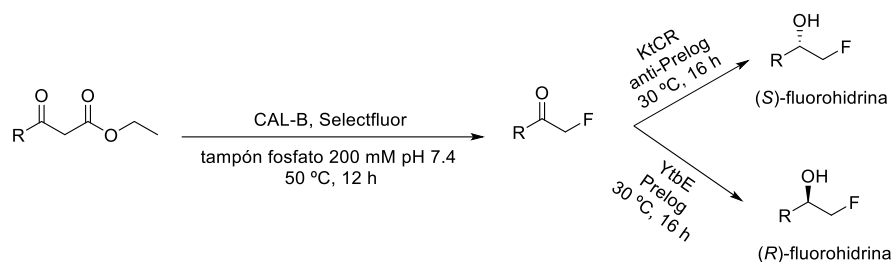


Esquema 4.3. Reducción de acetofenonas fluoradas empleando una cianobacteria irradiada con luz.

Por otra parte, en el trabajo desarrollado por Wu y colaboradores, la acción consecutiva de dos biocatalizadores como una lipasa y una cetorreductasa permitió sintetizar β -fluoroalcoholes ópticamente activos en un proceso que consta de 3 etapas (Esquema 4.4).²³⁴ Inicialmente los β -cetoésteres fueron hidrolizados en medio acuoso empleando una lipasa (CAL-B) para dar lugar a los β -cetoácidos, los cuales en presencia de Selectfluor dieron lugar a un proceso de fluoración descarboxilativa. Posteriormente, las α -fluorocetonas se redujeron utilizando dos cetorreductasas de selectividad contraria para obtener los correspondientes alcoholes de manera enantiocomplementaria. De este modo, la carbonil reductasa de *Kluyveromyces thermotolerans* (KtCR) dio lugar a los alcoholes de configuración *S*, mientras que la aldo-ceto reductasa de *Bacillus* sp. ECU0013 (YtbE) permitió acceder a los alcoholes de configuración *R* con buenos rendimientos.

²³³ (a) F. F. Özgen, M. E. Runda, S. Schmidt, *ChemBioChem* **2021**, 22, 790-806; (b) L. Schmermund, V. Jurkaš, F. F. Özgen, G. D. Barone, H. C. Büchenschütz, C. K. Winkler, S. Schmidt, R. Kourist, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2019**, 9, 4115-4144; (c) J. A. Maciá-Agulló, A. Corma, H. Garcia, *Chem. Eur. J.* **2015**, 21, 10940-10959.

²³⁴ J. Fan, Y. Peng, W. Xu, A. Wang, J. Xu, H. Yu, X. Lin, Q. Wu, *Org. Lett.* **2020**, 22, 5446-5450.



Esquema 4.4. Proceso secuencial en un mismo recipiente de 3 etapas para la síntesis asimétrica de fluorohidrininas a partir de β -cetoésteres.

Hasta ahora se han mostrado ejemplos prácticos de biorreducciones de α -fluorocetonas, pero también cabe destacar el estudio de modelización molecular de la carbonil reductasa de *Sporobolomyces salmonicolor* (SSCR) para la síntesis del 1-fenil-2,2,2-trifluoroetan-1-ol ópticamente activo, entre otros sustratos halogenados.²³⁵ En este trabajo se describe la posibilidad de afinar las interacciones entre los átomos de halógeno del sustrato y los aminoácidos del centro activo de la proteína para ayudar a producir variantes del enzima, las cuales podrían emplearse para la síntesis eficiente de β -haloalcoholes.

4.1.3. ALCOHOL DESHIDROGENASA DE *PICHIA GLUCOZYMA*

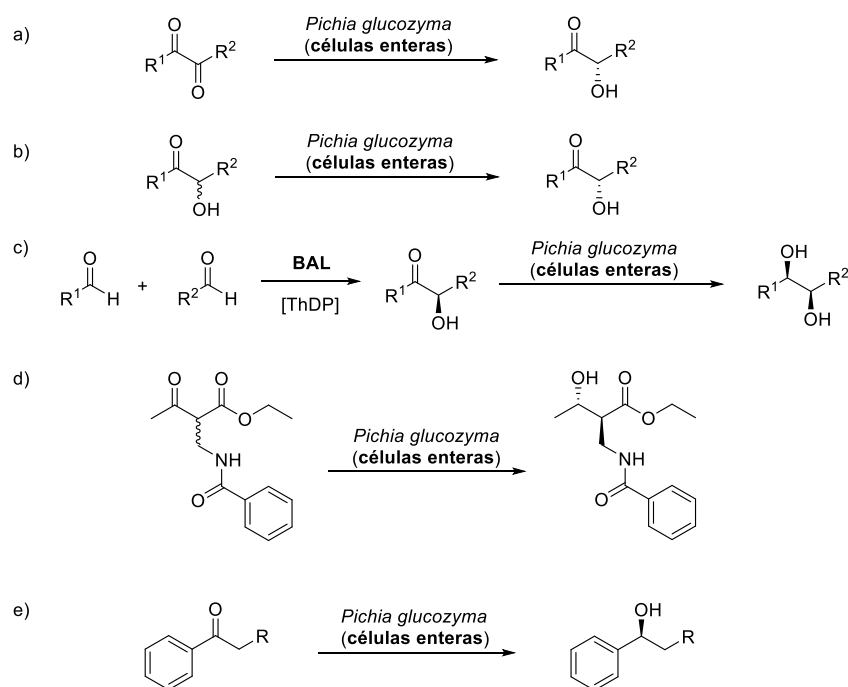
Puesto que en este capítulo se empleará la alcohol deshidrogenasa de *Pichia glucozyma* (KRED1-Pglu), aislada por el grupo del Profesor Francesco Molinari, se describirán a continuación sus posibilidades sintéticas en función de que este enzima haya sido empleado en preparaciones de células enteras o en forma recombinante, así como las principales características de este biocatalizador.

4.1.3.1. Células enteras

A continuación se resumen distintas aplicaciones de la levadura de *Pichia glucozyma* como catalizador aplicado en síntesis orgánica en la reducción de compuestos con sustituyentes voluminosos a ambos lados del grupo carbonilo, entre los que se encuentran 1,2-(hetero)diariletano-1,2-dionas, benzoínas, cetoésteres o cetonas aromáticas.

²³⁵ X. Chen, H. Zhang, J. Feng, Q. Wu, D. Zhu, *ACS Catal.* **2018**, 8, 3525-3531.

Molinari, Alcántara y colaboradores describieron el uso de células liofilizadas de la levadura *Pichia glucozyma* CBS 5766 para la reducción estereoselectiva de 1,2-(hetero)diariletano-1,2-dionas (2 mM) obteniendo conversiones generalmente elevadas hacia la formación de las benzoínas de configuración *S* (7-99%) con selectividades de moderadas a excelentes (57-99% *ee*, Esquema 4.5a).²³⁶ Los mismos autores consiguieron mejorar el sistema catalítico empleando cosolventes orgánicos hidrofóbicos como el *n*-heptano o el isooctano (50% v/v), desarrollando las reducciones de las 1,2-(hetero)diariletano-1,2-dionas con mejores resultados y siendo además posible la desracemización de varias benzoínas racémicas (58-99% *ee*, Esquema 4.5b).²³⁷



Esquema 4.5. Aplicaciones sintéticas de células enteras de *Pichia glucozyma* CBS 5766.

Müller y colaboradores han desarrollado una metodología biocatalítica para obtener dioles ópticamente activos de configuración relativa *syn*, relativamente difíciles de obtener mediante procesos no enzimáticos. Este método consta de dos pasos (Esquema 4.5c), comenzando con la condensación benzoínica entre dos aldehídos catalizada por una benzaldehído liasa (BAL) dependiente de tiamina difosfato (ThDP), que permitió acceder a las correspondientes (*R*)-2-hidroxicetonas. Estos productos, una

²³⁶ P. Hoyos, G. Sansottera, M. Fernández, F. Molinari, J. V. Sinisterra, A. R. Alcántara, *Tetrahedron* **2008**, 64, 7929-7936.

²³⁷ M. C. Fragnelli, P. Hoyos, D. Romano, R. Gandolfi, A. R. Alcántara, F. Molinari, *Tetrahedron* **2012**, 68, 523-528.

vez aislados, fueron reducidos posteriormente en presencia de células enteras de *Pichia glucozyma* para obtener los *syn*-dioles con rendimientos de moderados a buenos (52-82%) y excesos diastereoméricos altos (>90% *ed*).²³⁸

Por otro lado, Gandolfi y colaboradores estudiaron el comportamiento de 12 microorganismos en la reducción de un β -cetoéster α -sustituido, como es el 2-(benzamidometil)-3-oxobutanoato de etilo (4 g/L, Esquema 4.5d).²³⁹ De entre las diferentes levaduras estudiadas, la *Pichia glucozyma* mostró los mejores excesos diastereoméricos, con predominio de la formación del estereoisómero de configuración *anti*. Tras la optimización de las condiciones de reacción fue posible obtener el β -hidroxiéster α -sustituido de configuración (2*S*,3*S*) con muy buen exceso diastereomérico (86% *ed*) y enantiomérico (>99% *ee*), minimizando la formación de productos derivados de reacciones secundarias asociadas al uso de células enteras, como pueda ser la hidrólisis del grupo éster y la posible posterior descarboxilación espontánea del ácido carboxílico.

Romano y colaboradores también han estudiado la reactividad de cetoésteres empleando la levadura de *Pichia glucozyma* CBS 5766 para llevar a cabo la biorreducción de β y γ -cetoésteres, observándose selectividades más bajas para la formación de los γ -hidroxiésteres con respecto a sus análogos β . Es importante reseñar que debido a la existencia de esterasas activas en las células, se tuvo que modular su acción catalítica seleccionando las condiciones óptimas para las biorreducciones. Sin embargo, estos preparados enzimáticos podrían ser útiles para reacciones en cascada que posibiliten, por ejemplo, la hidrólisis de un grupo éster una vez que se obtengan los hidroxiésteres quirales en el proceso de reducción. En este estudio también se incluyeron distintas cetonas aromáticas (20 mM, R= H, Me, Et o *n*-Pr, Esquema 4.5e) alcanzando conversiones entre muy buenas y excelentes (90-97%) así como estereoselectividades excelentes (>96% *ee*) hacia la formación de los alcoholes de configuración *S*.²⁴⁰

²³⁸ S. M. Husain, T. Stillger, P. Dünkelfmann, M. Lödige, L. Walter, E. Breitling, M. Pohl, M. Bürchner, I. Krossing, M. Müller, D. Romano, F. Molinari, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2359-2362.

²³⁹ R. Gandolfi, E. Cesarotti, F. Molinari, D. Romano, I. Rimoldi, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 411-414.

²⁴⁰ M. L. Contente, F. Molinari, P. Zambelli, V. De Vitis, R. Gandolfi, A. Pinto, D. Romano, *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 7051-7053.

4.1.3.2. KRED1-Pglu recombinante

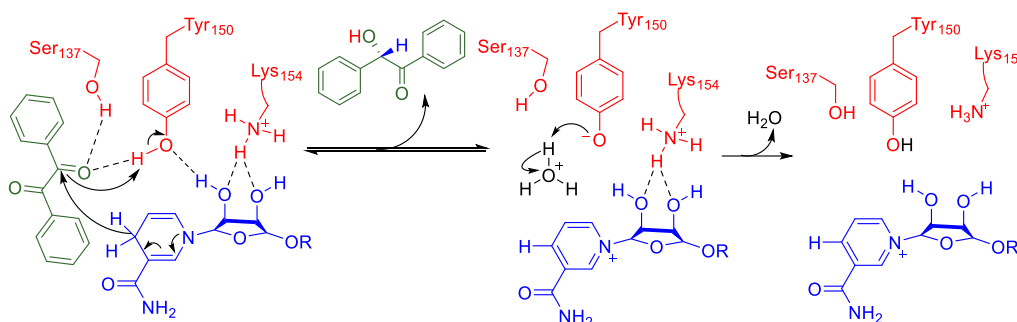
En los ejemplos expuestos anteriormente, en los cuales se emplearon células enteras de *Pichia glucozyma*, se han descrito las biorreducciones de diversas (di)cetonas, hidroxicetonas y cetoésteres, principalmente. Sin embargo, la pureza óptica de los alcoholes obtenidos se veía interferida por la presencia de otras cetorreductasas existentes dentro del microorganismo, e incluso se observaron otro tipo de reacciones, especialmente hidrolíticas, cuando se encontraban presentes otros grupos funcionales dentro de la molécula. Con estos precedentes, Romano y colaboradores analizaron el genoma de esta levadura identificando la proteína responsable de estas reacciones (KRED1-Pglu) como una bencilo reductasa dependiente de NADP perteneciente a la familia de las alcohol deshidrogenasas de cadena corta. Tras su clonación en *E. coli*, emplearon el enzima recombinante para desarrollar biorreducciones de diversas alquil aril cetonas, obteniendo una inversión de la configuración del alcohol obtenido dependiendo de la longitud de la cadena alifática. Así, a través de un estudio de modelización molecular,²⁴¹ llegaron a la conclusión de que la orientación de estos sustratos variaba en función de la longitud de dicha cadena, lo cual definía la estereoquímica de la reacción. Esto era debido principalmente a impedimentos estéricos con alguno de los aminoácidos del centro activo. De este modo, la acetofenona y la propiofenona eran reducidas para obtener los alcoholes de configuración *R* (anti-Prelog), mientras que la butirofenona daba lugar al alcohol de configuración contraria.

Otro estudio de modelización molecular más reciente desarrollado por Molinari y colaboradores,²⁴² ha descrito el centro activo de esta proteína, donde se observó que al igual que sucede con otras cetorreductasas, contenía tres aminoácidos principales. Dos de ellos (Ser137 y Tyr150) actúan como donadores de hidrógeno permitiendo el posicionamiento y estabilización de la cetona sustrato, lo que facilita el ataque del hidruro del NADPH normalmente por la cara *Re* de la cetona. El último aminoácido esencial es un residuo de lisina (Lys154), cuya función es formar enlaces de hidrógeno con el cofactor pirimidínico, lo que favorece la generación de la función alcohólica. Por tanto, basándose en la similitud con otras enzimas, los autores han propuesto un mecanismo de reacción que se muestra en el Esquema 4.6, donde los aminoácidos del

²⁴¹ M. L. Contente, I. Serra, M. Brambilla, I. Eberini, E. Gianazza, V. De Vitis, F. Molinari, P. Zambelli, D. Romano, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 193-201.

²⁴² M. Rabuffetti, P. Cannazza, M. L. Contente, A. Pinto, D. Romano, P. Hoyos, A. R. Alcantara, I. Eberini, T. Laurenzi, L. Gourlay, F. Di Pisa, F. Molinari, *Bioorg. Chem.* **2021**, *108*, 104644.

centro activo Ser y Tyr forman sendos enlaces de hidrógeno con la cetona sustrato y posicionan el carbono proquiral por encima del NADPH. El siguiente paso es el ataque nucleófilo del hidruro, donde el intermediario oxianión es estabilizado de nuevo por los enlaces de hidrógeno formados con la Ser y la Tyr. Posteriormente se transfiere un protón de la Tyr al sustrato para formar el alcohol. Este paso está favorecido por el enlace de hidrógeno formado entre la ribosa del cofactor y los aminoácidos Lys y Tyr, lo que aumenta la acidez del grupo hidroxilo de la tirosina, facilitando la pérdida del protón, pudiendo estabilizar la carga negativa resultante del alcóxido generado. Finalmente, el residuo de Tyr se reprotona mediante la acción de una molécula de agua.

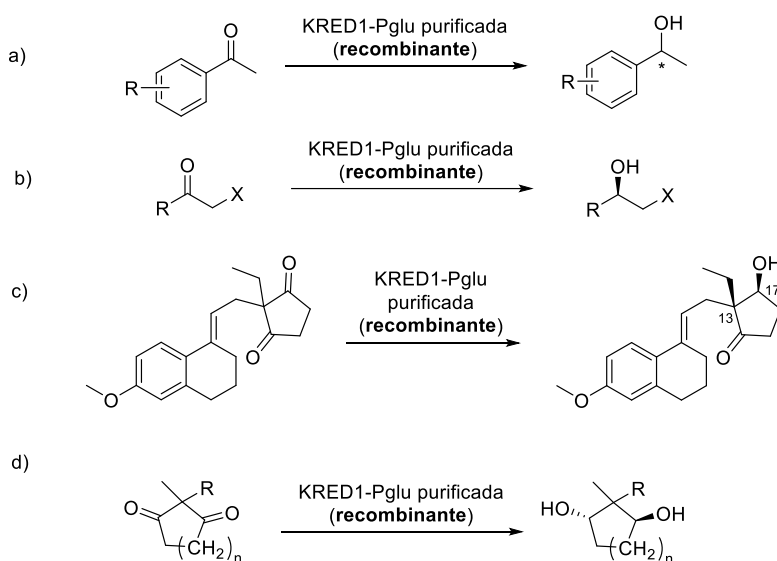


Esquema 4.6. Mecanismo propuesto para la reducción de la 1,2-difeniletano-1,2-diona catalizada por la KRED1-Pglu.

Tras la identificación y clonación de la KRED1-Pglu, se estudiaron las posibilidades sintéticas de esta proteína. De este modo en la investigación desarrollada por Romano y colaboradores se empleó este enzima purificado para llevar a cabo la reducción de varias acetofenonas monosustituídas en posiciones *orto*, *meta* o *para* del anillo aromático (1 g/L, Esquema 4.7a).²⁴³ Así, por un lado, en cuanto a la reactividad de los sustratos sustituidos en *meta* y *para*, se observó que se encontraba en concordancia con los efectos electrónicos descritos por los coeficientes de σ -Hammett ($\text{NO}_2 > \text{CN} > \text{CF}_3 > \text{F} > \text{H} > \text{Me} > \text{OMe} > \text{NH}_2$), mientras que para las acetofenonas sustituidas en *orto*, solo se observó cierta reactividad con los sustituyentes poco voluminosos como el átomo de flúor o el resto ciano. En cuanto a la estereoquímica de los alcoholes obtenidos llama la atención que fue posible obtener el (*R*)-1-feniletan-1-ol, sin embargo, cuando el anillo aromático estaba sustituido, los productos finales obtenidos fueron los 1-ariletan-1-oles de configuración *S*.

²⁴³ M. L. Contente, I. Serra, L. Palazzolo, C. Parravicini, E. Gianazza, I. Eberini, A. Pinto, B. Guidi, F. Molinari, D. Romano, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 3404-3408.

Este mismo grupo describió la capacidad de esta proteína purificada para llevar a cabo procesos de reducción asimétrica de α -cloro-, α -bromo-, α,α,α -trifluorocetonas y β -cetonitrilos (10 mM), obteniendo los correspondientes alcoholes (hetero)aromáticos con selectividad Prelog y altos niveles de pureza óptica (Esquema 4.7b).²⁴⁴ Una ventaja de este enzima es que puede ser utilizada de manera eficiente a diferentes pHs, lo cual ha permitido la reducción eficiente y limpia de estos sustratos evitando reacciones secundarias. Así, por ejemplo, la reducción de las cetonas α -halogenadas pudo llevarse a cabo a pH 5.0, evitando reacciones secundarias que pueden ocurrir a pHs más altos, como la sustitución del halógeno por una molécula de agua o la formación de epóxidos.



Esquema 4.7. Aplicaciones de la KRED1-Pglu recombinante purificada.

Como se ha comentado anteriormente, nos encontramos ante un enzima que acepta sustratos muy voluminosos, de lo que se ha sacado partido en la preparación de derivados de esteroides como es el caso del alcohol quiral derivado de la etil secodiona (Esquema 4.7c),²⁴⁵ precursora de un gran número de hormonas anticonceptivas. De entre todos los microorganismos y enzimas probados, la KRED1-Pglu purificada catalizó la formación del estereoisómero deseado (13R,17S), con los mejores resultados de estereoselectividad junto a la *Saccharomyces cerevisiae*, obteniéndose tras optimización de las condiciones de reacción (6.5 mM concentración de sustrato), un 56% de rendimiento aislado del producto enantiopuro.

²⁴⁴ M. L. Contente, I. Serra, F. Molinari, R. Gandolfi, A. Pinto, D. Romano, *Tetrahedron* **2016**, 72, 3974-3979.

²⁴⁵ M. L. Contente, F. Molinari, I. Serra, A. Pinto, D. Romano, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 1260-1263.

En otro trabajo más reciente, ha sido descrita la reducción asimétrica de 1,3-dicetonas cíclicas 2,2-disustituidas (28 mM) empleando la KRED1-Pglu recombinante purificada para obtener las β -hidroxicetonas y los dioles con una estereoselectividad excelente (Esquema 4.7d).²⁴⁶ Cabe destacar que en este estudio también se emplearon las células liofilizadas de *E. coli* DE3 Star sobreexpresando este enzima, permitiendo acceder a isómeros ópticos complementarios, debido a la acción de alguna de las alcohol deshidrogenasas endógenas del microorganismo huésped, hecho que se corroboró al utilizar las células de *E. coli* sin el plásmido que sobreexpresaba a la KRED1-Pglu.

En último lugar, Tamborini, Serra y colaboradores han llevado a cabo la reducción de compuestos tan variados como la 4-nitroacetofenona, 1-fenilpropano-1,2-diona, 1-fenilbutano-1,3-diona y la etil secodiona (3 mM) empleando un sistema formado por la KRED1-Pglu y la glucosa deshidrogenasa de *Bacillus megaterium* (BmGDH) co-inmovilizadas en un soporte de agarosa, posibilitando la preparación de los correspondientes alcoholes enantioenriquecidos en un sistema de flujo continuo y a escala preparativa. Se destacó el hecho de que este sistema catalítico funcionó correctamente durante 15 días, tolerando concentraciones de DMSO de hasta el 20% v/v.²⁴⁷

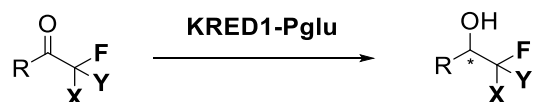
²⁴⁶ M. L. Contente, F. Dall'Oglio, F. Annunziata, F. Molinari, M. Rabuffetti, D. Romano, L. Tamborini, D. Rother, A. Pinto, *Catal. Lett.* **2020**, 150, 1176-1185.

²⁴⁷ F. Dall'Oglio, M. L. Contente, P. Conti, F. Molinari, D. Monfredi, A. Pinto, D. Romano, D. Ubiali, L. Tamborini, I. Serra, *Catal. Commun.* **2017**, 93, 29-32.

OBJETIVOS

La ADH de *Pichia glucozyma* ha sido descrita como un biocatalizador eficaz para la reducción estereoselectiva de cetonas aromáticas, pudiendo ser empleada en forma de células enteras o como enzima aislado tras su purificación. Por ello, y dada la importancia de las fluorohidrinas, en este capítulo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- Estudiar la biorreducción catalizada por la KRED1-Pglu sobreexpresada en *E. coli* BL21 DE3 Star de diversas cetonas (hetero)aromáticas y alifáticas α -fluoradas (Esquema 4.8), intentando optimizar los parámetros de reacción que afectan a la catálisis enzimática con el fin de lograr buenas conversiones y selectividades.



Esquema 4.8. Biorreducción de cetonas halogenadas en posición α empleando la ADH de *Pichia glucozyma*.

- Examinar las posibilidades sintéticas de este enzima, explorando no solo la biorreducción de α -fluorocetonas aromáticas sino también otras cetonas que por ejemplo contengan: (a) otros halógenos como el cloro; (b) más de un átomo de flúor en posición α al grupo carbonilo; (c) cetonas de estructura variable con sustratos heteroaromáticos, alifáticos o que contengan grupos éster.
- Corroborar que las selectividades provienen de la ADH de *Pichia glucozyma* y no de ADHs endógenas del propio microorganismo huésped.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Puesto que en este capítulo procederemos a estudiar las reacciones de reducción enzimática con la KRED1-Pglu, orientado a la síntesis de halohidrinas quirales (fluorohidrinas principalmente), se abordará en primer lugar la síntesis química de una serie de α -halocetonas de interés. Por otro lado, se llevará a cabo la reducción no selectiva de las cetonas halogenadas (Figura 4.2), con el objetivo de obtener las correspondientes halohidrinas racémicas (Figura 4.3) para el desarrollo de los métodos analíticos por cromatografía de gases en fase estacionaria aquiral y quiral. Finalmente, las reducciones enzimáticas podrán ser monitorizadas para estudiar las transformaciones de las cetonas en las halohidrinas (conversión), así como la estereoselectividad de los procesos (exceso enantiomérico).

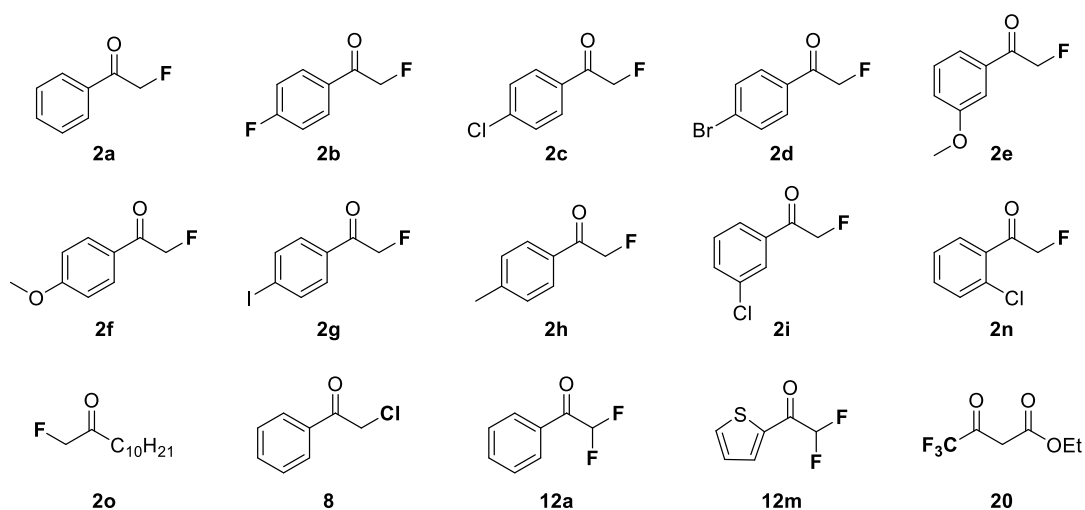
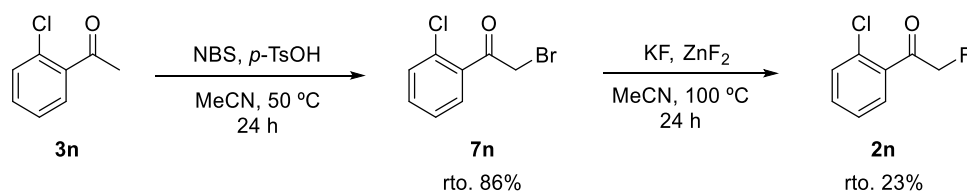


Figura 4.2. Cetonas α -halogenadas objeto de estudio en este capítulo.

4.3.1. SÍNTESIS QUÍMICA DE LAS FLUOROCETONAS

4.3.1.1. Síntesis de la 1-(2-clorofenil)-2-fluoroetan-1-ona (2n)

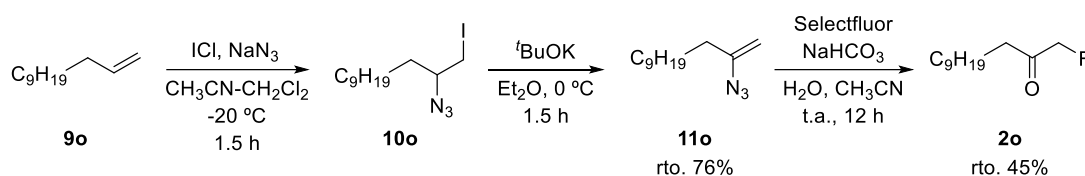
Además de emplear las α -fluorocetonas **2a-f** (R= H, 4-F, 4-Cl, 4-Br, 3-OMe y 4-OMe, Esquema 1.13) y **2g-i** (R= 4-I, 4-CH₃ y 3-Cl, Esquema 2.8) descritas en los Capítulos 1 y 2, la cetona fluorada **2n** (Esquema 4.9) fue incorporada al panel de sustratos. Así, se llevó a cabo la bromación de la *o*-cloroacetofenona (**3n**) empleando NBS, obteniendo la cetona bromada **7n** con un rendimiento del 86%. Este compuesto se transformó a continuación en la cetona **2n** con un rendimiento del 23% a través de una reacción de sustitución nucleófila y posterior purificación mediante columna cromatográfica en gel de sílice.^{123b}



Esquema 4.9. Síntesis de la α -fluorocetona **2n**.

4.3.1.2. Síntesis de la 1-fluorododecan-2-ona (**2o**)

Para llevar a cabo la síntesis del compuesto alifático **2o**, se utilizó una secuencia sintética de tres pasos que se muestra en el Esquema 4.10, y que ya fue utilizada en el Capítulo 2 para la síntesis de la α -fluoropropiofenona (**2j**).



Esquema 4.10. Síntesis de la 1-fluorododecan-2-ona **2o**.

La reacción a baja temperatura del dodec-1-eno (**9o**) con azida de sodio y cloruro de yodo condujo al 2-azido-1-yodododecano (**10o**), el cual una vez aislado tras evaporación del disolvente, fue tratado con *tert*-butóxido de potasio en dietiléter a 0 °C, obteniendo tras un proceso de eliminación el 2-azidododec-1-eno (**11o**) con un rendimiento del 76% tras una simple filtración en celita. En un último paso, se llevó a cabo la reacción de fluoración, en la cual se hizo reaccionar a la mencionada azida con Selectfluor en presencia de bicarbonato de sodio y agua, usando acetonitrilo como disolvente, dando lugar a la 1-fluorododecan-2-ona **2o** con un rendimiento del 45% tras purificación cromatográfica en gel de sílice.¹⁶⁵

4.3.2. SÍNTESIS DE LAS HALOHIDRINAS RACÉMICAS

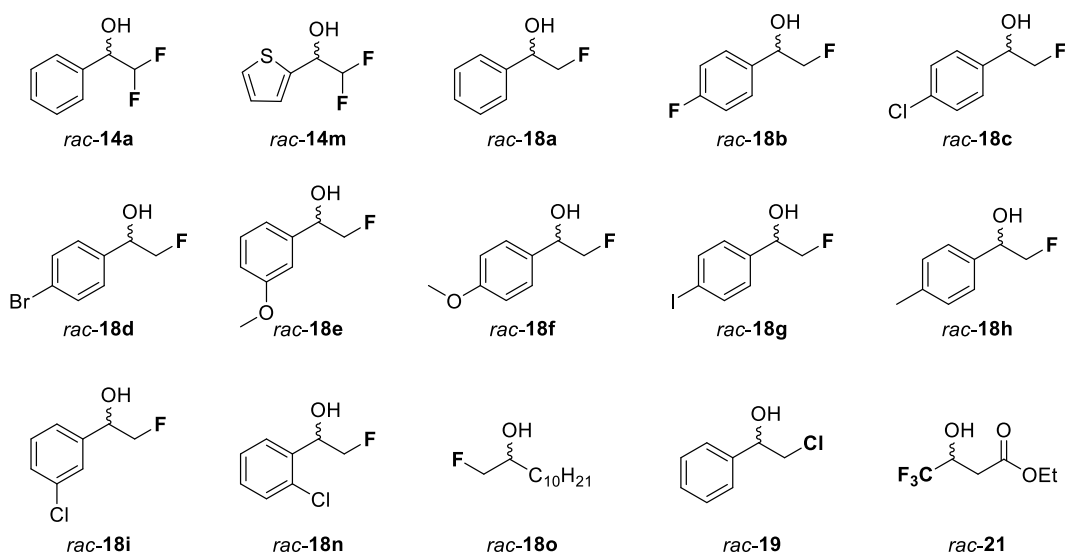
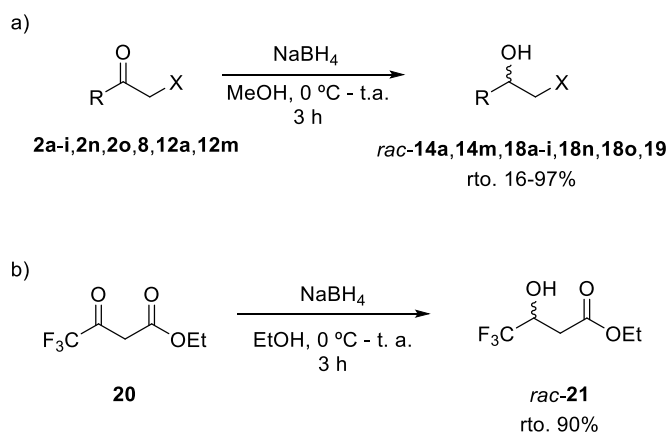


Figura 4.3. Halohidrinras racémicas objeto de estudio en este capítulo.

Finalmente, se sintetizaron los alcoholes racémicos **14a**, **14m**, **18a-i**, **18n**, **18o**, **19** y **21** partiendo de las cetonas halogenadas **2a-i**, **2n**, **2o**, **8**, **12a**, **12m** y **20** llevando a cabo su reducción con borohidruro de sodio (NaBH_4) y metanol como disolvente (etanol para el caso del cetoéster **20** con el fin de evitar productos de transesterificación). Así, tras adición del agente reductor a 0°C y reacción a temperatura ambiente durante 3 h, se obtuvieron los alcoholes con rendimientos comprendidos entre el 16 y el 97% (Esquema 4.11).

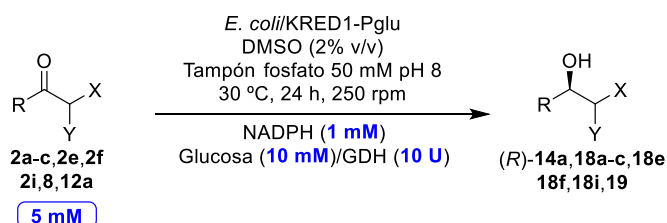


Esquema 4.11. Síntesis de los alcoholes racémicos: a) **14a**, **14m**, **18a-i**, **18n**, **18o** y **19**; b) **21**.

4.3.3. ESTUDIOS INICIALES DE LA BIORREDUCCIÓN DE α -HALOCETONAS CON *E. COLI*/KRED1-Pglu

Para realizar estos primeros estudios se emplearon células liofilizadas de *E. coli* BL21 DE3 Star sobreexpresando de manera heteróloga a la KRED1-Pglu, proporcionadas por los grupos de la Prof. Dörte Rother (Forschungszentrum Jülich, Alemania) y el Prof. Francesco Molinari (Universidad de Milán, Italia).²⁴⁶ Aunque ya se conocía por estudios previos la reactividad de la α -bromo- (**7a**), la α -cloroacetofenona (**8**) y la 2,2,2-trifluoroacetofenona (**17**) con este enzima purificado,²⁴⁴ dada la importancia de las fluorohidrinas como ya se ha comentado en los antecedentes de este capítulo (Sección 4.1.1), nos pareció interesante conocer la reactividad de la KRED1-Pglu con una selección de cetonas fluoradas conteniendo distintos sustituyentes en el anillo aromático en posiciones *meta* y *para* (Tabla 4.1). Como referencia se completó la selección de este primer panel de sustratos con la cetona **8**, y se añadió un sustrato difluorado como la 2,2-difluoroacetofenona (**12a**), para estudiar el efecto de la sustitución en la posición α al grupo carbonilo.

Tabla 4.1. Biorreducciones catalizadas por una preparación liofilizada de *E. coli*/KRED1-Pglu.



Entrada	Alcohol	R	X	Y	Conversión (%) ^a	ee (%) ^{b,c}
1	18a	Ph	F	H	>99	>99 (R)
2	18b	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	F	H	>99	>99 (R)
3	18c	<i>p</i> -Cl-C ₆ H ₄	F	H	>99	>99 (R)
4	18e	<i>m</i> -OMe-C ₆ H ₄	F	H	>99	>99 (R) ^d
5	18f	<i>p</i> -OMe-C ₆ H ₄	F	H	>99	>99 (R) ^d
6	18i	<i>m</i> -Cl-C ₆ H ₄	F	H	>99	>99 (R) ^d
7	19	Ph	Cl	H	>99	92 (R) ^d
8 ^e	19	Ph	Cl	H	94	95 (R)
9 ^f	14a	Ph	F	F	>99	>99 (R)

^a Conversiones medidas mediante CG con fase estacionaria aquiral. ^b Excesos enantioméricos medidos mediante CG con fase estacionaria quiral. ^c Cambio de la preferencia en la nomenclatura CIP. ^d Excesos enantioméricos de los derivados O-acetilados. ^e Utilizando el enzima purificado, referencia 244. ^f G6P/G6PDH como sistema de regeneración del cofactor.

Estas primeras pruebas fueron llevadas a cabo utilizando un medio de reacción similar al descrito previamente con este tipo de preparación enzimática.²⁴⁶ Así, se utilizó una disolución reguladora de fosfato 50 mM a pH 8, con un sistema de regeneración del

cofactor de glucosa/GDH añadiendo NADPH como cofactor, a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. Asimismo, se añadió un pequeño porcentaje de un cosolvente orgánico (DMSO, 2% v/v) para favorecer la solubilización de la cetona en el medio de reacción. Satisfactoriamente, la KRED1-Pglu sobreexpresada condujo a la reducción de las α -fluorocetonas **2a-c,e,f,i** (5 mM) con total conversión y selectividad independientemente de los sustituyentes en el anillo aromático (entradas 1 a 6). Además, la presencia de un átomo de halógeno más voluminoso en la posición α como el cloro no produjo efectos negativos en términos de conversión, si bien el exceso enantiomérico decreció hasta un 92% (entrada 7), hecho que ya se había descrito previamente cuando se utilizaba el enzima purificado (entrada 8).²⁴⁴ Por lo que respecta a la 2,2-difluoroacetofenona (**12a**, entrada 9), también ofreció un resultado excelente, aunque fue necesario cambiar el sistema de regeneración del cofactor a glucosa-6-fosfato y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ya que empleando el sistema de la glucosa/GDH se observó la formación del alcohol **14a** en la prueba en ausencia de la KRED1-Pglu (prueba en blanco). Puesto que la KRED1-Pglu es una ADH de tipo Prelog, los compuestos obtenidos deberían ser de configuración *S*, sin embargo, debido a la preferencia del halógeno al aplicar las reglas CIP, en todos los casos se obtuvieron las (*R*)-halohidrinas.

Aunque los resultados obtenidos fueron muy buenos en términos de conversión y selectividad, en vista de poder realizar las biorreducciones a una mayor concentración de sustrato, se decidió estudiar el efecto de un cosolvente orgánico en estos procesos. En base a resultados previos del grupo con respecto a su compatibilidad con otras oxidorreductasas,²⁴⁸ así como los obtenidos por otros grupos con la propia KRED1-Pglu,²⁴⁶ se decidió añadir una pequeña cantidad de TBME como cosolvente al medio de reacción para ver su efecto tanto en la selectividad del proceso como en la actividad del enzima (Tabla 4.2). Sin embargo, en la mayoría de los casos su adición tuvo un efecto negativo, ya que únicamente se alcanzó conversión completa para tres de los sustratos (entradas 3, 4 y 6) y los excesos enantioméricos disminuyeron, a excepción del 1-(4-clorofenil)-2-fluoroetan-1-ol (**18c**, entrada 3) y del 2-fluoro-1-(4-metoxifenil)etan-1-ol (**18f**, entrada 5). Especialmente para los derivados *meta* sustituidos **18e** y **18i** (entradas 4 y 6) y para el análogo difluorado **14a** (entrada 8) se observó un descenso muy acusado en la estereoselectividad del proceso.

²⁴⁸ (a) A. Díaz-Rodríguez, L. Martínez-Montero, I. Lavandera, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, 356, 2321-2329; (b) K. Kędziora, A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Green Chem.* **2014**, 16, 2448-2453.

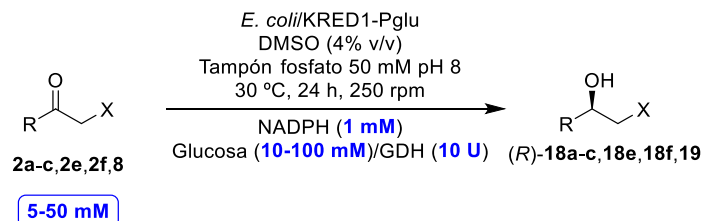
Tabla 4.2. Efecto del TBME en las biorreducciones catalizadas por la *E. coli*/KRED1-Pglu.

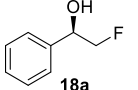
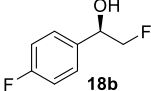
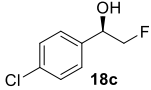
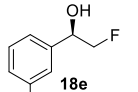
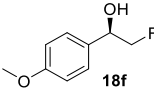
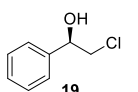
Entrada	Alcohol	R	X	Y	Conversión (%) ^a	ee (%) ^{b,c}
1	18a	Ph	F	H	75	96 (R)
2	18b	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	F	H	64	84 (R)
3	18c	<i>p</i> -Cl-C ₆ H ₄	F	H	>99	>99 (R)
4	18e	<i>m</i> -OMe-C ₆ H ₄	F	H	>99	52 (R) ^d
5	18f	<i>p</i> -OMe-C ₆ H ₄	F	H	30	>99 (R) ^d
6	18i	<i>m</i> -Cl-C ₆ H ₄	F	H	>99	78 (R) ^d
7	19	Ph	Cl	H	77	90 (R) ^d
8 ^e	14a	Ph	F	F	96	12 (R)

^a Conversiones medidas mediante CG con fase estacionaria aquiral. ^b Excesos enantioméricos medidos mediante CG con fase estacionaria quiral. ^c Cambio de la preferencia en la nomenclatura CIP. ^d Excesos enantioméricos de los derivados O-acetilados. ^e G6P/G6PDH como sistema de regeneración del cofactor.

4.3.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO

A continuación, se decidió elevar la concentración del sustrato con el fin de obtener una mejor productividad en las biorreducciones, así como estudiar el posible efecto que podría tener en la actividad del enzima. De esta manera, se consideró un intervalo variable entre 5 y 50 mM con algunas de las cetonas halogenadas ya estudiadas anteriormente (**2a-c, 2e, 2f, 8**, Tabla 4.3), ascendiendo hasta observar una disminución notable en la conversión del proceso. Evidentemente, no se varió ni la cantidad de la ADH ni de la GDH, mientras que se aumentó ligeramente la proporción de DMSO (4% v/v) y siempre se mantuvo una relación entre la cetona y la glucosa de 1 a 2 (mol:mol).

Tabla 4.3. Efecto de la concentración del sustrato en las biorreducciones de cetonas halogenadas catalizadas por una preparación liofilizada de *E. coli*/KRED1-Pglu.

Alcohol	Concentración (mM)	Conversión (%) ^a	ee (%) ^{b,c}
 18a	5	>99	>99 (R)
	10	>99	>99 (R)
	20	72	94 (R)
 18b	5	>99	>99 (R)
	10	>99	>99 (R)
	20	76	90 (R)
 18c	5	>99	>99 (R)
	10	>99	>99 (R)
	20	95	92 (R)
	30	85	88 (R)
 18e	5	>99	>99 (R) ^d
	10	>99	>99 (R) ^d
	20	99	76 (R) ^d
	30	76	54 (R) ^d
 18f	5	>99	>99 (R) ^d
	10	62	>99 (R) ^d
 19	5	>99	92 (R) ^d
	10	91	98 (R) ^d
	20	98	82 (R) ^d
	30	92	80 (R) ^d
	40	92	80 (R) ^d
	50	90	80 (R) ^d

^a Conversiones medidas mediante CG con fase estacionaria aquiral. ^b Excesos enantioméricos medidos mediante CG con fase estacionaria quirale. ^c Cambio de la preferencia en la nomenclatura CIP. ^d Excesos enantioméricos de los derivados O-acetilados.

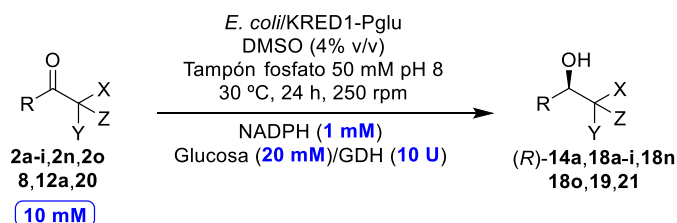
Si bien el aumento de concentración de 5 a 10 mM mantuvo los valores de conversión cuantitativa y excesos enantioméricos excelentes en la mayoría de los casos (a excepción de la cetona 2f), el incremento de la concentración del sustrato hasta 20 mM o mayores concentraciones provocó una disminución progresiva de ambos

parámetros, por lo que la concentración escogida para llevar a cabo las biorreducciones en los siguientes apartados fue 10 mM (resultados destacados en **negrita**).

4.3.5. EXTENSIÓN DE LA BIORREDUCCIÓN DE α -HALOCETONAS EMPLEANDO *E. COLI*/KRED1-Pglu

Una vez optimizadas las condiciones de reacción procedimos a ampliar el panel de sustratos con distintas α -fluorocetonas aromáticas sustituidas en las posiciones *orto*, *meta* y *para* del anillo aromático (**2a-i** y **2n**) y un sustrato de tipo alifático como la 1-fluorododecan-2-ona (**2o**). Se consideraron también compuestos con distinto número de átomos de flúor en el carbono adyacente al grupo carbonilo (**12a** y **20**), así como el tipo de halógeno (**8**).

Tabla 4.4. Biorreducciones de cetonas α -halogenadas catalizadas por la *E. coli*/KRED1-Pglu.



Entrada	Alcohol	R	X	Y	Z	Conversión (%) ^a	ee (%) ^{b,c}
1	18a	Ph	F	H	H	>99	>99 (R)
2	18b	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	F	H	H	>99	>99 (R)
3	18c	<i>p</i> -Cl-C ₆ H ₄	F	H	H	>99	>99 (R)
4	18d	<i>p</i> -Br-C ₆ H ₄	F	H	H	>99	92 (R)
5	18e	<i>m</i> -OMe-C ₆ H ₄	F	H	H	>99	>99 (R) ^d
6	18f	<i>p</i> -OMe-C ₆ H ₄	F	H	H	62	>99 (R) ^d
7	18g	<i>p</i> -I-C ₆ H ₄	F	H	H	>99	70 (R) ^d
8	18h	<i>p</i> -CH ₃ -C ₆ H ₄	F	H	H	67	92 (R)
9	18i	<i>m</i> -Cl-C ₆ H ₄	F	H	H	>99	>99 (R) ^d
10	18n	<i>o</i> -Cl-C ₆ H ₄	F	H	H	>99	>99 (R)
11	18o	C ₁₀ H ₂₁	F	H	H	>99	>99 (R) ^d
12	19	Ph	Cl	H	H	91	98 (R) ^d
13 ^e	14a	Ph	F	F	H	>99	>99 (R)
14	21	CH ₂ CO ₂ Et	F	F	F	67	90 (R)

^a Conversiones medidas mediante CG con fase estacionaria aquiral. ^b Excesos enantioméricos medidos mediante CG con fase estacionaria quiral. ^c Cambio de la preferencia en la nomenclatura CIP. ^d Excesos enantioméricos de los derivados O-acetilados. ^e G6P/G6PDH como sistema de regeneración del cofactor.

De los resultados obtenidos en la Tabla 4.4 podemos destacar los excelentes valores alcanzados con la KRED1-Pglu, en términos de conversión y pureza óptica, a la hora de llevar a cabo la biorreducción de cetonas aromáticas α -fluoradas. Por ejemplo,

es reseñable el efecto positivo de algunos sustituyentes halogenados en el anillo aromático, permitiendo la síntesis de las (*R*)-fluorohidrinas **18b**, **18c**, **18i** y **18n** (entradas 2, 3, 9 y 10) de manera cuantitativa y con excesos enantioméricos >99%.

Por otro lado, la obtención del (*R*)-1-(4-bromofenil)-2-fluoroetan-1-ol (*R*)-**18d** (entrada 4) y del (*R*)-2-fluoro-1-(4-yodofenil)etan-1-ol (*R*)-**18g** (entrada 7) no fue tan exitosa, puesto que los valores de selectividad cayeron hasta el 92% y el 70% *ee*, respectivamente. Además, la presencia en posición *para* del anillo aromático de grupos electrodonadores de tipo metoxi (entrada 6, **18f**) o metilo (entrada 8, **18h**) provocó una caída notable de la conversión hasta un 60%, decayendo también el exceso enantiomérico hasta el 92% en el caso del alcohol (*R*)-**18h**. Sin embargo, para el caso del (*R*)-2-fluoro-1-(3-metoxifenil)etan-1-ol (*R*)-**18e** (entrada 5), sustituido en la posición *meta*, la reacción procedió de manera excelente.

Además, este enzima demostró aceptar sustratos alifáticos, puesto que la conversión y selectividad fueron perfectas en la preparación del (*R*)-1-fluorododecan-2-ol (**18o**, entrada 11).

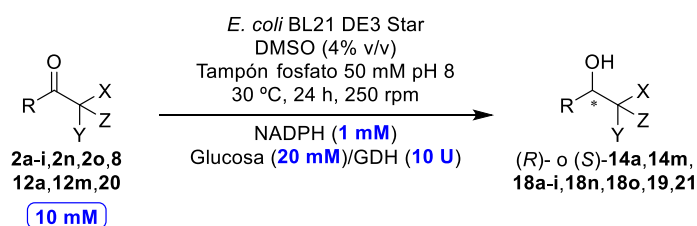
La introducción de un átomo de flúor adicional en el carbono adyacente al carbonilo no modificó el buen comportamiento del enzima (entrada 13), obteniéndose el compuesto (*R*)-**14a** enantiopuro de forma cuantitativa. Para el caso de la biorreducción del derivado trifluorado **20**, se alcanzó una conversión del 67%, obteniéndose el alcohol (*R*)-**21** con un 90% *ee* (entrada 14.) Por último, al considerar el átomo de cloro en lugar del flúor (entrada 12, **19**), la conversión bajó ligeramente a un 91%, pero se obtuvo un exceso enantiomérico muy alto (98%).

Con el fin de mostrar una mayor aplicabilidad del proceso, se llevó a cabo la biorreducción a escala semipreparativa de la cetona fluorada **2e** (20 mg, 30 mM) con la ADH de *Pichia glucozyma*, obteniendo tras 24 h de incubación el correspondiente alcohol (*R*)-**18e** con un *ee* del 94% y un rendimiento aislado del 54% tras purificación por columna cromatográfica. A este punto cabe reseñarse que las fluorohidrinas son compuestos muy volátiles y hay que tener mucha precaución a la hora de aislarlas.

4.3.6. BIORREDUCCIÓN DE LAS CETONAS HALOGENADAS CON LAS CÉLULAS LIOFILIZADAS DE *E. COLI*

Como ya se ha mencionado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, el uso de preparaciones liofilizadas de células enteras implica la existencia de otros enzimas endógenos que pueden provocar reacciones secundarias o disminuir la estereoselectividad de los procesos. Por ello, para corroborar que los excesos enantioméricos obtenidos se debían al biocatalizador utilizado, se emplearon células liofilizadas de *E. coli* BL21 DE3 Star en las que no existía el plásmido que codificaba la KRED1-Pglu (Tabla 4.5). De hecho, ya ha sido descrito en algún caso la biorreducción de cetonas con estas células, dando lugar a los productos de configuración opuesta a la ADH de *Pichia glucozyma*.²⁴⁶ Este efecto se ve favorecido debido al sistema de regeneración del cofactor, ya que al ser del enzima acoplado, las ADHs de la *E. coli* pueden funcionar con él sin problema.

Tabla 4.5. Biorreducciones en presencia de células liofilizadas de *E. coli* BL21 DE3 Star.



Entrada	Alcohol	R	X	Y	Z	Conversión (%) ^a	ee (%) ^b
1	18a	Ph	F	H	H	<1	n.d.
2	18b	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	F	H	H	16	62 (S) ^c
3	18c	<i>p</i> -Cl-C ₆ H ₄	F	H	H	24	34 (S) ^c
4	18d	<i>p</i> -Br-C ₆ H ₄	F	H	H	28	4 (S) ^c
5	18e	<i>m</i> -OMe-C ₆ H ₄	F	H	H	28	50 (S) ^{c,d}
6	18f	<i>p</i> -OMe-C ₆ H ₄	F	H	H	<1	n.d.
7	18g	<i>p</i> -I-C ₆ H ₄	F	H	H	21	40 (R) ^{c,d}
8	18h	<i>p</i> -CH ₃ -C ₆ H ₄	F	H	H	10	>99 (S) ^c
9	18i	<i>m</i> -Cl-C ₆ H ₄	F	H	H	35	28 (S) ^{c,d}
10	18n	<i>o</i> -Cl-C ₆ H ₄	F	H	H	40	74 (R) ^c
11	18o	C ₁₀ H ₂₁	F	H	H	<1	n.d.
12	19	Ph	Cl	H	H	19	46 (R) ^{c,d}
13 ^e	14a	Ph	F	F	H	96	86 (S) ^c
14 ^e	14m	C ₄ H ₉ S	F	F	H	>99	>99 (R)
15	21	CH ₂ CO ₂ Et	F	F	F	19	>99 (S) ^c

^a Conversiones medidas mediante CG con fase estacionaria aquiral. ^b Excesos enantioméricos medidos mediante CG con fase estacionaria quiral. ^c Cambio de la preferencia en la nomenclatura CIP. ^d Excesos enantioméricos de los derivados O-acetilados. ^e G6P/G6PDH como sistema de regeneración del cofactor. n.d. No determinado.

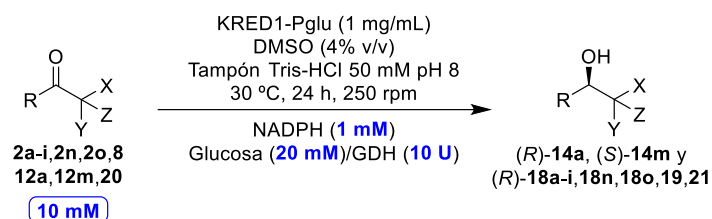
En este estudio decidimos incluir el sustrato heteroaromático 2,2-difluoro-1-(tiofen-2-il)etan-1-ona (**12m**), para el que como en el caso de la 2,2-difluoroacetofenona (**12a**) fue necesario emplear el sistema de regeneración del cofactor G6P/G6PDH puesto que este sustrato también posee un grupo CF₂H adyacente al carbonilo y era reducido por la GDH. Es evidente que por los resultados que se muestran en la Tabla 4.5, se puede concluir que la *E. coli* contenía cetorreductasa(s) endógenas con estereoselectividad opuesta (anti-Prelog) a la mostrada por la KRED1-Pglu, lo que puede influir en los valores finales de la selectividad. Si bien la mayoría de los valores de conversión obtenidos fueron menores del 40%, deben destacarse las biorreducciones de las cetonas difluoradas **12a** y **12m** (entradas 13 y 14), donde se alcanzaron conversiones mayores del 95%. Es tal vez por ello que en las pruebas a mayor concentración de sustrato (Tabla 4.3), se observara normalmente un descenso en los valores de los *ee* de las halohidrinas debido a la acción de estas ADHs endógenas. Como planes futuros, sería interesante estudiar la posibilidad de aislar la(s) cetorreductasa(s) proveniente(s) de *E. coli* capaces de aceptar este tipo de sustratos (hetero)aromáticos conteniendo grupos CF₂H contiguos al grupo carbonilo.

4.3.7. BIORREDUCCIÓN DE CETONAS HALOGENADAS EMPLEANDO LA KRED1-Pglu PURIFICADA

En base a los resultados obtenidos empleando las células de *E. coli* BL21 DE3 Star en la sección anterior, parece muy probable que la estereoselectividad observada en la preparación con la ADH sobreexpresada (Tabla 4.4) fuera debida a la acción de la KRED1-Pglu, pero para asegurarnos en este punto se decidió llevar a cabo su purificación para aplicarla posteriormente a la biorreducción de las cetonas halogenadas (Tabla 4.6). Puesto que se encuentra marcada con una secuencia de histidinas (*His-tag*), se pudo realizar su purificación tal como está descrita.²⁴⁶ En cuanto a las condiciones de reacción, señalar que el único cambio realizado fue la disolución tampón empleada (Tris-HCl en lugar de fosfato), tal como ha sido detallado en trabajos previos.²⁴⁶ En todos los casos los resultados fueron excelentes en términos de conversión y selectividad, alcanzando conversiones cuantitativas hacia la formación del correspondiente alcohol, a excepción del (*R*)-1-fluorododecan-2-ol (**18o**), con el cual se obtuvo una conversión del 95% (entrada 11). Este resultado es más que aceptable teniendo en cuenta que estamos hablando de un compuesto con una cadena lineal larga

de 12 átomos de carbono, y las biorreducciones de este tipo de sustratos no son muy habituales. Respecto a los excesos enantioméricos, en todos los casos se obtuvieron los correspondientes alcoholes enantiopuros de configuración *R*, a excepción del alcohol heteroaromático **14m**, de configuración opuesta debido a la preferencia del átomo de azufre sobre los átomos de flúor tal y como describen las reglas CIP.

Tabla 4.6. Biorreducciones de cetonas α -halogenadas catalizadas por la KRED1-Pglu purificada.



Entrada	Alcohol	R	X	Y	Z	Conversión (%) ^a	ee (%) ^b
1	18a	Ph	F	H	H	>99	>99 (<i>R</i>) ^c
2	18b	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	F	H	H	>99	>99 (<i>R</i>) ^c
3	18c	<i>p</i> -Cl-C ₆ H ₄	F	H	H	>99	>99 (<i>R</i>) ^c
4	18d	<i>p</i> -Br-C ₆ H ₄	F	H	H	>99	>99 (<i>R</i>) ^c
5	18e	<i>m</i> -OMe-C ₆ H ₄	F	H	H	>99	>99 (<i>R</i>) ^{c,d}
6	18f	<i>p</i> -OMe-C ₆ H ₄	F	H	H	>99	>99 (<i>R</i>) ^{c,d}
7	18g	<i>p</i> -I-C ₆ H ₄	F	H	H	>99	>99 (<i>R</i>) ^{c,d}
8	18h	<i>p</i> -CH ₃ -C ₆ H ₄	F	H	H	>99	>99 (<i>R</i>) ^c
9	18i	<i>m</i> -Cl-C ₆ H ₄	F	H	H	>99	>99 (<i>R</i>) ^{c,d}
10	18n	<i>o</i> -Cl-C ₆ H ₄	F	H	H	>99	>99 (<i>R</i>) ^c
11	18o	C ₁₀ H ₂₁	F	H	H	95	>99 (<i>R</i>) ^{c,d}
12	19	Ph	Cl	H	H	>99	>99 (<i>R</i>) ^{c,d}
13 ^e	14a	Ph	F	F	H	>99	>99 (<i>R</i>) ^c
14 ^e	14m	C ₄ H ₃ S	F	F	H	>99	>99 (<i>S</i>)
15	21	CH ₂ CO ₂ Et	F	F	F	>99	>99 (<i>R</i>) ^c

^a Conversiones medidas por CG con fase estacionaria aquiral. ^b Excesos enantioméricos medidos por CG con fase estacionaria quiral. ^c Cambio de la preferencia en la nomenclatura CIP. ^d Excesos enantioméricos de los derivados O-acetilados. ^e G6P/G6PDH como sistema de regeneración del cofactor.

Estos resultados corroboraron que las selectividades observadas para el caso de las células liofilizadas de *E. coli* sobreexpresando la KRED1-Pglu eran debidos a la acción de este enzima, siendo esta preparación enzimática un catalizador muy prometedor para llevar a cabo este tipo de biorreducciones debido a su fácil manejo y a su mayor estabilidad en comparación con el enzima purificado.

4.3.8. CRIBADO DE ADHs CON LA 1-FLUORODODECAN-2-ONA (**2o**)

Para completar este estudio nos pareció interesante aplicar diferentes ADHs disponibles en el laboratorio en la biorreducción del sustrato alifático **2o**. Aunque los valores obtenidos de conversión y exceso enantiomérico hacia el (*R*)-**18o** fueron muy buenos con la KRED1-Pglu, se emplearon las ADHs de *Ralstonia* sp. (RasADH), *Lactobacillus brevis* (LB-ADH), *Sphingobium yanoikuyae* (SyADH), *Thermoanaerobacter ethanolicus* (TeSADH), *Thermoanaerobacter* sp. (ADH-T) y *Rhodococcus ruber* (ADH-A) sobreexpresadas en *E. coli*, así como la ADH comercial evo-1.1.200, tal y como se muestra en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Biorreducciones del sustrato **2o** catalizadas por diferentes ADHs.



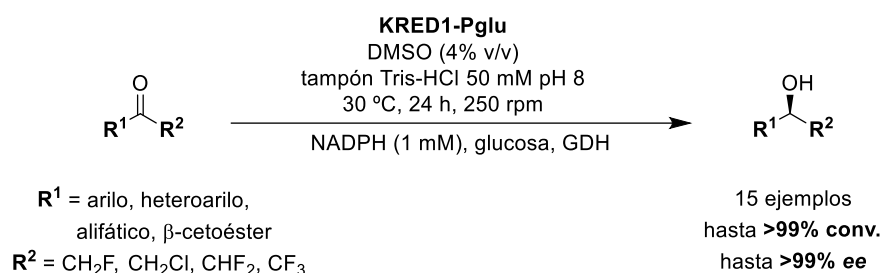
Preparación enzimática	Conversión (%) ^a	ee 18o (%) ^{b,c}
evo-1.1.200	93	>99 (<i>S</i>)
<i>E. coli</i> /LB-ADH	98	88 (<i>S</i>)
<i>E. coli</i> /RasADH	21	n.d.
<i>E. coli</i> /SyADH	97	10 (<i>R</i>)
<i>E. coli</i> /TeSADH	82	90 (<i>R</i>)
<i>E. coli</i> /ADH-T	91	>99 (<i>R</i>)
<i>E. coli</i> /ADH-A	>99	>99 (<i>R</i>)
<i>E. coli</i> /KRED1-Pglu	>99	>99 (<i>R</i>)
KRED1-Pglu purificada	95	>99 (<i>R</i>)

^a Conversiones medidas por CG con fase estacionaria aquiral. ^b Excesos enantioméricos medidos por CG con fase estacionaria quiral del derivado O-acetilado. ^c Cambio de la preferencia en la nomenclatura CIP. n.d. No determinado.

De entre todas las ADHs estudiadas, los mejores resultados se obtuvieron con la ADH-A y la KRED1-Pglu, de selectividad Prelog, mientras que la evo-1.1.200 fue la mejor de entre los enzimas de tipo anti-Prelog, dando lugar al alcohol (*S*)-**18o** enantiopuro con una conversión similar a la mostrada por la KRED1-Pglu purificada. Estos resultados ratifican a la KRED1-Pglu como un candidato muy prometedor para llevar a cabo la síntesis estereoselectiva de halohidrinás.

CONCLUSIONES

- Se ha llevado a cabo la biorreducción de una serie de cetonas α -halogenadas empleando la ADH de *Pichia glucozyma* (KRED1-Pglu) sobreexpresada en *E. coli* optimizándose algunos de los parámetros de la reacción como la concentración del sustrato (10 mM) o la posible adición de un cosolvente orgánico, obteniéndose las correspondientes (*R*)-halohidrinas con conversiones muy altas y *ee* excelentes de manera general.
- Tras emplear la KRED1-Pglu como una preparación de células enteras liofilizadas, se observó una posible interferencia con otros enzimas endógenos presentes en las propias células de *E. coli*, lo que hubiera podido dar lugar a reacciones indeseadas, por lo que se purificó la proteína para su posterior empleo en los ensayos de biorreducción (Esquema 4.12), corroborándose los buenos resultados obtenidos para el caso del enzima sobreexpresado.



Esquema 4.12. Reacción de biorreducción desarrollada en este capítulo.

- Se ha accedido exitosamente a una serie de halohidrinas de configuración *R* con excelentes conversiones y excesos enantioméricos presentando muy diversos patrones de sustitución, empleando tanto la KRED1-Pglu en su forma purificada como sobreexpresada en *E. coli*, siendo esta última una preparación con una gran aplicabilidad debido a su fácil manejo y larga estabilidad.
- El enzima aceptó sustratos mono-, di- y trihalogenados en posición α al carbonilo, con restos tanto (hetero)aromáticos como alifáticos. Precisamente con un derivado alifático (**2o**), se realizó un cribado enzimático encontrándose varias ADHs de selectividad complementaria, además de la propia KRED1-Pglu, que fueron capaces de dar lugar al alcohol correspondiente enantiopuro con una conversión cuantitativa.

PARTE EXPERIMENTAL

4.5.1. GENERAL

La procedencia de los compuestos químicos, así como los disolventes es común a lo establecido en capítulos anteriores. Los cofactores NADH y NADPH y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa fueron adquiridos a Sigma-Aldrich y VWR, la glucosa deshidrogenasa (GDH-105) a Codexis. La ADH evo-1.1.200 se adquirió a la compañía Evoxx Technologies GmbH (previamente llamada Evocatal) y las ADHs procedentes de *Ralstonia* sp. (RasADH), *Lactobacillus brevis* (LB-ADH), *Rhodococcus ruber* (ADH-A), *Sphingobium yanoikuyae* (SyADH), *Thermoanaerobacter* sp. (ADH-T) y *Thermoanaerobacter ethanolicus* (TeSADH) fueron cedidas por el Profesor Wolfgang Kroutil de la Universidad de Graz (Austria), y se emplearon sobreexpresadas en células de *E. coli*. Estos biocatalizadores se utilizaron en forma de células enteras tras un proceso de liofilización y se almacenaron a 4 °C.

La ADH procedente de *Pichia glucozyma* fue cedida por los Prof. Francesco Molinari y Dörte Rother de la Universidad de Milán (Italia) y Forschungszentrum Jülich (Alemania), respectivamente. El crecimiento de las células se realizó en un medio de tipo *luria broth* (LB, 20 mL) con kanamicina (25 µg/L) y cloranfenicol (25 µg/L) como antibióticos y se incubó a 37 °C y 150 rpm durante 16 h. Entonces, este precultivo se añadió a un nuevo medio *terrific broth* (TB, 200 mL) con kanamicina (25 µg/L), cloranfenicol (25 µg/L) y arabinosa (0.5 mg/mL) para una densidad óptica inicial a 600 nm de 0.1 y se incubó de nuevo a 37 °C y 90 rpm, hasta que la densidad óptica medida a 600 nm alcanzó un valor de 0.5. A continuación, se añadió isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, 0.5 mM) y la mezcla se agitó durante 72 h a 10 °C. Posteriormente, las células se centrifugaron a 8000 rpm durante 45 min a 4 °C y se lavaron con una disolución tampón de fosfato (pH 7.0, 20 mM), tras lo cual se resuspendieron en el mismo tampón, para posteriormente congelar la mezcla con nitrógeno líquido y liofilizar la preparación. Las células obtenidas se almacenaron a -20 °C, manteniéndose estables incluso tras varios meses de almacenamiento en el congelador. La purificación de la proteína fue llevada a cabo tras la lisis celular por un proceso de sonicación, y se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de Ni-NTA.²⁴⁶

4.5.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS

Las técnicas de cromatografía en gel de sílice, resonancia magnética nuclear (RMN) y rotación óptica empleadas se han descrito en los capítulos anteriores. A continuación, se detallan los métodos desarrollados para los compuestos estudiados en este capítulo.

4.5.2.1. Cromatografía de gases (CG)

Los análisis de CG se llevaron a cabo según lo descrito en capítulos anteriores utilizando la columna de relleno aquiral HP-1 para el cálculo de las conversiones y la columna de relleno quiral Chirasil-Dex-CB para la obtención de los excesos enantioméricos.

Tabla 4.8. Determinación de las conversiones por CG empleando una fase estacionaria aquiral.

Compuesto	Programa ^a	Tiempo de retención (min)
2e	90/0/2.5/120/1/30/220/2	9.1
18e	90/0/2.5/120/1/30/220/2	9.4
2f	90/0/2.5/120/1/30/220/2	10.3
18f	90/0/2.5/120/1/30/220/2	9.8
2g	90/0/2.5/120/1/30/220/2	13.1
18g	90/0/2.5/120/1/30/220/2	14.2
2i	90/0/2.5/120/1/30/220/2	6.8
18i	90/0/2.5/120/1/30/220/2	8.1
2o	90/0/2.5/120/5/30/200/1	11.9
18o	90/0/2.5/120/5/30/200/1	14.1
8	90/0/2.5/120/1/30/220/2	7.2
19	90/0/2.5/120/1/30/220/2	6.8

^a T_{inicial} (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T_{final} (°C)/ tiempo (min).

Tabla 4.9. Determinación de los valores de *ee* de los alcoholes **18e-g**, **18i**, **18o** y **19** por CG empleando una fase estacionaria quiral.

Compuesto ^a	Programa ^b	Tiempo de retención (min)
18e	110/3/2/160/0/30/200/2	19.6 (R), 20.4 (S)
18f	110/3/2/160/0/30/200/2	21.9 (R), 22.8 (S)
18g	120/5/30/180/10/10/200/1	12.2 (R), 12.5 (S)
18i	120/16/60/160/10/30/200/2	17.0 (R), 17.6 (S)
18o	120/0/2.5/170/0/10/200/3	15.2 (R), 15.9 (S)
19	110/3/3/180/2/30/200/4	14.4 (R), 15.0 (S)

^a En todos los casos, se midieron los excesos enantioméricos tras acetilación de los alcoholes **18e-g**, **18i**, **18o** y **19** *in situ* con anhídrido acético y 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina. ^b T_{inicial} (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T_{final} (°C)/ tiempo (min).

Tabla 4.10. Determinación de las conversiones y los *ee* por CG en la biorreducción de las cetonas **2a-d**, **2h**, **2n**, **12a**, **12m** y **20** empleando una fase estacionaria quiral.

Compuesto	Programa ^a	Tiempo de retención (min)
2a	120/20/20/200/1	6.5
18a	120/20/20/200/1	13.6 (S), 14.7 (R)
2b	110/3/3/180/2/30/200/4	7.2
18b	110/3/3/180/2/30/200/4	13.1 (S), 13.8 (R)
2c	120/16/60/160/10/30/200/2	14.9
18c	120/16/60/160/10/30/200/2	21.2 (S), 21.9 (R)
2d	110/3/3/180/2/30/200/4	16.8
18d	110/3/3/180/2/30/200/4	23.2 (S), 23.9 (R)
2h	110/3/3/160/0/30/200/1	10.7
18h	110/3/3/160/0/30/200/1	14.3 (S), 14.9 (R)
2n	120/16/60/160/10/30/200/2	11.2
18n	120/16/60/160/10/30/200/2	19.9 (S), 20.5 (R)
12a	110/5/3/150/0/30/200/4	4.2
14a	110/5/3/150/0/30/200/4	14.9 (S), 15.5 (R)
12m	100/10/1.5/155/1/30/200/1	7.4
14m	100/10/1.5/155/1/30/200/1	29.4 (R), 31.1 (S)
20	50/5/6/140/0/30/200/1	6.0
21	50/5/6/140/0/30/200/1	16.7 (S), 17.0 (R)

^a T_{inicial} (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ T_{final} (°C)/ tiempo (min).

4.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS NO ENZIMÁTICOS

Las 1-aril-2-fluoroetan-1-onas **2a-i**, la 2,2-difluoro-1-(tiofen-2-il)etan-1-ona (**12m**) y el alcohol β,β-difluorado **14a** se sintetizaron tal y como se ha descrito en los capítulos anteriores, mientras que el resto de procedimientos desarrollados en este capítulo se describen a continuación.

4.5.3.1. Procedimiento para la síntesis de la 1-(2-clorofenil)-2-fluoroetan-1-ona (**2n**)

4.5.3.1.1. Síntesis química de la 2-bromo-1-(2-clorofenil)etan-1-ona (**7n**)

A una disolución de la *o*-cloroacetofenona (**3n**, 6.47 mmol, 1 equiv.) en MeCN (4 mL) se añadió *N*-bromosuccinimida (NBS, 6.6 mmol, 1.02 equiv.) y ácido *p*-toluensulfónico (*p*-TsOH, 6.47 mmol, 1 equiv.). La reacción se agitó durante 24 h a 50 °C. Transcurrido este tiempo, se destiló el disolvente bajo presión reducida en el rotavapor y se añadió una disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (10 mL). La disolución resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (4 x 20 mL), se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó en el rotavapor

obteniéndose la cetona deseada **7n** sin necesidad de purificación adicional (86% rendimiento), y fue empleada a continuación para obtener la cetona fluorada **2n**.

4.5.3.1.2. Síntesis química de **2n**

Una mezcla de fluoruro de potasio (KF, 9.0 mmol, 1.5 equiv.) y fluoruro de zinc (ZnF_2 , 9.0 mmol, 1.5 equiv.) en MeCN (13 mL) depositada en un tubo sellado se agitó durante 1 h calentando a 100 °C. Posteriormente se le añadió una disolución de **7n** (6.0 mmol, 1 equiv.) en MeCN (9 mL), y se agitó dicha mezcla a 100 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se destiló el disolvente bajo presión reducida en el rotavapor y se añadió agua (20 mL). La disolución resultante se extrajo con CH_2Cl_2 (4 x 20 mL), se combinaron las fases orgánicas que se lavaron con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 x 20 mL), y la capa orgánica resultante se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se evaporó cuidadosamente en el rotavapor, debido a la volatilidad de la cetona **2n**, que fue purificada mediante cromatografía de columna en gel de sílice utilizando una mezcla de hexano y AcOEt (9:1) como eluyente (23% rendimiento).

4.5.3.2. Procedimiento para la síntesis de la 1-fluorododecan-2-ona (**2o**)

4.5.3.2.1. Síntesis química del intermediario 2-azidododec-1-eno (**11o**)

Sobre una suspensión de azida de sodio (30 mmol, 2.5 equiv.) en MeCN (9 mL), se añadió mediante un embudo de adición una disolución de ICl (18 mmol, 1.5 equiv.) en CH_2Cl_2 (15 mL) a -20 °C, y se agitó la mezcla a la misma temperatura durante 30 min. Después de este tiempo, se adicionó por goteo una disolución de dodec-1-eno (**9o**, 12 mmol, 1 equiv.) en CH_2Cl_2 (15 mL) y se dejó agitar la mezcla durante 1 h a -20 °C. La reacción se detuvo adicionando una disolución acuosa saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (50 mL) y se extrajo con Et_2O (3 x 80 mL). Posteriormente se combinaron las fases orgánicas, que se lavaron con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 x 80 mL), y la capa orgánica resultante se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras la evaporación de los disolventes en el rotavapor, el crudo resultante conteniendo el compuesto **10o** se usó inmediatamente para el siguiente paso sin purificación adicional.

El crudo obtenido anteriormente se disolvió en Et_2O (31 mL) y se añadió $t\text{BuOK}$ (14.8 mmol, 1.2 equiv.) a 0 °C, agitándose la mezcla durante 1.5 h a esa misma temperatura. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se filtró sobre celita y se eliminó el disolvente en el rotavapor. De este modo se obtuvo el intermediario **11o** (76%

rendimiento) que se utilizó en el paso posterior sin necesidad de una purificación adicional.

4.5.3.2.2. Síntesis química de **2o**

Sobre una suspensión de Selectfluor (14.1 mmol, 1.5 equiv.), NaHCO₃ (18.82 mmol, 2 equiv.) y H₂O (18.82 mmol, 2 equiv.) en MeCN (94 mL) a temperatura ambiente, se añadió el compuesto **11o** obtenido en el apartado anterior (9.41 mmol, 1 equiv.). La mezcla resultante se agitó durante 12 h y posteriormente se evaporó el disolvente en el rotavapor. La reacción se extrajo con Et₂O (3 x 100 mL), y se combinaron las fases orgánicas para, posteriormente, lavarlas con una disolución acuosa saturada de NaCl (200 mL). La capa orgánica resultante se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el disolvente en el rotavapor. El crudo resultante se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice utilizando hexano puro como eluyente (45% rendimiento).

4.5.3.3. Síntesis química de los alcoholes halogenados **14m**, **18a-i**, **18n**, **18o**, **19** y **21**

A una disolución de la cetona correspondiente **2a-i**, **2n**, **2o**, **8**, **12m** o **20** (1.28 mmol, 1 equiv.) en MeOH (2 mL) o EtOH (2 mL) en el caso de **20**, se le añadió borohidruro de sodio (1.28 mmol, 1 equiv.) a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. El transcurso de la reacción se siguió mediante análisis por TLC, observándose la completa desaparición de la cetona de partida normalmente a las 3 h. Transcurrido este tiempo, la reacción se detuvo añadiendo unas gotas de una disolución acuosa de HCl 1 N y se añadió H₂O (2 mL) para llevar a cabo a continuación un proceso de extracción con CH₂Cl₂ (3 x 2 mL). Finalmente las fases orgánicas se combinaron y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Tras la evaporación del disolvente en el rotavapor se obtuvieron los correspondientes alcoholes racémicos con alta pureza y sin ser necesaria una purificación adicional (16-97% rendimiento).

4.5.4. PROCEDIMIENTOS ENZIMÁTICOS

4.5.4.1. Procedimiento general para la biorreducción de las cetonas halogenadas empleando células liofilizadas de *E. coli*/KRED1-Pglu

4.5.4.1.1. Procedimiento general para la biorreducción de **2a-i**, **2n**, **2o**, **8** y **20**

En un tubo Eppendorf se añadieron las células liofilizadas de *E. coli*/KRED1-Pglu (20 mg), y posteriormente una mezcla de la disolución reguladora de fosfato (50 mM, pH 8, 576 μ L), que contenía NADPH (1 mM), glucosa (20 mM) y la GDH-105 (10 U). Finalmente se añadió la cetona correspondiente **2a-i**, **2n**, **2o**, **8** o **20** (10 mM) solubilizada en DMSO (24 μ L, resultando un volumen total de 600 μ L) y se agitó la mezcla de reacción en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. Transcurrido este tiempo la reacción se extrajo con AcOEt (2 x 500 μ L), se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones por análisis de CG empleando los métodos detallados en las Tablas 4.8 y 4.10.

Los excesos enantioméricos de los alcoholes **18e-g**, **18i**, **18o** o **19** se midieron tras su transformación en los correspondientes acetatos mediante el siguiente procedimiento de derivatización. Al sustrato racémico (2 μ L) o una mezcla de la reacción enzimática previamente extraída (200 μ L), se adicionaron AcOEt (500 μ L), unas gotas de anhídrido acético, y una punta de espátula de 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP). Esta mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, y transcurrido este tiempo se detuvo la reacción añadiendo agua (500 μ L). El producto se extrajo con AcOEt (2 x 350 μ L), combinando las fases orgánicas resultantes que se secaron con Na₂SO₄ anhidro. Los excesos enantioméricos se midieron empleando la técnica de cromatografía de gases y el método detallado en la Tabla 4.9.

4.5.4.1.2. Procedimiento para la biorreducción de la cetona **12a**

En un tubo Eppendorf se añadieron las células liofilizadas de *E. coli*/KRED1-Pglu (20 mg), y posteriormente una mezcla de la disolución reguladora de fosfato (50 mM, pH 8, 576 μ L), conteniendo NADPH (1 mM), glucosa-6-fosfato (20 mM) y la G6PDH (10 U). Finalmente se añadió la cetona **12a** (0.8 μ L, 10 mM) solubilizada en DMSO (24 μ L, resultando un volumen total de 600 μ L) y se agitó la mezcla de reacción en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. Transcurrido este tiempo la reacción se extrajo con AcOEt (2 x 500 μ L), se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre

Na₂SO₄ anhidro, midiendo la conversión y el exceso enantiomérico por análisis de CG empleando el método detallado en la Tabla 4.10.

4.5.4.2. Procedimiento general para la biorreducción de las cetonas halogenadas empleando las células liofilizadas de *E. coli* BL21 DE3 Star

4.5.4.2.1. Procedimiento general para la biorreducción de 2a-i, 2n, 2o, 8 y 20

En un tubo Eppendorf se añadieron las células liofilizadas de *E. coli* BL21 DE3 Star (20 mg), y posteriormente la disolución reguladora de fosfato (50 mM, pH 8, 576 µL), conteniendo NADPH (1 mM), glucosa (20 mM) y la GDH-105 (10 U). Finalmente se añadió la cetona correspondiente **2a-i**, **2n**, **2o**, **8** o **20** (10 mM) solubilizada en DMSO (24 µL, resultando un volumen total de 600 µL) y se agitó la mezcla de reacción en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. Transcurrido este tiempo la reacción se extrajo con AcOEt (2 x 500 µL), se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones por análisis de CG empleando los métodos detallados en las Tablas 4.8 y 4.10. Los excesos enantioméricos de los alcoholes **18e-g**, **18i**, **18o** o **19** se midieron por cromatografía de gases con una fase estacionaria quiral empleando el método detallado en la Tabla 4.9 tras su transformación en los correspondientes acetatos mediante el procedimiento de derivatización descrito en la Sección 4.5.4.1.1.

4.5.4.2.2. Procedimiento general para la biorreducción de 12a y 12m

En un tubo Eppendorf se añadieron las células liofilizadas de *E. coli* BL21 DE3 Star (20 mg), y posteriormente la disolución reguladora de fosfato (50 mM, pH 8, 576 µL), conteniendo NADPH (1 mM), glucosa-6-fosfato (20 mM) y la G6PDH (10 U). Finalmente se añadió la cetona correspondiente **12a** o **12m** (10 mM) solubilizada en DMSO (24 µL, resultando un volumen total de 600 µL) y se agitó la mezcla de reacción en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. Transcurrido este tiempo la reacción se extrajo con AcOEt (2 x 500 µL), se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones y excesos enantioméricos por análisis de CG empleando los métodos detallados en la Tabla 4.10.

4.5.4.3. Procedimiento general para la biorreducción de las cetonas halogenadas empleando la KRED1-Pglu purificada

4.5.4.3.1. Procedimiento general para la biorreducción de 2a-i, 2n, 2o, 8 y 20

En un tubo Eppendorf se añadió una mezcla de la disolución reguladora de Tris-HCl (50 mM, pH 8, 576 μ L), conteniendo NADPH (1 mM), glucosa (20 mM), la GDH-105 (10 U) y la cetona correspondiente **2a-i**, **2n**, **2o**, **8** o **20** (10 mM) solubilizada en DMSO (24 μ L, resultando un volumen total de 600 μ L). Finalmente se añadió la KRED1-Pglu purificada (0.6 mg, 1 mg/mL) a la mezcla de reacción y se agitó dicha mezcla en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. Transcurrido este tiempo la reacción se extrajo con AcOEt (2 x 500 μ L), se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones por análisis de CG empleando los métodos detallados en las Tablas 4.8 y 4.10. Transcurrido este tiempo la reacción se extrajo con AcOEt (2 x 500 μ L), se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones por análisis de CG empleando los métodos detallados en las Tablas 4.8 y 4.10. Los excesos enantioméricos de los alcoholes **18e-g**, **18i**, **18o** o **19** se midieron por cromatografía de gases con una fase estacionaria quiral empleando el método detallado en la Tabla 4.9 tras su transformación en los correspondientes acetatos mediante el procedimiento de derivatización descrito en la Sección 4.5.4.1.1.

4.5.4.3.2. Procedimiento general para la biorreducción de 12a y 12m

En un tubo Eppendorf se añadió una mezcla de la disolución reguladora de Tris-HCl (50 mM, pH 8, 576 μ L), conteniendo NADPH (1 mM), glucosa-6-fosfato (20 mM), G6PDH (10 U) y la cetona correspondiente **12a** o **12m** (10 mM) solubilizada en DMSO (24 μ L, resultando un volumen total de 600 μ L). Finalmente se añadió la KRED1-Pglu purificada (0.6 mg, 1 mg/mL) a la mezcla de reacción y se agitó dicha mezcla en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. Transcurrido este tiempo la reacción se extrajo con AcOEt (2 x 500 μ L), se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo las conversiones y excesos enantioméricos por análisis de CG empleando los métodos detallados en la Tabla 4.10.

4.5.4.4. Biorreducción de la cetona **2e** a escala semipreparativa empleando la *E. coli*/KRED1-Pglu

En un matraz Erlenmeyer se añadieron las células liofilizadas de *E. coli*/KRED1-Pglu (200 mg), y posteriormente la disolución reguladora de fosfato (50 mM, pH 8, 11.42 mL), conteniendo NADPH (10 mg, 1 mM), glucosa (43 mg, 20 mM) y la GDH-105 (3.3 mg, 10 U). Finalmente se añadió la cetona **2e** (20 mg, 30 mM) solubilizada en MeCN (476 μ L, resultando un volumen total de 11.9 mL) y se agitó la mezcla de reacción en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. Transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota de la reacción para medir la conversión mediante análisis de CG (94%) empleando el método detallado en la Tabla 4.8, y tras la acetilación del alcohol resultante se midió su pureza óptica ((*R*)-**18e**: 94% *ee*) empleando el método detallado en la Tabla 4.9. La reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (6 x 12 mL) y se combinaron todas las fases orgánicas, que se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se filtraron, evaporándose a continuación el disolvente en un rotavapor. El crudo obtenido se purificó por cromatografía de columna (5% Et₂O/Hexano), obteniendo el alcohol (*R*)-**18e** con un rendimiento aislado del 54% (10.7 mg).

4.5.4.5. Procedimientos para el cribado de ADHs con la 1-fluorododecan-2-ona (**2o**)

4.5.4.5.1. Biorreducción con la *E. coli*/RasADH

En un tubo Eppendorf se añadieron las células liofilizadas de *E. coli*/RasADH (10 mg), y posteriormente la disolución reguladora de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5, 585 μ L), conteniendo NADPH (1 mM), glucosa (5 mM) y la GDH-105 (10 U). Finalmente se añadió la cetona **2o** (3.44 μ L, 25 mM) solubilizada en DMSO (15 μ L, resultando un volumen total de 600 μ L) y se agitó la mezcla de reacción en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. Transcurrido este tiempo la reacción se extrajo con AcOEt (2 x 500 μ L), se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, midiendo la conversión por cromatografía de gases empleando el método detallado en la Tabla 4.8. El exceso enantiomérico del alcohol **18o** se midió por cromatografía de gases con una fase estacionaria quiral empleando el método detallado en la Tabla 4.9 tras su transformación en el correspondiente acetato mediante el procedimiento de derivatización descrito en la Sección 4.5.4.1.1.

4.5.4.5.2. Biorreducción con la evo-1.1.200

En un tubo Eppendorf se añadieron 10 mg de la ADH comercial evo-1.1.200, y posteriormente la disolución reguladora de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5, 462.5 μ L), conteniendo $MgCl_2$ (1 mM) y NADH (1 mM). Finalmente se añadieron 2-PrOH (25 μ L, 5% v/v) y la cetona **2o** (2.9 μ L, 25 mM) solubilizada en DMSO (12.5 μ L, resultando un volumen total de 500 μ L), y se agitó la mezcla de reacción en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. Transcurrido este tiempo la reacción se extrajo con AcOEt (2 x 500 μ L), se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, midiéndose la conversión por cromatografía de gases empleando el método detallado en la Tabla 4.8. El exceso enantiomérico del alcohol **18o** se midió por cromatografía de gases con una fase estacionaria quiral empleando el método detallado en la Tabla 4.9 tras su transformación en el correspondiente acetato mediante el procedimiento de derivatización descrito en la Sección 4.5.4.1.1.

4.5.4.5.3. Biorreducción con la *E. coli*/SyADH, *E. coli*/TeSADH y *E. coli*/ADH-T

En un tubo Eppendorf se añadieron las células liofilizadas de *E. coli* sobreexpresando la correspondiente ADH (10 mg), y posteriormente la disolución reguladora de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5, 555 μ L) conteniendo NADPH (1 mM). Finalmente se añadieron 2-PrOH (30 μ L, 5% v/v) y la cetona **2o** (3.44 μ L, 25 mM) solubilizada en DMSO (15 μ L, resultando un volumen total de 600 μ L), y se agitó la mezcla de reacción en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. Transcurrido este tiempo la reacción se extrajo con AcOEt (2 x 500 μ L), se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, midiéndose la conversión por cromatografía de gases empleando el método detallado en la Tabla 4.8. El exceso enantiomérico del alcohol **18o** se midió por cromatografía de gases con una fase estacionaria quiral empleando el método detallado en la Tabla 4.9 tras su transformación en el correspondiente acetato mediante el procedimiento de derivatización descrito en la Sección 4.5.4.1.1.

4.5.4.5.4. Biorreducción con la *E. coli*/LB-ADH

En un tubo Eppendorf se añadieron las células liofilizadas de *E. coli*/LB-ADH (10 mg), y posteriormente la disolución reguladora de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5, 455 μ L), conteniendo $MgCl_2$ (1 mM) y NADPH (1 mM). Finalmente se añadieron 2-PrOH (30

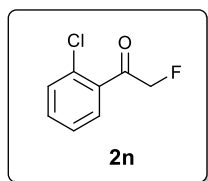
μL , 5% v/v) y la cetona **2o** (2.9 μL , 25 mM) solubilizada en DMSO (15 μL , resultando un volumen total de 500 μL), y se agitó la mezcla de reacción en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. Transcurrido este tiempo la reacción se extrajo con AcOEt (2 x 500 μL), se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, midiéndose la conversión por cromatografía de gases empleando el método detallado en la Tabla 4.8. El exceso enantiomérico del alcohol **18o** se midió por cromatografía de gases con una fase estacionaria quiral empleando el método detallado en la Tabla 4.9 tras su transformación en el correspondiente acetato mediante el procedimiento de derivatización descrito en la Sección 4.5.4.1.1.

4.5.4.5.5. Biorreducción con la *E. coli*/ADH-A

En un tubo Eppendorf se añadieron las células liofilizadas de *E. coli*/ADH-A (10 mg), y posteriormente la disolución reguladora de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5, 555 μL) conteniendo NADH (1 mM). Finalmente se añadieron a la mezcla de reacción 2-PrOH (30 μL , 5% v/v) y la cetona **2o** (3.44 μL , 25 mM) solubilizada en DMSO (15 μL , resultando un volumen total de 600 μL), y se agitó la mezcla de reacción en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. Transcurrido este tiempo la reacción se extrajo con AcOEt (2 x 500 μL), se combinaron las fases orgánicas y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, midiéndose la conversión por cromatografía de gases empleando el método detallado en la Tabla 4.8. El exceso enantiomérico del alcohol **18o** se midió por cromatografía de gases con una fase estacionaria quiral empleando el método detallado en la Tabla 4.9 tras su transformación en el correspondiente acetato mediante el procedimiento de derivatización descrito en la Sección 4.5.4.1.1.

4.5.5. DATOS EXPERIMENTALES

1-(2-Clorofenil)-2-fluoroetan-1-ona (2n)



Fórmula empírica: C₈H₆ClFO

Peso molecular: 172.58 g/mol

Aspecto: Aceite incoloro

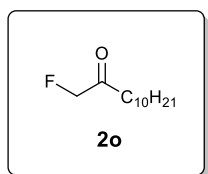
Rendimiento: 23% **R_f** (50% EtOAc/hexano): 0.77

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.49 (d, *J* = 46.7 Hz, 2H), 7.41 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.55 (m, 1H), 7.72 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 84.9 (d, *J* = 185.2 Hz, CH₂), 127.3 (CH), 130.3 (d, *J* = 2.0 Hz, CH), 130.7 (CH), 132.0 (C), 133.3 (CH), 135.2 (C), 196.5 (d, *J* = 18.0 Hz, C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -224.4

1-Fluorododecan-2-ona (2o)



Fórmula empírica: C₁₂H₂₃FO

Peso molecular: 202.31 g/mol

Aspecto: Aceite incoloro

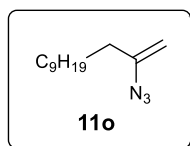
Rendimiento: 45% **R_f** (10% EtOAc/hexano): 0.70

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.81 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.17-1.27 (m, 14H), 1.56 (m, 2H), 2.47 (td, *J* = 7.4, 2.8 Hz, 2H), 4.74 (d, *J* = 47.8 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 14.1 (CH₃), 22.7 (CH₂), 22.8 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.6 (CH₂), 32.0 (CH₂), 38.3 (CH₂), 85.0 (d, *J* = 184.8 Hz, CH₂), 207.1 (d, *J* = 19.1 Hz, C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -227.6

2-Azidododec-1-eno (11o)



Fórmula empírica: $C_{12}H_{23}N_3$

Peso molecular: 209.34 g/mol

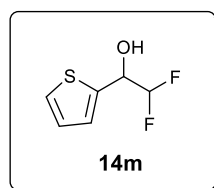
Aspecto: Aceite incoloro

Rendimiento: 76% **R_f** (100% Hexano): 0.84

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 0.85 (t, $J = 6.0$ Hz, 3H), 1.24-1.32 (m, 14H), 1.45 (m, 2H), 2.03 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 4.58 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H)

^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 14.1 (CH_3), 22.8 (CH_2), 27.4 (CH_2), 29.0 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.7 (CH_2), 31.2 (CH_2), 32.0 (CH_2), 33.8 (CH_2), 97.8 (CH_2), 146.9 (C)

2,2-Difluoro-1-(tiofen-2-il)etan-1-ol (14m)



Fórmula empírica: $C_6H_6F_2OS$

Peso molecular: 164.17 g/mol

Aspecto: Aceite naranja

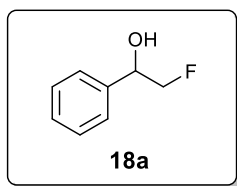
Rendimiento: 82% **R_f** (20% Et_2O /hexano): 0.28

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 2.82 (s ancho, 1H), 5.07 (td, $J = 10.6, 4.5$ Hz, 1H), 5.63-6.01 (td, $J = 55.9, 4.4$ Hz, 1H), 7.05 (dd, $J = 5.1, 3.5$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 7.37 (dd, $J = 5.0, 1.2$ Hz, 1H)

^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 70.1 (t, $J = 25.9$ Hz, CH), 115.2 (t, $J = 246.0$ Hz, CH), 126.6 (2CH), 127.2 (CH), 138.4 (t, $J = 3.0$ Hz, C)

^{19}F -NMR (282 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) -127.3, -127.4

1-Fenil-2-fluoroetan-1-ol (18a)



Fórmula empírica: C₈H₉FO

Peso molecular: 140.16 g/mol

Aspecto: Aceite amarillo

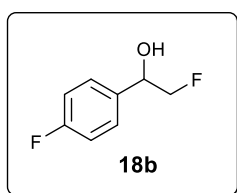
Rendimiento: 97% **R_f** (20% AcOEt/hexano): 0.41

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.49 (s ancho, 1H), 4.31-4.61 (m, 2H), 5.02 (ddd, *J* = 12.0, 9.0, 3.0 Hz, 1H), 7.36 (m, 5H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 73.1 (d, *J* = 19.5 Hz, CH), 87.3 (d, *J* = 173.3 Hz, CH₂), 126.5 (2CH), 128.6 (CH), 128.8 (2CH), 138.3 (d, *J* = 8.3 Hz, C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -220.6

2-Fluoro-1-(4-fluorofenil)etan-1-ol (18b)



Fórmula empírica: C₈H₈F₂O

Peso molecular: 158.15 g/mol

Aspecto: Aceite amarillo

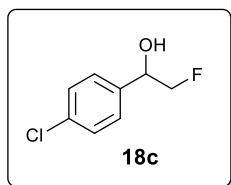
Rendimiento: 50% **R_f** (20% AcOEt/hexano): 0.39

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.86 (s ancho, 1H), 4.27-4.57 (m, 2H), 4.98 (ddd, *J* = 12.0, 9.0, 3.0 Hz, 1H), 7.05 (t aparente, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.35 (dd, *J* = 9.0, 6.0 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 72.4 (d, *J* = 20.3 Hz, CH), 87.1 (d, *J* = 174.0 Hz, CH₂), 115.7 (d, *J* = 21.8 Hz, 2CH), 128.2 (d, *J* = 8.3 Hz, 2CH), 134.1 (dd, *J* = 7.5, 2.3 Hz, C), 162.8 (d, *J* = 245.3 Hz, C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -113.7, -220.6

1-(4-Clorofenil)-2-fluoroetan-1-ol (18c)



Fórmula empírica: C₈H₈ClFO

Peso molecular: 174.60 g/mol

Aspecto: Aceite amarillo

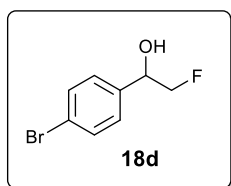
Rendimiento: 65% R_f (20% AcOEt/hexano): 0.44

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.88 (s, 1H), 4.26-4.57 (m, 2H), 4.97 (dd, J = 13.9, 8.5 Hz, 1H), 7.33 (m, 4H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 72.4 (d, J = 20.3 Hz, CH), 87.0 (d, J = 174.0 Hz, CH₂), 127.8 (2CH), 128.9 (2CH), 134.3 (C), 136.8 (d, J = 8.3 Hz, C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -221.0

1-(4-Bromofenil)-2-fluoroetan-1-ol (18d)



Fórmula empírica: C₈H₈BrFO

Peso molecular: 219.05 g/mol

Aspecto: Aceite amarillo

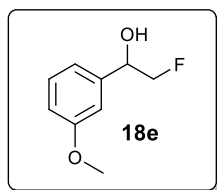
Rendimiento: 50% R_f (20% AcOEt/hexano): 0.43

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.90 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 4.28-4.59 (m, 2H), 4.98 (m, 1H), 7.27 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.52 (d, J = 8.5 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 72.4 (d, J = 19.5 Hz, CH), 86.9 (d, J = 174.0 Hz, CH₂), 122.4 (C), 128.1 (2CH), 131.9 (2CH), 137.3 (d, J = 8.3 Hz, C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -221.0

2-Fluoro-1-(3-metoxifenil)etan-1-ol (18e)



Fórmula empírica: C₉H₁₁FO₂

Peso molecular: 170.18 g/mol

Aspecto: Aceite naranja

Rendimiento: 96% **R_f** (20% AcOEt/hexano): 0.33

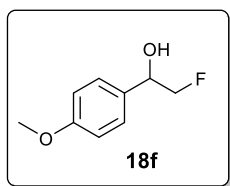
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.79 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 4.29-4.60 (m, 2H), 4.98 (ddd, *J* = 12.0, 9.0, 3.0 Hz, 1H), 6.86 (m, 1H), 6.94 (m, 2H), 7.28 (m, 1H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 55.4 (CH₃), 73.0 (d, *J* = 19.5 Hz, CH), 87.3 (d, *J* = 174.0 Hz, CH₂), 112.0 (CH), 114.0 (CH), 118.7 (CH), 129.8 (CH), 140.0 (d, *J* = 8.3 Hz, C), 159.9 (C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -220.6

Rotación óptica específica: $[\alpha]_D^{20} = -23.6$ (*c* 0.9, CHCl₃, 94% *ee* (*R*)-**8e**); bibliografía $[\alpha]_D^{20} = +42.3$ (*c* 1.85, CHCl₃, >99% *ee* (*S*)-**8e**)^{123b}

2-Fluoro-1-(4-metoxifenil)etan-1-ol (18f)



Fórmula empírica: C₉H₁₁FO₂

Peso molecular: 170.18 g/mol

Aspecto: Aceite naranja

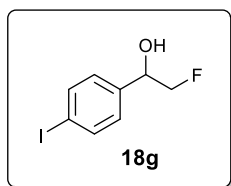
Rendimiento: 70% *R_f* (20% AcOEt/hexano): 0.32

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.63 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 4.29-4.56 (m, 2H), 4.96 (ddd, *J* = 12.0, 9.0, 3.0 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 55.4 (CH₃), 72.7 (d, *J* = 19.5 Hz, CH), 87.3 (d, *J* = 173.3 Hz, CH₂), 114.2 (2CH), 127.8 (2CH), 130.4 (d, *J* = 9.0 Hz, C), 159.8 (C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -220.0

2-Fluoro-1-(4-yodofenil)etan-1-ol (18g)



Fórmula empírica: C₈H₈FIO

Peso molecular: 266.05 g/mol

Aspecto: Aceite amarillo

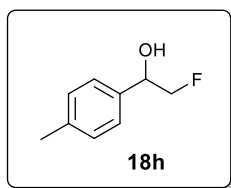
Rendimiento: 41% *R_f* (20% AcOEt/hexano): 0.42

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.77 (s ancho, 1H), 4.25-4.57 (m, 2H), 4.95 (m, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 72.5 (d, *J* = 20.3 Hz, CH), 86.9 (d, *J* = 174.0 Hz, CH₂), 94.1 (C), 128.3 (2CH), 137.8 (2CH), 138.0 (C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -221.0

2-Fluoro-1-(4-metilfenil)etan-1-ol (18h)



Fórmula empírica: C₉H₁₁FO

Peso molecular: 154.18 g/mol

Aspecto: Aceite blanco

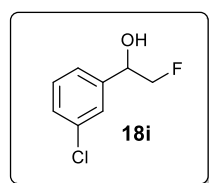
Rendimiento: 30% *R_f* (20% AcOEt/hexano): 0.47

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.46 (s, 3H), 4.40-4.69 (m, 2H), 5.10 (ddd, *J* = 12.0, 9.0, 3.0 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 21.3 (CH₃), 73.0 (d, *J* = 20.3 Hz, CH), 87.3 (d, *J* = 173.3 Hz, CH₂), 126.4 (2CH), 129.5 (2CH), 135.3 (d, *J* = 7.5 Hz, C), 138.4 (C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -220.3

1-(3-Clorofenil)-2-fluoroetan-1-ol (18i)



Fórmula empírica: C₈H₈ClFO

Peso molecular: 174.60 g/mol

Aspecto: Aceite amarillo

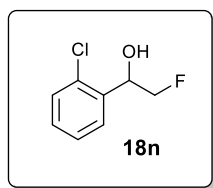
Rendimiento: 79% *R_f* (20% AcOEt/hexano): 0.49

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.30 (s, 1H), 4.25-4.56 (m, 2H), 4.93 (ddd, *J* = 12.0, 9.0, 3.0 Hz, 1H), 7.20-7.38 (m, 4H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 72.3 (d, *J* = 20.3 Hz, CH), 86.8 (d, *J* = 173.3 Hz, CH₂), 124.6 (CH), 126.6 (CH), 128.6 (CH), 130.0 (CH), 134.6 (C), 140.4 (d, *J* = 8.3 Hz, C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -221.4

1-(2-Clorofenil)-2-fluoroetan-1-ol (18n)



Fórmula empírica: C₈H₈ClFO

Peso molecular: 174.60 g/mol

Aspecto: Aceite amarillo

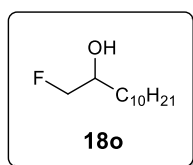
Rendimiento: 16% *R_f* (100% CH₂Cl₂): 0.41

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.66 (s, 1H), 4.24-4.77 (m, 2H), 5.48 (ddd, *J* = 12.0, 9.0, 3.0 Hz, 1H), 7.28-7.40 (m, 3H), 7.66 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 70.0 (d, *J* = 21.0 Hz, CH), 85.8 (d, *J* = 174.0 Hz, CH₂), 127.4 (CH), 128.0 (CH), 129.5 (CH), 129.6 (CH), 132.2 (C), 135.7 (d, *J* = 8.3 Hz, C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -221.9

1-Fluorododecan-2-ol (18o)



Fórmula empírica: C₁₂H₂₅FO

Peso molecular: 204.33 g/mol

Aspecto: Aceite amarillo

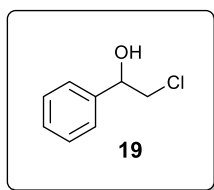
Rendimiento: 46% *R_f* (20% EtOAc/hexano): 0.49

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.87 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.28 (m, 16H), 1.45 (m, 2H), 4.16-4.51 (m, 3H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 14.2 (CH₃), 22.8 (CH₂), 25.5 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.6 (3CH₂), 29.7 (CH₂), 31.9 (CH₂), 32.0 (CH₂), 70.7 (d, *J* = 18.8 Hz, CH), 87.2 (d, *J* = 167.3 Hz, CH₂)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -228.2

2-Cloro-1-feniletan-1-ol (19)



Fórmula empírica: C₈H₉ClO

Peso molecular: 156.61 g/mol

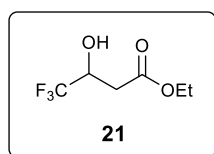
Aspecto: Aceite amarillento

Rendimiento: 80% **R_f** (30% Et₂O/hexano): 0.38

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.32 (s, 1H), 3.60-3.73 (m, 2H), 4.86 (dd, *J* = 6.4, 1.9 Hz, 1H), 7.38 (m, 5H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 50.6 (CH₂), 74.0 (CH), 126.1 (2CH), 128.4 (CH), 128.6 (2CH), 140.1 (C)

4,4,4-Trifluoro-3-hidroxibutanoato de etilo (21)



Fórmula empírica: C₆H₉F₃O₃

Peso molecular: 186.13 g/mol

Aspecto: Aceite amarillo

Rendimiento: 90% **R_f** (20% Et₂O/hexano): 0.59

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.28 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H), 2.62-2.76 (m, 2H), 3.75 (c, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.21 (c, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.37-4.48 (m, 1H)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 13.9 (CH₃), 35.1 (CH₂), 61.7 (CH₂), 67.1 (c, *J* = 31.5 Hz, CH), 124.7 (c, *J* = 279.8 Hz, C), 171.0 (C)

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃) δ (ppm) -80.2

CONCLUSIONES GENERALES

En esta Tesis Doctoral se ha explorado la síntesis de distintas familias de compuestos fluorados, familia de compuestos con gran aplicación en química medicinal. Para ello, se han empleado distintos biocatalizadores como las transaminasas, aminosas reductivas y alcohol deshidrogenasas. Los resultados obtenidos demuestran como pequeños cambios estructurales en un compuesto orgánico (por ejemplo, el número de átomos de flúor en posición α a un grupo carbonilo), puede afectar en gran medida a la reactividad de un biocatalizador.

En el Capítulo 1 se ha descrito la promiscuidad catalítica mostrada por las transaminasas en presencia de sustratos fluorados. Así, partiendo de una serie de β -fluoroaminas racémicas se ha llevado a cabo su resolución cinética mediante un proceso en cascada de hidrodesfluoración y desaminación, obteniendo las correspondientes cetonas y las β -fluoroaminas remanentes de manera enantiopura, sin necesidad de añadir un aceptor de amina. Empleando dos transaminasas de estereopreferencia contraria, como son la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* y la transaminasa de *Arthrobacter* sp., ha sido posible obtener las aminas de configuración S o R, respectivamente. Por otro lado, se ha observado un proceso de inhibición enzimática, por lo que se ha propuesto un mecanismo que diera cuenta tanto de dicha inhibición como de las reacciones de deshalogenación y desaminación. Dicho mecanismo fue confirmado gracias a la elucidación de la estructura de un aducto covalente proveniente de una de las β -fluoroaminas estudiadas unida a la proteína mediante experimento de difracción de rayos X.

En el Capítulo 2 se ha profundizado en la promiscuidad catalítica mostrada por las transaminasas en el capítulo anterior. De este modo se ha desarrollado una metodología de hidrodesfluoración de varias α -fluorocetonas en medio acuoso y condiciones suaves de reacción en presencia de la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* empleando una cantidad estequiométrica de, por ejemplo 2-propilamina, dando lugar a acetona, amoníaco y HF como subproductos. Esta transformación resultó ser quimioselectiva (reacción de un enlace C–F vs un enlace C=O), regioselectiva (se pudo romper un enlace C–F alifático frente a un enlace C–F aromático) y estereoselectiva (se llevó a cabo la desfluoración preferentemente sobre un enantiómero de un compuesto quiral fluorado). Asimismo, se ha contemplado la posibilidad de la ampliación de esta metodología a otros procesos de hidrodeshalogenación, como la reducción del enlace C–Cl en la α -cloroacetofenona.

En el Capítulo 3 se ha estudiado la reactividad de una serie de 2,2-difluoro-1-(hetero)ariletan-1-onas en presencia de transaminasas o aminosas reductivas. Así, se han obtenido las correspondientes aminas de manera enantiopura a través de dos aproximaciones enzimáticas complementarias. La presencia de dos átomos de flúor en la posición α al carbonilo de las cetonas ha tenido una gran influencia en el comportamiento enzimático. Por un lado, en el caso de las TAs y a diferencia de lo que ocurría con los sustratos monofluorados, se ha favorecido la formación de las aminas en lugar de dar lugar a los procesos de hidrodesfluoración, observando además que dicho proceso se encontraba favorecido termodinámicamente, puesto que las biotransformaciones se llevaron a cabo utilizando un pequeño exceso del donador de amina. Por otro lado, cuando se emplearon distintas RedAms en presencia de la 2,2-difluoroacetofenona y distintos donadores de amino para la síntesis selectiva de aminas difluoradas primarias y secundarias, se ha observado la formación de mezclas de la β,β -difluoroamina y del β,β -difluoroalcohol, mostrando estos enzimas también una actividad inesperada con este tipo de sustratos.

Finalmente, en el Capítulo 4 se ha sintetizado un panel amplio de halohidrininas de manera estereoselectiva utilizando una ADH de selectividad Prelog y dependiente de NADP proveniente de la levadura de *Pichia glucozyma*. Partiendo de las correspondientes cetonas mono, di, o trihalogenadas en posición α y tras la optimización de algunos de los parámetros de la reacción como la concentración del sustrato o la posible adición de un cosolvente orgánico, se ha llevado a cabo con éxito su reducción selectiva. Además, ha sido posible el empleo del enzima tanto en su forma purificada como en una preparación de células enteras liofilizadas, mostrándose la versatilidad de este biocatalizador a la hora de llevar a cabo reducciones enzimáticas de α -halocetonas proquirales.

Como conclusión final, se ha demostrado en el transcurso de esta Tesis Doctoral el gran potencial que tienen los biocatalizadores aplicados a la síntesis de derivados orgánicos fluorados, en especial si es necesaria la introducción de quiralidad en el producto final. Asimismo, se ha expuesto la especial reactividad que presentan los compuestos fluorados con enzimas dependientes de PLP y de NAD(P), lo que abre la puerta al desarrollo de procesos sintéticos selectivos en condiciones suaves de reacción y en medios acuosos.

REFERENCIAS CRUZADAS

CAPÍTULO 1

6. (d) D. L. Hughes, *Org. Process Res. Dev.* **2018**, 22, 1063-1080.
25. (a) J. F. Rocha, A. F. Pina, S. F. Sousa, N. M. F. S. A. Cerqueira, *Catal. Sci. Technol.* **2019**, 9, 4864-4876; (b) S. A. Kelly, S. Pohle, S. Wharry, S. Mix, C. C. R. Allen, T. S. Moody, B. G. Gilmore, *Chem. Rev.* **2018**, 118, 349-367; (c) M. D. Patil, G. Grogan, A. Bommarius, H. Yun, *Catalysts* **2018**, 8, 254; (d) A. Gomm, E. O'Reilly, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, 43, 106-112; (e) E. E. Ferrandi, D. Monti, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, 34, 13-22; (f) F. Guo, P. Berglund, *Green Chem.* **2017**, 19, 333-360; (g) I. Slabu, J. L. Galman, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2017**, 7, 8263-8284.
31. (c) D. Pressnitz, C. S. Fuchs, J. H. Sattler, T. Knaus, P. Macheroux, F. G. Mutti, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2013**, 3, 555-559; (e) D. Koszelewski, M. Göritzer, D. Clay, B. Seisser, W. Kroutil, *ChemCatChem* **2010**, 2, 73-77.
68. (a) D. O'Hagan, H. Deng, *Chem. Rev.* **2015**, 115, 634-649; (b) D. B. Harper, D. O'Hagan, *Nat. Prod. Rep.* **1994**, 11, 123-133.
69. D. O'Hagan, C. Schaffrath, S. L. Cobb, J. T. G. Hamilton, C. D. Murphy, *Nature* **2002**, 416, 279.
70. L. Wu, F. Maglangit, H. Deng, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, 55, 119-126.
74. (a) J. Han, A. M. Remete, L. S. Dobson, L. Kiss, K. Izawa, H. Moriwaki, V. A. Soloshonok, D. O'Hagan, *J. Fluor. Chem.* **2020**, 239, 109639; (b) M. Reichel, K. Karaghiosoff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 12268-12281; (c) *Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnosis, and Agrochemicals*, Eds. G. Haufe, F. R. Leroux, Elsevier, Ámsterdam (Países Bajos), **2019**; (d) A. Harsanyi, G. Sandford, *Green Chem.* **2015**, 17, 2081-2086; (e) D. Barnes-Seeman, J. Beck, C. Springer, *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, 14, 855-864; (f) J. Wang, M. Sánchez-Roselló, J. L. Aceña, C. del Pozo, A. E. Sorochinsky, S. Fustero, V. A. Soloshonok, H. Liu, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 2432-2506; (g) S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 320-330; (h) H.-J. Böhm, D. Banner, S. Bendels, M. Kansy, B. Kuhn, K. Müller, U. Obst-Sander, M. Stahl, *ChemBioChem* **2004**, 5, 637-643.

75. (a) B. M. Johnson, Y.-Z. Shu, X. Zhuo, N. A. Meanwell, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 6315-6386; (b) N. A. Meanwell, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 5822-5880; (c) E. P. Gillis, K. J. Eastman, M. D. Hill, D. J. Donnelly, N. A. Meanwell, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8315-8359.

CAPÍTULO 2

96. P. Storici, J. Qiu, T. Schirmer, R. B. Silverman, *Biochemistry* **2004**, *43*, 14057-14063.

98. (a) R. B. Silverman, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 4037-4070; (b) S. M. Nanavati, R. B. Silverman, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2413-2421.

99. B. Lippert, B. W. Metcalf, R. J. Resvick, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *108*, 146-152.

117. C. E. Paul, M. Rodríguez-Mata, E. Busto, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, S. García-Cerrada, J. Mendiola, Ó. de Frutos, I. Collado, *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 788-792.

118. U. Kaulmann, K. Smithies, M. E. B. Smith, H. C. Hailes, J. M. Ward, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 628-637.

122. Dícese de la catálisis debida a aminoácidos que no forman parte del centro activo del enzima y que por lo tanto no intervienen en la reacción natural para la cual han sido diseñados.

123. (a) C. Zizhan, W. Zhu, Z. Zheng, X. Zou, *J. Fluor. Chem.* **2010**, *131*, 340-344; (b) W. Borzęcka, I. Lavandera, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7312-7317.

126. A. Cuetos, M. García-Ramos, E.-M. Fischereider, A. Díaz-Rodríguez, G. Grogan, V. Gotor, W. Kroutil, I. Lavandera, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3144-3147.

CAPÍTULO 3

31. (c) D. Pressnitz, C. S. Fuchs, J. H. Sattler, T. Knaus, P. Macheroux, F. G. Mutti, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2013**, 3, 555-559; (e) D. Koszelewski, M. Göritzer, D. Clay, B. Seisser, W. Kroutil, *ChemCatChem* **2010**, 2, 73-77.
37. (b) W. Böhmer, A. Volkov, K. E. Cassimjee, F. G. Mutti, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, 362, 1858-1867.
80. A. Amadasi, M. Bertoldi, R. Contestabile, S. Bettati, B. Cellini, M. L. di Salvo, C. Borri-Voltattorni, F. Bossa, A. Mozzarelli, *Curr. Med. Chem.* **2007**, 14, 1291-1324.
90. R. B. Silverman, M. A. Levy, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 815-818.
92. P. Bey, M. J. Jung, F. Gerhart, D. Schirlin, V. Van Dorsselaer, P. Casara, *J. Neurochem.* **1981**, 37, 1341-1344.
93. R. B. Silverman, B. J. Invergo, *Biochemistry* **1986**, 25, 6817-6820.
94. D. Schirlin, S. Baltzer, J.-G. Heydt, M. J. Jung, *J. Enzyme Inhib.* **1987**, 1, 243-258.
98. (a) R. B. Silverman, *Chem. Rev.* **2018**, 118, 4037-4070; (b) S. M. Nanavati, R. B. Silverman, *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 2413-2421.
100. C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Branz, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, 329, 305-309.
115. D. González-Martínez, A. Cuetos, M. Sharma, M. García-Ramos, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, G. Grogan, *ChemCatChem* **2020**, 12, 2421-2425.
120. (a) F. G. Mutti, C. S. Fuchs, D. Pressnitz, J. H. Sattler, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 3227-3233.
121. F. G. Mutti, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 3409-3413.
123. (b) W. Borzęcka, I. Lavandera, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 7312-7317.

CAPÍTULO 4

72. (c) S. Fustero, D. M. Sedgwick, R. Román, P. Barrio, *Chem. Commun.* **2018**, 54, 9706-9725.

123. (b) W. Borzęcka, I. Lavandera, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 7312-7317.

165. S.-W. Wu, F. Liu, *Org. Lett.* **2016**, 18, 3642-3645.